Die Verarbeitung sensorischer Signale im Nervensystem

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia Legendi an der Universität Ulm

vorgelegt von
Dr. Wolfgang Stein

Ulm, im April 2006.

In dieser Arbeit werden die Untersuchungen zur neuronalen Kontrolle von Verhalten vorgestellt, die ich zwischen 1998 und 2006 an der Universität Ulm, der Universität Bielefeld und der University of Pennsylvania durchgeführt habe. Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der ausdrücklich angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harald Wolf, der meine Arbeit stets mit Interesse verfolgte und es mir durch seine Unterstützung ermöglichte, mein Forschungsgebiet zu etablieren.

Ganz besonderer Dank gilt des Weiteren Herrn Prof. Dr. Ulrich Bässler und Herrn Prof. M.P. Nusbaum für ihr Engagement für die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses im Allgemeinen, und meiner Arbeit im Besonderen. Beiden verdanke ich einen wesentlichen Teil meiner wissenschaftlichen Ausbildung. Ihre kontinuierliche Unterstützung meiner Arbeit und auch meines Labors möchte ich ganz besonders hervorheben.

Herrn Prof. Dr. Josef Schmitz, mit dem mich eine langjährige Freundschaft verbindet, möchte ich für die vielen spannenden Projekte und hilfreichen Ratschläge danken.

Den Mitarbeitern der Abteilung Neurobiologie gebührt ein ganz besonderer Dank, da ohne sie diese Arbeit nie zustande gekommen wäre. Im Speziellen möchte ich hierbei die gegenwärtigen und ehemaligen Mitglieder meiner Arbeitsgruppe erwähnen: Tina Eberle, Carmen Smarandache, Ulrike Hedrich, Oliver Straub und Nelly Daur. Frau Jessica Ausborn und Herrn Wolfgang Mader möchte ich danken für die stetige Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen. Ich könnte mir kein besseres Team vorstellen. Dafür, dass immer alles reibungslos lief und auch weiterhin läuft, möchte ich Frau Ursula Seifert danken, die uns immer tatkräftig zur Seite steht.

Meiner Frau Ilona Stein möchte ich danken, da sie trotz aller Hindernisse und Erschwernisse rückhaltlos zu mir steht.

Inhaltsverzeichnis

1.	Allgen	neine Einführung.	1
2.	Das K	ontrollsystem des Femur-Tibia-Gelenks der Stabheuschrecke.	4
3.	Das ste	omatogastrische Nervensystem des Taschenkrebses.	8
4.	Experi	mentelles	19
5.	Sensor	ische Aktivität und ihr Einfluss auf das Nervensystem.	20
	5.1.	Vibrationssensitive Neurone im femoralen Chordotonalorgan der Stabheuschrecke.	20
	5.2.	Verarbeitung sensorischer Information im Zentralnervensystem der Stabheuschrecke.	21
	5.3.	Das Femur-Tibia-Kontrollsystem als multifunktionelles Netzwerk.	28
	5.4	Der Einfluss vom Gehirn absteigender neuronaler Bahnen auf die	
		motorischen Netzwerke im stomatogastrischen Nervensystem.	36
	5.5	Einfluss des Projektionsneurons MCN1 auf die Netzwerke im stomatogastrischen Ganglion	30
	56	Einfluss motorischer Aktivität auf absteigende Projektionsneurone	<u></u> 39
	5.7.	Aktivierung mehrerer Projektionsneurone durch sensorische Bahnen.	41
6.	Zusam	menfassung und Ausblick.	48
7.	Eigene	Literatur, die zu dieser Arbeit beigetragen hat.	53
8.	Zitierte	e Literatur.	54

1. Allgemeine Einführung.

Die Verarbeitung sensorischer Signale ist eine der wichtigsten Aufgaben des Nervensystems und gleichzeitig eines der spannendsten Gebiete der Neurobiologie. Die Wahrnehmung von Reizen aus der Umwelt oder auch dem Inneren des Körpers stellt eine lebensnotwendige Aufgabe dar, ohne die komplexe Organismen nicht überlebensfähig wären. Sensorische Organe sind weit verbreitet und sehr zahlreich, selbst in einzelnen Individuen. Die Reizmodalitäten, die wahrgenommen werden, reichen dabei von mechanischen bis hin zu visuellen Reizen.

