

**Zur Signalausbreitung und Konvergenz
im Dendritensystem
am Beispiel der elektrosensorischen
Afferenz des clusterbildenden
Welses *Schilbe mystis***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von Jan Eschrich
aus München
November 2002

**Zur Signalausbreitung und Konvergenz
im Dendritensystem
am Beispiel der elektrosensorischen
Afferenz des clusterbildenden
Welses *Schilbe mystis***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von Jan Eschrich
aus München
November 2002

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Roth

2. Berichterstatter: Prof: Dr. P. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2003

Herrn Prof. Dr. Anton Roth danke ich für die freundschaftliche Aufnahme und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Einführung in das Arbeitsgebiet, die Unterstützung über die Jahre sowie die gewährte Selbständigkeit bei Themenwahl und Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Peter Schlegel möchte ich meinen Dank aussprechen für seinen großen Einsatz und die Unterstützung besonders in der Abschlußphase dieser Arbeit.

Bei Frau Jindriska Cihakova bedanke ich mich herzlich für die angenehme Zusammenarbeit und ihre tatkräftige und freundschaftliche Unterstützung.

Leif-Erik Dahlem will ich meine Anerkennung aussprechen für seine Begeisterungsfähigkeit, sein außergewöhnliches Interesse und seine Neugier an Diskussionen und bei den ihm übertragenen Arbeiten.

Herrn Zaszka und den Mitarbeitern der Werkstätten des Zoologischen Instituts gilt mein Dank für die akkurate Umsetzung beim Bau der notwendigen Geräte und Vorrichtungen.

Herrn Prof. Dr. Peter Fromherz und Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe bin ich dankbar für anregende persönliche Diskussionen und die Einladung zur Vorstellung meiner Arbeit im Rahmen eines Institutscolloquiums am Max-Planck-Institut Martinsried.

Auch meinen Eltern gilt besonderer Dank für die persönlichen und finanziellen Zuwendungen, ohne die die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhalt

1. Zusammenfassung	11
2. Einleitung	15
3. Ergebnisse	41
3.1 Untersuchungen zur Morphologie	41
3.2 Statistische Untersuchung des Interspike-Intervalls	54
3.3 Amplitudenvergleich innerhalb eines Clusters	60
3.4 Präparationsversuche	63
3.5 Theoretische Abschätzung der Signalausbreitung in der Endarborisation	66
3.6 Progressive TTX-Vergiftung	67
3.6.1 Vorversuche zur TTX-Vergiftung	75
3.6.2 Proximale TTX-Vergiftung	77
3.6.3 Distale TTX-Applikation	81
3.6.4 Vergleich der Applikationssituationen	85
3.7 Spannungssensitive Farbstoffe	86
3.8 Kathodische Inhibition	88
3.9 Korrelation zwischen Interspike-Intervall und Spikeamplitude	94
4. Diskussion	103
4.1 Untersuchung der Morphologie	103
4.2 Statistische Untersuchung des Interspike-Intervalls	121

4.3	Amplitudenvergleich innerhalb eines Clusters	127
4.4	Kathodische Inhibition	132
4.5	Korrelation zwischen Interspike-Intervall und Spikeamplitude	145
4.6	Progressive TTX-Vergiftung	150
4.6.1	Vorüberlegung	150
4.6.2	Proximale TTX-Applikation	161
4.6.3	Distale TTX-Applikation	165
4.6.4	Bestimmung der Empfindlichkeit	170
4.7	Gesamtdiskussion der Ergebnisse	174
5.	Material und Methoden	189
5.1	Abkürzungen und Begriffsdefinitionen	189
5.2	Versuchstiere	191
5.3	Allgemeines zur Methodik der Elektrophysiologie	195
5.3.1	Vorbemerkungen	195
5.3.2	Allgemeines zur Systemvariabilität	198
5.3.3	Stimulationsfeldbedingungen	200
5.3.4	Stimulations- und Erdungselektroden	208
5.3.5	Stimulationsgeräte	211
5.3.6	Abschirmung und Störungskontrolle	213
5.3.7	Interspike-Intervall-Variabilität durch exogene Störungen	215
5.3.8	Ableitelektrode	217
5.3.9	Vorverstärker	225
5.3.10	Signalaufbereitung und Registrierung	227
5.3.11	Mikroapplikation von DASPEI und TTX	230
5.3.12	Betäubung der Versuchstiere, Einfluß und Evasion des Narkotikums	232

5.3.13	Kontrolle abiotischer Einflußfaktoren	234
5.3.14	Tierbefestigung, Mikromanipulator und Ableitung	236
5.3.15	Lichtführung und Beleuchtungsanordnung bei Binokularkontrolle	239
5.3.16	Geräteentwicklung	242
5.4	Spezielle Methoden	244
5.4.1	Morphologie	244
5.4.2	Interspike-Intervall-Statistik	248
5.4.3	Amplitudenvergleich	251
5.4.4	TTX-Vergiftung	255
5.4.5	Kathodische Inhibition	263
5.4.6	Korrelation zwischen Interspike-Intervall (ISI) und Spikeamplitude	264
5.5	Anhang: Dokumentation der Schaltungen	264
6.	Literatur	279

1. Zusammenfassung

Hintergrund:

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die im Rahmen eigener Vorversuche beobachtete Diskrepanz zwischen morphologischen Gegebenheiten und physiologischen Befunden im Dendritensystem der elektrosensorischen Afferenz der clusterbildenden Elektrorezeptoren beim Wels *Schilbe mystis*. Die Widersprüche scheinen bei eingehender neurophysiologischer Analyse mit klassischen Theorien nicht erklärbar und wurden bislang noch in keiner veröffentlichten Studie genauer untersucht oder diskutiert; sie manifestierten sich z.B. in folgenden einfachen Beobachtungen: Die elektrosensorische Afferenz bildet beim Wels *Schilbe mystis* ausgedehnte Dendritenstrukturen mit mehreren Millimetern Erstreckung, deren Funktionieren nur auf der Basis aktiv über die Dendritenästchen fortgeleiteter Aktionspotentiale erklärbar scheint. Wie sich aus der Analyse eigener Vorversuche ergab, wäre dies jedoch schwer mit den hochregelmäßigen Aktivitätsmustern der afferenten Faser (sehr geringe Streuung des Interspike-Intervalls) und der konvergenzproportionalen Empfindlichkeitserhöhung im Cluster vereinbar, deren Koinzidenz eine Superposition graduerter Potentiale nahelegt und damit einer Fortleitung von Aktionspotentialen widersprechen würde.

Das Auftreten von Konvergenz mehrerer, über ein Hautareal ver-

teilter ampullärer Rezeptororgane auf eine afferente Nervenfasern, die sog. »Clusterbildung«, wurde erstmals in den Arbeiten von Peters & Mast (1983) und Zakon (1984) eingehend untersucht; alle bisherigen Veröffentlichungen (*ibid.*, insbes. auch Peters & van Ieperen 1989a, Teunis *et al.* 1990b, Bretschneider & Peters 1992, Peters *et al.* 1997a) beschäftigten sich jedoch nur phänomenologisch mit den Auswirkungen von Clusterbildung auf Funktion und Leistungsfähigkeit des elektrosensorischen Sinnessystems. Dabei erbrachten die bisherigen Studien z.T. einander widersprechende Ergebnisse und gelangten damit auch zu unterschiedlichen Schlußfolgerungen über die physiologischen Mechanismen. Diese Unstimmigkeiten betrafen insbesondere den Einfluß der Konvergenz auf die Empfindlichkeit, auf das Signal/Rausch-Verhältnis und den Frequenzgang, den mutmaßlichen Ort der Aktionspotential-Bildung, die Korrelation zwischen den Parametern Empfindlichkeit, Spontanaktivität und »Rauschen«, den Ursprung des »Rauschens«, sowie die Adaptationsmechanismen und die Einstellung der Ruhefrequenz bei zunehmender Konvergenz und Vergrößerung des Clusters (auch Andrianov *et al.* 1996). Während Funktion und Rezeptormechanismus der singulären ampullären Rezeptororgane und Synapsen bereits gut erforscht sind und alle Prozesse ab der Bildung von Aktionspotentialen in der afferenten Faser ebenso als bekannt gelten, konnten bei Clusterbildnern die Schritte der Fortleitung und Überlagerung postsynaptischer Signale, die in Dendriten bei der Konvergenz sensorischer »Inputs« ablaufen, in den bisherigen Untersuchungen noch nicht geklärt werden und sind deshalb Gegenstand vorliegender Arbeit.

Problemstellung, Ergebnisse und Schlußfolgerungen:

1. Die Morphologie des ausgedehnten Dendritensystems spricht nach gängiger Lehrmeinung für eine synapsennahe Aktionspotentialbildung und saltatorische Erregungsleitung im Dendritenbaum.

Bei Welsen der Spezies *Schilbe mystis* läßt sich im elektrosensorischen System eine Konvergenz mehrerer, im Laufe der Ontogenie in ihrer Zahl zunehmender (bis zu ca. 30) ampullärer Rezeptororgane eines sog. Clusters auf eine primäre afferente Nervenfasernachweisen (Peters & Mast 1983 (*Clarias lazera*), Roth, unveröffentl. Beobachtungen (*Schilbe mystis*)). In der vorliegenden Arbeit an *Schilbe mystis* wurden zwei morphologische Grundtypen der Clusterinnervierung gefunden: STERN- bzw. BÄUMCHENFÖRMIG; bei Clustern vom »Bäumchentyp« an der Analflossenbasis wurden Konvergenzareale mit Längen von bis zu 2mm beobachtet (größter Abstand zwischen 2 Ampullen, die von einer Afferenz versorgt werden) - in Einzelfällen auch etwas darüber. Die Dendriten weisen über ihre gesamte Erstreckung Myelinisierung auf mit u.a. atypisch kurzen Internodienabständen von typischerweise nur etwas mehr als 10µm bei einem Faserdurchmesser von gut 1µm und können relativ große Längen von bis zu ca. 3mm erreichen (der längste Dendritenast ist stets etwas länger als der Abstand zwischen den beiden entferntesten Ampullen dieses Clusters). Dabei treten sehr unterschiedliche Dendritenlängen innerhalb eines Clusters auf, die um mehr als den Faktor zehn differieren können (s. Abb. 1.1). Es ergibt sich aus diesen Beobachtungen, daß innerhalb eines Clusters vom Bäumchentyp die Dendriten mit sehr verschiedener Länge bei einer wahrscheinlichen Längskonstante von wenigen hundert Mikrometern

sehr unterschiedliche elektrische Eigenschaften (Wirkwiderstand = Resistanz R , Kapazität C , Scheinwiderstand = Impedanz Z) besitzen müssen. Myelinisierung, Dendritendimensionen, sowie die Länge und Unterschiedlichkeit der Fortleitungsstrecke lassen nach klassischer Lehrmeinung (Lehrbücher der Physiologie) eine synapsennahe Aktionspotentialbildung und saltatorische Fortleitung der Erregung innerhalb der Dendriten erwarten.

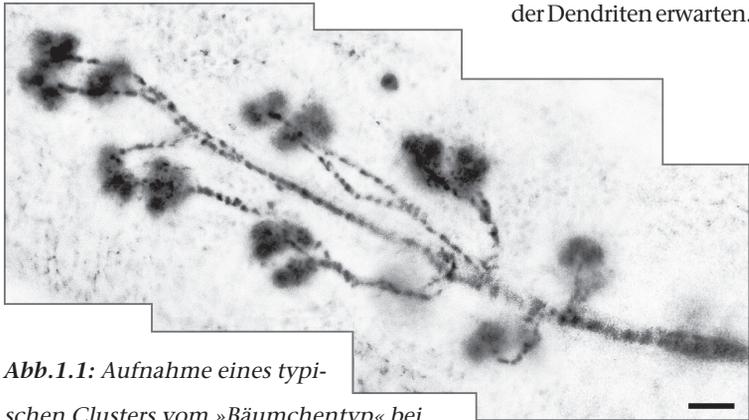


Abb.1.1: Aufnahme eines typischen Clusters vom »Bäumchentyp« bei Schilbe mystis, DASPEI-Färbung, konfokales Laserscanningmikroskop (Balken = 100 μm). Deutlich zu erkennen ist die Verzweigungsstruktur des Dendritenbaums und die Myelinisierung der Dendriten (= Abb. 3.1.1).

2. Die hoch regelmäßige Impulsaktivität deutet auf einen einheitlichen Impulsenstehungsort hin.

Ampulläre Elektrorezeptoren sind spontanaktiv und generieren in der afferenten Faser Aktionspotentiale in sehr regelmäßiger Abfolge; die statistische Auswertung des Interspike-Intervalls (*Abb. 1.2*) weist eine eingipflige, schmale, symmetrische Verteilung auf ($s = 7\%$).

Eine Verteilung wie diese zeigt einen einzigen stabilen und invarianten Grundrhythmus, der auf der ausschließlichen Aktivität oder

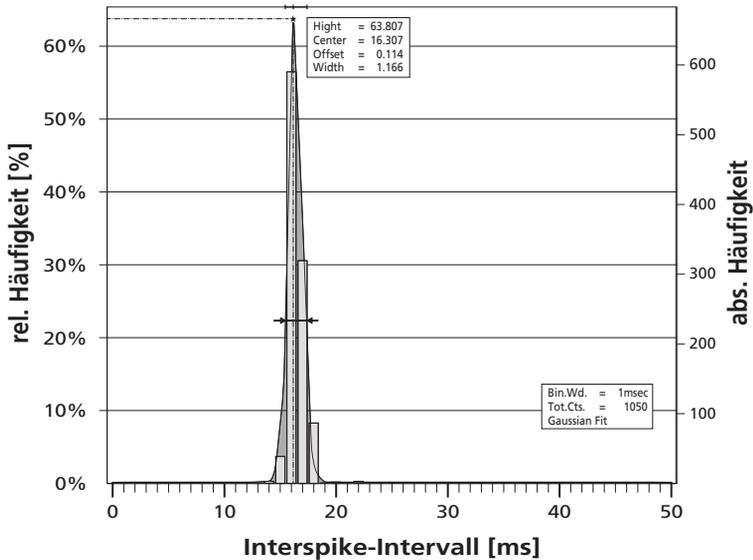


Abb.1.2: Interspike-Intervallhistogramm der Spontanaktivität bei Schilbemystis. Klassenbreite = 1 ms, $n = 1050$ (= Abb. 3.2.1, mod.).

Dominanz eines singulären »Rhythmusgebers« beruhen muß, und ist mit der Existenz mehrerer ungekoppelter, in den einzelnen Dendriten lokalisierter Impulstehungsorte nicht zu vereinbaren. Dieses Ergebnis kann aufgrund von Befunden (Peters & Mast 1983, van Dongen & Bretschneider 1984, Peters & van Ieperen 1989, Peters *et al.* 1997a u.a.) zur Empfindlichkeitserhöhung innerhalb des Clusterverbands nur mit monozentrischer Erregungsbildung im Axon – am Beginn der gemeinsamen Faser zentral der proximalsten, basalen Ramifikation – gedeutet werden. Diese Schlußfolgerung, die durch die später durchgeführten progressiven TTX-Blockierungsexperimente dieser Arbeit (s. Pkt. 6) eindeutig bestätigt wird, widerlegt damit die zur Erklärung der Systemfunktion wiederholt herangezogene sog. »Kollisionstheorie«.

Diese versucht eine Synchronisierung der Aktionspotentiale an mehreren synapsennahen Entstehungsorten auf der Basis fortgeleiteter Erregung in der gesamten Endarborisation, ausgelöst durch das jeweils empfindlichste Organ, zu erklären (Murray & Capranica 1973, Holden 1976, Pabst 1977, Sanchez & Zakon 1990, Teunis *et al.* 1990b, Bretschneider & Peters 1992, Longtin & Racicot 1996). Damit besteht ein klarer Widerspruch zwischen der morphologisch naheliegenden Forderung nach synapsennaher Aktionspotential-Bildung und dem physiologisch begründeten Postulat monozentrischer Erregungsbildung im Axonstamm.

3. Die Unabhängigkeit der Aktionspotentialamplitude von den passiven elektrischen Eigenschaften der Dendritenstrecke spricht für eine aktive Erregungsbildung nahe der Dendritenendigung oder für aktive retrograde Invasion.

Der Vergleich der an verschiedenen Orten innerhalb eines Clusters meßbaren Aktionspotentialamplituden zeigt keinerlei signifikanten Unterschied zwischen Aktionspotentialen, die – nahe oder fern ihres mutmaßlichen Entstehungsortes – von proximal bzw. distal innerhalb des Clusters gelegenen Organampullen abgeleitet wurden (*Abb. 1.3*).

Berechnet man die elektrotonische Stromausbreitung im Dendriten auf der Basis des statischen bzw. dynamischen Kabelmodells, so müßte sich eine extreme Abschwächung der Amplituden von EPSPs oder auch Aktionspotentialen bereits nach sehr kurzen Fortleitungsdistanzen von weit weniger als einem Millimeter zeigen (*Abb. 4.1.1, S. 98, Abb. 4.3.1, S. 110*). Das hier gemessene Ergebnis widerspricht somit im Falle monozentrischer Erregungsbildung im Axonstamm klar einer passiven Ausbreitung der Aktionspotentiale in der Endarborisation, und ist nur mit einer aktiven retrograden Invasion vom Aktionspo-

tentialentstehungsort in die Endarborisation hinein erklärbar. Dieses Postulat wird u.a. auch in den später durchgeführten Experimenten durch die progressive Blockierung mit TTX eindeutig bestätigt.

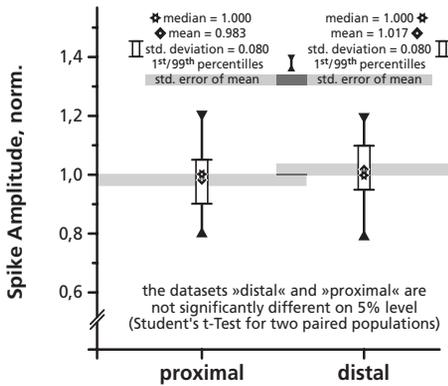


Abb.1.3: Vergleich der im Ampullenlumen abgreifbaren Aktionspotentialamplituden zwischen proximal und distal gelegenen Clusterorganen bei Schilbe mystis. Die Mittelwerte der Aktionspotentialamplituden unterscheiden sich nur geringfügig

(nicht-signifikant verschieden auf 5%-Niveau), die Standardfehler der Mittelwerte überlappen sich gerade noch (NB: die größeren Amplituden wurden an distalen Organen nach längerer Fortleitungsstrecke gemessen). (= Abb. 3.3.1)

4. Das Wiedereinsetzen der Spontanaktivität nach starken lumen-negativen Stimuli beruht auf einem dendritenlokalisierten Adaptationsprozeß, der maßgeblich von der Aktivität TTX-blockierbarer Natriumkanäle abhängt.

Es gibt während der elektrischen Konstantstromreizung mit weit über dem dynamischen Arbeitsbereich des Rezeptorsystems liegenden kathodischen (lumen-negativen) Intensitäten, der sog. »kathodischen Inhibition« (= *cathodal inhibition*, vgl. Bretschneider *et al.*, 1980), nach der zu erwartenden anfänglichen vollständigen Unterdrückung der Nervenimpulse eine oft langanhaltende, plateauartige Zwischenphase, in der eine leicht reduzierte, sehr regelmäßige Spontanaktivität

bei Fehlen jeglicher Empfindlichkeit selbst für sehr starke, supermaximale Reize auftritt. Die Rückkehr der Empfindlichkeit nach dieser Phase erfolgt – bis zur vollständigen Wiederherstellung der ursprünglichen Spontanaktivität und Empfindlichkeit – anisotrop, d.h. das Rezeptorsystem reagiert zunächst nur mit einer Zunahme der Aktivität bei anodischer Reizpolarität (Erregung), aber nicht (oder nur in geringem Umfang) mit einer Abnahme bei kathodischer Polarität (Abb. 1.4).

Diese Anpassung des Systems an die veränderten Potentialbedingungen während supermaximaler DC-Reizung verläuft somit in zwei Schritten – einem schnellen (innerhalb weniger Sekunden), der die regelmäßige, reizunabhängige Aktivität wiederherstellt und auf hohem Niveau stabilisiert, und einem langsamen (Minuten- bis Stunden-Bereich), der schließlich die Reizempfindlichkeit zurückbringt – und setzt die Existenz wenigstens zweier adaptiver Mechanismen vor

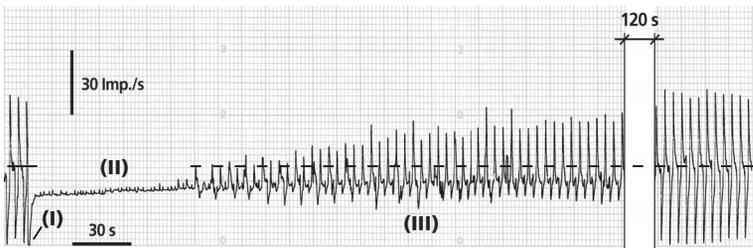


Abb.1.4: Typischer Verlauf eines »kathodischen Inhibitionsexperiments« bei *Schilbe mystis*: Vor Anlegen des »Inhibitions potentials« ist Spontanaktivität (gestrichelte Linie) und »Vollmodulation« auf den Teststimulus gegeben (Potentialhub des Testreizes moduliert die Aktivität der Afferenz gerade auf Null). Nach Zuschalten des Inhibitions potentials wird für einige Sekunden die Spikeaktivität vollständig unterdrückt (Phase I), danach tritt eine Plateauphase (II) auf. Die Wiederkehr der Empfindlichkeit in Phase (III) erfolgt deutlich anisotrop. (= Abb. 3.8.1)

der Bildung der Aktionspotentiale voraus. Durch Vergleiche mit Ergebnissen zum Ioneneinfluß (Roth 1971, Peters *et al.* 1975, Zhadan & Zhadan 1975, Bauswein 1977, Bretschneider *et al.* 1979 & 1980, Peters *et al.* 1997a) und zur chemisch-osmotischen Sinneszellentfernung (Roth 1973) muß man den primären, schnelleren der beiden Adaptationsmechanismen in den Dendriten lokalisieren (Bretschneider *et al.* 1980, Peters *et al.* 1988b, Bretschneider & Peters 1992). Da nach TTX-Einwirkung auf distale Bereiche der Endarborisation diese Stabilisierung der Spikerate nicht stattfindet und die Spontanaktivität z.T. praktisch bis auf Null (im Mittel: 17% des Ausgangswertes) abfällt (*Abb. 3.6.7, S. 64*), der Adaptationsmechanismus also eindeutig unterdrückt wird, kann dieser Adaptationsschritt nur den dendritischen, spannungsgesteuerten und TTX-blockierbaren Natriumkanälen zugeordnet werden, wie sie auch für die Erregungsbildung und -fortleitung im Hodgkin-Huxley-Zyklus verantwortlich sind.

5. Die Korrelation zwischen Aktionspotentialamplitude und Interspike-Intervall läßt sich als Ausdruck EPSP-korrelierter potentialabhängiger Inaktivierung dendritischer Natriumkanäle deuten und zeigt einen aktiven Beitrag dieser Kanäle bei der Fortleitung der EPSPs an.

Es gibt eine augenfällige Korrelation zwischen Aktionspotentialamplitude und Interspike-Intervall: bei Stimulation der ampullären Elektrorezeptoren tritt mit zunehmender Spikerate in der afferenten Faser eine Verminderung der (ableitbaren) Aktionspotentialamplitude ein und umgekehrt (*s. Abb. 1.5, nächste Seite*). Zur Erklärung dieses Phänomens kommen nach gegenwärtigem Stand der Forschung lediglich Refraktärphänomene (verzögerte Reaktivierung der spannungsgesteuerten Natrium-

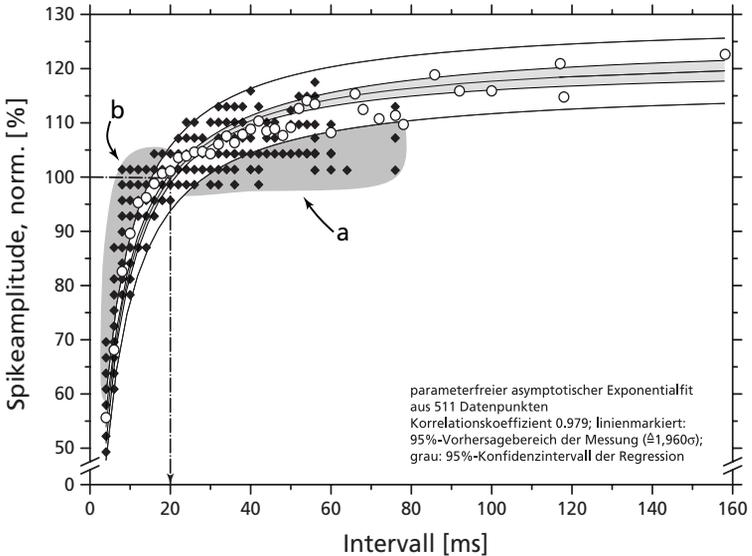


Abb.1.5: Korrelation zwischen Aktionspotentialamplitude und Interspike-Intervall bei Schilbe mystis. Symbole: schwarze Rauten = Einzelmeßwerte (NB: Meßwerte, die nahe der Regressionskurve liegen, sind oft mehrfach aufgetreten und beeinflussen die Mittelwertbildung daher stärker), offene Kreise = Mittelwerte der Spikeamplitude, die Spontanfrequenz (= 100%) liegt bei $49,5 \text{ s}^{-1}$ (entspr. 20,2 ms mittl. Interspike-Intervall). Je höher die Spikefrequenz, desto geringer ist die Aktionspotentialamplitude. Das Ergebnis ist bei Reizung im physiologischen Arbeitsbereich des Rezeptors unabhängig von der Reizsituation, das Korrelationsverhalten auf Einschalten eines anodischen Reizes ist nicht unterscheidbar von dem bei Ausschalten eines kathodischen Reizes. Die Amplituden der Spikes unmittelbar nach Stimulusbeginn fallen signifikant aus dem 95%-Vorhersagebereich der Messung heraus (grau hinterlegte Bereiche a, b) und weisen so bereits auf eine indirekte Kopplung beider Parameter hin (kombiniert aus Abb. 3.9.2 und 3.9.3). Weiteres siehe Text.

kanäle nach einem vorangegangenen Aktionspotential) oder die potentialabhängige Inaktivierung dieser Kanäle (durch intradendritischen Potentialanstieg unterhalb der Schwelle bedingte Verschiebung des Natriumkanalgleichgewichts zugunsten der nicht-aktivierbaren Konformation) in Betracht. Ein Zusammenhang mit Refraktärphänomenen in der Endarborisation kann aufgrund der großen Zeitdimension dieses Phänomens sowie verschiedener weiterer Experimentalbefunde (s.a. *Abb. 1.6*) eindeutig ausgeschlossen werden.

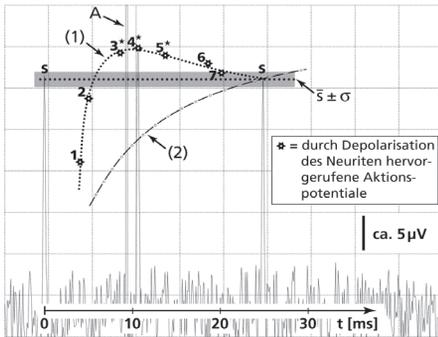


Abb.1.6: Amplitudenabhängigkeit »künstlich« (= durch elektrische Direktstimulation des Neuriten) ausgelöster Aktionspotentiale in Abhängigkeit vom Abstand zum vorangegangenen Spontanspike.

Oszilloskopausdruck eines repräsentativen Einzelexperimentes an einem Cluster von Schilbe mystis (Beobachtungen an insges. 23 Clustern bei 3 Individuen); Zeitbasis 5ms/DIV; »s« markiert spontane Aktionspotentiale, Sterne stellen die Ergebnisse anderer Versuchsdurchläufe dar, »A« kennzeichnet das Reizartefakt, die punktierte Linie » \bar{s} « die gemittelte Amplitude der Spontanaktivität \pm Standardabweichung σ (grau hinterlegt). Die Standardabweichung ($\sigma = 3,2\%$, $n = 2 \times 30$) wurde vor ($\sigma = 3,1\%$ der Spontanamplitude, $n = 30$) und nach ($\sigma = 3,4\%$, $n = 30$) der Durchführung der Versuchsreihe aus jeweils 30 aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen ermittelt und dient als Maß für die Präzision der Amplitudenbestimmung. Meßwerte 3, 4 und 5 sind demnach signifikant erhöht, der erste Meßwert ist signifikant verringert (punktierte Linie (1), Kurve optisch angepaßt).

Das Experiment zeigt eindeutig, daß Aktionspotentiale, die durch direkte Depolarisation des Neuriten etwa in der Mitte zwischen zwei Spontanspikes »künstlich« ausgelöst werden, signifikant höhere Amplitudenwerte aufweisen als ihre spontanen Nachbarn. Wäre die nachgewiesene Amplitudendepression Folge eines Refraktärphänomens, so wären »künstlich« ausgelöste Spikes in gleicher Weise von der Amplitudenverminderung betroffen wie im vorangegangenen Experiment (Abb. 1.5) und müßten den entsprechenden Amplitudenverlauf (2) zeigen (die strichpunktierte Linie entspricht der gemessenen Regressionskurve aus Abb. 1.5). Die Versuchsergebnisse (★) widerlegen klar die Annahme eines ursächlichen Zusammenhangs der Amplitudendepression mit dem Refraktärverhalten der Natriumkanäle, stehen jedoch im Einklang mit der Präsumtion einer potentialabhängigen Inaktivierung durch den EPSP-verursachten Potentialanstieg im Dendriten (»Inaktivierungshypothese«), die eine intermediäre Erhöhung der Amplitudenwerte für »künstlich« (nicht durch EPSP-Anstieg) ausgelöste Aktionspotentiale vorhersagt, da kurz nach einem vorangegangenen Aktionspotential noch weitgehend hyperpolarisierte Membranverhältnisse vorherrschen mit entsprechend hoher Aktivierbarkeit der Natriumkanäle (Weiteres siehe Text). Lediglich der erste Meßwert ca. 4 ms nach einem Spontanspike zeigt eine signifikante (und der zweite eine geringere) Amplitudenverminderung, die tatsächlich dem Refraktärverhalten der Natriumkanäle zuzuschreiben sein dürfte (nach Abb. 3.9.4, modifiziert).

Das Ergebnis aus Abb. 1.6 widerspricht klar der »Refraktärhypothese«, kann hingegen plausibel und hinreichend auf der Basis verminderter Aktivierbarkeit dendritischer Natriumkanäle (potentialabhängige Inaktivierung) aufgrund des EPSP-induzierten Anstiegs des intradendritischen Potentials erklärt werden: Der Potentialverlauf in Abb.

1.6 zeigt nicht – wie im Falle eines Refraktärphänomens zwingend zu erwarten – deutlich *niedrigere*, sondern intermediär signifikant *höhere* Amplitudenwerte für Aktionspotentiale, die durch elektrische Depolarisation der Dendritenendigung mit geringerem Abstand zum vorangegangenen Spike ausgelöst wurden und widerspricht damit bereits eindeutig der »Refraktärhypothese« (wäre das Refraktärverhalten der Natriumkanäle Ursache der Amplitudendepression, so würde sich dieses auf alle Aktionspotentiale unabhängig von ihrer Auslösung auswirken). Es steht jedoch im Einklang mit der Annahme einer EPSP-abhängigen Aktivierung der Natriumkanäle: Kurz nach Ende eines Aktionspotentials hat noch kaum ein EPSP-induzierter Anstieg des intradendritischen Potentials stattgefunden, wie er mit Entstehung und Ausbreitung eines EPSPs und dem Aufbau eines Generatorpotentials zwangsläufig einhergehen muß. Die Aktivierungswahrscheinlichkeit der Natriumkanäle ist deshalb zu diesem Zeitpunkt unmittelbar nach einer vorangegangenen Hyperpolarisation nahezu maximal und damit sind hier bei »künstlich« durch Depolarisation des Neuriten hervorgerufenen Aktionspotentialen (deren Auslösung kein EPSP-Anstieg im Dendriten vorausgeht) besonders große Aktionspotentialamplituden zu erwarten. Mit Zunahme des EPSPs steigt auch das intradendritische Potential an, woraus in Abhängigkeit von dessen Stärke eine subliminale Aktivierung der dendritischen Natriumkanäle resultiert; diese setzt durch Verschiebung des Konformationsgleichgewichts der Natriumkanäle (vom aktivierbar geschlossenen über den geöffneten zum geschlossen nicht-aktivierbaren Zustand) deren Aktivierungswahrscheinlichkeit im Hodgkin-Huxley-Zyklus herab (= potentialabhängige Inaktivierung) und somit verringert sich die Amplitude der Erregung (Hodgkin & Huxley 1952a–d, Lehrbücher der Physiologie). Je größer das einem

Aktionspotential vorausgegangene EPSP und damit auch die potentialabhängige Inaktivierung der Natriumkanäle, desto kleiner ist demnach zwangsläufig die Amplitude dieses Aktionspotentials.

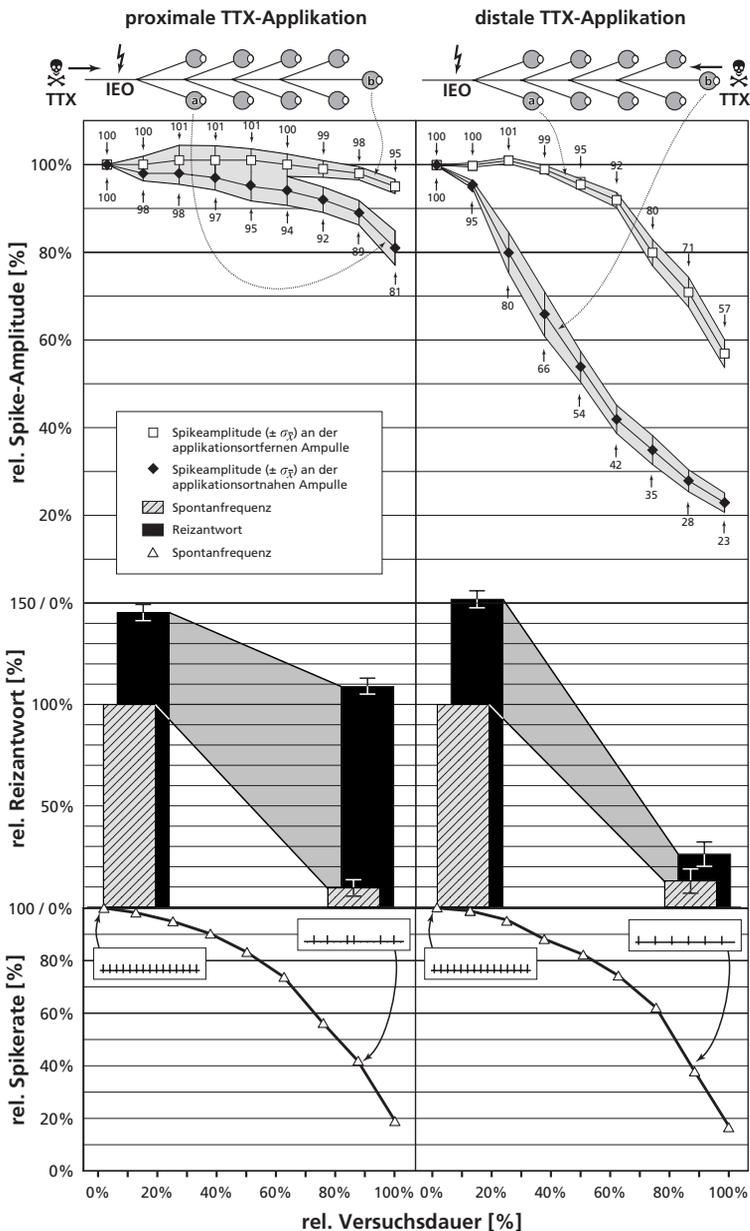
Diese Interpretation der Amplitudendepression als EPSP-korrelierte potentialabhängige Inaktivierung der durch TTX blockierbaren dendritischen Natriumkanäle fordert somit zwingend eine EPSP-abhängige, dem Aktionspotential vorausgehende Aktivierung dieser Kanäle, womit auch gleichzeitig ihre aktive, unterstützende Rolle bei der Fortleitung graduerter Potentiale nachgewiesen wäre (Hodgkin & Huxley 1952a–d), wie sie seit der Beschreibung der Kanaleigenschaften (*ibid.*) bereits wiederholt diskutiert wurde (u.a. Stafstrom *et al.* 1982, Perkel & Perkel 1985, Miller *et al.* 1985, Huguenard *et al.* 1989, French *et al.* 1990, Alzheimer *et al.* 1993, Brown *et al.* 1994, Taylor *et al.* 1995, Johnston *et al.* 1996, Lipowksy *et al.* 1996, Cash & Yuste 1998, Poznanski & Bell 2000a,b).

- 6. Experimente mit progressiver Blockierung der dendritischen Natriumkanäle durch TTX lassen sich nur mit folgenden Schlußfolgerungen in Einklang bringen: (1) Es gibt nur einen singulären Ort der Aktionspotentialbildung, der sich im Axonstamm befindet. (2) Dieser integriert die – mit Unterstützung dendritischer Natriumkanäle bis dorthin aktiv fortgeleiteten – EPSPs bis zum Erreichen der Auslöseschwelle für ein Aktionspotential. (3) Die Aktionspotentiale werden dabei anthero- wie retrograd aktiv fortgeleitet und invadieren den gesamten Dendritenbaum.**

Um die Rolle der dendritischen Natriumkanäle genauer zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen diese Kanäle progressiv

durch TTX blockiert wurden. Dazu appliziert man den Kanalblocker außerhalb des Clusters durch eine Punktläsion der Haut und läßt ihn aus proximaler bzw. distaler Richtung in den Dendritenbaum eindiffundieren. Mittels Doppelableitung aus proximaler und distaler Extremposition wurden im Verlauf der Diffusionsausbreitung des Kanalblockers in das Cluster hinein hochsignifikante Veränderungen in Aktionspotentialamplitude, -frequenz, Erregungsmustern und Empfindlichkeit der Organcluster in Abhängigkeit von Applikationsort und Ableitort registriert (s. Abb. 1.7, nächste Doppelseite).

Diese Befunde geben eine Vielzahl von Hinweisen über die dendritischen Prozesse: Unter proximaler TTX-Einwirkung auf den Axonstamm kommt es am Impulsenstehungsort zu Arrhythmien wegen des Ausfalls einzelner oder mehrerer aufeinander folgender Aktionspotentiale im gesamten Dendritenbaum, bei weiterhin absolut synchronem Auftreten der noch verbleibenden Aktionspotentiale. Mehrere hypothetische Impulsenstehungsorte in den einzelnen Dendritenästen, wie sie die »Kollisionstheorie« postuliert, müßten unausweichlich durch Anwendung von TTX entkoppelt (asynchron) und nachfolgend, bei zunehmender Blockierung von Natriumkanälen in den zur autonomen Bildung von Aktionspotentialen befähigten Strukturen zunächst gestört (arrhythmisch) werden und nachfolgend ganz ausfallen. Dies steht jedoch im Widerspruch zur Beobachtung synchroner und im Grundrhythmus stabiler »alles-oder-nichts«-Entladungen und kann deshalb eindeutig ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse belegen damit, daß die Erregungsbildung unter physiologischen Bedingungen – trotz erregbarer Dendriten – erst und ausschließlich im Axonstamm am Beginn der gemeinsamen Afferenz – und damit monozentrisch – stattfinden muß.



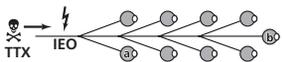
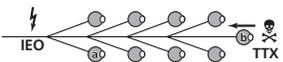
	<i>proximale TTX-Applikation</i>	<i>distale TTX-Applikation</i>
		
<i>Amplitudenrückgang</i>	applikationsortnahe Ampulle (a) um typ. 15...20%	applikationsortnahe Ampulle (b) um typ. 80%
	wenn überhaupt, erst gegen Ende der Messung (auch dann eher bei Ampullen nahe Applikationsort)	rasch einsetzend, zunächst bei Ampullen nahe Applikationsort, n. halber Versuchsdauer auch an zweiter Amp.
	wenig signifikanter Unterschied zwischen den Spikeamplituden der proximalen und distalen Ampullen (bis 75% der Versuchsdauer)	hochsignifikanter Unterschied zwischen den Spikeamplituden der proximalen und distalen Ampullen (bis zu $20\sigma_{\bar{x}}$ oder 6σ)
	beide Ampullen spiken bis zum Ende der Messung mit nahezu unverminderter Amplitude, bis Messung durch Ausbleiben von Spikes beendet wird	Spikeamplitude der proximalen Ampulle verschwindet oft vollständig, während die distale Ampulle weiter spiket
<i>Interspike-Intervall</i>	vergrößert sich allenfalls geringfügig; mit fortschreitender Messung durch Ausfall v. Spikes unregelmäßig, »stottern«	vergrößert sich kontinuierlich auf ca. das Sechsfache; Spikemuster bleibt regelmäßig
<i>Reizantwort</i>	weitgehend unverändert nach Ende der Spontanaktivität bleibt das System oft noch für kurze Zeit erregbar	drastischer Rückgang nach Ende der Spontanaktivität ist System nicht mehr erregbar
<i>Hinweise auf Ursachen (s. Diskussion)</i>	Einfluß auf Digitalsystem (d.h. AP-Generation oder -Fortleitung), Analogsystem weitgehend unbeeinflusst	Einfluß auf Analogsystem (z.B. aktiv unterstützte EPSP-Fortleitung), Digitalsystem unbeeinflusst

Abb. 1.7: Übersichtsgraphik und tabellarische Zusammenfassung der TTX-verursachten Veränderungen der Parameter Spikeamplitude, Reizantwort und Interspike-Intervall der afferenten Faser bei fortschreitender Besetzung dendritischer Natriumkanäle der Endarborisation aus proximaler bzw. distaler Richtung (Abb. 3.6.5, 4.6.1, Tab. 3.6.4, komb.). Weiteres siehe Text.

Die Anwendung von TTX an distalen Dendritenabschnitten führt dazu, daß die retrograde Fortleitung von Aktionspotentialen von ihrem Entstehungsort zurück in die Endarborisation zunächst in ihrer Amplitude kontinuierlich vermindert und schließlich vollständig unterdrückt wird, während andere, noch TTX-unbeeinflusste Bereiche der Endverzweigung Aktionspotentiale mit nahezu unverminderter Amplitude ableiten lassen. Ohne aktive Erregungsleitung ist es demnach Aktionspotentialen nicht möglich, die Dendritenstrecke zu überwinden.

Außerdem geht mit zunehmender TTX-Besetzung der dendritischen Natriumkanäle auch eine Verminderung der orthograden EPSP-Ausbreitung einher, die sich u.a. in einer Zunahme des Interspike-Intervalls und in einer Verminderung der Empfindlichkeit für elektrische Reize äußert und durch eine Verringerung der den Impulsentstehungsort erreichenden, EPSP-korrelierten und depolarisierenden Stromkomponente der dendritischen Natriumkanäle verursacht sein muß. Eine andere Ursache für die Verlangsamung des Generatorpotentialanstiegs als die Blockierung distal-dendritischer Natriumkanäle mit der Folge einer Verringerung des EPSP-unterstützenden Depolarisationsstroms kann somit nach der hier angestellten Analyse als Wirkungsmechanismus für den kontinuierlich-stetigen Anstieg des Interspike-Intervalls eindeutig ausgeschlossen werden. Ab einem gewissen Blockierungsgrad der Natriumkanäle der distalen Dendriten werden offenbar die wirksamen, aber bisher meßtechnisch nicht faßbaren, synaptischen Potentiale entlang der Dendritenstrecke so weit abgeschwächt, daß sie am Impulsentstehungsort am Beginn der gemeinsamen Afferenz die kritische »Feuerschwelle« nicht mehr erreichen und damit keine Aktionspotentiale mehr auslösen können. Dieser Beitrag der dendritischen Natriumkanäle ist damit – entsprechend dieser Be-

funde – unter physiologischen Bedingungen Voraussetzung für die Ausbreitung postsynaptischer Potentiale innerhalb der Endarborisation und damit maßgeblich und unverzichtbar für den Aufbau des Generatorpotentials.

Aus der Analyse der Ergebnisse kann damit nur gefolgert werden, daß durch den EPSP-verursachten Anstieg des intradendritischen Potentials über eine geringfügige Verschiebung des Konformationsverhältnisses der Natriumkanäle entsprechend der von Hodgekin & Huxley (1952a-d) gefundenen Aktivierungswahrscheinlichkeitsdichtefunktion ein subliminaler Verstärkungsmechanismus gesteuert wird, der in der Lage ist, postsynaptische Potentiale auf dem Wege einer Stromverstärkung bei ihrer Ausbreitung in den dendritischen Strukturen aktiv zu unterstützen. Die auf diese Weise verlustarm zum Impulsentstehungsort in der gemeinsamen Afferenz fortgeleiteten EPSPs werden dort bis zum Erreichen der Feuerschwelle integriert und lösen Aktionspotentiale aus, die sich bei ihrer retrograden Invasion der Endarborisation derselben Natriumkanalpopulation bedienen können, die bereits die Ausbreitung der postsynaptischen Potentiale unterstützt hat. Die EPSP-verursachte Verschiebung des Konformationsverhältnisses der Natriumkanäle ist demnach ausreichend, die Ausbreitungsverluste über die großen Fortleitungsdistanzen innerhalb des Dendritenbaumes zu kompensieren, jedoch zu gering, um die Fortleitung der Aktionspotentiale zu gefährden, deren retrograde Ausbreitung für einen notwendigen »Reset« der Natriumkanäle sorgen dürfte, der für die Funktion des Systems unverzichtbar ist. Jedoch manifestiert sich nach gegenwärtigem Erkenntnisstand in der nachgewiesenen Amplitudendepression (s. Pkt. 5) die vorangegangene subliminale Aktivierung der Natriumkanäle, die hierfür Voraussetzung ist und durch die EPSPs verursacht wird.

Außerdem kommt es durch TTX zu einer Unterdrückung der dendritenlokalisierten Adaptation der Spontanaktivität der afferenten Faser, wie sie u.a. nach »kathodischer Inhibition« eintritt und für das Wiedereinsetzen einer Spontanaktivität trotz fehlenden EPSPs verantwortlich ist: Nach TTX-Einwirkung auf distale Dendritenabschnitte kann trotz weiterhin vorhandener synaptischer Aktivität und Depolarisation der Dendritenendigung weder dieses postsynaptische Potential den Impulsentstehungsort aktivieren, noch findet eine adaptive Neueinstellung der Spontanaktivität statt, da offensichtlich beide Prozesse auf TTX-sensitiven Natriumkanälen basieren und durch den Kanalblocker unterbunden werden (*s.a. Kap. 4.3, S. 130–154*).

Zusammenfassend lassen sich aus diesen Ergebnissen u.a. folgende Schlüsse ziehen: (1) In jedem Cluster ist unter physiologischen Bedingungen für die Generierung der Aktionspotentiale nur ein Impulsentstehungsort verantwortlich, der sich im Axonstamm der gemeinsamen Afferenz befindet. (2) Die Ausbreitung der postsynaptischen Potentiale in den Endästchen der Dendriten erfolgt aktiv mit Unterstützung dendritischer Natriumkanäle, die im für die Aktionspotentialauslösung noch unterschwelligen Bereich als spannungsgesteuerte Stromverstärker »*stabil* und »*präzise*« (was Gegenstand kontroverser Diskussion ist, s.u.) arbeiten und postsynaptische Signale so verstärken, daß die bei elektrotonischer Ausbreitung eines EPSPs unausweichlich eintretende Amplitudenabnahme teilweise oder vollständig ausgeglichen wird. Durch einen solchen subliminalen Verstärkermechanismus wie er seit den Arbeiten von Hodgekin & Huxley (1952a–d) bereits wiederholt diskutiert wurde, entstehen erst die Voraussetzungen für Konvergenz und Addition der postsynaptischen Potentiale im Axonstamm (u.a. Stafstrom *et al.* 1982, Perkel & Perkel 1985, Miller *et*

al. 1985, Huguenard *et al.* 1989, French *et al.* 1990, Alzheimer *et al.* 1993, Brown *et al.* 1994, Taylor *et al.* 1995, Stuart & Sakmann 1995, Johnston *et al.* 1996, Lipowksy *et al.* 1996, Cash & Yuste 1998, Andreasen & Lambert 1999, Poznanski & Bell 2000a,b). (3) Die Endarborisation wird in ihrer gesamten Erstreckung von den Aktionspotentialen aktiv retrograd invadiert, was u.a. eine essentielle »Reset«-Funktion in den dendritischen Strukturen erfüllen dürfte (*s. Diskussion, Kap. 4.3, S. 30–154*).

7. Resümee und Erweiterung des Rezeptormodells.

Die Endarborisation stellt damit ein – in dieser Form und Ausprägung aus der Literatur noch nicht bekanntes – hoch wirksames, ideal auf die physiologischen Erfordernisse abgestimmtes peripheres Konvergenzsystem innerhalb eines Dendritenbaumes dar, das auf der Basis passiver Nerveneneigenschaften allein weder erklärbar noch in dieser Form überhaupt potentiell realisierbar wäre. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, basiert die Funktion des Dendritensystems maßgeblich auf der AKTIVEN Arbeitsweise dendritischer Natriumkanäle, die u.a. gleichzeitig die Aufgabe von »Analogverstärkern« für die postsynaptische Potentialintegration erfüllen wie auch der Fortleitung von Aktionspotentialen dienen. Die aktiv unterstützte Fortleitung graduerter Potentiale, wie sie aus der Analyse des Systems zu folgern ist, war zwar seit den Arbeiten von Hodgekin & Huxley (1952a–d) wiederholt Gegenstand theoretischer Diskussion, wird jedoch erst seit Kurzem v.a. im Rahmen zentralnervöser Informationsverarbeitung im Säugerhirn weltweit in mehreren Arbeitsgruppen experimentell untersucht (Stuart & Sakmann 1995, Magee & Johnston 1995, Schwindt & Crill 1995, Lipowsky *et al.* 1996, Haag & Borst 1996, Stuart *et al.* 1997a,b, Cook & Johnston 1997, Mittmann *et al.* 1997, Cash & Yuste 1998, Mickus *et*

al. 1999a,b). Neben diesem Beitrag zur Untersuchung und aktuellen Diskussion aktiver dendritischer Prozesse als einem allgemeinen Funktionsprinzip dendritischer Integration erweitert die vorliegende Arbeit das bislang gültige Rezeptormodell um aktive Mechanismen bei Fortleitung und Verarbeitung synaptischer Potentiale. Sie müssen essentiell und – dem einfachsten, hier vorgeschlagenen Erklärungsmodell zufolge sogar ausschließlich – denselben dendritischen spannungsgesteuerten und TTX-blockierbaren Natriumkanälen zugeordnet werden, die auch für die retrograde Fortleitung der Aktionspotentiale in die Endarborisation zurück verantwortlich sind. Nach bisherigem Kenntnisstand existierten noch eine Reihe ungeklärter Fragen und Widersprüche im bislang bekannten Modell des ampullären Rezeptorsystems im Zusammenhang mit der Funktion von Clusterbildung und peripherer Konvergenz. Hierzu zählen vor allem (1) die fehlende Korrelation zwischen Spontanaktivität und Empfindlichkeit (Peters *et al.* 1975, Bretschneider *et al.* 1979 & 1980, Peters *et al.* 1988, Teunis *et al.* 1989, Bretschneider & Peters 1992, Heijmen & Peters 1995, Peters *et al.* 1997), (2) die Stabilisierung der Spontanaktivität und die Abweichung des Signal/Rausch-Verhältnisses vom Nyquist-Kriterium im Zusammenhang mit der ontogenetischen Konvergenzzunahme und dem Wachstum der Clusterorgane (Peters & Mast 1983, van Dongen & Bretschneider 1984, Peters & van Ieperen 1989, Teunis *et al.* 1990, Bretschneider *et al.* 1991, Peters *et al.* 1997), sowie (3) die Frage nach dem theoretisch bereits postulierten ersten dendritischen Adaptationsmechanismus bei Änderung des Ionenmilieus und »kathodischer Inhibition« (Roth 1971 & 1973, Peters *et al.* 1975 & 1988, Zhadan & Zhadan 1975, Bauswein 1977, Bretschneider *et al.* 1979 & 1980, Zakon 1984, Sanchez & Zakon 1987 & 1990, Peters & van Ieperen 1989, Peters *et al.* 1997). Der

aktive Beitrag des dendritischen Natriumkanal-Systems bei Fortleitung und Verarbeitung postsynaptischer Potentiale, der in dieser Arbeit hergeleitet und indirekt bewiesen werden konnte, führt ein wichtiges neues Element in das bislang bekannte Modell dieses Rezeptor-mechanismus ein und ist damit geeignet, die oben genannten Widersprüche zu überbrücken und das Verständnis für dieses Sinnesystems zu erweitern.

2. Einleitung

Der elektrische Sinn ist bei Fischen und aquatisch lebenden Amphibien weit verbreitet und wird zusammen mit den Mechanosensoren, die auf Druckschwankungen und niederfrequente Wasserbewegungen ansprechen, dem Lateralis- oder Seitenliniensystem zugerechnet. Die Existenz dieses Sinnes wurde zunächst bei der aktiven Elektroortung schwach elektrischer Fische entdeckt, die sehr empfindlich auf äußere elektrische Reize wie auch auf die Veränderung der selbst generierten Felder reagieren (Lissmann 1958, Lissmann & Machin 1958, Machin & Lissmann 1958, Bennett 1971). Jedoch sind auch viele nicht elektrische Fische dazu befähigt, diese Sinnesmodalität wahrzunehmen und z.B. auf elektrische Felder in ihrer Umwelt zu reagieren. Hierzu dienen ihnen ampulläre Elektrozeporen, die in ihrer Haut nach einem festgelegten Verteilungsmuster angeordnet auf die Wahrnehmung elektrischer Niederfrequenzfelder spezialisiert sind. Als ancestraler Rezeptortyp kommen Sinnesorgane dieser Bauart bei allen elektro-sensitiven Teleostiern (Gymnotiden, Mormyriden – elektrisch aktiven wie nicht aktiven – sowie bei Welsen), des weiteren bei Haien, Lungenfischen, Stören, Flösselaalen wie auch bei wasserlebenden Schwanzlurchen vor; vom Typ des tuberösen Elektrozepors oder Knollenorgans, wie er ausschließlich bei elektrogenen Mormyriden und Gymnotiden auftritt und dort der aktiven Elektrolokalisation dient,

indem er mit phasischen Reaktionen auf die Entladungen ihrer elektrischen Organe reagiert, sind sie morphologisch, physiologisch und funktionell verschieden. Ampulläre Elektrozeporen wiederum werden gewöhnlich in zwei Unterklassen geteilt: die Lorenzinischen Ampullen und die Mikroampullen (u. a. auch »small pit organs« oder einfach »ampulläre Organe« genannt); da sich diese Arbeit ausschließlich mit letzteren beschäftigen wird, werden sie im Folgenden – wie auch in der Literatur verbreitet – oft nur als ampulläre Elektrozeporen, Elektrozeporen oder ampulläre Organe bezeichnet werden (Bennett 1971a,b, Szabo 1974, Zakon 1986, Fiedler 1991, Bretschneider & Peters 1992, Kramer 1996).

Lorenzinische Ampullen kommen bei Elasmobranchiern vor und sind große Sinnesorgane mit tausenden von Sinneszellen, die über einen langen Kanal mit der Umwelt in Verbindung stehen; sie gehören zu den empfindlichsten Sensoren für elektrische Felder und sind physiologisch bestens an das Leben im Meerwasser mit seiner hohen Leitfähigkeit und dem aus osmoregulatorischen Gründen geringen Hautwiderstand der Fische angepaßt (Bennett 1971a,b, Obara & Bennett 1972, Obara 1974, Kramer 1996).

Die Mikroampullen, die typischerweise bei Süßwasservertretern der vorgenannten Tiergruppen anzutreffen sind, bestehen hingegen aus wenigen Dutzend Sinneszellen in einem Ampullenbecher von ca. 100 µm Durchmesser, der sich über einen Porus zum Umgebungswasser öffnet. Diese Hautsinnesorgane, birnenförmige Invaginationen, an deren Basis sich ein eingesenkter Sinnesepithelkomplex aus sekundären acustico-lateralis-Rezeptoren umgeben von akzessorischen Zellen befindet, stehen über einen Kanal, der mit einer Mucopolysaccharid-Gallerte gefüllt und reich an sezernierten, die Leitfähigkeit erhöhenden und

das Ionenmilieu puffernden Kaliumionen ist, mit dem Außenmedium in Verbindung. Als sekundäre Rezeptoren übertragen die neuro-epithelialen Rezeptorzellen eines ampullären Organs ihre Information synaptisch zu einer afferenten Faser, die sie zum Gehirn fortleitet, wo Weiterverarbeitung und Verrechnung der Einzelorganantworten stattfinden (Bennett 1971a,b, Szabo 1974, Bennett & Clusin 1979, Teeter & Bennett 1981, Bretschneider & Peters 1992).

Diese Afferenzen zeigen eine ständige, reguläre Spontanaktivität, die durch Stimuli moduliert wird: bei Teleostiern erhöhen anodische oder lumenpositive Reize die Spikerate des afferenten Neurons, während kathodische, lumennegative Reize diese verringern. Dieser Mechanismus erlaubt die Codierung beider Reizpolaritäten und stellt einen wichtigen Mechanismus zur Empfindlichkeitserhöhung dar, da keine Codierungsschwelle existiert und jeder noch so kleine Stimulus (theoretisch) eine detektierbare Frequenzänderung (Δf) hervorruft. Den primären Transduktionsschritt stellt beim ampullären Elektrozepthor die Polarisierung seiner basalen Sinneszellmembran dar, die nach gängiger Lehrmeinung direkten Einfluß auf den Öffnungszustand spannungsgesteuerter Calciumkanäle und damit auf die Transmitterausschüttung besitzt (Bennett & Clusin 1979, Bennett & Obara 1986, Schäfer et al. 1990, Teunis et al. 1991b, Bretschneider & Peters 1992, Heijmen & Peters 1995b, Peters et al. 1997b). Der modulierte Transmitterfluß löst organ- und synapsennah die Erregung in der afferenten Faser aus. Durch einen ständigen geringfügigen Calciumeinstrom in die Rezeptorzellen auch in Abwesenheit von Stimuli kommt es zu einem zyklisch repetitiven Prozeß, der die konstante Spontanaktivität der afferenten Faser speist (Bennett 1971a, Bretschneider et al. 1980, Bretschneider et al. 1990, Bretschneider & Peters 1992, Andrianov 1996),

und die Voraussetzung für die bipolare und schwellenlose Arbeitsweise des ampullären Elektrozepthors darstellt.

Daneben gibt es aber eine Reihe von Spezies, die von diesem klassischen Schema der Innervierung und Informationsverarbeitung, wie man es bei den meisten elektrosensitiven Teleostiern kennt, in einem Punkt abweichen: bei den sog. »Clusterbildnern« bleibt es im Laufe der Ontogenese nicht bei der typischen 1-zu-1-Verschaltung eines jeden Organs über eine Nervenfaser zum ZNS. Auch hier wird in juvenilem Stadium zunächst durch eine vom einem Ast des Seitenliniennervs in ihr Zielgebiet auswachsenden Faser ein Organ induziert (Roth 1985 & 1986, Roth & Wittmaack 1991, Teunis et al. 1991a, Roth 1993, Roth pers. Mitt.). Im Laufe der Entwicklung aussprossende Neuritenäste induzieren jedoch weitere Organe, die mehrere hundert Mikrometer vom »Ursprungsorgan« entfernt liegen und die damit über dieselbe Faser innerviert werden. Dadurch entstehen im Laufe der Ontogenese wachsende Cluster, funktionelle Einheiten aus bis zu ca. 30 Organen, verteilt über ein Hautareal von bis zu 2 x 1 mm² (z.B. bei größeren Adultexemplaren von *Schilbe mystis*), deren Information in einem primären afferenten Neuron konvergiert und dort vorverarbeitet wird. Die Funktion des daraus resultierenden Dendritensystems läßt sich bei genauerer Analyse nur schwerlich mit einigen klassischen Vorstellungen der Neurophysiologie (Dendriten als passive Verschaltungs- und Integrationsstrukturen; ausschließlich passive Fortleitung graduerter postsynaptischer Potentiale und dadurch bedingt stark dekrement-behaftete Ausbreitung von Analogsignalen bereits über kurze Dendritendistanzen; daraus resultierende Notwendigkeit zur synapsennahen Digitalisierung postsynaptischer Potentiale; aktive Signalfortleitung ausschließlich auf Aktionspotentiale beschränkt; komplexe und spe-

zialisierte Informationsverarbeitung nur in neuronalen Netzen des Zentralnervensystems etc.) in Einklang bringen, wie sie einige Jahrzehnte lang uneingeschränkt zu gelten schienen.

Die im elektrosensorischen System clusterbildender Weise auftretende periphere Konvergenz besitzt eine Reihe weiterer Implikationen, die auf grundsätzliche Funktionsprinzipien verweisen könnten, die auch über dieses System hinaus von allgemeinerer Bedeutung sind. Bestimmte Aspekte dieser Konvergenz im elektrosensorischen System wurden bereits in mehreren früheren Arbeiten behandelt (Bretschneider et al. 1980, Peters & Mast 1983, van Dongen & Bretschneider 1984, Peters & van Ieperen 1989, Teunis et al. 1990b, Sanchez & Zakon 1990, Bretschneider & Peters 1992, Heijmen & Peters 1995, Andrianov 1996, Peters et al. 1997a). Im Mittelpunkt aller dieser bisherigen Arbeiten standen phänomenologische Untersuchungen über die Auswirkungen der Clusterbildung auf Rezeptorverhalten und Rezeptormechanismus (Empfindlichkeit, Dynamik, Frequenzverhalten, Rauschanalyse etc.). Jedoch ergaben diese Arbeiten noch kein eindeutiges Bild von Arbeitsweise, Funktion und biologischer Bedeutung der Konvergenz; insbesondere die Prozesse in dieser ausgedehnten multifunktionalen Endarborisation zwischen den Synapsen und der Bildung des ableitbaren Aktionspotentials im afferenten Neuron waren in keiner dieser Arbeiten Gegenstand genauerer Untersuchungen. So fehlten bislang experimentell fundierte Erkenntnisse über die Prozesse der Signalausbreitung und -verrechnung dieser primären Integrationsstufe und somit über alle Vorgänge, die sich von der synaptischen Antwort über die Fortleitung postsynaptischer Potentiale bis zu dem oder den Generationsorten der Aktionspotentiale, die bisher ebenfalls nicht identifiziert werden konnten, der Interaktion der Informationen der verschie-

denen Organ-»inputs« und der Ausbreitung der Aktionspotentiale im Dendritenbaum abspielen, weshalb eine Reihe von Ergebnissen die periphere Konvergenz betreffend, bisher noch nicht schlüssig gedeutet werden konnten.

Deshalb beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit diesen Vorgängen der Signalausbreitung, Informationsverarbeitung und Konvergenz in ausgedehnten peripheren Dendritensystemen anhand des elektro-sensorischen Systems clusterbildender Welse. Dieses außergewöhnliche Modellsystem als seltenes Beispiel eines auf periphere Informationsverarbeitung spezialisierten mononeuronalen Konvergenzsystems im Dendritenbaum eines primären sensorischen Vertebratenneurons läßt gute Voraussetzungen für die Untersuchung aktiver Prozesse in Dendritensystemen erwarten und damit einen Beitrag zur aktuellen Diskussion dieser Thematik, die seit Mitte der Neunziger Jahre stark an Bedeutung gewonnen hat und bisher nahezu ausschließlich in der zentralnervösen Informationsverarbeitung im Säugerhirn untersucht wurde (u.a. Alzheimer et al. 1993, Brown et al. 1994, Taylor et al. 1995, Stuart & Sakmann 1995, Magee & Johnston 1995, Schwindt & Crill 1995, Lipowski et al. 1996, Johnston et al. 1996, Haag & Borst 1996, Gillessen & Alzheimer 1996, Stuart et al. 1997a,b, Cook & Johnston 1997, Mittmann et al 1997, Lüscher & Larkum 1998, Stuart & Spruston 1998, De Schutter 1998, Cash & Yuste 1998, Mickus et al. 1999a,b, Poznanski & Bell 2000a,b).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Morphologie

Diese Arbeit beschäftigt sich – wie eingangs dargelegt – mit den Signalausbreitungsvorgängen in der Endarborisation, untersucht an Hand des Modellsystems der afferenten Dendriten des elektrosensorischen Systems clusterbildender Weise. Die Idee zur Bearbeitung des Themas vorliegender Dissertation entstand angesichts der morphologischen Beobachtung dieses Sinnessystems mit seiner sehr ausgedehnten peripheren Konvergenz zahlreicher (bis zu ca. 30) Sinnesorgane auf ein primäres afferentes Neuron und der physiologischen Untersuchung und Charakterisierung der Cluster mittels Doppelableitung zur Identifizierung der Clusterzugehörigkeit. Die Größe und Ausdehnung dieses dendritischen Systems wirft, wie später noch diskutiert werden soll, eine Reihe von Fragen zur Arbeitsweise des dendritischen Systems auf, das eine Integrations- und Verarbeitungsleistung der zahlreichen, räumlich weit gestreuten Inputs der konvergierenden Sinneszellen innerhalb eines Neurons ohne die Möglichkeit polyneuronaler Verarbeitungsnetze zu erbringen hat. Von besonderem Interesse ist hierbei auch die Signalausbreitung innerhalb des Dendritenbaums, die auf der Basis der klassischen neurophysiologischen Vorstellungen kaum denkbar wäre. Um die Funktion der Endarborisation besser einschätzen zu können, stellt sich zwangsläufig die Frage nach morphologischen Anpassungen und

besonderen Funktionskorrelaten in der Ausbildung des Dendritenbaums, die diesen an die spezifischen Anforderungen adaptieren. Deshalb war es naheliegend, Bau der Endarborisation, Dendritendurchmesser, Myelinisierung, Verzweigungstopologie und Dendritenlängenverhältnisse genauer morphologisch zu studieren. So standen zunächst morphologische Untersuchungen im Zentrum des Interesses. Es sollte geklärt werden, wie das Verschaltungsmuster der Dendriten auf das afferente Neuron aussieht, welche Verschaltungstopologie vorliegt, wie das Verhältnis der dendritischen Fortleitungsstrecken innerhalb des Clusters von der Synapse zur Afferenz beschaffen ist und welchen Durchmesser und Grad an Myelinisierung sie besitzen, welchen Bau, welche Stärke und Breite die Markscheide aufweist. Diese Untersuchungen wurden überwiegend am Fluoreszenzbinokular, Fluoreszenzmikroskop sowie am konfocalen Laser-Scanningmikroskop unter Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DASPEI (Diaminostyrylpyridiniumiodid) durchgeführt.

Bei Fischen der Spezies *Schilbe mystis* fanden sich zwei Grundtypen von Clustern, die im Folgenden als »Bäumchentyp« und »Sterntyp« bezeichnet werden. Sie treten je nach untersuchter Rezeptorreihe in unterschiedlicher relativer Häufigkeit auf. Während der »Sterntyp« typischerweise bis zu rund einem Dutzend Organe umfaßt, können Cluster des »Bäumchentyps« bis zu ca. 30 Organe einschließen, die alle auf ein primäres afferentes Neuron konvergieren. Das Konvergenzareal bzw. die Längsausdehnung eines Clusters des »Bäumchentyps« kann mehr als 2 mm erreichen (die maximalen Dendritenlängen können dabei fast 3 mm betragen). Den höchsten Verbreitungsgrad besitzen die Cluster vom »Bäumchentyp« auf der Analflosse in einem parallelen Streifen nahe ihrer Basis (in den späteren physiologischen Versuchen

an *Schilbe mystis* wird ausschließlich mit Organclustern dieses Typs von der Basis der Analflosse gearbeitet).

Während Cluster vom »Sterntyp« bei idealtypischer Ausprägung näherungsweise »hub«-Topologie mit radial-zentripetalen Dendriten, zuweilen mit dichotomen Sekundärverzweigungen, bei annähernd gleicher Länge aufweisen, besitzen typische »Bäumchen«-Cluster eher eine »line«-Topologie, die jedoch erhebliche Variabilität und Polymorphie mit z.T. hierarchischen oder mehrstufigen Verzweigungselementen aufweisen kann. Überwiegend sind in »Bäumchen«-Clustern von *Schilbe mystis* im Faserverlauf der Afferenz proximale Organe über kurze, weitgehend direkt in den gemeinsamen Axonstamm einlaufende Dendriten innerviert, während distalere Organe stets über um ein mehrfaches längere Dendriten versorgt werden, die sich z.T. ein- oder mehrstufig verzweigen können. Die Endarborisation ist bei *Schilbe mystis* wie auch bei *Physalia spec.* nahezu vollständig bis zu den synaptischen Endigungen myelinisiert. Während *Physalia* stark verdickte Dendriten (bis zu ca. 5 µm Innendurchmesser) und relativ ausgeglichene Dendritenlängen aufweist – axonnahe Organe werden nicht auf direktem Wege, sondern durch »mäandrierende« Dendriten innerviert, längere Dendriten besitzen oft einen größeren Querschnitt, Axonstamm entspringt oft weit innerhalb des Clusters und liegt nicht typischerweise wie bei *Schilbe mystis* proximal außerhalb des Clusters, wodurch ein teilweiser Ausgleich der Leitungslängendifferenzen und Propagationswiderstände eintreten könnte, was als morphologische Anpassung der EPSP-Fortleitung über größere Distanzen zu einem möglicherweise weiter entfernt in der gemeinsamen Afferenz liegenden Generationsort der Aktionspotentiale gedeutet werden könnte – sind Dendriten bei *Schilbe mystis* im Durchmesser unauffällig und i.d.R. deutlich dünner als das

Axon. Bei *Schilbe mystis* treten in »Bäumchenclustern« z.T. extreme Unterschiede in den Leitungslängen von 1:5 bis 1:10 und darüber auf, die keine der vorgenannten morphologischen Kompensationsmechanismen erkennen lassen (der höchste beobachtete Quotient lag bei 1:16,9). Im Mittel lag der Dendritenlängenquotient, ermittelt aus der Horizontalprojektion des jeweils längsten und kürzesten Dendriten eines Clusters anhand von Laser-Scanning-mikroskopischen Bildern und Fluoreszenzmikrophotographien von Clustern des Bäumchentyps mit mehr als 6 Organen, bei $8,7 \pm 3,1$ ($n = 63$). Der Neuritendurchmesser der Verzweigungsäste (rami) ist mit $1,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ($n = 27$) deutlich dünner als der des afferenten Axons, das 2...5 μm Durchmesser erreichen kann. Die Myelinisierung ist über die gesamte Fortleitungsstrecke stark ausgeprägt und weist – in etwa dem Axonkaliber entsprechend, zumeist jedoch dieses etwas übertreffend – einen typ. Außendurchmesser von 3 μm auf, die Markscheide ist jedoch mit einer typischen Länge von 12...15 μm bei einer Anulusbreite von 3...5 μm außergewöhnlich kurz und liegt um mehr als eine Größenordnung unter den typischen Werten myelinisierter Neuriten (Leonhardt 1977); der Grad der Myelinbedeckung liegt – bedingt durch den Quotienten der Segmentlängen von interannulärem : annulärem Abschnitt – nur bei ca. 75%. Nach Leonhardt und Benninghoff (1985) zeigen diese Daten nicht die zu erwartende typische Anpassung des Systems an die saltatorische Erregungsleitung mit der Optimierung hinsichtlich seiner Längskonstante und belegen eine für myelinisierte Fasern dieses Durchmessers ausgesprochen kurze Längskonstante mit relativ starker Signaldämpfung, wie später noch diskutiert werden soll.

Abb. 3.1.1...7 DASPEI-Färbungen von Clustern ampullärer Organe unterschiedlicher Ausprägung, Schilbe mystis (Balken \triangleq 100 μm) ▷

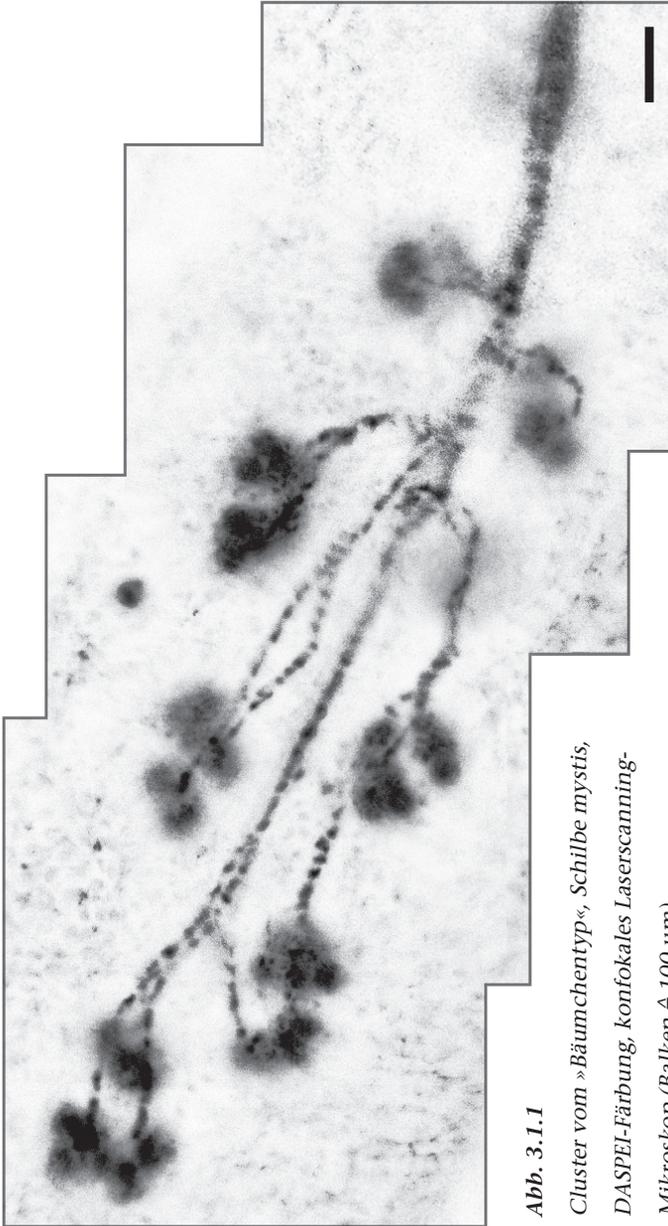


Abb. 3.1.1

Cluster vom »Bäumchentyp«, *Schilbe mystis*,
DASPEI-Färbung, konfokales Laserscanning-
Mikroskop (Balken Δ 100 μm)



Abb. 3.1.2 Cluster vom »Bäumchentyp«, *Schilbe mystis*, DASPEI-Färbung, konfokales Laserscanning-Mikroskop (Balken Δ 100 μm)

Abb. 3.1.3 Cluster vom »Bäumchentyp«, Schilbe
mystis, DASPEI-Färbung, konfokales Laserscanning-
Mikroskop (Balken \triangleq 100 μm)

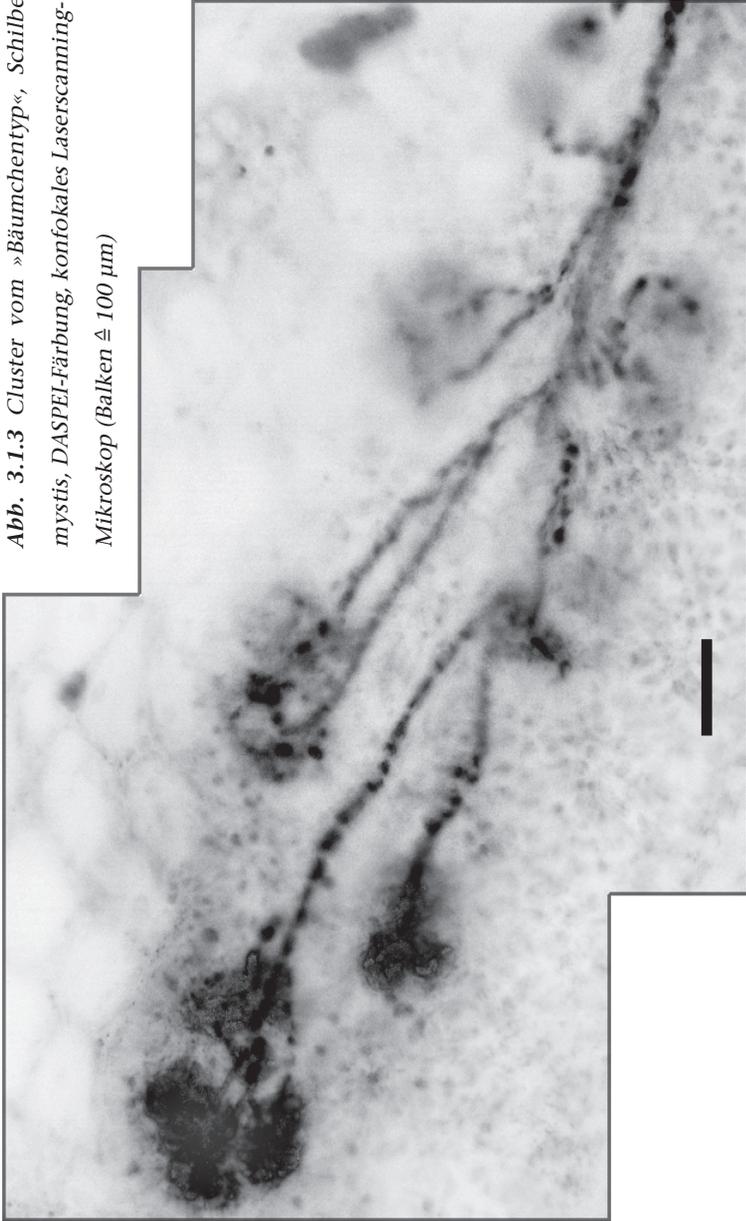




Abb. 3.1.4 Cluster vom »Bäumchentyp« in untypischer Ausprägung, Schilbe mystis, DASPEI-Färbung, konfokales Laserscanning-Mikroskop (Balken $\hat{=}$ 100 μm)

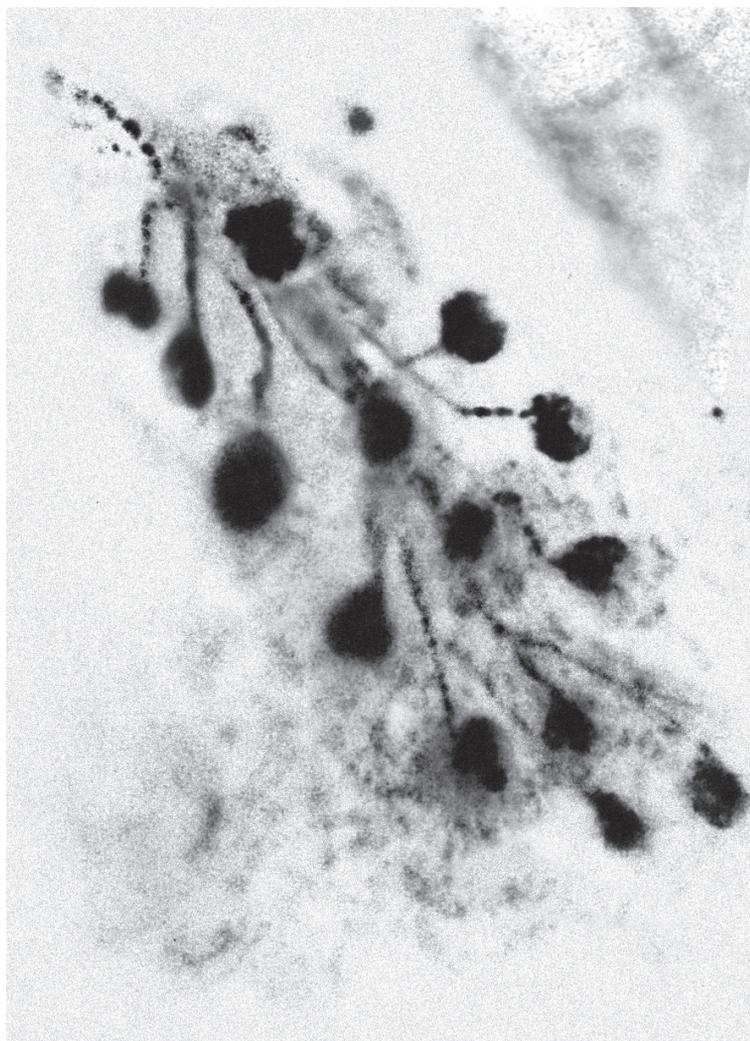


Abb. 3.1.5 großes »dreireihiges« Cluster vom »Bäumchentyp«, *Schilbe mystis*, photographische Aufnahme einer DASPEI-Färbung am Fluoreszenzbinokular, kontrastverstärktes Negativ



Abb. 3.1.6 Cluster vom »Sterntyp« in untypischer Ausprägung (Übergangsform), Schilbe mystis, DASPEI-Färbung, konfokales Laserscanning-Mikroskop (Balken $\hat{=}$ 100 μm)

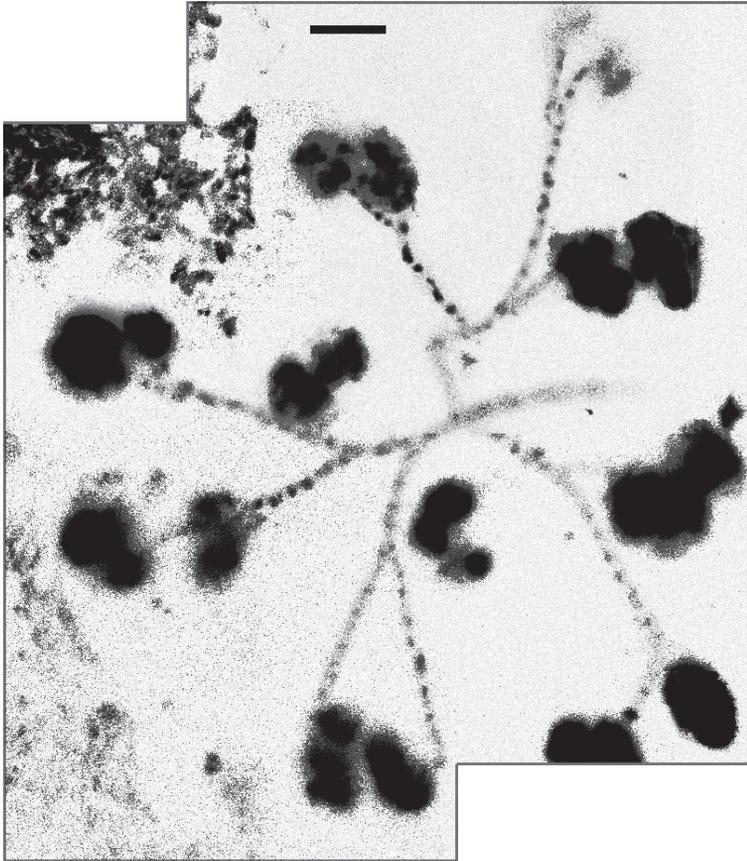


Abb. 3.1.7 Cluster vom »Stentyp«, Schilbe mystis, DASPEI-Färbung, konfokales Laserscanning-Mikroskop (Balken \triangleq 100 μ m)

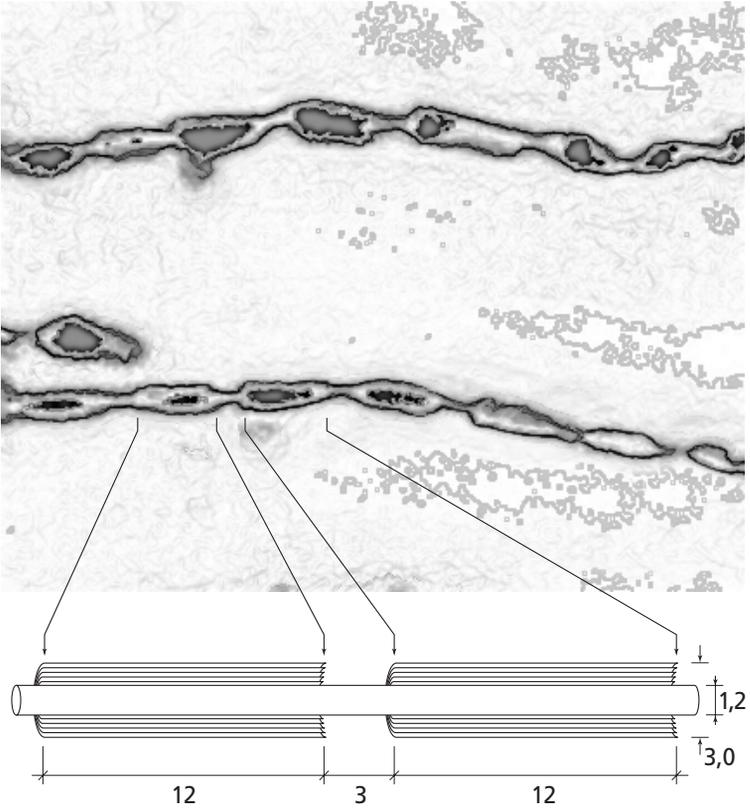


Abb. 3.1.8 »Falschfarben-Äquidensitendarstellung« einer konfokalen Laserscanning-Aufnahme DASPEI-gefärbter Dendriten von *Schilbe mystis*, Einzelschichtebenenrekonstruktion aus den Ebenen größter Schärfe mit schematischer Darstellung einer Dendritenrekonstruktion, die aus der Auswertung von ca. 200 Einzelschichtebenen entstand. Alle Abmessungen in μm .

max.	min.	Q	max.	min.	Q	max.	min.	Q
1639	167	9,81	773	153	5,05	1526	324	4,71
1155	252	4,58	643	101	6,37	1601	212	7,55
1681	198	8,49	605	117	5,17	1587	94	16,88
769	103	7,47	1975	123	16,06	731	86	8,50
1753	139	12,61	723	108	6,69	1046	130	8,05
1744	264	6,61	1338	126	10,62	1356	160	8,48
842	62	13,58	1542	304	5,07	1454	156	9,32
761	76	10,01	1437	104	13,82	1600	248	6,45
1455	106	13,73	1389	222	6,26	1006	79	12,73
1798	406	4,43	1509	149	10,13	1283	204	6,29
1366	159	8,59	1483	148	10,02	675	78	8,65
1464	196	7,47	1717	298	5,76	1634	238	6,87
1236	89	13,89	1434	182	7,88	772	65	11,88
635	234	2,71	1752	128	13,69	738	112	6,59
902	143	6,31	1754	193	9,09	749	103	7,27
1763	480	3,67	1705	176	9,69	1678	243	6,91
1155	85	13,59	997	132	7,55	973	156	6,24
1608	256	6,28	826	168	4,92	1693	175	9,67
2113	224	9,43	777	75	10,36	1084	120	9,03
1436	127	11,31	755	157	4,81	1292	131	9,86
1355	209	6,48	1698	180	9,43	1420	107	13,27
Dendritenlängenquotient: $8,65 \pm 3,14$ (n = 63)								

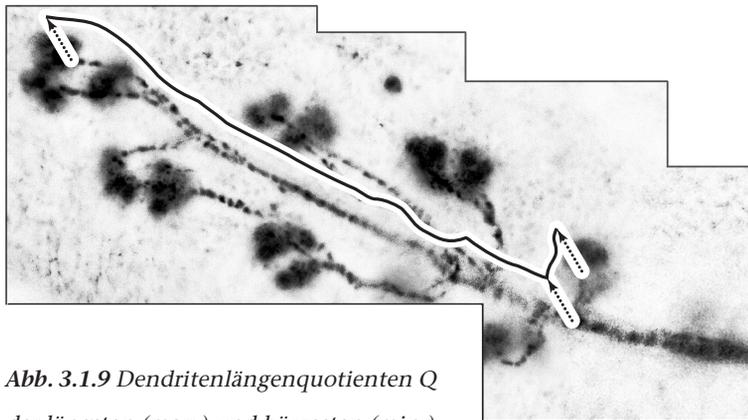


Abb. 3.1.9 Dendritenlängenquotienten Q der längsten (max.) und kürzesten (min.)

Dendriten, ermittelt aus der Horizontalprojektion der Endarborisation;
Schilbe mystis; (Beispiel einer Auswertung: $1338 \mu\text{m} : 126 \mu\text{m} = 10,67$)

3.2 Statistische Untersuchung des Interspike-Intervalls

Die Interspike-Intervall-Statistik kann Aussagen über die Zahl der aktiven Impulsentstehungsorte liefern und somit weitere Hinweise zur Lage des oder der Spikegeneratoren geben. Bei jeder Ableitung aus dem elektrosensorischen System von *Schilbe mystis* stellt man ein sehr hohes Maß an Regelmäßigkeit und Konstanz bei der Spikeabfolge während der Spontanaktivität fest. Um diesen augenfälligen Eindruck genauer quantitativ zu untersuchen, wurde eine große Anzahl von Interspike-Intervallen während Spontanaktivität erfaßt und dies mit Spikemustern in der »Aufwachphase« *post appl.* MS-222 (siehe auch Material und Methoden) und nach proximaler TTX-Applikation (siehe auch Kap. über progressive TTX-Vergiftung) verglichen, die ein jeweils evident anderes Bild liefern.

Zur statistischen Untersuchung des spontanen Interspike-Intervalls wurden 1050 Interspike-Intervalle einer idealtypischen Ableitung aus einem großen Cluster von *Schilbe mystis* mit zwölf, von einer Einzelfaser innervierten Organen vermessen und statistisch erfaßt. Das statistische Ergebnis ist eine schmale, eingipflige und weitgehend symmetrische (Offset = Schiefe der angepaßten Häufigkeitsverteilungskurve: 0,7%) Interspike-Intervall-Häufigkeitsverteilung (ISI-Häufigkeitsverteilung) ohne jegliche Basisverbreiterung mit einem σ von lediglich 7%.

Ein gänzlich anderes Bild zeigt die ISI-Häufigkeitsverteilung in der Aufwachphase nach MS-222 Anästhesie, die z.T. neben der klassischen »burst«-Aktivität (kurze »Spikesalven« unterbrochen von längeren erregungslosen Phasen) beobachtet werden kann und die an demselben Cluster wie zuvor durchgeführt wurde: hierbei kommt es zu einer

kontinuierlichen Spontanaktivität mit leicht verringerter Frequenz, jedoch mit starken, irregulären Fluktuationen im Interspike-Intervall. Die resultierende ISI-Häufigkeitsverteilung ist hier weitaus breiter, stark asymmetrisch, mit steilem Anstieg beginnend bei kurzen Intervallwerten

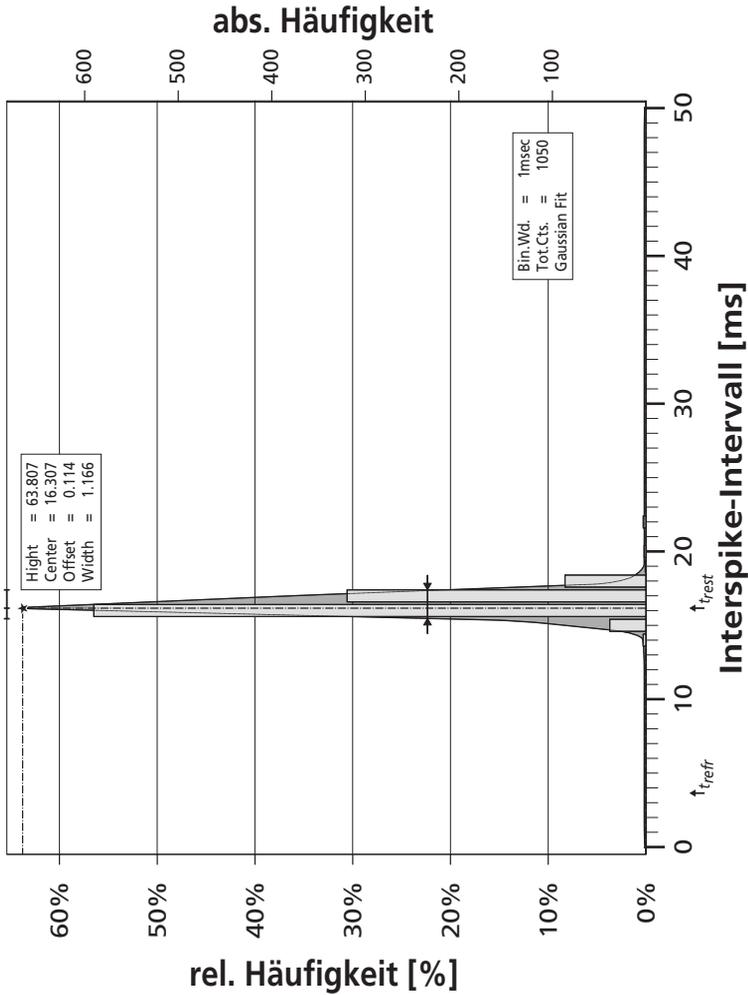


Abb. 3.2.1 ISI-Häufigkeitsverteilung der Spontanaktivität, Schilbe mystis

ab 3,8 ms, linksgipflig, mit flachem Auslauf zu großen Intervallwerten hin und zeigt somit gute Übereinstimmung mit der zu erwartenden Verteilungskurve eines Systems mit entkoppelten autonomen Van-der-Polschen Oszillatoren. Eine Kurve wie diese ist mit einem singulären

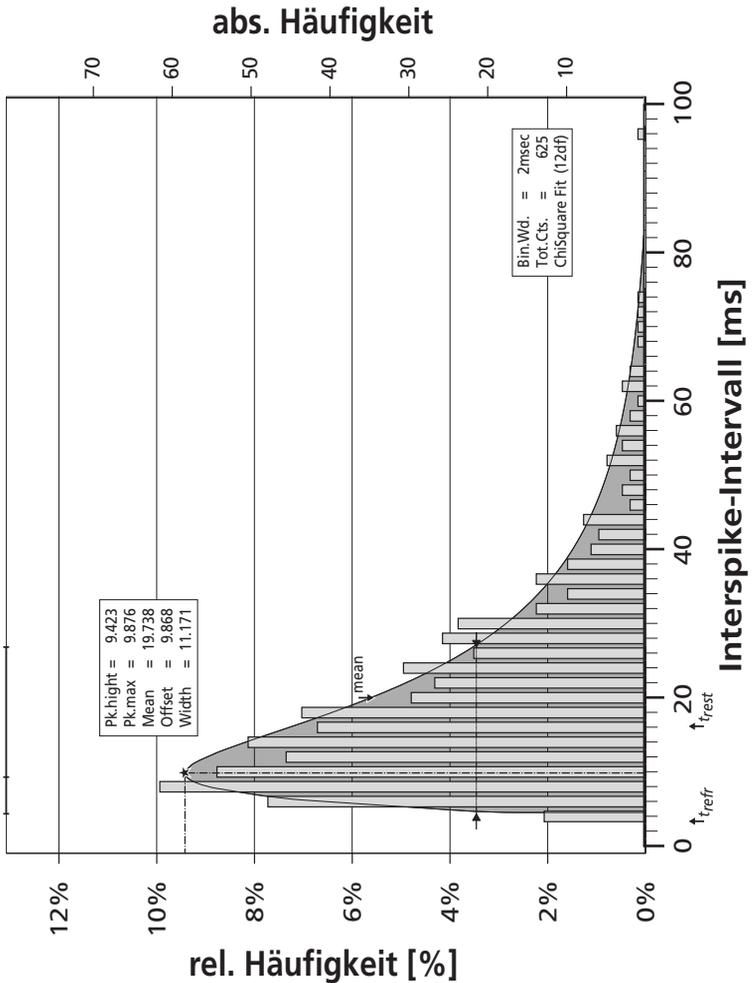


Abb. 3.2.2 ISI-Häufigkeitsverteilung post narc. MS-222, Schilbe mystis

Oszillatorsystem nicht in Einklang zu bringen (Hoppe *et al.* 1982, Gerthsen *et al.* 1977).

Eine dritte Art von Verteilungskurve erhält man bei proximaler Vergiftung des Initialabschnittes der gemeinsamen Afferenz mit TTX (siehe Ergebnisse und Diskussion der progressiven TTX-Vergiftung). Existiert hypothetisch nur ein Impulsentstehungsort, so müßte dieser (zwangsläufig) in der gemeinsamen Afferenz liegen und in seiner Funktion durch TTX beeinträchtigt werden, was prädigital z.B. zu einer Schwellenerhöhung für die Auslösung eines Aktionspotentials oder nach der Aktionspotentialbildung zu einem Ausfall einzelner Spikes führen könnte. Beides würde sich in charakteristischer, unterscheidbarer Weise in der ISI-Häufigkeitsverteilung manifestieren. Im Falle der Alternativhypothese wird eine Veränderung erst dann und nur in dem Maße eintreten, wie die TTX-Front bei progressiver TTX-Vergiftung mit proximal der Endarborisation gelegenen Applikationsort die jeweils organnah gelegenen Impulsentstehungsorte in den Dendriten erreicht und vergiftet bzw. durch Unterbrechung der Erregungsfortleitung die Kommunikation der einzelnen Aktionspotentialgeneratoren unterbindet und diese damit entkoppelt. Auch dies würde zu einer charakteristischen und von vorgenannten Möglichkeiten klar unterscheidbaren Veränderung der ISI-Häufigkeitsverteilung führen; darüberhinaus wären unterschiedliche Spikemuster bei der Doppelableitung aus verschiedenen Ampullen bei partieller Vergiftung der Endarborisation die unausweichliche Folge (dies konnte jedoch in sämtlichen Versuchen nicht ein einziges Mal gefunden werden, wie im weiteren Verlauf der Arbeit noch gezeigt wird). Betrachtet man nun die Histogrammkurve, so zeigt diese eine eindeutige, fast äquidistante Mehrgipfligkeit. Zusätzliche Nebengipfel treten – mit abnehmender »Peak«-Höhe – bei

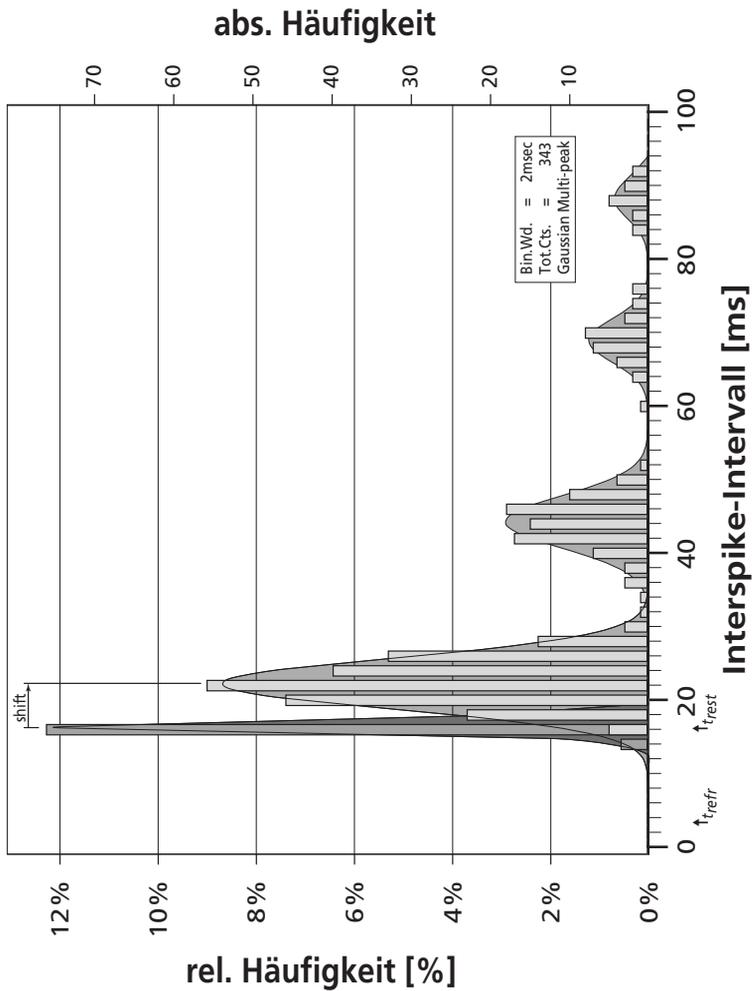
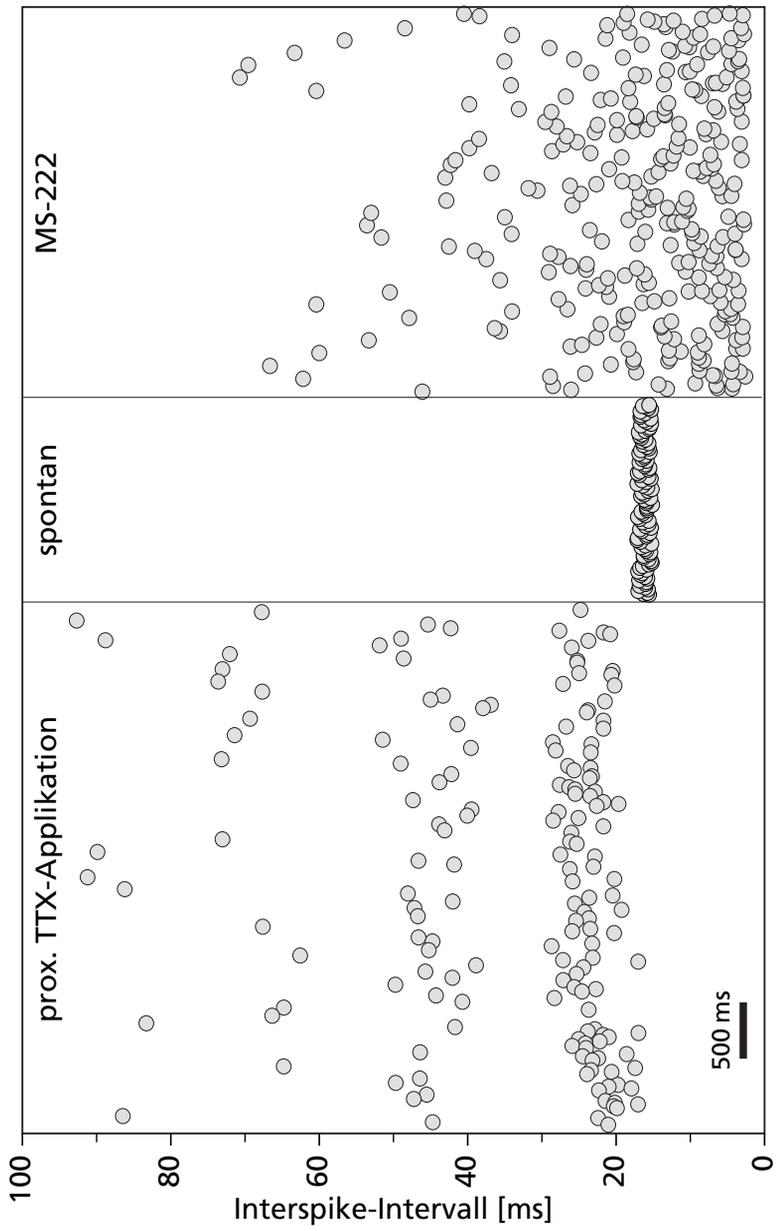


Abb. 3.2.3 ISI-Häufigkeitsverteilung nach proximaler TTX-Applikation; charakteristische stotternde Aktivität der Afferenz mit Ausfall von Einzelspikes und Spikegruppen; zum Vergleich einkopiert: Diagramm der Spontanaktivität prae appl. TTX (Amplitude verkleinert).

Abb. 3.2.4 Darstellung der ISI-Verteilung im »Scatter-Plot« (Nebenseite) ▷



den Vielfachen des Grundintervalls t_G , also neben $1 \cdot t_G$ auch bei $2 \cdot t_G$, $3 \cdot t_G$, $4 \cdot t_G$ auf. Das kürzeste Intervall entspricht in etwa dem Grundintervall der unvergifteten Faser, liegt jedoch geringfügig höher als dieses; auch das schmale, symmetrische Grundmaximum ist im Vergleich zum unbeeinflussten System etwas zu längeren Intervallwerten hin verschoben. Eindeutig ist das Fehlen jeglicher kürzerer Intervalle, wie sie bei entkoppelten Oszillatoren mit einer unteren Schranke, die durch die Refraktärzeit des Systems bestimmt wird, auftreten müßten. Diese Verteilung der Spikeintervalle belegt somit klar, daß sie einem Rhythmusgeber entspringt, bei dem einzelne Spikeereignisse synchron im gesamten Cluster ausfallen. Eine Entkopplung einzelner Impulsentstehungsorte oder Subzentren wurde niemals beobachtet; die Intervallverteilungskurven sind im gesamten Cluster (dies wurde in zahlreichen weiteren TTX-Versuchen bestätigt, siehe unten) absolut identisch.

3.3 Amplitudenvergleich innerhalb eines Clusters

Wie aus den morphologischen Daten und Bildern ersichtlich, können sich typische Cluster bei adulten Tieren der Spezies *Schilbe mystis* über bis zu 2 mm und mehr erstrecken. Dabei treten Dendritenlängen beim »Bäumchentyp« in ähnlicher Größenordnung auf (sie liegen genau genommen sogar um 20...40% darüber, da sie nicht geradlinig auf den proximal außerhalb des Clusters gelegenen basalen Ramifikationspunkt, der als Beginn der gemeinsamen Afferenz betrachtet werden kann, zulaufen). Postuliert man jedoch eine monozentrische Erregungsbildung an einem singulären Spike-Initiationsort, der dann zwangsläufig in der gemeinsamen Afferenz liegen müßte, so würden

wie zuvor erwähnt z.T. Wegstreckendifferenzen bei den Leitungslängen von bis zu 1:10 und darüber auftreten. Bei derartigen Wegstrecken und Streckendifferenzen ist jedoch (wie in der Berechnung im Kapitel Diskussion, ISI-Statistik abgeschätzt, siehe auch Kapitel Diskussion, Abschnitt: Amplitudenvergleich und Morphologie) zwangsläufig mit Amplitudenunterschieden und Impulsverbreiterungen bei den abgreifbaren Aktionspotentialen zwischen proximalen und distalen Ampullen zu rechnen.

Deshalb wurden Doppelableitungen in langgestreckten Clustern vom »Bäumchentyp« an insgesamt fünf Adultexemplaren von *Schilbe mystis* vorgenommen. In Vorversuchen wurde die Auswirkung der Elektrodenpositionierung innerhalb des Ampullenlumens und die Unterschiede in den beiden Ableitsignalwegen untersucht. Durch das angewandte Experimentalschema und die mathematische Verrechnung zur Elimination der Störgrößen (siehe Material und Methoden) konnte der Einfluß ableittechnischer Parameter wie Elektrodenpositionierung und -beschaffenheit, Unterschiede in den Ableitsignalwegen auf einen Wert von 0,3% (SEM) und der Fehler durch morphologische Unterschiede zwischen den beiden abgeleiteten Ampullen entsprechend auf 0,9% (SEM) reduziert werden.

Zur Untersuchung eines möglichen Amplitudengradienten innerhalb eines Clusters wurden an jedem der fünf Versuchstiere zwölf Mittelwertpaare aus jeweils 30 Einzelmessungen erhoben und in die Auswertung einbezogen. Die Gesamtzahl der gepaarten Einzelmessungen der Spikeamplitude betrug somit 1800 (zum Experimentalansatz siehe Material und Methoden). Ein signifikanter Amplitudenabfall entlang der Clusterausdehnung konnte experimentell in keiner Weise gefunden werden. Im Gegenteil zeigt sich eine fast perfekte Über-

einstimmung der ableitbaren Spikeamplituden und Spikeformen über das gesamte Cluster. Der Medianwert ist identisch, die Mittelwerte stimmen bis auf $\pm 1,7\%$ überein ($\pm 0,2 \sigma$). Überraschenderweise waren die abgreifbaren Amplituden am distalen Clusterende sogar die geringfügig größeren, jedoch ist diese Beobachtung angesichts des nicht-signifikanten Unterschieds bei den Amplitudenhöhen statistisch nicht abzusichern und möglicherweise zufälligen Ursprungs. Die Ergebnisse belegen jedoch stringent, daß die Amplituden am distalen Ende des Clusters keinen signifikanten Abfall – bedingt durch die extreme Fortleitungsstrecke – zeigen und die Aktionspotentiale sich somit im Rahmen der Meßgenauigkeit dekrementfrei in der Endarborisation ausbreiten.

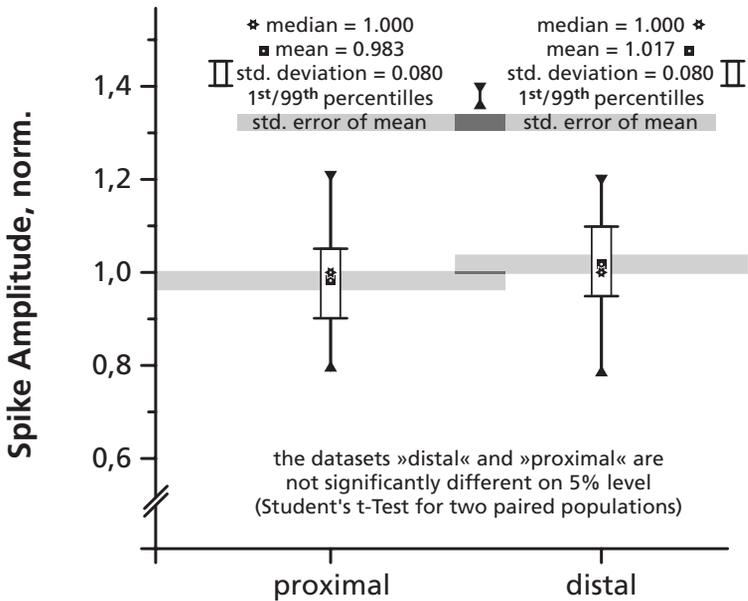


Abb. 3.3.1 Vergleich der im Ampullenlumen abgreifbaren Aktionspotentialamplitude zwischen proximal und distal gelegenen Clusterorganen bei *Schilbe mystis*. Die Standardfehler der Mittelwerte überlappen sich geringfügig.

3.4 Präparationsversuche

Zur genaueren Untersuchung des Systems ist es naheliegend, Nerv und Dendriten zu präparieren, um Zugang zu den neuronalen Strukturen für eine direkte intra- oder extrazelluläre Ableitung, Stimulation oder sogar »voltage-clamp«-Experimente zu erhalten. Es wurden rund 300 Präparationsversuche an Clustern der basalen Partie der Analflosse an insgesamt 43 Individuen der Spezies *Schilbe mystis* unternommen, da nur hier unter günstigsten Beleuchtungsbedingungen die afferente Faser im basalen Bereich der Analflosse sichtbar gemacht werden kann. Die erfolgreiche Präparation eines intakten Präparats erwies sich als weitaus komplizierter, als sie sich zunächst darstellte. Folgende Hauptschwierigkeiten sind zu berücksichtigen:

1. Die neuronalen Strukturen sind selbst unter sehr guten Präparationsbinokularen nur sehr schwer sichtbar zu machen (zur Beleuchtungstechnik und Auflösungsgrenze siehe Material und Methoden) und liegen an der Auflösungsgrenze des technisch Möglichen (Pohl 1958, Romeis 1968, Bergmann & Schäfer 1974, Inoué 1987, Zeiss 1999, persönl. Diskussion mit Dr. Bäsénmatter, Physiker, und H. Serfling, Entwicklungingenieur, beide Fa. Zeiss – Mikroskope und medizinische Optik). Deshalb sind die Fasern nur zeitweise und partiell während der Präparation sichtbar, oder eher, erahnbar. Phasenweise sind die Strukturen unter keinen Umständen erkennbar, z.B. bei Schnittführung, Abpräparieren der Haut etc. – die Präparation muß hier »blind« fortgeführt werden.

2. Die Sichtbarkeit verschlechtert sich drastisch, wenn die Haut geöffnet wird durch Trübungsbildung (u.a. Fettröpfchen), Meniskenbildung durch Objekte, die aus dem dünnen Flüssigkeitsfilm, der die

Präparationsstelle stets überdecken muß, herausragen, und durch Überschichtung mit Silikonöl, das die Stelle isolieren und vor Austrocknung schützen soll.

3. Die zu präparierenden Strukturen liegen im μm -Bereich und sind damit äußerst fein und empfindlich. Bereits geringfügige Zerrungen, Quetschungen oder kurzzeitiges Trockenfallen führen zur sofortigen Beschädigung der Nervenfunktion. Evtl. hat bereits die Trennung der Haut von der Bindegewebsschicht eine kritische mechanische Scher- und Zugbelastung der zwischen beiden Schichten gelegenen Fasern zur Folge; auch leichtes Berühren der Fasern mit Präparationswerkzeugen zur Lösung vom umgebenden Gewebe führt höchstwahrscheinlich zur mechanischen Überbeanspruchung.

4. Da Fasern und Dendriten vollständig myelinisiert sind, scheiden einfache extrazelluläre Ableitungen ohne vollständige Präparation der Faser und sehr gute elektrische Isolation von der Umgebung durch Abheben und Umhüllen des Neuriten mit Silikonöl aus; alle Ableitversuche aus der nicht freipräparierten Faser erzielten keine brauchbaren Ergebnisse. Auch das Eindringen in die Afferenz mit einer intrazellulären Mikroelektrode nach Fenestrieren der Hautoberfläche ist nahezu unmöglich und schlug trotz einiger hundert Versuche fehl.

Es wurden drei Präparationstechniken erprobt:

1. Der direkte Zugang durch Vorperforieren und flache Inzision der Haut in der unteren Rumpfpartie (der Fisch liegt flach auf agarbeschichtetem Präparationsspiegel, Schnittformen siehe Schemazeichnung). Der Longitudinalschnitt befindet sich knapp oberhalb der Analflossenbasis in der unteren ventralen Rumpfpartie. Anschließend wird vorsichtig die Haut flach vom darunterliegenden Gewebe gelöst und abgeklappt und der im Bindegewebe eingebettete Nerv freigelegt.

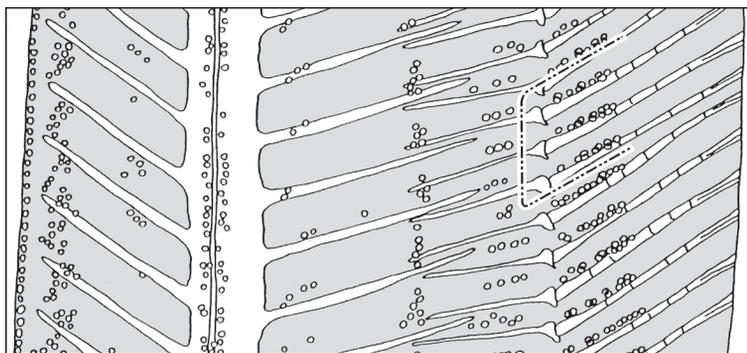


Abb. 3.4.1 Schnittführung bei der Präparation der afferenten Faser (Abb. nach Irlbauer, 1987, modifiziert)

2. Nadelpräparation. Mittels Skalpellspitze und sehr feiner Präpariernadel wird eine kleine Öffnung im Bereich der Kehlung zwischen Rumpf und Analflossenansatz über dem afferenten Nerv erzeugt. Anschließend wird der Nerv mit Präpariernadel und speziellen Subminiaturhaken (Irlbauer 1987) vom Gewebe gelöst und vorsichtig angehoben.

3. Ein kleiner, ca. 3 mm großer U-förmiger Hautlappen wird vom Körperstamm zum Flossenrand zu bis auf Höhe des von dieser Faser innervierten Clusters abgeklappt. Dazu wird die Haut erst perforiert und dann eingeschnitten. Die Präparationstiefe wird diesmal so gewählt, daß die gesamten neuronalen Strukturen mit dem Hautlappen mitgenommen und abgeklappt werden. Die Strukturen liegen dann im Erfolgsfall bereits ohne großen Freilegungsaufwand offen und sind von der Bindegewebsseite (serosale Seite des Hautpräparats) zugänglich.

Jede der Methoden ist prinzipiell geeignet, den afferenten Nerv freizulegen. Dies ist jedoch mit großem Aufwand und meist etlichen

Fehlversuchen verbunden. Die Erfolgsquote konnte mit jeder dieser Methoden bis auf etwa 20% für das erfolgreiche Freilegen der Faser gesteigert werden. Jedoch stellt jede der Methoden einen mechanischen, evtl. auch einen chemischen bzw. osmotisch-siccativen Streß für die sehr empfindlichen Strukturen dar und ist in keiner Weise mit der vergleichsweise einfachen Präparation von Nervenästen z.B. des Seitenliniennervs vergleichbar. Selbst bei weitestgehender Minimierung aller Streßfaktoren sind die afferenten Einzelfasern wegen der Komplexität der Präparation und der relativ langen Zeitspanne bis zur erfolgreichen vollständigen Freilegung und Beginn der Ableitung stets bereits irreversibel geschädigt. Deshalb scheidet eine direkte Untersuchung der neuronalen Strukturen nach unserem präparationstechnischen Kenntnisstand aus.

3.5 Theoretische Abschätzung der Signalausbreitung in der Endarborisation

Es wurde versucht, über mathematische Modellierung des Dendritenbaums genauere Informationen über das System zu erhalten. Da jedoch keine exakten Daten über die Endarborisation vorliegen (weder zur Morphologie, z.B. Querschnittsverteilung und -profile im Dendritenbaum, Myelinisierungsgrad, Anzahl der Myelinlagen, noch zu Kanalbestückung, Verteilungsdichteprofilen, Leitfähigkeit der Ionenkanäle oder elektrischen Daten der Endarborisation usw.), erscheint eine aufwendige mathematische Simulation der Signalausbreitung z.B. mittels der etablierten neurophysiologischen Analysesoftware NEURON (NEURON Version 4.3.1 for NT-Workstations: Hines M. & Moore J.W., Duke University, Durham, Carneville N.T., Yale Univ., New Haven CT,

<http://neuron.duke.edu>, <http://neuron.yale.edu>) wenig sinnvoll und wurde deshalb nach einigen Versuchen der Simulation mit Literaturdaten nicht weiter fortgeführt. Eine grob abschätzende Berechnung der Aktionspotentialausbreitung mit »unscharfen« Parametern lieferte angesichts der vielen Freiheitsgrade und der großen Variationsbreite einiger Parameter (es liegen auch keine hinreichend exakten und verlässlichen Grenzwerte vor, die eine einschränkende Abschätzung erlauben würden) keine sinnvollen und aussagekräftigen Ergebnisse und wurde deshalb auch nicht in diese Arbeit aufgenommen.

3.6 Progressive TTX-Vergiftung

Ziel dieser Experimente ist es, Aussagen über die Vorgänge in der Endarborisation treffen zu können, die auf dem Wege direkter Messung nicht zu gewinnen sind, da das System nach unseren bisherigen Erfahrungen trotz intensiver Anstrengungen präparativ für neurophysiologische Untersuchungen nicht zugänglich ist. Aus den morphologischen und physiologischen (Doppelableitungen) Experimenten an *Schilbe mystis* ist bekannt, daß es sich bei dem untersuchten System um ein sehr ausgedehntes Dendritensystem handelt, bei dem die Inputs aus einigen hundert bis über tausend chemischen Synapsen, die den Sinneszellen der sensorischen Epithelien von bis zu ca. 30 Organen zugeordnet sind und über ein Areal von bis zu ca. 2 mm verteilt sein können, auf ein afferentes Neuron konvergieren. Daraus ergeben sich Fragen über Zahl und Lage der Generationsorte für die Aktionspotentiale (Impulsentstehungsorte), über ihre Synchronisation, falls mehrere davon existieren, über die Fortleitung der graduierten postsynaptischen Potentiale (PSP) von der Synapse zum Impulsentstehungs-

ort, über die Interaktion der einzelnen Organantworten am Impulsenstehungsort und die Funktionsweise der Konvergenz und über die retrograde Ausbreitung der Aktionspotentiale in der Endarborisation.

Es wären nun prinzipiell mehrere Funktionsmechanismen dieses Systems denkbar, die nach bisherigem Kenntnisstand jedoch z.T. weitere Fragen oder Probleme aufwerfen würden (Genauerer siehe Diskussion):

- Es liegt in jedem Dendritenast ein Impulsenstehungsort in der Nähe der postsynaptischen Strukturen, der die synaptischen Potentiale in aktiv fortgeleitete Aktionspotentiale umsetzt. Es gäbe dann im System mehrere Impulsenstehungsorte, die durch einen bislang nicht identifizierten Mechanismus synchronisiert werden müßten. Die Fortleitung der postsynaptischen Potentiale und die Ausbreitung der Aktionspotentiale zur Synapse wären damit unkritisch.
- Es gibt nur einen Impulsenstehungsort für das gesamte Dendritensystem. Dieser muß dann zwangsläufig in der gemeinsamen Afferenz – und somit bis zu ca. 2...3 mm von der Synapse entfernt – lokalisiert sein. Die EPSPs könnten diese Distanz elektrotonisch nach theoretischen Erwägungen jedoch kaum überwinden. Folglich wären in diesem Fall u.U. hypothetisch aktive Mechanismen zu postulieren, die die postsynaptischen Potentiale bei ihrer Ausbreitung unterstützen; diese Fortleitungsmechanismen könnten z.B. auf der Basis spannungsgesteuerter Kanäle (z.B. Natriumkanäle) arbeiten. Für diese Spekulationen über aktive Fortleitungsmechanismen lagen uns jedoch zu diesem Zeitpunkt keine Hinweise aus Experiment oder Literatur vor; sie entsprangen einer Hypothese, die in Kenntnis grundlegender Eigenschaften spannungsgesteuerter Natriumkanäle aufgestellt wurde.
- Es könnte die gesamte Endarborisation synchron spiken. Auch in diesem Fall wird jedoch der Spike an einer Stelle initiiert und dort der

Hodgkin-Huxley-Zyklus erstmals ausgelöst. Somit ist dieser Fall erst ab der Auslösung eines Aktionspotentials unterscheidbar von den vorgenannten Hypothesen; der Unterschied liegt lediglich im Grad der Kopplung, den elektrisch-morphologisch-physiologischen Eigenschaften der Endarborisation, ob man eher von einer lokal begrenzten, sich in der Arborisation ausbreitenden Erregung oder von ausgedehnten, weitgehend synchron aktiven Strukturen sprechen kann. Für die Klärung der Systemfunktion ist dies zunächst von untergeordneter Bedeutung. Der Impulsenstehungsort kann auch hier nahe den postsynaptischen Strukturen oder in der gemeinsamen Afferenz liegen.

- Impulsenstehungsorte, die mitten in den Dendriten der Endarborisation liegen, wären theoretisch zwar möglich (sie würden sich entsprechend ihrer Lage im Dendritensystem zwischen den beiden oben genannten Fällen verhalten und experimentell manifestieren), jedoch wäre eine solche Lage physiologisch wenig sinnvoll und kaum wahrscheinlich.

Durch Einsatz eines spezifischen Blockers für spannungsgesteuerte Natriumkanäle können gezielte Eingriffe in dem System vorgenommen werden. Da der Kanalblocker weder an der Sinneszelle (und deren Transduktionsvorgängen) angreifen kann (Zipser & Bennett 1973, Akutsu & Obara 1974, Umekita *et al.* 1975, Obara & Sugawara 1979, Bennett 1986, Bretschneider & Peters 1992), noch an deren Synapse zum afferenten Neuron oder den unspezifischen subsynaptischen Kationenkanälen (Narahashi *et al.* 1966, Ulbricht 1979, Stryer 1996), die für die Entstehung des postsynaptischen Potentials verantwortlich sind, bleibt seine Wirkung beschränkt auf den Generationsprozeß der Aktionspotentials am Impulsenstehungsort, die Fortleitung der Aktionspotentials sowie evtl. im Falle aktiver (und u.U. auch passiver) Fort-

leitung der EPSPs auf deren Ausbreitung und damit auf die Entstehung des Generatorpotentials am Impulsentstehungsort. Diese TTX-inhibierbaren Prozesse finden jedoch – in Abhängigkeit von den oben genannten Hypothesen – in unterschiedlichen Bereichen der Endarborisation statt. Der Grad der TTX-Wirkung auf die drei potentiell affizierten Prozesse läßt sich mittels Doppelableitung (möglichst an proximaler und distaler Extremposition innerhalb eines Clusters) klar unterscheidbar bestimmen und den unterschiedlichen Funktionshypothese zuordnen. Eine lokale Applikation des TTX mittels positionsgenauer und statischer (ortsfester) Mikroinjektion ist nicht möglich (große technische und präparative Schwierigkeiten, außerdem breitet sich das TTX sofort im umgebenden Gewebe aus und bleibt dann also nicht lokal begrenzt wirksam). Deshalb wurde ein anderer Weg beschritten und der Kanalblocker außerhalb des Clusters appliziert und von proximal bzw. distal in das Cluster eindiffundieren lassen (siehe Material und Methoden). Die Ausbreitung durch Diffusion von der Applikationsstelle ausgehend muß in homogenem Gewebe kontinuierlich, gleichförmig und weitgehend isotrop erfolgen. Da das Molekül als nicht membrangängig bekannt ist (eigene Vorversuche, Stryer 1996, Alberts *et al.* 1983, Molecular Probes 1999), kann es sich ausschließlich im Interstitium ausbreiten, und hat dadurch eine verlängerte Diffusionsstrecke gegenüber freier Ausbreitung, was zu einer Verlangsamung der Diffusion führt. Relevante Wechselwirkungen sollten in diesem System nur mit Natriumkanälen auftreten (quantitative Titration der Natriumkanäle mit TTX, siehe Moore & Narashi 1967, Narahashi & Moore 1968, Ulbricht 1977, Molecular Probes 1999), die zu einer für unsere Betrachtungen als stabil zu bezeichnende Bindung des Blockermoleküls in der Kanalpore nach sich zieht (Ulbricht 1977, 1979, Stryer

1996); Bindungen zu anderen Strukturen in gleichgewichtsrelevanten Dimensionen sind nicht zu erwarten (*ibid.*, Narahashi *et al.* 1966).

Außerdem könnte die Diffusion noch von Strömungen im Interstitium überlagert sein. Zieht man zur Abschätzung des Strömungseinflusses Daten von Säugetieren bzw. des Menschen heran (Schmidt *et al.* 1983, Eckert 1986, Silbernagl & Despopoulos 1991, Randall 1997), so sollte dieser Einfluß von untergeordneter Bedeutung sein, da gerichtete Flüssigkeitsbewegungen in Form von interstitiellen Strömungen wie auch Drainageströmungen des Lymphsystems typischerweise derart geringfügig bzw. langsam sind, daß sie von Diffusionsbewegungen kleiner Moleküle wie dem des TTX um Größenordnungen übertroffen werden. Transmurale Austauschvorgänge in der terminalen Strombahn und Stoffaustausche innerhalb von Geweben über die interstitielle Flüssigkeit werden deshalb bei Molekülen von der Größe des TTX nahezu ausschließlich von der Diffusion getragen (*ibid.*). Eine Ausnahme von der dominierenden Rolle der Diffusion im Stofftransport bilden in diesem Bereich Kapillarströmungen, die mit typischen Geschwindigkeiten von 0,3 mm/s deutlich über der zu erwartenden mittleren Diffusionsgeschwindigkeit von 0,01 mm/s liegt. Diese Diffusionsgeschwindigkeit wurde für TTX im freien Plasma unter Annahme einer konstanten Konzentration am Applikationsort, die der Konzentration der applizierten TTX-Lösung entspricht, und eines linearen Konzentrationsgradienten für eine Diffusionsstrecke von 1 mm errechnet nach:

$$\dot{x} = -\frac{R \cdot T}{N_a \cdot 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \cdot \frac{d \ln(c_t)}{dx}$$

$$x = \int_{t=0}^i -\frac{R \cdot T}{N_a \cdot 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \cdot \frac{d \ln(c_t)}{dx} dt$$

Hierbei entsprechen R der allgemeinen Gaskonstante, T der Absoluttemperatur in Kelvin, N_a der Avogadrokonstante oder Loschmidtschen Zahl, π der Kreiszahl, η der dynamischen Viskosität der Lösung, r dem Teilchenradius, \ln dem Logarithmus naturalis und dc_t/dx dem Konzentrationsgradienten zum jeweiligen Zeitpunkt t . Durch Bildung des Integrals über der Diffusionsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt t erhält man die Diffusionsstrecke, die unter den gegebenen Annahmen nach rund zwei Minuten einen Millimeter erreicht (Hodgeman 1953, van Holde 1971, Cantor & Schimmel 1980, Brdicka 1985, Atkins 1998). Dabei handelt es sich um eine mittlere Diffusionsgeschwindigkeit, d.h. es gibt »schnellere« und »langsamere« Moleküle (Maxwell Verteilung). Die tatsächliche mittlere Diffusionsgeschwindigkeit dürfte jedoch sicherlich geringer sein, primär da sich die Diffusionsstrecke im Interstitium verlängert und sich der Konzentrationsgradient zusätzlich abflacht aufgrund der Konzentrationsabnahme durch Verdünnungseffekte am Applikationsort und durch TTX-Bindung in Natriumkanälen entlang der Diffusionsstrecke. Praktisch sollten (für Moleküle mittlerer Geschwindigkeit) Diffusionszeiten von 3...5 Minuten für eine Diffusionsstrecke von 1 mm zu erwarten sein. Dies wären gute Ausgangsvoraussetzungen für die Beobachtung der Ausbreitung der Diffusionsfront durch das Cluster und die progressive Vergiftung der TTX-inhibierbaren Prozesse. Um diese Überlegungen im praktischen Experiment zu überprüfen, wurden deshalb in einem Vorversuch drei Diffusionsstrecken untersucht: 0,5 mm, 1,0 mm, 2,0 mm.

Für die theoretische Berechnung wurde die Diffusionsausbreitung nach dem ersten Fickschen Gesetz nach oben genannter Formel unter Verwendung der bekannten Zahlenwerte und Konstanten (s.o.) simuliert. Einzige experimentelle Variable, die mit erheblicher Unschärfe in der

realen Applikationssituation versehen ist, stellt die Konzentration c am Applikationsort, dem Diffusionszentrum, dar, da dort durch Verdünnungseffekte in das Umgebungsmedium zwangsläufig eine geringere als die Ausgangskonzentration der applizierten TTX-Lösung vorliegen wird. Es zeigt sich jedoch, daß eine Veränderung der TTX-Konzentration am Applikationsort um den Faktor zehn die Diffusionsgeschwindigkeit lediglich um 20% und damit nur unerheblich für eine grobabschätzende Betrachtung verändern würde. Veranschlagt man die zuvor erwähnten Faktoren, die die Diffusionsausbreitung verlangsamen, mit einem hypothetischen Faktor von zwei, so erhält man eine erstaunlich gute Übereinstimmung zwischen theoretischen und experimentell gefundenen Werten:

Diffusionsdistanz	theoretische Diffusionszeit	korrigierter theoretischer Wert	praktisch gemessener Wert
0,5 mm	28 s	56 s	45 s
1,0 mm	114 s	228 s	240 s
2,0 mm	456 s	912 s	1290 s

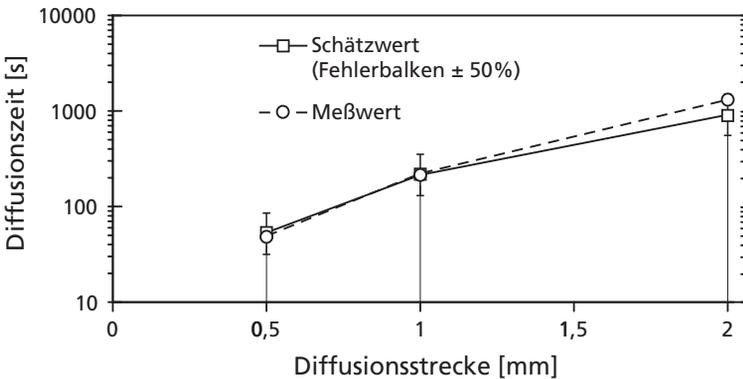


Abb. 3.6.1 Vergleich zwischen theoretisch berechneten und experimentell gemessenen Diffusionszeiten; die größere Steigung der Meßkurve steht in Einklang mit den Erwartungen (s. Text)

Die höhere Steigung der Experimentalkurve steht ebenfalls in gutem Einklang mit den theoretischen Erwartungen: da die Konzentration an TTX mit der dritten Potenz der Diffusionsdistanz abnimmt, genügt auf kurze Entfernung bereits eine kleinere Fraktion der schnelleren Moleküle, um das System vollständig zu blockieren, während über eine Strecke von 2 mm dieser Effekt erst eintritt, wenn sich die Konzentration ihrem Maximalwert nähert und auch die langsameren Moleküle ihren Wirkort erreicht haben. Diese Überlegungen stellen zweifellos lediglich eine grobe Abschätzung der zu erwartenden Ausbreitungsverhältnisse im Untersuchungssystem dar. Da sie jedoch unter den experimentellen Rahmenbedingungen als weitgehend konstant angesehen werden können und (abgesehen von Kapillaren) keine systematischen Inhomogenitäten oder Störfaktoren für die Ausbreitung vorliegen, ist auf jeden Fall mit der Ausbildung einer homogenen Diffusionsfront zu rechnen (wie sie aus einschlägigen Experimenten bekannt ist), die sich vom Applikationsort zentrifugal isotrop ausbreitet (Hodgeman 1953, Cantor & Schimmel 1980, persönl. Diskussion mit Prof. P. Fromherz, Direktor der Abteilung für Membran- und Neurophysik am Max-Planck-Institut Martinsried) und damit die Dendritenstrukturen nachvollziehbar und definiert vergiftet. Eine direkte Beobachtung der Diffusionsausbreitung des TTX ist leider nicht möglich; fluoreszenzmarkiertes TTX, das früher von Molecular Probes vertrieben wurde, ist nach fundierten Recherchen und Korrespondenz mit Experten auf diesem Gebiet (A. Schulz, MoBiTec LLC, Florida, USA, T.C. Smith, Molecular Probes, Oregon, USA) nicht mehr verfügbar und wird mangels Nachfrage weltweit nicht mehr synthetisiert. Außerdem wäre der Nachweis – geschweige denn quantitative Untersuchungen – in unserem System mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nachweistheoretisch praktisch ausgeschlossen.

Durch Wahl des Applikationsortes können somit zwei klar unterschiedliche Inhibitionsszenarien geschaffen werden, die unterschiedliche und für die zuvor erwähnten denkbaren Arbeitsprinzipien der Endarborisation charakteristische Ergebnisse liefern müssen. Zwar ist mit einer nicht unerheblichen Variabilität zwischen den einzelnen Versuchen zu rechnen, die insbesondere aus Unterschieden in Clusterbau und Ableitgeometrie, aber auch durch Unterschiede in der tatsächlich ins Gewebe aufgenommenen TTX-Menge resultieren dürfte; Probleme treten jedoch – wie bereits zuvor erwähnt – lediglich auf, wenn sich der TTX-Applikationskanal in unmittelbarer Nähe zu Kapillaren befindet, da dann – wie sich im Experiment bestätigte – die Diffusionsausbreitung des TTX gravierend gestört und offenbar ein Teil der applizierten Substanz entlang der Blutbahn transportiert wird.

3.6.1 Vorversuche zur TTX-Vergiftung

Vor der Durchführung der TTX-Versuche müssen zunächst zwei Fragen geklärt werden: 1. Kann TTX auch ohne Mikroläsion in das untersuchte Gewebe gelangen und am afferenten Neuron wirksam werden oder dringt es ausschließlich durch die zuvor beigebrachte Punktläsion ein und diffundiert von dort aus zentrifugal in das umgebende Gewebe und zum Neuron? (→ Blindversuch) 2. Welchen Einfluß auf das Untersuchungssystem üben Mikroläsion und Applikationsprocedere aus? (→ Leerversuch) So ist z.B. eine negative Korrelation zwischen Ionenkonzentration im Umgebungsmedium um den Ableitort herum und meßbarer Spikeamplitude bekannt (die im Ampullenlumen abgreifbare Spikeamplitude ist unter extrem ionenarmen Milieubedingungen am größten und verringert sich mit zunehmender Ionenkonzentration).

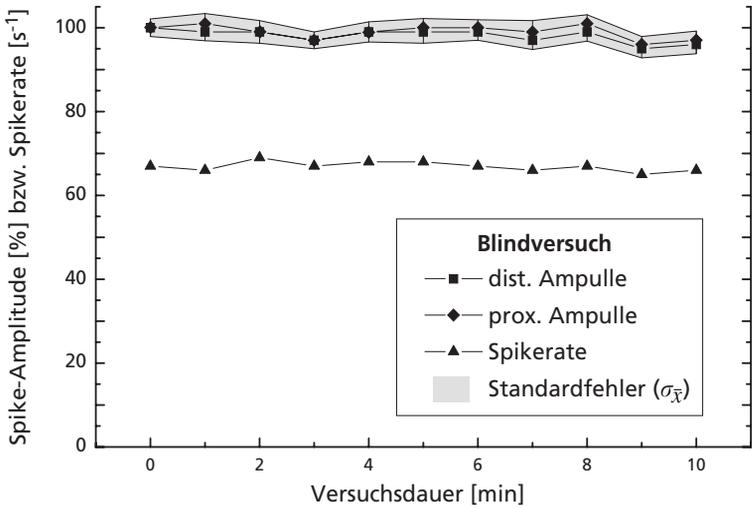
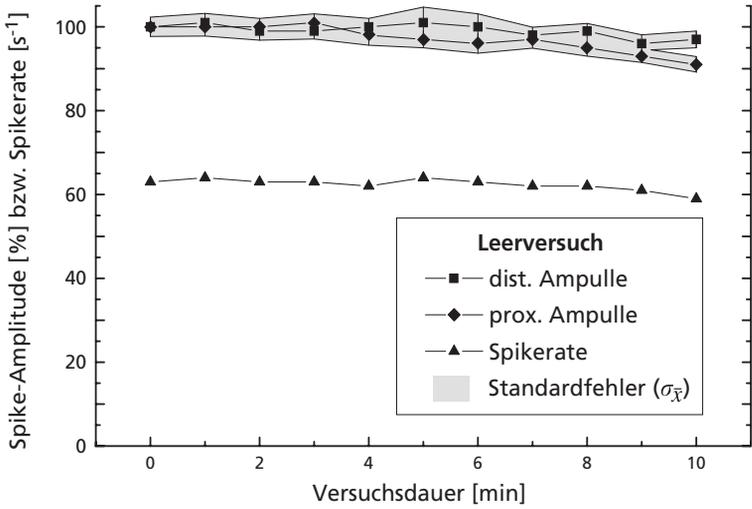


Abb. 3.6.2 Leerversuch (Applikation einer wirkstofffreien Lösung auf Stichkanal) und Blindversuch (Applikation der TTX-Lösung auf unversehrte Haut).

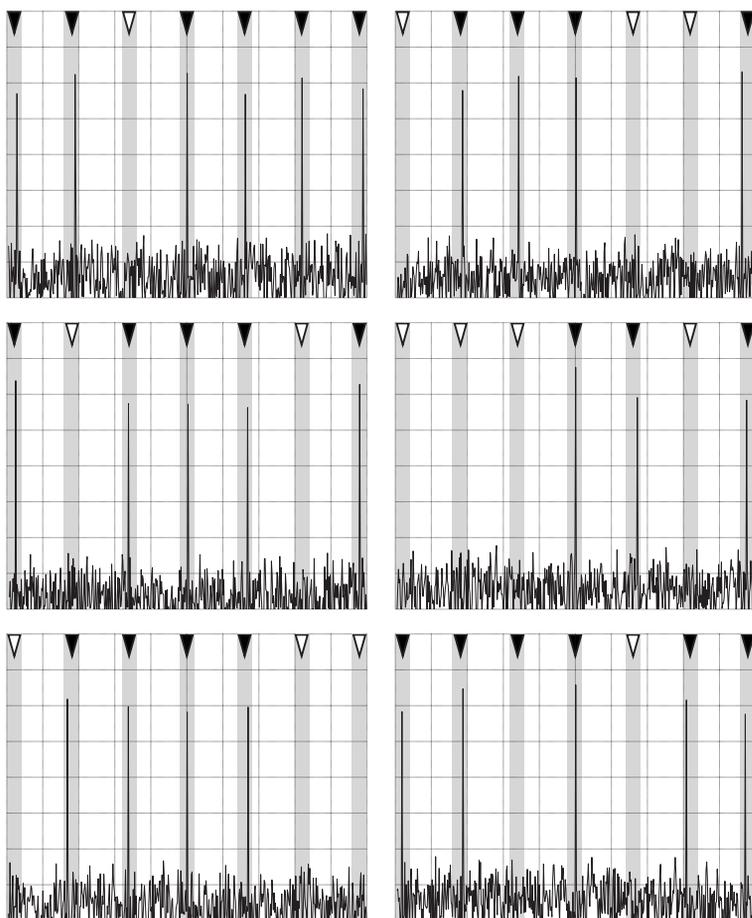
tration z.B. durch austretende Gewebsflüssigkeit, bedingt durch den abnehmenden »Shunt«-Widerstand über die leitfähigere Umgebung der elektrosensorischen Ampulle, den Wasserkörper, zum Signalbezugspunkt der Messung; siehe Material und Methoden). Hierbei spielt, wie sich zeigte, u.U. auch durch Hautläsionen austretende Körperflüssigkeit eine Rolle. Diese Fragestellungen wurden zunächst mittels Blind- und Leerversuch untersucht (siehe Kap. Material und Methoden). Diese Versuche bestätigten jeweils einen geringen Einfluß dieser Faktoren, der deutlich unter Signifikanzniveau liegt.

3.6.2 Proximale TTX-Vergiftung

Vergiftet man das System unter den in Material und Methoden beschriebenen Bedingungen aus proximaler Richtung (d.h. Diffusionsrichtung des TTX vom Körperstamm zum Rand der Analflosse) und leitet dabei aus zwei Ampullen in proximaler und distaler Extremposition innerhalb des Clusters ab, so erhält man – trotz einiger Variabilität im Detail – ein sehr charakteristisches und hochsignifikantes Veränderungsmuster.

Die durchschnittliche Versuchsdauer (d.h. die Zeit ab der TTX-Applikation bis zum letzten Meßpunkt vor Ausbleiben der Spikes) beträgt im Mittel 4 min 10 s ($\pm 2'40''$) (Quartilabstand 2'00" ... 5'15"). Das Ende der Messungen wird durch das Ausbleiben der Aktionspotentiale bestimmt. Während dieser Zeitspanne verringert sich die ableitbare Spikeamplitude nur geringfügig. Der Amplitudenmittelwert der dem Applikationsort fernen Ampulle bleibt zunächst in guter Näherung konstant ($\pm 1\%$), beginnt nach 75% der Versuchsdauer minimal abzusinken und erreicht zum Ende der Messung 95%. Charakteristisch ist, daß die applikations-

ortnähere Ampulle zunächst nur geringfügig und nicht-signifikant in ihrer Amplitude unter der Ampulle am distalen Clusterende liegt, sich ab 75% der Versuchsdauer erstmals signifikant (auf 95%-Niveau) unterscheidet und zum Ende der Messung auf 81% der Ausgangsamplitude abfällt. Damit bleibt somit insgesamt der Einfluß der TTX-Vergiftung auf die abgreifbaren Spikeamplituden im Ampullenlumen relativ gering.



Dafür zeigt sich bei jeder Messung ein charakteristischer Einfluß der TTX-Vergiftung auf Spikefrequenz und Spikerhythmus: Die Grundfrequenz der Spikeereignisse nimmt nur geringfügig im Verlauf der Messung ab, dafür kommt es etwa ab der Hälfte der Versuchsdauer zum Ausfall von Einzelspikes und später von ganzen Spikegruppen; das System beginnt zu »stottern« (siehe Abschnitt: »statistische Untersuchung des Interspike-Intervalls« in diesem Kapitel). Obwohl der resultierende Frequenzrückgang in ähnlicher Größenordnung liegt wie bei der distalen TTX-Applikation, sind das zu beobachtende Phänomen wie auch der zugrundeliegende Mechanismus (siehe Diskussion) völlig unterschiedlich und treten ausschließlich bei der proximalen TTX-Vergiftung auf. Dabei blieben während der gesamten Messung die Spikeereignisse auf beiden Ampullen absolut synchron; in allen Messungen wurde nicht ein einziger Spike gefunden, der nur an einer Ableitstelle sichtbar war und am anderen Ende des Clusters nicht auftrat. Die Abnahme der Reizempfindlichkeit (gegeben durch die Frequenzantwort des Clustersystems auf einen erregenden anodischen Stimulus) fällt mit 25% relativ gering aus (von 145% auf 109% bezogen auf das Kontrollniveau der Spontanaktivität), während die Spontanaktivität im selben Zeitraum um 90% (von 100% auf 10%) absinkt. Am Ende der Messung, wenn bereits keine spontanen Spikes mehr auftreten, ließ sich bei einem Teil der Experimente noch für kurze Zeit durch einen stärkeren Stimulus eine Erregung auslösen.

◁ *Abb. 3.6.3 Einfluß von proximal appliziertem TTX auf die Aktivitätsmuster der elektrosensorischen Afferenz; ungefüllte Pfeile vor den grau hinterlegten Balken (Breite: $\mu\pm\sigma$) zeigen die Ausfälle aus einem regelmäßigen Aktivitätsrhythmus an. Oszilloskopregistrierung, 10ms/DIV.*

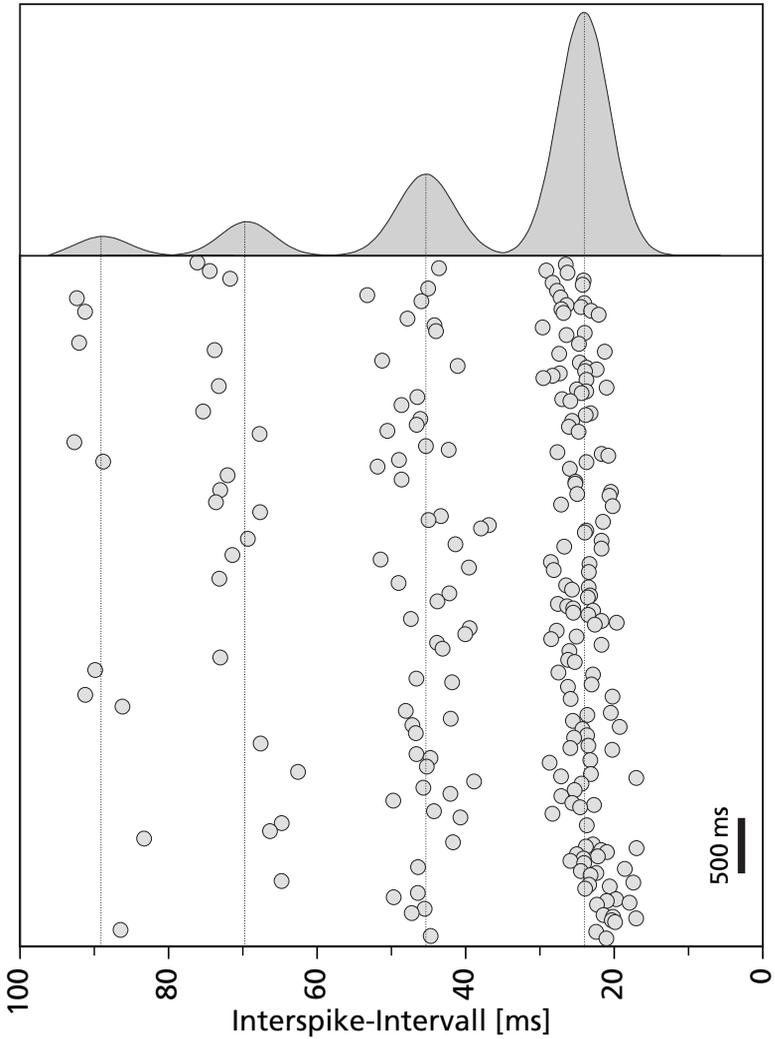


Abb. 3.6.4 Charakteristischer Ausfall von Spikeereignissen nach proximaler TTX-Applikation dargestellt als Scatterplot (Zeitfenster gekürzt) mit darübergelegter Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (der Approximation liegt ein 20.000-ms-Intervall zugrunde).

3.6.3 Distale TTX-Applikation

Bei distaler Applikation von TTX zeigt das System ein klar unterschiedliches, nicht minder charakteristisches Verhalten.

Die durchschnittliche Versuchsdauer ist hier erwartungsgemäß länger und beträgt 5 min 40 s ($\pm 4'20''$) (Quartilabstand 3'30" ... 6'00"). Im Gegensatz zur proximalen TTX-Vergiftung, wo die Aktionspotentiale bereits ausbleiben, wenn der mutmaßliche Impulstehungsort in der gemeinsamen Afferenz (wie später dargelegt werden wird) vergiftet ist, müssen hier große Teile der Endarborisation vergiftet sein, bevor jegliche Spikeaktivität zusammenbricht. Im Verlauf der fortschreitenden Vergiftung kommt es dabei zu einer drastischen Abnahme der ableitbaren Spikeamplitude. Die Abnahme setzt zunächst nach ca. 10% der Versuchsdauer auf der dem Applikationsort näheren Ampulle ein; dort fällt die Amplitude gegen die Mitte der Versuchsspanne auf Werte nahe 50%, zum Ende des Versuchs liegt sie häufig nahe der Erfassungsgrenze (ca. 15...18% der Normalamplitude), zuweilen auch darunter und verschwindet dann vollständig im Rauschen (Mittelwert 23%). Zur selben Zeit, wenn am distalen Clusterende keine Spikes mehr registriert werden können, sind aber auf der dem Applikationsort fernen Ampulle noch kräftige Aktionspotentiale mit mehr als 50% der Normalamplitude abzuleiten. Auch bei dieser Ampulle ist also zum Ende des Meßintervalls ein deutlicher Rückgang der Spikeamplitude zu verzeichnen; dieser beginnt jedoch typischerweise erst nach mehr als der Hälfte der Versuchsdauer und erreicht einen durchschnittlichen Minimalwert von 57%. Damit liegt die Amplitude der applikationsortfernen Ampulle zum Ende der Versuchsdauer mit 248% fast zweieinhalb Mal so hoch wie die der nahe an der Applikationsstelle gelegenen Ampulle. Die Verläufe der

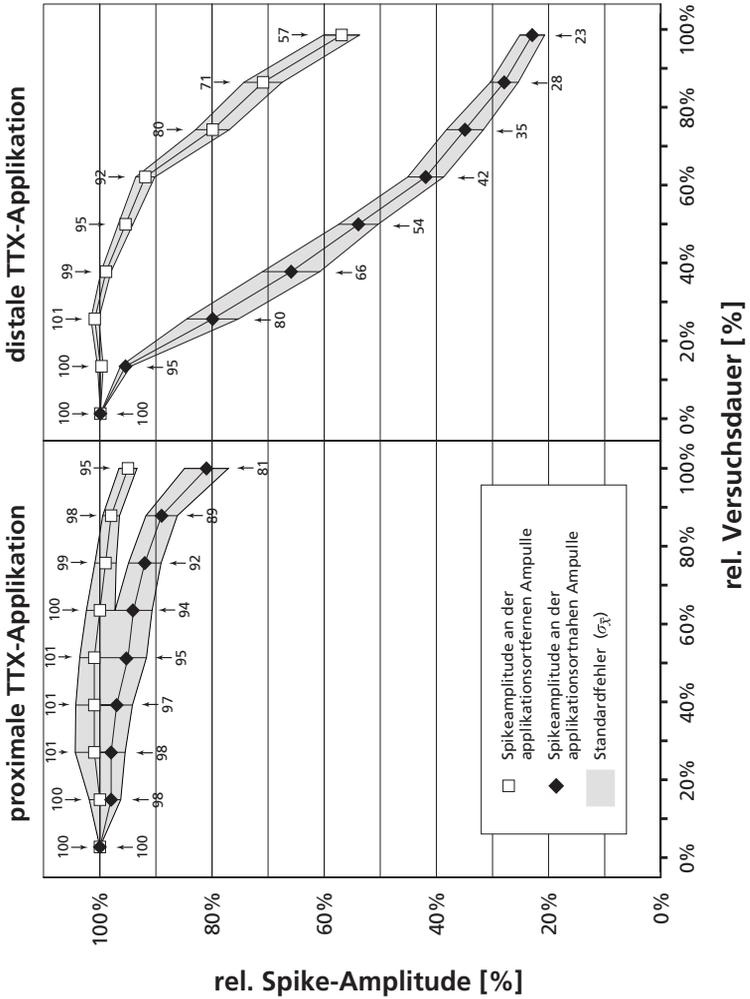


Abb. 3.6.5 Auswirkungen progressiver TTX-Vergiftung aus proximaler bzw. distaler Diffusionsrichtung auf die abgreifbaren Aktionspotentialamplituden an einer applikationsortnahen und einer applikationsorternen Ampulle innerhalb eines Organclusters von *Schilbe mystis*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwertskurven mit ihrem Standardfehler

Amplitudenkurven sind mit mehr als 6σ (!) hochsignifikant unterschiedlich. Wie bereits erwähnt, verschwinden zuweilen die Amplituden der nahe am Applikationsort gelegenen Ampullen vollständig, während weiter entfernt liegende Ampullen z.T. noch längere Zeit weiterspiken.

Die Spikerfrequenz nimmt auch hier deutlich auf rund 17% des Ruhewerts ab, jedoch durch kontinuierliche Zunahme des Interspikerintervalls (ISI); der Spikerhythmus bleibt bis zum Ende der Messung streng regelmäßig, ein »Stottern« oder jegliche andere Art von Arrhythmie ist niemals zu beobachten. Auch hier bleiben die Spikereignisse auf beiden Ampullen absolut synchron, bis die Amplitude ggf. in einer der

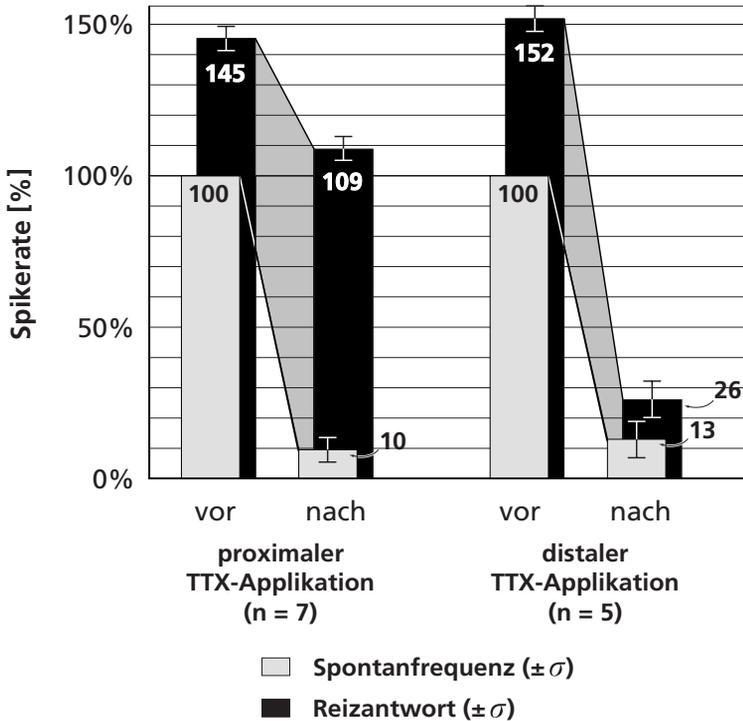


Abb. 3.6.6 Reizantwort nach TTX-Inhibition

beiden Ampullen unter die Nachweisgrenze fällt und verschwindet. Die Reizempfindlichkeit geht drastisch zurück und zwar um 83% (von 152% auf 26%, bezogen auf das Kontrollniveau der Spontanaktivität), während auch hier die Spontanaktivität im selben Zeitraum um 87% (von 100% auf 13%) und damit in ähnlicher Größenordnung wie die Reizantwort absinkt. Ist am Ende der Versuchsdauer keine spontane Spikeaktivität mehr registrierbar (trotz bis zuletzt meßbarer Spikeamplitude am proximalen Ableitort), so läßt sich auch durch starke anodische Stimuli keine Erregung mehr auslösen.

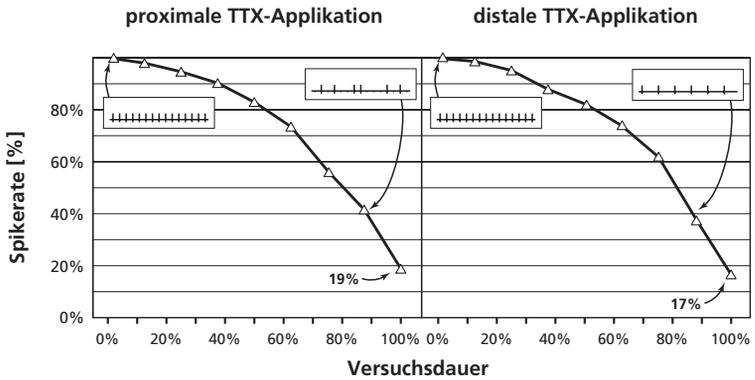


Abb. 3.6.7 Einfluß der TTX-Vergiftung auf die Spontanaktivität. Der Frequenzrückgang verläuft nicht signifikant unterschiedlich, hat jedoch unterschiedliche Ursachen: der Abfall der Spikerate wird bei distaler TTX-Applikation durch eine kontinuierliche Vergrößerung des Interspike-Intervalls hervorgerufen, während dieses bei proximaler TTX-Anwendung nur leicht ansteigt und der Frequenzrückgang primär durch den Ausfall von Spikeereignissen hervorgerufen wird (»stottern«), siehe Schemadarstellung der Spikemuster, Originalregistrierungen Abb. 3.6.3 und kombiniertes Scatterdiagramm Abb. 3.6.4.