Das Ziel meiner Arbeit ist es, ein tieferes Verständnis darüber zu erhalten, wie Nervensysteme verhaltensrelevante Aktivität generieren. Die meisten neuronalen Netzwerke, die an der Generierung von Verhalten beteiligt sind, zeigen eine funktionelle Flexibilität, d.h. das Verhalten kann den jeweiligen Anforderungen angepasst werden. Jedes Verhalten besteht dabei aus einer Abfolge von Bewegungen. Die an einer solchen Bewegung beteiligten Elemente (z.B. Gliedmaßen, Muskeln) müssen koordiniert eingesetzt werden und die Art der Koordination muss je nach Verhaltenskontext anders sein. So sind z.B. die Gelenke eines Beines beim Vorwärtslauf anders koordiniert als beim Rückwärtslauf, und beim Stehen ist keine direkte Koordination zwischen ihnen nötig. Gleichzeitig müssen fast alle Verhaltensweisen an wechselnde Umweltgegebenheiten angepasst werden können. Deshalb wird der genaue Ablauf der Bewegungen oftmals von Reflexen beeinflusst (siehe z.B. Bentley & Konishi, 1978). Aber auch umgekehrt sind solche Reflexe oft vom Verhaltenskontext bestimmt. So führt ein Tastreiz auf der Oberseite der Pfote einer Katze zu einer Beugung des Beingelenks, solange sich das Bein in einer Schwingphase des Laufens befindet, und zu einer Streckung dieses Gelenks, solange das Bein in der Stemmphase ist (Forssberg et al., 1975). Sowohl koordinierende Einflüsse als auch Reflexe werden also oft vom Verhaltenskontext abhängig sein. Insbesondere gilt dies auch für rhythmisch aktive Netzwerke, die z.B. der Fortbewegung (Bässler, 1993; Büschges, 1995), der Atmung (Lieske et al., 2000) oder auch dem Zerkleinern von Nahrung zugrunde liegen (Marder & Calabrese, 1996; Stein et al., 1997; Marder, 2000). Die beteiligten neuronalen Netzwerke, oftmals zentrale Mustergeneratoren, können in Abhängigkeit von den verschiedenen Anforderungen die unterschiedlichsten Aktivitäten produzieren. Das Zentralnervensystem muss daher auswählen, welches motorische Muster dem gewünschten Verhalten adäquat ist.

Die Flexibilität innerhalb solcher Mustergeneratoren und die Auswahl verschiedener motorischer Muster in verschiedenen Verhaltenssituationen ist seit geraumer Zeit Mittelpunkt der Forschung an den verschiedensten Systemen (Stein et al., 1997) und beinhaltet z.B. physiologische Studien sowie Simulationen in Vertebraten- und Invertebratensystemen (Jacobs & Theunissen, 1996; Grillner et al., 1997; Sparks et al., 1997; Kristan & Shaw, 1997). Es hat sich gezeigt, dass die Flexibilität der neuronalen Netze in der Regel nicht in einer Aktivierung zusätzlicher neuronaler Wege, sondern in einer lang anhaltenden dynamischen Anpassung vorhandener Bahnen begründet liegt. Meist werden solche Anpassungen durch den Einfluss von Neuromodulatoren und/oder sensorischer Information bedingt, die die zellulären und synaptischen Eigenschaften der beteiligten Netzwerkneurone und somit auch die generierte Aktivität verändern.

Über den Prozess, wie solche modulatorischen bzw. sensorischen Wege im Nervensystem verschiedene motorische Muster aus multifunktionellen Netzwerken selektieren, liegen vergleichsweise wenige Informationen vor (Stein et al., 1997; Sparks, 1999; Marder, 2000), da in den meisten Studien entweder fokale Applikation von Neuromodulatoren oder Stimulationen unvollständig charakterisierter neuronaler Bahnen benutzt wurden. Zusätzlich sind zumeist nur wenige der teilnehmenden Neurone gut charakterisiert.

Die Verarbeitung sensorischer Signale kann auf unterschiedlichen Ebenen untersucht werden. Das Ziel einer Untersuchung erfordert von daher die Auswahl des geeigneten Untersuchungsobjektes und des zu untersuchenden Systems. Mein Hauptinteresse liegt in der Erforschung der neuronalen Mechanismen, die es einem Organismus erlauben, Umgebungsreize wahrzunehmen. Dabei stellt sich das Problem, dass nur wenige Systeme so zugänglich sind bzw. gut genug untersucht wurden, um eine solche Frage zu studieren. Zunächst sollten die Neurone identifiziert werden können, die an der Generierung einer bestimmten Leistung beteiligt sind. Dies ist um so leichter, je einfacher das Nervensystem eines Organismus aufgebaut ist, d.h. je weniger Neurone es besitzt. Aus dieser Überlegung ergibt sich ein wichtiger Vorteil von "Invertebratensystemen", in denen die Zahl der beteiligten Neurone relativ gering ist. Weiterhin sollten die Versuchstiere nur ein begrenztes Verhaltensrepertoire besitzen und deshalb das einzelne Verhalten sehr stereotyp ausführen. Das gilt ebenfalls für viele Invertebraten. Tatsächlich ist es in einigen Invertebratensystemen aus diesen Gründen gelungen, den Einfluss einiger weniger Neurone auf das Verhalten zu beschreiben. Als Beispiele seien der Kiemenrückziehreflex von Aplysia (Byrne et al., 1978a; Byrne et al., 1978b), das stomatogastrische System von Krustazeen (Zusammenfassung: Selverston & Moulins, 1987; Harris-Warrick et al., 1992) und das Flugsystem der Wanderheuschrecken (z.B. Robertson & Pearson, 1985; Wolf, 1991) genannt. Generell kann festgestellt werden, dass die Mechanismen, die dem Nervensystem zur Verarbeitung sensorischer Signale zur Verfügung stehen, bei allen Tieren gleich sind. Es bietet sich daher an, für spezifische Fragestellungen verschiedene Systeme zu untersuchen und die Resultate dieser Untersuchungen zu einem Gesamtbild zu vereinen. Ich habe mich daher nicht auf ein einzelnes System beschränkt, sondern habe meine Forschung an zwei Modellsystemen für die Untersuchung neuronaler Aktivität durchgeführt. Ich habe mich dabei auch der computergestützten Modellierung neuronaler Aktivität bedient. Zum Einen habe ich mich mit der Verarbeitung sensorischer Information im Zentralnervensystem von Stabheuschrecken beschäftigt. Der Vorteil dieser Tiere für meine Untersuchungen liegt darin, dass deren Verhaltensrepertoire sehr begrenzt ist und die wenigen Verhaltensweisen sehr gut beschrieben wurden. Weiterhin sind die neuronalen Strukturen, die der Verarbeitung sensorischer Information dienen, bereits auf der Netzwerkebene beschrieben. "Netzwerkebene" bedeutet hier, dass die neuronalen Bahnen bereits charakterisiert wurden, und somit ein klares Konzept vorliegt, wie der Informationsfluss zwischen Sensorik und Motorik vollzogen wird. Da an Stabheuschrecken sehr gut Verhaltensuntersuchungen durchgeführt werden können, lassen sich somit Manipulationen an neuronalen oder sensorischen Bahnen hervorragend quantifizieren.

Da aber zur Charakterisierung der Verarbeitung sensorischer Aktivität eine detaillierte Beschreibung der neuronalen Wege vonnöten ist, habe ich mir die Vorteile eines weiteren Modellsystems zunutze gemacht. Das stomatogastrische Nervensystem des Taschenkrebses erlaubt einen Zugang zu den zellulären Mechanismen neuronaler Mustergeneratoren. Etwas mehr als zwei Dutzend Neurone generieren eine rhythmische motorische Aktivität, und die Mechanismen der Rhythmogenese sind bereits sehr gut charakterisiert. Der Einfluss sensorischer Information auf die Generierung der Rhythmen ist hier allerdings bisher nur ansatzweise geklärt. Es bietet sich aber aufgrund des immensen Wissensstandes über dieses System die Möglichkeit, den sensorischen Einfluss auf zellulärer und auf Netzwerkebene zu untersuchen. Im Folgenden möchte ich nun zunächst den aktuellen Wissensstand über beide verwendete Systeme darlegen und im Anschluss meine bisherigen Forschungsergebnisse erläutern. Da die deduzierten Aussagen eher allgemeingültigen Charakter besitzen, werde ich meine Resultate sowohl nach Untersuchungssystem als auch nach Thematik ordnen.

Die Arbeitshypothese, die ich hier vorstellen möchte, ist, dass eine große Anzahl synaptischer und zellulärer Mechanismen benutzt werden, um motorische Muster aus multifunktionellen Netzwerken zu selektieren. Diese Mechanismen beinhalten z.B. die differenzierte Beeinflussung der Zielnetzwerke durch die Interaktion verschiedener Ko-Transmitter (also verschiedener Transmitter eines Neurons), sowie das Zusammenarbeiten verschiedener modulatorischer, sensorischer und zentraler Neurone.