3.6.4 Vergleich der Applikationssituationen

Tabellarische Kurzzusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der progressiven TTX-Vergiftung:

	<i>distale TTX-Applikation</i>	<i>proximale TTX-Applikation</i>
Amplitudenrückgang	applikationsortnahe Ampulle um typ. 80%	applikationsortnahe Ampulle um typ. 15...20%
	rasch einsetzend, zunächst bei Ampullen nahe Applikationsort, n. halber Versuchsdauer auch an zweiter Amp.	wenn überhaupt, erst gegen Ende der Messung (auch dann eher bei Ampullen nahe Applikationsort)
	hochsignifikanter Unterschied zwischen den Spikeamplituden der proximalen und distalen Ampullen (bis zu $20\sigma_x$ oder 6σ)	wenig signifikanter Unterschied zwischen den Spikeamplituden der proximalen und distalen Ampullen (bis 75% der Versuchsdauer)
	Spikeamplitude der proximalen Ampulle verschwindet oft vollständig, während die distale Ampulle weiter-spiket	beide Ampullen spiken bis zum Ende der Messung mit nahezu unverminderter Amplitude, bis Messung durch Ausbleiben von Spikes beendet wird
Interspike-Intervall	vergrößert sich kontinuierlich auf ca. das Sechsfache; Spikemuster bleibt regelmäßig	vergrößert sich allenfalls geringfügig; mit fortschreitender Messung durch Ausfall v. Spikes unregelmäßig, »stottern«
Reizantwort	drastischer Rückgang	weitgehend unverändert
	nach Ende der Spontanaktivität ist System nicht mehr erregbar	nach Ende der Spontanaktivität bleibt das System oft noch für kurze Zeit erregbar
Hinweise auf Ursachen (s. Diskussion)	Einfluß auf Analogsystem (z.B. aktiv unterstützte EPSP-Fortleitung), Digitalsystem unbeeinflußt	Einfluß auf Digitalsystem (d.h. AP-Generation oder -Fortleitung), Analogsystem weitgehend unbeeinflußt

3.7 Spannungssensitive Farbstoffe

Nach dem Stand der Literatur (u.a. Konnerth *et al.* 1988, Fromherz & Lambacher 1991, Fromherz & Vetter 1991 & 1992, Antic *et al.* 1992, Fromherz & Muller 1993 & 1994, Rohr & Salzberg 1994, Tanifuji 1995, Kogan *et al.* 1995, Hirota *et al.* 1995, Momose-Sato *et al.* 1995, Kogan *et al.* 1995, Cinelli *et al.* 1995a,b,c, Larkum *et al.* 1996, Zecevic 1996, Meyer *et al.* 1997, Bullen *et al.* 1997, Hess & Webb 1998, Saito *et al.* 1998, Sakai *et al.* 1998, Sato *et al.* 1998) und persönlichen Gesprächen mit Prof. R. J. Paul, Münster, bestand zunächst das Vorhaben, das Dendritensystem von *Schilbe mystis* mittels bildgebender Potentialgradientenanalyse mit membranassozierten spannungssensitiven Farbstoffen zu untersuchen. Diese Technik ließ beim gegenwärtigen Stand der Technik zumindest wertvolle Hinweise für die Untersuchung langsamer Potentialveränderungen wie postsynaptische Potentiale und Generatorpotentiale und, wenn auch nicht zeitaufgelöst, eine Bestätigung der aktiven retrograden Invasion der Endarborisation durch die Aktionspotentiale erwarten. Prof. Paul, der 1998 gerade an der Etablierung und Verbesserung dieser Technik in seinem Labor arbeitete, berichtete von ersten positiven Erfahrungen mit spannungssensitiven Farbstoffen in Vorversuchen und hielt die geplanten Messungen an *Schilbe mystis* noch im Frühjahr 1999 für sinnvoll und möglich, sobald seine Meßanlage vollständig erprobt und in einigen konkreten Punkten weiterentwickelt sei. Es traten jedoch, wie zu erfahren war, eine Reihe unerwarteter Schwierigkeiten und Rückschläge auf, die die Möglichkeit einer erfolgsversprechenden Messung in weite Ferne rücken ließ.

Deshalb wurde das Projekt auf Einladung von Prof. P. Fromherz,

einem der weltweit führenden Experten auf dem Gebiet spannungsempfindlicher Farbstoffe wie auch der theoretischen Analyse von Vorgängen in Neuronen, auf einem Institutskolloquium am Max-Planck-Institut Martinsried im März 2000 vorgestellt und alle bisherigen Ergebnisse diskutiert. Prof. Fromherz räumte der Untersuchung mit spannungsempfindlichen Farbstoffen *in vivo* in unserem System keinerlei Erfolgsaussichten ein (einigermaßen detaillierte Untersuchungen sind z.Zt. nur in speziell ausgewählten, sehr robusten Systemen in Zellkultur möglich) und erklärte eindeutig die Literaturaussagen einiger Kollegen zu den gegenwärtigen Untersuchungsmöglichkeiten der bildgebende Potentialgradientenanalyse mit membranassoziierten spannungsempfindlichen Farbstoffen für zwar in näherer oder fernerer Zukunft (fünf bis zehn Jahre) aussichtsreich, aber beim momentanen Stand der experimentellen Technik noch in keiner Weise realisierbar, da die Entwicklung der Methode zur allgemeinen *in-vivo*-Anwendbarkeit in physiologischen Systemen noch ganz am Anfang stehe und zahlreiche Probleme weitgehend ungelöst seien. Da er mit allen weltweit führenden Labors auf diesem Gebiet in enger wissenschaftlicher Verbindung stehe, könne er mit Sicherheit sagen, daß die geplanten Messungen in keinem Labor weder gegenwärtig noch mit höchster Wahrscheinlichkeit auch in den nächsten zwei bis drei Jahren technisch möglich seien. Folgende Probleme sind beim gegenwärtigen Stand der Forschung in unserem System noch nicht lösbar (persönliches Gespräche mit Prof. Fromherz und Mitarbeitern Prinz, Kuhnert, Braun, Müller, Jenkner):

1. Die Einbringung und Verteilung des Farbstoffs intrazellulär oder selektiv an die Neuronmembran extrazellulär ohne Kontamination des übrigen Systems und Anfärbung anderer Membranen und Strukturen.

2. Die hohe (Photo-)Toxizität der gegenwärtig bekannten Farbstoffe, die für diese Versuche geeignet wären.
3. Die zu geringe Stabilität der Farbstoffe.
4. Die relativ niedrige räumliche und zeitliche Auflösung der Analyseverfahren.
5. Die Notwendigkeit complanarer Strukturen, die frei von Deckgewebe vorliegen müssen; in der Regel ist sogar die völlige Isolierung der Fasern von jeglichen Fremdgeweben und Untersuchung in der »Petrischale« erforderlich (überwiegend werden die Experimente gegenwärtig mit kultivierten Neuronen durchgeführt).

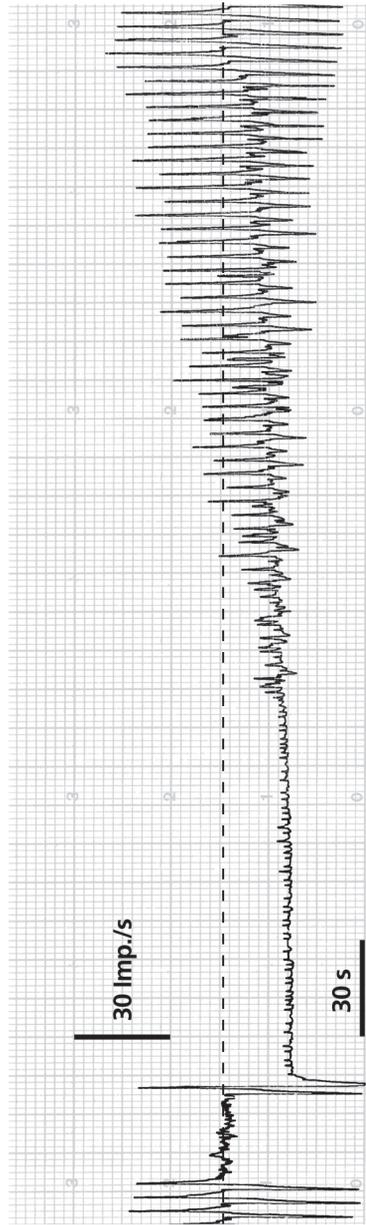
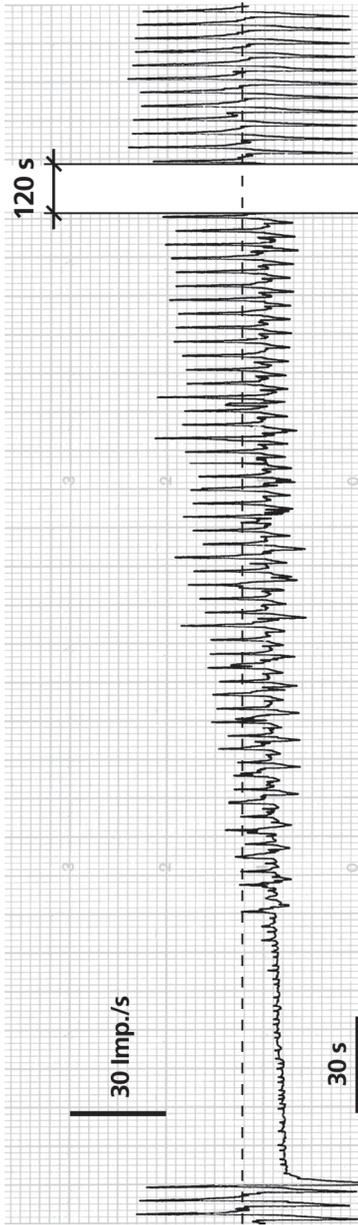
Somit scheidet jede direkte Beobachtung der Prozesse in der Endarborisation via bildgebender Potentialanalyse mit spannungsensitiven Farbstoffen beim gegenwärtigen Stand der Technik aus.

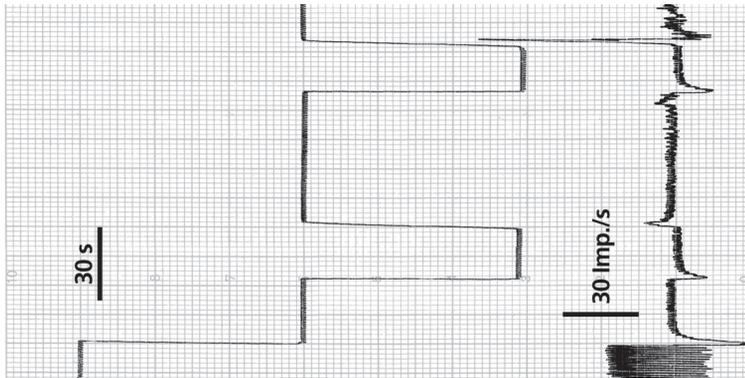
3.8 Kathodische Inhibition

Jede Form von Konvergenz bedeutet gleichzeitig eine Verarbeitung der in das System eingespeisten Information. Diese Informationsverarbeitung beinhaltet (neben der Anwendung einer »Input-Output«-Übertragungsfunktion) zumindest die räumliche (z.B. Addition mit oder ohne Gewichtung) und zeitliche (u.a. phasisch-tonisches Rezeptor-Antwortverhalten, Adaptationsphänomene) Verrechnung der konvergenten Eingänge und wird in der Regel in separaten Verarbeitungsstufen spezialisierter neuronaler Netze, zumeist im Zentralnervensystem, ausgeführt. Im elektrosensorischen System geschehen jedoch wichtige Verarbeitungsschritte der konvergenten Information zwangsläufig in der Endarborisation eines Einzelneurons, da hier die Informationen aller Organe zusammenlaufen und digitalisiert werden (die anderen

Stufen der analogen Signalumsetzung könnten lediglich Einfluß nehmen auf Zeitkonstanten, Amplitudenkennlinien; siehe Diskussion). Um weitere Informationen über die Verarbeitungsprozesse dieses Konvergenzsystems zu gewinnen, sind potentiell auch alle Phänomene der Regulation und Adaptation interessant, da sie u.U. auch mit dem Verhalten der Natriumkanäle in der Endarborisation in Zusammenhang stehen und so möglicherweise Rückschlüsse über deren Funktion in der Dendritensystem zulassen.

Ein besonders interessanter Fall von Adaptation tritt bei der »kathodischen Inhibition« des Systems durch starke Stimulusintensitäten auf. Nach der zu erwartenden anfänglich absoluten Unterdrückung jeglicher Spikeantwort kommt es zu einer u.U. langanhaltenden (bis über eine Stunde) Plateauphase, während derer eine völlig regelmäßige und konstante, jedoch deutlich reduzierte Aktivität bei absolutem Fehlen jeglicher Empfindlichkeit auftritt (Bretschneider *et al.* 1980). Dieses Verhalten, es kann lt. Roth und Bretschneider (Roth 1971, Bretschneider *et al.* 1980) auch durch calciumfreies Medium hervorgerufen werden, erinnert an die Ergebnisse von Roth (Roth 1973) nach der Entfernung der Sinneszellen. Bretschneider und Peters (Bretschneider *et al.* 1980, Peters *et al.* 1989a) postulieren aus diesen Ergebnissen einen »bias current«, der den Spikegenerator versorgt und den sie auch mit anderen Adaptations- und Regulationsvorgängen in Verbindung bringen. Um dies genauer zu hinterfragen, mit dem Verhalten der Natriumkanäle in Bezug zu setzen und auch mit der Unterdrückung der Spikeaktivität durch TTX zu korrelieren, wurden die Experimente mit *Schilbe mystis* wiederholt und dabei vor allem auf die Übergänge der verschiedenen Inhibitionsphasen und die Wiederkehr der Empfindlichkeit geachtet. Im wesentlichen konnten die Ergebnisse von Bretschneider *et al.*





△ **Abb. 3.8.2** Beispiel »scheinbarer Empfindlichkeit« trotz kathodischer Inhibition (Abb. auf dieser Seite oben). Weitere Erläuterung im Text.

◁ **Abb. 3.8.1** Typischer Verlauf kathodischer Inhibitionsexperimente (Nebenseite). Vor Einschalten des Inhibitions potentials sind Spontanaktivität (gestrichelte Linie) und »Vollmodulation« auf den Teststimulus gegeben (Potentialhub des Testreizes moduliert die Aktivität der Afferenz gerade auf Null). Nach Anlegen des Inhibitions potentials wird zunächst für einige Sekunden die Spikeaktivität vollständig unterdrückt (Phase I), danach tritt eine Plateauphase (II) auf. Die Wiederkehr der Empfindlichkeit in Phase III erfolgt deutlich anisotrop.

(1980) in den eigenen Experimenten bestätigt werden. Darüber hinaus traten weitere interessante Resultate reproduzierbar auf, die in dieser Arbeit (*ibid.*) nicht diskutiert wurden – obwohl sie dort vermutlich z.T. in gleicher Weise aufgetreten sein dürften.

Für die kathodischen Inhibitionsexperimente wurde ein periodischer Testreiz mit 0,2...0,5 Hz appliziert, der eine Modulation der Spontanaktivität auf Werte nahe Null erzeugte (nachfolgend als »Vollmodulation«

bezeichnet), zu dem ein um typischerweise eine Dekade stärkeres »Inhibitionspotential« aufaddiert werden konnte. Vor dem Einschalten des »Inhibitionspotential« erzeugt der Testreiz eine kräftige, mehr oder weniger um den Wert der Spontanaktivität symmetrische Modulation der Clusterantwort. Schaltet man nun das »Inhibitionspotential« ein und addiert dieses auf den Testreiz, so wird erwartungsgemäß zunächst jegliche Rezeptorantwort unterdrückt (Phase I). Diese Phase völliger Unterdrückung ist jedoch nur sehr kurz und dauert typischerweise 1...5s. Danach stellt sich eine gewisse Spikeaktivität wieder ein, die asymptotisch, innerhalb weniger, max. 10, Sekunden einem Wert zustrebt, der typischerweise 50...70% der ursprünglichen Spontanaktivität beträgt. Diese Plateauphase (Phase II), in der das Cluster absolut regelmäßig und mit verringerter Frequenz Aktionspotentiale generiert, ist gekennzeichnet durch das Fehlen jeglicher Empfindlichkeit (die teilweise in den Schreiberregistrierungen vorhandenen »Minizacken« stellen keine Rezeptorantworten dar, sondern entsprechen genau den Verstärkerartefakten, die das Hugo-Sachs-Stimulationsgerät im Vorverstärker der Fa. WPI induzierte und die beim Einsatz der Geräte in dieser Konstellation nicht zu vermeiden sind). Appliziert man jedoch sehr starke Stimuli, so erhält man tatsächlich wieder eine geringfügige Reizantwort der afferenten Faser (eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch findet sich an entsprechender Stelle im Kap. Diskussion). Die Dauer dieser Plateauphase (II) ist höchst unterschiedlich und stark nichtlinear mit dem »Inhibitionspotential« korreliert; beginnt man das »Inhibitionspotential« in kleinen Inkrementen zu steigern, so erhält man zunächst – ab einer gewissen Intensität, die in der Größenordnung um etwa eine Dekade ($10^{(0,7...1,4)}$) über dem physiologischen Antwortbereich des Clusters liegt – kurze Inhibitionsphasen von we-

nigen Sekunden; ab einer gewissen »Schwelle« steigt die Dauer des Inhibitionsplateaus »explosionsartig« an (hier kann z.B. eine Erhöhung des »Inhibitions potentials« um 3% zu einer Verlängerung der Plateauphase um 300% führen). Ein typisches Beispiel für diesen hochgradig nicht-linearen Zusammenhang zwischen Inhibitionsspannung und Inhibitionsdauer ist in folgender Abbildung dargestellt.

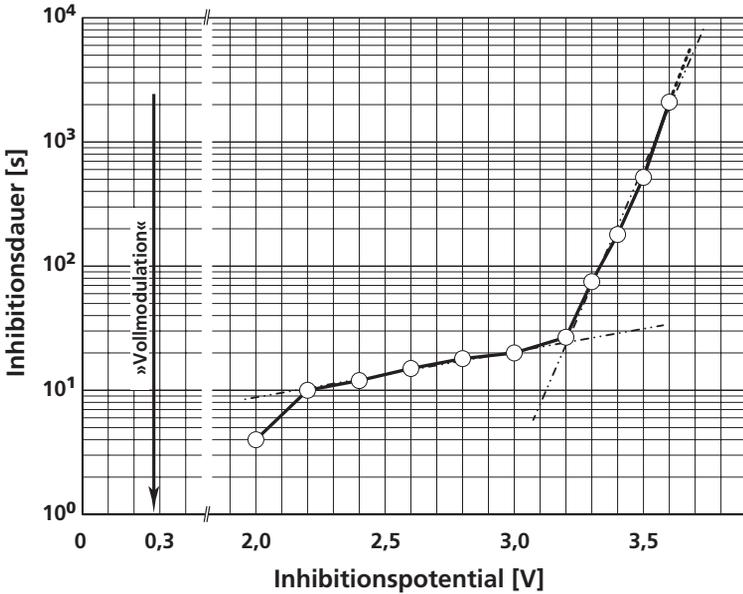


Abb. 3.8.3 »Kathodische Inhibition«: Nicht-linearer Zusammenhang zwischen Inhibitionsspannung und Inhibitionsdauer. Darstellung eines repräsentativen Einzelexperiments.

So wurden in verschiedenen Experimenten Plateauphasen von wenigen Sekunden bis mehr als 10.000 Sekunden beobachtet (letztenanntes Experiment wurde durch das »Absterben« der afferenten Faser beendet). Normalerweise erholt sich das System wieder und die

reguläre Spontanaktivität und Empfindlichkeit setzen graduell wieder ein. Dieser Prozeß der vollständigen Adaptation der Rezeptoren an das »Inhibitionspotential« und die damit einhergehende Restauration der regulären Spontanaktivität und Empfindlichkeit erstreckt sich typischerweise über mehrere Minuten (Phase III) und scheint nur wenig von Intensität und Dauer der Inhibition abzuhängen. Auffällig ist bei allen Experimenten, daß die Wiederkehr der Empfindlichkeit stets anisotrop erfolgt und das System bei Wiederkehr der Empfindlichkeit und dem allmählichen Anstieg der Spontanaktivität zunächst nur erregbar und nicht (oder in nur geringerem Umfang) hemmbar ist. Der Zustand eingeschränkter Hemmbarkeit verschwindet jedoch zunehmend mit der vollständigen Wiederkehr von Spontanaktivität und Empfindlichkeit auf erregende Stimuli.

3.9 Korrelation zwischen Interspike-Intervall und Spikeamplitude

Aktionspotentiale stellen eine sog. »Alles-oder-Nichts«-Antwort dar und sollten folglich eine einheitliche Amplitude besitzen. Bei genauere Beobachtung der Spikeamplitude *post stimulus* fällt jedoch auf, daß diese Invarianz der Aktionspotentialamplitude beim elektrosensorischen System nicht gegeben ist, daß diese sich im Verhältnis 1:2,5 ändern kann und zwar in Abhängigkeit von der Spikefrequenz. Bereits Obara (1976) hat hierzu an den Lorenzinischen Ampullen von *Plotosus* Untersuchungen durchgeführt und gelangte zu der unbewiesenen Hypothese, daß der poststimulative Amplitudenabfall durch ein transmembranales »Shunting« innerhalb der Dendriten, verursacht durch eine meßbare Leitfähigkeitszunahme der Dendritenmembran,

die mit der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit der Natriumkanäle in der Endarborisation korreliert, entstehen könnte. Falls dieser Effekt tatsächlich mit der Aktivität der Natriumkanäle korreliert, so könnten Untersuchungen dieses Phänomens weitere Erkenntnisse zur Rolle dieser Kanäle in der Endarborisation liefern und damit komplementäre Hinweise zur Ausbreitung der postsynaptischen Potentiale in den Dendriten, die via Imagingtechniken nicht zu gewinnen waren. Deshalb wurden einige Versuchsserien am ampullären Rezeptor bei *Schilbe mystis* und *Kryptopterus bicirrhis* durchgeführt, um die Abhängigkeit zwischen Interspike-Intervall und Spikeamplitude quantitativ zu untersuchen und mit den bisherigen Erkenntnissen zu korrelieren.

Aus den Ergebnissen geht eine klare, hochsignifikante nicht-lineare Korrelation zwischen beiden Untersuchungsparametern mit Korrelationskoeffizienten von 0,979 (*Schilbe mystis*) bzw. 0,965 (*Kryptopterus bicirrhis*) hervor. Dabei zeigt sich eine stärkere Auswirkung auf die Spikeamplitude in Richtung Frequenzerhöhung; der Amplitudenanstieg bei Verminderung der Spikefrequenz ist dagegen nur schwächer ausgeprägt, jedoch bis in den Zeitbereich von 50 ms statistisch eindeutig nachweisbar. Beide Parameter verlaufen temporär weitgehend parallel und besitzen ein sehr ähnliches Zeitverhalten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen An- und Aus-Antworten auf kathodische bzw. anodische Reize waren nicht zu finden; die Korrelationskurven liegen jeweils deckungsgleich. Bei genauerer Analyse zeigt sich jedoch, daß nach Einsetzen des Stimulus die Spikeamplitude nicht direkt mit dem Abstand zum vorangegangenen Spike korreliert, wie dies bei direkter Kausalität unter Annahme eines Refraktärphänomens der Fall sein müßte. Vielmehr »hinkt« der Parameter Spikeamplitude geringfügig hinter dem präzedenten Interspike-Intervall hinterher. Dies weist

deutlich auf einen Zusammenhang über einen dritten Parameter (wie Leitfähigkeit, intrazelluläres Potential) hin. Dies manifestiert sich auch bei den Korrelationsdiagrammen in der Bildung zweier kleiner Meßpunktpopulationen, die für inhibitorische Stimuli unter (Subpopulation a), bei exzitatorischen über (Subpopulation b) der Korrelationskurve liegen und sich deutlich über das 95%-»Vorhersageband« ($\pm 1,960 \sigma$) hinaus erstrecken; die Ersts spikes nach Stimulationsbeginn fallen damit signifikant (95%-Niveau) aus der Korrelationsbeziehung Interspike-Intervall und Spikeamplitude, indem sie temporär hinter dem korrespondierenden Interspike-Intervall geringfügig hinterherhinken (die Berechnung von Korrelationsbeziehung und Konfidenzintervallen in den abgebildeten Diagrammen berücksichtigt selbstverständlich alle Meßwerte, auch die der beiden Subpopulationen, da ihre Ausgrenzung nach streng wissenschaftlichen Kriterien nicht möglich ist und einen willkürlichen Eingriff darstellen würde; bei der Beurteilung dieser Berechnungen ist zu berücksichtigen, daß viele Meßwerte innerhalb des Konfidenzbandes wegen ihres häufigeren Auftretens stärker zu gewichten sind und damit den Kurvenverlauf auch in höherem Maße beeinflussen).

Für dieses Phänomen könnten drei mögliche Erklärungen ins Feld geführt werden: a) bei der Amplitudendepression handelt es sich um ein Phänomen der relativen Refraktärphase und korreliert mit temporären, konformationskinetischen Phänomenen (Reinaktivierung der Kaliumkanäle und Übergang der Natriumkanäle in den aktivierbaren Zustand; diese müßte jedoch hier erheblich langsamer als gemeinhin bekannt ablaufen, da beide Parameter bis ca. 50 ms miteinander korrelieren, was gängigen Vorstellungen über den Zeitverlauf der Konformationsübergänge widersprechen würde, außerdem steht diese Hypo-

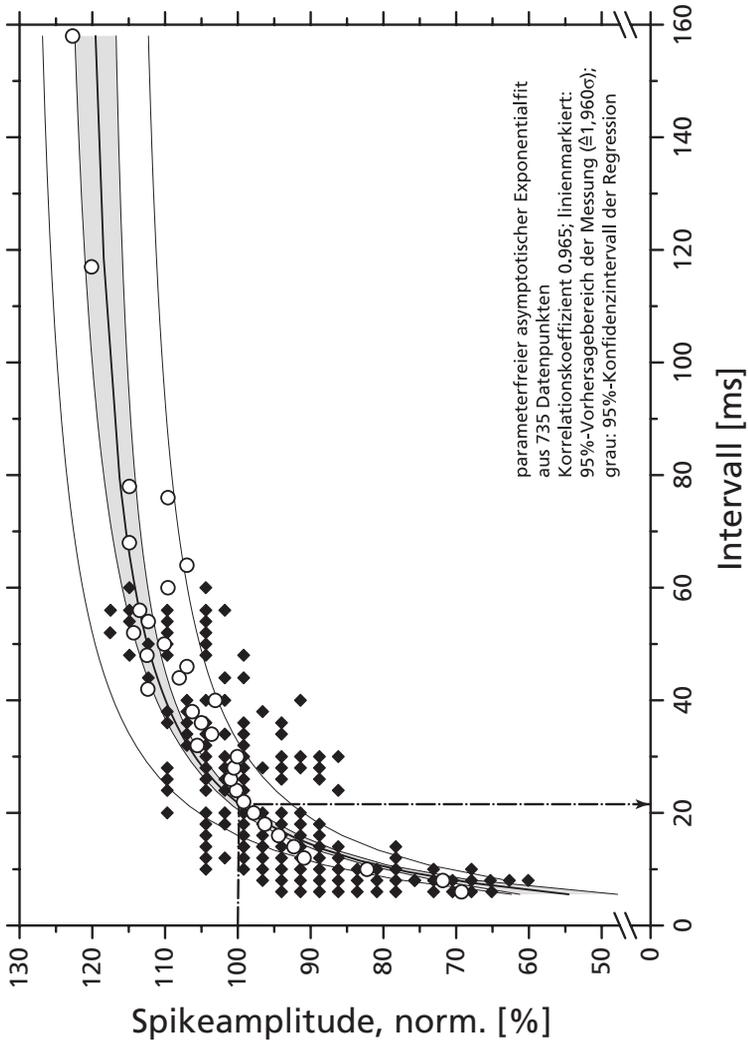


Abb. 3.9.1 Korrelation zwischen Aktionspotentialamplitude und Interspike-Intervall bei *Kryptopterus bicirrhis*. Schwarze Rauten = Einzelmeßwerte (NB: Meßwerte z.T. mehrfach belegt), offene Kreise = Mittelwerte der Spikeamplitude. Spontanfrequenz (= 100%): $49,5 \text{ s}^{-1}$ ($\Delta 20,2 \text{ ms}$).

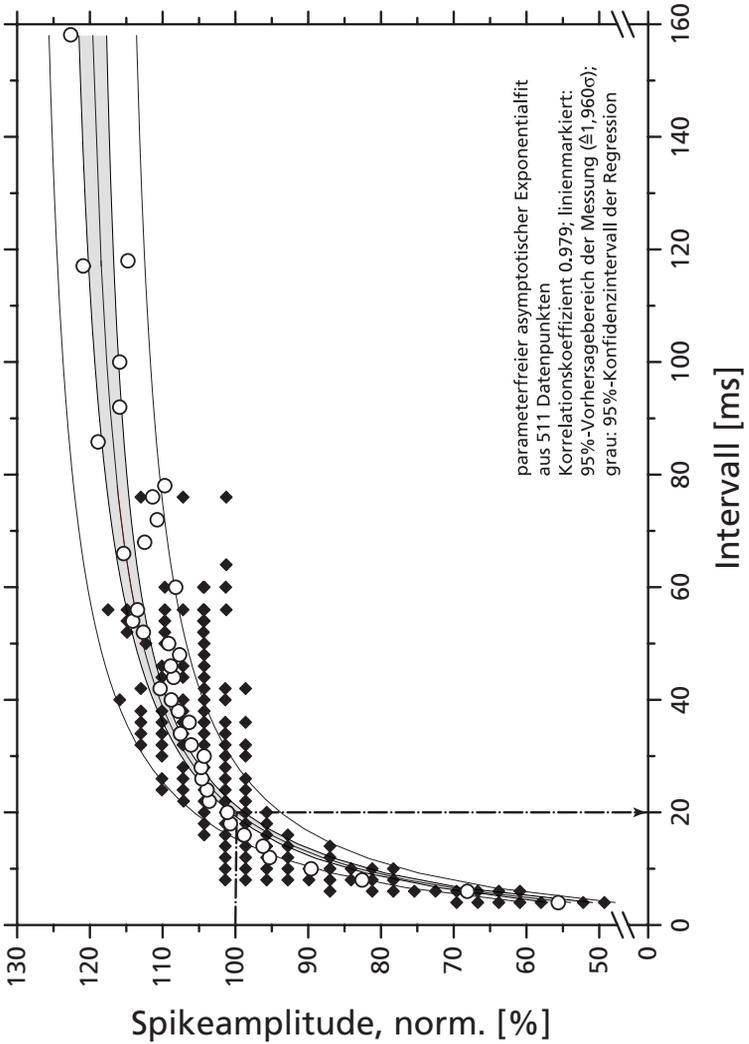


Abb. 3.9.2 Korrelation zwischen Aktionspotentialamplitude und Inter-spike-Intervall bei *Schilbe mystis*. Schwarze Rauten = Einzelmeßwerte (NB: Meßwerte z.T. mehrfach belegt), offene Kreise = Mittelwerte der Spikeamplitude. Spontanfrequenz (= 100%): $49,5 \text{ s}^{-1}$ ($\Delta 20,2 \text{ ms}$).

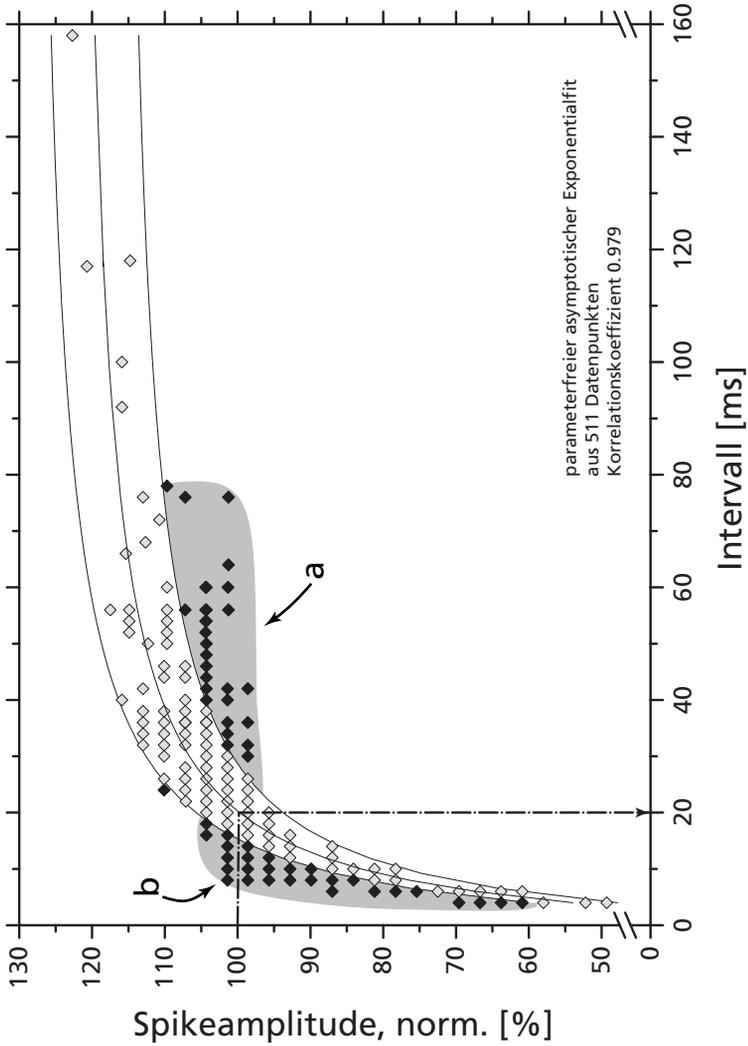


Abb. 3.9.3 Korrelation zwischen Aktionspotentialamplitude und Inter-spike-Intervall bei *Schilbe mystis*. Grau hinterlegt sind die beiden Subpopulationen a und b, die Hinweise auf einen indirekten Zusammenhang der beiden Parameter über eine dritte Größe geben. Weiteres s. Text.

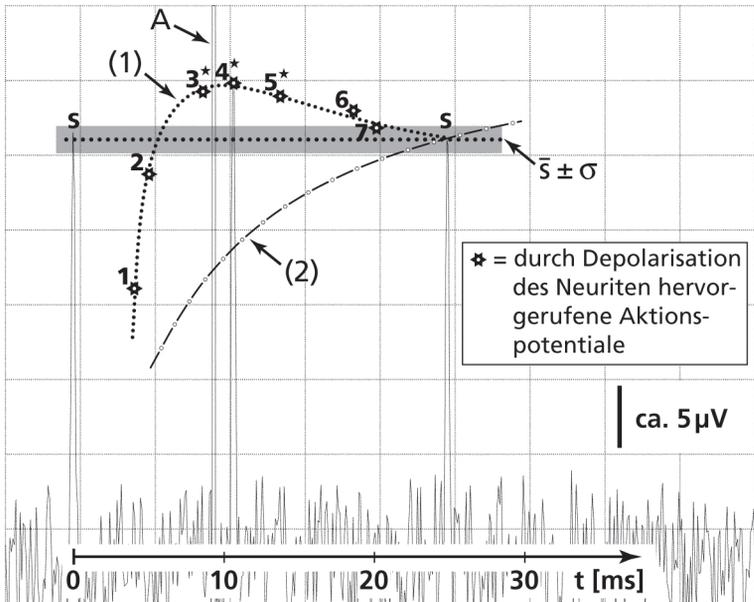


Abb. 3.9.4 Amplitudenabhängigkeit »künstlich« (= durch elektrische Direktstimulation des Neuriten) ausgelöster Aktionspotentiale in Abhängigkeit vom Abstand zum vorangegangenen Spontanspike. Schilbe mystis, Oszilloskopausdruck eines repräsentativen Einzelexperiments (Beobachtungen an insges. 23 Clustern bei 3 Individuen); »s« markiert spontane Aktionspotentiale, Sterne stellen die Ergebnisse anderer Versuchsdurchläufe dar, »A« kennzeichnet das Reizartefakt, die punktierte Linie » \bar{s} « die gemittelte Amplitude der Spontanaktivität \pm Standardabweichung σ (grau hinterlegt). Die Standardabweichung ($\sigma = 3,2\%$, $n = 2 \times 30$) wurde vor ($\sigma = 3,1\%$ der Spontanamplitude, $n = 30$) und nach ($\sigma = 3,4\%$, $n = 30$) Versuchsdurchführung aus jeweils 30 aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen ermittelt und dient als Maß für die Präzision der Amplitudenbestimmung. Meßwerte 3, 4 und 5 sind demnach signifikant erhöht, der erste Meßwert ist signifikant verringert (punktierte Linie (1), Kurve optisch angepaßt).

these mit der zuvor erwähnten indirekten Kopplung beider Parameter nicht in Einklang), oder b) die Amplitudendepression entsteht durch transmembranales »Shunting«, verursacht durch die Leitfähigkeits-erhöhung von Ionenkanälen entsprechend vorgenannter »Obara-Hypothese«, oder c) die Amplitudendepression ist ein potentialabhängiges Inaktivationsphänomen der Natriumkanäle. Um die tatsächliche Ursache dieses Phänomens zu klären, wurde versucht, die Fragestellung durch retrograde Stimulation des afferenten Nervs zu untersuchen. Wegen der hohen präparativen Schwierigkeiten gelang auch hier eine Einzelfaserpräparation nicht.

Nachdem einzelne Beobachtungen (neben der großen Zeitdimension dieses Phänomens von ca. 50 ms) bereits Gegenargumente gegen die Refraktärhypothese lieferten (1. indirekte Kopplung beider Parameter nach Stimulationsbeginn, deutlich schwächere Korrelation des Erstpikes nach Stimulationsbeginn; 2. keine Amplitudendepression trotz kurzer Interspike-Intervalle bei »burst«-Aktivität in der Aufwachphase nach MS-222 Betäubung; 3. keine Bestätigung der zu erwartenden Temperaturabhängigkeit der Konformationskinetik), wurde nach einer anderen Methode zur Klärung dieser Frage gesucht. Dazu wurde folgender Versuch durchgeführt: während konstanter Spontanaktivität wurde durch einen starken 200- μ s-Puls unter Umgehung der Sinneszellen und Synapsen, die auf Stimuli dieser Dauer keine Reaktion zeigen (Peters & Buwalda 1972, de Weille 1983, Bretschneider *et al.* 1985, Bretschneider & Peters 1992, Heijmen *et al.* 1995a, Heijmen & Peters 1995b), eine direkte Stimulation der Faser durchgeführt (Roth 1973 & 1978) und ein irreguläres Aktionspotential »künstlich« induziert (fehlende synaptische Latenz), dessen Lage zum jeweils vorangegangenen Spontanspikes variiert werden kann.

Ab einem Abstand von ca. 6 ms zum vorangegangenen Spike weist dieses evozierte Aktionspotential keinerlei Amplitudendepression auf, vielmehr erreicht seine Amplitude bei Intervallen um 10 ms zum vorangegangenen Spontanspike nach eigenen Beobachtungen sogar geringfügig größere Werte als seine Spikenachbarn.

4. Diskussion

4.1 Untersuchung der Morphologie

Wichtige Funktionsprinzipien des Nervensystems

Im Laufe der Evolution des Nervensystems haben sich eine Reihe von Mechanismen entwickelt, die für seine Funktion nach klassischer Vorstellung lange Zeit als unverzichtbar und universell gültig betrachtet wurden. Im Folgenden seien ausschnittsweise die für die weitere Diskussion wichtigen Funktionsprinzipien, wie sie in klassischen Standardwerken (z.B. Florey 1975, Penzlin 1980, Schmidt *et al.* 1983, Kandel *et al.* 1985, Eckert 1986) abgehandelt werden, in starker Vereinfachung unter einer eher technisch-systemtheoretischen Sichtweise kurz dargestellt:

- Das Nervensystem ist aus Nervenzellen aufgebaut, die die (Haupt-) Trägerinnen der primären Systemfunktion (Empfang, Verarbeitung, Fortleitung und Weitergabe neuronaler Information) darstellen. Diese bestehen typischerweise (im Falle einer multipolaren Nervenzelle mit langem Neurit = Axon) aus einem Zellkörper (Soma), Dendriten und langgestrecktem Axon, das für die Informationsfortleitung in einer Vorzugsrichtung dient. Eine Reihe abweichender Bauprinzipien sind möglich. Die Übertragung der Information von Neuron zu Neuron erfolgt meist über chemische, seltener über elektrische Synapsen.

- Die Informationsfortleitung basiert auf der Änderung elektrischer Potentiale. Die hierfür notwendige Stromausbreitung erfolgt durch elektrische Leitung zweiter Art, also durch Ionenleitung im Elektrolyten, innerhalb der durch die Zellmembranen und ggf. Markscheiden von den umgebenden Geweben isolierten Zellen. Auch ein großer Teil der Informationsverarbeitung geschieht auf elektrischem Wege; dabei bedient sich das Nervensystem typischerweise neuronaler Netzwerke, also zwei- oder mehrstufiger Verschaltungen von Nervenzellen, die über erregende und/oder hemmende Synapsen miteinander verbunden sind und die Grundfunktionseinheiten neuronaler Verarbeitung darstellen. Addition, Subtraktion, Konvergenz, Divergenz, Hemmung, räumliche und zeitliche Summation, Bahnung, Verarbeitung im Amplituden- (Kennlinien-Transformation) und Zeitbereich, Filterung etc. können auf diese Weise dargestellt werden. Durch beliebige Kombinationsmöglichkeiten dieser Grundverschaltungen sind eine ungeheure Vielzahl auch höherer Verarbeitungsleistungen realisierbar. All diese Verarbeitungsfunktionen basieren auf einem einheitlichen Grundmechanismus: eine Erregung bestimmter Intensität (die durch ihre Impulsfrequenz codiert ist) in einer Nervenzelle (n) wird z.B. über eine oder mehrere Synapsen auf eine oder mehrere Nervenzellen der Verarbeitungsstufe ($n+1$) übertragen und erzeugt dort eine Sequenz von erregenden oder hemmenden postsynaptischen Potentialpulsen. Diese werden in den Empfängerzellen der Stufe ($n+1$) mit sich selbst sowie mit anderen Inputs über die elektrischen (RC-)Eigenschaften der Zelle gewichtet und verrechnet (entsprechend ihrer räumlichen und zeitlichen Konsistenz), um dort erneut eine aktive Erregung anderer Intensität hervorzurufen oder ihrer Fortleitung zu unterdrücken. Im Falle einer fortgeleiteten

Erregung kann diese in gleicher Weise über Synapsen zur nächsten Verarbeitungsstufe ($n+2$) fort- oder auf eine vorangeschaltete Verarbeitungsstufe (n) zurückübertragen werden; ebenso ist eine direkte Rückkopplung auf dieselbe Zelle oder ein anderes Neuron derselben Verarbeitungsstufe möglich.

- Die Fortleitung der Information erfolgt in nahezu allen Neuronen für den überwiegenden Teil der Fortleitungsstrecke aktiv; lediglich über kurze Distanzen (typ. unter 100 μm) z.B. in Dendriten bis zum Erreichen eines aktivierbaren Zentrums, das zur Bildung von Aktionspotentialen befähigt ist (Spike-Initiationszone), oder in sehr kompakten Neurozyten kann sie ausschließlich elektrotonisch erfolgen. Zur aktiven Fortleitung bedient sich das Nervensystem eines Mechanismus, bei dem es alle Informationen in Sequenzen von Aktionspotentialen umwandelt, kurze (um 1 ms) Spannungspulse (weitgehend einheitlicher Amplitude, die durch Permeabilitätsänderungen der Neuronmembran primär für Natrium- (Aufstrich des Aktionspotentials) und zeitversetzt für Kaliumionen (Abfall des Aktionspotentials), dem sog. Hodgkin-Huxley-Zyklus, entstehen. Die treibende Kraft und Energiequelle für diesen aktiven Prozeß ist der über der Membran aufgebaute Ionengradient, der – über spannungsgesteuerte Membranpermeabilitäten für Natrium- und Kaliumionen abgerufen – den »push-and-pull«-Verstärker (wörtl.: Gegentaktverstärker) treibt und so die Nervenpotentialänderung bei der Fortleitung unterstützt. Als Generator für diesen energieliefernden Ionengradienten dienen ATP-getriebene Ionenpumpen in der Nervenzellmembran, die die Ionenbatterie kontinuierlich nachladen.
- Im Falle der Fortleitung von Aktionspotentialen gilt ein Alles-oder-Nichts-Prinzip, bei dem alle aktivierbaren Natriumkanäle durch eine

positive (selbsterregende) Rückkopplungsschleife bei Überschreiten eines Schwellenwerts zur Öffnung gebracht werden, bevor der Spannungspuls durch die zeitversetzt potentialabhängig aktivierten Kaliumkanäle wieder zurückgesetzt wird. Der zu übermittelnde Intensitätswert wird dabei durch den Mechanismus der Aktionspotential-Generation »digitalisiert« und durch Frequenzmodulation – genauer Puls-Intervall-Modulation (PIM) – codiert; die Spikeamplitude trägt damit keine systemrelevante Information. Dieses Prinzip der Digitalisierung der Signale gilt als unverzichtbare Voraussetzung für die dekrementfreie, präzise, exakte und störsichere Übertragung von Information mittels autoregenerativer Erregungsfortleitung selbst über relativ kurze Distanzen von deutlich weniger als 1 mm, da die Transmission analoger Information Verlusten, Störungen und Beeinflussungen verschiedenster Art selbst in myelinisierten Fasern unterworfen und eine reproduzierbare, verlässliche und quantitativ exakte Fortleitung über größere Strecken auf andere Weise nicht möglich wäre. Die Autoregenerativität und digitale Natur der Aktionspotentiale gelten dabei als unverzichtbare Voraussetzung für die Informationsübermittlung innerhalb der Neurozyten und darüber hinaus für die Fortleitungs- und Verarbeitungsfunktion des gesamten Nervensystems.

- Vertebraten-Neurone sind häufig zur Erhöhung der Geschwindigkeit aktiver Fortleitung myelinisiert (saltatorische Erregungsleitung); die Ausbildung einer Markscheide gilt gemeinhin als Indikator aktiver saltatorischer Erregungsleitung. Durch die Umhüllung eines einige hundert Mikrometer bis über einen Millimeter langen Faserabschnitts durch die Isolierschicht der vielfach um die Faser gewundenen Membranen einer Schwannschen Zelle werden Mem-

branleitfähigkeit und Membrankapazität herabgesetzt, die Längskonstante der Faser und dadurch die longitudinale Reichweite einer Depolarisation, die an einem nicht-ummantelten kurzen erregbaren Nervabschnitt, dem Ranvierschen Schnürring, stattfindet, deutlich vergrößert. Die Depolarisation erreicht so überschwellig den nächsten, oft viele hundert Mikrometer entfernten Schnürring und kann dort neuerlich ein Aktionspotential auslösen. Da die internodiale Impulsfortleitung über eine relativ große Distanz (typ. einige hundert Mikrometer bis einige Millimeter) elektrotonisch, also mit Lichtgeschwindigkeit, stattfindet, bevor neuerlich ein Hodgkin-Huxley-»Verstärkerzyklus« erforderlich wird, sind hohe Leitungsgeschwindigkeiten bei geringem Platzbedarf (verglichen mit der Ausbildung von Riesenaxonen der Evertrebraten) zu erzielen. Gleichzeitig sinkt der Energiebedarf drastisch, da große Axonabschnitte durch die Markscheide isoliert sind und folglich (fast) kein Depolarisationsstrom durch die Membran der interanulären Segmente austreten kann; durch die um 3...4 Größenordnungen geringere Globalkapazität eines Funktionsabschnittes aus Nodium und Internodium im Vergleich zu marklosen Fasern entsprechender Leitungsgeschwindigkeit ist auch der erforderliche Ionenstrom zur Umladung des Membrankondensators und zur Depolarisation des Neuronabschnittes entsprechend geringer.

- Typischerweise wird angenommen, daß ein graduiertes Potential, falls es eine hinreichende Amplitude besitzt, um in dieser Zelle überhaupt eine Erregung hervorrufen zu können, (spätestens) am ersten Ranvierschen Schnürring ein Aktionspotential generiert (sofern es sich um myelinisierte Neuriten(abschnitte) handelt und die Erregung nicht als Integrationsprodukt kurzer Dendriten am Axonhügel

eines nahegelegenen Zellsomas gebildet wird); die nodale Natrium- und Kaliumkanal-Dichte liegt dort typ. mehr als hundertfach höher als an unmyelinisierten Abschnitten (Cahalan 1978), wodurch ein lokales Leitfähigkeitsmaximum entsteht und somit durch Fokussierung der Stromlinien die lokale Stromdichte im System dort am höchsten ist (zumindest höher als an nachgeschalteten Strukturen des Systems; später im Faserverlauf positionierte Schnürringe erhalten wegen des starken Ladungsabflusses durch das kaskadierte »Spannungsteilersystem« natürlich nur geringere Anteile des gradierten Signals, *ibid.*). Da die zuvor genannte Globalkapazität hier verringert, die lokale Leitfähigkeit jedoch stark erhöht ist, erreicht man durch beide Faktoren eine verstärkte Nutzung des Depolarisationsstroms für die Aktivierung der spannungsgesteuerten Natriumkanäle und eine Reduzierung der Systemzeitkonstante. Durch die hohe Natriumkanaldichte der kurzen Nodularabschnitte setzt die Kettenreaktion der positiv rückgekoppelten Natriumkanal-Öffnungswahrscheinlichkeit früher ein (die notwendige Grenzverstärkung zur Auslösung einer Kettenreaktion wird bereits bei geringerem Aktivierungsgrad erreicht); die Erregungsschwelle liegt deshalb niedriger als an jedem anderen Faserabschnitt entsprechender »Bauart« mit geringerer Natriumkanal-Dichte (ebenso gilt die hohe Natriumkanal-Dichte am Axonhügel bei typischen integrativen Neuronen auch als entscheidender Mechanismus der Schwellenabsenkung, die ihn als Spike-Initiationszone für Inputs aus kurzen unmyelinisierten Dendriten auszeichnet).

- Analoge Ausbreitung von Potentialen erfolgt somit nur über sehr kurze Distanzen und findet dann stets rein elektrotonisch, also passiv, statt: »Graduierte Potentiale breiten sich stets ohne aktive Un-

terstützung rein elektrotonisch aus ... *{und}* nehmen deshalb mit zunehmender Entfernung vom Entstehungsort rasch ab. Diese amplitudenmodulierten analogen Signale ... treten daher nur in kleinen Neuronen, wie nichtfeuernden lokalen Schaltneuronen ..., *{die nicht fähig sind}*, Aktionspotentiale hervorzubringen, oder über kurze Leitungsdistanzen unter einigen hundert Mikrometern als Signalübertragungsmechanismus auf; ...*{amplitudenmodulierte analoge Signale}* sind daher nicht in der Lage, Informationen über größere Entfernungen zu übermitteln... Soll die Information über größere Strecken ...*{transportiert werden}*, muß sie in Aktionspotentiale umgewandelt werden (frequenzmodulierte Impulse), die ohne Dekrement ... weitergeleitet werden, ... *{da sich}* nur die*{se}* Signale nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip ... mit aktiver Unterstützung *{ausbreiten können}*.«, (Eckert 1986, Zusammenf. d. d. Verf.). Die passive Ausbreitung graduierter Signale spielt demzufolge nur in kleinen nichtspikenden lokalen Schaltneuronen sowie zur integrativen Verarbeitung lokaler synaptischer Eingänge bei typischen Leitungsdistanzen im 100-µm-Bereich eine Rolle. Somit werden Analogsignale überwiegend als unvermeidliche Zwischenstufe bis zur nächsten Digitalisierung der Information angesehen, »graduierete Potentiale bleiben meist auf sensorische und postsynaptische Membranen beschränkt, während die dazwischenliegenden Leitungsdistanzen von Aktionspotentialen überbrückt werden« (*ibid.*). Weitergehende, aktive Funktion bei der Fortleitung oder Verarbeitung von Information kommt graduierten Signalen im Nervensystem nach klassischer Lehrmeinung nicht zu.

- Die Übertragung der Information von Zelle zu Zelle erfolgt über Synapsen meist chemischer Art, die vereinfacht folgendermaßen funk-

tionieren: Die Depolarisation einer Sinneszelle oder eines vorgeschalteten Neurons führt über die Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle und den Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels zur Calcium-gesteuerten Exozytose von Transmittervesikeln. Diese diffundieren durch den synaptischen Spalt und interagieren mit den entsprechenden transmitterspezifischen Rezeptoren an der subsynaptischen Membran. Dies führt über die Aktivierung der gekoppelten Ionenkanäle (Öffnung der »Gates« = Tore) in der subsynaptischen Membran, zur Erhöhung der Membranleitfähigkeit für permeable Ionen. Daraus resultiert im Falle einer typischen erregenden Synapse mit unspezifischen Kationenkanälen in der subsynaptischen Membran eine Steigerung des Nettoeinstroms positiver Ladungen (hauptsächlich Natriumionen) in die subsynaptische Dendritenendigung (postsynaptischer = subsynaptischer Strom) und damit der Aufbau eines depolarisierenden – also erregenden – postsynaptischen Potentials (EPSP = exzitatorisches postsynaptisches Potential). Dieses EPSP (bzw. seine Stromkomponente) breitet sich elektrotonisch (also passiv) bis zum nahegelegenen Impulsentstehungsort z.B. am ersten Ranvier'schen Schnürring (s.o.) aus und löst dort bei Erreichen der Schwelle ein Aktionspotential aus. »Graduierte Potentiale treten an sensorischen und postsynaptischen Membranen auf ...{und} bleiben in ihrer lokalen Ausbreitung sehr beschränkt. ...{Sie erfahren} mit zunehmender Entfernung vom Ort der Stromzuführung eine starke Abschwächung des Membranpotentials ...{und} sind daher nicht in der Lage, Informationen über größere Entfernungen zu übermitteln; ...{postsynaptische Potentiale lösen deshalb}, wenn sie groß genug sind, in lokal benachbarten Strukturen des postsynaptischen Neurons Aktionspotentiale aus,... die allein größere

Leitungsdistanzen ohne Verlust der Signalstärke überwinden können.«, (Eckert 1986, Zusammenf. d. d. Verf.).

- Die Auswertung von Information aus mehreren Eingangskanälen erfolgt nach klassischer Vorstellung stets in Neuronenverbänden, die in der Regel (bei Vertebraten) im Zentralnervensystem lokalisiert sind und die Verarbeitungsfunktionen des Nervensystems bereitstellen. Dies gilt z.B. auch für die Verrechnung konvergenter Information aus mehreren Sinnesorganen, die einen wichtigen Prozeß der Informationsverarbeitung und damit typischerweise eine Funktion des Gehirns darstellt.

Morphologische Untersuchungen

Einige dieser klassischen Vorstellungen lassen sich nur schwerlich mit den morphologischen Beobachtungen in den elektrosensorischen Afferenzen clusterbildender Weise in Einklang bringen. Zunächst weist dieses System eine Konvergenz der sensorischen Information mehrerer räumlich verstreut über ein größeres Hautareal angeordneter Sinnesorgane auf, die mikroskopisch beobachtet und physiologisch mittels Doppelableitung der Nervenimpulse aus dem Ampullenlumen der am Cluster beteiligten Organe eindeutig charakterisiert werden kann. Bemerkenswerterweise steht für die bei jeder Konvergenz von Information notwendige Verrechnung der Inputs kein neuronales Netzwerk mit interneuronalen synaptischen Verschaltungen zur Verfügung, sondern sie findet peripher mononeuronal in einem ausgedehnten Dendritenbaum eines primären afferenten Neuron statt. Hierbei handelt es sich nicht um ein homogenes, kleines Sinnesepithel, bei dem mehrere lokal eng benachbarte Synapsen im afferenten Neuron ein gemeinsames EPSP ausbilden, sondern um weit verstreute, disjunkte

Sinnesepithelien zahlreicher Einzelsinnesorgane, deren postsynaptische Potentiale ohne aktive Mechanismen kaum den gemeinsamen Axonstamm erreichen und miteinander additiv interagieren können. Vergleichbares ist in dieser Form und Ausprägung in der neurophysiologischen Literatur nicht bekannt. Bei *Schilbe mystis* und *Physalia spec.* treten Dendritenlängen von z.T. über 2 mm auf. Auch wenn man bei *Physalia* über morphologische Anpassungen der Dendriten hinsichtlich ihres Durchmessers, ihrer Myelinisierung und eines Leitungslängenausgleichs spekulieren könnte, ist selbst dort eine elektrotische Ausbreitung postsynaptischer Potentiale bis zum gemeinsamen Axon nach klassischer Theorie kaum vorstellbar (siehe auch Kap. Diskussion, ISI-Spikestatistik). Dies gilt umso mehr für die Verhältnisse bei *Schilbe mystis*, die weder eine Verdickung der Dendriten noch einen Ausgleich extremer Unterschiede in der Leitungslänge von z.T. 1:10 und darüber aufweisen. Somit wäre nach klassischer Vorstellung zu postulieren, daß Spike-Initiationsstellen synapsennah in jedem Dendritenast vorhanden sind (Teunis *et al.* 1990b). Dies steht jedoch im Widerspruch zum physiologischen Befund hoch-regelmäßiger Spike-muster, die mit mehreren unabhängigen, nicht gekoppelten Impulsentstehungsorten, wie sie in der Kollisionstheorie diskutiert wurden (Murray & Capranica 1973, Pabst 1977, Holden 1976, Sanchez & Zakon 1990, Teunis *et al.* 1990b, Longtin & Racicot 1996), keinesfalls vereinbar sind. Da die singulären Impulsentstehungsorte lediglich auf elektrischem Wege kommunizieren, d.h. gekoppelt sein könnten, und eine Kopplung über graduierte Potentiale auszuschließen ist (siehe Kap. Diskussion, Spikestatistik), bliebe als einzige theoretisch denkbare Möglichkeit eine Kopplung der Spikezentren über Aktionspotentiale, d.h. eine retrograde Invasion der Aktionspotentiale in alle Äste des

Dendritenbaums und somit die Auslösung eines Hodgkin-Huxley-Zyklus an jedem der Impulsentstehungsorte mit Zurücksetzen der gesamten Endarborisation auf die Startbedingungen eines einheitlichen Ruhepotentials. Alternativ könnte dies auch als eine elektrisch stark gekoppelte, in ihrer Gesamtheit spikende Endarborisation interpretiert werden, die jeweils wiederum von einer der synapsennahen, in jedem Dendritenast vorhandenen Spike-Initiationsstellen getriggert würde. Ein derartiger Mechanismus wirft jedoch ein fundamentales Problem auf: es gibt keine Möglichkeit, die eine Verrechnung, d.h. primär eine Addition der Einzelempfindlichkeiten der konvergent zusammengeschalteten Organe erlauben würde – mit den Vorteilen der Verringerung des Rezeptorrauschens, der Linearisierung der Einzelkennlinien, ggf. auch der Vergrößerung des Dynamikbereichs, der Steigerung der Zeitauflösung des Clustersystems u.ä., also aller Vorteile, die als evolutive Triebfeder der Konvergenzbildung zu erwarten sind –; das jeweils »schnellste« bzw. empfindlichste Organ in jedem Cluster löst eine afferente Nervenerregung aus; die restlichen Organe des Clusters leisten keinen Beitrag zur Verbesserung des Systems. Ein derartiger Mechanismus, der in der Ontogenese (und vermutlich auch beim Übergang vom Nicht-Clusterbildner zum Clusterbildner in der Phylogenese, da die 1:1-Verschaltung der Organe zum ZNS den ursprünglicheren Zustand repräsentieren dürfte und nicht die Clusterbildung) zunehmend komplexere Strukturen aufbaut und unter Energieaufwand erhält, ohne daß diese zusätzlichen Strukturen einen Nutzen bringen (in einem Cluster mit (n) Organen würden $(n-1)$ Organe keinen Beitrag zur Funktion des Clustersystems liefern), erscheint physiologisch schwer vorstellbar, zumal auch Ampullen im Adultstadium reversibel eingeschmolzen und wieder neugebildet werden können,

z.B. in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand des Tieres (Roth persönl. Mitteilung; eigene Beobachtung). Zwar wurde diese (Kollisions-)Theorie mit dem Durchsetzen des »fittesten« Organs von Teunis *et al.* (1990b) bei *Clarias gariepinus* aufgrund von Befunden der Rauschanalyse diskutiert, die weitgehend von der Zahl konvergierender Organe unabhängige Ergebnisse liefert, wobei die Rauschquelle als organassoziiert, evtl. im synaptischen Übertragungsmechanismus lokalisiert, betrachtet wird; diese Annahme wurde jedoch bislang keineswegs zwingend nachgewiesen und wird durch andere Ergebnisse (s.u.) z.T. eindeutig widerlegt. Als mögliche Erklärung für die Kollisionstheorie führt diese Arbeit (*ibid.*) an, daß sich durch diesen Mechanismus stets der beste Rezeptor durchsetzt und seine Information zum ZNS fortleitet; dadurch könnte eine Redundanz des Systems, eine größere Verletzungssicherheit und ein »aus dem Verkehr ziehen« älterer, schlechterer Organe erreicht werden. Dies erscheint jedoch vor dem Hintergrund der Systemplastizität und reversiblen Organneubildung unwahrscheinlich (Szamier & Bennett 1973, Roth 1985 & 1986 & 1993, Teunis *et al.* 1989 & 1991a, Roth & Wittmaack 1991, Roth persönl. Mitt.). Außerdem zeigen Arbeiten der Utrechter Arbeitsgruppe um Prof. Peters eine Addition der Empfindlichkeit der Einzelorgane innerhalb eines Clusters mit hoher Signifikanz (Peters & Mast 1983: $96 \pm 10\%$, Peters & van Ieperen 1989: $106 \pm 9\%$, bzw. Peters *et al.* 1997a: $104 \pm 8\%$; theoretischer Erwartungswert bei exakter Additivität = 100%; Erwartungswert im Falle der Kollisionstheorie = 0%), die keinesfalls mit einer »Kollisionstheorie« oder einem Durchsetzen des »fittesten« Organs in Einklang gebracht werden kann (zusätzlich bleiben auch die Befunde der superproportionalen Empfindlichkeitsreduktion bei Ausschaltung einzelner Clusterorgane in van Dongen & Bretschneider

(1984) unter der Hypothese der Kollisionstheorie unerklärlich). Dendritische Miniaturpotentiale (Spencer & Kandel 1961, Amitai *et al.* 1993, Yuste *et al.* 1994), die jedoch nicht mit hinreichender Amplitude die gemeinsame Afferenz erreichen, um dort eine Erregung auslösen zu können, als weitere Hypothese, die potentiell zur Erklärung der Signalausbreitung über die großen Dendritenstrecken und Addition der Einzelorganempfindlichkeiten in der Lage wäre, konnten niemals gefunden werden (obwohl sie im Falle ihrer Existenz nachweisbar sein müßten) und sind eindeutig auszuschließen, da sie u.a. sowohl mit der äußerst geringen Streuung des Interspike-Intervalls (siehe nächster Abschnitt) wie auch mit der graduierten Inhibierbarkeit des dendritischen Fortleitungsmechanismus in den späteren TTX-Experimenten unvereinbar wären.

Jegliche Verrechnung der Inputs aus den Einzelorganen ist nur analog auf der Basis des Kirchhoffschen Knotenpunktsatzes der Summation von Zweigströmen vorstellbar. Dazu müssen analoge Äquivalente der postsynaptischen Potentiale in einem räumlich-zeitlichen Fenster, das durch die passiven elektrischen Eigenschaften des Systems bestimmt ist, an einen Ort miteinander interagieren und ihre Stromkomponenten sich am Knotenpunkt des Axonursprungs, der auch den Impulsentstehungsort trägt, entsprechend der Kirchhoffschen Regel addieren. Das aber würde einen Mechanismus zur Übertragung der analogen Information voraussetzen, der es den postsynaptischen Potentialen ermöglicht, die große Dendritenstrecke ohne gravierende Informationsverluste zu überwinden und in die gemeinsame Afferenz zu gelangen.

Betrachtet man unter den vorgenannten Aspekten den Bau typischer Cluster vom Bäumchentyp bei *Schilbe mystis*, so zeigt sich ein

Bild, das verschiedene Fragen aufwirft. Entsprechend der klassischen neurophysiologischen Theorie müsste ein myelinisierter Neurit mit einem Faserdurchmesser im Mikrometerbereich und einer Faserlänge von 2 mm und darüber Aktionspotentiale generieren und diese saltatorisch fortleiten, da dies die einzige Möglichkeit zur verlustfreien Signalübermittlung über diese Dendritenstrecke darstellen sollte. Die Länge der interanulären Segmente ist mit typ. 12...15 μm bei einem mittleren Faserdurchmesser von 1,2 μm als außergewöhnlich kurz zu bezeichnen (Leonhard 1977). Faserdurchmesser, Aufbau der Schwannschen Zellen, Myelinisierungsgrad und Internodienlänge liegen weit unter den Werten von Neuritensystemen, deren Längskonstante mm-Dimensionen erreicht. Die Parameter Faserdurchmesser, Internodienlänge, Myelinisierungsgrad und Längskonstante sind nach Leonhard (*ibid.*) und anderen Autoren (Hodgin & Rushton 1946, Stämpfli 1954, Rall 1959 & 1970 & 1977, Benninghoff & Goertler 1985) eindeutig miteinander korreliert (»Der Faserdurchmesser verhält sich typischerweise zur Länge des Internodiums etwa wie 1:100. Die Markscheidendicke ist dem Axonkaliber annähernd proportional {nach Benninghoff & Goertler, 1985, beträgt das Verhältnis 6:4}... Mit dem Bau der Nervenfasern korreliert ebenso deren Längskonstante, die stets um ein Weniges über der Internodienlänge {typ. Faktor 5, *ibid.*} liegt und somit die Erregungsförderung durch überschwellige Depolarisation am nächsten Ranvierschen Schnürring gewährleistet«, Leonhard 1977); dies alles spricht klar gegen ein System mit großer Längskonstante (λ). Handelt es sich bei den afferenten Dendriten des elektrosensorischen Systems von *Schilbe mystis* um ein typisch gebautes afferentes sensorisches Wirbeltierneuron mit entsprechenden Daten (Hodgin & Rushton 1946, Stämpfli 1954, Rall 1959 & 1970 & 1977, Andersen et

al. 1980, Podznanski 1988, Holmes 1989, Bernander *et al.* 1991, Rapp *et al.* 1994, Spruston *et al.* 1994, Major *et al.* 1994 u.a.), so wäre allein aufgrund dieser Befunde eine Längskonstante in der Größenordnung von wenigen hundert Mikrometern zu erwarten, was auch mit der relativ geringen Internodallänge (aufgrund der Internodienlänge läge der Schätzwert der Längskonstante in der Größenordnung von hundert Mikrometern) evtl. noch in Einklang zu bringen wäre (s.a. Benninghoff *et al.* 1985). Bereits bei einer Dendritenlänge von 3λ , die weit überschritten werden dürfte (dies entspräche bei einer Dendritenlänge von 3 mm bereits einer für Neuriten dieses Baues unrealistisch großen Längskonstante von $1000 \mu\text{m}$), erreichen bei statischer Betrachtung (ohne Berücksichtigung der Membrankapazität, die die Fortleitung zusätzlich dynamisch dämpfen würde) bei passiver Fortleitung nur 5% der eingespeisten Signalamplitude das Ende des Dendriten; bei 6λ ($\triangleq 500 \mu\text{m}$) wären es 0,6%; bei 10λ ($\triangleq 300 \mu\text{m}$) würden sogar nur 0,004% des Ausgangssignals an das Dendritenende gelangen. So müßte man aufgrund der elektrophysikalischen Eigenschaften annehmen, daß das Potentialgeschehen bei rein elektrotonischer Ausbreitung am Beginn des Axonstamms nur in untergeordnetem bzw. zu vernachlässigendem Maße von der synaptisch übertragenen Information, weit stärker hingegen von extraneuronalen Geschehnissen, Störpotentialen, Leitfähigkeitsschwankungen, Änderung der Membraneigenschaften etc. beeinflusst werden würde und daß postsynaptische Potentiale bei einem potentiell am Beginn der gemeinsamen Afferenz gelegenen Impulsentstehungsort diesen unter keinen Umständen erregen könnten. Selbst wenn man eine Dendritenlänge von nur 1λ zugrundelegen würde, was bei dieser Morphologie als völlig unrealistisch gelten darf – dies würde eine Längskonstante von 3 mm erfordern, die

bisher nur in Axonen mit 10 μm Dicke und darüber mit entsprechend starken und breiten Myelinscheiden beobachtet wurde (Benninghoff 1985, Eckert 1986, Schmidt *et al.* 1983) –, wäre ein Signalverlust von rund $\frac{2}{3}$ und eine immer noch relativ starke Störanfälligkeit des Systems kaum für einen der informationskritischen Übertragungsfaktoren eines hochspezialisierten, optimierten und vermutlich evolutiv durch Clusterbildung fortentwickelten Sinnessystems sinnvoll und tolerabel (ohne entscheidende physiologische Vorteile wäre die Clusterbildung vermutlich in der Evolution gar nicht »erfunden« und »beibehalten« worden).

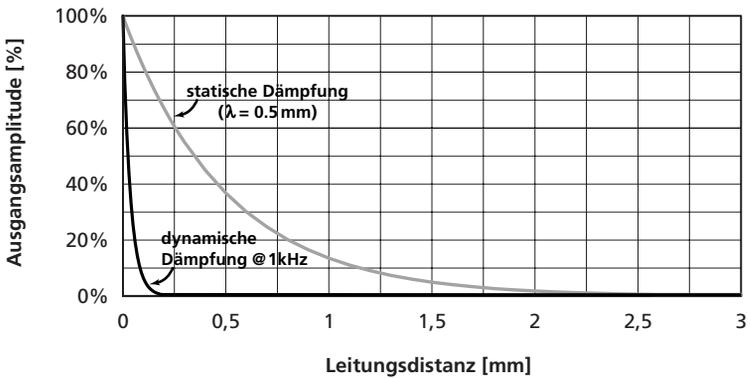


Abb. 4.1.1 Berechnete Signaldämpfung in einem Neuriten von 3 mm Länge (Myelinisierungsgrad 75%). Bei elektrotonisch sich ausbreitenden DC-Potentialen fällt deren Ausgangsamplitude (100%) innerhalb der Längskonstante (hier ca. 0,5 mm) auf 36,8%; nach einer Dendritenstrecke von 3 mm sind lediglich noch 0,25% der eingespeisten Signalamplitude vorhanden (graue Kurve). Veränderliche Signale wie Aktionspotentiale werden jedoch durch die Membrankapazität weitaus stärker gedämpft, wie die schwarze Kurve veranschaulicht (für die Berechnung zugrundegelegte Werte: $R_i = 3 \text{ Ohm/m}$, $R_m = 3 \text{ Ohm/m}^2$, $C_m = 0,01 \text{ F/m}^2$, $D = 1 \mu\text{m}$, $f = 1 \text{ kHz}$).

Außerdem kommt es unabhängig von der konkreten Größe der Längskonstante zu einem stetigen longitudinalen Abfall des postsynaptischen Potentials von Nodium zu Nodium, da an jedem Schnürring entlang der Fortleitungsstrecke im Dendriten ein bestimmter Anteil des Reststroms austritt und so das für eine Auslösung eines Aktionspotentials zur Verfügung stehende Potential von Schnürring zu Schnürring schwächt. Da sich die schwachen Restpotentiale, die das gemeinsame Axon erreichen könnten, dort nicht addieren, sondern nur auf einen mittleren Potentialwert angleichen würden (bei den Beiträgen der Teiläste würde es sich elektrisch betrachtet um den Zusammenschluß hochimpedanter Spannungsquellen handeln, bei deren Zusammenschaltung ein entsprechend den Impedanzverhältnissen gewichteter Mittelwert resultierte), wären die Bedingungen für die Auslösung eines Aktionspotentials am ersten Ranvierschen Schnürring in der gemeinsamen Afferenz äußerst ungünstig. Zudem wirkt sich auch noch die Membrankapazität negativ auf die bisherige Betrachtung der Systemfunktion aus, da sie den Potentialanstieg an einem entfernten Neuritenabschnitt erheblich dämpfen und verzögern würde.

All diese Faktoren sprechen dafür, daß die postsynaptischen Potentiale nicht elektrotonisch die Dendritenstrecke überwinden. Legt man das klassische neurophysiologische Modell zugrunde, dann sollten Aktionspotentiale generiert werden und zwar in einem synapsennahen Abschnitt, also wahrscheinlich am ersten Ranvierschen Schnürring des jeweiligen Dendriten (Hausser *et al.* 1995, Koch *et al.* 1995, Mainen *et al.* 1995, Colebert & Johnston 1996, Stuart *et al.* 1997a,b, Lüscher & Larkum 1998), wie dies bereits verschiedentlich in der Endarborisation von Afferenzen des Lateralissystems diskutiert wurde (z.B. Murray & Capranica 1973, Teunis *et al.* 1990b, Sanchez & Zakon 1990). Falls aber

diese Annahme synapsennaher Spike-Initiationsorte zutrifft, dann besitzt jeder oder zumindest fast jeder Dendritenast einen autonomen Spikegenerator oder -initiator.

Alternativ dazu und im Widerspruch zur klassischen neurophysiologischen Vorstellung wäre die Annahme monozentrischer Erregungsbildung an einem einzigen Impulsentstehungsort, der am Beginn der gemeinsamen Afferenz liegen müßte. Dies würde einen Mechanismus voraussetzen, der es den graduierten Potentialen gestatten würde, die große Entfernung bis zum Impulsentstehungsort zu überwinden. Hierfür käme ggf. ein Mechanismus der Stromverstärkung in Betracht, der die zuvor erwähnten hochimpedanten Spannungsquellen in spannungsgesteuerte Stromquellen verwandeln würde, die einen dem postsynaptischen Potential entsprechenden Teilstrom beitragen, niederimpedant in das gemeinsame Axon einspeisen, und diesen am Strom-Summiationsknoten zu Beginn des gemeinsamen Axons mit den Beiträgen aller anderen Äste entsprechend der ersten Kirchhoffschen Regel aufaddieren könnten. Die Aufgabe des Stromverstärkers könnten hypothetisch über die Dendritenlänge verteilte Ionenkanäle als spannungsgesteuerte Stromquellen übernehmen (Traub & Llinas 1979, Jack *et al.* 1983, Gilly & Armstrong 1984, Yoshii *et al.* 1988, French *et al.* 1990, Vallet *et al.* 1992, Taylor *et al.* 1993 & 1995, Stuart & Sakmann 1995a, Magge & Johnston 1995a, Schwandt & Crill 1995, Johnston *et al.* 1996, Lipowski *et al.* 1996, Cook & Johnston 1997, Poznanski & Bell 2000a,b). Das Generatorpotential entspräche dann dem Spannungsabfall des Gesamtstroms am »Knotenpunkt« des Impulsentstehungsorts über dem virtuellen Lastwiderstand des Ladungsabflusses über das afferente Axon und würde so die Bedingungen für einen additiven Konvergenzmechanismus mit monozentrischer Erregungsbildung erfüllen.

4.2 Statistische Untersuchung des Interspike-Intervalls

Betrachtet man nun die ISI-Statistik, so kann diese Aussagen über die Zahl der aktiven Impulsentstehungszentren liefern, die sich in beiden vorgenannten Theorien unterscheidet. Analysiert man die Meßergebnisse einer typischen Clusterableitung von *Schilbe mystis*, dann zeigt sich eine schmale, eingipflige, symmetrische ISI-Häufigkeitsverteilung mit einem σ von nur 7% und ohne jegliche Basisverbreiterung zu längeren Intervallwerten hin. Dies ist mit der Annahme ungekoppelter autonomer Spikegeneratoren absolut unvereinbar; die Folge dieser Hypothese wäre eine breite, unsymmetrisch linksgipflige Häufigkeitsverteilung mit Intervallwerten, die am hochfrequenten Ende etwa bei einem $t(\min)$ entsprechend der Refraktärzeit des Dendritensystems steil einsetzt und sich u.U. bis zu einem $t(\max)$ des schnellsten Teiloszillators erstrecken kann. Eine Häufigkeitsverteilung wie die eben beschriebene ähnelt oder entspricht dem Bild, das nach Anästhesie eines Fisches mit MS-222 in der »Aufwachphase« der peripheren Neurone häufig beobachtet werden kann. Hier zeigen sich nach einer anfänglichen sog. »burst«-Aktivität bei Wiedereinsetzen der Spontanaktivität oft zunächst unregelmäßige, »chaotische« Spikemuster, die nach Analyse der ISI-Häufigkeitsverteilung gute Übereinstimmung mit der zu erwartenden Verteilungskurve eines Systems mit mehreren ungekoppelten oder entkoppelten autonomen harmonischen Oszillatoren van-der-Polschen Typs (Murray & Capranica 1973, Chance *et al.* 1973, Holden 1976, Pabst 1977, Hoppe *et al.* 1982) aufweist, deren genaue Anzahl aus diesen Daten jedoch nicht gefolgert werden kann. Als Hypothese wäre denkbar, daß hier der reguläre Impulsentstehungsort in der ge-

meinsamen Afferenz blockiert oder zumindest so weit in seiner Funktion beeinträchtigt ist, daß die auf physiologischem Wege stattfindende Erregungsbildung dort zunächst ausbleibt, und daß Aktionspotentiale ungekoppelt in den einzelnen Dendriten initiiert werden, die, wie sich später bestätigte, erregbar sind und Spikes generieren könnten, die dann chaotisch miteinander interagieren und sich in der Endarborisation ausbreiten würden. Da MS-222 vielfältige Auswirkungen auf die verschiedensten Arten von Ionenkanälen besitzt, könnte auf diese Weise die Initiation der Erregungsbildung in den Dendriten stattfinden, was unter normalen physiologischen Bedingungen offensichtlich nicht eintritt. Jedoch lassen die vorliegenden Daten lediglich den Schluß auf die Aktivität mehrerer ungekoppelter Oszillatoren zu (das können räumlich getrennte Strukturen oder Prozesse darstellen), die die Aktionspotentialgeneration steuern; diese sollten sich dann in den Dendriten befinden und unabhängig voneinander (oder höchstens mit geringer Kopplung untereinander) tätig sein, jedoch die Endarborisation in ihrer Gesamtheit erregen können.