2. Das Kontrollsystem des Femur-Tibia-Gelenks der Stabheuschrecke.

Ich möchte zunächst das Femur-Tibia-Kontrollsystem der Stabheuschrecken (Abb. 1) vorstellen und die relevanten Detailinformation darlegen. Das Femur-Tibia-Kontrollsystem ist aus mehreren Gründen für das Studium der neuronalen Basis kontextabhängiger Variationen in der Arbeitsweise neuronaler Netzwerke geeignet: Das Tier hat ein kleines, klar definiertes Verhaltensrepertoire (Bässler, 1983), die Verhaltenszustände sind bis zu einem gewissen Grad von außen steuerbar sowie auch im festgelegten Tier klar erkennbar, und der neuronale Aufbau des Systems ist gut bekannt (Zusammenfassung: Bässler, 1993).



Abb. 1. Die Stabheuschrecke *Cuniculina impigra*. Mitte: Weibchen, Rechts unten: Männchen. Die Körperlänge des Weibchens beträgt ca. 8 cm.

In der Stabheuschrecke ist der am detailliertesten untersuchte Gelenkstellungsregelkreis das Femur-Tibia-Kontrollsystem. In diesem System wird der Femur-Tibia Winkel von ungefähr 80 der 500 Sinneszellen des femoralen Chordotonalorgans (fCO, Füller & Ernst, 1973; Kittmann & Schmitz, 1992) perzipiert. Die Sinneszellen signalisieren entweder die Position, die Geschwindigkeit oder die Beschleunigung der Tibia oder eine Kombination aus zwei dieser Parameter (Hofmann & Koch, 1985; Hofmann et al., 1985; Büschges, 1994). Die in diesen ca. 80 Afferenzen enthaltene Information wird dann auf fünf hintereinander geschalteten Ebenen jeweils antagonistisch verarbeitet (Abb. 2). (1) Die Terminalen der Afferenzen im Ganglion erhalten präsynaptische Inhibition von spikenden

Interneuronen, die ihrerseits Eingänge von den gleichen, aber auch von anderen fCO-Afferenzen erhalten (Sauer et al., 1997). (2) Die präsynaptisch gehemmten Afferenzen verschalten auf bestimmte Klassen von Interneuronen (Büschges, 1989; 1990), vorwiegend auf nichtspikende Neurone. Bisher sind 10 verschiedene identifizierte Typen lokaler nichtspikender Interneurone (NSIs) bekannt, die die sensorische Information verarbeiten und sie zu den Extensor- und Flexor-Motoneuronen weiterleiten (Büschges, 1990; Sauer et al., 1996). Eine unbekannte Anzahl spikender Interneurone (Büschges, 1989) ist an der Verarbeitung beteiligt. Die fCO-Afferenzen projizieren entweder direkt exzitatorisch auf die NSIs oder indirekt (über ein zwischengeschaltetes spikendes Interneuron) inhibitorisch. Das relative Gewicht der direkt erregenden und der indirekt hemmenden Einflüsse ist für jeden der 10 NSIs anders. Deshalb wird die Information des fCOs von diesen Neuronen in jeweils charakteristischer Weise verarbeitet (Büschges, 1990; Sauer et al., 1996).



Abb. 2. Schematische Darstellung des neuronalen Netzwerks, welches die Extensor-Motoneurone des Femur-Tibia-Regelkreises steuert.

(3) Sieben der bekannten nichtspikenden Interneurone wirken erregend auf die beiden exzitatorischen Motoneurone des Extensor-Tibiae-Muskels. Sie werden E-Neurone genannt (E1 - E7). Drei der bekannten Interneurone (so genannte I-Neurone, I1, I2, I4) wirken hemmend auf FETi (Fast Extensor Tibiae Motoneuron) und SETi (Slow Extensor Tibiae Motoneuron). Auch auf dieser Ebene gibt es also eine antagonistische Informationsverarbeitung. Der Antagonismus drückt sich aber auch noch in einer anderen Weise aus: Einige E-Typen und einige I-Typen unterstützen nämlich den Widerstandsreflex, während andere E- und I-Typen ihm entgegenwirken (Zusammenfassungen: Bässler, 1993; Büschges, 1995; Driesang & Büschges, 1996). Zum Beispiel werden Interneurone des Typs E3 bei einer Dehnung des fCOs depolarisiert, während Interneurone des Typs E7 hyperpolarisiert werden (Büschges, 1990; Sauer et al., 1996). Beide sind aber exzitatorisch mit den Extensor-Motoneuronen verschaltet. Da fCO-Dehnung eine Erregung in diesen Motoneuronen auslöst, unterstützt also E3 die SETi-Antwort, während E7 ihr opponiert. Für sich alleine würde E7 die Extensor-Aktivität verringern. Die motoneuronale Aktivität ist daher die Summe von sich widersprechenden Informationen der verschiedenen neuronalen Komponenten. (4) Die Kontraktion des Extensor-Tibiae-Muskels wird nicht nur von den erregenden Motoneuronen FETi und SETi ausgelöst, sondern wird zusätzlich von einem inhibitorischen Motoneuron, dem Common Inhibitor 1

 (CI_1) bestimmt (z.B. Bässler & Stein, 1996). (5) Die aus den Aktivitäten der erregenden und hemmenden Motoneuronen resultierende Bewegung der Tibia kann weiterhin beeinflusst werden durch die Kontraktionen des antagonistischen Flexor-Tibiae Muskels (Bässler & Stein, 1996).

Das Verhalten der Stabheuschrecken ist bei Tageslicht sehr stereotyp. Sie vermeiden möglichst jede Bewegung und bremsen aufgezwungene Bewegungen ab. Solche Bewegungen lösen nämlich einen Widerstandsreflex, z.B. im Femur-Tibia (FT)-Gelenk aus (Bässler, 1983). Die Stärke dieses Reflexes ist sehr variabel (bis zu einem Faktor von 50; Bässler, 1974; Kittmann, 1991). Sie wird in Abhängigkeit von verschiedenen externen und internen Parametern verändert. Die Verstärkung steigt nach einer Beunruhigung (Berühren, Anblasen) und sie fällt langsam während längerer Zeit der Ruhe und schnell bei rascher Wiederholung von Reizen (Habituation bzw. habituationsähnlicher Vorgang; Kittmann, 1991; Bässler & Stein, 1996). Der allmähliche Abfall der Verstärkung bei repetitiver Reizung beruht bei der hier untersuchten Spezies *Cuniculina impigra* auf einer zunehmenden Co-Kontraktion von Extensor- und Flexor-Muskeln. Die Aktivität von Motoneuronen (z.B. SETi) verändert sich dagegen nur wenig (Bässler & Stein, 1996). Während also diese Art der Verstärkungsabnahme auf eine Muskeleigenschaft zurückgeführt werden konnte, ist bisher über die Ursachen der durch Beunruhigung hervorgerufenen Verstärkungserhöhungen nur wenig bekannt (Bässler, 1993; Kittmann, 1991; 1997; Bässler & Nothof, 1994).

Wenn Stabheuschrecken aktiv werden, was zumeist nachts vorkommt, da dann die Gefahr, von einem Fressfeind entdeckt zu werden, geringer ist, ändern sich Vorgänge auf mehreren Verarbeitungsebenen. So wird beim Laufen (1) das inhibitorische Motoneuron des Extensor-Muskels aktiv und unterdrückt dadurch mögliche Co-Kontraktionen (Ebenen 4 und 5). Deshalb kann das Extensor-Flexor-System rasche Modulationen der motoneuronalen Aktivität in voller Höhe in Bewegungen umsetzen (Bässler & Stein, 1996). (2) Das Femur-Tibia-Kontrollsystem schaltet von einem Widerstandsreflex im inaktiven Tier auf die so genannte "aktive Reaktion" um (Bässler, 1974; 1976; 1986a,b; 1988; Weiland & Koch, 1987). Die aktive Reaktion synchronisiert die Bewegungsabläufe aller Beine, die sich gleichzeitig in der Stemmphase befinden (Cruse et al., 1997). Gleichzeitig ist die aktive Reaktion auch an der Steuerung des Übergangs von der Stemm- in die Schwingphase beteiligt (Weiland & Koch, 1987; Bässler, 1988). Bei der aktiven Reaktion werden z.B. bei einer Beugung des FT-Gelenkes die Extensor Motoneurone FETi und SETi stark gehemmt, und nicht erregt, wie beim Widerstandsreflex im inaktiven Tier. Erst nach Erreichen einer stark gebeugten Stellung werden sie plötzlich wieder aktiv. Bei der aktiven Reaktion ändert sich anscheinend hauptsächlich die relative Gewichtung von erregenden und indirekt hemmenden Eingängen auf die nichtspikenden Interneurone (Ebene 2; Bässler & Büschges, 1990; Driesang & Büschges, 1996). Eine solche verhaltensabhängige Reflexumkehr wurde nach ihrer Entdeckung bei Stabheuschrecken (Bässler, 1973) auch bei verschiedenen Vertebraten- und Invertebratensystemen beschrieben (Zusammenfassung: Pearson, 1995), z.B. bei Katzen (Forssberg et al., 1975; Pearson & Collins, 1993), bei Menschen (Yang & Stein, 1990), bei Krebsen (DiCaprio & Clarac, 1981; Skorupski & Sillar, 1986) und der Wanderheuschrecke (Bässler, 1992; Wolf, 1992).