Im Gegensatz dazu spricht ein Häufigkeitshistogramm wie das bei regulärer Spontanaktivität gemessene stark für eine monozentrische Erregungsbildung an einem einzigen Impulsentstehungsort, der am Beginn der gemeinsamen Afferenz liegen muß, da die Histogrammverteilung zwingend von einem (einzigem) Rhythmusgeber stammen muß. Theoretisch wäre als zweite Möglichkeit die Existenz mehrerer synapsennaher Initiationsstellen in den Dendriten denkbar, die mittels eines Kopplungsmechanismus untereinander verbunden sind und sich so wie ein einziges System verhalten. Dieser Kopplungsmechanismus, der gewährleistet, daß nur der Impulsentstehungsort *eines* Dendritenastes aktiv ist und somit nur *ein* Organ pro Cluster den

Spikerhythmus bestimmt, muß elektrischer Natur sein und auf der Basis aktiv fortgeleiteter Nervenimpulse funktionieren, da graduierte, elektrotonisch sich ausbreitende Potentiale diese Kopplungsaufgabe keinesfalls erfüllen könnten (sie wären außerdem depolarisierend also exzitatorisch, müßten aber die Spikeentstehung in Nachbarästen verzögern oder unterdrücken (reziproke Hemmung), da nur ein Rhythmusgeber aktiv sein dürfte; außerdem würde eine reziproke Hemmung auf dieser Ebene die Empfindlichkeit des Systems herabsetzen, da hier jedes Organ gegen jedes andere »ankämpfen« müßte. Eine Synchronisation durch Mitkopplung auf der Basis eines Analogsignals ist ebenso auszuschließen, da sie einen hohen Kopplungsgrad nahe »1« und damit eine nahezu verlustfreie Ausbreitung der postsynaptischen Potentiale über Strecken bis zur doppelten Ausdehnung des Dendritenbaums erfordern würde; prinzipiell wäre eine für ein Spikehistogramm dieser Güte erforderliche Präzision bei exakter Additivität durch ein System derartiger Kopplungen nicht vorstellbar). Außerdem müßten die graduierten Signale zweimal die Strecke eines Dendritenabschnittes zurücklegen, bevor sie mit dem noch nahezu ungedämpften Generatorpotential des korrespondierenden Organs interagieren könnten, was für postsynaptische Signale als ausgeschlossen gelten darf (es existieren in diesem System keine Querverschaltungen mit hemmenden Synapsen, Interneuronen oder andere inhibierende Mechanismen, die eine derartige Synchronisationsleistung plausibel erfüllen könnten). Da also eine Kopplung auf der Basis graduierter Signale nicht denkbar ist, würde das bedeuten, daß allein die Aktionspotentiale selbst diese Synchronisationsaufgabe wahrnehmen könnten, indem sie retrograd alle Dendritenäste invadieren und alle Impulsentstehungsorte erregen und damit die beginnende Depolarisation durch das postsynaptische

Potential am Impulsentstehungsort wieder zurücksetzen, was angesichts der starken Kopplung der myelinisierten Endarborisation mehr oder weniger einer in ihrer Gesamtheit spikenden Endarborisation entsprechen könnte. Dabei würde sich stets das empfindlichste und damit »schnellste« Organ durchsetzen und eine Gesamterregung im Dendritensystem hervorrufen; darüber hinaus müßte man postulieren, daß diese Aufgabe stets (oder zumindest über einen längeren Zeitraum bezogen auf die Beobachtungsdauer) von ein und demselben Organ wahrgenommen wird, da die individuelle Spontanaktivität und Empfindlichkeit einzelner Organe im Cluster deutlich unterschiedlich ist (Heijmen & Peters 1995), heterogene Rhythmengeber jedoch mit den Befunden äußerst geringer Interspike-Intervall-Variabilität unvereinbar wären. Dadurch würde in einem Cluster mit (n) Organen stets nur ein und dasselbe Organ (zumindest für einen längeren Zeitraum) die Perzeption der elektrischen Felder übernehmen und die Erregung der afferenten Faser bestimmen, die anderen ($n-1$) Organe würden keinen Beitrag zur Verbesserung der Systemleistung erbringen (siehe vorangegangener Abschnitt); das aber stünde in klarem Widerspruch zu der von Peters *et al.* (Peters & Mast 1983, van Dongen & Bretschneider 1984, Peters & van Ieperen 1989, Peters *et al.* 1997a) gefundenen Addition der Rezeptorempfindlichkeiten im Cluster. Für die in vorgenannten Arbeiten (*ibid.*) gefundene Addition der Organeinzelempfindlichkeiten innerhalb des Clusters muß jeder Teilast zwingend seinen Teilstrom beitragen, der sich am Knotenpunkt des Netzwerks, also dem Beginn des Axonstamms, addiert und dort erst in eine Folge von Aktionspotentialen gewandelt werden kann.

Eine dritte Art von Verteilungskurve erhält man nach proximaler Vergiftung des Initialabschnittes der gemeinsamen Afferenz mit TTX

(siehe unten, siehe Kap. Diskussion, »progressive TTX-Vergiftung«). Charakteristisch hierfür ist, daß das kürzeste Intervall in etwa dem Grundintervall der unvergifteten Faser entspricht (geringfügig größer), daß also nicht wie bei entkoppelten Oszillatoren kürzere Intervalle auftreten können mit einer unteren Schranke, die durch die Refraktärzeit des Systems bestimmt wird. Außerdem zeigt sich das Frequenz- bzw. Intervallspektrum deutlich mehrgipflig. Zusätzliche Nebenpeaks treten dabei in guter Übereinstimmung mit den Vielfachen des Grundintervalls t_G , also neben $1 \cdot t_G$ auch bei $2 \cdot t_G$, $3 \cdot t_G$, $4 \cdot t_G$ auf. Das Grundintervall ist dabei im Vergleich zur Spontanaktivität des unbeeinflussten Systems etwas zu längeren Werten hin verschoben. Diese Verteilung der Spikeintervalle belegt klar, daß sie einem singulären Rhythmusgeber entspringen muß, bei dem einzelne Spikeereignisse ausfallen. Eine Entkopplung einzelner Impulsenstehungsorte oder Subzentren wurde niemals beobachtet, die Intervall-Verteilungskurven aus beiden abgeleiteten Organen sind damit absolut identisch. Analysiert man die theoretisch denkbaren Funktionsmöglichkeiten des Systems und die daraus resultierenden Konsequenzen einer proximalen TTX-Vergiftung, so wird klar, daß in dieser Versuchssituation sehr charakteristische Ergebnisse zu erwarten sind. Existiert hypothetisch nur ein Impulsenstehungsort, so müßte dieser zwangsläufig in der gemeinsamen Afferenz liegen und in seiner Funktion frühzeitig durch TTX beeinträchtigt werden, was prädigital z.B. zu einer Schwellenwerterhöhung für die Auslösung eines Aktionspotentials oder nach der Aktionspotentialbildung zu einem Ausfall einzelner Spikes führen könnte. Beides würde sich in charakteristischer Weise in der ISI-Häufigkeitsverteilung manifestieren. Im Falle der Alternativhypothese mehrerer synapsennaher Impulsenstehungsorte wird eine Veränderung erst

dann und nur in dem Maße eintreten, wie die TTX-Front bei progressiver Vergiftung mit proximal der Endarborisation gelegenen Applikationsort die jeweils organnah gelegenen Impulsentstehungsorte in den Dendriten erreicht und vergiftet bzw. durch Unterbrechung der Erregungsfortleitung die Kommunikation der einzelnen Aktionspotentialgeneratoren unterbindet und diese damit entkoppelt. Auch dies würde zu einer charakteristischen und von vorgenannten Möglichkeiten klar unterscheidbaren Veränderung der ISI-Häufigkeitsverteilung führen.

Aus den Ergebnissen geht klar hervor, daß auch unter proximaler TTX-Vergiftung beim Ausfall von Spikeereignissen und dem »Stottern« des Systems lediglich ein einzelner Impulsentstehungsort aktiv ist, der noch nach wie vor einen stabilen Grundrhythmus vorgibt, dessen Erregung aber unvollständig bleibt oder aber vollständig abläuft, und aus dem dann einzelne Spikes ausfallen oder sich nicht in die Endarborisation fortpflanzen – d.h. es zeigt sich eindeutig ein primärer Angriff des TTX auf das Digitalsystem in Verbindung mit einer leichteren Beeinträchtigung des Analogsystems (Vergrößerung des mittleren Interspike-Intervalls der Grundfrequenz). Zu keinem Zeitpunkt konnten chaotische Phänomene mit entkoppelten Generatoren (z.B. wie nach MS-222 Anwendung) beobachtet werden (deren Kopplung über die Arborisationsstruktur würde nach TTX-Anwendung im Verlauf fortschreitender Blockierung der Endarborisation zwangsläufig unterbrochen, was unausweichlich zu unkoordinierter Tätigkeit einzelner Impulsentstehungsorte führen würde), nie konnte die Aktivität von Subsystemen oder ein Fortleitungsabbruch an Dendritenverzweigungen nachgewiesen werden. Die Bedeutung des ISI-Histogramms wird im Zusammenhang mit den TTX-Versuchen weiter diskutiert.

4.3 Amplitudenvergleich innerhalb eines Clusters

Nimmt man nach den vorangegangenen Ergebnissen an, daß der Impulsentstehungsort in der gemeinsamen Afferenz liegt, so haben Aktionspotentiale eine weite Strecke zwischen dem Ort ihrer Entstehung und der Synapse zurückzulegen. Diese Aktionspotentiale, die im Axonstamm gebildet würden, müßten folglich die gesamte Länge der Dendritenstrecke überwinden, um die Synapse zu erreichen, dann z.B. noch die postsynaptische Membran, die basale Sinneszellmembran, das Sinneszellumen und die apicale Sinneszellmembran durchqueren, und sich im Ampullenlumen, das niederimpedant mit dem geerdeten Wasserkörper des Ableitbeckens in Verbindung steht, ausbreiten, bevor sie dort mit einer Amplitude in der typischen Größenordnung von 10...50 μV im Ampullenlumen abgeleitet werden können. Diese Ausbreitung vom Impulsentstehungsort bis in die Region der Synapse könnte (primär) innerhalb der Dendriten erfolgen, wobei hier die Fortleitung aktiv oder passiv geschehen könnte, oder außerhalb der Dendriten diffus über das umgebende Gewebe (hierbei kommt natürlich nur passive Fortleitung in Betracht); weitere Möglichkeiten sind nicht denkbar. Im Falle diffuser Ausbreitung ist mit einer extrem starken Abschwächung und Impulsverbreiterung zu rechnen, da die Spikeamplitude bei ungehinderter Ausbreitung im Elektrolyten – bereits ohne zusätzliche resistive (zelluläre, den Ausbreitungsquerschnitt verengende) Strukturen oder kapazitive Verluste (über Membranen quer zur Ausbreitungsrichtung) – mit dem Quadrat der Entfernung vom Entstehungsort abnehmen würde und auf ihrem Weg durch die Gewebsstrukturen, die als »kaskadierte (R-)RC-Glieder« Tiefpaßeigenschaft besitzen, in

Form und Pulsbreite verändert würde. Deshalb könnten unter diesen Ableitbedingungen singuläre Aktionspotentiale aus dem Axonstamm keinesfalls im Ampullenlumen registriert werden (über den Wassertrög, in dem der Fisch während der Ableitung liegt, würden derartige Potentiale durch »shunting« (niederohmiger Abfluß gegen den Massebezugspunkt) zusätzlich erheblich geschwächt), wie sich später in den TTX-Versuchen eindeutig bestätigte. Ein weit entscheidenderes und absolut zwingendes Argument ergibt sich jedoch aus der Tatsache, daß diese Form der Ausbreitung nicht kanalisiert ist und damit auch keine elektrisch begünstigte Verbindung zu den jeweils von dieser Faser innervierten Ampullen vorhanden wäre. Bei *Schilbe mystis* finden sich oft benachbarte Cluster, die unmittelbar aneinander grenzen oder sogar ineinander verzahnt sind. Diese Cluster lassen sich sauber aus dem Ampullenlumen ableiten (wenn die Elektrode sorgfältig im Ampullenlumen plaziert ist und den Porus weitgehend abdichtet, erhält man exakt nur Spikes der afferenten Faser, die das jeweilige Cluster versorgt, nicht jedoch die der Nachbarampullen, die um weit über 40 dB in ihrer Amplitude abgeschwächt sind, obwohl ihr Impulsenstehungsort oft sogar näher an der Ableitelektrode liegt als jener der korrespondierenden Faser). Dies bedeutet zwingend, daß zwischen dem Impulsenstehungsort und den entsprechenden Ampullenlumina eine begünstigte und gegenüber ihrer Umgebung wirksam abgeschirmte Verbindung besteht, die die Aktionspotentiale kanalisiert in die Ampullenlumina aller Organe des jeweiligen Clusters fortleitet, nicht jedoch zu Organen, die über eine andere Faser innerviert werden und widerlegt damit klar eine diffuse Ausbreitung der Aktionspotentiale außerhalb der Faser.

Wird das Aktionspotential innerhalb der Faser nur elektrotonisch in die Endarborisation fortgeleitet, und findet keine aktive Invasion

statt, so muß – unabhängig von der konkreten Größe der Längskonstante (selbst bei einer hypothetischen Längskonstante von einem Meter wäre immer noch mit einem signifikanten Ergebnis zu rechnen) – zwangsläufig bei einer Leitungstreckendifferenz von 1:5...1:10 und darüber zumindest im statistischen Mittel ein eindeutig meßbarer Unterschied in der Dämpfung der Amplitude stattfinden (zusätzlich zu einer Impulsverbreiterung, die durch die RC-Tiefpaß-Eigenschaften des Dendriten hervorgerufen wird, siehe letzter Abschnitt). Dies konnte jedoch experimentell in keinem Fall gefunden werden; im Gegenteil zeigten sich eine fast perfekte, statistisch hoch signifikante Übereinstimmung und sogar geringfügig höhere Amplituden bei den längeren Leitungstrecken der distalen Ampullen (dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht eindeutig abzusichern). Nach dem t-Test nach Student für gepaarte Stichproben muß bei gegebener Meßwertstreuung und Stichprobenumfang der Amplitudenwert an der distalen Ampulle zwischen dem 0,956...1,044-fachen liegen, um als nicht unterschiedlich auf dem 95%-Signifikanzniveau zu gelten; tatsächlich wurde er mit 1,034 gemessen. Unter Zugrundelegung dieses Meßwertes würde dies jedoch bedeuten, daß die Längskonstante mehr als das 88fache der Differenz der Dendritenlängen – also bei einer Leitungslängendifferenz von 2,5 mm rund 220 mm – betragen müßte, allein, um die hierfür erforderliche geringe statische Dämpfung zu erzielen (dabei sind noch nicht einmal kapazitive Dämpfungseffekte berücksichtigt!), was als absolut unrealistisch gelten dürfte (Andersen *et al.* 1980, Eckert 1986, Podznanski 1988, Rapp *et al.* 1994, Major *et al.* 1994). Durch die Tatsache, daß an den entfernteren Ampullen die geringfügig – jedoch gerade noch nicht-signifikant – größeren Aktionspotentiale gemessen wurden, ist zwar die Hypothese einer nicht-aktiven Invasion der

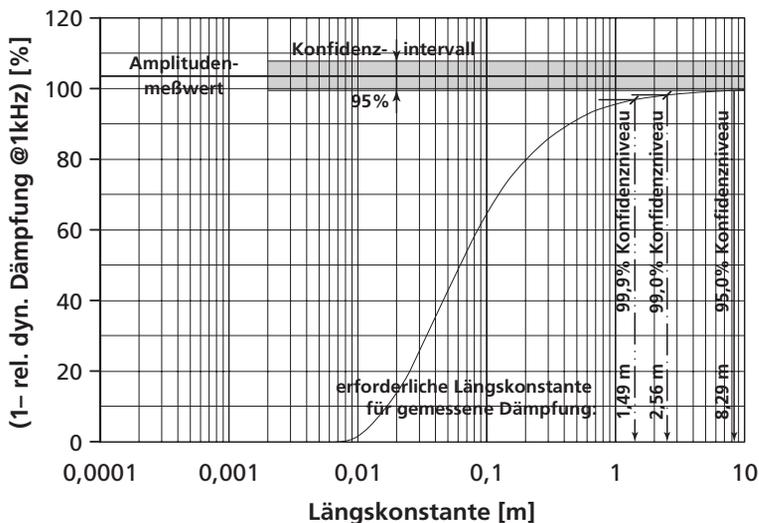


Abb. 4.3.1 Simulation der relativen dynamischen Signaldämpfung im Neuriten in Abhängigkeit von dessen statischer Längskonstante (Daten wie Abb. 4.1.1). Die horizontale Linie markiert den experimentell ermittelten Wert der Dämpfung, grau hinterlegt das 95%-Konfidenzband der Messung (die 99,0%- bzw. 99,9%- Konfidenzniveaus sind durch kurze Linien markiert). Die Abbildung zeigt u.a: 1. Je kürzer die Längskonstante (Abszisse), desto geringere Anteile der am Beginn des Neuriten vorhandenen Signalamplitude erreichen das Neuritenende. 2. Die Längskonstante müßte Werte im Meterbereich annehmen, um Signale dämpfungsarm (Dämpfung < 5%) über die Dendritenstrecke zu übertragen. 3. Bei einer experimentell ermittelten Dämpfung der Dendriten von 103,4% würden (scheinbar paradoxerweise) Signale nach längerer Fortleitungsstrecke weniger gedämpft als nach kurzer Strecke, was innerhalb eines homogenen passiven Modells nicht erklärbar wäre. 4. Für einen Dämpfungswert von 103,4% – 4,4% = 99,0% (= Untergrenze des 95%-Konfidenzbandes) müßte der Berechnung zufolge die Längskonstante unrealistische 8,29 m betragen. Weiteres s. Text.

Aktionspotentiale noch nicht *a priori* widerlegt (der Amplitudenunterschied erreicht noch nicht Signifikanzniveau), jedoch wären die Anforderungen an die Dämpfungsfreiheit der retrograden Signalausbreitung und damit an die Längskonstante des Neuriten extrem hoch, um dieses Ergebnis auf der Basis eines statistischen Fehlers deuten zu können. Bei Berücksichtigung der Membrankapazität (elektrophysiologische Werte der Dendriten wie im vorangegangenen Abschnitt) müßte sich dieser Wert der Longitudinalkonstante damit sogar auf acht Meter (*sic!*) erhöhen, um dieses Ergebnis unter der Hypothese elektrotonischer Signalausbreitung mit gerade 5%-iger Wahrscheinlichkeit erklären zu können (die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen Fehler zweiter Art betrüge selbst im Falle einer Längskonstante von acht Metern noch 95%!). Damit kann dieses Ergebnis des Fehlens eines signifikanten Potentialgradienten ausschließlich mit aktiver retrograder Fortleitung der Aktionspotentiale in die Endarborisation hinein erklärt werden.

Nimmt man im Vorgriff an dieser Stelle ein Teilergebnis aus den Experimenten der distalen TTX-Vergiftung hinzu, so wird die Schlußfolgerung, daß sich das System aktiver Fortleitung der Aktionspotentiale bedient, damit zusätzlich klar untermauert. Wird die aktive Fortleitung der Aktionspotentiale durch Besetzung der Natriumkanäle mit TTX unterbunden, so wird in den betroffenen Bereichen der Endarborisation die Amplitude der Aktionspotentiale geschwächt, während andere, noch unbetreffene Bereiche mit unverminderter Amplitude weiterspiken. Es zeigt sich sogar, daß ohne aktive Fortleitung nach vollständiger Vergiftung mit TTX überhaupt keine Aktionspotentiale im Ampullenlumen nachweisbar sind, während in geringer betroffenen Bereichen des Clusters weiterhin Aktionspotentiale mit wenig verminderter Amplitude abgeleitet werden können.

4.4 Kathodische Inhibition

Um weitere Aufschlüsse über die Vorgänge in der Endarborisation zu gewinnen, sind auch die Schritte der Informationsverarbeitung und Adaptation von besonderem Interesse, die in den Dendriten lokalisiert sind. Diese können einen komplementären Einblick in die prädigitalen Prozesse geben und damit auch in die Übertragung der postsynaptischen Potentiale. Ein besonders interessanter Fall von Adaptation tritt bei der »kathodischen Inhibition« des Systems durch starke Stimulusintensitäten auf, die u.a. nach Bretschneider *et al.* (1980) auf zwei Regulationsmechanismen beruht, einem präsynaptischen und einem postsynaptischen. Letzterer verspricht Einblick in die dendritischen Prozesse und interessante Aspekte für die Interpretation der TTX-Versuche.

Betrachtet man die Ergebnisse der kathodischen Inhibition, so fallen sofort Parallelen auf zu den Experimenten von Roth, der Utrechter Arbeitsgruppe um Peters und Bretschneider und anderen mit Calcium-freiem Medium (Roth 1971, Peters *et al.* 1975, Zhadan & Zhadan 1975, Bauswein 1977, Bretschneider *et al.* 1979, Bretschneider *et al.* 1980) und zur Entfernung der Sinneszellen (Roth 1973). All diesen Versuchen gemeinsam und sehr charakteristisch ist eine langanhaltende Phase, in der die Organe sehr gleichmäßig, jedoch mit einer gegenüber der regulären Spontanaktivität verringerten Frequenz spiken, aber keine (physiologische) Empfindlichkeit besitzen. Betrachtet man nun die Kette der Vorgänge, die vom elektrischen Stimulus zur Spikeantwort der afferenten Faser führen, so stellt sie sich kurz zusammengefaßt (nach Bennett 1971a,b, Szabo 1974, Bennett & Clusin 1979, Bretschneider *et al.* 1980, Teeter & Bennett 1981, Bennett & Obara

1986, Schäfer *et al.* 1990, Bretschneider *et al.* 1991, Teunis *et al.* 1991b, Bretschneider & Peters 1992, Heijmen & Peters 1995b, Andrianov 1996, Peters *et al.* 1997b u.a.) folgendermaßen dar (siehe Abb. 4.4.1, nächste Seite):

1. Einsetzen des (erregenden) anodischen Stimulus,
2. Hyperpolarisation der apikalen Sinneszellmembran,
3. Depolarisation der basalen Sinneszellmembran,
4. Calciumeinstrom durch spannungsgesteuerte Kanäle in der basalen Sinneszellmembran,
5. Transmitterexocytose in den synaptischen Spalt,
6. Öffnung unspezifischer Ionenkanäle auf der subsynaptischen Membran,
7. Daraus resultierend Nettoeinstrom positiver Ladungen (v.a. Natriumionen) durch die subsynaptische Membran (= subsynaptischer Strom); dieser erzeugt in der postsynaptischen Endigung das EPSP,
8. Ausbreitung des EPSP in den Dendriten bis zum Generationsort der Aktionspotentiale,
9. Erreichen der Schwelle am Impulsentstehungsort und Auslösung eines Aktionspotentials.

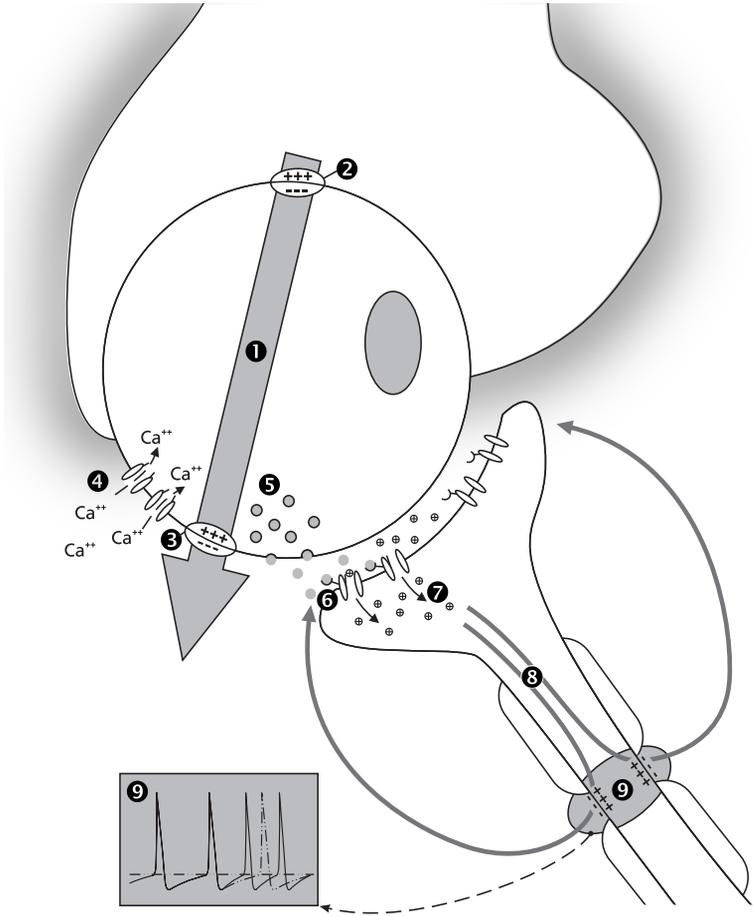


Abb. 4.4.1 Schematische Darstellung des Rezeptormechanismus. Die Zahlen beziehen sich auf die Beschreibung auf der vorangegangenen Seite.

In dieser Kausalkette sind prinzipiell mehrere Schritte denkbar, an denen (mehr oder weniger wahrscheinlich) Veränderungen angreifen könnten, während die anderen als (weitgehend) invariabel und non-adaptiv in diesem Zusammenhang zu betrachten sind. Die regulatorischen Schritte könnten sein:

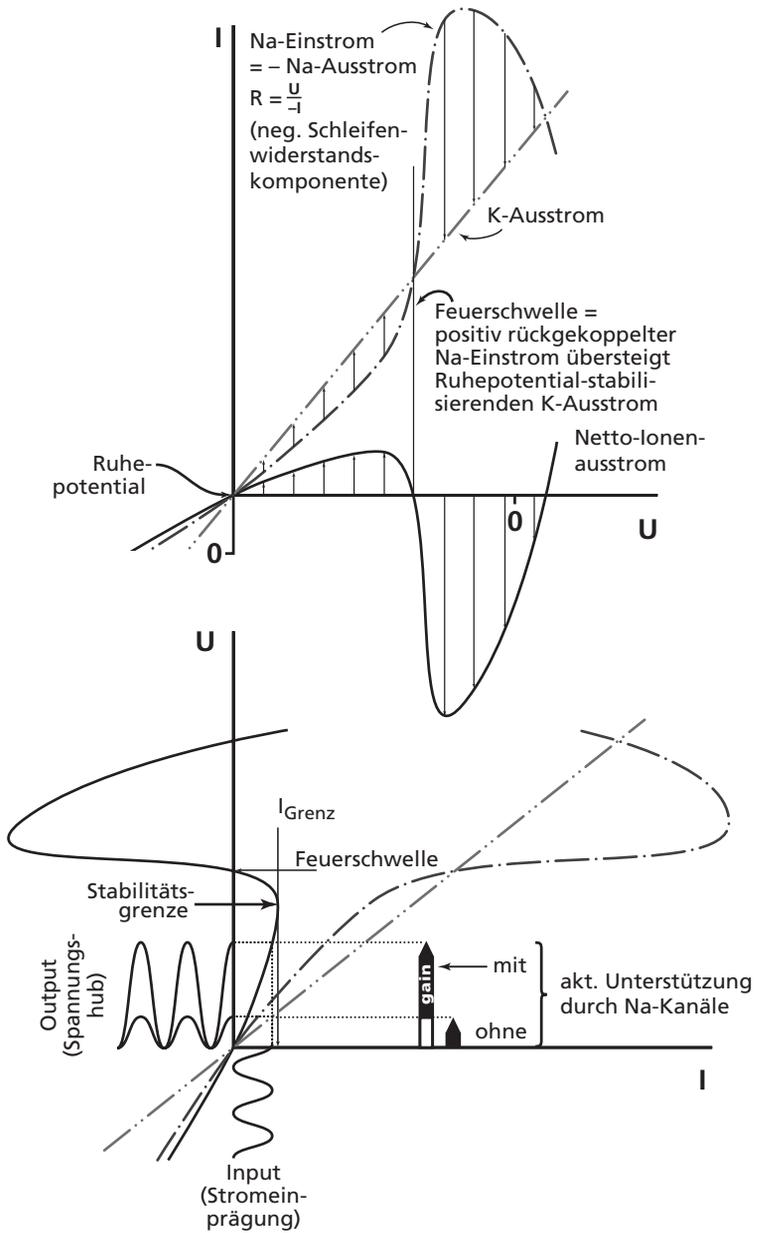
1. Membraneigenschaften der Sinneszelle (basal und/oder apical), die z.B. über Ionenkanäle in ihrer Leitfähigkeit beeinflusst werden könnten. Dies könnte sich gleichzeitig auf das intrazelluläre Potential der Sinneszelle auswirken, müßte aber nicht zwangsläufig mit diesem direkt gekoppelt sein. Damit würde sich der durch Änderung der Widerstandsverhältnisse über der basalen Sinneszellmembran abfallende Anteil der Reizspannung und evtl. durch Verschiebung der elektroosmotischen Konzentrationsverhältnisse der Potentialgradient über der basalen Sinneszellmembran als Steuergröße des basalen Calciumeinstroms verändern (bipolarer Einfluß auf Arbeitspunkt und evtl. Empfindlichkeit).
2. Ebenso den Potentialgradienten über der basalen Sinneszellmembran beeinflussen könnte das Hautpotential, das als adaptives Glied bei der zweiten Anpassungsphase der kathodischen Inhibition diskutiert wird (Roth 1971, Peters *et al.* 1975, Zhandan & Zhandan 1975, Bauswein 1977, Bretschneider *et al.* 1979) und zusammen mit dem Rezeptorpotential als seriengeschaltete galvanische Elemente den wirksamen Potentialgradienten der basalen Sinneszellmembran beeinflusst (bipolarer, evtl. nichtlinearer Einfluß auf Arbeitspunkt).
3. Der Calciumeinstrom durch die basale Sinneszellmembran bei gegebenem Potentialgradienten ist ebenso nicht zwangsläufig als invariabel zu betrachten, da auch hier z.B. über Kanalaktivierbar-

keiten und allosterische Prozesse eine Steuerung stattfinden könnte. (Einfluß auf Übertragungskennlinie).

4. Auch der »Füllungsgrad« des präsynaptischen Transmitterreservoirs könnte das Systemverhalten beeinflussen, und zwar sowohl über die Einführung bzw. Modulation einer sog. »bias«-Größe (bias = wörtl. Keil, lineare, additive Komponente, die einen Systemzustand nach oben bzw. unten verschiebt), die die Kennlinie anhebt oder absenkt, als auch über die Exozytosewahrscheinlichkeit und -menge oder Rückwirkungen auf den Transmitterresyntheseprozess, die die Kennlinie in ihrer Steilheit und Gestalt modifizieren (bipolarer, evtl. nichtlinearer Einfluß auf Arbeitspunkt und Empfindlichkeit).
5. Mittel- bis längerfristige Adaptationsmechanismen könnten auch an den transmittergesteuerten Ionenkanälen und deren Rezeptoren in der subsynaptischen Membran ansetzen (Penzlin 1980, Wirth & Gloxhuber 1981, Kandel *et al.* 1982, Forth *et al.* 1983, Schmidt 1987). (Abflachung der Übertragungskennlinie, Empfindlichkeitsreduktion).
6. Eine Beeinflussung der Übertragungseigenschaften für postsynaptische Potentiale; hierfür kämen prinzipiell alle Arten potential-regulierter Ionenkanäle (zusammen mit den homöostatischen Prozessen zur Stabilisierung des Intrazellulärpotentials) in Betracht. Sind dies v.a. Natriumkanäle (deren bedeutende Rolle am Fortleitungsprozeß später gezeigt werden wird; siehe Diskussion der TTX-Ergebnisse), die diese Aufgabe auch nach theoretischen Überlegungen wahrnehmen könnten, so wäre ihr Beitrag ein aktiver (Hodgkin & Huxley 1952a,b, Stafstrom *et al.* 1982, Jack *et al.* 1983, Gilly & Armstrong 1984, Llinas 1988, French *et al.* 1990,

Alzheimer *et al.* 1993, Brown *et al.* 1994, Stuart & Sakmann 1995, Schwindt *et al.* 1995, Taylor *et al.* 1995, Lipowsky *et al.* 1996, Mittmann *et al.* 1997, Lampl *et al.* 1998, Mickus *et al.* 1999a, Poznanski & Bell 2000a,b u.a.). Diese Kanäle besitzen eine positive Korrelation zwischen der Stärke der Depolarisation und der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit, die als Stromverstärker für kleine Signale dienen könnte; erst ab dem Erreichen der Feuerschwelle erreicht der »current-gain« Werte > 1 (der durch Öffnung eines Kanals zusätzlich hervorgerufene Einwärtsstrom führt in dem RC-System des wirksamen Neuritenabschnitts zu einem Spannungshub, der statistisch gesehen die Öffnung von mehr als einem Kanal hervorruft), was die bekannte explosionsartige Kettenreaktion auslöst und so den Hodgkin-Huxley-Zyklus startet. Im unterschweligen Bereich handelt es sich aus mathematischer Sicht um eine konvergente Reihe, die unter der Annahme eines konstanten Verstärkungsfaktors (»gains«) $g < 1$ einen Limes von $1 / (1 - g)$ besitzt; wird diese Grenze überschritten, setzt eine ungebremste Kettenreaktion ein (s.a. Taylor *et al.* 1995, Lipowsky *et al.* 1996, Poznanski & Bell 2000a,b; Modellgraphik siehe nächste Seite). Natriumkanäle zeigen jedoch auch Phänomene der Adaptation, Akkomodation, Verschiebung der Arbeitskurve und Inaktivierung, die als Regulativ u.a. stabilisierend und adaptiv in den Prozeß eingreifen könnten (bipolarer, evtl. nichtlinearer Einfluß auf Arbeitspunkt und Empfindlichkeit).

7. Durch dieselben Phänomene kann auch der Spike-Generator beeinflusst werden, da dieser von Natriumkanälen angetrieben wird (bipolarer, evtl. nichtlinearer Einfluß auf Arbeitspunkt und Empfindlichkeit).



◁ **Abb. 4.4.2** Schematische Darstellung eines möglichen Verstärkermechanismus auf der Basis der seit Hodgkin & Huxley (1952a–d) bekannten spannungsabhängigen Eigenschaften von Natrium- und Kaliumkanälen. Unterhalb einer gewissen Stabilitätsgrenze arbeitet das Kanalsystem stabil als analoger Stromverstärker. Weitere Diskussion im Text.

8. Verschiebung des intrazellulären Potentials am Ort des Impuls-generators durch Steuerung von anderen Ionenkanälen als Natriumkanälen oder Beeinflussung der Aktivität von Ionenpumpen (die Beeinflussung dendritischer Ionenkanäle fällt unter 6.). Hierdurch würden sich die Potentialverhältnisse am Impulsentstehungsort verschieben, was über verschiedene Mechanismen Einfluß auf Geschwindigkeit und Zeitpunkt des Erreichens der Auslöseschwelle für ein Aktionspotential besitzt (bipolarer, evtl. nichtlinearer Einfluß auf Arbeitspunkt und Empfindlichkeit).

Die Schritte 1 mit 4 wären in den Sinneszellen lokalisiert, 5 mit 8 in der Endarborisation. Die Faktoren 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 sind als empfindlichkeitssteigernde Adaptationsmechanismen denkbar, die u. a. auch die 2 Anpassungsstufen bei der Rückkehr von Aktivität und Empfindlichkeit nach kathodischer Inhibition vollziehen könnten (Punkt 5 ist eher als längerfristige empfindlichkeitsreduzierende Mechanismen bekannt). Jeweils in Klammern angegeben ist der wahrscheinliche Einfluß auf das System. Der erste Schritt, also die Wiederkehr einer gleichmäßigen Aktivität geringerer Frequenz im Vergleich zur Spontanaktivität des intakten Systems, vollzieht sich in ähnlicher Weise nach kathodischer Inhibition (Peters *et al.* 1975, insbes. Bretschneider *et al.*

1980), nach Applikation Calcium-freien Mediums (Roth 1971, Peters *et al.* 1975, Zhandan & Zhadan 1975, Bauswein 1977, Bretschneider *et al.* 1979 & 1980) wie auch nach Abtötung bzw. Entfernung der Sinneszellen (Roth 1973). Unterstellt man in allen drei Fällen, die sehr ähnliche Ergebnisse hervorbringen, denselben Mechanismus, so muß dieser zwangsläufig in der Endarborisation, also Schritt 6, 7 oder 8, lokalisiert sein. Eine Adaptation bei den Schritten 1 mit 5 kann unter dieser Voraussetzung eindeutig ausgeschlossen werden, wie auch z.B. die Ergebnisse der Arbeiten von Bretschneider *et al.* (1980) und Peters *et al.* (1988b & 1997a) nahelegen und spätere Experimente dieser Arbeit mit TTX-Vergiftung klar bestätigen.

Dies würde bedeuten, daß der erste Schritt der Adaptation in der Endarborisation stattfindet, indem dort eine Erregung generiert wird, obwohl kein Transmitterfluß auf die synaptische Endigung einwirkt, was auch in Einklang mit den Literaturergebnissen steht (*ibid.*). Nach distaler TTX-Gabe findet dieser Adaptationsschritt jedoch nicht statt und zwar fällt der Mechanismus – wie an entsprechender Stelle in den Ergebnissen der TTX-Versuche diskutiert – bereits in dem Maße aus, wie TTX in die Endarborisation eindiffundiert, zu einem Zeitpunkt, zu dem der Kanalblocker den Impulstehungsort noch nicht erreicht hat. Dies ist mit einer Adaptation in Schritt 7 oder 8 unvereinbar und spricht klar für einen Mechanismus, der auf der Funktion dendritischer Natriumkanäle basiert (die zweite denkbare Möglichkeit einer Adaptation am Impulstehungsort steht mit diesen TTX-Ergebnissen nicht im Einklang), und der auch mit bereits theoretisch bekannten Kanaleigenschaften gut in Einklang zu bringen wäre (Hodgkin & Huxley 1952a,b, Chandler & Meves 1970, Dubois & Bergman 1975, Soukimas & French 1980, Stafstrom *et al.* 1982, Jack *et al.* 1983, Gilly

& Armstrong 1984, Aldrich & Stevens 1987, Llinas 1988, Hounsgaard & Midtgaard 1989, French *et al.* 1990, Alzheimer *et al.* 1993, Brown *et al.* 1994, Stuart & Sakmann 1995a, Schwindt & Crill 1995, Taylor *et al.* 1995, Lipowsky *et al.* 1996, Mittmann *et al.* 1997, Lampl *et al.* 1998, Mickus *et al.* 1999a,b, Podznanski & Bell 2000a,b u.a.). Aufgrund dieser Eigenschaften sollte das Natriumkanal-System zu bipolarer Adaptation in der Lage sein, was sich auch in den Ergebnissen der Korrelationsversuche zwischen Interspike-Intervall und Spikeamplitude widerspiegelt, und einen physiologisch wichtigen stabilisierenden, selbstkalibrierenden Rückkopplungsmechanismus im dendritischen System einführen würde. Dieses Adaptationssystem könnte so auch als sog. »self-biasing-mechanism« eine mögliche Erklärung liefern für den von einigen Autoren (u.a. Peters & van Ieperen 1989, Teunis *et al.* 1990, Bretschneider & Peters 1992, Andrianov *et al.* 1996, Peters *et al.* 1997) theoretisch postulierten Adaptationsmechanismus zum Ausgleich der Spontanaktivität während des in der Ontogenese sich vollziehenden Aufbaus des elektrosensorischen Systems mit Vergrößerung des Sinneszellepithels und Zunahme der peripheren Konvergenz; die bei diesem Prozeß stets zu beobachtende (Peters & Mast 1983, van Dongen & Bretschneider 1984, Zakon 1984, Sanchez & Zakon 1987 & 1990, Peters & van Ieperen 1989a, Sanchez & Zakon 1990, Teunis *et al.* 1990b & 1991c, Bretschneider & Peters 1992, Andrianov *et al.* 1996, Peters *et al.* 1997a, eigene Beobachtungen) Neueinstellung des »Arbeitspunktes des Systems« könnte auf der Basis eines solchen adaptiven Prozesses, der entsprechend der Ergebnisse z.B. von Peters *et al.* (1988b & 1997a) im axodendritischen System der Afferenz lokalisiert ist, einfach realisiert werden. Durch einen solchen Mechanismus wäre, wie zuvor erläutert, ein Übertragungsglied innerhalb der Dendriten mit variablem

»Gain« und »Offset« (also mit adaptiver Übertragungsverstärkung und anpaßbarer bzw. autoregulativer Arbeitspunkteinstellung) integriert, das potentiell auch in der Lage wäre, die oft diskutierte fehlende Kopplung zwischen Empfindlichkeit und Spontanaktivität (Peters *et al.* 1975, Bretschneider *et al.* 1979 & 1980, Peters *et al.* 1988, Teunis *et al.* 1989, Bretschneider & Peters 1992, Peters *et al.* 1997a), sowie Widersprüche hinsichtlich der Systemadaptation und der Korrelation von Spontanaktivität und Signal-Rausch-Verhältnis (Nyquist-Kriterium) mit der Clustergröße bei zunehmender Konvergenz (Bretschneider *et al.* 1980, Peters *et al.* 1975, Peters & Mast 1983, Peters & van Ieperen 1989a, Teunis *et al.* 1990, Bretschneider *et al.* 1991, Peters *et al.* 1997a) zu erklären.

Betrachtet man die Versuchsergebnisse der kathodischen Inhibition, so geht unmittelbar nach Einsetzen des kathodischen Inhibitionsreizes die Spikeaktivität der afferenten Faser erwartungsgemäß auf Null zurück. Da die Sinneszellen während dieses extremen Inhibitionsstimulus zunächst zwangsläufig außerhalb ihres Arbeitsbereichs liegen, damit bei der Erregungsbildung ausgeschaltet sind und so auch die Transmitterausschüttung auf Null reduziert sein dürfte (Bretschneider *et al.* 1980), ist naturgemäß keine (physiologische) Empfindlichkeit vorhanden. Nach wenigen Sekunden kehrt die afferente Faser jedoch wieder zu einer regelmäßigen, im Vergleich zur Spontanaktivität verringerten Aktivität zurück, jedoch bei weiterhin völligem Fehlen jeder Empfindlichkeit. Dieser Übergang zur Phase II stellt damit einen ersten Adaptationsschritt des elektrosensorischen Systems dar, der nach Literaturmeinung (*ibid.*, auch: Peters *et al.* 1988b, Bretschneider & Peters 1992) im axodendritischen System der afferenten Faser lokalisiert ist und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der TTX-Expe-

rimente (primär und essentiell) auf einem Mechanismus der dendritischen Natriumkanäle basiert sein muß. Der sich dabei vollziehende Adaptationsschritt wird nach vorherrschender Meinung (Peters *et al.* 1975, Zhadan & Zhadan 1975, Bretschneider *et al.* 1979 & 1980, Peters *et al.* 1997) mit den Vorgängen der primären Inhibition des elektrosensitiven Systems durch Calcium-freies Umgebungsmedium verglichen, der nach Bretschneider *et al.* (1980) Parallelen zeigt zur Sinneszellentfernung (Roth 1973). Während dieser Phase kommt es damit – ohne Transmitterausschüttung und postsynaptisches Potential – durch Adaptation dendritischer Natriumkanäle evtl. im Zusammenwirken mit weiteren Faktoren über die Verschiebung des Arbeitspunktes zu einer Neueinstellung des intrazellulären Potentials, das dann den Spikegenerator treibt und so zu zyklischer Erregungsbildung in Abwesenheit jeglicher Empfindlichkeit führt. Nach einer gewissen Zeit geht das System über eine Restitutionsphase III innerhalb weniger Minuten wieder zu regulärer Aktivität über. Während dieser Phase III findet damit notwendigerweise ein Adaptationsschritt statt, der zwingend auf präsynaptischen Mechanismen beruht und nach Peters *et al.* (1975) und Bretschneider *et al.* (1979 & 1980) durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Potentialkomponenten entsteht; primär über die Regulation von Haut- und Rezeptorpotential werden die Rezeptorzellen langsam (typischerweise im Bereich von einigen Minuten bis Stunden) in ihren Arbeitsbereich zurückgebracht und somit ist wieder eine reguläre Funktion des elektrosensitiven Systems möglich. Hieraus folgt, daß zu Beginn der Phase III die Empfindlichkeit auf einen bipolaren Teststimulus anisotrop zurückkehrt und zunächst die Aktivität der afferenten Faser von der Plateauaktivität der Phase II ausgehend nur nach oben, kaum jedoch nach unten moduliert wer-

den kann (nach vollständiger Unterbindung der Transmitterausschüttung in Phase II kann diese (als nicht-negative Größe) zunächst nur nach oben und nicht nach unten moduliert werden). Nur in dem Maße, wie die spontane Transmitterausschüttung sich den Normalwerten nähert und das reguläre Spontanaktivitätsniveau wieder erreicht wird, wobei im Gegenzug das primäre Adaptationssystem auf der Basis dendritischer Natriumkanäle in gegenläufigem Maße zurückgeregelt wird (nach den experimentellen Ergebnissen ist es um mehr als eine Größenordnung schneller als die Restitution des Systems in Phase III und reagiert damit ohne erkennbare Zeitverzögerung), kehrt die vollständige Inhibierbarkeit des Systems – deutlich nach dessen Vollaktivierbarkeit – wieder zurück. Durch die Existenz dieser beiden Regelkreise auf Sinneszell- und neuronal-prädigitaler Ebene besitzt das elektrosensorische Analogsystem (mindestens) zwei negative (und damit systemregulierende und stabilisierende) Rückkopplungsmechanismen und ist damit zur Autoregulation und selbstständigen Einstellung und Stabilisierung seines Arbeitspunktes fähig; dies ist Voraussetzung, damit das System z.B. unter wechselnden Umweltbedingungen und bei der in der Ontogenese zunehmenden Konvergenz und Vergrößerung des Sinnesepithels stabil funktionieren kann (Goldmann 1953, Gerthsen *et al.* 1977, Hoppe *et al.* 1982, Peters & Mast 1983, van Dongen & Bretschneider 1984, Zakon 1984, Sanchez & Zakon 1987 & 1990, Peters & van Ieperen 1989, Sanchez & Zakon 1990, Teunis *et al.* 1990b & 1991c, Bretschneider & Peters 1992, Andrianov *et al.* 1996, Peters *et al.* 1997, eigene Beobachtungen).

Zusammenfassend kann man feststellen, daß während kathodischer Inhibition sich die Rückkehr des elektrosensorischen Systems zur Normalfunktion in (mindestens) zwei Adaptationsschritten voll-

zieht: einem ersten, schnellen, TTX-inhibierbaren Schritt, der essenziell auf der Adaptation der dendritischen Natriumkanäle beruht und eine konstante Basisaktivität der afferenten Faser ohne jede Empfindlichkeit der sich noch in vollständiger Inhibition befindlichen Rezeptorzellen einstellt, und einem zweiten, langsameren, der nach vorherrschender Meinung (Peters *et al.* 1975 & 1988 & 1997, Zhadan & Zhadan 1975, Bretschneider *et al.* 1979 & 1980) auf dem Zusammenspiel verschiedener Potentialkomponenten primär über die Regulation von Haut- und Rezeptorpotential beruht und die Rezeptorzellen so wieder in ihren Arbeitsbereich zurückbringt.

4.5 Korrelation zwischen Interspike-Intervall und Spikeamplitude

Aktionspotentiale folgen prinzipiell dem Alles-oder-Nichts-Prinzip; dies bedeutet, daß die Spikeamplitude nicht Trägerin systemrelevanter und -verwertbarer Information ist und gemeinhin als konstant betrachtet wird. Bei genauerer Beobachtung der Spikeamplitude *post stimulus* erkennt man jedoch bei der Ableitung der Aktionspotentiale der elektrosensorischen Afferenz einen eindeutigen, strengkorrelierten und stark ausgeprägten Zusammenhang zwischen Interspike-Intervall und Amplitude, der zunächst ungewöhnlich erscheint. Ein Einfluß der Spikefrequenz auf die ableitbare Amplitude im Experiment wäre nur denkbar, wenn die Aktivierbarkeit des schnellen Natrium-Systems sich ändert (relative Refraktärphänomene, potentialabhängige Inaktivierung des Natrium-Systems) oder wenn von Aktionspotentialen gleicher Höhe unterschiedliche Anteile den Ort der Ableitung erreichen. Damit kämen als Ursache dieses Phänomens drei mögliche Erklärungen in

Betracht: (1) die Amplitudendepression ist auf Prozesse der relativen Refraktärphase zurückzuführen und korreliert mit temporären, konformationskinetischen Phänomenen (Reinaktivierung der Kaliumkanäle und Übergang der Natriumkanäle in den aktivierbaren Zustand), (2) die Amplitudendepression ist ein potentialabhängiges Inaktivationsphänomen der Natriumkanäle, oder (3) die Amplitudendepression entsteht durch transmembranales »Shunting« (engl., hier: Ableiten über einen Nebenschlußwiderstand bzw. eine Parallelkapazität) durch die Leitfähigkeitserhöhung von Ionenkanälen. Letzteres wurde von Obara in seiner Arbeit (1976) postuliert, der dieses Phänomen an den Lorenzinischen Ampullen von *Plotosus* untersuchte. Er gelangt in dieser Arbeit zu der Schlußfolgerung, daß der poststimulative Amplitudenabfall durch ein transmembranales »Shunting« innerhalb der Dendriten verursacht wird. Dieses »Shunting« soll aus einer experimentell meßbaren Leitfähigkeitszunahme resultieren, die mit dem postsynaptischen Potential korreliert (Obara & Bennett 1972, Obara 1976). Diese das postsynaptische Potential generierende Leitfähigkeitszunahme müßte jedoch in erster Linie von der Öffnung unspezifischer subsynaptischer Ionenkanäle verursacht werden, die aufgrund der Gradientenverhältnisse v.a. Natriumionen einströmen lassen, sowie – zumindest nach den Ergebnissen dieser Arbeit bei *Schilbe mystis* – durch EPSP-induzierte Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle (evtl. zusätzlich auch Calciumkanäle, die bei *Schilbe mystis* offensichtlich keine prozeßrelevante Rolle spielen), die aufgrund ihrer bekannten Eigenschaften (Hodgkin & Huxley 1952a,b, Stafstrom *et al.* 1982, Jack *et al.* 1983, Gilly & Armstrong 1984, Llimas 1988, French *et al.* 1990, Alzheimer *et al.* 1993, Brown *et al.* 1994, Stuart & Sakmann 1995, Schwindt *et al.* 1995, Taylor *et al.* 1995, Lipowsky *et*

al. 1996, Mittmann *et al.* 1997, Lampl *et al.* 1998, Cash & Yuste 1998, Mickus *et al.* 1999, Poznanski & Bell 2000a,b) durch ihre potentialabhängig zunehmende Öffnungswahrscheinlichkeit die Natrium-Leitfähigkeit ansteigen lassen; eine Beteiligung anderer Arten von Kanälen (in prozeßbestimmendem Umfang) ist nicht anzunehmen. Die elektrochemischen Gradientenverhältnisse führen jedoch in jedem Fall bei Kanalaktivierung jeweils zu einem ausgeprägten Nettoeinstrom positiver Ladungsträger und werden dominiert durch Natriumionen, deren Reversionspotential über dem Spitzenwert des Aktionspotentials liegt (*ibid.*, Holde 1971, Hoppe *et al.* 1982, Schmidt 1987, Atkins 1989). Somit scheidet ein »Shunting« durch subsynaptische Ionenkanäle und Natriumkanäle als Ursache der Aktionspotential-Depression aus. Vielmehr ist anzunehmen, daß dieser Effekt aus dem Inaktivationsphänomen der Natriumkanäle herrührt. Die langsame, graduierte Verschiebung des Intrazellulärpotentials beeinflusst zwangsläufig die Aktivierbarkeit des Natrium-Systems und damit den Scheitelwert der Aktionspotentiale (die Aktivierung ist notwendige und hinreichende Bedingung für das Auftreten von Inaktivierung). Somit kann die Modulation der Aktionspotential-Amplitude in diesem Fall als Indikator für eine vorangegangene partielle Aktivierung der Natriumkanäle durch die Ausbreitung graduierter Potentiale in der Endarborisation angesehen werden – mit der zwangsläufigen Folge der Unterstützung der fortgeleiteten Analogsignale durch ihre Stromverstärkung. Das Eintreten einer vom externen Stimulus abhängigen Amplitudendepression der Aktionspotentiale durch Inaktivierung der Natriumkanäle wäre damit notwendige Folge der Ausbreitung postsynaptischer Potentiale von der Synapse zum Impulsentstehungs-ort in der gemeinsamen Afferenz in denselben Dendriten, die auch

von den Aktionspotentialen aktiv retrograd invadiert werden (Hodgkin & Huxley 1952a–d, Holden 1976, Jack *et al.* 1983, Llimas 1988, French *et al.* 1990, Alzheimer *et al.* 1993, Stuart & Sakmann 1995a, Taylor *et al.* 1995, Magee & Jahnston 1995c, Poznanski & Bell 2000a,b).

Die zweite Hypothese führt die Amplitudendepression auf temporäre, konformationskinetische Phänomene (Reinaktivierung der Kaliumkanäle und Übergang der Natriumkanäle in den aktivierbaren Zustand) in der relativen Refraktärphase zurück. Diese Erklärungsmöglichkeit erscheint bereits sehr unwahrscheinlich aufgrund der großen Zeitdimensionen, in denen dieses Phänomen abläuft, wie auch der fehlenden Bestätigung der zu erwartenden Temperaturabhängigkeit für diese auf Konformationsübergängen in den Kanalproteinen basierenden Prozesse. Weitere Gegenargumente liefern die fehlende Amplitudendepression trotz kurzer Interspike-Intervalle bei »burst«-Aktivität in der Aufwachphase nach MS-222 Betäubung (trotz unkalkulierbarer Beeinflussungen der Kanalsysteme durch das Anästheticum wäre eine Beschleunigung der Konformationsübergänge durch das Pharmakon als eher unwahrscheinlich zu betrachten) und die temporär versetzte Kopplung der beiden Parameter, die sich auch in den disjunkten Subpopulationen der poststimulatorischen Meßwerte im Korrelationsplot widerspiegelt.

Den direktesten Gegenbeweis liefern die Experimente mit evozierten Aktionspotentialen, wie sie im Abschnitt »Ergebnisse« beschrieben wurden. Hierbei zeigt sich, daß Spikes, die in kurzem Abstand zu einem vorangegangenen Aktionspotential evoziert werden, – im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorangegangenen Korrelationsexperimente – eine z.T. sogar geringfügig höhere Amplitude besitzen als ihre regulären Nachbarn. Diese Ergebnisse widerlegen klar die Refraktärhypothese

mit direkt zeitkorreliertem Wirkungszusammenhang zwischen beiden Parametern aufgrund temporärer, konformationskinetischer Phänomene, ist jedoch auf der Basis eines Wirkungszusammenhangs über die potentialabhängige und damit EPSP-korrelierte Inaktivierung der dendritischen Natriumkanäle leicht erklärlich; im Falle eines externen physiologischen Stimulus wird über die Erregung der Sinneszellen ein kräftiger subsynaptischer Strom mit gleichermaßen hohem Potentialanstieg ausgelöst, der eine entsprechend starke Inaktivierung der Natriumkanäle nach sich zieht; im Falle evozierter Aktionspotentiale ist das EPSP-korrelierte Dendritenpotential nach dem »Reset« und der Hyperpolarisation der Endarborisation aber noch kaum angestiegen, und damit die Aktivierbarkeitsrate der Natriumkanäle sehr hoch, was sich in einer gestiegenen Spikeamplitude widerspiegelt. In den TTX-Experimenten wird dieser potentialgesteuerte Inaktivierungsmechanismus über die stimulusabhängige und EPSP-induzierte Aktivierung der dendritischen Natriumkanäle, die sich durch Gabe des Kanalblockers unterdrücken läßt, eindeutig untermauert.

Somit ist dieses Inaktivierungsphänomen Ausdruck einer »längeranhaltenden«, also quasi-statischen Aktivierung der Natriumkanäle durch Potentialanstieg in den Dendriten (Hodgkin & Huxley 1952a–d, Holden 1976, Jack *et al.* 1983, Llimas 1988, French *et al.* 1990, Alzheimer *et al.* 1993, Stuart & Sakmann 1995a, Taylor *et al.* 1995, Magee & Jahnston 1995c, Johnston *et al.* 1996, Poznanski & Bell 2000a,b) und zeigt an, daß sich das analoge postsynaptische Potential durch die Dendriten ausbreitet und dabei auf seinem Weg Natriumkanäle aktiviert (Stafstrom *et al.* 1982 & 1984b & 1985, Huguenard *et al.* 1989, Coles & Schneider-Pickard 1989, Hirsch & Gilbert 1991, Vallet & Coles 1993a,b, Brown *et al.* 1994, Lipowski *et al.* 1996,

Johnston *et al.* 1996, Haag & Borst 1996, Cash & Yuste 1998, Andreasen & Lambert 1999, Poznanski & Bell 2000a,b). Dies hat zur zwangsläufigen Folge, daß Natriumionen in den Dendriten einströmen und dieser einwärtsgerichtete »Booster«-Strom unterstützt das postsynaptische Potential (über den Grad der Unterstützung kann man daraus freilich noch keine Rückschlüsse ziehen; dieser zeigt sich erst in den Experimenten mit distaler TTX-Applikation). Somit läßt eine Amplitudendepression, die auf Inaktivierung der Natriumkanäle beruht, Rückschlüsse zu über den Aktivierungszustand dieser Kanäle und damit auf einen aktivierungsbedingten aktiven Einwärtsstrom positiver Ionenladungen in den Dendriten und bestätigt so eine aktive Rolle der Natriumkanäle bei der EPSP-Fortleitung; diese EPSP-induzierte Aktivierung der Natriumkanäle stellt, wie Ergebnisse der TTX-Vergiftung zeigen werden, einen unverzichtbaren Mechanismus dar, der es den postsynaptischen Potentialen überhaupt erst gestattet, ihre Information dekrementarm, akkurat und präzise über die große Fortleitungsstrecke bis zum Impulsenstehungsort zu übertragen.

4.6 Progressive TTX-Vergiftung

4.6.1 Vorüberlegung

Grundsätzliche Vorüberlegungen und Berechnungen zu den Experimenten sind bereits im Kapitel »Ergebnisse« angeführt, da die theoretische Analyse Voraussetzung für das Verständnis der Experimente ist. Es konnte dort gezeigt werden, daß sich das präparativ nicht zugängliche System durch gerichtete Eindiffundierung eines Kanalblockers

von proximal resp. distal progressiv, reproduzierbar und in aus experimenteller Sicht sehr praktikablen Zeitdimensionen vergiften läßt (Versuchsdauern unter 2 min oder über 5 min dürften aus experimentell-technischer Sicht als wenig sinnvoll gelten, siehe auch Kap. »Material und Methoden«; aus diesen Zeitvorgaben ergibt sich eine optimale Diffusionsdistanz von ca. 1 mm; der Applikationsort liegt somit hinreichend dicht an den zu untersuchenden Strukturen ohne die Gefahr unerwünschter Irritationen des Untersuchungssystems), daß Störungen allenfalls durch kapilläre Strömungen zu erwarten sind und daß die resultierenden Ergebnisse charakteristische und interpretierbare Antworten zur Fragestellung der Funktion des dendritischen Systems liefern würden und damit wichtige Rückschlüsse auf die Prozesse in der Endarborisation ermöglichen. Folgt man den theoretischen Überlegungen zur Systemfunktion und interpretiert die Daten der ISI-Statistik, der Konvergenzversuche von Peters *et al.* (insbes. Peters & Mast 1983, Peters & van Ieperen 1989, Peters *et al.* 1997), so liefern diese sehr starke Hinweise auf einen singulären Impulsenstehungsort. Unter dieser Annahme sind jedoch die Ergebnisse der zuvor diskutierten Versuche (ISI-Statistik, Korrelation zwischen Interspike-Intervall und Aktionspotential-Amplitude) nur mit dem Postulat einer aktiven Invadierung der Endarborisation durch das Aktionspotential in Einklang zu bringen, da die Erregung dann in der gemeinsamen Afferenz entstehen, der ableitbare Spike jedoch nahe der synaptischen Endigung eines jeden Dendriten aktiv generiert werden müßte. Auch wäre dann ein aktiver Mechanismus für die Ausbreitung der postsynaptischen Potentiale über die große Dendritenentfernung zu postulieren, der in Kenntnis wichtiger Eigenschaften spannungsgesteuerter Natriumkanäle (s.o.) und in Einklang mit den Ergebnissen der Korrelations-

experimente zwischen Interspike-Intervall und Spikeamplitude nach eigener Vorstellung am ehesten durch einen Mechanismus auf der Basis spannungsgesteuerter Natriumkanäle bewerkstelligt werden könnte.

Damit lassen sich als zentrale Fragen bei der Funktion dieses Konvergenzsystems die Lage des Impulsenstehungsortes und daran gekoppelt die Ausbreitungsmechanismen der Aktionspotentiale und postsynaptischen Potentiale über die großen Dendritendistanzen formulieren. Alle drei Prozesse (EPSP-Fortleitung, Aktionspotentialgeneration und retrograde Ausbreitung der Aktionspotentiale) wären im Falle vorgenannter Hypothese zur aktiv unterstützten Fortleitung der postsynaptischen Potentiale an die Funktion der spannungsgesteuerten Natriumkanäle gekoppelt (im Falle der aktiven EPSP-Fortleitung ist dies natürlich bis zu diesem Punkt der Diskussion noch spekulativ, obwohl bereits starke Evidenzen für diese Hypothese in dieser Arbeit gewonnen werden konnten); dies war der Anlaß, TTX als klassischen, hochselektiven Natriumkanal-Blocker als erstes auf die Endarborisation dieses Untersuchungssystems anzuwenden.

TTX wirkt, wie allgemein bekannt (Moore & Narashi 1967, Narashi & Moore 1968, Ulbricht 1977, Alberts *et al.* 1983, Stryer 1996, Molecular Probes 1999) hochselektiv und bindet (unter normalen Versuchsbedingungen) nahezu irreversibel, stöchiometrisch und mit sehr hoher Affinität an die Kanäle des schnellen, spannungsaktivierbaren Natriumsystems (*ibid.*), das für den »Aufstrich« des Aktionspotentials, die Depolarisation, zuständig ist. Mit der Zahl der besetzten Ionenkanäle wird die Zahl aktivierbarer Kanäle reduziert, was eine entsprechende Auswirkung über die Verringerung des Depolarisationsstroms und darüber auch auf die Spike-Amplitude besitzt. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität unter normalen physiologischen Bedingungen ist

TTX damit geeignet, z.B. die Kanalzahl titrativ über die TTX-Menge zu bestimmen, die einen halbmaximalen Effekt erzielt. Durch diese hochselektive Wirkung dieses Blockers, der alle anderen Arten von Ionenkanälen und Poren unbeeinträchtigt läßt (*ibid.*), ist eine gezielte Untersuchung der Rolle dieser Natriumkanäle in analogen und digitalen Prozessen gewährleistet.

Folgende Ergebnisse sind für die verschiedenen Fälle denkbar:

- Impulststehungsort in gemeinsamer Afferenz: Im Falle der Cluster vom »Bäumchentyp« (für die Versuche wurden Cluster aus der basisnahen Reihe auf der Analflosse ausgewählt, die nach unserer morphologischen Kenntnis mit hoher Wahrscheinlichkeit diesem Clustertyp zuzuordnen sind, was nachträglich *post experimentum* für alle Versuche betätigt werden konnte) wird der Impulststehungsort bei *proximaler* TTX-Applikation zwangsläufig als erstes von der TTX-Front erreicht werden (läge ein Cluster vom »Sternotyp« mit einer Spike-Initiationsstelle im Zentrum des Clusters vor, so wäre, leicht nachvollziehbar, die Art und Abfolge der Systemveränderungen bei einem Cluster dieses Typs klar unterscheidbar eine andere; der Angriff des Kanalblockers auf den Impulststehungsort würde in diesem Fall bei proximaler und distaler Applikation in gleicher Weise erfolgen und in beiden Applikationssituationen symmetrische ununterscheidbare Ergebnisse liefern, die einen Angriff auf die Aktionspotential-Initiationsstelle und damit den Digitalisierungsprozesses zwischen der Beeinträchtigung der Analogvorgänge an applikationsortnaher und applikationsortferner Ampulle widerspiegeln würden). Das TTX kann am Spikegenerator vor und/oder nach der Digitalisierung der Rezeptorinformation Einfluß auf das System nehmen. Vor der Digitalisierung würde dabei zu einer Erhöhung der

Feuerschwelle für die Aktionspotential-Entstehung führen und damit das Interspike-Intervall kontinuierlich vergrößern (durch Reduktion der Dichte aktivierbarer Kanäle verschiebt sich die Schwelle für die Auslösung der »Kettenreaktion« zu höheren Depolarisationswerten (Lüscher & Shiner 1990a,b, Amitai *et al.* 1993, Mainen *et al.* 1995, Rapp *et al.* 1996, Stuart *et al.* 1997a), **nach** der Digitalisierung entspräche einem Einfluß auf bereits gebildete oder zumindest initiierte Aktionspotentiale und könnte dabei eine Auswirkung auf den Scheitelwert des Aktionspotentiale (unterschreitet er einen kritischen Wert, könnte davon die Ausbreitung der Erregung betroffen sein), auf das vollständige Ablaufen des Hodgkin-Huxley-Zyklus, auf die Ausbildung lediglich einer Art von lokaler Erregung, auf die Ausbreitung des Aktionspotentials z.B. durch Abbruch der Erregungsfortleitung an Ramifikationspunkten (Grossmann 1979, Parnas & Segev 1979, Stockbridge 1989, Lüscher & Shiner 1990a,b, Krauthamer 1990, Korogod 1990, Fromherz & Vetter 1991, Fromherz & Gaede 1993, Migliore 1996, Baccus 1998, Goldfinger 2000) bis hin zur vollständigen Auslöschung eines bereits gebildeten Aktionspotentials bedeuten; diese Phänomene erlangen für das System erst Bedeutung und manifestieren sich, indem sie mit einer Störung des Spikerhythmus oder der antero- bzw. retrograden Fortleitung einhergehen. Welches System am stärksten von der TTX-Wirkung betroffen ist, läßt sich dabei a priori nicht vorhersagen. U.U. könnten die proximalen Ampullen mit geringem zeitlichen Versatz von der TTX-Front erreicht und die Aktionspotentiale in ihrer Amplitude erkennbar verringert werden. Diese Wirkungen müssen auftreten, bevor eine Auswirkung auf die Aktionspotential-Amplituden der distalen Organe oder ein Zusammenbruch der Empfindlichkeit er-

kennbar wird. Weiterhin wird charakteristisch sein, daß der Ausfall von Spikes an einem singulären Impulsenstehungsort im gesamten Cluster an allen Ableitstellen synchron auftritt und nachgewiesen werden kann (bei mehreren Impulsenstehungsorten, die in verschiedenen Dendritenästen lokalisiert sind, könnten diese natürlich niemals gleichzeitig ausfallen). Bei *distaler* TTX-Applikation müßte die aktive Komponente der EPSP-Fortleitung zunehmend unterdrückt werden, was eine kontinuierliche, zuletzt drastische Zunahme des Interspike-Intervalls nach sich zöge; der Impulsenstehungsort dürfte erst als letztes von der TTX-Vergiftung betroffen sein, d.h. das gesamte System müßte bereits in höchstem Maße vergiftet sein, an den distalen Ampullen wäre bereits längst keine Ableitung von Aktionspotentialen mehr möglich, da die retrograde Invasion unterbunden ist, bevor eine Auswirkung auf das Digitalsystem des Impulsenstehungsort durch Spikerhythmus-Unregelmäßigkeiten erkennbar werden dürfte (wahrscheinlich wäre bereits das gesamte System zuvor funktionsunfähig). Dieser Fall sei nachfolgend als **HYPOTHESE A** bezeichnet.

- Im Unterschied dazu würde ein System mit je einem synapsennahen Impulsenstehungsort in jedem Dendriten zunächst von *proximal* appliziertem TTX nicht beeinflußt werden; die Auswirkungen wären erst zu beobachten, wenn die Diffusionsfront die Region der jeweilig abgeleiteten Organe erreicht und dort die Prozesse in zuvor beschriebener Weise stört. Proximal gelegene Organe würden früher erreicht werden als distale und deshalb früher einen Effekt auf die Spikeamplitude zeigen (sie ist als analoger Parameter naturgemäß anfälliger und sofort erkennbar graduell von Störungen betroffen, während digitale Prozesse ein gewisses Maß an Störsicherheit auf-

weisen und bis zum Erreichen einer kritischen Größe keinen Einfluß der Störung erkennen lassen); kurz darauf könnte ggf. das Digital-system der Spikegeneration von der Vergiftung betroffen sein. Ebenso müßte frühzeitig erkennbar das in diesem Fall obligat zu postulierende (wegen der Ergebnisse aus ISI-Statistik und Spike-Amplitudenvergleich mittels Doppelableitung) Kopplungssystem zwischen den einzelnen Impulsentstehungsorten betroffen sein, da die Ausbreitung der Aktionspotentiale über den basalen Ramifikationspunkt am Beginn des gemeinsamen Axons in seiner Funktion von den TTX-Molekülen beeinträchtigt wäre. Ein distales Subsystem noch unbeeinflusster Organe würde noch eine gewisse Zeit lang nach Vergiftung der proximalen Organe seine weitgehend regelmäßige Funktion beibehalten, wobei es fortschreitend zu einer Entkopplung der Impulsentstehungsorte kommen müßte. Infolge dessen sollten bei partieller Vergiftung des Clusters zwangsläufig Zustände entkoppelter Subsysteme mit unterschiedlichen Spikerhythmen nachweisbar sein; eine kontinuierliche und homogene Vergrößerung des Interspike-Intervall über die gesamte Clusterausdehnung hinweg könnte unter diesen Annahmen bei *distaler* TTX-Applikation niemals zustandekommen. Vielmehr würde es in Ästen mit »extern getriebenem Impulsentstehungsort« mit einsetzender Entkopplung zwangsläufig zu irregulären, nicht-linearen, sprunghaften Veränderungen in Spontanfrequenz und Empfindlichkeit kommen. Dieser Fall sei in der Folge als **HYPOTHESE B** bezeichnet.

- Ein Impulsentstehungsort, der zwischen diesen logischen Extrempositionen mitten in der Dendritenerstreckung liegt, ist kaum wahrscheinlich und physiologisch wenig sinnvoll; für ihn würden entsprechende Überlegungen gelten (der Zeitpunkt der TTX-Wirkung

läge zwischen denen der beiden vorgenannten Fälle, die Entkoppelungsphänomene der einzelnen Impulsentstehungsorte müßten jedoch in ähnlicher Weise auftreten). Da dieser Fall als nicht wahrscheinlich zu betrachten ist, und durch die Ergebnisse widerlegt wird, sei er hier nicht in allen Einzelheiten diskutiert.

- Mit aktiver retrograder Fortleitung der Aktionspotentiale ist nur bei Hypothese A zu rechnen; hier würde das System im Falle distaler TTX-Applikation eine TTX-abhängige Reduktion der Spikeamplitude bis auf Werte nahe Null zeigen (dies wäre im Fall der Hypothese B nicht möglich, da hier der Spikegenerator und nicht die Aktionspotentialfortleitung betroffen wäre), die zunächst an den distalen Ampullen einsetzt. Diese Amplitudenreduktion an den distalen Ampullen muß den ersten, deutlich erkennbaren Effekt vor einer erkennbaren Verminderung der Spontanfrequenz oder Empfindlichkeit darstellen; ein irreguläres Spikerhythmusgeschehen darf es dabei bis zur nahezu vollständigen Vergiftung des gesamten Dendritenbaums nicht geben.
- Ebenso ist nur unter Hypothese A aktive EPSP-Fortleitung anzunehmen (bis zum diesem Stand der Diskussion zunächst noch hypothetisch-postulativ). Wenn dieser Prozeß aktiv funktioniert und auf der Basis spannungsgesteuerter Natriumkanäle arbeitet, dann wird eine TTX-Vergiftung des Systems auch hier eine charakteristische Wirkung hervorrufen. Betrachtet man den gesamten Rezeptormechanismus, wie er nach vorherrschender Meinung nach den Ergebnissen u.a. von Bennett, Obara, Peters, Bretschneider *et al.* beschrieben wird (Bennett 1971a,b, Szabo 1974, Bennett & Clusin 1979, Bretschneider *et al.* 1980, Teeter & Bennett 1981, Bennett & Obara 1986, Schäfer *et al.* 1990, Bretschneider *et al.* 1990, Teunis *et*

al. 1991b, Bretschneider & Peters 1992, Heijmen & Peters 1995b, Andrianov 1996, Peters *et al.* 1997b u.a.), so kann TTX nur an Natriumkanälen der Dendriten und Axone der afferenten Fasern angreifen. Weder der Transduktionsprozeß der Sinneszelle (Zipser & Bennett 1973, Akutsu & Obara 1974, Umekita *et al.* 1975, Obara & Sugawara 1979, Bennett 1986, Bretschneider & Peters 1992), noch Transmitterausschüttung, Prozesse an der subsynaptischen Membran, subsynaptischer Strom – an den unspezifischen Ionenkanälen der subsynaptischen Membran kann TTX nicht angreifen (Narahashi *et al.* 1966, Ulbricht 1979, Stryer 1996) – und das daraus resultierende, subsynaptisch generierte postsynaptische Potential werden von TTX beeinflusst. Dagegen kann TTX an den Natriumkanälen der Dendriten *und* des Axons angreifen (hierbei interessieren nur Einflüsse bis zur Generierung eines Aktionspotentials am Impulsentstehungsort, da Auswirkungen auf das Digitalsystem eine andere, klar unterscheidbare Art von Veränderungen hervorbringen) und eine hypothetische aktive Fortleitung der postsynaptischen Potentiale unterdrücken und später auch ggf. die Schwelle am Impulsentstehungsort erhöhen. Beides würde zu einer kontinuierlichen Verringerung der Frequenz bzw. Vergrößerung des Interspike-Intervalls führen. Der Angriffsort, ob Hemmung der EPSP-Fortleitung in den Dendriten oder Erhöhung der Feuerschwelle am Impulsentstehungsort, kann zunächst am Ergebnis nicht entschieden werden; eine kausale Zuordnung der zunehmenden Frequenzverminderung durch TTX-Vergiftung mit der Unterdrückung der aktiven EPSP-Fortleitung kann jedoch vorgenommen werden, sofern als Ursache dieses Effekts die Schwellenerhöhung am Impulsentstehungsort ausgeschlossen werden kann (s.u.).

- Auch der Parameter Empfindlichkeit würde sich unter den beiden Hypothesen charakteristisch unterscheiden: Im Falle der Hypothese A wird hier bei distaler TTX-Applikation die aktive, Natriumkanalgestützte Fortleitung graduerter Signale mit fortschreitender Ausbreitung des Kanalblockers in zunehmendem Maße beeinträchtigt; weshalb eine kontinuierliche graduelle Absenkung der Amplitude des Analogsignals und damit auch des Generatorpotentials resultieren wird und folglich eine Vergrößerung des Interspike-Intervalls eintritt. Dieser Effekt wird sich in annähernd gleicher Weise auf die relative Absenkung der spontanen wie auch der reizinduzierten Frequenz bemerkbar machen und beide in ähnlicher Größenordnung absenken. Bei proximaler TTX-Verabreichung wird primär der Impulstehungsort davon betroffen sein; die Ausbreitung des Kanalblockers wird große Teile der Endarborisation während der Versuchsdauer nicht erreichen und so den »Stromverstärkermechanismus« dort nicht beeinträchtigen (doppelte Diffusionsstrecke = vierfache Diffusionszeit = Achtel der TTX-Konzentration!); damit wird nach wie vor die Ausbreitung der synaptisch übertragenen sensorischen Information weitgehend intakt bleiben und ein reizkonformes Generatorpotential ausbilden. Hier würde jedoch der Impulstehungsort durch Blockierung seiner Natriumkanäle beeinträchtigt werden. Dies kann sich prädigital in einer Anhebung der Auslöseschwelle für die Aktionspotential-Bildung oder nach Auslösen des Hodgkin-Huxley-Zyklus über verschiedene Mechanismen in einem Ausfall bereits gebildeter oder zumindest initiiertes Spikes oder dem Abbruch der Erregungsfortleitung äußern (s.u.). Dadurch wird im Falle prädigitalen Angriffs des Kanalblockers das Interspike-Intervall sich kontinuierlich vergrößern bzw. nach der

Digitalisierung durch Spikeausfall (»Stottern«) bemerkbar machen; durch beide Phänomene kommt es zum Abfall der Spikerate. Diese beginnende Beeinträchtigung des Digitalsystems wird eine gewisse Zeit lang durch Stimulation des Systems kompensiert werden können, und zwar durch den dann deutlich höheren subsynaptischen Strom und den daraus resultierenden steileren Anstieg des Generatorpotentials; durch eine Art Facilitationseffekt, der von dem höheren Generatorpotential, und einem verminderten Inaktivations-effekt, der von der höheren Depolarisationsgeschwindigkeit ausgeht, könnte so trotz der Beeinträchtigung des Digitalsystems eine fortpflanzungsfähige Erregung ausgebildet werden, die ohne Stimulation die kritische Stärke möglicherweise nicht erreicht hätte. Dadurch wird das bereits irregulär und mit stark verminderter Frequenz spikende System für eine gewisse Zeitspanne durch Stimulation noch zu regelmäßiger und nur wenig beeinträchtigter Aktivität angeregt werden können. D.h. bei distaler TTX-Applikation werden spontane und reizinduzierte Aktivität drastisch und in ähnlichem Maße sinken, während bei proximaler TTX-Gabe die Spontanfrequenz ebenso drastisch fällt und das System stottert, während poststimulatorisch die Systemantwort eine gewisse Zeit lang nur wenig durch den Kanalblocker beeinflusst sein wird.