Wenn das Tier aktiv läuft, müssen sich die Gelenkstellungsregelkreise verschiedener Gelenke und auch die verschiedenen Beine gegenseitig beeinflussen können. Die FT-Kontrollsysteme verschiedener Beine beeinflussen sich im inaktiven Tier nicht in eindeutiger Weise (Bässler, 1974). Im aktiven Tier sind dagegen deutliche Einflüsse vorhanden (Zusammenfassung: Cruse, 1990). Diese Einflüsse zwischen den FT-Kontrollsystemen verschiedener Beine sind also ebenfalls kontextabhängig.

Die Stabheuschrecke ist zur Untersuchung von kontextabhängigen Reaktionen besonders geeignet, weil hier zwei Verhaltenszustände eindeutig definiert werden können: (1) ein inaktiver und (2) ein aktiver Verhaltenszustand (Bässler, 1983). In diesen Verhaltenszuständen lösen Elongationsreize am fCO (dies entspricht einem Beugen der Tibia) unterschiedliche, aber eindeutige Reaktionen aus. Ähnlich eindeutige Verhaltenszustände liegen bei anderen Tieren nicht vor (z.B. Wanderheuschrecke, Bässler, 1992).

(1) Im inaktiven Verhaltenszustand verharren Stabheuschrecken bewegungslos (Bässler, 1983). Helles Licht unterdrückt Aktivität so stark, dass die Tiere bewegungslos bleiben (Steininger, 1933; Kalmus, 1938; Eidmann, 1956; Godden & Goldsmith, 1972). In diesem Zustand zeigen Stabheuschrecken auch das Verhalten der Katalepsie. Von den Extensor-Motoneuronen ist nur das Slow-Motoneuron (SETi) mit niedriger konstanter Frequenz aktiv. Ein Elongationsreiz am fCO löst einen Widerstandsreflex (negative Rückkopplung) aus (Zusammenfassung: Bässler, 1983; 1993), wobei der Extensor-Muskel erregt und der Flexor-Muskel gehemmt wird. Wird ein Tier leicht gestört, z.B. durch eine kurze Berührung des Abdomens, wird die Stärke dieses Widerstandsreflexes drastisch erhöht (Kittmann, 1991).

(2) Bei andauernder oder heftiger Störung des Tieres wechselt das Tier in den aktiven Verhaltenszustand. Dies zeigt sich dadurch, dass die Tiere aktive Bewegungen mit den Beinen ausführen und alle Motoneurone des Extensor-Tibiae-Muskels Aktionspotentiale bilden. Wird in diesem Verhaltenszustand ein Dehnungsreiz an das fCO appliziert, wird die aktive Reaktion ausgelöst (Zusammenfassung: Bässler, 1983).

Da es Ziel meiner Arbeit war, zu untersuchen, wie das Nervensystem kontextabhängige Verhaltensänderungen generiert, habe ich meine Untersuchungen an Stabheuschrecken der Verarbeitung sensorischer Information und der Auswertung dieser Information durch die die Beinbewegung kontrollierenden neuronalen Netzwerke gewidmet.

3. Das stomatogastrische Nervensystem des Taschenkrebses.

Weiterhin möchte ich nun in die Details des stomatogastrischen Nervensystems (STNS) einführen. Im STNS finden sich die rhythmisch aktiven Netzwerke des pylorischen und gastrischen Rhythmus. Beide sind im stomatogastrischen Ganglion (STG) lokalisiert, einem von vier Ganglien, die zusammen das stomatogastrische Nervensystem bilden. Die Motivation für dieses Projekt stammt daher, dass in diesem System bereits die neuronalen Verschaltungen der dem pylorischen und gastrischen Rhythmus zugrunde liegenden Netzwerke charakterisiert wurden. Ebenso wurden bereits mehrere modulatorische absteigende Projektionen und sensorische Eingänge zu diesen Netzwerken aufgezeigt. Für meine Untersuchungen habe ich das stomatogastrische Nervensystem des Taschenkrebses, *Cancer pagurus* (Abb. 3), bzw. dessen nahen Verwandten, *Cancer borealis*, gewählt.



Abb. 3. Der Taschenkrebs *Cancer pagurus*. Die maximale Breite des Adulttiers liegt bei ca. 20 cm.

Es hat sich gezeigt, dass das isolierte STNS eine Vielzahl verschiedener lang anhaltender gastrischer Rhythmen generieren kann (Nusbaum & Beenhakker, 2002). Diese Vielfalt zeigt sich aber nur unter zwei Voraussetzungen: Applikation von neuromodulatorisch aktiven Substanzen oder Stimulation von neuromodulatorischen Projektionsneuronen, einer Klasse von Interneuronen, die das STG innervieren.

Spezifische Modulatoren bzw. Stimulation einzelner Projektionsneurone lösen dabei selektiv verschiedene gastrische Rhythmen aus. Die Modulatoren, meist Peptide, greifen dabei verschiedene Ziele, wie Synapsen oder Membraneigenschaften unterschiedlicher STG-Neuronen an. Über das Zusammenarbeiten verschiedener Modulatoren bzw. Projektionsneurone ist allerdings wenig bekannt. Das isolierte STNS zeigt also eine sehr große Variabilität an motorischen Mustern und viele Möglichkeiten zur Selektion verschiedener motorischer Muster.

Die Details:

Das stomatogastrische Nervensystem der Krustazeen ist ein sehr gut beschriebenes Modell zur Untersuchung der funktionellen Organisation rhythmisch aktiver Netzwerke auf zellulärer Ebene (Harris-Warrick et al., 1992; Marder & Calabrese, 1996; Stein et al., 1997). Es stellt eine Erweiterung des Zentralnervensystems dar und kontrolliert die rhythmischen Kontraktionen der quergestreiften Muskulatur des Vorderdarms (Abb. 4), der aus Ösophagus (Schlucken), Magensack (Lagerung der Nahrung), gastrischer Mühle (Kauen der Nahrung) und Pylorus (Filtern der Nahrungspartikel) besteht. Das STNS (Abb. 5) besteht aus vier Ganglien, den paarigen Kommissuralganglien (CoGs mit jeweils ca. 500 Neuronen), dem unpaarigen Ösophagealganglion (14 Neurone) und dem stomatogastrischen Ganglion (26 Neurone). Diese Ganglien enthalten mehrere, voneinander getrennte neuronale Netzwerke, die die rhythmischen Bewegungen der verschiedenen Vorderdarmteile steuern.



Abb. 4. Schematische Darstellung des Vorderdarms des Taschenkrebses und seiner vier Kammern. Das STNS liegt dem Vorderdarm dorsal auf (rot) und innerviert die gestreifte Muskulatur des Darms. Verändert nach Beenhakker et al. (2000).



Abb. 5. Schematische Darstellung des STNS anhand der wichtigsten Nerven und Muskeln.

Die am besten untersuchten Netzwerke sind die des gastrischen Mühlenrhythmus und des pylorischen Rhythmus. Beide Netzwerke bestehen aus separaten, aber überlappenden Gruppen von STG-Neuronen (Abb. 6A,B; Weimann et al., 1991; Weimann & Marder, 1994). Im isolierten stomatogastrischen Nervensystem des Krebses ist der pylorische Rhythmus (Abb. 6C) ständig aktiv, während der gastrische Rhythmus (Abb. 6C) meist inaktiv bleibt.

deren und Verbindungen Beide Rhythmen, sowie alle beteiligten Neurone und Membraneigenschaften, sind in den verschiedenen Krustazeenarten sehr gut charakterisiert (Abb. 6B). Zusätzlich sind etwa 15 neuromodulatorische Substanzen bekannt, die diese beiden Rhythmen beeinflussen (Harris-Warrick et al., 1992; Marder & Calabrese, 1996; Skiebe, 2001). Perfusion jeder dieser Modulatoren löst einen bestimmten pylorischen bzw. gastrischen Rhythmus aus. Dies resultiert aus dem spezifischen Einfluss der einzelnen Modulatoren auf synaptische und zelluläre Eigenschaften der STG-Neurone (Marder & Calabrese, 1996; Harris-Warrick et al., 1997). Einige dieser Rhythmen sind den in vivo ausgelösten Rhythmen sehr ähnlich (Heinzel et al., 1993). Die Auswahl solcher verschiedener motorischer Muster durch das Zentralnervensystem ist noch ungeklärt.