- Unter Hypothese B hingegen könnte von der distalen TTX-Vergiftung kein Analogsignal betroffen sein. In diesem Falle würde der Kanalblocker ausschließlich an den Impulsenstehungsorten der jeweiligen Dendritenäste angreifen, die zu diesem Zeitpunkt bereits von der TTX-»Wolke« erfaßt wurden. Da die gesamte Endarborisation im Falle dieser Hypothese vom »fittesten« Organ gesteuert und erregt würde (Teunis *et al.* 1990), würde eine Reduzierung der Emp-

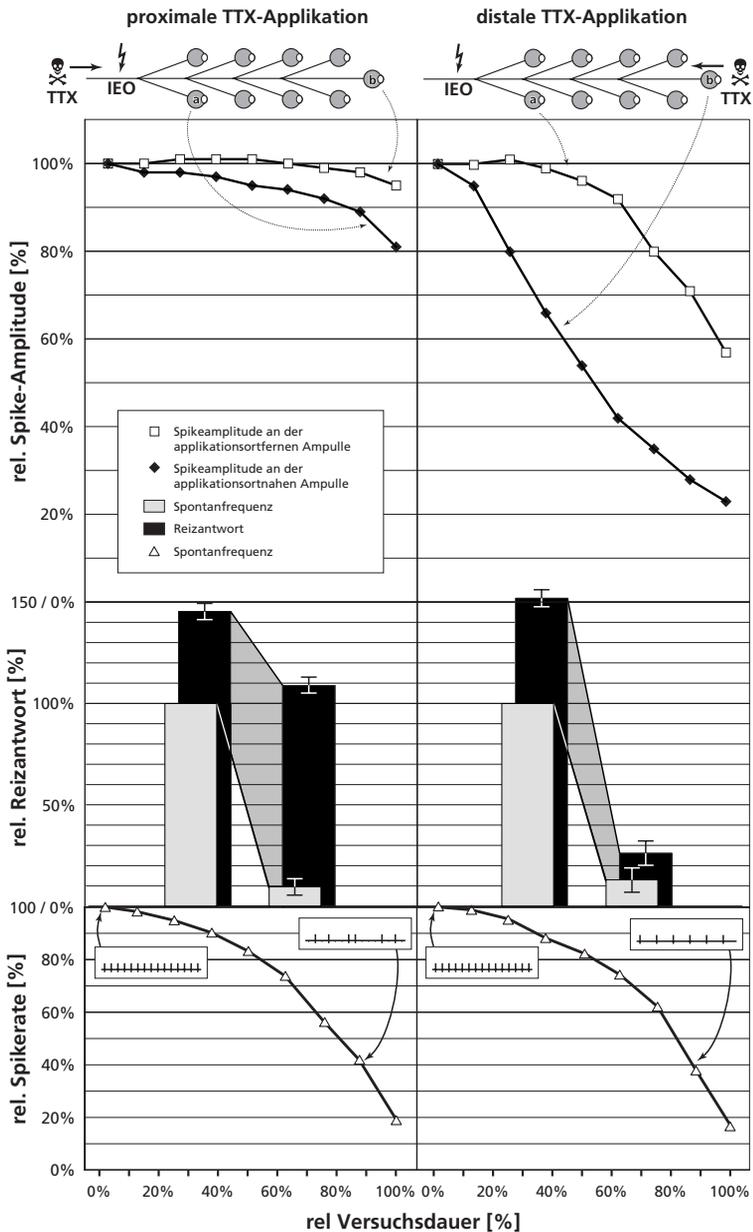
findlichkeit des Gesamtclusters erst durch Anhebung der Spikeauslöseschwelle an diesem »empfindlichsten« Impulsentstehungsort des »fittesten« Organs eintreten; je nach Lage dieses Organs im Gesamtcluster ist dieser Effekt früher oder später zu erwarten. Wird dieses Organ bereits frühzeitig von der TTX-Front erfaßt und verliert seine Empfindlichkeit, dann wird ein anderes Organ mit der dann höchsten Empfindlichkeit die Rolle des Rhythmusgebers im Cluster übernehmen. Während dieser Übergangsphase kommt es möglicherweise zu ersten Fluktuationen und Irregularitäten im Interspike-Intervall. Liegt das empfindlichste Organ dagegen vom TTX-Applikationsort aus betrachtet in diametral entgegengesetzter Position im Cluster, so wird das empfindlichkeitsbestimmende Organ erst sehr spät von der Kanalblockierung betroffen sein und seine Empfindlichkeit einbüßen. In dem Maße, wie Fortleitungsstrecken und Verzweigungspunkte im Dendritenbaum betroffen sind und die Erregungsausbreitung dort gestört ist, wird es zur Entkopplung der betroffenen Clusterbereiche mit charakteristischen Folgeerscheinungen kommen.

4.6.2 Proximale TTX-Applikation

Die Abnahme der Aktionspotential-Amplitude zeigte in allen Experimenten in Abhängigkeit des TTX-Applikationsorts ein charakteristisches Verhalten. Vor Beginn der Messung sind Spikes regelmäßiger Frequenz mit einer einheitlichen Amplitude an allen Ampullen eines Clusters abgreifbar. Bereits das hohe Maß an Regelmäßigkeit, das sich in dem ISI-Häufigkeitsverteilungshistogramm manifestiert, liefert starke Hinweise auf nur einen Spikeentstehungsort in der gemeinsamen Afferenz. Diese Schlußfolgerung wird durch die Ergebnisse der proxi-

malen TTX-Applikationen erhärtet, und zwar durch folgende Befunde: (1) Spikes treten immer synchron an allen Ampullen auf; nicht ein einziges Aktionspotential konnte jemals im Verlauf fortschreitender Vergiftung gefunden werden, das nur auf einer Ampulle ableitbar war, während es auf einer anderen Ampulle ausfiel. (2) Der Zusammenbruch der Spikeaktivität findet ebenfalls gleichzeitig im gesamten Cluster statt. (3) Proximale TTX-Applikation ist stets durch das Auftreten »stotternder« – also durch irregulären Ausfall von Spikeereignissen gekennzeichnet – Aktivität charakterisiert. Zu diesem frühen Zeitpunkt, zu dem nur der Impulsentstehungsort und evtl. der proximalste Clusterrand betroffen ist, findet ein Angriff auf das Digitalsystem statt, lange bevor eine Amplitudenabsenkung an den proximalen Organen nachweisbar ist, die als analoger Parameter unmittelbar in dem Maße sichtbar wird, in dem eine Blockierung von Kanälen stattfindet (doppelte Diffusionsstrecke = vierfache Diffusionszeit = Achtel der TTX-Konzentration! Deshalb bleibt die TTX-Wirkung während des Versuchs auf einen Teil des Clusters beschränkt). Deshalb wäre (4) eine Beeinträchtigung der digitalen Prozesse synapsennah gelegener Impulsentstehungsorte keinesfalls möglich. (5) Dieses Stottern tritt im gesamten Cluster absolut ereignissynchron auf – nie wurde eine sonst unvermeidlich eintretende Entkopplung dendritischer Spikezentren beobachtet. (6) Das ISI-Verteilungshistogramm zeigt klar einen Angriff auf das Digitalsystem eines singulären Impulsentstehungsortes. (7) Im Falle distaler TTX-Anwendung wurde in keinem Versuch auch nur eine einzige Irregularität im Spikezyklus beobachtet, die dann unvermeidlich auftreten

Abb. 4.6.1 Übersichtgraphik der Veränderungen durch proximal bzw. distal in das Cluster eindiffundierendes TTX. ▷



müßte, wenn die Impulsenstehungsorte synapsennah gelegen wären. All diese Ergebnisse sind nur mit einem einzelnen Impulsenstehungsort im Axonstamm der gemeinsamen Afferenz in Einklang zu bringen.

Insgesamt tritt bis gegen Ende der gesamten Versuchsdauer kein signifikanter Amplitudenrückgang und kein signifikanter Unterschied zwischen Spikeamplituden auf beiden Ampullen auf. Die Wirkung des TTX bleibt somit weitgehend auf den Impulsenstehungsort beschränkt und äußert sich dort in charakteristischer Weise in einer mit dem Ausfall einzelner Spikeereignisse, später im Versuchsverlauf auch ganzer Spikegruppen, einhergehenden Verminderung der Spikerate; der Einfluß auf das Grundintervall des Interspike-Intervalls bleibt jedoch gering. Bei dieser Applikationssituation findet folglich weit überwiegend ein charakteristischer Angriff auf das Digitalsystem der Spikeerzeugung im Axonstamm (oder die Fortleitung der Aktionspotentiale) am oder nahe bei dem Impulsenstehungsort statt. Ein Angriff auf die Impulsfortleitung an Ramifikationspunkten ist wenig wahrscheinlich, da es dann mit fortschreitender Vergiftung zur Fortleitung der Erregung auf nur einem der beiden Äste der Dichotomie kommen könnte, während sie im anderen Ast abbricht (Grossmann 1979, Parnas & Segev 1979, Stockbridge 1989, Lüscher & Shiner 1990a,b, Krauthamer 1990, Korogod 1990, Fromherz & Vetter 1991, Fromherz & Gaede 1993, Migliore 1996, Baccus 1998, Goldfinger 2000), und so Spikes nur zu einem Teil der Ampullen aktiv fortgeleitet würden. Dies konnte jedoch während der gesamten Experimente nicht ein einziges Mal beobachtet werden.

4.6.3 Distale TTX-Applikation

Der Startpunkt der Messung entspricht dem der proximalen TTX-Experimente. Bereits nach rund 10% der Versuchsdauer beginnt jedoch ein drastischer Abfall der Spikeamplitude auf der dem Applikationsort näher gelegenen distalen Ampulle, der gegen Ende der Messung im statistischen Mittel 80% erreicht, bei einigen Experimenten fallen die Aktionspotentiale sogar unter die Nachweisgrenze und verschwinden im Rauschen. Nach 75% der Versuchsdauer erreicht der Amplitudenwert mit 34% der Ausgangsamplitude weniger als die Hälfte des Wertes der zu diesem Zeitpunkt noch in geringerem Umfang von den Kanalblockern betroffenen proximalen Ampulle, deren Amplitude zu diesem Zeitpunkt noch 72% des Ursprungswertes beträgt. Damit sind die Kurvenverläufe an beiden Ableitorten hochsignifikant unterschiedlich (auf 6σ !). Grad und Kinetik der Amplitudenabsenkung korrelieren gut und bestätigen den Wirkungszusammenhang mit der TTX-Vergiftung. Diese Ergebnisse belegen – in Verbindung mit dem Befund zur Lage der Spike-Initiationsstelle im Axonstamm der gemeinsamen Afferenz – eindeutig, daß (1) eine aktive retrograde Invadierung der Endarborisation durch die Aktionspotentiale stattfindet, deren Spikeamplitude in Abhängigkeit vom Kanalbesetzungsgrad der jeweiligen Partie der Endarborisation durch Verringerung des Depolarisationsstroms absinkt, (2) daß ohne retrograde Invasion keine meßbaren Spikes das Ampullenlumen erreichen, (3) daß der ableitbare Spike synapsennah im jeweiligen Ast der Arborisation gebildet wird, der das jeweilige abgeleitete Organ versorgt, wohin er durch aktive Erregungsleitung vom Impulsentstehungsort im Axonstamm der gemeinsamen Afferenz über die Dendriten bis nahe den synaptischen Endigungen fortgeleitet wurde.

Arhythmien – gleich welcher Art – wurden bei distaler TTX-Applikation niemals beobachtet; das Spikemuster bleibt bis zum Ende der Messung, das durch das vollständige Ausfallen der Erregungsbildung im gesamten System gekennzeichnet ist, in höchstem Maße regelmäßig. Die Spikerate fällt jedoch auch hier, und zwar durch kontinuierliche Vergrößerung des Interspike-Intervalls. Das zeigt klar, daß mehr Zeit bis zur Auslösung des jeweils nächsten Spikes am Impulsentstehungsort vergeht und damit, daß dort der Anstieg des Generatorpotentials langsamer verläuft; dies kann – wie zuvor dargelegt – auf der Basis des bekannten Rezeptormechanismus allein durch eine Beeinträchtigung der Fortleitung des postsynaptischen Potentials zum Impulsentstehungsort durch TTX-Wirkung gedeutet werden (der TTX-Angriff erfolgt eindeutig auf die Fortleitung der analogen postsynaptischen Potentiale in den Dendriten nach der Bildung des subsynaptischen Stroms und vor Erreichen des Impulsentstehungsortes; der Impulsentstehungsort könnte nach Kenntnis der TTX-Ausbreitung allenfalls zum Ende der Meßperiode und auch dann nur in geringem Ausmaß von TTX-Molekülen erreicht werden, jedoch noch nicht zum Zeitpunkt des Wirkungseintritts, da die TTX-Front erst viel später die näher am Impulsentstehungsort gelegene Ampulle passiert (siehe Amplitudenverlauf an der Impulsentstehungsort-näheren Ampulle) und deutlich nach diesem Zeitpunkt den Impulsentstehungsort (der zudem eine höhere TTX-Toleranz besitzt) in geringer Konzentration erreichen könnte; bei proximaler TTX-Anwendung mit weit stärkerem TTX-Angriff auf die Analogprozesse des Impulsentstehungsortes bleibt der Einfluß auf das Interspike-Intervall-Grundintervall selbst nach massiver Störung des Digitalsystems relativ gering; somit kann als Ursache der Interspike-Intervall-Vergrößerung ein TTX-Effekt am

Impulsentstehungsort eindeutig ausgeschlossen und der Effekt auf TTX-Blockierung dendritischer Natriumkanäle zurückgeführt werden). Da die Blockierung dendritischer Natriumkanäle zu einer Dämpfung der Ausbreitung der synaptischen Information führt, muß hieraus zwangsläufig gefolgert werden, daß die Fortleitung der postsynaptischen Potentiale durch aktive Mechanismen zumindest unter Beteiligung spannungsgesteuerter Natriumkanäle als deren entscheidende und unverzichtbare Voraussetzung erfolgt.

Ein Angriff auf den Aktionspotential-Generationsmechanismus als Ursache der Vergrößerung des Interspike-Intervalls kann somit nach den vorangegangenen Ausführungen durch diese Experimentalergebnisse eindeutig ausgeschlossen werden. Bereits die Resultate der Korrelationsversuche zwischen Interspike-Intervall und Spikeamplitude zeigen, daß die bei steigender Spikefrequenz auftretende Amplitudendepression die Folge von Inaktivationsphänomenen der terminalen dendritischen Natriumkanäle darstellt, die – wie dort bereits beschrieben – nach allgemeiner Vorstellung (Hodgkin & Huxley 1952a–d, Holden 1976, Jack *et al.* 1983, Llinas 1988, French *et al.* 1990, Alzheimer *et al.* 1993, Stuart & Sakmann 1995a, Taylor *et al.* 1995, Magee & Johnston 1995c, Johnston *et al.* 1996, Poznanski & Bell 2000a,b) eine vorangegangene quasistatische Aktivierung dieser Kanäle voraussetzt (entsprechend des Konformationszyklus: aktivierbar geschlossen → aktiviert offen → nicht-aktivierbar geschlossen), was bereits Rückschlüsse auf eine Natriumkanal-basierte Verstärkung der postsynaptischen Potentiale erlaubt (Stafstrom *et al.* 1982 & 1984b & 1985, Huguenard *et al.* 1989, Coles & Schneider-Picard 1989, Hirsch & Gilbert 1991, Vallet & Coles 1993a,b, Brown *et al.* 1994, Lipowsky *et al.* 1996, Johnston *et al.* 1996, Haag & Borst 1998, Cash & Yuste 1998, Andreasen & Lambert

1999, Poznanski & Bell 2000a,b). Auch korreliert diese Verstärkung mit dem ersten Adaptationsschritt nach kathodischer Inhibition, der nach Interpretation der Ergebnisse, in Übereinstimmung mit der Literaturmeinung, einen dendritischen Mechanismus darstellt und keinesfalls auf einem präsynaptischen Prozeß beruhen kann (s.o.). Da dieser Mechanismus durch TTX praktisch vollständig blockiert wird, muß daraus seine essentielle Kopplung an die Funktion der dendritischen Natriumkanäle gefolgert werden.

Ein Angriff auf präsynaptische Analogprozesse als die einzige andere theoretisch denkbare Möglichkeit ist auszuschließen, da nach Kenntnis des Rezeptormechanismus die basale Sinneszellularmembran keine TTX-inhibierbaren Kanäle besitzt (Zipser & Bennett 1973, Akutsu & Obara 1974, Umekita *et al.* 1975, Bennett & Clusin 1979, Obara & Sugawara 1979, Bennett & Obara 1986) und nur über spannungsgesteuerte Calciumkanäle zur Stimulustransduktion verfügt (Bennett 1967 & 1971a,b, Bennett & Clusin 1979, Bennett & Obara 1986, Peters *et al.* 1988, 1997b, Peters & van Ieperen 1989, Bretschneider *et al.* 1991, Bretschneider & Peters 1992, Heijmen & Peters 1995b). Selbst wenn man das Fehlen TTX-inhibierbarer Kanäle in Zweifel zöge, so müßten bei distaler TTX-Vergiftung die unwiderlegbar nachgewiesenen spannungsgesteuerten Calciumkanäle (*ibid.*) durch hohe Stimulusintensitäten vollständig aktivierbar bleiben und nach wie vor eine maximale Transmitterausschüttung und damit einen subsynaptischen Strom maximaler Stärke auslösen können, da ein TTX-Angriff auf diese Prozesse ausgeschlossen ist (Narahashi *et al.* 1966, Moore & Narashi 1967, Narashi & Moore 1968, Ulbricht 1977, Alberts *et al.* 1983, Stryer 1996, Molecular Probes 1999). Trotzdem kommt es bei weitgehender Vergiftung der dendritischen Fortleitungsstrecken zu keiner Erregung der

afferenten Faser. Erhöht man die exzitatorische Stimulusintensität weiter auf Werte, die das System unter Umgehung von Sinneszellen und Synapsen direkt erregen könnten, so wird selbst dadurch kein Aktionspotential mehr ausgelöst, da der Stimulus, der die Dendritenenden erreicht und unter Normalbedingungen – offensichtlich mit aktiver Unterstützung der Natriumkanäle – zum Impulsentstehungsort fortgeleitet wird, über die blockierte Dendritenstrecke nicht mehr dort hin gelangen kann.

Der Zeitpunkt vollständiger Unterdrückung jeder Spikeaktivität tritt in dieser Applikationssituation – im Gegensatz zur proximalen TTX-Vergiftung, wo der Impulsentstehungsort als erste Struktur erreicht und blockiert wird – erwartungsgemäß später ein, weil die TTX-Front weit in die Endarborisation eindringen und große Teile davon vergiften muß (redundante Parallelsysteme), bevor jede Aktivität zum Erliegen kommt. Die Spiketätigkeit endet jedoch bereits, wenn erhebliche Teile der Endarborisation vergiftet oder in ihrer Funktion in starkem Maße beeinträchtigt sind, wie aus dem Verlauf der Kurven klar hervorgeht; eine vollständige Blockierung aller Dendriten ist nicht erforderlich (s.o.). Offenbar führen der aus der TTX-Vergiftung resultierende Abfall der »EPSP-Verstärkung« und sogenannte »loading«-Phänomene (Peters & Mast 1983, van Dongen & Bretschneider 1984) der blockierten Dendritenstrecken (inaktive Dendriten stellen eine »Ladungssenke« dar) dazu, daß die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentials am Impulsentstehungsort nicht mehr erreicht werden kann.

4.6.4 Bestimmung der Empfindlichkeit

Die Ergebnisse der bei einem Teil der TTX-Vergiftungsexperimente durchgeführten Empfindlichkeitsmessungen zeigen ebenso charakteristische Unterschiede zwischen den beiden Angriffsrichtungen des Kanalblockers. Bei proximaler TTX-Applikation bleibt die Antwort des Systems auf einen erregenden Stimulus weitgehend erhalten, während die Spontanaktivität durch zunehmenden Ausfall von Einzelspikes und Spikegruppen im Verlauf der Messung absinkt. Dies kann sogar so weit gehen, daß das unstimulierte Organ keine Spontanaktivität mehr zeigt, aber trotzdem auf Stimuli noch kräftige und nahezu regelmäßige Spikemuster erzeugt. Die ISI-Statistik belegt klar, daß der Rückgang der Spontanfrequenz bei proximaler TTX-Vergiftung durch Ausfall von Spikeereignissen aus einer regelmäßigen Spikefolge zustandekommt, die durch einen einzelnen Rhythmusgeber erzeugt werden, da die Histogrammverteilung mehrgipflig ist und klare Peaks bei Vielfachen des Grundintervalls aufweist. Der Einfluß muß zweifelsfrei auf der Digitalstrecke zwischen der Spikeinitiation (d.h. nicht zwangsläufig, daß der Hodgkin-Huxley-Zyklus vollständig und ungestört ablaufen und eine voll ausgebildete Erregung entstehen müßte, sondern evtl. lediglich, daß die Schwelle erreicht und die Kettenreaktion angestoßen wurde, die nach Öffnung der Kaliumkanäle in einem lokalen »Reset« des Systems endet) und der retrograden Invasion der Spikes in die Endarborisation stattfinden (es gibt keine singulären Spikeereignisse in Teilbereichen der Arborisation!). Es liegt deshalb nahe anzunehmen, daß der Kanalblocker die Ausbildung einer regulären und fortpflanzungsfähigen Erregung am Impulsentstehungsort behindert und es lediglich zur Ausbildung eines amplitudenreduzierten

Aktionspotentials oder einer Art von lokaler Erregung (dies muß nicht gleichbedeutend einer Lokalerregung im Sinne der klassisch physiologischen Definition sein, z.B. Schmidt 1987) kommt. Da TTX die Zahl aktivierbarer Natriumkanäle reduziert, wird sich dies sowohl auf die Schwelle der Erregungsbildung am Impulsenstehungsort wie auch an den benachbarten Ranvierschen Schnürringen auswirken sowie auf den Scheitelwert des ausgelösten Aktionspotentials und zwar auf direktem (über Kanalblockierung) wie indirektem Wege (über die adaptive Absenkung der Aktivierungswahrscheinlichkeit der verbleibenden unblockierten Kanäle über die Verringerung der Depolarisationsgeschwindigkeit). Dadurch unterschreitet möglicherweise das am benachbarten Schnürring zur Verfügung stehende Aktionspotential die durch TTX erhöhte Aktivierungsschwelle für die Auslösung des Hodgkin-Huxley-Zyklus und es kommt nicht zur Fortpflanzung der Erregung, die retrograde Invasion unterbleibt. Ein anderer denkbarer Erklärungsansatz wäre ein Unterschreiten der kritischen Aktivierungsgeschwindigkeit zur vollständigen Auslösung der Kettenreaktion am Impulsenstehungsort (Holden 1976, Penzlin 1980, Kandel *et al.* 1985, Llimas 1988, French *et al.* 1990) und damit eine Akkommodation der Auslöseschwelle. Nach dem Abbruch der Erregungsfortleitung (Rapp *et al.* 1996, Stuart *et al.* 1997b) und dem Ausfall eines Spikes könnte eine leicht veränderte Grundsituation eintreten: der Impulsenstehungsort wird hyper- bzw. repolarisiert nach einem fehlgeschlagenen Versuch der Aktionspotentialauslösung; dadurch erhöht sich die Aktivierungswahrscheinlichkeit der zuvor akkommodierten, noch unblockierten Natriumkanäle, die Endarborisation wurde aber nicht durch eine retrograde Erregung vollständig entladen (fehlender »Reset«). Damit baut sich am Impulsenstehungsort mit höherer Ge-

schwindigkeit ein etwas größeres Generatorpotential auf, da es sich auf den Pegel der vorangegangenen und nicht zurückgesetzten dendritischen Depolarisation aufsetzen kann; die Aktivierungswahrscheinlichkeit wäre so höher und könnte dann ein reguläres, fortpflanzungsfähiges Aktionspotential auslösen. Wird das System jedoch stimuliert, dann wird ein deutlich höherer subsynaptischer Strom die Dendriten weit schneller und stärker depolarisieren als in unstimuliertem Zustand. Somit steigt die Depolarisierungsgeschwindigkeit am Impulsenstehungsort erheblich an und kann ohne Schwierigkeiten noch eine vollständige, fortpflanzungsfähige Erregung im partiell vergifteten Axonstamm auslösen. Außerdem könnte das erhöhte postsynaptische Potential zusätzlich als eine Art Facilitator wirken. Da bei den Experimenten mit relativ starken Stimuli gearbeitet wurde, ist nicht verwunderlich, daß weitgehend reguläre Stimulusantworten noch auftreten, selbst wenn das System unstimuliert keine Aktionspotentiale mehr hervorzubringen imstande ist; das Interspike-Intervall ist jedoch gegenüber dem unvergifteten Zustand wegen der erhöhten Aktionspotentialschwelle etwas vergrößert.

Auch wenn ein Nachweis des genauen Wirkungsmechanismus anhand der Ergebnisse nicht möglich ist, kann ein Angriff auf das Digitalsystem nahe dem Impulsenstehungsort aufgrund der Ergebnisse als gesichert gelten. Diese Erklärungshypothesen liefern somit eine mögliche, plausible Deutung sowohl für den Ausfall von Spikeereignissen nach proximaler TTX-Applikation, der zu mehrgipfligen Interspike-Intervall-Verteilungen mit (näherungsweise) Intervallvielfachen des Grundintervalls führt, wie auch für das Ergebnis, daß nach Stimulation der Ausfall von Spikes im partiell inhibierten System längere Zeit ausbleibt und wieder weitgehend regelmäßige Aktivität auftritt.

Ein anderes Bild entsteht nach distaler TTX-Applikation: vor Eintritt der TTX-Wirkung ist die Situation hinsichtlich Spontanaktivität und Stimulusantwort vergleichbar, die Systemparameter weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Da hier der TTX-Angriff auf die Natriumkanäle des Dendritenbaums stattfindet, ist davon die aktive Fortleitung der postsynaptischen Potentiale betroffen und dieser Effekt sollte sich in ähnlicher Weise auf die Ausbildung der Spontanfrequenz wie auch der Reizantwort in einer kontinuierlichen Vergrößerung des Interspike-Intervalls auswirken. Dies bestätigte sich im Experiment: der Rückgang der Reizantwort betrug 83%, der Rückgang der Spontanaktivität lag bei 87%. Diese Ergebnisse zeigen, daß auch das reizinduzierte vergrößerte postsynaptische Potential in ähnlicher Weise vom Versagen des aktiven Fortleitungssystems in den Dendriten betroffen ist wie das Spontan-EPSP und daß selbst bei Stimulation des Systems die Ausbreitung des postsynaptischen Potentials auf die aktive Unterstützung der spannungsgesteuerten Natriumkanäle angewiesen ist, um die Information von der Synapse zum Impulsentstehungsort zu übertragen. Die Dämpfung spontaner und stimulusinduzierter Erregung ist vergleichbar; selbst hohe, weit über der Sättigungsschwelle liegende Stimulusintensitäten und daraus resultierende maximale postsynaptische Potentiale sind in gleicher Weise auf die Unterstützung der Natriumkanäle bei der Fortleitung angewiesen; sind erhebliche Teile der distalen Dendritenabschnitte an ihren Natriumkanälen TTX-blockiert, so läßt sich keine Erregung mehr auslösen, obwohl nach wie vor die maximale Stärke des subsynaptischen Stroms vorliegen muß, da dieser nicht durch die TTX-Vergiftung beeinträchtigt werden kann (dies gilt sogar für unphysiologisch starke Reizintensitäten, die eine Direktstimulation

der Dendritenendigungen hervorrufen und dennoch den Impulsentstehungsort ohne aktive Unterstützung bei ihrer Ausbreitung nicht mehr erreichen können, s.o.).

4.7 Gesamtdiskussion der Ergebnisse

Betrachtet man die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit in der Gesamtschau und fügt die Mosaiksteine aneinander, so ergibt sich folgendes Bild des elektrosensorischen Systems clusterbildender Welse (am Beispiel von *Schilbe mystis*):

Die Morphologie zeigt ein Sinnessystem mit einer außergewöhnlichen, räumlich sehr ausgedehnten peripheren Konvergenz zahlreicher (bis ca. 30) über ein größeres Hautareal verteilter ampullärer Organe auf ein singuläres primäres afferentes Neuron, das damit verschiedene Aufgaben der Signalverarbeitung auf dieser ersten neuronalen Stufe (mononeuronal, also ohne neuronales Netzwerk) erfüllen muß; das dendritische System großer Adultexemplare der Spezies *Schilbe mystis* kann eine Longitudinalerstreckung von mehr als 2 mm aufweisen. Einzelne Dendriten des Endbäumchens können eine Erstreckung von bis zu ca. 3 mm erreichen und sind dabei über ihre gesamte Länge myelinisiert, jedoch liegen ihre Werte für Markscheidenlänge mit 12...15 µm und Grad der Myelinbedeckung mit 75% bei einer Anulusbreite von 3...5 µm ungewöhnlich niedrig. Damit zeigt der Dendritenbau deutliche Abweichungen von den Erwartungswerten typischer Neuriten mit saltatorischer Erregungsleitung (Hodgin & Rushton 1946, Stämpfli 1954, Rall 1959 & 1970 & 1977, Leonhard 1977, Benninghoff & Goertler 1985). Aus diesen Werten läßt sich eine Längskonstante in der Größenordnung von einigen hundert Mikro-

metern und damit nur einem Bruchteil der Dendritenlänge ermitteln. Wie leicht theoretisch zu errechnen, muß es deshalb als ausgeschlossen gelten, daß postsynaptische Potentiale die Strecke bis zu einem potentiellen Impulsentstehungsort im gemeinsamen Axonstamm rein passiv durch elektrotonische Fortleitung überwinden; entsprechendes gilt für die retrograde Ausbreitung dort generierter Aktionspotentiale zurück in den Dendritenbaum, die bei elektrotonischer Fortleitung keinesfalls von der Ableitelektrode registriert werden könnten. Auf der Basis der bekannten elektrophysikalischen Eigenschaften passiver Neuriten ergibt sich somit eindeutig, daß: (1) aufgrund normaler elektrotonischer Ausbreitung nur minimale, zu vernachlässigende Anteile des postsynaptischen Potentials einen Impulsentstehungsort in der gemeinsamen Afferenz erreichen könnten, und (2) daß das Potentialgeschehen weit stärker durch extraneuronale Faktoren bestimmt würde als durch die synaptisch übertragene Information der elektrosensorischen Rezeptoren. Ähnliches gilt für die Übertragung der Aktionspotentiale über die Dendritenlänge.

Analysiert man die Ergebnisse der ISI-Statistik und der Konvergenzexperimente, so zeigen diese klar, daß (1) das abzuleitende, hochregelmäßige Spikemuster nur von einem einzigen Impulsgenerator stammen kann, und (2) daß sich die Inputs der einzelnen ampullären Organe arithmetisch addieren. Ersteres kann theoretisch dadurch erreicht werden, daß nur ein Impulsentstehungsort in der gemeinsamen Afferenz vorhanden ist, oder, daß zwar mehrere Impulsentstehungsorte in den einzelnen Ästen der Dendriten existieren, diese aber gekoppelt sind (wie im Abschnitt Spikestatistik genauer dargelegt); als alleinige Möglichkeit der Kopplung wäre eine retrograde Invasion aller Dendritenäste durch Aktionspotentiale von dem Organ mit der höch-

sten Empfindlichkeit denkbar (Murray & Capranica 1973, Pabst 1977, Holden 1976, Sanchez & Zakon 1990, Teunis *et al.* 1990b), das damit eine mehr oder weniger synchrone Erregung der gesamten Enderbo-risation hervorruft und so den Reset aller anderen Impulsenstehungs-orte durchführt (Rapp *et al.* 1996, Stuart *et al.* 1997b). Letztere Möglichkeit wäre jedoch absolut unvereinbar mit der Addition der Einzelempfindlichkeiten, wie Peters *et al.* sie in mehreren Arbeiten nachgewiesen haben (Peters & Mast 1983, Peters & van Ieperen 1989, Peters *et al.* 1997), die lediglich durch einen singulären Impuls-entstehungsort in der gemeinsamen Afferenz zu realisieren ist (durch analoge Summation der Einzelstrombeiträge eines jeden Dendriten). Bereits diese Ergebnisse sind nur unter der Hypothese eines singulären Impulsenstehungsortes erklärbar, der jedoch aufgrund der physiolo-gischen Eigenschaften keinesfalls durch elektrotonisch sich ausbrei-tende postsynaptische Potentiale gespeist werden kann.

Dieser nach klassisch neurophysiologischer Vorstellung nicht er-klärbare Widerspruch in der Dendritenfunktion läßt sich nur lösen, wenn man eine aktive Komponente bei der Fortleitung der postsyn-aptischen Potentiale in Form eines spannungsgesteuerten Stromver-stärkers postuliert, die physiologisch durch entsprechende potential-abhängige Ionenkanäle realisiert werden könnte (primär wären für diese Aufgabe nach theoretischen Überlegungen am ehesten Natrium-kanäle, ggf. noch Calciumkanäle, potentiell geeignet). Dadurch könnten die postsynaptischen Potentiale durch diese Art der Stromverstärkung mit geringem Potentialdekrement (oder evtl. sogar mit geringfügiger Amplitudenverstärkung, wie aus den Ergebnissen des Amplituden-vergleichs gefolgert werden könnte) über die weite Dendritenstrecke von der Synapse zum Impulsenstehungsort im Axonstamm transpor-

tiert werden. Dabei weist diese Art der Fortleitung eine Reihe von Vorteilen auf, wie höhere Geschwindigkeit und Präzision der Informationsübertragung (Shaw 1981, Taylor *et al.* 1995, Schwindt & Crill 1995, Haag & Borst 1996, Rall 1997), verbesserte Störsicherheit (durch Erhöhung des axonalen Stromflusses wird die Informationsübertragung weniger anfällig für alle Arten von Störungseinflüssen), Minimierung digitalisierungsbedingter Informationsverluste und »Jitter«-Probleme (Fluktuationen und Inakuranz in der Zeitachse) durch analoge Informationsvorverarbeitung, d.h. Vorverrechnung und Addition der Einzelinputs (Goldmann 1953, Shaw 1981, Hoppe *et al.* 1982, Taylor *et al.* 1995), und ermöglicht so die Bereitstellung exakterer und höher zeitaufgelöster Information zur Weiterverarbeitung im ZNS.

Bereits seit längerer Zeit diskutiert man theoretisch über aktive Eigenschaften der Dendritenmembran, wie eine mögliche persistente Aktivierung von Ionenkanälen, und deren Einfluß auf die Ausbreitung analoger Kleinsignale wie synaptische und andere gradierte Potentiale in Neuriten (u.a. Chandler & Meves 1970, Traub & Llinas 1979, Llinas & Sugimori 1980, Stafstrom *et al.* 1982 & 1984b & 1985, Jack *et al.* 1983, Gilly & Armstrong 1984, Miller *et al.* 1985, Perkel & Perkel 1985, Yoshi *et al.* 1988, Sutor & Hablitz 1989a, Hounsgaard & Midtgaard 1989, Deisz *et al.* 1991, Vallet & Coles 1993a,b, Taylor *et al.* 1993). Der wahrscheinlichste und in diesen Arbeiten meist genannte Mechanismus, der eine derartige Verstärkeraufgabe erfüllen könnte, basiert auf der Leitfähigkeitsänderung der spannungsgesteuerten Natriumkanäle (auch wenn lange Zeit direkte experimentelle Beweise für diese Hypothese fehlten). Allein auf der Basis der sigmoiden Aktivierungswahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Natriumkanäle in Kombination mit den potential- und zeitabhängigen Einflüssen auf Natrium-

und Kaliumionenströme, die auf Aktivations- und Inaktivations-eigenschaften dieser Ionenkanäle basieren, könnte bereits ein derartiger Verstärkermechanismus realisiert werden (*ibid.*). Über dieses seit den Ergebnissen von Hodgkin & Huxley (1952a–d) prinzipiell bekannte Verhalten der Natriumkanäle hinaus wird in neueren Arbeiten (Llinas & Yarom 1981, Stafstrom *et al.* 1982 & 1985, Llinas 1988, French *et al.* 1990, Alzheimer *et al.* 1993, Brown *et al.* 1994, Stuart & Sakmann 1995a, Mittmann *et al.* 1997, Lampl *et al.* 1998, Mickus *et al.* 1999a,b, Crill 2000) ein weiterer Typ von Natriumkanälen diskutiert, der als nicht-inaktivierender Natriumkanal bezeichnet wird und nach Alzheimer *et al.* (1993) und Stuart & Sakmann (1995a) einen weiteren Zustand im Konformationsgleichgewicht der schnellen spannungsgesteuerten Natriumkanäle darstellt, deren Subpopulation über ein dynamisches Gleichgewicht mit den Konformationszuständen des Hodgkin-Huxley-Zyklus in Beziehung steht (Hille 1975 & 1992, Holden 1976, Aldrich & Stevens 1987, French *et al.* 1990). Dieser Kanaltyp bzw. Konformationszustand könnte aufgrund seiner stark reduzierten Inaktivationskinetik und besseren Aktivierungslinearität auch im schwelennahen Bereich bei geringerer positiver Selbstrückkopplung eine sehr gute Eignung zur stabilen Verstärkung graduierter Kleinsignale besitzen, jedoch wäre – wie zuvor ausgeführt – eine Realisierung der Verstärkeraufgabe auch ohne diesen Kanaltyp über das Konformationstriplett der klassischen Hodgkin-Huxley-Kinetik denkbar.

Wenn die Dendriten entsprechend dieser Hypothese durch ihre Natriumkanäle die graduierten postsynaptischen Potentiale bei ihrer Fortleitung aktiv unterstützen und verstärken, dann stellt sich immer noch die Frage, wie die Aktionspotentiale, die bei *Kryptopterus bicirrhus* nach den Ergebnissen von Bennett (1971a) die Endarborisation nicht

aktiv invadieren, die weite Distanz bis ins Ampullenlumen ohne starke frequenzabhängige Dämpfung und ohne Impulsverbreiterung zurücklegen können. Die Versuche zum Amplitudenvergleich innerhalb eines Clusters belegen jedoch bei *Schilbe mystis* stringent, daß dort die stets zu beobachtende dämpfungsfreie Ausbreitung der Aktionspotentiale innerhalb des Dendritenbaums im Falle passiver Invasion eine utopische Längskonstante von mehr als 8 Metern erfordern würde und deshalb ausschließlich mit aktiver retrograder Invasion zu erklären ist. Folglich werden – bereits durch vorgenannte Ergebnisse zwingend zu postulieren – beide Signalausbreitungswege, die antherograde Fortleitung des postsynaptischen Potentials von der Synapse zum Impulsentstehungsort in der gemeinsamen Afferenz wie auch die retrograde Invasion der Aktionspotentiale über dieselbe Strecke zurück zu den Synapsen mit aktiver Unterstützung zurückgelegt, die mutmaßlich primär von der Aktivität derselben spannungsgesteuerten Natriumkanäle getrieben wird. Die Experimente mit kathodischer Inhibition zeigen, daß in der peripheren, prädigitalen Verarbeitungskette des elektrosensorischen Sinnessystems mindestens zwei adaptive Prozesse, von denen der langsamere (im Bereich von einigen 10 Minuten arbeitende), aber vermutlich hinsichtlich seiner Adaptationsbreite leistungsfähigere, der nach den Erkenntnissen von Peters *et al.*, Roth u.a. (Roth 1971, Peters *et al.* 1975 & 1988 & 1997, Zhadan & Zhadan 1975, Bauswein 1977, Bretschneider *et al.* 1979 & 1980) mit Potentialverschiebungen über der Fischhaut und der basalen Sinneszellmembran einhergeht, präsynaptisch lokalisiert ist, während das schnell (im Sekundenbereich) adaptierende System, das auch mit dem phasisch-tonischen Systemverhalten dieses Rezeptortyps zumindest partiell korrelieren dürfte, sich in den peripheren Dendriten der primären

Afferenz befindet (Bretschneider *et al.* 1980, Peters *et al.* 1988b & 1997). Wie sich nach distaler TTX-Gabe zeigt, fällt dieses System in dem Maße aus, in dem das TTX aus distaler Richtung die peripheren Dendriten erreicht und deren Natriumkanäle besetzt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Annahme einer aktiven Funktion des schnellen spannungsabhängigen und als einzigen TTX-blockierbaren Natrium-Systems bei der Ausbreitung der postsynaptischen Potentiale im Dendritenbaum und läßt sich nur deuten, wenn die schnelle Adaptation des elektrosensorischen Systems, die auch durch TTX unterdrückt wird, ebenfalls auf diesem Natriumkanal-basierten Mechanismus beruht, der hier die Aufgabe eines autoregulativen spannungsgesteuerten Stromverstärkers mit selbständiger Einstellung und Stabilisierung des Arbeitspunktes erfüllt.

Die Ergebnisse der Korrelationsexperimente zwischen Interspike-Intervall und Spikeamplitude lassen sich – auch im Lichte der bisherigen Erkenntnisse – nur als partielle potentialabhängige Inaktivierung des Natrium-Systems interpretieren. Dadurch wird die Amplitudenmodulation zum Indikator von Existenz und Stärke eines graduierten Potentials in der Endarborisation. Außerdem setzt die partielle Inaktivierung eine temporäre, (in Dimensionen von Nervenspikes) quasistatische Aktivierung des Natrium-Systems im unterkritischen, stabilen Arbeitsbereich der Natriumkanäle voraus, also oberhalb der Aktivierbarkeitsschwelle (eine Schwelle für die Aktivierbarkeit existiert angesichts der bekannten Aktivierungswahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Natriumkanäle strenggenommen nicht – trotzdem muß eine hinreichende Aktivierungsstärke erzielt werden, die das Konformationsgleichgewicht zu Lasten des aktivierbaren Zustands signifikant verschiebt), aber unterhalb der Feuerschwelle (Hodgkin & Huxley 1952a–d,

Chandler & Meves 1970, Holden 1976, Soukimas & French 1980, Jack *et al.* 1983, Llinas 1988, French *et al.* 1990, Alzheimer *et al.* 1993, Stuart & Sakmann 1995a, Taylor *et al.* 1995, Magee & Jahnston 1995c). Dadurch zeigen diese Ergebnisse, daß die Natriumkanäle durch analoge, graduierte und mit dem postsynaptischen Potential korrelierte Signale in ihrer Leitfähigkeit moduliert werden können und daß sie durch diese Modulation zwangsläufig eine stabile Verstärkerfunktion für postsynaptische Potentiale erfüllen. So unterstützen diese Ergebnisse die Theorie, daß Natriumkanäle durch graduierte Potentiale zu partieller, stabiler und relativ statischer, persistenter Aktivierung angeregt werden können und damit geeignet und in der Lage sind, Analogsignale auf dem Wege einer potentialgesteuerten Stromverstärkung in ihrer Ausbreitung zu unterstützen und stabil zu verstärken (ohne Auslösung der Kettenreaktion im Hodgkin-Huxley-Zyklus). Erst durch einen Mechanismus wie diesen sind präzise und gut zeitaufgelöste Rechenwerke in großen Konvergenzsystemen auf der Basis von Analogsignalen wie postsynaptischen Potentialen darstellbar, indem diese Signale bereits prädigital vorverarbeitet und niederimpedant auf dem Wege der Kirchhoffschen Summation der Teilströme aus den Dendritenästen am Impulsentstehungsort addiert werden können (Stafstrom *et al.* 1982 & 1984b & 1985, Huguenard *et al.* 1989, Coles & Schneider-Pickard 1989, Hirsch & Gilbert 1991, Vallet & Coles 1993a,b, Brown *et al.* 1994, Lipowski *et al.* 1996, Johnston *et al.* 1996, Haag & Borst 1996, Cash & Yuste 1998, Andreassen & Lambert 1999, Poznanski & Bell 2000a,b). Also läßt eine Amplitudendepression, die auf der partiellen Inaktivierung der Natriumkanäle basiert, Rückschlüsse zu über den präinitiatorischen Aktivierungszustand dieser Kanäle (vor Auslösung eines Aktionspotentials) durch graduierte Potentiale

und so auf einen dadurch hervorgerufenen aktiven Einwärtsstrom von Natriumionen durch diese Kanäle des schnellen spannungsaktivierbaren Natrium-Systems der Dendriten, durch den die entsprechenden Signale notwendigerweise in ihrer Ausbreitung unterstützt werden.

Es liegt deshalb nahe, die beiden aktiven Fortleitungsvorgänge, den der postsynaptischen Potentiale zum Impulsentstehungsort im Axonstamm wie den der retrograden Invasion der dort ausgelösten Aktionspotentiale in Richtung der Synapsen, die beide von der aktiven Rolle der Natriumkanäle abhängig sind, unter progressiver Inhibition des Systems durch TTX aus proximaler bzw. distaler Richtung genauer zu untersuchen und dabei die Vorgänge in der Endarborisation an zwei verschiedenen Punkten ihrer proximodistalen Erstreckung mittels Doppelableitung simultan zu erfassen. Auf diese Weise sind reproduzierbare, charakteristische und interpretierbare Ergebnisse zu gewinnen, die wichtige Rückschlüsse über das präparativ nicht zugängliche Dendritensystem zulassen.

Aus den Ergebnissen der *proximalen* TTX-Vergiftung folgt u.a. eindeutig, daß der Angriff zunächst ausschließlich auf das digitale System am Impulsentstehungsort stattfindet, daß dieser Impulsentstehungsort nur singular in jedem Cluster vorhanden und am Beginn der gemeinsamen Afferenz lokalisiert ist. Aus den Ergebnissen der *distalen* TTX-Vergiftung geht klar hervor, daß (1) die retrograde Invasion der Aktionspotentiale bis in die synaptische Region aktiv stattfindet, (2) daß ohne aktive retrograde Invasion keine Spikes im Ampullenlumen meßbar sind, und (3) daß der ableitbare Spike synapsennah im jeweiligen Ast des Dendritenbaums gebildet wird. Außerdem bestätigen diese Experimente die bereits zuvor aufgrund anderer Ergebnisse dieser Ar-

beit aufgestellte Hypothese, daß die Ausbreitung der postsynaptischen Potentiale durch einen aktiven Mechanismus unterstützt wird, der entscheidend, wenn nicht sogar nahezu ausschließlich, durch die spannungsgesteuerten Natriumkanäle getragen wird. Insgesamt ergeben sich aus diesen Ergebnissen klar drei primäre Schlußfolgerungen:

(1) Es gibt nur einen einzigen Impulsentstehungsort; dieser liegt in der gemeinsamen Afferenz. Dies stellt die einzige Möglichkeit dar für einen Funktionsmechanismus mit maximaler Empfindlichkeit und Effektivität und unter Vermeidung eines »hohen neuronalen Prozessierungsaufwands« durch eine 1-zu-1-Verschaltung (ein elektro-sensorisches Organ wird auf ein zentrales Neuron abgebildet) mit konsekutiver zentraler Informationsverarbeitung, wobei auch die Digitalisierungsverluste, Umsetzungsfehler und »Jitterprobleme«, bedingt durch Laufzeitverzögerungen bei der Informationsübertragung und Digitalisierung bei dieser Art der prädigitalen Informationsverarbeitung in der Endarborisation eines peripheren Konvergenzsystems, von vorne herein vermieden bzw. minimiert werden. Als analoges System dürfte es so prinzipiell eine höhere Präzision und Zeitauflösung erreichen als jedes noch so komplexe neuronale Netzwerk im Gehirn, da diese Art der Informationsverarbeitung (Goldman 1953, Shaw 1981, Koch *et al.* 1983, Taylor *et al.* 1995, Schwindt & Crill 1995, Haag & Borst 1996, Stuart *et al.* 1997b, Rall 1997) durch ihre Vorgeschichte stets auf digitalisierten und damit prinzipbedingt auflösungs- und präzisionsreduzierten (in Amplituden- und Zeitachse) Daten basiert, die vor jeder Verrechnungs- und Verschaltungsstufe erneut reanalogisiert und häufig in einem im Vergleich zum Interspike-Intervall größeren Zeitfenster integriert werden müssen, bevor sie wiederum unter Informationsverlust in ein pulsintervallmoduliertes Signal transfor-

miert werden; diese in vorgeschalteten Stufen der Verarbeitung verworfene Information kann durch keine noch so komplexen zentralen neuronalen Verarbeitungsprozesse wiedergewonnen werden.

(2) Die synaptisch übertragene Analoginformation weiträumig verstreuter elektrosensorischer Organe wird über die – aus dieser physiologischen Optimierung der Signalverarbeitung und Systemfunktion resultierende – weite Strecke von den synaptischen Endigungen bis zum Impulsentstehungsort aktiv fortgeleitet. Ohne diese Unterstützung der Fortleitung durch den Stromverstärkermechanismus der Natriumkanäle sind selbst starke postsynaptische Potentiale, die durch große, weit im Sättigungsbereich des Systems liegende Stimuli hervorgerufen werden (Maximalantworten), – die TTX-Experimente bestätigen hierin die zuvor aufgeführten theoretischen Analysen – nicht in der Lage, die Distanz zum Impulsentstehungsort zu überwinden.

(3) Die dort am Impulsentstehungsort ausgelösten Aktionspotentiale breiten sich ebenfalls in beide Richtungen – anthero- wie retrograd – aktiv nach dem Hodgkin-Huxley-Mechanismus aus und dürften dabei von denselben Natriumkanälen unterstützt werden, die auch für die Analogverstärkung der postsynaptische Potentiale zuständig sind (Jack *et al.* 1983, Hounsgaard & Midtgaard 1989, French *et al.* 1990, Alzheimer *et al.* 1993, Taylor *et al.* 1995). Diese retrograde Invasion wird damit zu einem Reset der gesamten Endarborisation führen (Rapp *et al.* 1996, Stuart *et al.* 1997), denn nur so – nach dem Zurücksetzen des Dendritenpotentials in den partiell depolarisierten Ästen des Dendritenbaums – kann das System als Integrator ($U = \int_{t=0}^i \frac{I(t)}{C} dt$) und Digitalisierer neuerlich mit definierten, stets gleichen Potentialstartbedingungen seine präzise Funktion erfüllen (daneben dürfte der retrograden Invasion auch eine »Refresh«-Aufgabe des unidirektionalen »push-up-

Dendritenverstärkers« zukommen, da das aktivierte Natriumkanal-System Gleichrichtereffekt besitzt und so auf die Repolarisation durch die Kaliumkanäle angewiesen ist, um auf Stimulusabschwächungen schnell reagieren zu können; zudem werden Akkommodations- und Inaktivierungseffekte an den Natriumkanälen vor jedem neuen Zyklus auf definierte Werte zurückgesetzt – Wiederherstellung eines definierten Konformationsgleichgewichts und damit einer konstanten »Verstärkercharakteristik«). Dadurch stellt das dendritische System ein sehr einfaches, aber effizientes und höchst präzises Informationsverarbeitungs-, Konvergenz- und Integrationssystem dar, das als analoger Mechanismus ein höheres Maß an Präzision und Zeitauflösung erreichen dürfte als jedes noch so komplexe neuronale Netzwerk, (u.a. Goldman 1953, Shaw 1981, Hoppe *et al.* 1982, Koch *et al.* 1983, Taylor *et al.* 1995, Schwindt & Crill 1995, Stuart *et al.* 1997b).

Das elektrosensorische System clusterbildender Weise ist damit ein interessantes Beispiel eines mononeuronalen peripheren Konvergenzsystems mit analoger Informationsverarbeitung im Dendritenbaum eines primären afferenten Neurons, wie es in vergleichbarer Form und Ausprägung aus der Literatur nicht bekannt ist. Dabei dürften die Dendriten eine Reihe verschiedener Aufgaben übernehmen, wie aktive Fortleitung analoger postsynaptische Potentiale, räumliche und zeitliche Integration, Vorverarbeitung im Amplituden- und Zeitbereich, aktive Frequenzfilterung, präzises Additionsrechenwerk (Koeffizientenaddierer), autoregulative Einstellung von Arbeitspunkt und Verstärkungsfaktor, Adaptationsfunktionen (auf elektrische Stimuli, Veränderungen im Ionenmilieu, ontogenetische Entwicklung des elektrosensorischen Systems...), phasisch-tonisches Rezeptorverhalten, Systemstabilisierung, retrograde Fortleitung von Aktionspotentialen mit Reset des Integrators,

ohne daß hierfür der zusätzliche Aufbau komplexer neuronaler Strukturen in Form von Netzwerken mit zwischengeschalteter Digitalisierung der Information erforderlich wäre, und bestätigen und erweitern damit das Konzept der aktiven Dendriten in der neuronalen Verarbeitung analoger Informationen. Über einen neu entwickelten experimentellen Ansatz der Systemanalyse unter progressiver in-situ Vergiftung des Dendritensystem mit dem Natriumkanalblocker TTX konnten so in Verbindung mit mehreren komplementären indirekten Versuchsansätzen experimentelle Fakten und Meßergebnisse gewonnen werden zum Thema aktiver Analogprozesse in dendritischen Systemen, das bereits lange theoretisch diskutiert wurde (Chandler & Meves 1970, Traub & Llinas 1976, Llinas & Sugimori 1980, Stafstrom *et al.* 1982 & 1984b & 1985, Jack *et al.* 1983, Gilly & Armstrong 1984, Miller *et al.* 1985, Perkel & Perkel 1985, Yoshi *et al.* 1988, Sutor & Hablitz 1989a, Hounsgaard & Midtgaard 1989, Deisz *et al.* 1991, Vallet & Coles 1993a,b, Taylor *et al.* 1993), aber bislang nur durch wenige experimentelle Befunde modellfrei verifiziert und erhärtet werden konnte.

Neben dem Beitrag zur Untersuchung und aktuellen Diskussion analoger dendritischer Prozesse als einem allgemeinen neurologischen Funktionsprinzip, gewinnt diese Arbeit neue Erkenntnisse zum Mechanismus des ampullären Elektrorezeptors in konvergenten Systemen. Nach bisherigem Kenntnisstand existierten noch einige ungeklärte Fragen und Widersprüche im bislang bekannten Modell des Rezeptorsystems, so z.B. die fehlende Korrelation zwischen Spontanaktivität und Empfindlichkeit (Peters *et al.* 1975, Bretschneider *et al.* 1979 & 1980, Peters *et al.* 1988, Teunis *et al.* 1989, Bretschneider & Peters 1992, Heijmen & Peters 1995, Peters *et al.* 1997), das nicht-additive Verhalten der Spontanaktivität und die Abweichung des Signal-

Rausch-Verhältnisses des Clustersystems bei zunehmender Konvergenz vom Nyquist-Kriterium (Peters & Mast 1983, van Dongen & Bretschneider 1984, Peters & van Ieperen 1989, Teunis *et al.* 1990, Bretschneider *et al.* 1991, Peters *et al.* 1997); die Widersprüche um dendritische Adaptationsmechanismen im Zusammenhang mit der ontogenetischen Anpassung an Konvergenzzunahme und Wachstum der Clusterorgane sowie die Frage nach dem theoretisch bereits postulierten ersten dendritischen Adaptationsmechanismus bei Änderung des Ionenmilieus und kathodischer Inhibition (Roth 1971 & 1973, Peters *et al.* 1975 & 1988 & 1997, Zhadan & Zhadan 1975, Bauswein 1977, Bretschneider *et al.* 1979 & 1980, Zakon 1984, Sanchez & Zakon 1987 & 1990, Peters & van Ieperen 1989, Peters *et al.* 1997). Die aktiven Mechanismen des dendritischen Systems, die in dieser Arbeit gefunden werden konnten, führen ein neues wesentliches Element in das bislang bekannte Modell dieses Rezeptormechanismus ein und wären damit potentiell geeignet, die oben genannten Widersprüche aufzulösen und das Verständnis dieses Systems zu erweitern.

5. Material und Methoden

5.1 Abkürzungen und Begriffsdefinitionen

AP	Aktionspotential
Spike	wird in dieser Arbeit synonym zum Begriff Aktionspotential gebraucht
IEO	Impulsentstehungsort; Ort, an dem Aktionspotentiale gebildet werden können
PSP	postsynaptisches Potential; die durch den subsynaptischen Strom über der subsynaptischen Membran erzeugte Potentialveränderung
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
Generatorpotential	das am Ort der Erregungsbildung über der Neuronenmembran abfallende graduierte depolarisierende Potential, das bei Erreichen der »Feuerschwelle« dort ein Aktionspotential auslöst
Cluster	System mehrerer, auf eine afferente Faser konvergierender ampullärer Organe
prox.	proximal, näher an der Körpermitte gelegen; proximale Clusterorgane der Analflosse liegen innerhalb eines Clusters näher an der Flossenbasis; proximale TTX-Applikation bezeichnet eine Anwendungssitu-

	ation (bezogen auf Cluster der Analflosse), bei der das TTX von zentral nach peripher durch das Cluster diffundiert, also von der Flossenbasis in Richtung Flossenrand
dist.	distal, weiter entfernt von der Körpermitte; distale Clusterorgane der Analflosse liegen innerhalb eines Clusters näher am Flossenrand und in der Regel weiter vom Axon der afferenten Faser entfernt; distale TTX-Applikation bezeichnet eine Anwendungssituation (bezogen auf Cluster der Analflosse), bei der das TTX von peripher nach zentral durch das Cluster diffundiert, also vom Flossenrand in Richtung Flossenbasis
ZNS	Zentralnervensystem
TTX	Tetrodotoxin, Blocker für spannungsgesteuerte Natriumkanäle
DASPEI	2-(4-Dimethylamino)styryl-N-ethylpyridiniumiodid $C_{17}H_{21}IN_2$, Fluoreszenzfarbstoff, der u.a. zur Vitalfärbung von Neurozyten verwendet wird
MS-222	m-Aminobenzoesäure-ethylester-methansulfonat, $C_{10}H_{15}NO_5S$; Anästheticum, Analgeticum und Sedativum für Poikilotherme
VT	Versuchstier
VD	Versuchsdauer
ISI	Interspike-Intervall
SD	»standard deviation«, Standardabweichung der Einzelwerte einer Messung von ihrem Mittelwert, mittlerer Fehler der Einzelmessung

SEM »standard error of mean«, Standardfehler des arithmetischen Mittels einer Messung, mittlerer Fehler des Mittelwerts

5.2 Versuchstiere

In allen Versuchen wurden Welse der Spezies *Schilbe mystis* (afrikanischer Silberwels) eingesetzt, die bereits über Jahre im Institut für Zoologie der Ludwig-Maximilians-Universität München gehalten und gezüchtet wurden und über die bereits in der Arbeitsgruppe umfangreiche Erfahrung vorliegt. Bei *Schilbe mystis* handelt es sich um einen Clusterbildner, d.h. zahlreiche (bis zu ca. 30) ampulläre Organe konvergieren auf ein singuläres primäres afferentes Neuron, das die Information unmittelbar integriert und zum ZNS fortleitet. Tiere dieser Spezies besitzen zwei Clustertypen, von denen der größere »Bäumchentyp«, der z.B. vorherrschend in einem basisnahen Streifen auf der Afterflosse anzutreffen ist, eine große räumliche Erstreckung von bis zu ca. 2 mm aufweist. Die relativ gute Sichtbarkeit der Ampullen, Pori und Sinnesepithelien, zuweilen auch der Afferenz, bei relativ schwacher Pigmentierung der dünnen Flossenstrukturen, die zugleich eine einfache Transmissionsausleuchtung, gute Planität und horizontale Ausrichtbarkeit des Untersuchungsareals ermöglicht, sowie relativ gute elektrophysikalische Ausgangsbedingungen stellen bewährte Voraussetzungen für die elektrophysiologischen Untersuchungen dar.

Einige morphologische Vergleichsbeobachtungen wurden an *Physalia spec.*, einem afrikanischen Glaswels (ebenfalls Clusterbildner) durchgeführt, der nur in wenigen Exemplaren (Körperlänge 50...70 mm) zur Verfügung stand. Neurophysiologische Ableitungen

gestalten sich bei dieser Spezies relativ schwierig, da hier insbes. die Ampullenpori geringe Durchmesser von 3...5 μm aufweisen, die im Ampullenlumen abgreifbare Spikeamplitude um 35...50% geringer ist als bei *Schilbe* und der Signal-Rausch-Abstand zusätzlich durch das stärkere Elektrodenrauschen der dünner ausgezogenen und damit hochohmigeren Glasmikroelektroden verschlechtert wird. Dafür erlaubt seine hohe Transparenz, die nahe an die Verhältnisse von *Kryptopterus* heranreicht, ideale Bedingungen für morphologische Untersuchungen eines Clusterbildners.

Als hinsichtlich seines ampullären Elektrozepors bestuntersuchtes Versuchstier wurde *Kryptopterus bicirrhis*, der indische Glaswels, für einige vergleichende Untersuchungen eingesetzt. Die Bedingungen für morphologische und physiologische Untersuchungen sind bei dieser Spezies nahezu ideal wegen seiner fast perfekten Transparenz und seinen ideal für Ableitungen geeigneten Ampullen, jedoch zeigt diese Spezies keine Clusterbildung, also auch keine Konvergenz mehrerer Organe auf eine sehr große Endarborisation und ist somit in dieser Arbeit nur gelegentlich als Vergleichsorganismus von Bedeutung.

Alle Versuchstiere der Spezies *Schilbe mystis* wurden vor der Verwendung im Experiment mindestens für sechs Monate im Hause gehalten und an das Münchner Leitungswasser (Temperatur 25°C) gewöhnt, da aus der jahrelangen Erfahrung in der Arbeitsgruppe bei Haltung und Zucht dieser Tiere bekannt ist, daß Änderungen in den Haltungsbedingungen (Temperatur, Ionenzusammensetzung) Auswirkungen auf Anzahl und Funktion der Elektrozeporen besitzen. Im Experiment wurden ausschließlich semiadulte Tiere (ab ca. 60mm Körperlänge oder 9 Monate) oder kleinere Adultexemplare (Körperlänge typ. 80...120 mm) eingesetzt. Wie aus eigenen mikroskopischen Färbe-

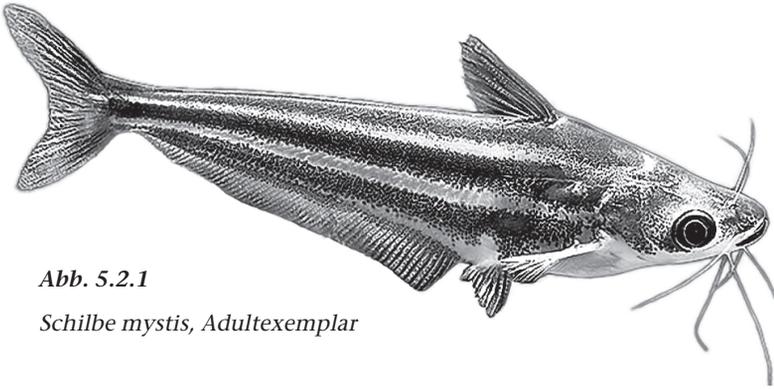


Abb. 5.2.1

Schilbe mystis, Adultexemplar

studien bekannt war, treten erste Doubletten ab ca. 24 mm Körperlänge auf, erste Vierer-Cluster ab 30mm und erste Zehner-Cluster ab 56 mm.

<i>Körperlänge des Versuchstiers [mm]</i>	<i>25 % der Cluster an Analflossenbasis größer/gleich ...Organe (oberes Quartil)</i>
24	2
30	4
38	6
56	10

Die abkürzende Bezeichnung: »morphologisch und physiologisch gesunde Rezeptororgane« steht für eine Kontrolle der Versuchstiere vor dem Versuchsbeginn. Wie bereits erwähnt, steht die Ausbildung der ampullären Organe in Zusammenhang mit Faktoren wie Fischgesundheit, Haltungsbedingungen des Versuchstiers etc. Deshalb wurden routinemäßig alle Versuchstiere vor Experimentalbeginn generell untersucht und nur »gesunde« Tiere den Versuchen unterzogen. Kriterien dieser Untersuchung waren erstens morphologischer (Zahl und Verteilungsmuster der Ampullen, Sichtbarkeit und Form von Ampullenbecher und Porus, Zahl und morphologisches Erscheinungsbild der

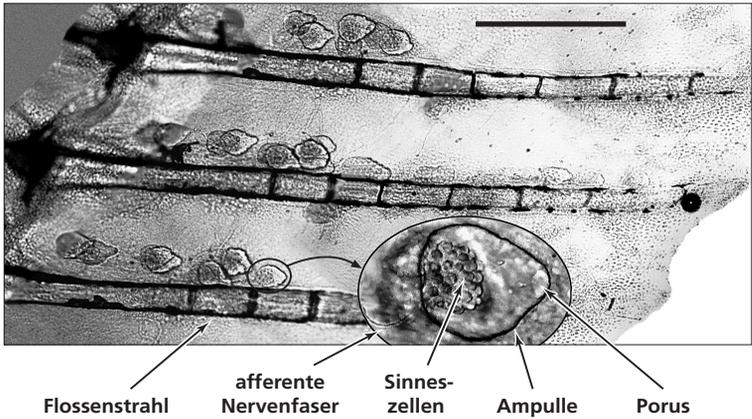


Abb. 5.2.2 Ampullärer Elektrorezeptor bei Kryptopterus bicirrhus, Mikrophotographie, Balken \triangleq 500 μ m (aus: Roth & Eschrich 1998).

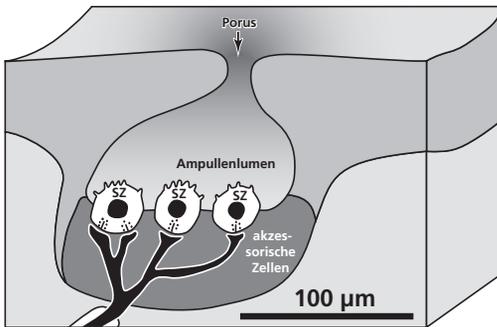


Abb. 5.2.3 Schematischer Querschnitt durch einen ampullären Elektrorezeptor am Beispiel Schilbe mystis (SZ = Sinneszelle).

Sinneszellen...) und zweitens physiologischer (hoch regelmäßige und frequenzkonstante Spontanaktivität von 40...80 Hz, gesunde, normaltypische und reproduzierbare Reizempfindlichkeit und Adaptation) Natur, wobei fast immer Fische, mit morphologisch gutem Befund auch einen hohen Anteil an Organen mit physiologisch regulärer Spikeaktivität und Empfindlichkeit aufwiesen, und somit die ver-

schiedenen Kriterien stark korrelierten. Durch diesen Vortest konnte sichergestellt werden, daß kein unnötiger Experimentalaufwand an nicht gesunden Tieren getrieben wurde, die von vorn herein keine erfolgreichen Messungen erlauben, und es konnte ausgeschlossen werden, daß geschädigte oder pathologisch veränderte Tiere in die Untersuchungen einbezogen wurden, die das Normalbild verzerren. Andere Selektionskriterien als diese wurden nicht angewendet, vor allem wurden von Organen bzw. Clustern, die diese Kriterien erfüllten, keine Experimentaldaten erfolgreicher Messungen nachträglich verworfen. Auffällig war die starke Konvergenz der Kriterien, die meist unzweifelhafte Entscheidungen zuließen. Bei allen physiologischen Experimenten wurde ausschließlich aus Ampullen der Analflosse (überwiegend aus deren craniobasaler Partie) abgeleitet; je nach Entwicklungszustand des Versuchstiers befinden sich dort in jeder Kammer zwischen zwei Flossenstrahlen meist ein oder zwei ausgedehnte Cluster vom Bäumchentyp, die für die Ableitversuche Verwendung fanden.

5.3 Allgemeines zur Methodik der Elektrophysiologie

5.3.1 Vorbemerkungen

Das elektrosensorische System der Welse läßt sich bereits mit relativ einfachen Mitteln untersuchen und die Erregung der afferenten Nervenfasern non-invasiv aus dem Ampullenlumen ableiten; es eignet sich deshalb auch sehr gut als Lehrversuch für Anfängerpraktika. Auch

wenn dieses Sinnessystem bereits seit mehr als 30 Jahren intensiv erforscht wurde, im peripheren Aufbau relativ einfach erscheint und scheinbar leicht mit exakten Stimuli erregt werden kann, gestalten sich exakt quantitative Untersuchungen dieses Rezeptorsystems besonders schwierig und werfen eine Reihe z.T. noch ungelöster und in der Literatur noch nicht beschriebener Probleme auf, von denen nur einige hier erwähnt werden sollen, soweit sie für die folgenden Experimente oder die Interpretation von Literaturdaten von Bedeutung sind.

Das ampulläre Rezeptororgan wird gemeinhin als Voltmeter oder Spannungsmesser beschrieben (z.B. Bennett 1967, 1971a+b, Bretschneider *et al.* 1991, Andrianov *et al.* 1996), da das Rezeptorsystem für ein physiologisches System als hochimpedant zu bezeichnen ist und damit nur sehr geringe Reizströme zur Stimulation erforderlich sind und außerdem den primären, die Transduktionskette auslösenden Schritt im Rezeptormechanismus nach vorherrschendem Verständnis des Rezeptorsystems der Potentialgradient über der basalen Sinneszellmembran darstellt, der für die Öffnung von Calciumkanälen verantwortlich ist und damit die Transduktionskette bis zu Erregung der afferenten Nervenfasern auslöst (Bennett 1971a+b, Bretschneider *et al.* 1991, Heijmen & Peters 1995, Andrianov *et al.* 1996). Aus Arbeiten wie Bretschneider *et al.* 1991 geht hervor, daß z.B. für *Kryptopterus bicirrhus* ein Stimulationsstrom von lediglich 0,2 pA/Hz am jeweiligen Rezeptororgan erforderlich ist, bei dem entsprechend 0,002 pA (oder 2 fA) durch die einzelne Sinneszelle fließen. Dies entspricht Werten bester Elektrometerverstärker von Präzisionsvoltmetern, die unter größtem technischen Aufwand in Speziallabors betrieben werden, und kommt dem Ideal einer stromlosen Spannungsmessung sehr nahe. Entsprechend dieser Charakterisierung sollten Spannungen bzw., da

es sich um exogene, in der Umwelt der Fische vorhandene Potentiale handelt, die über die Ausbreitungsstrecke im »Elektrolyten« abfallen, Potentialgradienten die adäquaten Stimuli darstellen, die auch im Experiment dem Fisch bzw. Teilen seines elektrorezeptiven Systems als Reize dargeboten werden sollten. Aus naheliegenden Gründen quantifiziert man seit längerer Zeit die Stimuli im Experiment fast ausschließlich über ihre korrespondierende Stromkomponente bzw. bei großräumiger, weitgehend homogener Stimulation über ihre Reizstromdichte (z.B. Peters & Bretschneider 1972, Bullock & Fessard 1974, Finger 1986, Bretschneider *et al.* 1991), da beide Größen (Potentialgradient und Stromdichte) bei Kenntnis der Leitfähigkeiten über das Ohmsche Gesetz für homogen durchflossene Volumenleiter (bei homogenen Feldverhältnissen) ineinander überführt werden können (Bretschneider & Peters 1992). Im gesamten Stimulationstromkreis am Beispiel einer lokalen Stimulation bei geerdetem Fischrumpf, der vereinfacht als Serienschaltung der Widerstände im Elektrolyten, der Fischhaut (mit parallel geschaltetem Rezeptororgan, das jedoch nur einen sehr geringen Anteil an der Körperoberfläche einnimmt) und des Fischkörpers aufgefaßt werden kann, stellt die Leitfähigkeit des Umgebungsmediums des Fisches die Hauptvariable dar (die anderen Parameter sind konstant oder unterliegen bei Süßwasserfischen weitgehender Homöostase). Da der parallelgeschaltete Komplex aus Haut- und Organwiderstand um mehrere Größenordnungen über den anderen Widerständen liegt, stellt er bei gegebener Prägespannung den strombestimmenden Faktor dar und besitzt somit auf die im Rezeptororgan perzipierten Spannungen kaum einen Einfluß. Diese werden von der exogenen (niederimpedanten) Spannungsquelle bestimmt, die entsprechend dem Widerstand des Gesamtsystems einen gewissen

Strom liefert und dem Rezeptororgan den Stimulus aufträgt. Da jedoch die Umgebungsleitfähigkeit in erheblichen Grenzen variieren kann, wird sich der letztendlich maßgebliche Potentialgradient über der basalen Sinneszellmembran entsprechend dem Produkt $R \cdot I$ des ihn durchfließenden (minimalen) Stroms einstellen, der entlang eines unverzweigten Pfades invariant ist und besser von dessen Stromdichte als von dem davon unabhängigen, mit den Umgebungsparametern variierenden Potentialgradienten im Wasserkörper beschrieben wird, der zusätzlich noch von dessen Konduktanz abhängt (wird in der Literaturangabe der Potentialgradient angegeben, so kann dieser nicht ohne den Wert der Wasserleitfähigkeit interpretiert werden). Aus diesem Grunde ist die Angabe des Reizstroms bzw. der Reizstromdichte der verlässlichere und besser vergleichbare Parameter (Bretschneider & Peters 1992), der in der Literatur seit längerer Zeit fast durchgängig verwendet wird. Ein weiterer Grund ist technischer Natur: Stimulusströme lassen sich weit besser kontrollieren und quantifizieren und vermeiden verschiedene Probleme an den Stimulationselektroden, die bei Spannungsstimuli zwangsläufig auftreten und jede Quantifizierung des Reizes auf direktem Wege ohne Verwendung aufwendiger Elektroden und Potentiostaten mit Vierpunktregelung und -messung (s.u.) a priori verhindern.

5.3.2 Allgemeines zur Systemvariabilität

Die individuelle Empfindlichkeit eines einzelnen ampullären Rezeptors variiert innerhalb einer großen Bandbreite von 40...50 dB (Bretschneider *et al.* 1980, 1991, Peters & Mast 1983, Bretschneider & Peters 1992, Heijmen & Peters 1995), die mindestens auf drei entschei-

dende Faktoren zurückzuführen ist (abweichende und genauere Differenzierung ist möglich): (1) interindividuelle Unterschiede der Rezeptorempfindlichkeit (darunter dürften z.B. die »Vorgeschichte« des Individuums mit dessen Haltungsbedingungen, Gesundheitszustand, Art und Stärke der Stimuli im natürlichen oder künstlichen Umfeld des Fisches und damit der »Trainingszustand« der Rezeptoren, aber auch genetische und sonstige, auf anderen Faktoren beruhende evtl. nicht erklärbare interindividuelle Unterschiede fallen), (2) systematische intraindividuelle Unterschiede (je nach Lage des einzelnen Rezeptors auf dem Fischkörper, dessen elektrisches Leitfähigkeits- bzw. Widerstandsmuster eine gravierende Störung der weitgehend parallelen Feldlinien im homogenen Wasserkörper darstellt; aus diesem Grunde ist z.B. ein Vergleich von Ampullen verschiedener Körperregionen nicht zulässig, wie eigene abschätzende Untersuchungen mit Feldmikrosonden belegen), (3) nicht-systematische intraindividuelle Unterschiede (jedes Rezeptororgan besitzt nach eigenen Beobachtungen individuelle in weiten Grenzen von typ. 20 dB und darüber variable Empfindlichkeiten; hierunter fallen u.a. Zahl und Empfindlichkeit der Sinneszellen, geometrische Faktoren der Ampullen und Pori, wie sie u.a. auch in Bretschneider *et al.* 1980, Peters & Mast 1983, Heijmen & Peters 1995, u.a. angesprochen werden). Dies bedeutet, daß vergleichende Aussagen zwischen verschiedenen, selbst benachbarten Ampullen oder während der Ontogenese des Fisches und der dabei auftretenden Vergrößerung der Cluster oder der Organ- und Clusterneubildung nach Hautresektion gemäß eigenen Erfahrungen nur mit großer Vorsicht interpretiert werden sollten. Es ist deshalb für exakt quantitative Untersuchungen notwendig, entweder den individuellen Rezeptor zu charakterisieren, bei statistischen Aussagen zwischen Untersuchungs-

und Kontrollgruppe jegliche systematische Unterschiede sorgfältigst auszuschließen oder auf absolute Aussagen zu verzichten, jeden Rezeptor zu normieren und nur relative Veränderungen über einen vergleichsweise kurzen Experimentalzeitraum von einigen Minuten zu untersuchen.

5.3.3 Stimulationsfeldbedingungen

Will man reproduzierbare und vergleichbare Empfindlichkeitsdaten produzieren, ist es unverzichtbar, sich mit den Stimulationsbedingungen genauer auseinander zu setzen.

1. Homogenfeldstimulation. Sie stellt die scheinbar am einfachsten zu realisierende Methode dar, deren Ergebnisse am besten vergleichbar sind mit Empfindlichkeitswerten aus Verhaltensversuchen (die natürlich aufgrund der neuronalen Integration und Verarbeitungen andere Werte liefern), da sie unter vergleichbaren Stimulationsfeldbedingungen gewonnen werden können. Hierfür ist prinzipiell nur ein Rechteckbecken mit Dimensionen erforderlich, die »hinreichend groß« gegenüber dem Fischkörper sind (der Fischkörper muß auch »hinreichend tief« unter der Wasseroberfläche liegen), mit »nicht-polarisierbaren« Plattenelektroden, die in zwei gegenüberliegende Seiten des Trogs eingelassen sind und diese vollständig bedecken und eine Fischhalterung, die keine Deformation des Feldes hervorruft. In der Praxis erweist sich das Problem der Fischhalterung wie auch der Einführung der Ableitelektrode als relativ schwierig lösbar; auch Ausrichtung des Fischkörpers und Zugänglichkeit der Ampullen ist bei dieser Anordnung sehr ungünstig. Deshalb wurde eine Vertikalanzordnung entwickelt, die für diese Experimente besser geeignet ist.

Eine Konstruktion des Fischhalters aus einem massiven Festkörper sollte vermieden werden, da diese praktisch immer eine andere Konduktanz als das Umgebungswasser aufweist. Gerne wird hierfür ein Isolator als Träger verwendet, der jedoch die Feldlinien verdrängt und im Nahbereich kaum kontrollierbare Feldverhältnisse schafft (eine Tierfixierung mittels Präpariernadeln, wie sie hierbei gelegentlich verwendet wird, hat unbedingt zu unterbleiben). Selbst ein dünner, poröser Tonträger verzerrt bereits deutlich die angelegten Felder und macht nach eigenen Messungen den Potentialgradienten um ca. 50...80% steiler als im freien Wasserkörper. Konstruktiv konnte dieses Problem in Vorversuchen am besten durch eine Fadenhalterung gelöst werden, die aus jeweils ca. 10 Fäden auf beiden Rumpfsseiten des Fisches quer zu dessen Längsachse besteht. Als Fadenmaterial wurden spezialversponnene Aramidfasern (Kevlar®-Garn Typ 139Ht, 560dtex Filamentflachgarn), die freundlicherweise unentgeltlich von der Fa. DuPont, CH-1218 Genf, Schweiz, für diese Versuche zur Verfügung gestellt wurden, eingesetzt, da dieses Fadenmaterial die mit Abstand besten Eigenschaften hinsichtlich geringer Lastdehnung und nahezu völliger Feuchteresistenz (Feuchtedehnung unter 0,1%) aufweist. Mit dieser Art der Tierhalterung konnte bei Vermeidung von Erschütterungen und Strömungen im Wassertrog eine nahezu ideale Fixierung des Tieres gewährleistet werden. Es konnten mit dieser Befestigungsmethode in Vorversuchen mehrere stabile Ableitungen über z.T. mehr als eine Stunde durchgeführt werden. Auch der Halter für die Ableitelektrode muß geerdet und aktiv geschirmt (»actively driven shield«), vollständig und wasserdicht elektrisch isoliert, tauchbar und schlank sein, um die Messung möglichst wenig zu beeinflussen. Die Feldverzerrung durch den Fischkörper ist dem physiologischen Sy-

stem immanent und tritt in gleicher Weise auch unter natürlichen Bedingungen auf. Die Fischhaut besitzt einen relativ hohen elektrischen Widerstand, weshalb elektrische Felder vom Fischkörper eher verdrängt werden. Bevorzugte Ein- bzw. Austrittsorte für Feldlinien stellen Maul und Kiemenspalten dar, die über u.a. die Kiemenepithelien niederimpedant mit dem Körperinneren des Fisches in Verbindung stehen. Daraus resultieren systematische Unterschiede in der Empfindlichkeit ampullärer Organe in verschiedenen Regionen des Fischkörpers, die physiologischen Ursprungs sind und bei der korrekten Auswertung von absolut-quantitativen Versuchsdaten u.U. berücksichtigt werden müssen.

2. Lokalstimulation. Hierbei wird eine irgendwie geartete Elektrode (z.B. Kugelelektrode, Hufeisenelektrode, Ringelektrode) in die Nähe der Ableitstelle gebracht und der Fischrumpf geerdet. Experimentell ist dieser Aufbau sehr einfach zu realisieren, jedoch muß hier die Stimulusintensität, falls erforderlich, auf anderem Wege (z.B. Potentialdif-

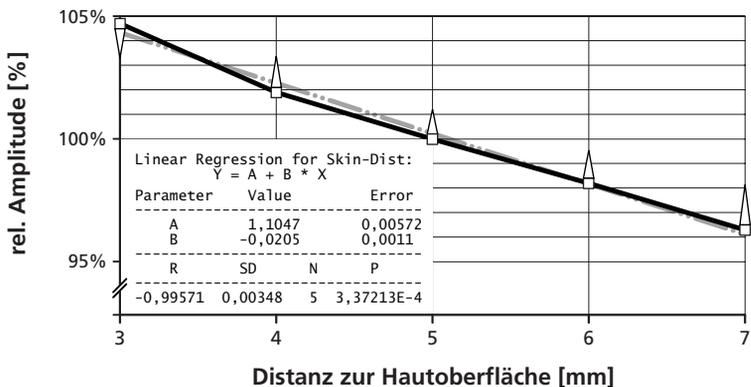


Abb. 5.3.1 Einfluß der Distanz zwischen Stimuluselektrode und Hautoberfläche bei Lokalstimulation (Fehlerdreiecke = Standardabweichung, $n = 12$).

ferenz über der Fischhaut, Spannungshub im Ampullenlumen) bestimmt werden, da die Feldverhältnisse hierbei nicht zu kontrollieren sind. Der Einfluß der Elektrodenposition ist bei einem Abstand von 5 ± 1 mm äußerst gering und beträgt nach eigenen Messungen 2,1%/mm (SEM, $n = 12$).

Bei dieser Art der Stimulation sollte – im Gegensatz zum vorher gesagten – der Stimulus nicht über seine Stromkomponente quantifiziert und vor allem nicht mit anderen Experimenten unter abweichenden Bedingungen verglichen werden, da – wie sich in Vorversuchen Hinweise ergaben – die Stimulusintensitäten deutlich differieren können. Kann die Stimulusintensität jedoch definiert und meßortnah über die hervorgerufene Potentialdifferenz erfaßt werden, so stellt diese Methode den einfachsten und direktesten Weg zur Bestimmung der Eigenschaften des ampullären Elektrozepptors auf der Ebene der Einzelorgane bzw. Cluster dar.

3. Current Clamp Stimulation. Diese zunächst bestechend einfache und exakte Methode (verwendet u.a. in Peters & Mast 1983) wurde ebenfalls bei Vorversuchen genauer analysiert. Sie geht davon aus, daß durch ein Hautareal definierter Größe ein kontrollierbarer («clamped» = »geklemmter«) homogener elektrischer Strom hindurchgeschickt wird. Konstruiert man – wie in Peters & Mast 1983 – eine kleine Stimulationskammer, die auf die Fischhaut aufgepreßt wird und gegen die Umgebung mit einem Silikongummiring abdichtet, so ergeben sich im Experiment zwei Probleme: Erstens übt diese Vorrichtung Druck auf die Fischhaut um die Ableitstelle aus, der sich diffus über das Gewebe bis zu den Sinneszellen fortpflanzen kann und diese meßbar beeinflusst (diese Irritation der Sinneszellen läßt sich durch Trennung der Tierfixierung von der Kammervorrichtung erreichen; die Abdich-

tung kann in diesem Fall über auf den Silikongummiring aufgetragenes hochviskoses Silikonfett gewährleistet werden). Zweitens stellt diese Kammer ein sehr kleines, vom großen Wasserkörper der Umgebung abgetrenntes Teilvolumen dar, das in der Größenordnung von $0,1 \text{ cm}^3$ liegt. Die Stimulations- und Ableitbedingungen, Temperatur und Ionenkonzentration verändern sich in diesem winzigen Volumen so schnell, daß im Minutenbereich während eines Experiments keinesfalls von einer Konstanz ausgegangen werden kann. Zur optimalen Homöostase der Umgebungsbedingungen wurde sogar für das »große« Ableitbecken mit ca. $50 \dots 100 \text{ cm}^3$ Volumen ein Durchflußhomöostat erprobt und bei einigen Experimenten eingesetzt, da sich während längerer Versuchsdauer Ionenkonzentrationen wie Temperatur im Ableitbecken in ergebnisrelevanten Dimensionen änderten. Da eine starke Temperaturabhängigkeit des ampullären Elektrozepors bekannt ist (in eigenen Vorversuchen wurde z.B. bei 25°C eine Temperaturabhängigkeit der Ruheaktivität bei *Schilbe mystis* von $11,5 \pm 3,1$ (SD) $\%/^\circ\text{C}$; $n=6$ Versuchstiere; entsprechend einem Q_{10} von

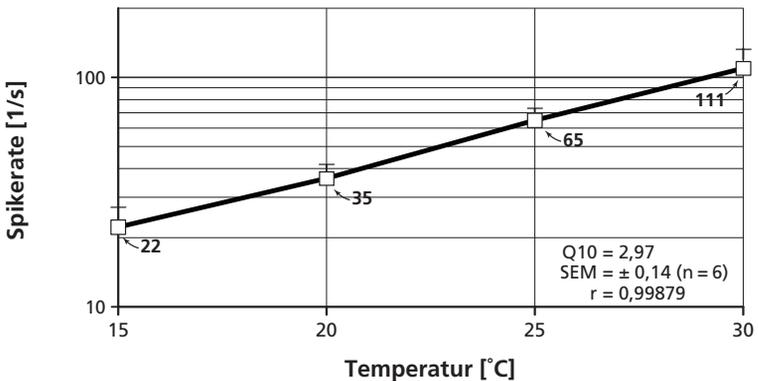


Abb. 5.3.2 Abhängigkeit der Spontanaktivität von der Wassertemperatur, *Schilbe mystis* (Fehlerbalken = Standardabweichung, $n = 6$).

2,97 ermittelt), wurde die Temperatur bei den Experimenten miterfaßt und auf $\pm 1^\circ\text{C}$ konstantgehalten. Falls die Raumtemperatur nicht der Wassertemperatur von 25°C entspricht, muß stets eine rasche Angleichung von etwa der halben Differenz zwischen Wasser- und Umgebungstemperatur pro 10 Minuten bei einer Wasserhöhe von 10 mm im Becken berücksichtigt werden. Das bedeutet bei einer Raumtemperatur von 21°C also ca. einen Temperaturabfall von etwas über 1°C in 5min!

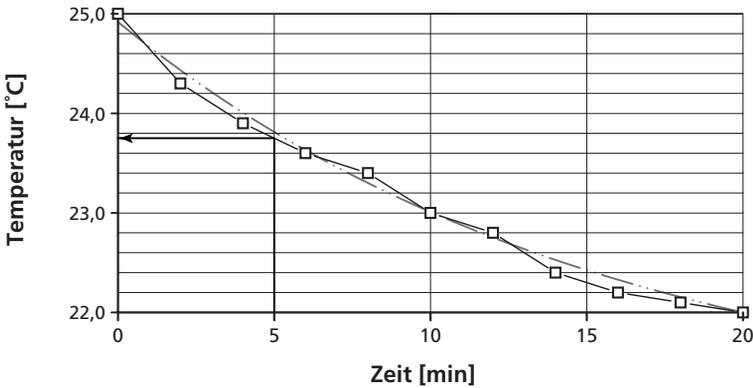


Abb. 5.3.3 Abkühlungsgeschwindigkeit von 100 ml Wasser in temperiertem Massiv-PMMA-Becken in 10 mm Schichthöhe bei 21°C Raumtemperatur.

4. Lumen Clamp Stimulation. Hierbei wird die kombinierte Stimulations- und Ableitelektrode in das Ampullenlumen eingeführt (z.B. Bretschneider *et al.* 1991) und am Ampullenporus abgedichtet. Diese Abdichtung geschieht mechanisch und durch Austausch des Umgebungsmediums durch einen Isolator wie Silikonöl oder deionisiertes Wasser. Die Anwendung von Silikonöl birgt jedoch das Risiko

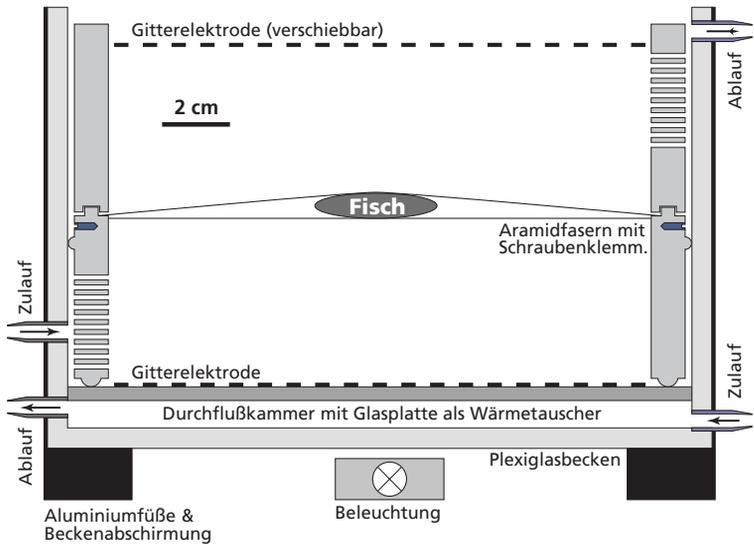
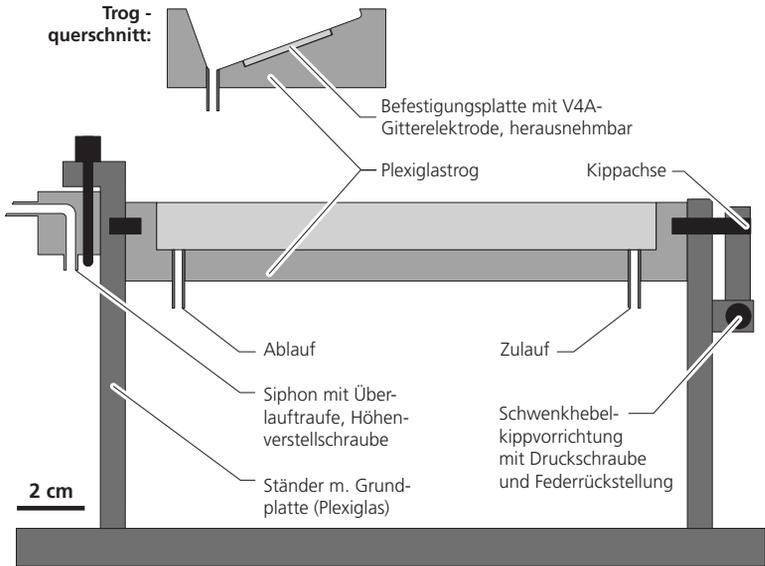
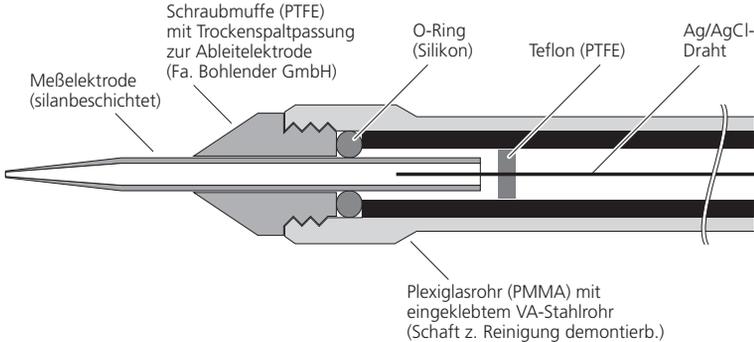


Abb. 5.3.4 Schwenkbare Ableitbecken für Lokalstimulation (links oben)

Abb. 5.3.5 Becken für Homogenfeldstimulation (links unten)

Abb. 5.3.6 Tauchbarer Elektrodenhalter (diese Seite unten);

Beschreibung siehe Text



der unkontrollierten Veränderung der Ionenkonzentration durch Sezernierung von Kaliumionen in den Ampullenbecher (neben einem evtl. Kaliumleckstrom aus der Elektrodenspitze), der nun nicht mehr über den Porus mit dem Umgebungswasser in Verbindung steht, wodurch sich so das dynamische Ionengleichgewicht verändert. In Anbetracht der hohen Empfindlichkeit und Isolationswiderstände der Sinneszellen und Wandstrukturen im Ampullenbecher (Stimulationsstrom von $0,2 \text{ pA/Hz}$ am jeweiligen Rezeptororgan, s.o.) sind Restleckströme, die über den ionenhaltigen Wasserfilm aus dem Porus austreten und an der ebenfalls ionenabsondernden, feuchten Fischhaut »entlangkriechen«, wie auch Leckströme durch den Elektrodenschaft, kaum zuverlässig zu unterbinden oder zu quantifizieren.

Durch intelligente Kombination verschiedener Stimulationsmethoden mit der Erfassung möglichst vieler elektrischer Parameter

(Spannung, Strom, Widerstand), kann ein tieferes Verständnis des elektrosensorischen Systems gewonnen werden, wobei die Gefahr von falschen Ergebnissen und Fehlinterpretationen wegen Artefakten, systematischen Fehlerquellen beim intraindividuellen Vergleich (s.o.) und unzulässigen Deutungen von Ergebnissen, die unter unterschiedlichen Bedingungen gewonnen wurde (s.u.), sehr groß ist.

Diese kurze Aufstellung gängiger Stimulationsmethoden und einiger wichtiger Probleme wurde für das ursprüngliche Promotions-thema (»Physiologische Charakterisierung der Konvergenzbildung im elektrosensorischen System clusterbildender Weise«) experimentell und theoretisch erarbeitet und zusammengestellt und dient dieser Arbeit als wichtige Grundlage zur Versuchsdurchführung und Analyse von Fehlerquellen sowie als Hintergrundwissen für die Diskussion von Literaturergebnissen; sie soll außerdem einen kleinen Einblick in die Schwierigkeiten exakt-quantitativen Arbeitens vermitteln. Deshalb wurde bei den Experimenten dieser Arbeit stets mit relativen Stimulusintensitäten gearbeitet, die unter minimaler Beeinflussung und größtmöglicher Konstanz der Bedingungen gewonnen wurden.

5.3.4 *Stimulations- und Erdungselektroden*

In den Literaturarbeiten wurden fast stets als Stimulations- und als Referenzelektroden Ag/AgCl-Elektroden eingesetzt. Diese sollen als Elektrode zweiter Art eine stabile Halbzelle bilden, die konstante Experimentalverhältnisse während der Versuchsdauer gewährleistet. So etabliert und – bei richtiger Anwendung – bewährt diese Methode bei der Kontaktierung des Elektrolyten in der Ableitelektrode ist, erscheint dieser Elektrodentyp für den Einsatz als Stimulations- und als

Referenzelektrode weniger geeignet (Instandhaltungsaufwand nach jedem Experiment, hohe Übergangswiderstände, starke Strompolarisierung, die Messung u.U. beeinflussende Photosensibilität der AgCl-Schicht durch photoelektrischen Effekt, geringe Strombelastbarkeit 1 nAh/mm^2 , geringe Stabilität in chloridarmem Milieu; Ives 1969, Lavallee 1969, Geddes 1972, Purves 1981, Smith 1985, Ogden 1994). Deshalb ist eine potentialstabile Metallelektrode erster Art mit möglichst großer Oberfläche, die all diese Probleme nicht aufweist, einer Ag/AgCl-Elektrode klar vorzuziehen. Platin ist bekanntermaßen für diesen Einsatzbereich sehr geeignet, aber extrem teuer. V4A-Stahl (säurebeständiger, hochnickellegierter Chrom-Nickel-Stahl) hat sich als »Platinersatz« bestens bewährt und weist in dieser Anwendungssituation ähnliche Vorteile wie das Edelmetall auf (V2A-Stahl ist weitaus leichter zu beschaffen, jedoch sind seine Eigenschaften weit von denen des Platins oder von V4A-Legierungen (und höher) entfernt). Trotzdem sollte auch hier zu Stimulationszwecken eine spannungsgesteuerte Stromquelle eingesetzt oder – falls Potentialgradientenstimulation angewendet werden soll – auf einen 4-Punkt-Potentiostaten zurückgegriffen werden. Das Stimulationsgerät sollte frei von Störungen und Trägerfrequenzen sein, über einen Trennverstärker vom Signalgenerator »galvanisch« getrennt sein und einen bezugspotentialfreien Differenzstromausgang besitzen (für Potentialgradientenstimulation entsprechend: Differenzspannungsausgang mit einem hochohmigen Differenzspannungsfühler-Steuereingang).

Im Falle einer Homogenfeldstimulation zeigte sich ein weiterer Aspekt, der unbedingt zu berücksichtigen ist: Im Ableittrög befinden sich (ohne Meßelektroden) stets drei Elektroden: die beiden Stimulationselektroden und eine kombinierte Erdungs- und Signal-

bezugselektrode. Letztere hat die Funktion, als Erdungselektrode elektrische Störungen abzuleiten und zu neutralisieren und das Bezugspotential der Messung bereitzustellen. Dabei ist bei den meisten kommerziellen elektrophysiologischen Verstärkern genau zu beachten, daß sich der Ort der Ableitung äquipotential zur Signalbezugselektrode befindet, da die Stimulationspotentiale durch Elektrodengrenzschichtphänomene (die bekanntlich zu starken Verzerrungen des Potentialgradienten führen) um mehrere Größenordnungen über den zu messenden Potentialen liegen können und damit die Eingangsgleichtaktspannungsunterdrückung (»common mode rejection ratio« = CMMR) des Ableitverstärkers überlasten und diesen in die Sättigung treiben. Aus dieser Notwendigkeit heraus zum Einsatz einer dritten Erdungs- und Bezugselektrode, die großflächig und in der Nähe des zu untersuchenden Rezeptororgans lokalisiert sein muß, resultiert eine neue Schwierigkeit, da diese Elektrode einen stark feldverzerrenden und damit die Empfindlichkeitsmessung störenden Einfluß ausübt, trotz ihrer relativ geringen Effizienz. Abhilfe konnte durch einen sehr leistungsfähigen spannungsgesteuerten Stromkonverter mit selbstzentrierendem bezugspotentialsymmetrischem Ausgang und »Feedback-Sense«-Elektrode (Rückkopplungselektrodenfühler) geschaffen werden, die aktiv auf virtuelles Nullpotential geregelt und stabilisiert wird. Dadurch können Störungen im gesamten Wasserkörper des Trogs über die beiden großflächigen Stimulationselektroden optimal neutralisiert und gleichzeitig der Ableitort exakt auf virtuellem Bezugspotential gehalten werden, wobei sich eine echte, zusätzlich störungsmindernde Differenzmessung realisieren läßt.

5.3.5 Stimulationsgeräte

Die Anforderungen an ein Stimulationsgerät ergeben sich weitgehend aus dem vorher Gesagten. Das Gerät muß die gewünschte Signalform störungsfrei und mit entsprechender Amplitude generieren und mittels eines geeigneten Trenngeräts (optisch, galvanisch, kapazitiv, fm-codiert oder digital) getrennt in den abgeschirmten Ableitbereich übertragen, muß einen spannungsgeregelten Stromausgang besitzen und sollte im Falle der Homogenfeldstimulation auch darüber hinaus die im letzten Abschnitt genannten Forderungen erfüllen. Das zu Beginn der Arbeit während der Vorversuche eingesetzte Stimulationsgerät der Fa. Hugo Sachs Modular Typ 215/I mit Reizisoliereinheit O-10 (Hugo Sachs Elektronik & Harvard Apparatus GmbH, D-79232 Hugstetten/March, Deutschland) ist hierfür (je nach Art der Messung) kaum geeignet, da es keine hinreichenden Werte für die Störsicherheit gewährleistet, das Trenngerät durch die hF-Amplitudenmodulation hochfrequente Störungen in das Ableitsystem überträgt, die dort durch Demodulation in andere Frequenzbänder verschoben werden können, quasionische Rechteckreize von mehreren hundert Millisekunden oder Sekunden nicht akkurat über die Reizisoliereinheit reproduzieren kann, für Sinusstimulation oder andere Reizformen und -parameter nicht geeignet ist und keinen spannungsgesteuerten Stromausgang besitzt. Deshalb wurden nach Maßgabe der experimentellen Erfordernisse entsprechende Module konzipiert und getestet, die von beliebigen Signalgeneratoren gespeist werden können (wurde jedoch für die Messungen nicht fertiggestellt, da letztendlich nur geringere Anforderungen an die Stimulationsseite gestellt wurden). Die Schaltpläne, Stücklisten und Layouts der entwickelten Geräte sind

im Abschnitt Gerätebaupläne enthalten. Auf die verschiedenen Signalformen sei an dieser Stelle nicht näher eingegangen und nur erwähnt, daß sinusförmige Stimuli etabliert und optimal geeignet sind, um bei computergestützter Erfassung und Auswertung der Meßergebnisse z.B. die Systemempfindlichkeit schnell und präzise zu ermitteln. Außerdem vermeidet diese Signalform die Transientenbildung, Polarisierungsphänomene und andere Elektrodenprobleme und Artefakte. Da die Messungen der vorliegenden Arbeit manuell erfaßt wurden, fand die traditionelle Stimulationsmethode des Systems mit quasistatischen Rechteckreizen Anwendung. Bei den Experimenten mit Doppelableitungen war nur eine relative, grob quantifizierbare Stimulationsquelle erforderlich. Deshalb wurde für diese Experimente wieder ein einfaches Batteriestimulationsgerät mit Potentiometerregelung und manueller Reizauslösung eingesetzt, da dieses weit weniger Probleme in dieser experimentellen Situation bereitete als das Stimulationsgerät der Fa. Hugo Sachs Elektronik. Um Elektrodenartefakte und andere Störungen zu verringern, wurde ein Stabilisationswiderstand von 56 kOhm (bei einigen Experimenten auch 300 kOhm bei entsprechend erhöhter Stimulationsspannung) eingesetzt. Da die Stimulusintensität an der Elektrode mittels Digitalmeßgerät kontrolliert und für die Auswertung normiert wurde und der Aufbau innerhalb der zu vergleichenden Versuchsserien unverändert blieb, ist dieses Vorgehen bei den Versuchen dieser Arbeit unkritisch. Stimulusdauer und -timing wurden störungsfrei via LED und Lichtleiter aus dem Abschirmkäfig übertragen und mittels Selen-Photodetektor gewandelt und auf einem weiteren Oszilloskopkanal dargestellt oder direkt per Videoerfassung zusammen mit einer LCD-Uhr als Zeitgeber und dem Oszilloskopschirmbild zur späteren Auswertung aufgezeichnet.

5.3.6 Abschirmung und Störungskontrolle

Wie in umfangreichen Vorversuchen festgestellt werden konnte, stellen in diesem System elektromagnetische Einstreuungen eine in zweifacher Hinsicht tückische Fehlerquelle dar. Im Vergleich zu klassischen intrazellulären Ableitungen aus der Nervenfaser sind die Signale hier z.T. um mehr als vier Größenordnungen oder mehr als 80 dB geringer. Dies erfordert im Vergleich zu Intrazellulärableitungen andere Abschirm- und Ableitungstechniken. Bei der Abschirmung ist besonders zu beachten, daß elektrostatische Einstreuungen aufgrund der Signalpegel und Widerstandsbedingungen deutlich größere Anforderungen an die Abschirmmaßnahmen stellen. Bei Doppelableitungen verschlechtert sich die Situation deutlich (das Störspektrum verändert sich und der Störpegel steigt im Vergleich zu einer optimierten Einzelableitung auf mehrfach höhere Werte an). Dies resultiert aus einem weit schwerer zu kontrollierenden Problemkomplex der induktiven Einstreuungen, dem bei Doppelableitungen kaum mit der Minimierung der aufgespannten Induktionsflächen beizukommen ist, da die beiden Schenkel des Y-förmigen Ableitpfades mit der Signalbezugsleitung aufgrund der geometrisch vorgegebenen Platzierung der Mikromanipulatoren beiderseits des Ableittroges drei großflächige Induktionsschleifen aufspannen, wobei diese Störungen wegen der sehr geringen Signalpegel um rund 80 dB besser unterdrückt werden müssen als dies bei typischen intrazellulären Messungen der Fall ist. Gegen das Problem induktiver Einstreuungen hilft bekanntermaßen ein Faraday-Käfig nur wenig; eine möglichst weite räumliche Entfernung der Induktionsquellen (Störfeldstärke verringert sich entsprechend dem Kehrwert des Abstands und nicht mit dessen Quadrat, wie

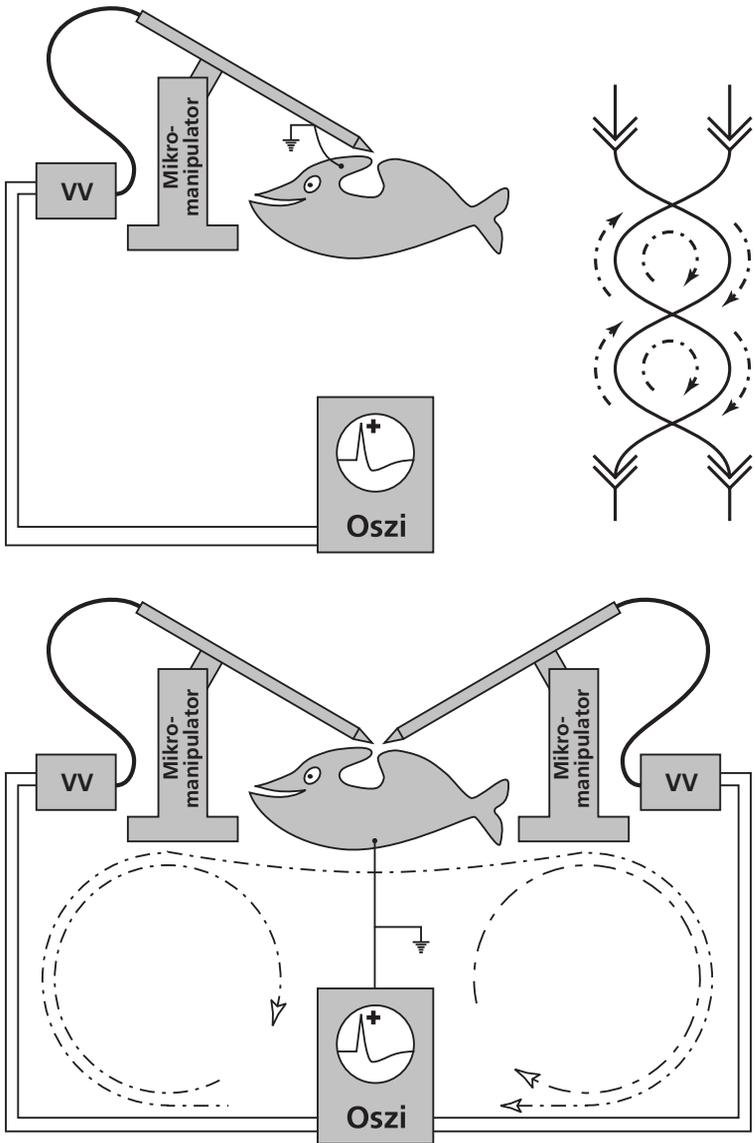


Abb. 5.3.7 Schemaabbildung zu den Induktionsproblemen bei Doppelableitung. Rechts oben: Prinzip der twisted-pairs-Anordnung – siehe Text.

bei elektrostatischen Störungen), Ausrichtung der Leiter im Versuchsaufbau, u.U. der Einbau von Kompensationsschleifen durch Leiterkreuzung zur Erzielung einer Gegeninduktion (sog. »twisted pairs«-Anordnung) und die Lokalisation auf einer massiven Stahlplatte tragen jedoch zu weiterer Reduktion dieser Störungskomponente bei.

5.3.7 Interspike-Intervall-Variabilität durch exogene Störungen

Nach eigenen Beobachtungen zum Rezeptorrauschen an *Schilbe mystis* liegt die Interspike-Intervall-Variabilität bei sorgfältig durchgeführten Experimenten unter weitgehender Ausschaltung elektromagnetischer Einstreuungen äußerst niedrig und weit unter den Werten, die in den Arbeiten der Utrechter Arbeitsgruppe für *Ictalurus nebulosus* LeS publiziert wurden (Bretschneider *et al.* 1980, Teunis *et al.* 1991, u.a.). Auch im Überblick über zahlreiche andere Arbeiten am Elektrorezeptor insbes. von Bennett, Roth und anderen sind Fluktuationen der von Bretschneider und Teunis publizierten Größenordnung nicht bekannt. In eigenen Experimenten mit *Schilbe mystis*, *Physalia spec.* und *Kryptopterus bicirrhis* konnte festgestellt werden, daß vergleichbar große Fluktuationen im Interspike-Intervall stets auf exogene Störungen zurückzuführen waren, die über die Stimulations- und/oder Ableitelektroden eingekoppelt wurden und die Organe beeinträchtigten oder auf Tiermaterial in schlechtem physiologischen Zustand beruhten (bei sehr sorgfältig durchgeführten und von Störungen abgeschirmten Experimenten mit Fischen, deren Ampullen gesund ausgebildet waren, traten bei den Messungen besonders geringe Interspike-Intervall-Fluktuationen auf; deshalb wurde dieses Kriterium auch als Indikator

für optimale, idealtypische Experimente angesehen, während stark variierende Interspike-Intervalle stets auf Fehler hinwiesen). Über die Ableitelektrode in das System eingeführte Störungen würden sich u.U. in einer konvergenzunabhängigen Interspike-Intervall-Fluktuation manifestieren und damit auch die unter den Erwartungen des Nyquist-Kriteriums liegende Zunahme der Rezeptorrauschdichte mit steigender Clustergröße erklären, wie sie z.B. von Peters & Mast (1983), Peters & van Ieperen (1989), Teunis *et al.* (1990b), Bretschneider & Peters (1992), Peters *et al.* (1997a) gefunden wurde und nicht konsistent und schlüssig erklärt werden konnte. Widersprüchliche Schlußfolgerungen, wie sie aus Arbeiten wie Bretschneider *et al.* (1980) gezogen werden müssen, der eindeutig eine präsynaptische Rauschquelle postuliert, während andere Arbeiten (z.B. Peters & van Ieperen 1989, Peters *et al.* 1997a) klar zu dem Ergebnis gelangen, daß die Quelle des Rauschens erst hinter dem Integrationspunkt lokalisiert sein kann, der – in Übereinstimmung mit konvergenzabhängigen Befunden zur Empfindlichkeitsaddition (*ibid.*) und in der Zusammenschau der Ergebnisse von Arbeiten wie Peters & Mast (1983), Teunis *et al.* (1990b & 1991), Sanchez & Zakon (1991) – wie auch den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wiederum in der gemeinsamen Afferenz lokalisiert sein muß, wären mit der Annahme exogen induzierter Störungen potentiell erklärbar. Da unsere Experimente jedoch unter abweichenden Versuchsbedingungen an einer anderen Spezies durchgeführt wurden, sind sie möglicherweise nicht zur Interpretation dieser publizierten Rauschdaten geeignet.

Auch mechanische Erschütterungen und Vibrationen stellen eine gravierende Störquelle dar, deren Bedeutung nicht zu unterschätzen ist. Bereits geringste Relativbewegungen zwischen Fisch und Ableit-

elektrode von wenigen Mikrometern führen durch eine minimale diffuse Druckfortpflanzung über den Ampullenporus bis zum Sinnesepithel zu einer nachweisbaren, geringfügigen Modulation der Sinneszellaktivität und damit der Spikerate. Deshalb sollte der gesamte Versuchsaufbau bestmöglich von Erschütterungen freigehalten werden (es konnte eindeutig festgestellt werden, daß die Qualität einer großen Zahl von Messungen durch mechanische Erschütterungen erkennbar verringert wurde, auch wenn hierüber keine exakten quantitativen Angaben gemacht werden können).

5.3.8 Ableitelektrode

An dieser Stelle seien einige Überlegungen zur Beschaffenheit der Ableitelektroden angeführt. Prinzipiell sind – wie aus der Literatur bekannt – sowohl Metall- wie auch Glasmikroelektroden für endoluminale Ableitungen geeignet. Da die Technik der Ableitung mit Glasmikroelektroden in der Arbeitsgruppe bereits etabliert war, wurden sie auch für alle Messungen der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Der ideale Elektrodendurchmesser orientiert sich am Porusdurchmesser des ampullären Elektrorezeptors, der im Mittel bei den verwendeten Versuchstieren der Spezies *Schilbe mystis* zu 15 μm (12...20 μm) bestimmt wurde. Die Ampullen bestehen nach Kramer (1996) aus einem mit elektrisch gut leitender Gallerte gefüllten Ampullenbecher, der von Wänden mit sehr hohem elektrischen Widerstand (Bretschneider *et al.* 1991) umgeben ist und über den Porus mit der Umwelt in Verbindung steht. Der Außendurchmesser der Elektrodenspitze sollte nun einerseits hinreichend dünn sein, um ohne mechanische Irritationen und Druckausübung auf die umgebenden Gewebe und damit indirekt

auf die Rezeptorzellen in das Ampullenlumen eingeführt werden zu können, andererseits den Ampullenporus möglichst vollständig abdecken, um das sog. »Shunting«, das Abfließen von Teilen des Nutzsinalns in das geerdete Ableitbecken, zu minimieren und gleichzeitig über die Maximierung des Spitzenquerschnitts den Elektrodenwiderstand zu verringern (s.u.). Bei einem optimalen Spitzendurchmesser von 10...15 μm besitzen die Elektroden einen Innendurchmesser von 6...8 μm und damit einen typ. elektrischen Widerstand bei Füllung mit 3M KCl in der Größenordnung von $3 \cdot 10^5 \dots 3 \cdot 10^6$ Ohm (zu berücksichtigen ist der »flache« Konzentrationsgradient in der Elektrodenspitze, der sich stark auf den Elektrodenwiderstand auswirkt!).

Elektrolyte mit unterschiedlicher thermodynamischer Ionenbeweglichkeit der Kat- und Anionen erwiesen sich in Vorversuchen bei diesem verwendeten Elektrodendurchmesser als ungeeignet, da sich hierbei kein stabiles Diffusionspotential herausbildete und das elektro-sensorische System dadurch beeinträchtigt wurde. Deshalb wurde stets klassisch mit einer wässrigen 3M KCl-Lösung als Füllungselektrolyt in den Ableitelektroden gearbeitet.

Aus diesen Erfordernissen resultiert ein weiteres Problem: Da die Elektroden einen großen Spitzendurchmesser aufweisen und mit hochkonzentriertem KCl-Elektrolyt gefüllt sind, treten starke Diffusions- und Osmosephänomene an der Grenzschicht der Elektrodenspitze zwischen Elektrolyt und Leitungswasser auf. Nach dem Eintauchen der Elektroden in Leitungswasser können zwei Phänomene beobachtet werden: KCl-Elektrolyt kann unter beobachtbarer Schlierenbildung aus der Elektrodenspitze ausströmen und sich in das Umgebungsmedium verdünnen. Dabei verarmt die Elektrodenspitze an KCl und es bildet sich ein für die Zeitdimensionen des Ableit-

versuchs als weitgehend stationär zu betrachtender Konzentrationsgradient innerhalb der Elektrodenspitze aus, der von nahe Null bis auf die Ursprungskonzentration von 3M ansteigt. Es kann aber auch ein Wassereinstrom (mit geringfügigem Anstieg der Flüssigkeitssäule im Elektrodenschaft) in die Elektrode stattfinden, der dort zunächst einen »Wasserpfropfen« mit klar unter dem Binokular erkennbarer Grenzschicht zum optisch höher brechenden Füllelektrolyten ausbildet, der jedoch innerhalb weniger Minuten wieder verschwindet. Nach etwa zehn Minuten Vorwässerung mit mehrmaligem Wasserwechsel ist in der Regel in beiden Fällen ein stabiler Konzentrationsgradient aufgebaut. Diese Konzentrationsausgleichphänomene wurden zunächst nur unter ableittechnisch-elektrischen Gesichtspunkten betrachtet. Im ersten Fall kommt es beim erstmaligen Eintauchen der frisch gefüllten und abgebrochenen Elektrode durch Austritt einer Ionenwolke zu einer lokalen Erhöhung der Leitfähigkeit im Umgebungsmedium in Dimensionen von einigen hundert μm . Dies hat zur Folge, daß wiederum ein sog. »Shunting« (niederohmiger Ladungsabfluß über den Nebenschluß gegen den Massebezugspunkt im Ableittrog) des Ableitsignals aus dem Ampullenlumen in das geerdete Ableitbecken hinein stattfindet und die Elektrode auf diese Weise »unempfindlich« wird bzw. die Spikeamplitude stark reduziert. Als weiteres sekundäres Problem einer nicht äquilibrierten Ableit-elektrode, die Kaliumionen in das Ampullenlumen ausdiffundieren läßt, ist eine ionische Beeinflussung der Rezeptorzellen (Roth 1971, Bretschneider *et al.* 1979, Roth 1982) z.B. über die Veränderung von Membranpotentialen und einer evtl. Verzerrung des applizierten Stimulusfeldes durch veränderte Konduktanzverhältnisse im Ampullenlumen zu berücksichtigen.

Anders sehen die Verhältnisse beim Leitungswassereinstrom in die Elektrodenspitze aus. Die damit einhergehende Erhöhung des elektrischen Widerstands an sich stellt primär, statisch betrachtet, kein Problem für den Ableitsignalpfad dar, da dieser in Serie mit der Eingangsimpedanz des Vorverstärkers liegt. Dennoch sind diese Elektroden für Ableitungen aus dem Ampullenlumen bei starkem Leitungswassereinstrom ungeeignet. Dies beruht auf zwei Faktoren: Erstens tritt ein Störpegelanstieg durch die am drastisch gestiegenen Spitzenwiderstand der Ableitelektroden entsprechend dem Produkt $R \cdot I$ mit höherer Amplitude abfallenden Rausch- und Störstromkomponenten auf, das den Signal/Rauschabstand deutlich verschlechtert. Zweitens erfährt das Nutzsignal eine Dämpfung und Verzerrung durch Absenkung der Eckfrequenz des Tiefpaßfilters, gebildet aus Spitzenwiderstand der Elektrode und ihrer transmuralen Streukapazität, die jeder Mikroelektrode immanent ist und parallel zu den Streukapazitäten von Signalkabel und Eingangsstufe des Vorverstärkers liegt. Diese Probleme der Spitzenwiderstandserhöhung durch Leitungswassereinstrom in die Ableitelektrode sind in ihrer Wirkung vergleichbar mit dem Verhalten hochimpedanter Intrazellulärelektroden mit Spitzendurchmessern im Submikrometer-Bereich, die zu ähnlichen Phänomenen bei der Ableitung von Nervenspikes aus dem Ampullenlumen führen. Diese Phänomene und deren physikalische Ursachen konnten in Vorversuchen eindeutig nachgewiesen werden. An dieser Stelle sei auch erwähnt, daß eine hohe Wasserschicht über der Ableitstelle ebenso zu einer Absenkung der abgreifbaren Amplitude führt, da auch hier die Eckfrequenz des Tiefpaßfilters »Elektrode«, diesmal durch Anstieg der transmuralen Streukapazität abgesenkt und dadurch die Spikeamplitude stärker gedämpft wird.

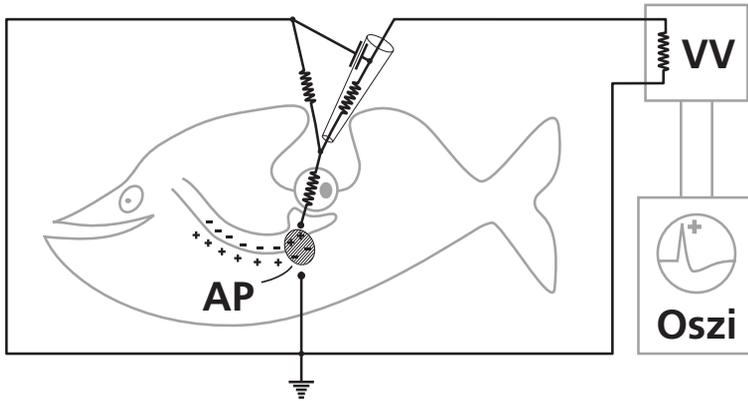


Abb. 5.3.8 Schematische Erklärung der Ableitprobleme mit frisch abgebrochenen Ableitelektroden. Kapazitives und resistives »Shunting« machen die Elektrode »unempfindlich« – weitere Erklärung im Text.

Da die elektrischen Eigenschaften der Mikroelektroden wie auch die Menge ausströmender Kaliumionen möglicherweise entscheidenden Einfluß auf Signalhöhe und Funktion des Rezeptorsystems besitzen können, wurde grundsätzlich bei allen Doppelableitungen auf optimalen Elektrodenabgleich (»Matching« der Elektrodenpaare) hinsichtlich Spitzendurchmesser, Länge und Geometrie von Elektroden- spitze und Konus geachtet. Es wurden jeweils Elektrodenpaare aus einer nacheinander mit identischen Einstellungen am Elektroden- ziehgerät (»Puller«) gefertigten Arbeitsserie (mit ca. 3 min Abkühl- phase zwischen jedem einzelnen Ziehvorgang) verwendet, da sonst mit dem verwendeten Elektrodenziehgerät (WPI PUL-1, World Precision Instruments Inc., Connecticut, USA) keine hinreichende Konstanz der Ergebnisse gewährleistet war. Da diese Elektroden nicht mit dem erforderlichen Spitzendurchmesser auf dem Elektrodenzieh-

gerät gefertigt werden können, wurden die Exemplare unter Mikroskopkontrolle mit Meßokular mittels Mikrometerschlitten auf den gewünschten Durchmesser abgebrochen. Nach Fertigstellung einer vollständigen Arbeitsserie mit ca. 20 Elektroden wurden die Einzel-exemplare optisch makro- und mikroskopisch genau verglichen und wiederum möglichst identische Paarungen gebildet, die mit einer feinen Injektionskanüle kapillar über den Schaft (Elektroden mit Mikrofilament) blasenfrei befüllt wurden. Die Elektrodenpaare wurden vor dem Experiment in gleicher Weise bei mehrmaligem Wasserwechsel mindestens zehn Minuten lang gewässert, bis stabile Ableitbedingungen bei minimalem Elektrolytaustritt hergestellt waren. Um Konstanz und Vergleichbarkeit der Elektrodenkonditionierung wie auch der Ableitbedingungen experimentell abzusichern, wurde folgender Versuch durchgeführt: Es wurden nach vorgenannter Maßgabe fünf Elektrodenpaare hergestellt und mit diesen in Doppelableitungen mit sechsfachem Positionswechsel aus Clusterampullen von *Schilbe mystis* abgeleitet. Durch weitere Versuche und Auswertungsvorschriften (Elimination von Störgrößen, s.u.) konnte sichergestellt werden, daß 1. beide Elektroden identische Potentiale »sehen«, 2. systematische Positionierungsfehler unter 0,3% fallen und 3. die Verstärkungsfaktoren beider Signalfade auf 0,2% übereinstimmten. Aus insges. 900 Paarmessungen konnte so eine mittlere Übereinstimmung der nach Vorschrift abgeglichenen Elektrodenpaare auf $\pm 1,9\%$ (SEM, $n = 5$ unabhängige Meßwertpaarungen) erzielt werden. Um dieses Ergebnis in einem direkten Versuch nochmals zu bestätigen, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt mit Spannungspulsen von 1ms (Generator: Hugo Sachs Stimulator Typ 215/I mit Spannungsteiler 99k:1k) Dauer als synthetische »Aktionspotentiale«,

die in ein kleines Wasserbecken eingekoppelt wurden und einmal in Doppelableitung über zwei Präzisionsmetallfilmwiderstände (Vishay 432S10, 1M000, 0,1%, TK10) mit angelöteter Kugelkontaktelektrode Ag/AgCl (frisch chloriert, 2,5mm Durchmesser) und im Anschluß daran über 10 nach Vorschrift abgegliche Glasmikroelektrodenpaare mit ca. 1M Ω abgeleitet wurden. Die Ergebnisse wurden auf dem Oszilloskop dargestellt und über ein Fluke 89-IV Präzisionsmeßgerät (4 $\frac{3}{4}$ Digits, 0,025% \pm 2 LSD, Fluke GmbH, D-34123 Kassel, Deutschland) exakt bestimmt. Aus dieser Messung ergab sich nach Eliminierung der Verstärkerfehler des elektrophysiologischen Vorverstärkers WPI DAM-50 (World Precision Instruments Inc., Connecticut, USA) ein mittlerer Elektrodenfehler von 1,2% (SEM, n = 10 unabhängige Meßwertpaarungen), der primär auf dem durch Elektrode, Kabel und Verstärkereingangsstufe formierten Tiefpaß beruht. Bei dieser Messung geht jedoch der »Shunting«-Strom, der an der Elektrode durch die Ableitung über das Umgebungsmedium »vorbeifließt« und so den »biologischen Spannungsteiler« beeinflusst (s.o.), nicht in das Ergebnis ein und trägt deshalb nicht zum Fehler bei.

Einen weiteren wichtigen Parameter stellt der Positionierungseinfluß der Ableitelektroden innerhalb des Ampullenbeckers dar, der in folgendem Experiment analysiert wurde. An Ampullen durchschnittlicher Größe mit einer Tiefe des Ampullenbeckers von 100...120 μ m wurde die Ableitelektrode zunächst über dem Porus in Richtung der Ampullenerstreckung mit der Hautoberfläche bündig ausgerichtet. Von dieser Position ausgehend wurde die Elektrode in Schritten von 20 μ m in Richtung Sinnesepithel in die Ampulle bis auf 100 μ m Tiefe (kurz vor Berührung der Sinneszellen) vorgeschoben und dann wieder in denselben Schritten aus dem Ampullenbecher zurückgezogen. Auf

jeder der neun Positionen wurde die gemittelte Spikeamplitude aus 30 Messungen bestimmt. Dieses Experiment wurde an insges. 16 Ampullen durchgeführt und aus den Meßwerten der jeweiligen Position Mittelwert und Standardabweichung ermittelt und graphisch getrennt für Vorschub und Zurückziehen der Elektrode aufgetragen. Im Diagramm ist gut zu erkennen, daß sich die Spikeamplitude in diesen beiden Fällen voneinander unterscheidet, was auf den Einfluß ausdiffundierender Ionen zurückzuführen ist (beobachtbar!), die beim Zurückziehen der Elektrode in etwas stärkerem Maße die abgreifbare Spikeamplitude absenken. Für die späteren Versuche ist jedoch praktisch nur die »bessere« Vorschubkurve im Bereich zwischen 60µm und 100µm für die Elektrodenpositionierung von Bedeutung, wo mit einem Standardfehler von rund 0,2%/10µm (SEM, n=16) Positionsabweichung zu rechnen ist (in der Praxis kann der Positionierungsfehler unter 20µm gehalten werden).

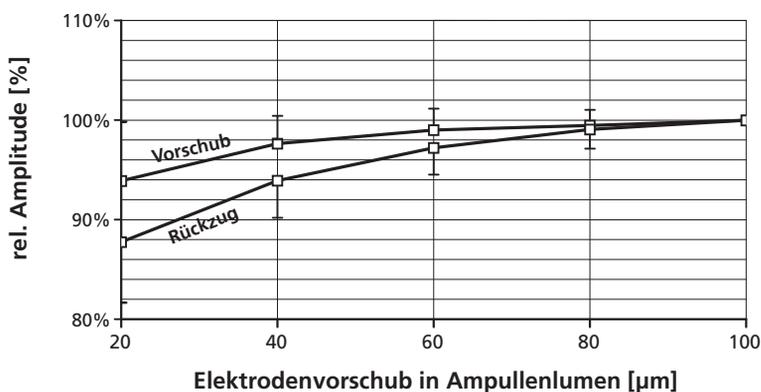


Abb. 5.3.9 Einfluß der Elektrodenposition innerhalb des Ampullenlumens; 0 µm△ Hautoberfläche. Beim Zurückziehen der Elektrode verursachen Kaliumionen ein leichtes «Shunting» und drücken die Spikeamplitude.

5.3.9 Vorverstärker

Da es sich beim Abgriff afferenter Aktionspotentiale aus dem Ampullenlumen um die Erfassung von Kleinstsignalen über eine relativ niederimpedante Meßelektrode handelt, stellen diese Experimente andere als die typischen Anforderungen der intrazellulären Ableitung an einen elektrophysiologischen Vorverstärker. Bei einem typ. um mehr als 80 dB geringeren Signalpegel resultiert – trotz der deutlich geringeren Impedanz in der gesamten Ableitsignalkette – eine typ. um 60dB geringere Signalquelleistung. Dies stellt bei präzisen Messungen extreme Anforderungen an die Werte der maximalen Eingangsspannung und der äquivalenten Eingangsruschleistungsdichte über dem Quellwiderstand im Signalfrequenzband zwischen 0,5...5kHz. Verwendet für die Versuche wurde ein elektrophysiologischer Differenzverstärker der Fa. WPI (World Precision Instruments Inc., Connecticut, USA) Typ DAM50, der jedoch nur im unipolaren Betriebsmodus eingesetzt wurde. Allerdings besitzt dieses Gerät eine Reihe von Eigenschaften, die es für besonders exakte, rauscharme Messungen oder Experimente unter bestimmten Bedingungen weniger geeignet erscheinen lassen. Hierunter sind besonders zu nennen: das äquivalente Eingangsspannungsrauschen (»ENSI-Voltage«) von $10 \mu\text{V(p-p)} @ 1 \text{ Hz} \dots 10 \text{ kHz}$, das äquivalente Eingangstromrauschen (»ENSI-Current«) von $120 \text{ pA(p-p)} @ 1 \text{ Hz} \dots 10 \text{ kHz}$, die geringen Werte der Gleichtaktsignalpegelunterdrückung (»CMMR«) von $100 \text{ dB(typ.)} @ 0 \text{ Hz}$ und $50 \text{ dB(typ.)} @ 1 \text{ Mhz}$ bei einem zulässigen Gleichtakt-Eingangsspannungsbereich von 5 V / Verstärkungsfaktor, also 5 mV bei 1000facher Verstärkung (Probleme hierdurch siehe oben Abschnitt »Stimulationsfeldbedingungen,

Homogenfeldstimulation«), der maximale Eingangsleckstrom (»I(leak)«) von 50 pA (der bereits zu einer geringfügigen Dauerstimulation der abgeleiteten Ampulle führt, an die jedoch – ebenso wie an das elektro-osmotische Spitzenpotential der Ableitelektrode – von den Rezeptoren innerhalb weniger Sekunden vollständig adaptiert wird; bei echten Lumen Clamp Messungen führt dieser Leckstrom jedoch zu gravierenderen Problemen) und die verwendete RJ45-Steckverbindung zur Signaleingangsleitung, die als mechanisch unbefriedigend und elektrisch äußerst problematisch zu bezeichnen ist (fehlende wirksame Abschirmung, geringe Störsicherheit, hohe Streukapazität, schlechte Isolationswerte, die bereits bei unbenutzten, absolut sauberen Steckern 46 dB unter denen der Eingangsverstärkerstufe liegen, hohe Verschmutzungsanfälligkeit und die Notwendigkeit, den Steckerisolationkörper routinemäßig mit Teslanol SP, Hapena GmbH, D-29451 Dannenberg, Deutschland, und Ethanol absolut zu reinigen und mit gereinigter Druckluft zu trocknen). Außerdem fehlen, falls Messungen mit größerer Elektrodeneintauchtiefe vorgenommen werden müssen, die Kapazitätskompensation – sowie für manche Versuche – die Möglichkeiten zu Stromeinprägung mit Monitoring, Auftrennung des Signalpfades in zwei Frequenzbänder, wirksame Signalfilter und aktive eingangssignalgeführte Schirmungstreiber. Aus diesem Grund wurde ein universell einsetzbarer Differenzvorverstärker und Signalkonditionierer mit C-Kompensation, Stromeinprägung, Vollbereichs-Gleichtaktspannungsunterdrückung (»ultra-high rail-to-rail-CMMR«), sehr geringen äquivalenten Eingangsstromfehlern und Eingangsrauschdaten, die sich an das Nyquist-Grenzkriterium annähern, und aktiver Differenzeingangsschirmung konstruiert. Die Daten der entwickelten Schaltung übertreffen in allen relevanten Bereichen in dieser Spezi-

fikationskombination alle auf dem Markt befindlichen physiologischen Verstärker z.T. um Größenordnungen und bieten alle Optionen für sämtliche mit endoluminärer Ableittechnik am ampullären Elektrorezeptor zu untersuchenden Fragestellungen. Die Verstärkerschaltung wurde nur in der Testphase als Prototyp eingesetzt und hat die Erwartungen vollständig erfüllt. Weitere Angaben zur Schaltung siehe unten.

5.3.10 Signalaufbereitung und Registrierung

Die Signalkette verläuft bei allen endoluminalen Ableitungen von der Mikroelektrode über den neurophysiologischen Vorverstärker einerseits zum Signalkonditionierer, -nachverstärker mit Monitorausgang, Spikedetektor und Spikeratenzähler (im Folgenden als »Spikerate-Converter« bezeichnet) und andererseits über ein Potentiometer auf einen der beiden Stereokanäle eines »hochimpedanten« Kopfhörers mit hohem Wirkungsgrad (600 Ohm, 108 dB/mW). Bei Doppelableitungen ist diese Signalkette in doppelter Ausführung aufgebaut. Die Spikeratenausgänge werden von einem Kanal eines Zweikanal-Kompensationsschreibers registriert, die Monitorausgänge werden auf dem Oszilloskop dargestellt neben der Reizschreibung, die z.T. über Lichtleiter und Selen-Photodetektor optogekoppelt wurde und je nach Fragestellung auf einem der beiden Schreiberkanäle oder dem zweiten oder dritten Oszilloskopkanal dargestellt oder direkt über das neben dem Oszilloskopbild eingeblendete Lichtsignal über die Videokamera erfaßt und aufgezeichnet. Der »Spikerate-Converter« war notwendige Voraussetzung für das Gelingen der technisch schwierigen Doppelableitungen unter TTX-Vergiftung bei *Schilbe mystis* (hier kommen eine

Reihe verschiedener Erschwernisse hinzu, darunter auch die Probleme der Doppelableitung mit sehr schlechten Signal-Rausch-Verhältnissen, mit der Notwendigkeit, Aktionspotentiale mit abnehmender Amplitude exakt und möglichst wenig rauschbeaufschlagt in ihrer Größe bestimmen zu können und eine unter allen Bedingungen einfache, zuverlässige, stabile und störstichere Ableitung während der gesamten Versuchsdauer eines jeden Experiments ohne zwischenzeitliches Nachoptimieren zu gewährleisten; Minimierung der Einflüsse von Elektrodenbeschaffenheit und Positionierung; Erfordernis, die Aktionspotentiale bereits in einigem Abstand über der Hautoberfläche erfassen zu können, um die Clusterausdehnung und Zugehörigkeit jeder Ampulle zuverlässig abscannen zu können, etc.). Deshalb waren an dieses Gerät eine Reihe von Anforderungen zu stellen, deren wichtigste hier in Stichpunkten aufgezählt werden: (1) exakt abgestimmte aktive Eingangsbandpässe mit 2phasiger Roll-off-Charakteristik, die Ableitsignal und Störfrequenzspektrum optimal Rechnung trägt; (2) variabler Eingangssignalverstärker ($\times 30 \dots \times 330$), einstellbar über 10-gang Helipot mit Digitalskala oder Digipot; (3) Spikedetektor mit Einheitspulsgenerator (Anstiegsgeschwindigkeit $0,3 \dots 3,3$ V/ms, positive Flanke, Pulsbreite $0,5 \dots 5$ ms, Pulshöhe $1 \dots 5$ V, Schmidt Trigger mit 50 mV Hysterese) erzielt eine Zählrate von 100% bei endoluminal abgeleiteten Aktionspotentialen und ist gegen diverse Störquellen weitgehend immun; (4) Spikeratenzähler in SC-MOS-Technik mit $10,000$ mV·s Ausgang (Ausgangsfehler $0,01\%$ ohne Nachkalibrierung) mit »sliding window«-Integrator; (5) robuster, unverwüstlicher mechanischer Aufbau und zuverlässige Schutzschaltungen für alle Ein- und Ausgänge, Aludruckgußgehäuse, robuste Steckverbindungen, sturzsicher (da auch als Gerät im Anfängerpraktikum eingesetzt); (6)

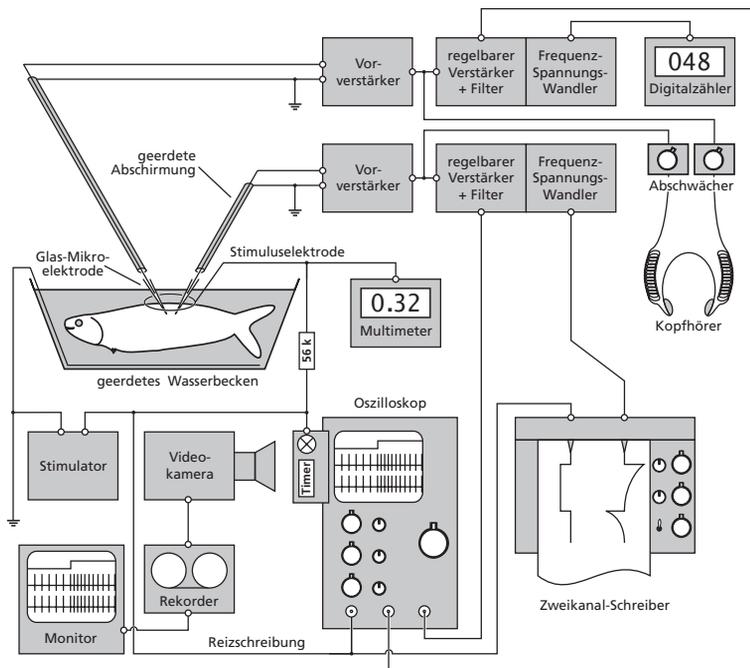


Abb. 5.3.10 Schematischer Versuchsaufbau

200 Betriebsstunden mit einer einzigen 9V-Standardblockbatterie (Typ 6LR61), auslaufsicheres Batteriefach mit Testschaltung und Batterieschnellwechsel; (7) kostengünstige und schnelle Bestückung und Einbau der in Kleinserie maschinell gefertigten Platinen. Weitere Angaben zur Schaltung siehe unten.

Bei Experimenten, bei denen die Spikerate ausgewertet werden sollte und das Interspike-Intervall oder das genaue Timing der Spikes nicht von Bedeutung war, wurde dieser Parameter direkt vom Ausgang des Spikeratenkonverters zur Verfügung gestellt und durch einen Kompensationsschreiber aufgezeichnet und digital am Multimeter-

display angezeigt. Darüberhinaus wurde das Ableitsignal am Monitorausgang, zusammen mit dem Stimulussignal und LCD-Uhr per Videokamera erfasst und auf Videoband zur späteren manuellen Auswertung nach verschiedenen Kriterien aufgenommen. Den Versuchsaufbau für einen Standardversuch zeigt Abb. 5.3.10.

5.3.11 Mikroapplikation von DASPEI und TTX

Die Mikroapplikation kleiner Lösungsmengen (Farbstoffe, Kanalblocker) wurde in Versuchsreihen erprobt. Bereits im Rahmen der Diplomarbeit wurde eine Methode entwickelt und erprobt, um kleinste Flüssigkeitsvolumina (ab 100 nl) mit Tracern computergesteuert in die Hämolympfbahn kleiner transparenter Spinnen (*Pholcus phalangioides*) injizieren zu können. Hierfür wurde über rechnerkontrollierte Feinschrittmotoren via Mikrometerspindel der Kolben einer Hamilton-Präzisionspritze gesteuert und über eine luftfreie Silikonölhydraulik zur Injektionskapillare übertragen. Die Injektion wurde über eine auf 2...5 μm (je nach Erfordernissen) dünn ausgezogene Glasmikrokapillare ausgeführt, die mit 18° Spitzenwinkel auf ca. 100 nm präzisionsgeschliffen (»gebevelled«) war. Dies wurde über eine selbstgebaute »Bevelling«-Vorrichtung bewerkstelligt, einen schweren Plattenspieler mit einer 200 mm Glasschleifplatte mit aufgesinterter Diamantstaub 50nm Korngröße, durch die die Elektrode bei definierter Auflagekraft von 2 cN unter elektronischer Kontrolle (Schwingkreisverstimmung) naßgeschliffen wurde. Alle vorangegangenen Versuche der Kapillarenfertigung und Schärfung ohne eine entsprechende Bevellingvorrichtung führten zwar auch zu lichtmikroskopisch äußerst scharfen Kanülen, versagten jedoch im späteren Experiment. Der Aufwand,

diese Injektionstechnik zu perfektionieren und zum Erfolg zu führen, nahm knapp ein dreiviertel Jahr in Anspruch.

Auf dem Hintergrund dieser Erfahrungen wurde deshalb zunächst wiederum versucht, Farbstoff bzw. Kanalblocker via Mikroinjektion bei *Schilbe mystis* in Clusternähe zu applizieren. Hierfür sollte geringerer Aufwand getrieben werden: es stand eine einfache handbetriebene Hamiltonspritze mit manuellem Mikrometervortrieb zur Verfügung, deren Hydrauliksystem sich in der Praxis jedoch nicht absolut luftfrei füllen ließ; auch stand keine »Bevelling«-Vorrichtung zur Verfügung. Es wurde deshalb mit verschiedenen Mikrokapillar-Glassorten experimentiert, um eine Glassorte herauszufinden, die beim Brechen unter Mikroskopkontrolle möglichst definiert, sauber und mit scharfen, glatten Bruchkanten gebrochen werden kann. Parallel wurde versucht, über diverse einfachere Schleifvorrichtungen die Spitzengüte und -scharfe zu verbessern. Keiner der Versuche lieferte jedoch auch nur annähernd brauchbare Ergebnisse, die ausreichend gewesen wären, um die Haut der Versuchstiere zu penetrieren. Deshalb wurde versucht, mit einer 0,2-mm-Insektennadel die Haut vorzustechen und die Lösung dann über die Mikrokapillare zu applizieren. Auch dieser Versuch führte nicht zum Erfolg, da es durch die Gewebsverletzung zum undefinierten Austritt von Blut und Gewebsflüssigkeit, die einen Teil des applizierten Flüssigkeitsvolumens wieder abtransportieren, oder zur Verklebung oder Verstopfung der Kapillare kommen kann. Das Hydrauliksystem arbeitet bei weitem nicht exakt und zuverlässig genug für diesen Einsatzzweck; durch Lufteinschlüsse und Dehnungsreserven einerseits und große Variationsbreite des Staudrucks an der Kanüle kommt es zunächst meist zum Rückstau, bei weiterer Druckerhöhung zum explosionsartigen Auswurf eines größeren Volumens,

das entweder nahezu quantitativ im Gewebe verbleibt oder größtenteils aus der Verletzung wieder austritt; als weiteres Problem kommt hinzu, daß die applizierte Lösung häufig unkontrolliert durch den Druckaufbau undefiniert im Gewebe verteilt wird und somit die Ausbildung eines homogenen Konzentrationsgradienten mit gleichmäßiger Ausbreitungsgeschwindigkeit verhindert, der für diese Experimente unverzichtbar ist. Darüber hinaus vereitelt in der Praxis der Applikationsaufwand und die Geräteplatzierung eine erfolgreiche experimentelle Durchführung des eigentlichen elektrophysiologischen Versuchs.

Deshalb wurde auf eine sehr einfache Methode erfolgreich zurückgegriffen: die Lösung wurde nicht über Druck in die mittels Insektennadel vorpunktierte Stelle mit all den vorgenannten Problemen injiziert, sondern via Diffusion durch einen Stichkanal (0,2-mm-Insektennadel) bei konstanter Einwirkdauer appliziert. Diese Methode liefert bei aller Einfachheit gute, für die Versuche hinreichend exakte und reproduzierbare Ergebnisse (weit besser und präziser als die Mikroinjektionstechnik bei vertretbarem Aufwand).

5.3.12 Betäubung der Versuchstiere, Einfluß und Evasion des Narkotikums

Die Betäubung wurde durch Überführen der Versuchstiere mit dem Kopf voran in ein schmales, hohes Becherglas von ca. 40 mm Durchmesser durchgeführt, das ca. 40 mm hoch mit einer Lösung von 10 g MS-222 (m-Aminobenzoessäure-Ethylester-Methansulfonat, $C_{10}H_{15}NO_5S$, Sandoz, Basel) pro Liter Leitungswasser gefüllt war. Dabei sollte der Fisch mindestens im Kopf- und Kiemenbereich mit der Lösung be-

deckt sein. Nach wenigen Sekunden (typ. 2...5 Sekunden) setzt über die Aufnahme des Anästheticums primär über die Kiemenepithelien vollständige Bewegungs- und Reflexlosigkeit ein. Danach wird der Fisch sofort in ein Becherglas mit frischem, temperiertem Leitungswasser (25°C) überführt, das in kurzen Abständen zweimal und danach 5, 10 und 20 min post narc. gegen temperiertes Wasser gewechselt wird, da jeder längere Verbleib in der MS-222 Lösung negative Auswirkungen auf die Dauer der Evasionsphase hätte. Nach 30 min wird der Fisch in das Ableitbecken überführt und dort mit mindestens dreimaligem Wasserwechseln innerhalb von 10 min zusammen mit den Ableitelektroden gewässert.

Das Pharmakon, das sich als Anästheticum, Analgeticum und Sedativum für Poikilotherme bewährt hat, verteilt sich über den Blutkreislauf schnell im gesamten Organismus, setzt an allen Nervenzellen an und bringt deren Aktivität zum Erliegen. Dies äußert sich zunächst in einer völligen Erregungslosigkeit sämtlicher Neurone, zentral wie peripher. Durch die Prozedur des Wasserwechselns wird das inkorporierte und weitgehend im Körper verteilte Anästheticum entsprechend dem Konzentrationsgradienten langsam innerhalb von ca. 30 bis 40 Minuten wieder über Blutkreislauf und Kiemenepithelien in das Umgebungswasser abgegeben. Nach diesem Zeitraum wacht das periphere Nervensystem wieder auf, das ZNS jedoch wird nach etwa 30 Minuten ohne aktive Ventilation der Kiemen durch die Kiemendeckel aufgrund der anhaltenden Sauerstoffmangelversorgung irreversibel geschädigt und stirbt ab. Bei beschleunigter Eliminationsphase, wie sie bei aktiver Perfusion durch Einsprudeln von Luft durch eine Düse direkt in die Maulöffnung stattfindet, kann das Versuchstier innerhalb etwa 30 Minuten post narc. wieder aufgeweckt werden. Dies

wird für die Durchführung von Operationen angewendet oder z.B. auch dann, wenn der Fisch, der unmittelbar nach der Betäubung auf Qualität, Anzahl und Verteilung der Ampullen und Aussehen des Sinnesepithels unter dem Binokular untersucht werden sollte, ein von der Norm abweichendes Erscheinungsbild zeigt und nicht dem Experiment unterzogen wird.

Nach dem Abklingen der Betäubung setzt die Aktivität des peripheren Nervensystems wieder ein, indem vereinzelte, unregelmäßige Aktionspotentiale gebildet und z.T. schnelle, kürzere oder längere Entladungssalven spontan – wie auch in verstärktem Maße auf Stimulation – abgegeben werden. Innerhalb weniger Minuten stellt sich in der afferenten Nervenfasern des Elektrozephtors wieder eine kontinuierliche Aktivität ein, die zunächst jedoch noch nicht sofort das gewohnte Maß an Regelmäßigkeit der Spontanaktivität aufweist, sondern stärkere Fluktuationen zeigt und evtl. noch zu gelegentlicher »burst«-Aktivität neigt, was verstärkt nach Stimulation des Systems auftritt. Während dieser Phase ist das Interspike-Intervall-Histogramm in charakteristischer Weise verändert, wie bereits im entsprechenden Abschnitt des Kapitels Ergebnisse gezeigt. Erst nach dem Abklingen jeglicher »burst«-Aktivität auch auf Stimulation und dem Einsetzen einer hochregelmäßigen Spontanaktivität ist das System wieder in physiologischem Zustand und für Experimente geeignet.

5.3.13 Kontrolle abiotischer Einflußfaktoren

Zwei wichtige abiotische Faktoren beeinflussen Aktivität und Verhalten des Elektrozephtors bekanntermaßen stark: Temperatur und Ionen. Beide Faktoren waren bereits Gegenstand zahlreicher Arbeiten, wie

Bretschneider *et al.* (1979), Bretschneider *et al.* (1980), Roth (1982), Peters *et al.* (1988b), Wittmaack (1990), Schäfer *et al.* (1990 & 1994), Teunis *et al.* (1991b) u.a. Dabei ist der Parameter »Ionenkonzentration« schwerer faßbar, da Veränderungen im Verlauf der Messung z.T. unkontrolliert und im Mikrobereich stattfinden und nicht wie Temperaturschwankungen über eine Meßsonde protokolliert werden können; er läßt sich jedoch – wie vorher erwähnt – über seinen Einfluß auf die Messung aufspüren. Ursache für diese Änderungen in der Ionenkonzentration ist die Abgabe von Ionen über die Fischhaut, über den Austritt von Körperflüssigkeit aus Verletzungen der Fischhaut und die Abgabe von Ionen aus der Elektrodenspitze. Auf diese Ursachen wurde bereits in früheren Abschnitten eingegangen. Durch drei Maßnahmen läßt sich dieser Faktor gut kontrollieren und auf einem für die Messung weitgehend unkritischen Niveau halten: durch die Vermeidung von Verletzungen an der Fischhaut, durch korrekte Vorbehandlung der Elektrode und durch regelmäßigen Wasserwechsel nach jedem Meßzyklus oder ca. alle 10...15 Minuten. Alternativ zur Intervallspülung des Präparats ist u.U. eine kontinuierliche Dauerperfusion des Ableitbeckens möglich. Dieses Vorgehen ist gleichzeitig eine wirksame Maßnahme zur Kontrolle der Wassertemperatur im Ableitbecken, die sich selbst in dem relativ großen Ableitbecken mit ca. 100 cm³ Füllvolumen bereits innerhalb von 5 Minuten um ca. 25% an die Raumtemperatur annähert, also bei einer Raumtemperatur von 21°C um rund 1°C abfällt, was wiederum einen Abfall der Ruheaktivität bei *Schilbe mystis* von $11,5 \pm 3,1\%$ zur Folge hätte (siehe Abschnitt »Stimulationsfeldbedingungen«). Bereits daran erkennt man die Bedeutung der Kontrolle abiotischer Faktoren. Setzt man ein großes thermisch isoliertes Wasserreservoir mit ca. 5 Litern ein, aus dem

Konstant- oder Intervallwässerung durchgeführt werden kann, so lassen sich diese Probleme zuverlässig vermeiden. Alle Versuche in dieser Arbeit sind, soweit nicht anders angegeben, auf Münchner Leitungswasser bei 25°C bezogen. Die Analyse ist wie folgt (Angaben: Dr. H. Schmidt, Meßtechnisches Labor der Stadtwerke München, 27. Januar 1998):

<i>Substanz [mg/l]</i>	<i>Minimum</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Maximum</i>
Calcium	72,9	82,0	92,2
Magnesium	16,5	19,4	22,0
Natrium	3,2	3,8	4,4
Kalium	0,8	1,2	4,6
Hydrogencarbonat	237,7	316,9	350,6
Sulfat	12,7	23,0	50,2
Chlorid	4,7	5,9	6,8
pH-Wert	7,37	7,62	7,81
Leitfähigkeit [$\mu\text{S/cm}$]	485	537	580

5.3.14 Tierbefestigung, Mikromanipulator und Ableitung

Die Tierbefestigung erfolgte bisher verbreitet mittels Präpariernadeln auf einem Agar- oder Wachsbett. Diese Methode sollte unbedingt unterbleiben, da metallische Gegenstände die Felder stark und unkontrollierbar verzerren und im Falle dieser Befestigungsmethode sogar als Stimulationsantennen wirken können (dies kann die Stimulationsverhältnisse undefiniert verzerren oder sogar umkehren, wie sich leicht durch Versetzen der Fixationsnadeln feststellen läßt); in seltenen Fällen kann das sogar dazu führen, daß sich die Stimulationsverhältnisse innerhalb eines Clusters invertieren können (ein Teil des Clusters wird aktiviert, der andere Teil wird inhibiert - dies läßt sich am einfachsten

an Clustern mit Mischinnervierung nachweisen). Ebenso besteht die Gefahr, daß die Fixationsnadeln in der Nähe von Nerven platziert und diese durch den Stimulus erregt werden, was sich im Falle motorischer Neurone in Muskelzucken äußern kann. Ein weiteres schwerwiegendes Problem entspringt der vielfachen Punktierung des Fischrumpfs, die zur Erzielung einer stabilen Befestigung notwendig ist. An diesen Stellen tritt Körperflüssigkeit aus, die sich in Form von Ionenwolken in das Umgebungswasser ausbreitet, die Stimulusausbreitung beeinflusst, die abgreifbare Spikeamplitude durch »Shunting« (verstärkter Ladungsabfluß über den Nebenschlußwiderstand gegen Massebezugspotential) reduziert und direkten Einfluß über den Ioneneffekt und vermutlich auf dem Wege des Haut- und Rezeptormembranpotentials auf das System nimmt (Roth 1971, Peters *et al.* 1975, Zhandan & Zhandan 1975, Bretschneider *et al.* 1979). Diese Effekte konnten in Vorversuchen nachgewiesen werden – wenn auch eine exakte Quantifizierung kaum möglich und sinnvoll ist. Ein Versuch zum Einfluß aus tretender Körperflüssigkeit wird auch Kap. »Material und Methoden: TTX-Vergiftung« beschrieben.

Die feldverzerrenden Auswirkungen verschiedener Träger wurden bereits zuvor angesprochen. Deshalb wurden verschiedene alternative Möglichkeiten zur Lösung der Versuchstierbefestigung entwickelt, die zuverlässig, aber nicht-invasiv und nicht feldverzerrend sind. Ist es wichtig, daß das elektrische Feld nicht durch die Fixierung beeinträchtigt wird, so sollte der Fisch, wie bei der Homogenfeldstimulation erwähnt, in einer Fadenaufhängung aus spezialversponnenen Aramidfasern (Kevlar®-Garn Typ 139Ht, 560 dtex Filamentflachgarn, Fa. DuPont) aus jeweils ca. 10 Fäden auf beiden Rumpfsseiten des Fisches quer zu dessen Längsachse stabil gehalten werden, da diese Fa-

sern nahezu keine Feuchte- und Lastdehnung aufweisen. Bei geeigneter Ausführung kann das Versuchstier so über mehr als eine Stunde stabil in Ableitposition gehalten werden. Für alle anderen Stimulations-situationen ist es zweckmäßig, den Fisch auf Bezugspotential zu legen und ihn großflächig mit der Erdungselektrode in Kontakt zu bringen. Das Einstechen einer Elektrode sollte jedoch aus den vorgenannten Gründen unbedingt unterbleiben. Ideal ist es, das Versuchstier mittels Fäden auf einem dünnen, lichtdurchlässigen (wegen der Beleuchtung der Ableitstelle) Plexiglasträger, auf dem die Bezugs- und Erdungselektrode z.B. in Form einer feinen V4A-Gitterelektrode aufgebracht ist, gut zu fixieren. Diese Einheit aus Plexiglasträger, Elektrode und Versuchstier läßt sich einfach handhaben und entweder am Boden des Ableittrogs befestigen oder unter leichter Vorspannung gegen die Kammertrennwand (Current Clamp Becken) fixieren.

Bei allen Ableitsituationen wurde angestrebt, daß die Haut der Fischoberseite in der Umgebung der Ableitstelle möglichst exakt horizontal ausgerichtet ist; zur Einrichtung diente eine Schwenkvorrichtung des Ableittrogs zur Lokalstimulation. Deshalb wurde ein Umbau der vorhandenen Mikromanipulatoren (Eigenbau der Werkstatt des Zoologischen Instituts der Universität München, Herr Zschka) entsprechend der Ableitsituation in Auftrag gegeben, so daß diese nun sechs Bewegungsrichtungen ausführen können: zum schnellen und exakten Anfahren der Ampullen ist die planitaktische Steuerung in x-y-Ebene, gepaart mit einer Höhenverstellung in z-Richtung, die Neigungsverstellung (entsprechend Ampullenorientierung und Platzierungsmöglichkeit) für den Elektrodenhalter und der Vorschub in Elektrodenrichtung sehr wichtig, weniger bedeutsam ist die Rotation des gesamten Mikromanipulatorenkopfes in Horizontalebene. Mittels

dieses Mikromanipulators wird die Ableitelektrode durch den Ampullenporus in Richtung auf das Sinnesepithel vorgeschoben, wobei die Sinneszellen gerade nicht berührt werden dürfen. Bereits im Falle einer leichten Berührung reagieren die Sinneszellen auf die mechanische Reizung mit einer sofortigen Erregung, die sich über den Anstieg der Spikfrequenz manifestiert, so daß die Elektrodenposition unverzüglich korrigiert werden kann.

Die Clusterzugehörigkeit von Ampullen wird mittels Doppelableitung aus zwei Ampullen identifiziert, da dies die einzig zuverlässige Methode darstellt (eine exakte und zweifelsfreie optische Identifizierung ist in der Praxis der elektrophysiologischen Ableitung nicht möglich). Da Clusterzugehörigkeit über die Innervierung durch ein und dieselbe Afferenz definiert ist, werden die Ampullen eines Clusters stets synchrone Spikemuster aufweisen, was durch paarweise Testung zweier Ampullen über Stereo-Kopfhörer oder Oszilloskopkontrolle überprüft werden kann. Um dies festzustellen, genügt bei der in dieser Arbeit entwickelten und zum Einsatz gebrachten Ableittechnik ein Abscannen des potentiellen Clustergebiets mit einer der Ableitelektroden, die in Abständen von bis zu 100 μm über die Hautoberfläche und die Ampullenpori bewegt werden kann.

5.3.15 Lichtführung und Beleuchtungsanordnung bei Binokularkontrolle

Die Lichtführung und Beleuchtung des Präparats hat entscheidenden Einfluß auf die Kontrastbildung der sich in ihrer optischen Dichte nur geringfügig unterscheidenden Strukturen und für das optische Auflösungsvermögen bei Binokularbeobachtungen. Anders als beim Licht-

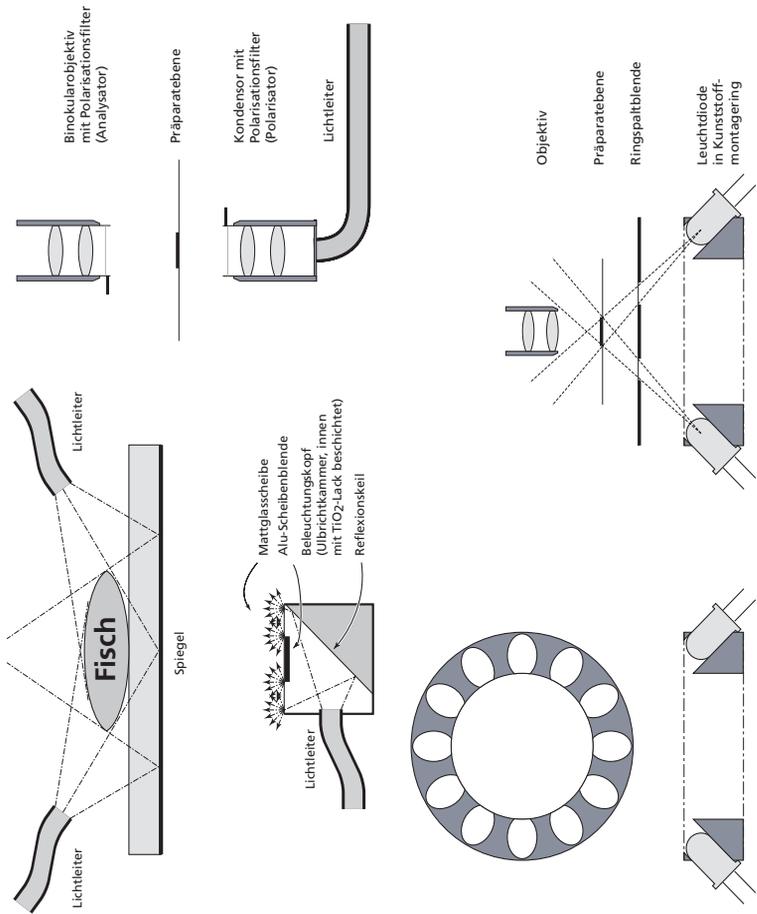


Abb. 5.3.11 Schematische Darstellung verschiedener erprobter und bewährter Beleuchtungsoptionen für Binokulararbeit. Links oben: Polarisationskontrast mit Kollimatorausleuchtung; links unten: Spiegelbeleuchtung (zur Präparation) und einfacher diffuser Graufeldbeleuchtungskopf; Reihe rechts: Einfache Dunkelfeldanordnung auf der Basis superheller Leuchtdioden.

mikroskop sind üblicherweise bei Binokularen nicht bereits eingebaute Beleuchtungskontrastoptionen vorhanden; vielmehr wird hier meist das Präparat mittels eines Schwanenhals-Lichtleiters undefiniert angestrahlt. Dabei ergeben jedoch die Strukturen des ampullären Elektrozepthors nahezu keine Modulation der Helligkeitswerte. Die einfachste Methode stellt diffuse Schräglicht-Durchleuchtung mittels eines schräg unter dem Präparat angebrachten Reflexionsdiffusors aus Papier dar, die als einfache Variante der Graufeld-Durchlichtbeleuchtung aufgefaßt werden könnte. Die Kontrastierungsbedingungen verbessern sich mit zunehmender Annäherung an das Ideal der Durchlicht-Dunkelfeld-Beobachtung. Als vereinfachte unvollkommene Variante dieser Beleuchtungssituation kann die Schräglicht-Spiegelbeleuchtung gelten, die bei Präparation außerhalb des Wasserbeckens gerne angewendet wird. Da die Präparatbeleuchtung entscheidenden Einfluß auf Sichtbarkeit von Ampullenporus, Sinneszellen, afferenter Faser etc. und damit auf die erfolgreiche Versuchsdurchführung besitzt, wurden in Vorversuchen einige Beleuchtungsköpfe entwickelt und mit gutem Erfolg angewandt, die teils auf Halogenkaltlichtlampen mit Lichtleiter für Spiegelbeleuchtung, Graufeld-Durchlicht und Polarisationskontrast (multimodaler Quarzlichtleiter, 6 mm Durchmesser, mit hitzebeständiger metallfreier Silikonummantelung, freundlicherweise als Forschungsmuster von der Fa. Schott, D-55122 Mainz, Deutschland, zur Verfügung gestellt), teils auf LED-Lichtquellen (GL10ZY47, 25.000 mcd, 8° Leuchtwinkel, Fa. Sharp) für Durchlicht-Dunkelfeldkontrast beruhen. Dabei erzielt der Einsatz superheller LEDs in dieser Anordnung ähnliche Leuchtdichten am Präparat wie gängige Halogen-Kaltlichtleuchten (obwohl deren absoluter Gesamtlichtstrom deutlich höher ist) bei einer Reihe von Vorteilen,

wie engwinkliger, präziser und äußerst homogener Abstrahlungscharakteristik, kompakter Bauweise, Monochromasie, extrem hoher Leuchtdichte (Vorsicht: Gefahr schwerer Netzhautverbrennungen beim Blick in den Lichtstrahl!), vernachlässigbare Wärmeentwicklung (Präparataufheizung durch »Kaltlichtlampen« ist nicht unproblematisch) und Elimination von elektrischen Störungen durch netzfreien Betrieb. Zu berücksichtigen bei der Konstruktion und der Dimensionierung des Lochkreisdurchmessers ist der Montageabstand zum Präparat, der bei einem Konvergenzwinkel von 45° in homogenem Medium $D/2$ beträgt. Sitzt der Leuchtkopf unmittelbar unter dem Wassertrog, so erhöht sich die Distanz zum Präparat aufgrund der Lichtbrechung am Phasenübergang Luft – Wasser auf $4 \cdot D/5$.

5.3.16 Geräteentwicklung

Die Elektronikentwicklung hat einen sehr breiten Raum in dieser Arbeit eingenommen. Dies war z.T. notwendige Voraussetzung für die Durchführung einiger Versuche (»Spikerate-Converter«), während andere Geräte, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt, getestet und optimiert wurden, in den späteren Experimenten nicht zum Einsatz kamen. Trotzdem soll die umfangreiche Entwicklungsarbeit, die auch hierfür geleistet wurde und die zu für die experimentellen Erfordernisse optimierten und in jeder Hinsicht ausgereiften Geräten führte, in kurzer Form dokumentiert werden, um die Funktion der Schaltungen nachvollziehen zu können und diese Informationen zur späteren Verwendung, für Wartung und Nachbau verfügbar zu halten. Im Folgenden sind deshalb die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten elektronischen Geräte mit Schaltplan, Bestückungsplan und Stückliste aufge-

führt, die dem Elektroniker die wichtigsten Informationen zum Verständnis an die Hand geben und eine Analyse der Schaltungen ermöglichen. Die Geräte im einzelnen sind:

1. »Spikerate-Converter-Amplifier« mit selektiven Spezialfiltern, einstellbarer Verstärkung mit digitaler Ablesung, Spike-Detection-Unit, Einheitspulsgenerator, Frequenz-Spannungsumsetzer und kontinuierlichem »gleitendem« Fensterintegrator mit low-voltage/low-power Design (200 Stunden Betriebszeit mit einer einzigen 9-Volt-Standardbatterie, Typ 6LR61)

2. Universal-Präzisionssignaltrenneinheit, kopplungsminimierter, hochpräziser ausgangsregelbarer Trennverstärker zur Stimulationserzeugung und -einkopplung

3. spannungsgesteuerter Stromkonverter zur spannungsgeführten Reizstromeinprägung, mit Eingang für Rückkopplungsfühler und selbstzentrierendem, bezugspotentialsymmetrisch-zwangsgeführtem Ausgang

4. vollsymmetrischer kompensierbarer elektrophysiologischer Differenzvorverstärker und Signalkonditionierer mit extrem rauscharmen Hochimpedanz-Differenzeingängen, C-Kompensation, nachgeführter aktiver Schirmung, Reizstromeinprägung, Vollbereichs-Gleichtaktspannungsunterdrückung (»ultra-high rail-to-rail-CMMR«), sehr geringen äquivalenten Eingangsstromfehlern und Eingangsrauschdaten (Schaltpläne, Bestückungspläne und Stücklisten am Ende des Kapitels)

5.4 Spezielle Methoden

5.4.1 Morphologie

Die Untersuchungen wurden an Adulttieren der clusterbildenden Spezies *Schilbe mystis* durchgeführt, einige hier nicht fotografisch dokumentierte Vergleichsbeobachtungen wurden auch an *Physalia spec.* und *Kryptopterus bicirrhis* vorgenommen. Alle Versuchstiere wurden entsprechend der oben gegebenen Vorschrift mit MS-222 betäubt. Die Färbung wurde – in Abweichung zur Vorschrift in der Arbeit von Jørgensen (Jørgensen 1992) – mittels 1M DASPEI (Diaminostyrylpyridiniumiodid, Rare and Fine Chemicals, New York, USA) durchgeführt. Das Absorptionsoptimum des Farbstoffs liegt bei 461 nm, das Emissionsmaximum bei 589 nm. Da – wie in Vorversuchen festgestellt – DASPEI bei *Schilbe mystis* kaum die Hautbarriere überwinden kann und bei äußerlicher Anwendung fast nur Sinneszellen, Ampullenbecher und Porus anfärbt, wurde der Farbstoff über eine Hautverletzung (Einstich mit Präpariernadel oder dünner Kanüle ca. 1mm von den zu färbenden Strukturen entfernt) appliziert. Ein Baden oder kontinuierliches Beträufeln des Hautareals während 2...3 Minuten erwies sich als ausreichend; längere Einwirkdauern führen zu einer Überfärbung der Sinneszellen, die dann den Verlauf der Nervenfasern und Dendriten überstrahlt. Nach der Einwirkzeit wurde das oberflächlich anhaftende DASPEI abgespült und der Fisch während der Diffusionsdauer in ein Becherglas mit frischem Wasser überführt. Dieses Vorgehen ist einfach durchführbar und erzielte reproduzierbar gute Ergebnisse. Es zeigt sich, daß die Diffusionsgeschwindigkeit von DASPEI – trotz vergleichbarer Molekülmasse wie TTX – mit nur

2...3mm/h um fast eine Größenordnung niedriger liegt als die des TTX (Molekülmasse des DASPEI-Kations 253,37 (380,27 als Iodid), TTX 319,27), da DASPEI in starke Wechselwirkung mit Lipidmembranen tritt (Molecular Probes 1999) und deshalb nicht ungehindert diffundieren kann. Deshalb liegt die Zeitspanne, bis zum Erreichen optimaler Färbeergebnisse bei 1,0...1,5 h für die Beobachtung unter dem Fluoreszenzbinokular bzw. 0,75...1,0 h bei der Dokumentation unter dem konfokalen Laserscanningmikroskop (hier sind – im Vergleich zum Fluoreszenzbinokular – frühere, schwächer gefärbte Stadien vorzuziehen, weshalb die Färbung bereits nach einer halben Stunde begutachtet und ein interessantes Cluster für die Aufnahme eingestellt werden sollte, damit im optimalen Zeitfenster zwischen 0,75...1,0 h alles für die entscheidenden Aufnahmen vorbereitet ist) bei einem Applikationsabstand von 1 mm; eine Verringerung der Applikationsdistanz und damit der Diffusionsstrecke ist nicht ratsam, da erstens der Konzentrationsgradient des Farbstoffs zu steil und damit die Färbintensität zu inhomogen wird und zweitens ein stark fluoreszierender Farbstoffhof, der sich stets um die Einstichstelle bildet und mehrere hundert Mikrometer im Durchmesser aufweisen kann, störend dicht an die zu beobachtenden Strukturen heranreicht und diese überdeckt oder (falls außerhalb der Schärfenebene lokalisiert) zumindest überstrahlt.

Beim Arbeiten unter dem Auflichtfluoreszenz-Binokular sollte für die fotografische Dokumentation die Hintergrundbeleuchtung auf ein Kontrastverhältnis von etwa 1:4 oder -2 LW, bezogen auf die Fluoreszenzhelligkeit der gefärbten Fasern, eingestellt werden (wird bei den Aufnahmen Maximalkontrast gewünscht, so sollte von vorgenannter Einstellung ausgehend die Hintergrundbeleuchtung durch

ein ND4-Filter (Graufilter der Dichte 0,6) abgeschwächt und der Belichtungswert um 2 LW gegenkorrigiert werden), da dann bei integraler Meßcharakteristik der Binokularkamera ein gutes Auflösungsvermögen bei hohen Kontrastwerten (kräftig fluoreszierende Strukturen vor fast zeichnungslos dunklem Hintergrund) ohne Überstrahlungslichthöfe gewährleistet ist. Das Versuchstier liegt während der Untersuchung in einer gläsernen Petrischale und wird ca. alle fünf Minuten mittels Pasteurpipette mit Wasser benetzt, um ein Austrocknen der Haut zu verhindern. Da das Versuchstier nicht unter Wasser liegt und flotieren kann, ist das Präparat auch bei den resultierenden langen Belichtungszeiten (typ. zwischen 4...8min bei 800 ASA Material) hinreichend stabil; ein Trockenfallen der Haut muß jedoch zu jeder Zeit unter allen Umständen vermieden werden. Als Filmmaterial (nur CN-Material kommt in Betracht) sollte der Fuji New Superia 800 (mit neuer Emulsionstechnologie und vierter Farbschicht, deutlich bessere Ergebnisse bzgl. spektraler Empfindlichkeit auf die Emissionslinien, Kornstruktur und Kornrauschen als der frühere Superia 800 oder die aktuellen Vergleichstypen der Firmen Agfa und Kodak), belichtet auf 640 ASA oder bevorzugt mit »Push-1«-Entwicklung (»Push-Gewinn« nur $\frac{2}{3}$ LW) auf eine Empfindlichkeit 1000 ASA für Ergebnisse mit optimaler Detailwiedergabe, bzw. Fuji Superia 1600, gepusht auf 3200 ASA bei deutlichen Abstrichen an Körnigkeit, Kontrastverhalten und Detailwiedergabe für bequeme und schnelle Dokumentationszwecke (Belichtungszeit 1...2 min) eingesetzt werden. Filmmaterial mit 400 ASA und darunter sollte vermieden werden, da im Vergleich zu Fuji New Superia 800 bei 640 ASA emulsionsbedingt kaum ein Qualitätsgewinn zu erzielen ist, die Qualitätsminderung und Probleme bei Belichtungszeiten ab ca. 8 Minuten durch beginnende Trock-

nung und Schrumpfungartefakte (Bewegung im Präparat, Trübungsbildung) kaum vermeidbar sind. Eine geringfügige Verbesserung der Bildergebnisse lässt sich mit Latensifikation durch »pre-fogging« (diffuse unterschwellige Vorbelichtung) im unteren Schleierbereich der Emulsions-Gradationskurve bei -3 LW erzielen; hierdurch wird die Wiedergabe und Differenzierung von Bilddetails in den dunklen Bildpartien erkennbar verbessert durch Kompensation der Gradationsverflachung im Schleier-Durchhang-Bereich bei gleichzeitiger Erhöhung der nutzbaren Empfindlichkeit um 50%. Als weitere Möglichkeit kann das Präparat während der Binokularbetrachtung unter Wasser gehalten und mechanisch gut fixiert werden; die Analflosse wird zusätzlich durch eine Glasplatte fixiert. Die Schwierigkeiten der mechanischen Fixierung und der Gasblasenbildung (Wasser zuvor im »Wasserstrahlvakuum« leicht entgasen, beseitigt dieses Problem) sind bei langen Belichtungszeiten in der Mikrofluoreszenzphotografie zuweilen größer als bei der elektrophysiologischen Ableitung aus dem Ampullenlumen.

Für den Einsatz unter dem konfokalen Laserscanningmikroskop wurde ein spezielles Fischbecken gebaut, in dessen Boden ein Beobachtungsfenster in Deckglasstärke 0,17 mm bzw. 1/150 Inch (inverses Mikroskop!) mittels Cyanacrylatkleber eingeklebt ist (ein dickeres Glas würde zu Problemen mit Objektivkorrektur und unzureichender Fokustiefen im Präparat führen). Kleinere Versuchstierexemplare können im Ganzen auf dem Objektisch unter dem Kondensator platziert werden; alternativ besteht die Möglichkeit, die Analflosse vom Rumpf weiträumig mit der unteren Rumpfpattie abzutrennen und unter dem Laserscanningmikroskop zu untersuchen. In beiden Fällen wird die unter einer dünnen Wasserschicht von 3...5mm Höhe liegende Anal-

flosse mittels Objektträgern beschwert, um eine Bewegung während der Scanningaufnahmen auszuschließen. Die Aufnahmen werden digital als »Image-Stacks« abgespeichert, mittels der Software Scion Image Version Release Beta 3b (<http://www.scioncorp.com>) invertiert und vorverarbeitet und alle rekonstruktionsrelevanten Schichtebenen als »single-layer tagged image files« zur Weiterverarbeitung in Photoshop importiert, wo sie – wie auch die digitalisierten Aufnahmen des Auflichtfluoreszenz-Photobinokulars – mittels selbstentwickelter automatisierter Makro-Scripts unter Verwendung von Kontrast- und Dichtemaskierung, Gradationsausgleich, Denoisingalgorithmen, Matrizen- und Maskentechniken, ChOps, Layerblends die Einzelschichtaufnahmen hinsichtlich der Wiedergabe der morphologischen Strukturen optimiert (die Algorithmen zielen darauf ab, lokale Strukturkontraste herauszuarbeiten und vom Störungshintergrund abzuheben), pixelgenau übereinander ausgerichtet und mittels Überblendmaskierung wieder ineinander montiert werden.

5.4.2 Interspike-Intervall-Statistik

Alle Versuche wurden an kleineren Exemplaren (90...120 mm Körperlänge) adulter Tiere der Spezies *Schilbe mystis* mit »morphologisch und physiologisch gesunden« (Definition s.o.) Rezeptororganen durchgeführt. Bei der Messung handelte es sich um eine Standard-Einzelampullenableitung; die Ergebnisse wurden auf Videoband aufgezeichnet und die Interspike-Intervalle bei Einzelbildwiedergabe mittels Schablone auf 0,5 ms genau ausgemessen und in den Computer aufgenommen. Die Klassifizierung, Auswertung und Histogrammdarstellung erfolgte in der wissenschaftlichen Datenanalyse- und Gra-

phiksoftware MicroCal Origin 4.1. Der Kurvenfit der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen erfolgte für die Spontanaktivität mittels »Gaussian-Fit, Single Peak«, für das Ergebnis nach proximaler TTX-Applikation mittels »Gaussian-Fit, Multi Peak« und für die irreguläre Aktivität post appl. von MS-222 parameterfrei mittels »Chi-Square-Fit, 12df« (die Auswahl dieses nichtparametrischen Fitverfahrens erfolgte aufgrund der Versuchsergebnisse und Histogrammform, die beide chaotisches Verhalten entkoppelter Subsysteme anzeigen und so auf unabhängige Eingangsvariable verweisen; da das untersuchte Cluster aus 12 ampullären Organen besteht, die potentiell unabhängige Subsysteme darstellen könnten, wurden die Freiheitsgrade des Systems entsprechend festgelegt und damit eine gute Annäherung erzielt, Umkehrschlüsse von der Fitfunktion auf den physiologischen Mechanismus sind deshalb mit Vorsicht zu interpretieren; die aus der Interspike-Intervall-Analyse resultierenden Interpretationen sind jedoch eindeutig und vollständig unabhängig von der verwendeten Fitfunktion). Dem Intervallklassenhistogramm wurde die gefittete Funktionskurve hinterlegt und die errechneten Werte des Fits numerisch angegeben.

Anmerkung zur Gewinnung der Interspike-Intervall-Histogramme bei proximaler TTX-Vergiftung: Bei proximaler TTX-Vergiftung ist es schwierig, aussagekräftige Interspike-Intervall-Histogramme zu erhalten. Im Gegensatz zu Spontanaktivität oder irregulärer Aktivität in der »Aufwachphase« der afferenten Neurone nach MS-222-Anästhesie, die ohne Probleme im Minutenbereich stabil registriert und ausgewertet werden können und damit eine hinreichend große Anzahl von Spikeereignissen für eine aussagekräftige statistische Auswertung liefern, verändern sich die Verhältnisse bei proximaler TTX-Vergiftung oft sehr schnell, da die Vergiftung rasch voranschreitet und das

Spikeintervallhistogramm beeinflusst. Integriert man hierbei über einen längeren Zeitraum (der zur Erstellung und Auswertung eines Interspike-Intervall-Histogramms notwendig ist), so verliert die Histogramm-Darstellung ihre Aussagekraft (durch den »peak shift« während der Auswertungsperiode verschwindet die Mehr Gipfligkeit) und suggeriert so eine falsche Deutung (zu dem Zeitpunkt, zu dem die Spikerate 50% der Spontanaktivität erreicht und das Interspike-Intervall-Histogramm eine besonders charakteristische Mehr Gipfligkeit zeigt, kann sich innerhalb von 10 Sekunden die Frequenz um 50% und mehr verändern – im Gesamtittel sind es über 30% –, noch drastischer fallen dabei oft die Veränderungen der Peakhöhen – insbes. der längeren Intervallkomponenten – aus; dadurch verwischt die charakteristische Kurvengestalt und es entsteht der Eindruck einer uncharakteristischen, breiten, linkssteilen Verteilungskurve; für eine tragfähige Auswertung benötigt man eine Auswertzeit von mindestens 20 Sekunden). Auch ein Poolen der Ergebnisse aus mehreren Versuchen schafft hier keine Abhilfe und wäre auch statistisch nicht zulässig.

Die abgedruckten Auswertungen (Interspike-Intervall-Histogramm, Scatterplot und approximierte Verteilungsdichtefunktion) wurden – wie zuvor empfohlen – bei einem Stadium der Vergiftung durchgeführt, bei dem die Spikerate auf 50% der Spontanaktivität abgesunken war. Kriterium für die Stabilität des ausgewerteten Zeitfensters war ein Histogrammvergleich zwischen der ersten und zweiten Hälfte der Meßperiode, die keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der statistischen Parameter sowie ihrer Form aufweisen durften. Deshalb wurde zur genaueren Analyse eine Messung exemplarischen Charakters ausgewählt, die dieses Kriterium bestmöglich erfüllte und über 20 Sekunden hinsichtlich der Interspike-Intervall-Verteilung weitestge-

hend stabile Verhältnisse aufwies und damit die Auswertung von 323 Spikes für die Analyse zuließ; zudem besaß es ein ähnliches Aktivitätsniveau, wie das Organsystem, das für die anderen beiden Interspikereintervall-Verteilungsuntersuchungen herangezogen wurde.

5.4.3 Amplitudenvergleich

Diese Versuche wurden ebenfalls an kleineren Exemplaren (80...120 mm Körperlänge) adulter Tiere der Spezies *Schilbe mystis* mit morphologisch und physiologisch gesunden (Definition s.o.) Rezeptororganen als Doppelableitungen aus je einer Ampulle in proximaler und distaler Extremposition innerhalb des Clusters an fünf Versuchstieren durchgeführt. An jedem der Versuchstiere wurden zwölf Mittelwertpaare aus jeweils 30 Einzelmessungen gewonnen und in die Auswertung einbezogen. Die Gesamtzahl der gepaarten Einzelmessungen der Spikeamplitude betrug somit 1800. Die Ergebnisse wurden auf Videoband aufgezeichnet und die Interspikereintervalle bei Einzelbildwiedergabe mittels Schablone mit einem maximalen Fehler von $\pm 2,5\%$ ausgemessen und in den Computer aufgenommen.

Ziel dieser Experimente war es festzustellen, ob innerhalb ausgehnter Cluster mit einer Längserstreckung von mehr als einem Millimeter ein Abfall der Spikeamplitude mit zunehmender Fortleitungstrecke zu beobachten ist, der bei elektrotonischer Ausbreitung der Aktionspotentiale von einem Impulsenstehungsort in der gemeinsamen Afferenz über die gesamte Strecke des Dendritenbaums bis zu den synaptischen Endigungen der entferntesten Organe unvermeidlich wäre (Weiteres siehe unter Ergebnisse und Diskussion). Zu diesem Zweck wurden zwei exakt abgegliche und im Rahmen des Mögli-

chen reproduzierbar platzierte Elektroden, bezeichnet als A und B, eingesetzt, um aus der "proximalsten" resp. "distalsten" Ampulle, bezeichnet als 1 und 2, simultan abzuleiten. Damit sind zwei Ableitkonstellationen möglich: A~1 – B~2 bzw. A~2 – B~1. Folgendes Meßschema wurde angewendet:

Versuchstier 1: Elektrode A mißt Ampulle 1 – Elektrode B mißt Ampulle 2 (in dieser Konstellation werden 30 Meßwertpaare für die Spikeamplituden an den zwei Ableitstellen ermittelt), dann Überkreuztauschen der Ableitelektroden: Elektrode A mißt Ampulle 2 – Elektrode B mißt Ampulle 1 (wiederum werden in dieser Konstellation 30 Meßwertpaare für die Spikeamplituden an den zwei Ableitstellen ermittelt), danach wird wieder in die Konstellation A~1 – B~2 für die Bestimmung weiterer 30 Wertepaare zurückgetauscht, danach wiederum A~2 – B~1 für die nächsten 30 gepaarten Meßwerte. Insgesamt wird die Elektrodenposition nach diesem Schema 6mal gewechselt. Diese Anwendungsvorschrift stellt einen Meßzyklus an einem Versuchstier dar; insgesamt wurden 5 Versuchstiere entsprechend dieser Vorschrift gemessen. Strenggenommen hätte man für jede Messung eine eigene Gleichung aufzustellen und damit ein System aus 1800 Gleichungen zu betrachten, das zusätzlich noch statistische Streuvariablen enthält. Da dies nicht darstellbar ist, wurde im Folgenden ein leicht vereinfachter Weg der Erklärung gewählt. Die Höhe des Aktionspotentials am Impulsentstehungsort sei als $U(0)$ bezeichnet (da es sich um eine Simultanauswertung der zusammengehörigen Wertepaare handelt, kann dieser Wert ohne statistische Varianz in die Berechnung eingehen, s.u.). Der Spannungswert $U(1)$, der in der Ampulle 1 meßbar ist, wird somit:

$$U(1) = U(0) \cdot a(\text{Fortleitungsstrecke}_1) \cdot a(\text{Membrandämpfung})$$

betragen, wobei a (Fortleitungsstrecke) die Signalamplitudendämpfung ($a = \text{»attenuation«}$) entlang der Fortleitungsstrecke im Dendritenbaum bezeichnet und a (Membrandämpfung) vereinfacht die Signaldämpfung beim Durchgang durch die Membranen und sonstigen Strukturen für das Signal auf seinem Weg von den synaptischen Endigungen bis in das Ampullenlumen darstellt. Entsprechendes gilt für $U(2)$. a (Fortleitungsstrecke) stellt somit die gesuchte Variable dar, die jedoch bei Kenntnis von $U(1)$ und $U(2)$ nicht von a (Membrandämpfung) getrennt werden kann (hypodeterminiertes Gleichungssystem aus zwei Gleichungen mit drei Unbekannten). Da jedoch anzunehmen ist, daß die "Membrandämpfung" einen relativ schwachen bzw. konstanten Einflußfaktor darstellt (was die späteren Experimente erhärteten) und dieser Parameter eine statistische Verteilung aufweist, die nicht mit der Lage des Organs im Cluster korreliert (was durch morphologisch erfaßbare Daten wie Länge, Breite, Porusdurchmesser der Ampulle, Zahl, Größe, Ausbreitung der Sinneszellen am Ampullenboden, Durchmesser und Bau der Dendriten und damit wahrscheinlich auch der Synapsen unterstützt wird), kann die Varianz dieses Parameters über die interexperimentelle Statistik aus den Versuchsergebnissen zu 2,1% abgeschätzt und durch Mittelung auf 0,9% Standardabweichung verringert werden.

Entsprechendes gilt für Varianzen im Ableitsignalfad. Hier gilt:

$$U(1') = U(1) \cdot a(\text{Elektrode}_A) \cdot f(\text{Platz}_i) \cdot g(\text{Signalverarb.}).$$

oder, da $g(\text{Signalverarb.})$ der elektronischen Geräte in der Signalverarbeitungskette exakt bestimmbar ist und somit eliminiert werden kann:

$$U(1'') = U(1) \cdot a(\text{Elektrode}_A) \cdot f(\text{Platz}_i).$$

Hierbei stellt wieder $U(1)$ den Spannungswert dar, der in der Ampulle 1

abgreifbar ist, $a(\text{Elektrode_A})$ die Signaldämpfung von der Ableitelektrode A bis zur Eingangsstufe des Vorverstärkers A und $f(\text{Platzierung_i})$ einen Platzierungsfaktor der Ableitelektrode im jeweiligen Experiment i , der jedoch – wie wir in einem anderen Vorversuch bestimmen konnten (s.o.) – bei sorgfältigem Arbeiten nur einen sehr geringfügigen Einfluß auf das Versuchsergebnis (weit unter 1%) besitzt und statistisch variiert und damit bei der sechsmaligen Neuplatzierung der Elektrode im Mittel unter 0,3% fallen dürfte. Um die Identität von $U(1)$ über die Bestimmung von $U(1'')$ herstellen zu können, fehlt noch der Parameter $a(\text{Elektrode})$. Da es jedoch nur um vergleichende Aussagen zwischen $U(1)$ und $U(2)$ geht, kann dieser Parameter durch das Überkreuztauschen zwischen der Situation $A\sim 1 - B\sim 2$ und $A\sim 2 - B\sim 1$ genau bestimmt und über die Durchschnittsbildung mit der Reziprosksituation aus Symmetriegründen rechnerisch eliminiert werden. Somit sind durch dieses Vorgehen alle Unbekannten dieses einfachen Gleichungssystems bestimmbar und das Verhältnis $U(1)/U(2)$ kann ermittelt werden.

Somit lauten die Gleichungssysteme für die aus jeweils 30 Einzelmessungen gewonnenen Amplitudenwerte:

$$U(1''_i) = U(0) \cdot a(\text{Fortl.}_1) \cdot a(\text{Membr.}) \cdot a(\text{Elekt_A}) \cdot f(\text{Platz_i})$$

$$U(1''_i) = U(0) \cdot a(\text{Fortl.}_1) \cdot a(\text{Membr.}) \cdot a(\text{Elekt_B}) \cdot f(\text{Platz_i})$$

$$U(2''_i) = U(0) \cdot a(\text{Fortl.}_2) \cdot a(\text{Membr.}) \cdot a(\text{Elekt_B}) \cdot f(\text{Platz_i})$$

$$U(2''_i) = U(0) \cdot a(\text{Fortl.}_2) \cdot a(\text{Membr.}) \cdot a(\text{Elekt_A}) \cdot f(\text{Platz_i})$$

Da jede dieser Situationen (= Gleichungen) 15mal eingenommen wird, lassen sich nach Normierung die störenden Variablen eliminieren und der Quotient $U(2) / U(1)$ letztendlich zu $1,017 / 0,983$ bestimmen (der höhere Amplitudenwert an der distalen Ampulle).

Für die Abschätzung der notwendigen Längskonstante wurde die statische bzw. dynamische Signaldämpfung berechnet und deren ma-

ximal möglicher Wert über die Signifikanzanalyse auf 95%-Niveau mittels der Datenanalysesoftware MicroCalOrigin 4.1 auf der Basis des Standardfehlers der Messung über die Studentsche t-Verteilung ermittelt; zur besseren Veranschaulichung wurde die dynamische Dämpfungsfunktion über der Längskonstante gemeinsam mit den Konfidenzintervallen nach Student auf normalem Signifikanzniveau (95% bzw. $1,96\sigma$) aufgetragen, wie auch die Werte für die Signifikanzniveaus von 99,0% und 99,9% markiert.

5.4.4 TTX-Vergiftung

Diese Versuche wurden an semiadulten Tieren ab 65mm Körperlänge und kleineren Exemplaren (80...130 mm Körperlänge) adulter Tiere der Spezies *Schilbe mystis* mit morphologisch und physiologisch gesunden (Definition s.o.) Rezeptororganen als Doppelableitungen aus je einer Ampullen in möglichst proximaler und distaler Extremposition innerhalb eines Clusters durchgeführt. Es wurden stets Cluster vom Bäumchentyp ausgewählt, deren Spontanaktivität zwischen 60 und 80 Hz lag und ein hohes Maß an Regelmäßigkeit aufwies. 1mg TTX ($C_{11}H_{17}N_3O_8$, MGW = 319,27g/mol) wurde für drei Ansätze aliquotiert und in 300 μ l H_2O gelöst, was zu einer 300nM Lösung führte. Nach entsprechenden Vorversuchen wurde die Applikation des Kanalblockers über eine Mikroläsion der Fischhaut durchgeführt, nachdem durch Leer- und Blindversuche sichergestellt war, daß weder die Mikroläsion die Messung beeinträchtigte, noch TTX auf anderem Wege (z.B. über die Haut) in den Fischkörper gelangen und an den Dendriten wirksam werden konnte. Diese Applikationsart erwies sich als zuverlässiger und reproduzierbarer als die ebenfalls versuchte

Mikroinjektion. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Diffusion von der Applikationsstelle weitgehend homogen und isotrop erfolgt und in guter Übereinstimmung mit den theoretisch zu erwartenden Ausbreitungsgeschwindigkeiten (siehe im Kap. »Ergebnisse«). Die günstigste Applikationsdistanz vom Rand des Clusters liegt bei einem Millimeter, da hier für die Versuchsdurchführung optimale Diffusionszeiten erreicht, mechanische und chemisch-osmotische Beeinträchtigungen minimiert und hinreichend klare Diffusionsgradienten erzielt werden.

Der Ablauf eines Experiments ist folgendermaßen: Betäubung und Wässerung des Versuchstiers bis zur Aufwachphase des peripheren Nervensystems und zum Wiedereinsetzen regulärer Spontanaktivität, sorgfältige Fadenfixierung des Fisches an einem mit der Erdungs- und Signalbezugselektrode versehenen Plexiglasstreifen, der dann am Boden des Ableitbecken befestigt wird, und Vorbereitung der Ableitelektroden wie zuvor beschrieben. Zu Beginn der Messung wird ein gesundes Cluster vom »Bäumchentyp« mit möglichst großer Längserstreckung ausgewählt und zwei Ampullen in proximodistaler Extremposition identifiziert. Die Elektroden werden in zuvor beschriebener Art in Optimalposition vorgeschoben und Spikeamplitude und Spontanfrequenz kurz auf Videoband aufgezeichnet. Nach Festhalten der Position werden die Elektroden zurückgezogen und die Mikroläsion mittels einer Insektennadel 1 mm proximal bzw. distal des Clusterandes beigebracht. Danach werden die Elektroden wieder in die Ableitposition zurückgefahren, Frequenz und Amplitude überprüft, deren Werte sich durch die Hautpunktion nicht verändert haben dürfen, und wiederum eine kurze Kontrollsequenz (Nullsequenz) auf Videoband aufgezeichnet. Danach werden aus einer 1-ml-Insulinspritze mit 0,32-mm-Kanüle 2 bis 3 Tropfen der TTX-Lösung auf den Ein-

stichkanal aufgetropft und gleichzeitig die Versuchszeit gestartet und auf dem Videoband markiert. Unmittelbar vor der TTX-Applikation ($t = 0$) sowie alle 30 Sekunden werden die Amplitudenwerte für proximale und distale Ampulle sowie die Spikefrequenz ermittelt. Der Amplitudenwert ergibt sich durch arithmetische Mittelwertbildung aus den Amplituden von 30 Einzelspikes, der Frequenzwert aus dem arithmetischen Mittel von 30 Messungen der Spikeanzahl pro 100ms. Bei Experimenten mit Empfindlichkeitsbestimmung wurde zusätzlich die Reizantwort auf einen anodischen Rechteckreiz bei Lokalstimulation gemessen. Im Gegensatz zu den sonst verwendeten Meßwerten für die Spikerate sind hier die im entsprechenden Empfindlichkeitsdiagramm verwendeten Spikeanzahlen unmittelbar prä- und poststimulatorisch in einem einzelnen 100-ms-Zeitfenster erhoben. Da die Spikeamplitude von verschiedenen Faktoren abhängt und in dieser Versuchskonstellation nicht exakt in ihrer absoluten Größe bestimmt werden kann, werden – zur besseren Vergleichbarkeit – alle Spikeamplituden auf den mittleren Spikeamplitudenwert zum Versuchszeitpunkt $t=0$ normiert. Für die Frequenzwerte, die zwar leicht zu ermitteln sind, jedoch in ihrer individuellen Höhe keine verwertbare Aussage besitzen (es interessiert deren TTX-induzierte *Veränderung*), gilt Entsprechendes. Die Einzelmessungen besitzen alle charakteristische und stets reproduzierbare Eigenschaften, wie im Kap. »Ergebnisse« dargestellt, sind jedoch im individuellen Verlauf und in der Versuchsdauer unterschiedlich. Dies ist hinderlich, wenn genauere Aussagen und Vergleiche zwischen beiden Vergiftungssituationen (proximal und distal) getroffen werden sollen, die auf der Typizität der Experimentalgesamtheit und deren Varianz (und nicht der Interpretation der Individualkurven) beruht. Deshalb wurde auch die Versuchsdauer normiert

(100% entspricht dem letzten Meßwert vor vollständiger Vergiftung des Systems). Die in dieser Weise normierten Einzelversuche können unter linearer Interpolation der Meßwerte gemittelt und ihre Standardabweichung bestimmt werden. Auf diese Weise erhält man charakteristische und gut interpretierbare Mittelwertskurven des Systemverhaltens bei beiden Vergiftungsszenarien. Tabelle aller gemittelten Meßwerte:

rel.Zeit	P1 fern	P1 nah	P2 fern	P2 nah	P3 fern	P3 nah	P4 fern	P4 nah	P5 fern	P5 nah	MW±SE nah
0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	100±0,0%
0,125	0,997	0,978	1,037	1,057	1,038	0,997	0,997	0,995	0,996	0,998	98 ±1,7%
0,250	1,018	0,980	1,077	1,119	1,059	0,999	1,035	0,997	0,997	0,999	98 ±2,5%
0,375	1,019	0,978	1,137	1,135	1,017	0,958	1,057	0,995	0,979	0,979	97 ±2,8%
0,500	0,999	0,959	1,139	1,137	0,995	0,897	1,036	0,976	0,979	0,977	95 ±3,3%
0,625	0,996	0,958	1,118	1,077	0,996	0,857	1,020	0,975	0,957	0,958	94 ±3,0%
0,750	0,976	0,938	1,055	1,037	1,020	0,877	0,999	0,998	0,959	0,935	92 ±2,9%
0,875	0,960	0,898	1,044	1,018	1,001	0,856	0,964	0,896	0,942	0,876	89 ±2,8%
1,000	0,923	0,877	1,004	0,997	0,922	0,779	0,922	0,799	0,901	0,858	81 ±3,9%
rel.Zeit	P6 fern	P6 nah	P7 fern	P7 nah	P8 fern	P8 nah	P9 fern	P9 nah	P10 fern	P10 nah	MW±SE nah
0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	100 ±0,0%
0,125	1,059	0,995	1,058	0,996	0,837	0,836	0,997	0,976	0,995	0,997	100 ±1,9%
0,250	1,118	0,998	1,097	0,999	0,718	0,779	0,996	0,956	0,997	0,978	101 ±3,4%
0,375	1,116	0,996	1,056	0,997	0,738	0,756	0,980	0,917	0,999	0,979	101 ±3,3%
0,500	1,118	0,997	1,058	0,998	0,820	0,697	0,978	0,896	0,996	0,977	101 ±2,6%
0,625	1,099	0,992	0,996	0,999	0,858	0,716	0,957	0,878	0,998	0,958	100 ±2,2%
0,750	1,077	0,979	0,996	0,960	0,877	0,680	0,958	0,879	0,999	0,920	99 ±1,7%
0,875	1,040	0,997	1,004	0,958	0,901	0,679	0,944	0,878	0,981	0,876	98 ±1,4%
1,000	1,043	0,995	0,965	0,699	0,862	0,659	0,943	0,856	0,984	0,616	95 ±1,6%
rel.Zeit	D1 fern	D1 nah	D2 fern	D2 nah	D3 fern	D3 nah	D4 fern	D4 nah	D5 fern	D5 nah	
0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
0,125	1,007	0,941	0,990	0,881	1,005	0,982	1,003	0,962	1,009	0,964	
0,250	1,024	0,722	1,007	0,444	0,985	1,023	0,963	0,884	0,980	0,822	
0,375	1,016	0,463	1,003	0,385	0,969	0,964	0,940	0,785	0,965	0,661	
0,500	0,972	0,404	0,936	0,344	0,979	0,644	0,931	0,703	0,892	0,643	
0,625	1,008	0,341	0,892	0,283	0,976	0,482	0,832	0,621	0,864	0,285	
0,750	1,010	0,324	0,714	0,263	0,964	0,404	0,767	0,583	0,781	0,184	
0,875	0,956	0,321	0,603	0,263	0,916	0,322	0,698	0,500	0,698	0,185	
1,000	0,614	0,320	0,427	0,263	0,766	0,223	0,665	0,442	0,693	0,185	
rel.Zeit	D6 fern	D6 nah	D7 fern	D7 nah	D8 fern	D8 nah	D9 fern	D9 nah	D10 fern	D10 nah	MW±SE fern
0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	100 ±0,0%
0,125	0,994	0,921	0,992	0,822	1,004	1,022	1,001	0,880	1,006	1,023	100 ±0,2%
0,250	1,046	0,843	0,987	0,623	0,943	0,865	0,988	0,785	1,015	0,981	101 ±0,7%
0,375	1,043	0,784	0,939	0,522	0,972	0,721	0,922	0,621	1,025	1,000	99 ±0,9%
0,500	1,048	0,642	0,907	0,440	0,930	0,463	0,804	0,521	1,034	0,821	95 ±1,3%
0,625	0,990	0,500	0,830	0,341	0,961	0,305	0,812	0,425	1,011	0,662	92 ±1,7%
0,750	0,967	0,405	0,661	0,302	0,949	0,220	0,672	0,341	0,873	0,505	80 ±3,0%
0,875	0,885	0,303	0,501	0,283	0,964	0,102	0,497	0,181	0,731	0,361	71 ±3,4%
1,000	0,811	0,245	0,311	0,245	0,870	0,102	0,370	0,122	0,486	0,241	57 ±3,2%
rel.Zeit	D11 fern	D11 nah	D12 fern	D12 nah	D13 fern	D13 nah	D14 fern	D14 nah	D15 fern	D15 nah	MW±SE nah
0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	100 ±0,9%
0,125	1,007	0,960	0,996	1,020	1,010	0,963	0,992	0,962	0,992	0,924	95 ±0,9%
0,250	1,055	0,563	1,110	1,064	1,000	0,803	0,996	0,763	0,986	0,742	80 ±4,6%
0,375	1,067	0,522	1,137	0,681	1,018	0,705	0,916	0,525	0,877	0,624	66 ±5,1%
0,500	1,028	0,225	1,057	0,642	0,961	0,583	0,865	0,424	0,866	0,563	54 ±3,5%
0,625	1,027	0,221	1,035	0,542	0,899	0,481	0,813	0,303	0,778	0,462	42 ±3,2%
0,750	0,889	0,224	0,871	0,481	0,695	0,342	0,661	0,282	0,579	0,363	35 ±3,3%
0,875	0,823	0,220	0,812	0,442	0,625	0,241	0,410	0,224	0,566	0,261	28 ±2,5%
1,000	0,707	0,223	0,604	0,383	0,385	0,201	0,291	0,142	0,518	0,183	23 ±2,2%

Bei den proximalen TTX-Versuche vor allem in der Anfangsphase mit dieser neuen Meßmethode trat bei einigen Experimenten eine ausgeprägte, weitgehend lineare Drift der meßbaren Spikeamplitude auf, die beide Ampullen fast in gleicher Weise betraf und typischerweise während der gesamten Meßdauer ab Versuchsbeginn ($t = 0$) gegenwärtig war. Damit unterscheiden sich diese Messungen klar von allen anderen TTX-Versuchen, die bis zum Erreichen des Wirkorts durch die TTX-Diffusion und dem Auftreten charakteristischer TTX-Wirkungen in ihrer Amplitude weitestgehend konstant bleiben (TTX benötigt eine gewisse Mindestzeitspanne, um den Wirkort zu erreichen; diese Zeitspanne muß für weiter entfernte Wirkorte größer sein, als für nahe dem Applikationsort liegende, und zwar nimmt die Diffusionsdauer – wie im Kap. Ergebnisse ausgeführt – stärker als das Entfernungsquadrat zu; eine reguläre Diffusionsfront muß naturgesetzlich nahe Wirkorte deutlich vor entfernteren erreichen, bevor sie dort eine Wirkung entsprechend ihres Konzentrationsgradienten entfalten kann; ist diese Abfolge nicht gegeben und setzen Drifterscheinung an einem nahen und einem weiter entfernten Wirkort gleichzeitig und praktisch ab Versuchsbeginn ein, verlaufen jedoch linear und nahezu parallel und bleiben aber in ihrer Stärke weit hinter den Auswirkungen auf den Spikegenerator zurück, während eine Auswirkung auf den Impulsentstehungsort erst sehr viel später beobachtet werden kann, so können diese Effekte keinesfalls TTX-induziert sein). Auch wenn diese Amplitudendrift einfach ignoriert werden könnte, da auch bei diesen Kurven kein signifikanter Unterschied in der Aktionspotentialamplitude zwischen beiden Ampullen auftritt und die lineare Drift keinen entscheidenden Einfluß über die Mittelwertskurven auf Ergebnisse und Diskussion der Modelle hätte,

sollte ihre Ursache geklärt werden, um die von dieser Störung betroffenen Messungen u.U. nicht unzulässigerweise in die Diskussion der TTX-Wirkungen einzubeziehen, da es sich bei diesem Phänomen auf Grund von Kinetik und Geschwindigkeit des Wirkungseintritts nicht um einen Effekt durch eindiffundiertes TTX handeln kann.

Drei Ursachen kommen potentiell für dieses Phänomen in Betracht: (1) Wird versehentlich – wie zuvor bereits erwähnt – eine Kapillare punktiert oder ein Stichkanal in ihrer unmittelbaren Nähe eingebracht, so kann hierdurch TTX in der terminalen Strombahn transportiert und in Sekundenschnelle über das Gewebe verteilt werden (wie im Experiment bereits beobachtet werden konnte). Dies stellt den einzigen gravierenden Störfaktor dar, der eine geregelte Diffusionsausbreitung des Kanalblockers verhindert und so zu einer Änderung der Angriffsrichtung oder zu diffuser Vergiftung der Dendritenprozesse führt. Hiervon betroffene Experimente zeigen mit großer Wahrscheinlichkeit neben den Amplitudeneffekten auch einen entsprechenden frühzeitigen Einfluß auf Spikefrequenz und -rhythmus. Die Gefahr einer Kapillarpunktierung ist bei proximalen TTX-Experimenten auf Grund von Lage und Tiefe des Stichkanals bei schlechterer visueller Kontrolle bedeutend größer. (2) Potentiell ist auch die Möglichkeit, daß TTX unkontrolliert über eine zufällig in der Fischhaut vorhandene, unauffällige Verletzung eindringt, wie sie in seltenen Fällen beobachtet werden konnte, nicht auszuschließen. Auch in diesem Falle könnte es entsprechend in Sekundenschnelle zu einer undefinierten Verteilung der Kanalblockermoleküle über die Blutbahn mit diffusen, nahezu unverzüglich eintretenden Veränderungen kommen. (3) Durch den Einfluß austretender ionenreicherer Körperflüssigkeit kann es – wie im Rahmen des ursprünglichen Promotionsthemas: »Physio-

logische Charakterisierung der Konvergenzbildung im elektro-sensorischen System clusterbildender Weise« untersucht (siehe oben) – zu gravierenden Einflüssen auf die Spikeamplitude kommen (in ähnlicher Weise kann auch durch Ionendiffusion aus der Spitze unsachgemäß präparierter Ableitelektroden die Amplitude der abgreifbaren Aktionspotentiale sogar vollständig zum Verschwinden gebracht werden). In Kenntnis dieses Effekts austretender Körperflüssigkeit in das Umgebungswasser des Ableitbeckens um die Läsionsstelle herum wurde deshalb nochmals eine Versuchsreihe mit 2 · 12 Experimenten durchgeführt, bei der proximal und distal in ca. 1 mm Entfernung vom abgeleiteten Cluster in der basisnahen Rezeptorreihe auf der Analflosse die Fischhaut mit einer feinen Kanüle von 0,4 mm Durchmesser punktiert wurde. Dies bedeutete im distalen Falle einen Durchstich durch die Analflosse, im proximalen Falle einen ca. 1 mm tiefen Einstich in den unteren Rumpfbereich. Bei letzterem läßt sich unter dem Binokular bei zuvor abgetrockneter Umgebung um den Stichkanal ein zwar geringfügiger, jedoch im Vergleich zur distalen Einstichsituation zuweilen deutlich stärkerer Austritt von Körperflüssigkeit beobachten. Die innerhalb von zehn Sekunden austretenden Flüssigkeitsvolumina wurden unter dem Binokular stereometrisch (Berechnung über die Kalottenvolumina) für die proximale Punktion auf 0,01...2 µl, für die distale Punktion jedoch auf 0,003...0,01 µl geschätzt. Diese grobe Schätzung kann zwar nicht als Grundlage der durch Diffusion in das Umgebungswasser austretenden Ionenmenge dienen; sie belegt jedoch klar die These eines zuweilen stärkeren Ionenaustritts im Falle proximaler Punktion. Um den Einfluß dieses Faktors auf Ableitexperimente zu überprüfen, wurden mit proximaler und distaler Punktion (die Einstiche wurden diesmal mit einer 0,6-

mm-Kanüle etwas stärker ausgeführt als die durchschnittlichen Stichkanäle im TTX-Experiment) jeweils drei Experimente durchgeführt; die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied im Amplitudenrückgang zwischen beiden Situationen. Während der mittlere Einfluß nach 5 min auf die ableitbare Amplitude nach Durchstich durch die Analflosse nur rund 5% beträgt (und somit die Ergebnisse des Vorversuchs bestätigt), geht die Spikeamplitude nach proximalem Einstich im Mittel um fast 32% zurück.

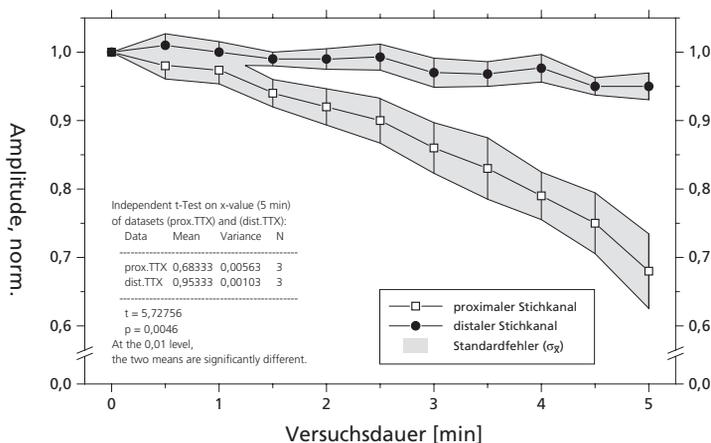


Abb. 5.4.1 Einfluß austretender Körperflüssigkeit auf die meßbare Spikeamplitude; zwischen proximaler und distaler Punktion besteht ein signifikanter Unterschied.

Jeder dieser Faktoren für sich beeinflusst in entsprechender Weise die meßbare Amplitude der Aktionspotentiale und ist damit in der Lage, die bei einigen der proximalen TTX-Vergiftungen auftretenden Driftstörungen der Spikeamplitude vollständig zu erklären, die nicht mit den Wirkungen einer definierten TTX-Diffusion vereinbart wer-

den können. Da diese Faktoren im Falle ihres Auftretens sich eindeutig im Ergebnis manifestieren und unkontrollierten Einfluß auf die Untersuchungsparameter ausüben, sollten Versuche dieser klar definierten Kategorie nicht in die Auswertung einbezogen werden.

5.4.5 Kathodische Inhibition

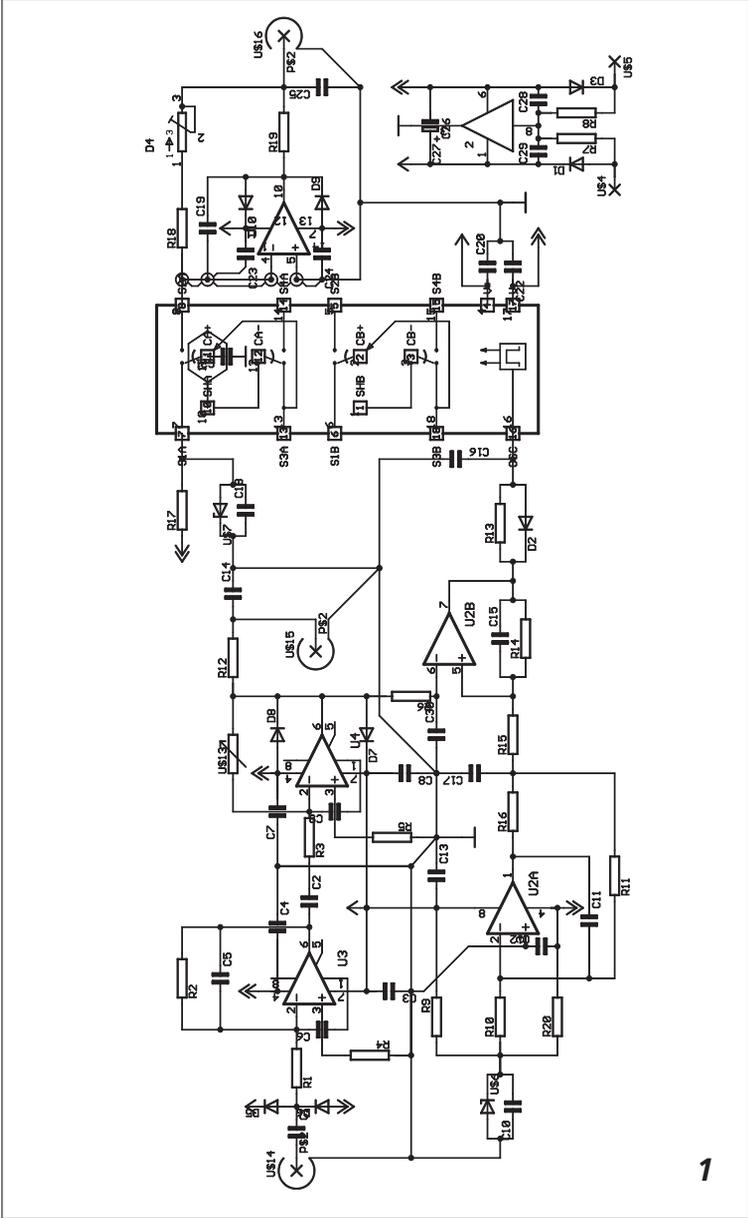
Alle Versuche wurden an kleineren Exemplaren (90...120 mm Körperlänge) adulter Tiere der Spezies *Schilbe mystis* mit »morphologisch und physiologisch gesunden« (Definition s.o.) Rezeptororganen durchgeführt. Bei der Messung handelte es sich um eine Standard-Einzelampullenableitung; die Ergebnisse wurden auf Videoband registriert und die bei diesen Versuchen relevanten Spikeraten zur direkten Auswertung über den Spikeratenausgangskanal des »Spikerate-Converters« direkt zusammen mit dem Stimulus auf dem Zweikanal-Kompensationsschreiber aufgezeichnet; das Integrationszeitfenster für die Frequenzermittlung betrug 200 ms. Als Stimulationsmethode kam wiederum Lokalstimulation zur Anwendung; die Stimulations-elektrode wurde von zwei in Serie geschalteten Reizgeräten gespeist (Hugo Sachs Stimulator für die periodischen Testsignale und Batterie-stimulator für den regelbaren Konstantspannungsanteil zur Inhibition des Clustersystems).

5.4.6 Korrelation zwischen Interspike-Intervall (ISI) und Spikeamplitude

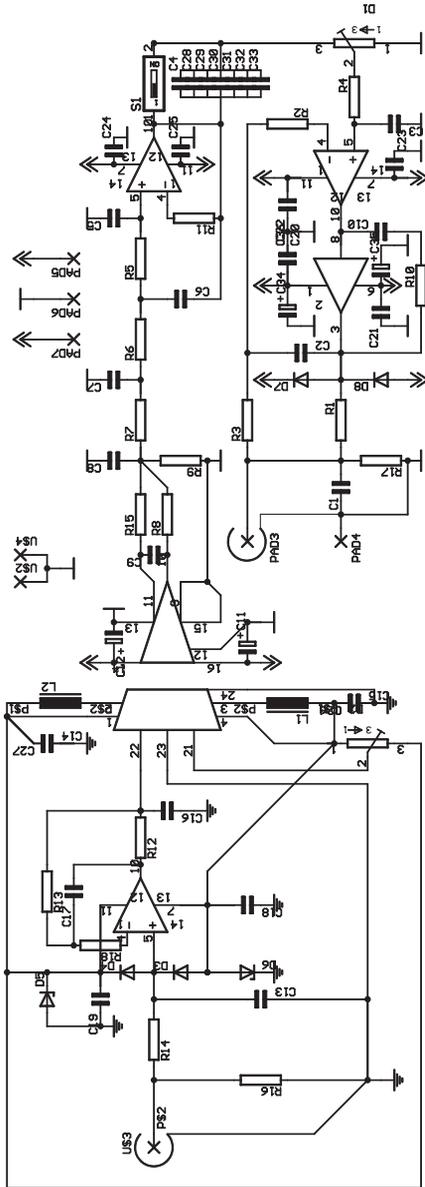
Alle Versuche wurden an kleineren Exemplaren (80...120 mm Körperlänge) adulter Tiere der Spezies *Schilbe mystis* sowie an Adulttieren der Spezies *Kryptopterus bicirrhis* (50...70 mm) mit »morphologisch und physiologisch gesunden« (Definition s.o.) Rezeptororganen durchgeführt. Als Stimulation kam Lokalstimulation zur Anwendung; die Stimuluserzeugung erfolgte mit einem Hugo Sachs Stimulator Typ 215/I mit Reizisoliereinheit Hugo Sachs O-10. Bei der Messung handelte es sich um eine Standard-Einzelampullenableitung; die Oszilloskopdarstellung erfolgte reizsynchron getriggert und wurde auf Videoband aufgezeichnet; die Interspike-Intervalle bei Einzelbildwiedergabe mittels Schablone auf 0,5 ms genau ausgemessen und im Computer erfaßt. Die weitere Auswertung, Darstellung und der Kurvenfit (parameterfreier asymptotischer Exponentialfit) erfolgte in der wissenschaftlichen Datenanalyse- und Graphiksoftware MicroCal Origin 4.1.

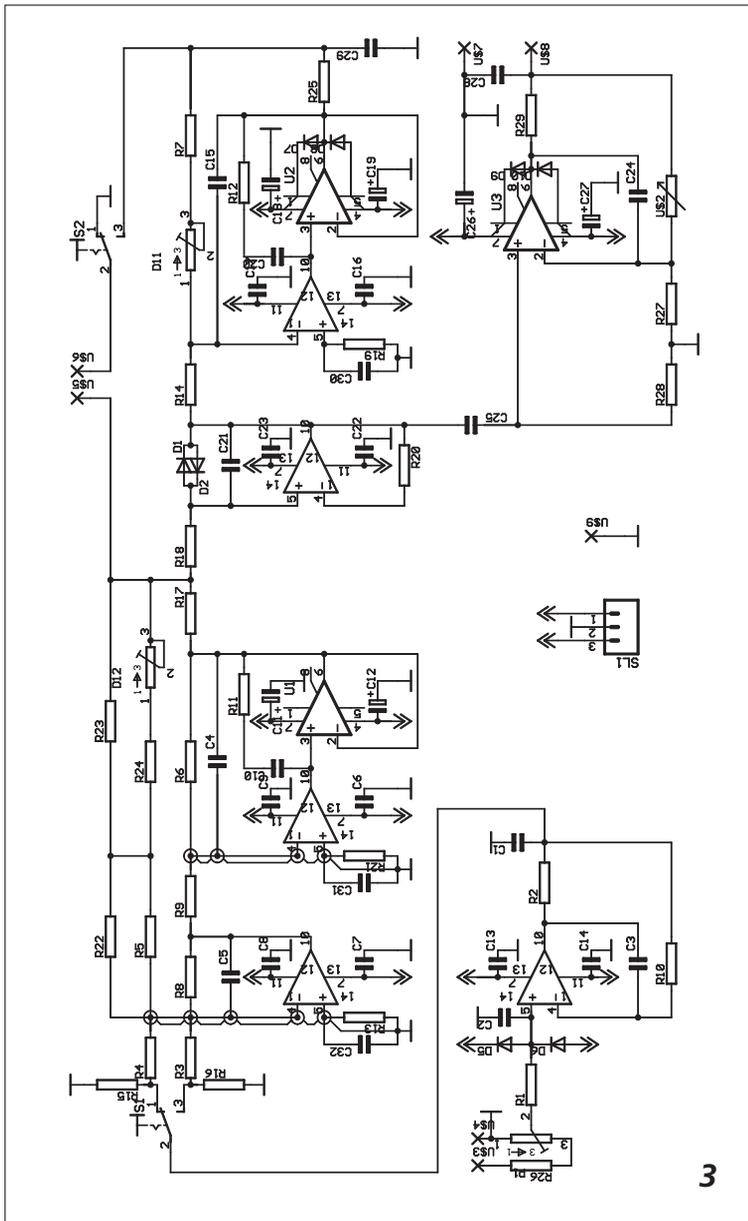
5.5 Anhang: Dokumentation der Schaltungen

Die Schaltpläne, Bestückungspläne und Stücklisten tragen jeweils eine Gerätenummer entsprechend der Auflistung in Abschnitt: 5.3.16.

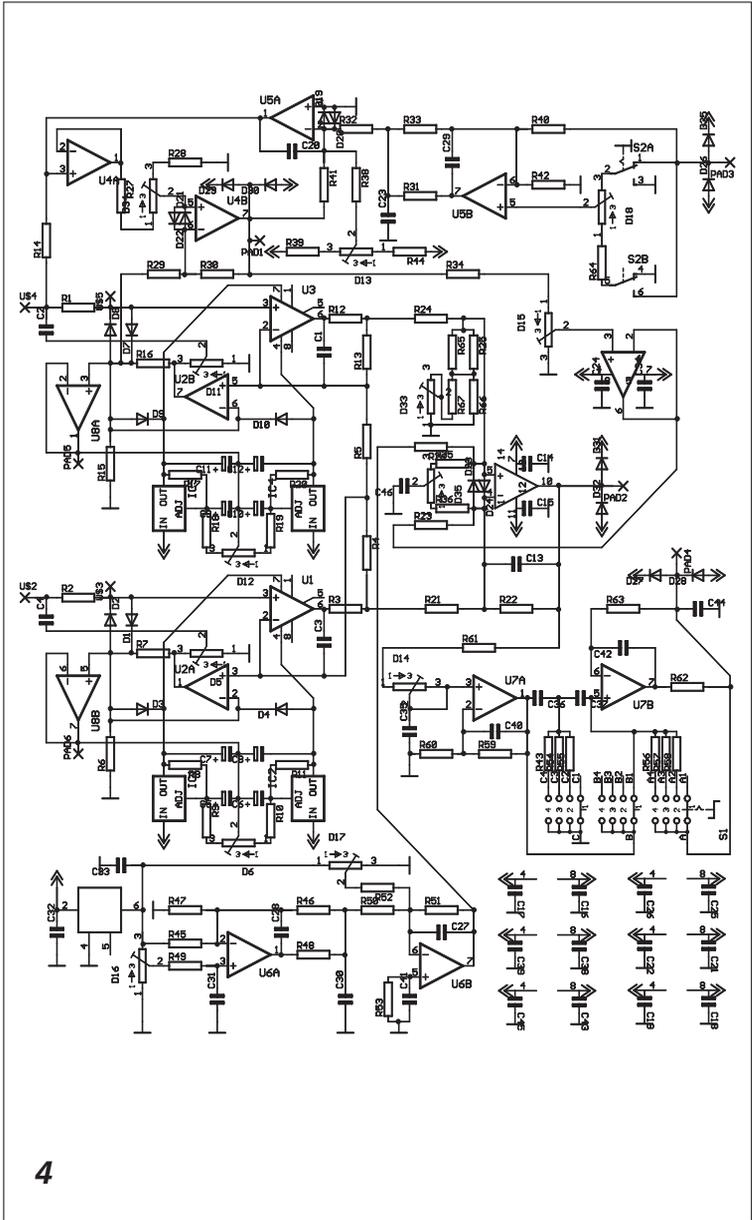


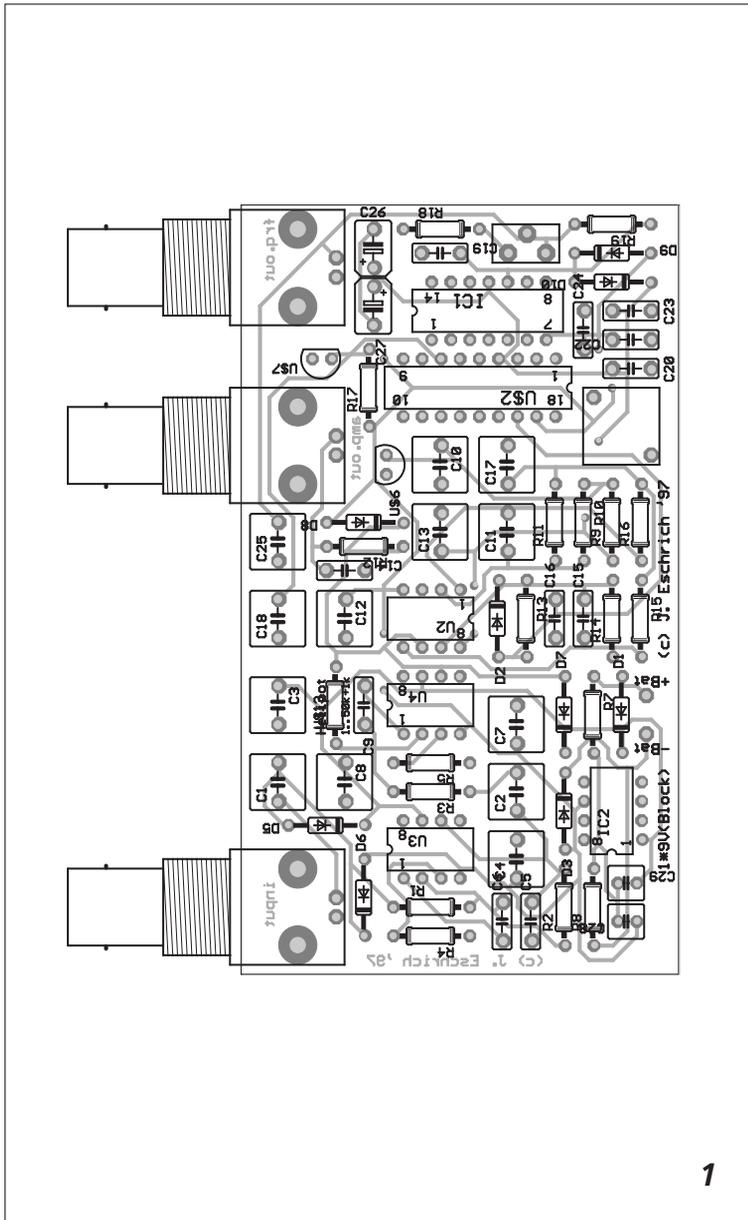
2

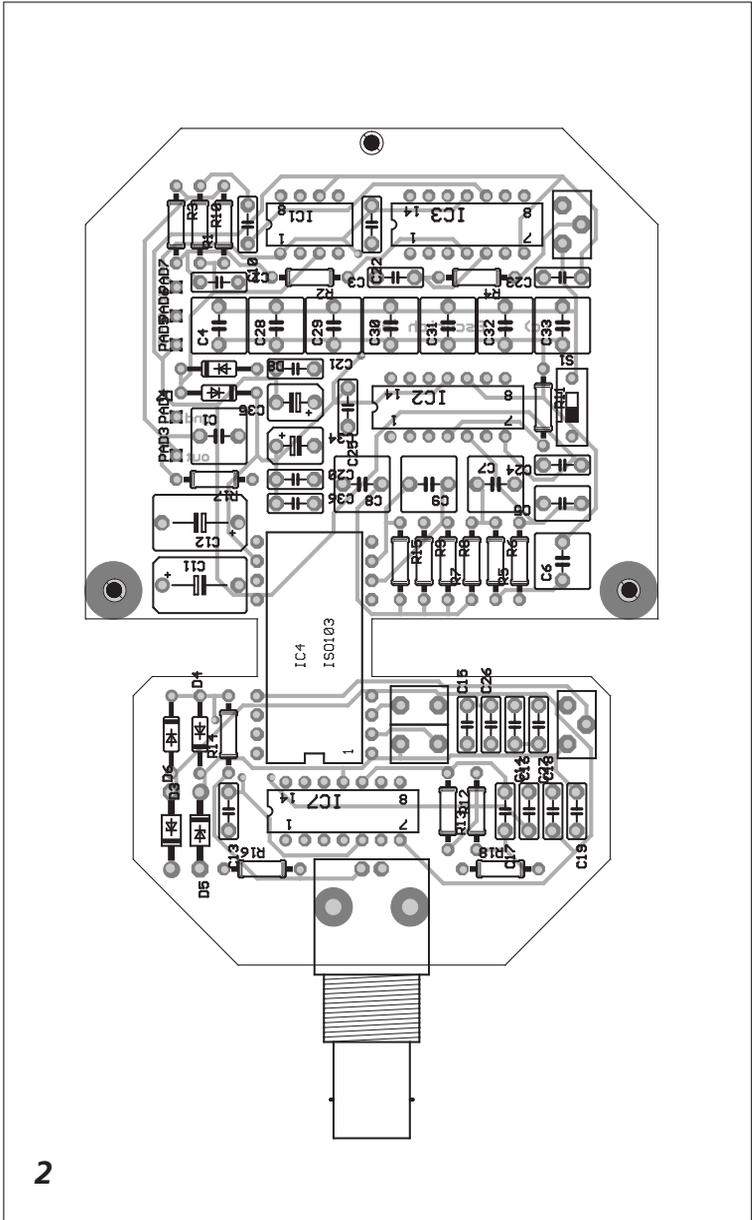




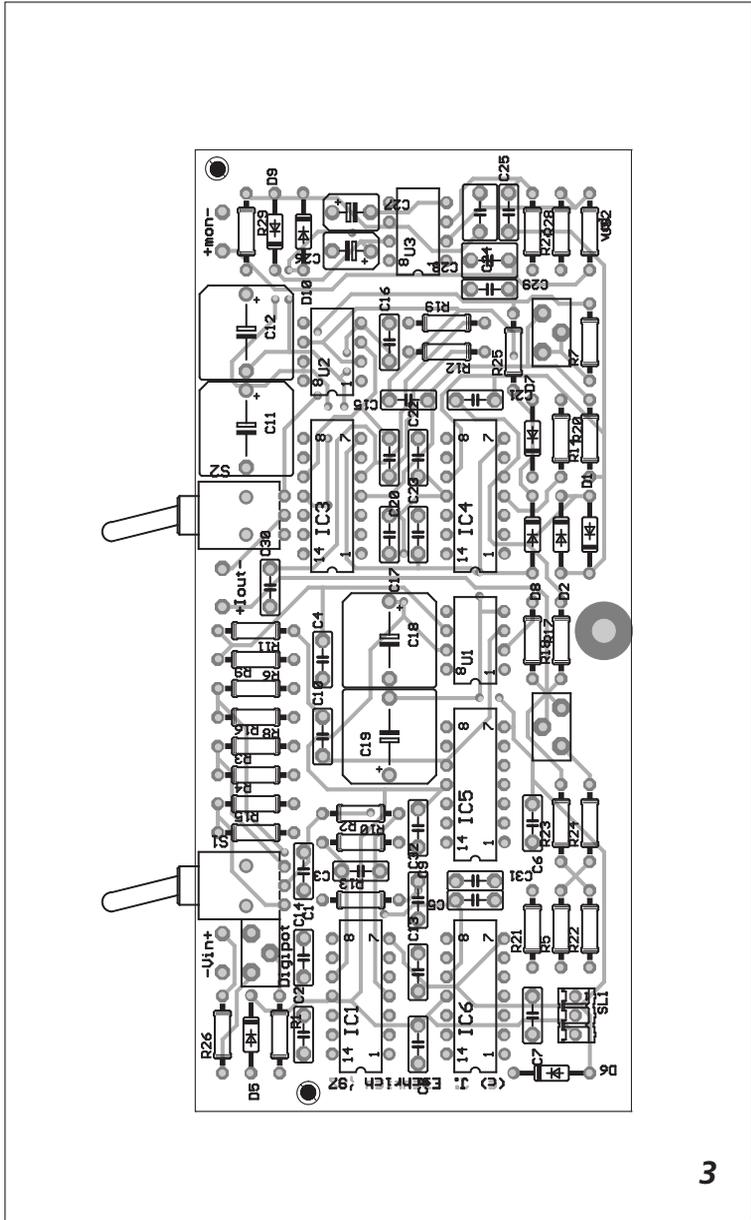
3







2



Partlist E:\EAGLE\projects\spikerate-15.txt exported from
spikerate-15.sch at 10.12.1997 01:53:09

Part	Value	Device	Package	Library	Sheet
C1	0μ33MKC	C5B7.2	C5B7.2A	CAP	1
C2	30nFKP	C5B7.2	C5B7.2A	CAP	1
C3	4μ7MKS	C5B7.2	C5B7.2A	CAP	1
C4	4μ7MKS	C5B7.2	C5B7.2A	CAP	1
C5	3n3FKC	C5B2.5E	C5B2.5A	CAP	1
C6	470pFKP	C5B2.5E	C5B2.5A	CAP	1
C7	4μ7MKS	C5B7.2E	C5B7.2A	CAP	1
C8	4μ7MKS	C5B7.2E	C5B7.2A	CAP	1
C9	470pFKP	C5B2.5E	C5B2.5A	CAP	1
C10	4μ7MKS	C5B7.2E	C5B7.2A	CAP	1
C11	4μ7MKS	C5B7.2E	C5B7.2A	CAP	1
C12	4μ7MKS	C5B7.2E	C5B7.2A	CAP	1
C13	4μ7MKS	C5B7.2E	C5B7.2A	CAP	1
C14	1n0FKC	C5B2.5E	C5B2.5A	CAP	1
C15	100pFKC	C5B2.5E	C5B2.5A	CAP	1
C16	1n0FKC	C5B2.5E	C5B2.5A	CAP	1
C17	4μ7MKS	C5B7.2	C5B7.2A	CAP	1
C18	4μ7MKS	C5B7.2	C5B7.2A	CAP	1
C19	33nMKC	C5B7.2	C5B2.5A	CAP	1
C20	1μXR7	C5B7.2	C5B2.5A	CAP	1
C21	33nSTY	STY7	STY7	CAP	1
C22	1μXR7	C5B7.2	C5B2.5A	CAP	1
C23	1μXR7	C5B7.2	C5B2.5A	CAP	1
C24	1μXR7	C5B7.2	C5B2.5A	CAP	1
C25	2μ2MKS	C5B7.2	C5B7.2A	CAP	1
C26	47μTaB	B45181B	B45181B	CAP-TANT	1
C27	47μTaB	B45181B	B45181B	CAP-TANT	1
C28	0μ68MKSO2	C5B2.5E	C2.5-5	CAP	1
C29	0μ68MKSO2	C5B2.5E	C2.5-5	CAP	1
D1	BAT43	1N4148	D035-10	DIODE	1
D2	BAT43	1N4148	D035-10	DIODE	1
D3	BAT43	1N4148	D035-10	DIODE	1
D4	0.5k	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D5	BAT43	1N4148	D035-10	DIODE	1
D6	BAT43	1N4148	D035-10	DIODE	1
D7	BAT43	1N4148	D035-10	DIODE	1
D8	BAT43	1N4148	D035-10	DIODE	1
D9	BAT43	1N4148	D035-10	DIODE	1
D10	BAT43	1N4148	D035-10	DIODE	1
IC1	LT1150.L	LT1150.L	DIL14	LINEAR	1
IC2	LT1010_CN8	LT1010_CN8	DIL08	LINEAR	1
R1	1k0	0207/10	0207/10	R	1
R2	10k	0207/10	0207/10	R	1
R3	1k0	0207/10	0207/10	R	1
R4	1k0	0207/10	0207/10	R	1
R5	1k0	0207/10	0207/10	R	1
R7	10k	0207/10	0207/10	R	1
R8	10k	0207/10	0207/10	R	1
R9	1k0	0207/10	0207/10	R	1
R10	2k48	0207/10	0207/10	R	1
R11	2k0	0207/10	0207/10	R	1
R12	10k	0207/10	0207/10	R	1
R13	10k	0207/10	0207/10	R	1
R14	100k	0207/10	0207/10	R	1
R15	1k25	0207/10	0207/10	R	1
R16	1k0	0207/10	0207/10	R	1
R17	1k0	0207/10	0207/10	R	1
R18	249k	0207/10	0207/10	R	1
R19	1k0	0207/10	0207/10	R	1
U\$2	LT1043	LT1043	DIL18	LINEAR	1
U\$4	PAD08-18	PAD08-18	PAD08-18	WIREPAD	1
U\$5	PAD08-18	PAD08-18	PAD08-18	WIREPAD	1
U\$6	LT1004-1.2	LT1004	T092H	DIODE	1
U\$7	LT1004-1.2	LT1004	T092H	DIODE	1
U\$13	0.50k+1k	VAR	0207/10	R	1
U\$14	BNC_L1	BNC_L1	BNC_L1	WIREPAD	1
U\$15	BNC_L1	BNC_L1	BNC_L1	WIREPAD	1
U\$16	BNC_L1	BNC_L1	BNC_L1	WIREPAD	1
U2	LT1112CN	OPA2111P	DIL08	LINEAR	1
U3	LT1008CN	OPA21Z	DIL08	LINEAR	1
U4	LT1008CN	OPA21Z	DIL08	LINEAR	1

Partlist E:\EAGLE\projects\trennverstärker-22.txt exported from
trenn_22s.sch at 10.12.1997 02:25:57

Part	Value	Device	Package	Library	Sheet
C1	0u33	C5B4,5	C5B7,2A	CAP	1
C2	15n	C5B4,5	C5B2,5A	CAP	1
C3	150p	C5B4,5	C5B2,5A	CAP	1
C4	4u7	C5B7,2	C5B7,2A	CAP	1
C5	1n0	C5B5,5	C5B4,5A	CAP	1
C6	4n7	C5B5,5	C5B7,2A	CAP	1
C7	10n	C5B5,5	C5B7,2A	CAP	1
C8	10n	C5B5,5	C5B7,2A	CAP	1
C9	10n	C5B5,5	C5B7,2A	CAP	1
C10	15n	C5B5,5	C5B2,5A	CAP	1
C11	68u Sie	TT5D10	B45181C	CAP-TANT	1
C12	68u Sie	TT5D10	B45181C	CAP-TANT	1
C13	100p	C5B5	C5B2,5A	CAP	1
C14	3u0 XR7	C5B5	C5B2,5A	CAP	1
C15	3u0 XR7	C5B5	C5B2,5A	CAP	1
C16	10n	C5B5	C5B2,5A	CAP	1
C17	10n	C5B5	C5B2,5A	CAP	1
C18	1u0 XR7	C2,5	C5B2,5A	CAP	1
C19	1u0 XR7	C2,5	C5B2,5A	CAP	1
C20	1u0	C2,5	C5B2,5A	CAP	1
C21	1u0	C2,5	C5B2,5A	CAP	1
C22	1u0	C2,5	C5B2,5A	CAP	1
C23	1u0	C2,5	C5B2,5A	CAP	1
C24	1u0	C2,5	C5B2,5A	CAP	1
C25	1u0	C2,5	C5B2,5A	CAP	1
C26	330n KR	C5B2,5	C5B2,5A	CAP	1
C27	330n KR	C5B2,5	C5B2,5A	CAP	1
C28	4u7	C5B7,2	C5B7,2A	CAP	1
C29	4u7	C5B7,2	C5B7,2A	CAP	1
C30	4u7	C5B7,2	C5B7,2A	CAP	1
C31	4u7	C5B7,2	C5B7,2A	CAP	1
C32	4u7	C5B7,2	C5B7,2A	CAP	1
C33	4u7	C5B7,2	C5B7,2A	CAP	1
C34	68uTaC	B45181B	B45181B	CAP-TANT	1
C35	68uTaC	B45181B	B45181B	CAP-TANT	1
C36	470n KP	C5B2,5E	C5B2,5A	CAP	1
D1	10k 1in	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D2	100k	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D3	BAT43	IN4148	DO35-10	DIODE	1
D4	BAT43	IN4148	DO35-10	DIODE	1
D5	ZPY16	ZPY	DO41Z10	DIODE	1
D6	ZPY16	ZPY	DO41Z10	DIODE	1
D7	BAT43	IN4148	DO35-10	DIODE	1
D8	BAT43	IN4148	DO35-10	DIODE	1
IC1	LT1010_CN8	LT1010_CN8	DIL08	LINEAR	1
IC2	LT1150_L	LT1150_L	DIL14	LINEAR	1
IC3	LT1150_L	LT1150_L	DIL14	LINEAR	1
IC4	ISO103	ISO103	ISO	LINEAR	1
IC7	LT1150_L	LT1150_L	DIL14	LINEAR	1
L1	47uH	NEOSID75	NEOSID75	IND-A	1
L2	47uH	NEOSID75	NEOSID75	IND-A	1
PAD5	1,6/0,8	1,6/0,8	1,6/0,8	WIREPAD	1
PAD6	1,6/0,8	1,6/0,8	1,6/0,8	WIREPAD	1
PAD7	1,6/0,8	1,6/0,8	1,6/0,8	WIREPAD	1
R1	50R	0207/10	0207/10	R	1
R2	100k	0207/10	0207/10	R	1
R3	1k0	0207/10	0207/10	R	1
R4	100k	0207/10	0207/10	R	1
R5	7k68	0207/10	0207/10	R	1
R6	2k49	0207/10	0207/10	R	1
R7	1k62	0207/10	0207/10	R	1
R8	1k0	0207/10	0207/10	R	1
R9	10k	0207/10	0207/10	R	1
R10	800R	0207/10	0207/10	R	1
R11	12k	0207/10	0207/10	R	1
R12	1k5	0207/10	0207/10	R	1
R13	1k5	0207/10	0207/10	R	1
R14	150k	0207/10	0207/10	R	1
R15	1k5	0207/10	0207/10	R	1
R16	10k	0207/10	0207/10	R	1
R17	10k	0207/10	0207/10	R	1

R18	150k	0207/10	0207/10	R	1
S1	DS01	DS01	DS-01	DILSWTCH	1
U\$2	PAD30-70	PAD30-70	PAD30-70	WIREPAD	1
U\$3	BNC_L1	BNC_L1	BNC_L1	WIREPAD	1
U\$4	PAD30-70	PAD30-70	PAD30-70	WIREPAD	1
U\$5	BNC_L1	BNC_L1	BNC_L1	WIREPAD	1

EAGLE Version 3.53 Copyright (c) 1988-1997 CadSoft

Partlist E:\EAGLE\projects\sym_cuco-25 exported from sym_cuco-25.brd at 10.12.1997 01:47:58

Part	Value Orientation	Package	Library	Position (inch)	
C1	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(1.25 1.725)	R180
C2	15nMKC	C5B2_5A	CAP	(0.4 1.725)	R0
C3	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(1.25 1.425)	R90
C4	10nMKS <i>i</i>	C5B2_5A	CAP	(2.35 1.625)	R0
C5	10nMKS <i>i</i>	C5B2_5A	CAP	(1.1 0.825)	R90
C6	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(1.5 0.525)	R180
C7	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(0.5 0.525)	R180
C8	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(0.35 1.125)	R180
C9	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(1.475 1.125)	R180
C10	100pFKP	C5B2_5A	CAP	(1.95 1.625)	R0
C11	150µTaD	B45181D	CAP-TANT	(3.55 2.025)	R180
C12	150µTaD	B45181D	CAP-TANT	(4.05 2.025)	R180
C13	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(0.725 1.125)	R0
C14	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(0.8 1.725)	R0
C15	10nMKS <i>i</i>	C5B2_5A	CAP	(3.7 1.175)	R90
C16	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(4 1.275)	R0
C17	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(3 1.275)	R180
C18	150µTaD	B45181D	CAP-TANT	(2.45 1.275)	R180
C19	150µTaD	B45181D	CAP-TANT	(1.95 1.275)	R0
C20	100pFKP	C5B2_5A	CAP	(3.4 1.275)	R180
C21	100pFKP	C5B2_5A	CAP	(3.7 0.825)	R270
C22	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(3.4 1.125)	R0
C23	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(3 1.125)	R0
C24	100pFKP	C5B4_5A	CAP	(4.675 0.8)	R180
C25	30nMKC	C5B2_5A	CAP	(4.675 0.65)	R0
C26	22µTaB	B45181B	CAP-TANT	(4.475 1.475)	R90
C27	22µTaB	B45181B	CAP-TANT	(4.675 1.475)	R270
C28	10nFKC	C5B4_5A	CAP	(4.425 0.75)	R90
C29	100nMKS	C5B2_5A	CAP	(4.275 0.75)	R270
C30	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(2.725 1.9)	R0
C31	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(1.2 0.825)	R270
C32	1µXR7	C5B2_5A	CAP	(1.1 1.125)	R0
D1	BAS404	D035-10	DIODE	(3 0.225)	R0
D2	2x8AV17	D035-10	DIODE	(3 0.375)	R180
D5	BAT43	D035-10	DIODE	(0.4 2)	R180
D6	BAT43	D035-10	DIODE	(0.2 0.425)	R270
D7	BAT43	D035-10	DIODE	(3.5 0.525)	R0
D8	BAT43	D035-10	DIODE	(3 0.525)	R180
D10	BAT43	D035-10	DIODE	(4.575 1.875)	R0
D11	BAT43	D035-10	DIODE	(4.575 1.725)	R180
D12	0. .2k	POT800	TRIMPOT	(4.05 0.425)	R180
D12	0. .10k	POT800	TRIMPOT	(2 0.425)	R0
IC1	LT1150CN14	DIL14	LINEAR	(0.6 1.425)	R0
IC3	LT1150CN14	DIL14	LINEAR	(3.2 1.575)	R0
IC4	LT1150CN14	DIL14	LINEAR	(3.2 0.825)	R0
IC5	LT1150CN14	DIL14	LINEAR	(1.7 0.825)	R0
IC6	LT1150CN14	DIL14	LINEAR	(0.6 0.825)	R0
P1	0. .10k Digi	POT800	TRIMPOT	(0.825 1.95)	R180
R1	100k	0207/10	R	(0.4 1.85)	R180
R2	1k0	0207/10	R	(1.4 1.425)	R270
R3	100k	0207/10	R	(1.75 1.975)	R270
R4	10M	0207/10	R	(0.95 1.975)	R270
R5	909k	0207/10	R	(0.95 0.375)	R0
R6	100k	0207/10	R	(2.35 1.975)	R90
R7	9k09	0207/10	R	(4 0.225)	R90
R8	100k	0207/10	R	(2.05 1.975)	R90
R9	100k	0207/10	R	(2.2 1.975)	R270
R10	1k5	0207/10	R	(1.55 1.425)	R90
R11	1M	0207/10	R	(2.5 1.975)	R90

R12	1M	0207/10	R	(3.95 0.975)	R90
R13	100k	0207/10	R	(1.1 1.425)	R270
R14	10k	0207/10	R	(3.5 0.225)	R0
R15	(100k)	0207/10	R	(1.45 1.975)	R270
R16	(10M)	0207/10	R	(1.9 1.975)	R270
R17	9k09	0207/10	R	(2.45 0.525)	R180
R18	10k	0207/10	R	(2.45 0.375)	R0
R19	10k	0207/10	R	(4.1 0.975)	R270
R20	10k	0207/10	R	(3.5 0.375)	R180
R21	100k	0207/10	R	(0.95 0.525)	R0
R22	90k9	0207/10	R	(0.95 0.225)	R0
R23	13k7	0207/10	R	(1.5 0.375)	R0
R24	16k5	0207/10	R	(1.5 0.225)	R0
R25	9k09	0207/10	R	(3.95 0.625)	R0
R26	1k0	0207/10	R	(0.4 2.15)	R0
R27	2k0	0207/10	R	(4.575 0.375)	R0
R28	10k	0207/10	R	(4.575 0.525)	R180
R29	1k0	0207/10	R	(4.575 2.025)	R180
S1	9070-1W	9070-1W	SWITCH	(1.175 2.025)	R270
S2	9070-1W	9070-1W	SWITCH	(3.1 2.025)	R270
SL1	M03	03P	CONQUICK	(0.5 0.3)	R180
U52	0..100k+20k	0207/10	R	(4.575 0.225)	R180
U53	PAD08-18	PAD08-18	WIREPAD	(0.925 2.15)	R0
U54	PAD08-18	PAD08-18	WIREPAD	(0.725 2.15)	R0
U55	PAD08-18	PAD08-18	WIREPAD	(2.625 2.15)	R0
U56	PAD08-18	PAD08-18	WIREPAD	(2.825 2.15)	R0
U57	PAD08-18	PAD08-18	WIREPAD	(4.675 2.15)	R0
U58	PAD08-18	PAD08-18	WIREPAD	(4.475 2.15)	R0
U59	PAD30-70	PAD30-70	WIREPAD	(2.5 0.15)	R0
U1	OP27Z	DIL08	LINEAR	(2.45 0.825)	R0
U2	OP27Z	DIL08	LINEAR	(3.95 1.575)	R0
U3	OP27Z	DIL08	LINEAR	(4.575 1.125)	R0

EAGLE Version 3.53 Copyright (c) 1988-1997 CadSoft

Partlist E:\EAGLE\projects\neurophysiol.txt exported from
neurophysiol-17.sch at 17.07.2001 00:01:13

Part	Value	Device	Package	Library	Sheet
C1	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C2	STY5	STY5	STY5	CAP	1
C3	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C4	STY5	STY5	STY5	CAP	1
C5	TT5D10	TT5D10	B45181B	CAP-TANT	1
C6	TT5D10	TT5D10	B45181B	CAP-TANT	1
C7	TT5D10	TT5D10	TT5D10	CAP-TANT	1
C8	TT5D10	TT5D10	TT5D10	CAP-TANT	1
C9	TT5D10	TT5D10	B45181B	CAP-TANT	1
C10	TT5D10	TT5D10	B45181B	CAP-TANT	1
C11	TT5D10	TT5D10	TT5D10	CAP-TANT	1
C12	TT5D10	TT5D10	TT5D10	CAP-TANT	1
C13	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C14	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C15	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C16	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C17	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C18	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C19	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C20	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C21	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C22	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C23	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C24	C5B3,5	C5B3,5	C5B3,5	CAP	1
C25	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C26	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C27	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C28	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C29	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C30	C5B3,5	C5B3,5	C5B3,5	CAP	1
C31	C5B7,2	C5B7,2	C5B7,2	CAP	1
C32	C5B7,2	C5B7,2	C5B7,2	CAP	1
C33	C5B7,2	C5B7,2	C5B7,2	CAP	1
C34	C5B3,5	C5B3,5	C5B3,5	CAP	1

C35	C5B7,2	C5B7,2	C5B7,2	CAP	1
C36	C5B7,2	C5B7,2	C5B7,2	CAP	1
C37	C5B7,2	C5B7,2	C5B7,2	CAP	1
C38	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C39	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C40	C5B3,5	C5B3,5	C5B3,5	CAP	1
C41	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C42	C5B3,5	C5B3,5	C5B3,5	CAP	1
C43	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C44	C5B3,5	C5B3,5	C5B3,5	CAP	1
C45	C5B2,5	C5B2,5	C5B2,5	CAP	1
C46	C5B2,5E	C5B2,5E	C5B2,5A	CAP	1
D1	BAV17	BAV17	D035-10	DIODE	1
D2	BAV17	BAV17	D035-10	DIODE	1
D3	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D4	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D5	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D6	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D7	BAV17	BAV17	D035-10	DIODE	1
D8	BAV17	BAV17	D035-10	DIODE	1
D9	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D10	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D11	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D12	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D13	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D14	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D15	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D16	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D17	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D18	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D19	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D20	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D21	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D22	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D23	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D24	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D25	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D26	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D27	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D28	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D29	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D30	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D31	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D32	1N4148	1N4148	D035-10	DIODE	1
D33	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D34	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
D35	POT800	POT800	POT800	TRIMPOT	1
IC1	LM317L	LM317L	317L	V-REG	1
IC2	LM337L	LM337L	337L	V-REG	1
IC3	LM317L	LM317L	317L	V-REG	1
IC4	LM337L	LM337L	337L	V-REG	1
IC5	LT1150 L	LT1150 L	DIL14	LINEAR	1
IC6	LT1021H	LT1021H	T099	LINEAR	1
IC7	LT1150	LT1150	DIL08	LINEAR	1
PAD1	1,6/0,8	1,6/0,8	1,6/0,8	WIREPAD	1
PAD2	1,6/0,8	1,6/0,8	1,6/0,8	WIREPAD	1
PAD3	1,6/0,8	1,6/0,8	1,6/0,8	WIREPAD	1
PAD4	1,6/0,8	1,6/0,8	1,6/0,8	WIREPAD	1
PAD5	1,6/0,8	1,6/0,8	1,6/0,8	WIREPAD	1
PAD6	1,6/0,8	1,6/0,8	1,6/0,8	WIREPAD	1
R1	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R2	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R3	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R4	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R5	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R6	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R7	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R8	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R9	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R10	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R11	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R12	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R13	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R14	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R15	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R16	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R17	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R18	0207/10	0207/10	0207/10	R	1

R19	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R20	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R21	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R22	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R23	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R24	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R25	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R26	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R27	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R28	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R29	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R30	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R31	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R32	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R33	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R34	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R35	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R36	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R38	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R39	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R40	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R41	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R42	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R43	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R44	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R45	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R46	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R47	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R48	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R49	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R50	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R51	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R52	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R53	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R54	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R55	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R56	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R57	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R58	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R59	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R60	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R61	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R62	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R63	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R64	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R65	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R66	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
R67	0207/10	0207/10	0207/10	R	1
S1	CK103X04	CK103X04	CK103X04	SWITCH	1
S2	9070-2W	9070-2W	9070-2W	SWITCH	1
U52	PTFE_LSD	PTFE_LSD	PTFE_LSD	WIREPAD	1
U53	PTFE_LSD	PTFE_LSD	PTFE_LSD	WIREPAD	1
U54	PTFE_LSD	PTFE_LSD	PTFE_LSD	WIREPAD	1
U55	PTFE_LSD	PTFE_LSD	PTFE_LSD	WIREPAD	1
U1	OPA111	OPA111	T099	LINEAR	1
U2	2AMP_P8+4	2AMP_P8+4	D1L08	LINEAR	1
U3	OPA111	OPA111	T099	LINEAR	1
U4	2AMP_P8+4	2AMP_P8+4	D1L08	LINEAR	1
U5	2AMP_P8+4	2AMP_P8+4	D1L08	LINEAR	1
U6	2AMP_P8+4	2AMP_P8+4	D1L08	LINEAR	1
U7	2AMP_P8+4	2AMP_P8+4	D1L08	LINEAR	1
U8	2AMP_P8+4	2AMP_P8+4	D1L08	LINEAR	1

6. Literatur

- ADAMS PR (1992): The platonic neuron gets the hots. *Curr. Biol.* **2**, S. 625 – 627.
- AKUTSU Y, OBARA S (1974): Calcium dependent receptor potential of the electroreceptor of marine catfish *Proc. Japan Acad.* **50**, S. 247 – 251.
- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD (¹1983): *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing Inc.
- ALDRICH RW, STEVENS CF (1987): Voltage dependent gating of single sodium channels from mammalian Neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Z.* S. 418 – 431.
- ALZHEIMER C, SCHWINDT PC, CRILL WE (1993): Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. *J. Neurosci.* **13**, S. 660 – 673.
- AMITAI Y, FRIEDMAN B, CONNORS BW, GUTNICK MJ (1993): Regenerative activity in apical dendrites of pyramidal cells in neocortex. *Cerebral Cortex* **3**, S. 26 – 38.
- ANDERSEN P, SILFVENIUS H. SUNDBERG SH, SVEEN OA (1980): A comparison of distal and proximal dendrite synapses on CA1 pyramids in guinea pig hippocampal slices in vitro *J. Physiol. Lond.* **307**, S. 273 – 299.

- ANDREASEN M, LAMBERT JD (1999): Somatic amplification of distally generated subthreshold EPSPs in rat hippocampal pyramidal neurones. *J. Physiol. (Lond)*. **15**, S. 85 – 100.
- ANDRIANOV GN, BRETSCHNEIDER F, PETERS RC (1996): Mode of operation of ampullary electroreceptor organs of freshwater catfish *Prim. Sens. Neron*. **1**, S. 231 – 242.
- ANDRIANOV GN, BRETSCHNEIDER F, PETERS RC, TEUNIS PFM (1992): In vitro electroreceptor organs for pharmacological studies *J. Neurosci. Meth.* **44**, S. 1 – 6.
- ANGELIDES KJ (1981a): Application of photoactivable fluorescent active-site directed probes to serine-containing enzymes *Biochim. Biophys. Acta*. **669**, S. 149 – 156.
- ANGELIDES KJ (1981b): Fluorescent and photoactivable fluorescent derivatives of tetrodotoxin to probe the sodium channel of excitable membranes. *Biochemistry*. **20**, S. 4107 – 4118.
- ANGELIDES KJ (1989): Fluorescent analogs of toxins. *Methods Cell Biol.* **29**, S. 29 – 58.
- ANTIC S, LOEW L, WUSKELL J, ZECEVIC D (1992): Voltage-sensitive dyes for intracellular application. *Biol. Bulletin*. **183**, S. 350 – 351.
- ANTIC S, ZECEVIC D (1995): Optical signals from neurons with internally applied voltage-sensitive dyes. *J. Neurosci.* **15**, S. 1392 – 1405.
- ATKINS PW (1998): Physical Chemistry. Oxford: Oxford University Press.
- BACCUS SA (1998): Synaptic facilitation by reflected action potentials: enhancement of transmission when nerve pulses reverse direction at axon branch points *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, S. 8345 – 8350.

- BALERNA M, COLBET A, CHICHEPORTICHE R, ROMÉY G, LAZDUNSKI M (1981): Synthesis and properties of new photoactivable derivatives of tetrodotoxin. *Biochim. Biophys. Acta.* **644**, S. 219 – 225.
- BARTSCH HJ (1984): Taschenbuch mathematischer Formeln. Leipzig: VEB Fachbuchverlag.
- BAUSWEIN E (1977): Effect of calcium on the differentiating operation of the ampullary electroreceptor in *Ictalurus nebulosus*. *J. Comp. Physiol.* **121**, S. 381 – 394.
- BEAN BP (1989): Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* **51**, S. 367 – 384.
- BENEKE TW, SCHWIPPERT WW (1997): Datenanalyse und Präsentation mit Origin. Addison-Wesley Longman Verlag: Bonn.
- BENNETT MVL (1967): Mechanisms of electroreception. In: *Lateral Line Detectors* (Ed. Cahn PH). S. 313 – 393.
- BENNETT MVL (1971a): Electrolocation in fish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **188**, S. 242 – 269.
- BENNETT MVL (1971b): Electroreception In: *Fish Physiology, Vol. V: Sensory systems and electric organs* (Eds. Hoar WS, Randall DJ). **V**, S. 493 – 574, New York, London: Academic Press.
- BENNETT MVL (1972): Mechanism of electroreception In: *Lateral Line Detectors* (Ed. Cahn P). S. 313 – 393 Bloomington Indiana: University Press.
- BENNETT MVL (1974): An Essay on the Discovery of Sensory Receptors and the Assignment of their Functions Together with an Introduction to Electroreceptors. In: *Handbook of Sensory Physiology.* **III/3**, S. 1 – 58, Heidelberg, New York, Berlin: Springer-Verlag.

- BENNETT MVL, CLUSIN WT (1979): Transduction at electroreceptors: origins of sensitivity *In: Membrane Transduction Mechanisms (Eds. Cone RA, Dowling JE)*. S. 91 – 116.
- BENNETT MVL, OBARA S (1986): Ionic mechanisms and pharmacology of electroreceptors *Electroreception (Eds. Bullock TH, Heiligenberg W)*. S. 157 – 181.
- BENNINGHOFF A, GOERTLER K (HRSG.) (¹⁴1985): Anatomie, Bd. 1-3. München, Wien, Baltimore Urban & Schwarzenberg.
- BERGMANN L, SCHÄFER C (⁶1974): Lehrbuch der Experimentalphysik. Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- BERNANDER O, DOUGLAS RJ, MARTIN KA, KOCH C (1991): Synaptic background activity influences spatiotemporal integration in single pyramidal cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, S. 11569 – 11573.
- BERNANDER O, KOCH C, DOUGLAS RJ (1994): Amplification and linearization of distal synaptic input to cortical pyramidal cells *J. Neurophysiol.* **72**, S. 2743 – 2753.
- BORST A, HECK D, THOMANN M (1997): Voltage signals of individual Purkinje cell dendrites in rat cerebellar slices. *Neurosci. Lett.* **238**, S. 29 – 32.
- BRAUN HA, SCHÄFER K, VOIGT K, PETERS R, BRETSCHEIDER F, PEI X, WILKENS L, MOSS F (1997): Low-dimensional dynamics in sensory Biology 1: Thermally Sensitive Electroreceptors of the catfish *J. Comput. Neurosci.* **4**, S. 335 – 347.
- BRDICKA R (¹⁵1985): Grundlagen der physikalischen Chemie. Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften.
- BRETSCHEIDER F, KROESBERGEN G, BEIJNINK FB (1979): Functioning of catfish electroreceptors: Relation between skin potential and receptor activity *J. Physiol. Paris*. **75**, S. 343 – 347.

- BRETSCHNEIDER F, PETERS RC, PEELE PH, DORRESTEIJN AWC (1980):
Functioning of catfish electroreceptors: statistical distribution of sensitivity and fluctuations of spontaneous activity *J. Comp. Physiol.* **137**, S. 273 – 279.
- BRETSCHNEIDER F, WEILLE DE JR, KLIS JFL (1985): Functioning of catfish electroreceptors: fractional-order filtering and non-linearity. *Comp. Biochem. Physiol.* **80A**, S. 191 – 198.
- BRETSCHNEIDER F, VERWEY J, HEUTS P (1991): Functioning of catfish electroreceptors: Input impedance and stimulus efficiency *Comp. Biochem. Physiol.* **99A**, S. 295 – 299.
- BRETSCHNEIDER F, PETERS RC (1992): Transduction and transmission in ampullary electroreceptors of catfish *Comp. Biochem. Physiol.* **103A**, S. 245 – 252.
- BRONSTEIN IN, SEMEDJAJEW KA (²¹1982): Taschenbuch mathematischer Formeln. Leipzig: Teubner.
- BROWN AM, SCHWINDT PC, CRILL WE (1994): Different voltage dependence of transient and persistent Na⁺ currents is compatible with modal gating hypothesis for sodium channels *J. Neurophysiol.* **71**, S. 2562 – 2565.
- BÜNING H, TRECKLER G (³1994): Nichtparametrische statistische Verfahren. Berlin: Walther de Gruyter Verlag.
- BULLEN A, PATEL SS, SAGGAU P (1997): High-speed, random-access fluorescence microscopy. 1. high-resolution optical-recording with voltage-sensitive dyes and ion indicators. *Biophys. J.* **73**, S. 477 – 491.
- BULLOCK TH, FESSARD A (1974): Electroreceptors and other specialized receptors in lower vertebrates (Handbook of sensory physiology: 3,3). Berlin, New York Springer Verlag.

- CAHALAN M (1978): Voltage clamp studies on the first node of ranvier. (Ed. Waxman SG). New York: Raven Press.
- CANTOR CR, SCHIMMEL PR (¹1980): Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function. New York, Oxford: W.H. Freeman and Company.
- CASH S, YUSTE R (1998): Input summation by cultured pyramidal neurons is linear and position-independent *J. Neurosci.* **18**, S. 10 – 15.
- CHANCE B, PYE EK, GHOSH A, HESS B (EDS.) (1973): Biological and biochemical oscillators. New York, London: Academic Press.
- CHANDLER WK, MEVES H (1970): Evidence for two types of sodium conductance in axons perfused with sodium fluoride solution *J. Physiol.* **211**, S. 653 – 678.
- CHAO TI, ALZHEIMER C (1995): Do neurons from rat neostiatum express both a TTX-sensitive and a TTX-insensitive slow Na⁺-current *J. Neurophysiol.* **74**, S. 934 – 941.
- CHICHEPORTICHE R, BALERNA M, LOMBERT A, ROMÉY G, LAZDUNSKI M (1979): Synthesis and mode of action an axonal membranes of photoactivable derivates of tetrodotoxin. *J. Biol. Chem.* **254**, S. 1552 – 1557.
- CINELLI AR, NEFF SR, KAUER JS (1995a): Salamander olfactory-bulb neuronal-activity observed by video-rate, voltage-sensitive dye imaging I. Characterization of the recording system *J. Neurophysiol.* **73**, S. 2017 – 2032.
- CINELLI AR, KAUER JS (1995b): Salamander olfactory-bulb neuronal-activity observed by video-rate, voltage-sensitive dye imaging II. Spatial and temporal properties of responses evoked by electric stimulation. *J. Neurophysiol.* **73**, S. 2033 – 2052.

- CINELLI AR, HAMILTON KA, KAUER JS (1995c): Salamander olfactory-bulb neuronal-activity observed by video-rate, voltage-sensitive dye imaging III. Spatial and temporal properties of responses evoked by odorant stimulation. *J. Neurophysiol.* **73**, S. 2053 – 2071.
- CLUSIN WT, BENNETT MV (1977a): Calcium activated conductance in skate electroreceptors: current clamp experiments *J. Gen. Physiol.* **69**, S. 121 – 143.
- CLUSIN WT, BENNETT MV (1977b): Calcium activated conductance in skate electroreceptors: voltage clamp experiments *J. Gen. Physiol.* **69**, S. 145 – 172.
- CLUSIN WT, BENNETT MV (1978): The multiple roles of calcium in a sensory receptor *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **307**, S. 436 – 439.
- CLUSIN WT, BENNETT MV (1979): The ionic basis of oscillatory responses of skate electroreceptors *J. Gen. Physiol.* **73**, S. 703 – 723.
- COLBERT CM, JOHNSTON D (1996): Axonal action-potential initiation and Na-channel densities in the soma and axonal initial segment of subicular pyramidal neurons *J. Neurosci.* **16**, S. 6676 – 6686.
- COLBERT CM, MAGEE JC, HOFFMAN DA, JOHNSTON D (1997): Slow recovery from Inactivation of Na-channels underlied the activity-dependent attenuation of dendritic action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **17**, S. 6512 – 6521.
- COLES JA, SCHNEIDER-PICARD G (1989): Amplification of small signals by voltage-gated sodium channels in drone photoreceptors. *J. Comp. Physiol. [A]*. **165**, S. 109 – 118.
- COOK EP, JOHNSTON D (1997): Active dendrites reduce location-dependent variability of synaptic input trains *J. Neurophysiol.* **78**, S. 2116 – 2128.

- COOK EP, JOHNSTON D (1999): Voltage-dependent properties of dendrites that eliminate location dependent variability of synaptic input. *J. Neurophysiol.* **81**, S. 535 – 543.
- CRILL WE (1999): Functional implications of dendritic voltage-dependent conductances. *J. Physiol. Paris.* **93**, S. 17 – 21.
- CRILL WE (2000): Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Ann. Rev. Physiol.* **58**, S. 349 – 362.
- DEISZ RA, FORTIN G, ZIEGLGÄNSBERGER W (1991): Voltage dependence of excitatory postsynaptic potentials of rat neocortical neurons *J. Neurophysiol.* **65**, S. 371 – 382.
- DONGEN AMJ VAN, BRETSCHNEIDER F (1984): Functioning of catfish electroreceptors: bursting discharge pattern of Kryptopterus electroreceptors elicited by microelectrode impalement *Comp. Biochem. Physiol.* **77A**, S. 647 – 650.
- DUBOIS JM, BERGMAN C (1975): Late sodium current in the node of Ranvier *Pflüger Arch.* **357**, S. 145 – 148.
- ECKERT R (1986): Tierphysiologie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- EILERS J, AUGUSTINE GJ, KONNERTH A (1995): Subthreshold synaptic Ca²⁺ signalling in fine dendrites and spines of cerebellar Purkinje neurons *Nature.* **373**, S. 115 – 158.
- FEELY S, POULARIKAS AD (1979): Electrical Engineering and Electronics, Electromagnetics (Vol. 8), Classical and Modern Theory and Applications. New York, Basel: M. Dekker. Inc.
- FINGER TE (1986): Electroreception in catfish (behaviour, anatomy and electrophysiology) *In: Electroreception (Eds. Bullock TH, Heiligenberg W).* New York Wiley Interscience.
- FLOREY E (1975): Lehrbuch der Tierphysiologie. Stuttgart: G. Thieme.

- FORTH W, HENSCHLER D, RUMMEL W ⁴ (1983): Pharmakologie und Toxikologie. Mannheim, Wien, Zürich: Bibliographisches Institut.
- FRELIN C, BARBRY P, VIGNE P, CHASSANDE O, CRAGOE EJ JR, LAZDUNSKI M (1988): Amiloride and its analogs as tools to inhibit Na⁺ transport via the Na⁺ channel, the Na/H⁺ antiport and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochimie*. **70**, S. 1285 – 1290.
- FRENCH CR, SAH P, BUCKETT KJ, GAGE PW (1990): A voltage-dependent persistent sodium current in mammalia hippocampal neurons *J. Gen. Physiol.* **95**, S. 1139 – 1157.
- FRIESER H, HAASE G, KLEIN E (¹1968): Dei Grundlagen der photographischen Prozesse mit Silberhalogeniden. Frankfurt/Main: Akademische Verlagsgesellschaft.
- FROMHERZ P, VETTER T (1991a): Propagation of voltage transients in arborized neurites of Retzius cells of the leech in culture *Z. Naturforsch. [C]*. **46**, S. 687 – 696.
- FROMHERZ P, LAMBACHER A (1991b): Spectra of voltage-sensitive fluorescence of styryl-dye in neuron membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. **1068**, S. 149 – 156.
- FROMHERZ P, VETTER T (1991c): Propagation of voltage transients in arborized neurites of Retzius cells of the leech in culture. *Z. Naturforsch. [c]*. **46**, S. 687 – 696.
- FROMHERZ P, VETTER T (1992): Cable properties of arborized Retzius cells of the leech in culture as probed by a voltage-sensitive dye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, S. 2041 – 2045.
- FROMHERZ P, GAEDE V (1993a): Exclusive-OR function of single arborized neurons *Biol. Cybern.* **69**, S. 337 – 344.
- FROMHERZ P, MULLER CO (1993b): Voltage-sensitive fluorescence of amphiphilic hemicyanine dyes in neuron membranes. *Biochim.*

- Biophys. Acta.* **1150**, S. 111 – 122.
- FROMHERZ P, MULLER CO (1994): Cable properties of a straight neurite of a leech neuron probed by a voltage-sensitive dye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, S. 4604 – 4608.
- GALSTER H (¹1991): pH Measurement. Weilheim, New York, Basel, Cambridge: VCh Verlag.
- GEDDES LA (¹1972): Electrodes and measurement of bioelectric events. New York: Wiley-Interscience.
- GERTHSEN C, KNESER HO, VOGEL H (¹³1977): Physik. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag.
- GILLESSEN T, ALZHEIMER C (1997): Amplification of EPSPs by low Ni(2+)- and amiloride-sensitive Ca²⁺ channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons *J. Neurophysiol.* **77**, S. 1639 – 1643.
- GILLY WF, ARMSTRONG CM (1984): Threshold channels - a novel type of sodium channel in squid giant axon *Nature.* **309**, S. 448 – 450.
- GOLDFINGER MD (2000): Computation of high safety factor impulse propagation at axonal branch points *Neuroreport.* **11**, S. 449 – 456.
- GOLDING NL, SPRUSTON N (1998): Dendritic sodium spikes are variable triggers of axonal action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons *Neuron.* **21**, S. 1189 – 1200.
- GOLDMANN S (1953): Information theory. New York: Prentice Hall Inc.
- GROSSMAN Y, PARNAS I, SPIRA ME (1979): Differential conduction block in branches of a bifurcating axon *J. Physiol.* **295**, S. 283 – 305.
- HAAG J, BORST A (1996): Amplification of high-frequency synaptic inputs by active dendritic membrane processes *Nature.* **379**, S. 639 – 641.

- HAAG J, BORST A (1998): Active membrane properties and signal encoding in graded potential neurons. *J. Neurosci.* **18**, S. 7972 – 7986.
- HARRIS GG, FRISHKOPF LS, FLOCK A (1970): Receptor potentials from hair cells of the lateral line *Science.* **167**, S. 76 – 79.
- HARVEY JR, BRUNER LJ (1995a): The spike generation zone of the ampullary electroreceptor: I. Stimulus-response characteristics of a relaxation oscillator circuit model *Biol. Cybernetics.* **72**, S. 371 – 378.
- HARVEY JR, BRUNER LJ (1995b): The spike generation zone of the ampullary electroreceptor: II. Oscillator period noise and its limits of sensitivity *Biol. Cybernetics.* **72**, S. 379 – 387.
- HAUSSER M, STUART G, RACCA C, SAKMANN B (1995): Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons *Neuron.* **15**, S. 637 – 647.
- HEIJMEN PS, PETERS RC (1994): Apically administered cytochalasin B and D decreases sensitivity in electroreceptor organs in the North-American catfish, *Ictalurus nebulosus* *J. Comp. Physiol.* **175A**, S. 279 – 287.
- HEIJMEN PS, BRAKS AH, BRETSCHEIDER F, PETERS RC (1995a): Microvilli in electroreceptor organs in *Ictalurus nebulosus* play a part in signal filtering *J. Comp. Physiol. A.* **176**, S. 103 – 109.
- HEIJMEN PS, PETERS RC (1995b): Sensory variability of ampullary electroreceptor organs in part explained by apical membrane properties *Prim. Sens. Neuron.* **1**, S. 81 – 93.
- HEIJMEN PS, KALMEIJER D, PETERS RC (1996a): Vincristine disturbs spontaneous firing of the afferent nerve fibre in ampullary electroreceptor organs *Neurosci.* **72**, S. 585 – 591.

- HEIJMEN PS, BOELE A, PETERS RC (1996b): The effect of hyperosmotic treatment on the functioning of ampullary electroreceptor organs *Neurosci.* 72, S. 1107 – 1115.
- HERRERA AA BANNER LR (1990): The use and effects of vital fluorescent dyes: observation of motor nerve terminals and satellite cells in living frog muscles. *J. Neurocytol.* 19, S. 67 – 83.
- HESS ST, WEBB WW (1998): Measurement of fluorescence signal of a voltage sensitive dye using two-photon excitation. *Biophys.* 74A, S. 201 – 212.
- HILLE B (1975): Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model. *J. Gen. Physiol.* 66, S. 535 – 560.
- HILLE B (1992): Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland, Mass. USA: Sinauer Assoc. Inc.
- HIROTA A, SATO K, MOMOSE SATO Y, SAKAI T, KAMINO K (1995): A new simultaneous 1020-site optical-recording system for monitoring neural activity using voltage-sensitive dyes. *J. Neurosci. Meth.* 56, S. 187 – 194.
- HIRSCH J, GILBERT CD (1991): Synaptic physiology of horizontal connections in the cat visual cortex *J. Neurophysiol.* 11, S. 1800 – 1809.
- HODGKIN AL, HUXLEY AF (1952a): The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo J. Physiol. Lond.* 116, S. 497 – 506.
- HODGKIN AL, HUXLEY AF (1952b): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve *J. Physiol. Lond.* 270, S. 500 – 544.
- HODGKIN AL, HUXLEY AF (1952c): Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of

- Loligo. *J. Physiol. Lond.* **166**, S. 449 – 472.
- HODGKIN AL, HUXLEY AF (1952d): Properties of the nerve axons: (I) Movement of sodium and potassium ions during nervous activity. *Cold Harbour Spring Symp. Quant. Biol.* **17**, S. 43 – 52.
- HODGEMAN CD, WEAST RC, WALLACE CW (³⁵1953): Handbook of Chemistry and Physics. Cleveland Chemical Rubber Publishing Co.
- HODGIN AL, RUSHTON WAH (2046): The electrical constants of a crustacean nerve fiber *Proc. Roy. Soc. B.* **133**, S. 444 – 479.
- HOLDE VAN KE (¹1971): Physical Biochemistry. Eaglewood Cliffs: Prentice-Hall.
- HOLDEN AV (1976): Models of stochastic activity of neurons. *In: Lecture Notes in Biomathematics, Vol. 12.* Berlin Springer-Verlag.
- HOLMES WR (1989): The role of dendritic diameters in maximizing the effectiveness of synaptic inputs. *Brain Res.* **478**, S. 127 – 137.
- HOLMES WR, RALL W (1992): Estimating the electrotonic structure of neurons with compartmental models. *J. Neurophysiol.* **68**, S. 1438 – 1452.
- HONOLD F, HONOLD B (¹1991): Ionenselektive Elektroden. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser.
- HOPPE W, LOHMANN W, MARKL H, ZIEGLER H (HRSG.) (²1982): Biophysik. New York, Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag.
- HOUNSGAARD J, MIDTGAARD J (1989): Dendrites processing in more ways than one *Trends Neurosci.* **12**, S. 313 – 315.
- HUGUENARD JR, HAMILL OP, PRINCE DA (1989): Sodium channels in dendrites of rat cortical pyramidal neurons *Proc. Acad. Natl. Sci. USA.* **86**, S. 2473 – 2477.
- INOUE S (³1987): Video Microscopy. New York, London: Plenum Press.

- IRLBAUER G (1987): Induktion ampullärer Elektrozeporen durch Verlegung der afferenten Nervenfasern beim Glaswels *Kryptopterus bicirrhus*. München Diplomarbeit, Zoologisches Institut der LMU.
- IVES DJG (1969): Reference Electrodes. New York Academic Press.
- JACK JJB, NOBLE D, TSJEN RW (¹1983): Electrical current flow in excitable cells. Oxford: Oxford University Press.
- JAEGER D, DE SCHUTTER E, BOWER JM (1997): The role of synaptic voltage-gated currents in the control of Purkinje cell spiking: a modelling study *J. Neurosci.* **17**, S. 91 – 106.
- JOHNSTON D, MAGEE JC, COLBERT CM, CRISTIE BR (1996): Active properties of neuronal dendrites *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, S. 165 – 186.
- JØRGENSEN JM (1992): The electrosensory cells of the ampullary organ of the transparent catfish (*Kryptopterus bicirrhus*) *Acta Zoologica (Stockholm)*. **73**, S. 79 – 83.
- JUNG H-Y, MICKUS T, SPRUSTON N (1997): Prolonged sodium channel inactivation contributes to dendritic action potential attenuation in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **17**, S. 6639 – 6646.
- KÄSTNER A (1991): Lehrbuch der speziellen Zoologie: Bd. 2/2 Fische. Stuttgart Gustav Fischer Verlag.
- KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM (²1985): Principles of Neural Science. New York: Elsevier.
- KARLSON P (¹²1984): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart: Thieme Verlag.
- KAWATO M (1984): Cable properties of a neuron model with non-uniform membrane resistivity. *J. Theoret. Biol.* **111**, S. 149 – 169.

- KAY AR, SUGIMORI M, LLINAS R (1998): Kinetic and stochastic properties of a persistent sodium current in mature guinea pig cerebellar purkinje cells *J. Neurophysiol.* **80**, S. 1167 – 1179.
- KIM HG, CONNORS BW (1993): Apical dendrites of the neocortex: correlation between sodium- and calcium-dependent spiking *J. Neurosci.* **13**, S. 5301 – 5311.
- KLEYMAN TR, CRAGOE EJ JR (1988): Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membr. Biol.* **105**, S. 1 – 21.
- KOCH C, POGGIO T, TORRE V (1983): Nonlinear interactions in a dendritic tree: localization, timing, and role in information processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, S. 2799 – 2802.
- KOCH C (1984): Cable theory in neurons with active, linearized membranes. *Biol. Cybern.* **50**, S. 15 – 33.
- KOCH C, BERNANDER O, DOUGLAS RJ (1995): Do neurons have a voltage or a current threshold for action potential initiation? *J. comput. Neurosci.* **2**, S. 63 – 82.
- KOGAN A, ROSS WN, ZECEVIC D, LASSER-ROSS N (1995): Optical recording from cerebellar Purkinje cells using intracellularly injected voltage sensitive dyes. *Brain Res.* **700**, S. 235 – 239.
- KONNERTH A, ORKAND PM, ORKAND RK (1988): Optical recording of electrical activity from axons and glia of frog optical nerve: potentiometric dye responses and morphometrics. *Glia.* **1**, S. 225 – 232.
- KOROGOD SM (1996): Electro-geometrical coupling in non-uniform branching dendrites. Consequences for relative synaptic reflectiveness. *Biol Cybern.* **74**, S. 85 – 93.
- KRAAIJ DA, BRETSCHNEIDER F, PETERS RC (1997): Comparison of electroreceptor organ functioning in vivo and in vitro *Prim. Sensory Neuron.* **2**, S. 1 – 8.

- KRAMER B (³1996): Electroreception and communication in fishes.
Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- KRAUTHAMER V (1990): Modulation of conduction at points of axonal bifurcation by applied electric fields *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **37**, S. 515 – 519.
- KUCHLING H (⁵1987): Taschenbuch der Physik. Thun, Frankfurt/Main: Verlag Harri Deutsch.
- LAMPL I, SCHWINDT P, CRILL W (1998): Reduction of cortical pyramidal neuron excitability by action of Phenytoin on persistent Na current *J. Pharm. Exp. Therapeut.* **284**, S. 228 – 237.
- LARKUM ME, RIOULT MG, LUSCHER HR (1996): Propagation of action-potentials in the dendrites of neurons from rat spinal-cord slice cultures. *J. Neurophysiol.* **75**, S. 154 – 170.
- LAVALLEE M (1969): Glass Microelectrodes. New York Wiley.
- LEONHARDT H (⁵1977): Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- LIPOWSKY R, ALZHEIMER C (1995): Role of dendritic sodium channels on synaptic integration of CA1 pyramidal cells *Soc. Neurosci. Abstr.* **21**, S. 3219 – 3232.
- LIPOWSKY R, GILLESSEN T, ALZHEIMER C (1996): Dendritic Na⁺ channels amplify EPSPs in hippocampal CA1 pyramidal cells *J. Neurophysiol.* **76**, S. 2181 – 2191.
- LISSMANN HW (1958a): On the function and evolution of electric organs in fish *J. Exptl. Biol.* **35**, S. 156 – 191.
- LISSMANN HW, MACHIN KE (1958b): The mechanism of object location in *Gymnarchus niloticus* and similar fish. *J. Exptl. Biol.* **35**, S. 451 – 486.
- LINAS R, SUGIMORI M (1980): Electrophysiological properties of in

- in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices *J. Physiol.* **305**, S. 171 – 195.
- LLINAS R, YAROM Y (1981): Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurons in vitro. Different types of voltage dependent ionic conductances *J. Physiol.* **315**, S. 549 – 567.
- LLINAS RR (1988): The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system functions *Science*. **242**, S. 1654 – 1664.
- LONGTIN A, RACICOT DM (1996): Spike train patterning and forecastability *BioSystems*. **40**, S. 111 – 118.
- LU L, FISHMAN HM (1995): Ion channels and transporters in the electroreceptive ampullary epithelium from skates *Biophys. J.* **69**, S. 2467 – 2475.
- LÜSCHER HR, SHINER JS (1990a): Simulation of action potential propagation in complex terminal arborizations *Biophys. J.* **58**, S. 1389 – 1399.
- LÜSCHER HR, SHINER JS (1990b): Computation of action potential propagation and presynaptic bouton activation in terminal arborizations of different geometries *Biophys. J.* **58**, S. 1377 – 1388.
- LÜSCHER HR, LARKUM ME (1998): Modelling action potential initiation and back-propagation in dendrites of cultured rat motoneurons *J. Neurophysiol.* **80**, S. 715 – 729.
- MAGGE JC, JOHNSTON D (1995a): Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons *Science*. **268**, S. 301 – 304.
- MAGEE JC, CHRISTOFI G, MIYAKAWA H, CHRISTIE B, LASSER-ROSS N, JOHNSTON D (1995b): Subthreshold synaptic activation of

- voltage-gated Ca²⁺ channels mediates a localized Ca²⁺ influx into the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **74**, S. 1335 – 1342.
- MAGEE JC, JOHNSTON D (1995c): Charakterization of single voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels *J. Physiol.* **487**, S. 67 – 90.
- MAGEE JC, CARRUTH M (1999): Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **82**, S. 1895 – 1901.
- MAGEE JC, COOK EP (2000): Somatic EPSP amplitude is independent of synaps location in hippocampal pyramidal neurons *Net. Neurosci.* **3**, S. 895 – 903.
- MAGRASSI L, PURVES D, LICHMAN JW (1987): Flourescent probes that stain living nerve terminals. *J. Neurosci.* **7**, S. 1207 – 1214.
- MAINEN ZF, JOERGES J, HUGUENARD JR, SEJNOWSKI TJ (1995): A model of spike initiation in neocortical pyramidal neurons *Neuron.* **15**, S. 1427 – 1439.
- MAJOR G, LARKMAN AU, JONAS P, SAKMANN B (1994): Detailed passive cable models of whole-cell recorded CA3 pyramidal neurons in rat hippocampal slices *J. Neurosci.* **14**, S. 4613 – 4638.
- MARKRAM H, SAKMANN B (1994): Calcium transients in dendrites of neocortical neurons evoked by single subthreshold excitatory postsynaptic potentials via low-voltage-activated calcium channels *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, S. 5207 – 5211.
- MARKRAM H, LÜBKE J, FROTSCHER M, SAKMANN B (1997): Regulation of synaptic efficassy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs *Science.* **275**, S. 213 – 215.
- MARTINA M, VIDA I, JONAS P (2000): Distal initiation and active propagation of action potential in interneuron dendrites

- Science*. **287**, S. 295 – 300.
- MEL BW (1993): Synaptic integration in an excitable dendritic tree *J. Neurophysiol.* **70**, S. 1086 – 1101.
- MEYER E, MULLER CO, FROMHERZ P (1997): Cable properties of dendrites in hippocampal neurons of the rat mapped by a voltage-sensitive dye. *Eur. J. Neurosci.* **9**, S. 778 – 785.
- MICKUS T, JUNG HY, SPRUSTON N (1999a): Slow sodium channel inactivation in CA1 pyramidal cells *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **868**, S. 91 – 101.
- MICKUS T, JUNG HY, SPRUSTON N (1999b): Properties of slow, cumulative sodium channel inactivation in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons *Biophys. J.* **76**, S. 846 – 860.
- MICROCAL INC. (1995a): Origin Program User's Manual. Northampton: Microcal Inc.
- MICROCAL INC. (1995b): LabTalk Programming Language Manual. Northampton: Microcal Inc.
- MIGLIORE M (1996): Modelling the attenuation and failure of action potentials in the dendrites of hippocampal neurons *Biophys. J.* **71**, S. 2394 – 2403.
- MILLER JP, RALL W, RINZEL J (1985): Synaptic amplification by active membrane in dendritic spines *Brain Res.* **325**, S. 325 – 330.
- MITTMANN T, LINTON SM, SCHWINDT P, CRILL W (1997): Evidence for persistent Na⁺ current in apical dendrites of rat neocortical neurons from imaging of Na⁺-sensitive dye *J. Neurophysiol.* **78**, S. 1188 – 1192.
- MOLECULAR PROBES (1999): Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. o.O. Molecular Probes Inc. Eigenverlag.
- MOMOSE-SATO Y, SATO K, SAKAI T, HIROTA A, MATSUTANI K, KAMINO K (1995): Evaluation of optimal voltage-sensitive dyes for optical

- monitoring of embryonic neural activity. *J. Membrane Biol.* **144**, S. 167 – 176.
- MOORE JW, NARAHASHI T (1967): Tetrodotoxin's highly selective blockage of an ionic channel *Fed. Proc.* **26**, S. 1655 – 1663.
- MURRAY MJ, CAPRANICA RR (1973): Spike generation in lateral-line afferents of *Xenopus laevis*: evidence favoring multiple sites of initiation. *J. Comp. Physiol.* **87**, S. 1 – 20.
- NARAHASHI T, ANDERSON NC, MOORE JW (1966a): Specific Action of Tetrodotoxin *Science.* **154**, S. 425 – 437.
- NARAHASHI T, ANDERSON NC, MOORE JW (1966b): Tetrodotoxin does not block excitation from inside the nerve membrane *Science.* **153**, S. 765 – 767.
- NARAHASHI T, MOORE JW (1968): Neuroactive agents and nerve membrane conductances *J. gen. Physiol.* **51**, S. 93 –.
- NARAHASHI T (1972): Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes. *Fed. Proc.* **31**, S. 1124 – 1132.
- NARAHASHI T (1977): Toxic chemicals as probes of nerve membrane function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **84**, S. 407 – 445.
- OBARA S, BENNETT MVL (1972): Mode of operation of ampullae of Lorenzini of the skate, Raja *J. Gen. Physiol.* **60**, S. 534 – 557.
- OBARA S (1974): Receptor cell activity at 'rest' with respect to the tonic operation of a specialized lateralis receptor *Proc. Japan Acad.* **50**, S. 386 – 391.
- OBARA S (1976): Mechanism of electroreception in ampullae of Lorenzini of the marine Catfish *Plotosus* In: *Electrophysiology of Nerve, Synapse and Muscle* (Eds. Reuben JP, Purpura DP, Bennett MVL, Kandel ER). S. 129 – 147.

- OBARA S, SUGAWARA Y (1979): Contribution of Ca to the electroreceptor mechanism in *Plotosus Ampullae* *J. Physiol. Paris.* 75, S. 335 – 340.
- OBARA S, HIGACHI T (1980): High-gain synapse in the sensory transduction of the ampullary electroreceptors *J. Physiol. Soc. Japan.* 42, S. 250 –.
- OBARA S, HIGACHI T, NAGAI T (1981): High-sensitivity processes in the sensory transduction of the *Plotosus* electroreceptors. *In: Sensory Physiology of Aquatic Lower Vertebrates (Eds. Szabo T, Czeh G)*. Budapest Pergamon Press / Akademiai Kiado.
- OBARA S, SUGAWARA Y (¹1984): Electroreceptor Mechanisms in Teleosts and Non-teleost Fishes. *In: Comparative physiology of sensory system*. Cambridge: Cambridge University Press.
- OBARA S, SUGAWARA Y, OGURA T (1993): The ampullary electroreceptor as a pH sensor? *Japan. J. Physiol.* 43Sp, S. 311 –.
- OGDEN D (1994): Microelectrode techniques. Cambridge Co. of Biologists.
- PABST A (1977): Number and location of the sites of impulse generation in the lateral-line afferents of *Xenopus laevis* *J. Comp. Physiol.* 114, S. 51 – 67.
- PARNAS I, SEGEV I (1979): A mathematical model for conduction of action potentials along bifurcating axons *J. Physiol.* 295, S. 323 – 343.
- PENZLIN H (³1980): *Lehrbuch der Tierphysiologie*. Jena Fischer Verlag.
- PERKEL DH, PERKEL DJ (1985): Dendritic spines: the role of active membrane in modulating synaptic efficacy *Brain Res.* 325, S. 331 – 335.

- PETERS RC; BUVALDA RJA (1972): Frequency Response of the electroreceptors („small pit organs“) of the catfish, *Ictalurus nebulosus* LeS *J. Comp. Physiol.* 79, S. 29 – 38.
- PETERS RC, WIJLAND F VAN (1974): Electro-orientation in the passive electric catfish, *Ictalurus nebulosus* Les *J. Comp. Physiol.* 92, S. 273 – 281.
- PETERS RC, BRETSCHNEIDER F, SCHREUDER J-JA (1975): Influence of direct current on the ion-induced sensitivity changes of the electroreceptors (small pit organs) of the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* LeS *Neth. J. Zool.* 25, S. 389 – 397.
- PETERS RC, MAST F (1983): Information transmission by ampullary receptors: parallel convergent inputs *Comp. Biochem. Physiol.* 76A, S. 143 – 151.
- PETERS RC, TEUNIS FM, BRETSCHNEIDET F. WEERDEN R VAN (1988a): Ampullary electroreceptors in neurophysiological instruction *J. Biol. Edu.* 22, S. 61 – 66.
- PETERS RC, GROEN EL, SLUIS M VAN DER, TEUNIS FM, WILHELM KA (1988b): Denervation reveals two components of neurotransmission in electroreceptor synapses *Neurosci.* 27, S. 1049 – 1053.
- PETERS RC, IEPEREN S VAN (1989a): Resting discharge and sensitivity of ampullary electroreceptors in *Clarias gariepinus* related to convergence during ontogeny *Brain Behav. Evol.* 34, S. 43 – 47.
- PETERS RC, ZWART E, LOOS WJG, BRETSCHNEIDER (1989b): Transduction at electroreceptor cells manipulated by exposure of apical membranes to ionic channel blockers *Comp. Biochem. Physiol.* 94C, S. 663 – 669.
- PETERS RC, BRANS RJ, BRETSCHNEIDER F, VERSTEEG E, WENT A (1997a):

- Converging electroreceptor cells improve sensitivity and tuning
Neurosci. **81**, S. 297 – 301.
- PETERS RC, VERSTEEG E, BRETSCHNEIDER F, BRANS RJ, WENT A (1997b):
Caffeine reduces the efficacy of electroreceptor cell synapses: an
electrophysiological single-unit in vivo study *Neurosci.* **78**, S.
1229 – 1238.
- PETERS RC, WESTERINK RHS (1999): Catfish electroreceptor organ
functioning during five days exposure to different calcium
environments. *Physiol. Biochem.* **21**, S. 81 – 88.
- POHL RW (¹⁰1958): Optik und Atomphysik. Berlin, Göttingen, Hei-
delberg: Springer.
- POZNANSKI RR (1988): Membrane voltage changes in passive
dendritic trees: a tapering equivalent cylinder model. *IMA J.*
Math. Appl. Med. Biol. **5**, S. 113 – 145.
- POZNANSKI RR, BELL J (2000a): A dendritic cable model for the
amplification of synaptic potentials by an ensemble average of
persistent sodium channels *Math. Biosci.* **166**, S. 101 – 121.
- POZNANSKI RR, BELL J (2000b): Theoretical analysis of the ampli-
fication of synaptic potentials by small clusters of persistent
sodium channels in dendrites *Math. Biosci.* **166**, S. 123 – 147.
- PROSSER ET AL (1991): Natural and Integrative Animal Pysiology..
- PURVES RD (¹1981): Microelectrode Methods for Intracellular
Recording and Iontophoresis. London: Academic Press Inc. Ltd.
- RALL W (1959): Branching dendritic trees and motoneuron
membran resistivity *Exp. Neurol.* **1**, S. 491 – 527.
- RALL W (¹1970): Cable properties of dendrites and effects of synaptic
location *Excitatory Synaptic Mechanisms*, ed. Andersen P &
Jansen JKS. S. 175 – 187 Oslo: Oslo Universitetsforlaget.

- RALL W (¹1977): Core conductor theory and cable properties of neurons *Handbook of Physiology*, ed. Kandel ER. **1**, S. 39 – 97
Bethesda, Maryland: American Physiological Society.
- RALL W, BURKE RE, HOLMES WR, JACK JJB, REDMAN SJ, SEGEV I (1992): Matching dendritic neuron models to experimental data
Physiol. Rev. **72 S**, S. 159 – 186.
- RAPP M, SEGEV I, YAROM Y (1994): Physiology, morphology and detailed passive models of guinea-pig cerebellar Purkinje cells
J. Physiol. **474**, S. 101 – 118.
- RAPP M, YAROM Y, SEGEV I (1996): Modelling back propagating action potential in weakly excitable dendrites of neocortical pyramidal cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**, S. 11985 – 11990.
- REGHEER WG, KONNERTH A, ARMSTRONG CM (1992): Sodium action potentials in the dendrites of cerebellar Purkinje cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**, S. 5492 – 5496.
- REGHEER W, KEHOE JS, ASCHER P, ARMSTRONG C (1993): Synaptically triggered action potentials in dendrites.
Neuron. **11**, S. 145 – 151.
- RENNER M (¹⁷1978): Leitfaden Zoolog. Praktikum. Stuttgart: Fischer Verlag.
- ROBERTS A, BUSH BMH (¹1981): Neurons without impulses. Cambridge Cambridge University Press.
- ROHR S, SALZBERG BM (1994): Characterization of impulse propagation at the microscopic level across geometrically defined expansions of excitable tissue - multiple-site optical-recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell-cultures.
J. Gen. Physiol. **104**, S. 387 – 309.
- ROMEIS B (¹⁶1968): Mikroskopische Technik. München, Wien: Oldenbourg Verlag.

- ROMER AS, PARSONS TS (⁵1983): Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere. Hamburg, Berlin: Paul Parey.
- ROTH A (1968): Electroreception in the catfish, *Amiurus nebulosus* *Z. Vergleich. Physiol.* **61**, S. 196 – 202.
- ROTH A (1969): Elektrische Sinnesorgane beim Zwergwels *Ictalurus nebulosus* (*Amiurus nebulosus*) *Z. vergl. Physiol.* **65**, S. 368 – 388.
- ROTH A (1971): Zur Funktionsweise der Elektrorezeptoren in der Haut von Welsen (*Ictalurus*): der Einfluß von Ionen im Süßwasser *Z. vergl. Physiol.* **75**, S. 303 – 322.
- ROTH A (1972): Wozu dienen die Elektrorezeptoren der Welse *Z. vergl. Physiol.* **79**, S. 113 – 135.
- ROTH A (1973): Ampullary electroreceptors in catfish: afferent fiber activity before and after removal of the sensory cells *J. Comp. Physiol.* **87**, S. 259 – 275.
- ROTH A (1975): Central neurons involved in the electroreception of the catfish *Kryptopterus* *J. Comp. Physiol.* **100**, S. 135 – 146.
- ROTH A, DAUMER K (1976a): Elektrische Fische und Elektrorezeption *Biologie in unserer Zeit.* **6**, S. 11 – 21.
- ROTH A, TSCHARNTKE H (1976b): Ultrastructure of ampullary electroreceptors in lungfish and *Brachiopterygii*. *Cell Tissue Res.* **173**, S. 95 – 108.
- ROTH A (1978): Further Indications of a chemical synapse in the electroreceptors of catfish *J. Comp. Physiol.* **126**, S. 147 – 150.
- ROTH A (1982): Sensitivity of catfish electroreceptors: dependence on freshwater ions and skin potential *J. Comp. Physiol.* **147**, S. 329 – 337.
- ROTH A (1985): Axonal flow in the afferent fiber maintains the electroreceptor in the skin of fish *Naturwissenschaften.* **72**, S. 380 – 381.

- ROTH A (1986): Afferent nerve fibers induce electroreceptors in the skin of fish. *Naturwiss.* **73**, S. 264 – 266.
- ROTH A, WITTMACK J (1991): Funktioning of normal and ectopic electroreceptors *Naturwissenschaften.* **78**, S. 322 – 324.
- ROTH A (1993): Regenerative outgrow and distribution of the electroreceptive nerve fibers in the catfish *Kryptopterus J. Comp. Neurol.* **328**, S. 473 – 484.
- ROTH A, ESCHRICH J (1998): Skriptum zum Tierphysiologischen Praktikum. Zoologisches Institut der LMU München.
- SACHS L (1984): Angewandte Statistik. New York, Heidelberg, Berlin, Tokyo: Springer-Verlag.
- SAITO T, HARTELL NA, MUGURUMA H, HOTTA S, SASAKI S, ITO M, KARUBE I (1998): Light dose and time dependency of photodynamic cell membrane damage. *Photochem. Photobiol.* **68**, S. 745 – 748.
- SAKAI T, MOMOSE-SATO Y, SATO K, HIROTA A, KAMINO K (1998): Optical monitoring of synaptic transmission in bullfrog sympathetic ganglia using a voltage-sensitive dye. *Neurosci. Lett.* **242**, S. 1 – 4.
- SANCHEZ DY, ZAKON HH (1987): A model for age-related increase in sensitivity of electroreceptive afferents *Abstr. Soc. Neurosci.* **13**, S. 622 – 628.
- SANCHEZ DY, ZAKON HH (1990): The effects of postembryonic receptor cell addition on the response properties of electroreceptive afferents *J. Neurosci.* **10**, S. 361 – 369.
- SATO K, MOMOSE-SATO Y, HIROTA A, SAKAI T, KAMINO K (1998): Optical mapping of neural responses in the embryonic rat brainstem with reference to the early functional organization of

- vagal nuclei. *J. Neurosci.* **18**, S. 1345 – 1362.
- SCHÄFER K, BRAUN HA, BRETSCHEIDER F, TEUNIS PFM, PETERS RC (1990): Ampullary electroreceptors in catfish (Teleostei): temperature dependence of stimulus transduction *Pflügers Arch.* **417**, S. 100 – 105.
- SCHÄFER K, BRAUN HA, PETERS RC, BRETSCHEIDER F (1995): Periodic firing pattern in afferent discharges from electroreceptor organs of catfish *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **429**, S. 378 – 385.
- SCHILLER J, SCHILLER Y, STUART G, SAKMAN B (1997): Calcium action potentials restricted to distal dendrites of rat neocortical pyramidal neurons *J. Physiol.* **505**, S. 605 – 616.
- SCHMIDT RF, THEWS G, LANG F (HRSG.) (²¹1983): Physiologie des Menschen. Berlin, Heidelberg Springer-Verlag.
- SCHMIDT RF (HRSG.) (⁶1987): Grungruß der Neurophysiologie. Berlin, Heidelberg, New York Springer-Verlag.
- SCHUTTER DE E, BOWER JM (1994a): Simulated responses of cerebellar Purkinje cells are independent of the dendritic location of granule cell synaptic inputs *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, S. 4736 – 4740.
- SCHUTTER DE E, BOWER JM (1994b): An active membrane model of the cerebellar Purkinje cell II. Simulation of synaptic responses *J. Neurophysiol.* **71**, S. 401 – 419.
- SCHUTTER DE E, BOWER JM (1994c): An active membrane model of the cerebellar Purkinje cell I. Simulation of clamps in slice *J. Neurophysiol.* **71**, S. 375 – 400.
- SCHUTTER DE E (1998a): Dendritic voltage and calcium-gated channels amplify the variability of postsynaptic responses in a Purkinje cell model *J. Neurophysiol.* **80**, S. 504 – 519.

- SCHWINDT PC, CRILL WE (1995): Amplification of synaptic current by persistent sodium conductance in apical dendrites *J. Neurophysiol.* **74**, S. 2220 – 2224.
- SCHWINDT P, CRILL W (1996): Equivalence of amplified current flowing from dendrite to soma measured by alteration of repetitive firing and by voltage clamp in layer 5 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **76**, S. 3731 – 3739.
- SCHWINDT PC, CRILL WE (1997a): Modification of current transmitted from apical dendrite to soma by blockade of voltage- and Ca²⁺-dependent conductances in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **78**, S. 187 – 198.
- SCHWINDT PC, CRILL WE (1997b): Local and propagated dendritic action potentials evoked by glutamate iontophoresis on rat neocortical pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **77**, S. 2466 – 2483.
- SCHWINDT PC, CRILL WE (1998): Synaptically evoked dendritic action potentials in rat neocortical pyramidal neurons *J. Neurophysiol.* **79**, S. 2432 – 2446.
- SHAW SR (1981): Anatomy and physiology of identified non-spiking cells of insects, especially Diptera. *Neurons without Impulses*. Cambridge Cambridge University Press.
- SHEPPARD GM, BRAYTON RK, MILLER JP, SEGEV I, RINZEL J (1985): Signal enhancement in distal cortical dendrites by means of interaction between active dendritic spines *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, S. 2192 – 2195.
- SIEGEL S (1976): Nichtparametrische statistische Methoden. Frankfurt/Main: Fachbuchhandlung für Psychologie.
- SIGWORTH FJ (1977): Sodium channels in nerve apparently have two conductance states *Nature.* **270**, S. 265 – 267.

- SILBERNAGL S, DESPOPOULOS A (1991): Taschenatlas der Physiologie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- SKOOG DA (1971): Principles of Instrumental Analysis. New York Holt, Rinehart & Winston.
- SMITH TG (ED.) (1985): Voltage and patch clamping with microelectrodes. Bethesda American Physiol. Soc.
- SOKAL RR, ROHLF FJ (1981): Biometry. San Francisco: W. H. Freeman and Co.
- SOUKIMAS JJ, FRENCH RJ (1980): Incomplete inactivation of sodium current in nonperfused squid axon *Biophys. J.* **32**, S. 857 – 862.
- SPENCER WA, KANDEL ER (1961): Electrophysiology of hippocampal neurons *J. Neurophysiol.* **24**, S. 272 – 285.
- SPRUSTON N, JAFFE DB, WILLIAMS SH, JOHNSTON D (1993): Voltage- and space-clamp errors associated with measurement of electrotonically remote synaptic events *J. Neurophysiol.* **70**, S. 781 – 802.
- SPRUSTON N, JAFFE DB, JOHNSTON D (1994): Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties *Trends Neurosci.* **17**, S. 161 – 166.
- SPRUSTON N, SCHILLER Y, STUART G, SAKMAN B (1995): Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites *Science.* **268**, S. 297 – 300.
- STÄMPFLI R (1954): Saltatory conduction in nerve. *Physiol. Rev.* **34**, S. 101 – 112.
- STAFSTROM CE, SCHWINDT PC, CHUBB MC, CRILL WE (1985): Properties of persistent sodium conductance and calcium conductance of Layer V neurons from cat sensorimotor cortex in vitro *J. Neurophysiol.* **53**, S. 153 – 170.

- STAFSTROM CE, SCHWINDT PC, CRILL WE (1982): Negative slope conductance due to a persistent subthreshold sodium current in cat neocortical neurons in vitro *Brain Res.* **236**, S. 221 – 226.
- STAFSTROM CE, SCHWINDT PC, CRILL WE (1984a): Repetitive firing in Layer V neurons of cat neocortex in vitro *J. Neurophysiol.* **52**, S. 264 – 277.
- STAFSTROM CE, SCHWINDT PC, FLATMAN JA, CRILL WE (1984b): Properties of subthreshold response and action potential recorded in layer V neurons from cat sensorimotor cortex in vitro *J. Neurophysiol.* **52**, S. 244 – 263.
- STOCKBRIDGE N (1989): Theoretical response of a bifurcating axon with a locally altered axial resistivity. *J. Theor. Biol.* **137**, S. 339 – 354.
- STRATFORD K, MASON A, LARKMANN A, MAJOR G, JACK JJB¹ (1989): The modelling of pyramidal neurons in the visual cortex *In: The computing Neuron*. London Addison-Wesley.
- STRYER L (1996): Biochemie. Heidelberg: Spektrum Akademie Verlag.
- STUART GJ, SAKMANN B (1994a): Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites *Nature.* **367**, S. 69 – 72.
- STUART G, HAUSSER M (1994b): Initiation and spread of sodium action potentials in cerebellar Purkinje cells. *Neuron.* **13**, S. 703 – 712.
- STUART G, SAKMANN B (1995a): Amplification of EPSPs by axosomatic sodium channels in neocortical pyramidal neurons *Neuron.* **15**, S. 1065 – 1076.
- STUART G, SPRUSTON N (1995b): Probing dendritic function with patch pipettes *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, S. 389 – 394.

- STUART G, SCHILLER J, SAKMANN B (1997a): Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons *J. Physiol.* **505**, S. 617 – 632.
- STUART G, SPRUSTON N, SAKMANN B, HÄUSER M (1997b): Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS *Trends Neurosci.* **20**, S. 125 – 131.
- STUART G, SPRUSTON N (1998): Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites *J. Neurosci.* **18**, S. 3501 – 3510.
- SUGAWARA Y, OBARA S (1984a): Ionic currents in the sensory epithelium examined in isolated electroreceptors of *Plotosus* under simulated conditions *Brain Res.* **302**, S. 176 – 179.
- SUGAWARA Y, OBARA S (1984b): Damped oscillation in the ampullary electroreceptors of *Plotosus* Involves Ca-activated transient K conductance in the basal membrane of receptor cells *Brain Res.* **302**, S. 171 – 175.
- SUGAWARA Y, OBARA S (1989a): Two Ca current components of the receptor current in the electroreceptors of the marine catfish *Plotosus* *J. Gen. Physiol.* **93**, S. 365 – 380.
- SUGAWARA Y, OBARA S (1989b): Receptor Ca current and Ca-gated K current in the tonic electroreceptors of the marine catfish *Plotosus* *J. Gen. Physiol.* **93**, S. 343 – 364.
- SUTOR B, HABLITZ JJ (1989a): EPSPs in rat neocortical neurons in vitro I: Electrophysiological evidence for two distinct EPSPs *J. Neurophysiol.* **61**, S. 607 – 620.
- SUTOR B, HABLITZ JJ (1989b): EPSPs in rat neocortical neurons in vitro II: Involvement of N-methyl-D- aspartate receptors in generation of EPSPs *J. Neurophysiol.* **61**, S. 621 – 634.

- SZABO T (1967): Activity of peripheral and central neurons involved in electroreception *In: Lateral Line Detectors (Ed. Cahn P)*. S. 295 – 311 Bloomington Indiana University Press.
- SZABO T, BAUER R, MOLLER P (1973): Elektrische Sinneswahrnehmung und Verhalten der Fische. *Naturwissenschaften*. **60**, S. 10 – 18.
- SZABO T, FESSARD A (¹1974): Physiology of Electroreceptors *In: Handbook of Sensory Physiology*. **III/3**, S. 59 – 121 New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- SZAMIER RB & BENNETT MVL (1973): Rapid degeneration of ampullary electroreceptor organs after denervation. *J. Cell. Biol.* **56**, S. 466 – 477.
- TANIFUJI M, SUGIYAMA T, MURASE K (1994): Horizontal propagation of excitation in rat visual cortical slices revealed by optical imaging. *Science*. **266**, S. 1057 – 1059.
- TAYLOR GC, EILBECK JC, COLES JA (1993): Modelling of non-decremental conduction of graded potentials along an axon continuously depolarised to the activation range of sodium channels *32nd Int. Congr. Physiol. Sci.* S. 178 – 189.
- TAYLOR GC, COLES JA, EILBECK JC (1995): Conditions under which Na⁺ channels can boost conduction of small graded potentials *J. theor. Biol.* **172**, S. 379 – 386.
- TEETER JH, BENNETT MVL (1981): Synaptic transmission in the ampullary electroreceptor of the catfish, *Kryptopterus* *J. Comp. Physiol.* **142**, S. 371 – 377.
- TEUNIS PFM, BRETSCHEIDER F, PETERS RC (1989): Denervation changes the transmission properties of electroreceptor sensory synapses *Comp. Biochem. Physiol.* **94A**, S. 647 – 651.

- TEUNIS PFM, BRETSCHNEIDER F, PETERS RC (1990a): Synaptic latency in denervated electroreceptor organs *Comp. Biochem. Physiol.* **97A**, S. 399 – 403.
- TEUNIS PFM, BRETSCHNEIDER F, PETERS RC (1990b): Convergence ratio and transduction in catfish electroreceptive organs *Comp. Biochem. Physiol.* **97A**, S. 405 – 410.
- TEUNIS PFM, BRETSCHNEIDER F, BEDAUX JJM, PETERS RC (1991a): Synaptic noise in spike trains of normal and denervated electroreceptor organs *Neurosci.* **41**, S. 809 – 816.
- TEUNIS PFM, BRETSCHNEIDER F, GROENINGEN C VAN, PETERS RC, BEDAUX JJM (1991b): Quantitative aspects of transduction in an electroreceptor organ studied by means of experimental manipulation of the interspike interval *Neurosci.* **42**, S. 283 – 289.
- TEUNIS PFM, VREDEVOOGD W, WETERINGS C, BRETSCHNEIDER F, PETERS RC (1991c): The emergence of electroreceptor organs in regenerating fish skin and concurrent changes in their transduction properties *Neurosci.* **45**, S. 205 – 212.
- THOMASON AM, GIRDLESTONE D, WEST DC (1988): Voltage dependent currents prolong single-axon postsynaptic potentials in Layer III pyramidal neurons in rat neocortical slices *J. Neurophysiol.* **60**, S. 1896 – 1907.
- TRAUB RD, LLINAS R (1979): Hippocampal pyramid cells: significance of dendritic ion conductances for neuronal function and epileptogenesis *J. Neurophysiol.* **42**, S. 476 – 496.
- ULBRICHT W (1977): Ionic channels and gating currents in excitable membranes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, S. 7 – 31.
- ULBRICHT W (1979): Kinetics of Tetrodotoxin and Saxitoxin action at the node of Ranvier *Adv. Cytopharmacol.* S. 363 – 371.

- UMEKITA S-I, SUGAWARA Y, OBARA S (1975): Input-output relation across the receptor-afferent synapses in a tonic electroreceptor of marine catfish *Proc. Japan Acad.* **51**, S. 485 – 490.
- VALLET AM, COLES JA, EILBECK JC, SCOTT AC (1992): Membrane conductances involved in amplification of small signals by sodium channels in photoreceptors of drone honey bee *J. Physiol. Lond.* **456**, S. 303 – 324.
- VALLET AM, COLES JA (1993a): Is the membrane voltage amplifier of drone photoreceptors useful at physiological light intensities? *J. Comp. Physiol. A.* **173**, S. 163 – 168.
- VALLET AM, COLES JA (1993b): The perception of small objects by the drone honey bee *J. Comp. Physiol. A.* **172**, S. 183 – 188.
- WACHTEL AW, SZAMIER RB (1969): Special cutaneous receptor organs of fish: IV Ampullary organs of the nonelectric catfish, *Kryptopterus J. Morph.* **128**, S. 291 – 308.
- WEILLE DE JR (1983): Electrosensory information processing by lateral-line lobe neurons of catfish investigated by means of white noise cross-correlation. *Comp. Biochem. Physiol.* **74A**, S. 677 – 680.
- WILLIAMS SR, STUART GJ (2000): Action potential backpropagation and somato-dendritic distribution of ion channels in thalamocortical neurons *J. Neurosci.* **20**, S. 1307 – 1317.
- WIRTH W, GLOXHUBER C (³1981): Toxikologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- WITTMACK J (1990): Die Empfindlichkeit von regulären und irregulären Elektrozeporen beim Glaswels (*Kryptopterus bicirrhis*) - Ein Vergleich. München, Diplomarbeit, Zoologisches Institut der LMU.

- YOSHII K, MOORE LE, CHRISTENSEN BN (1988): The effect of subthreshold voltage dependent conductances on the transfer function of branched excitable cell *J. Neurophysiol.* **59**, S. 706 – 716.
- YUSTE R, GUTNICK MJ, SAAR D, DELANEY KR, TANK DW (1994): Ca²⁺ accumulations in dendrites of neocortical neurons: an apical band and evidence for two functional compartments *Neuron*. **13**, S. 23 – 43.
- ZAKON HH (1984): Postembryonic changes in the peripheral electrosensory system of a weakly electric fish: addition of receptor organs with age *J. Comp. Neurol.* **228**, S. 557 – 570.
- ZAKON HH (¹1986): The electroreceptive periphery *In: Electoreception (Eds. Bullock TH, Heiligenberg W)*. S. 103 – 156 New York Wiley Interscience.
- ZAKON HH (1987a): Variation in the mode of receptor cell addition in the electrosensory system of gymnotiform fish *J. Comp. Neurol.* **262**, S. 195 – 214.
- ZAKON HH (¹1987b): The Electroreceptors, Diversity in Structure and Function. *In: Sensory Biology of Aquatic Animals (Eds. Atema J et al.)*. New York, Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag.
- ZAKON HH (1988): The electroreceptors: diversity in structure and function. *In: Biology of Aquatic Animals (Eds. Atema J et al.)*. S. 815 – 850, New York: Springer.
- ZECEVIC D (1996): Multiple spike-initiation zones in single neurons revealed by voltage-sensitive dyes. *Nature*. **381**, S. 322 – 325.
- ZEISS (1999): Handbook of Optical Instruments. Jena Fa. Zeiss im Eigenverlag.
- ZHADAN GG, ZHADAN PM (1975): The effect of sodium, potassium and calcium ions on the functional characteristics of catfish

- electroreceptors *Neirofiziologija*. 7, S. 403 – 410.
- ZIPSER B, BENNETT MV (1973): Tetrodotoxin resistant electrically excitable responses of receptor cells *Brain. Res.* 62, S. 253 – 259.
- ZÖFEL P (1985): Statistik in der Praxis. Stuttgart Gustav Fischer Verlag.
- ZWART R (1989): Electrophysiological changes and histochemical demonstration of intracellular cadmium in catfish electroreceptors after exposure to cadmium *Neth. J. Zool.* 38, S. 215 – 216.

Literaturverzeichnis erstellt am: 22.07.2001

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungskommission vorgelegen.

München, im November 2002 *Man Eschich*

Lebenslauf

- 21.03.1965 Geburt in München
- 1971 – 1975 Volksschule in München
- 1975 – 1984 Dante-Gymnasium in München
- 1984 – 1986 Grundstudium der Biologie (Diplom) und Allg. Physik (Diplom) an der Technischen Universität München
- 1986 – 1990 Hauptstudium an der Technischen Universität München
- 1990 – 1991 Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, Prof. Dr. B. Linzen / PD Dr. R.J. Paul: »Fluoreszenzspektroskopische in-vivo-Messungen des Zustands biologischer Redoxsysteme in verschiedenen Geweben bei der Vogelspinne *Eurypelma californicum*«
- 1991 – 1993 Entwicklung einer neuartigen Methodik zum Nachweis von Konformationsübergängen bei Makromolekülen in der Arbeitsgruppe »Molekulare Regulation und Proteinbiophysik« am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität bei Priv.-Doz. Dr. H. Decker (Graduiertenstipendium des Freistaates Bayern); Promotion »Zur Allosterie molekularer Proteinkomplexe – insbesondere des Hämocyanins«, konnte wegen auslaufender Forschungsmittel nach 20 Monaten nicht fortgesetzt werden
- 1993 – 1997 Aufbau einer Firma für Computerdienstleistungen
- seit 1997 Promotion am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität bei Prof. Dr. A. Roth: »Zur Signalausbreitung und Konvergenz im Dendritensystem der elektrosensorischen Afferenz am Beispiel des clusterbildenden Welses *Schilbe mystis*«