Abb. 6. A. Foto eines stomatogastrischen Ganglions, in dem die 22 Zellkörper der gastrischen und pylorischen Netzwerke zu erkennen sind. B. Darstellung der Verschaltung der pylorischen (rot) und gastrischen Netzwerke (blau). C. Extrazelluläre Ableitungen der pylorischen Nerven *mvn* (medianer Ventrikularnerv) und *pdn* (pylorischer Dilatornerv), sowie des gastrischen Nerves *dgn* (dorsaler gastrischer Nerv). Intrazelluläre Ableitungen der gastrischen Motoneurone LG, DG und GM. Die rhythmisch wiederkehrende Aktivität in den gastrischen Motoneuronen zeigt den gastrischen Rhythmus, die der pylorischen Neurone den pylorischen. Neuronennamen: AB anteriores Bursterneuron, AM anteriores Medianneuron, DG dorsales gastrisches Motoneuron, GMs gastrische Motoneurone (4 homologe Kopien), IC inferiores cardiac Motoneuron, Int1 Interneuron 1, LG laterales gastrisches Motoneuron, LP laterales pylorisches Neuron, LPG laterale pylorische Neurone (2 homologe Kopien), MG medianes gastrisches Motoneuron, PD pylorische Dilatorneurone (2 homologe Kopien), PY pylorische Konstriktormotoneurone (5 homologe Kopien), VD ventrales Dilatorneuron.

Zur Untersuchung der Selektion motorischer Muster aus einem multifunktionellen Netzwerk habe ich das STNS des Taschenkrebses *Cancer pagurus* ausgewählt, da der Taschenkrebs ein naher Verwandter des amerikanischen Krebses *Cancer borealis* ist, an dem die meisten Untersuchungen zur Generierung gastrischer Rhythmen durchgeführt wurden (Nusbaum & Beenhakker, 2002). Das STNS beider Arten scheint gleich aufgebaut zu sein (Heinzel et al., 1993), und auch unsere bisherigen Ergebnisse (siehe Stein et al., 2005; 2006b) haben keinen Unterschied in der Verschaltung des neuronalen Netzwerks beider Arten ergeben. Die Konnektivität sowie alle Neurone innerhalb des STG sind bekannt (siehe Abb. 6B) und können relativ einfach identifiziert werden. Zusätzlich sind die Membraneigenschaften und synaptischen Übertragungen innerhalb des STG bekannt.

Ein weiterer Vorteil des STNS ist es, dass das gleiche Tier für Untersuchungen am intakten und isolierten System verwendet werden kann. Dadurch können die am intakten Tier gewonnenen Daten sogleich am isolierten System des gleichen Tiers überprüft werden. Insbesondere die (nachträgliche) Identifikation von Neuronen im intakten Tier wird dadurch erleichtert.

Ich habe die Auswahl motorischer Muster im STNS am Beispiel des gastrischen Rhythmus (siehe Abb. 6C) untersucht. Das neuronale Netzwerk des gastrischen Rhythmus wird im Gegensatz zum pylorischen Netzwerk nicht durch klassische Schrittmacherneurone angetrieben, sondern durch ein so genanntes 'Half-Center', eine reziproke Inhibition zwischen zwei Neuronen (Abb. 6B). Dadurch ist der gastrische Rhythmus im isolierten System im Regelfall nicht aktiv. Er wird erst durch die Aktivität der modulatorischen Projektionsneurone gestartet. Das Zentralnervensystem bestimmt also durch die Aktivität der Projektionsneurone die Generierung gastrischer Rhythmen. Die verschiedenen gastrischen Rhythmen werden durch Beteiligung unterschiedlicher gastrischer Motoneurone und deren Phasenbeziehungen charakterisiert.

In Vertebraten- und Invertebratensystemen hat sich gezeigt, dass viele, ja sogar die meisten Neurone mehr als einen Transmitter besitzen (Brezina & Weiss, 1997; Nusbaum et al., 2001). Üblicherweise findet sich ein klassischer Neurotransmitter und ein oder mehrere Neuropeptide. Die Mechanismen, die die Wirkung dieser gleichzeitig ausgeschütteten Transmitter bestimmen, sind dabei aber nur wenig verstanden, selbst in Systemen, in denen sie untersucht wurden. Es gibt viele mögliche Wirkmechanismen, z.B. eine räumlich getrennte Ausschüttung aus verschiedenen Release Sites und/oder zeitlich getrennte Ausschüttung. Ebenso können die Wirkungen durch separate oder koinzidierende Rezeptorlokalisationen bewirkt werden (Nusbaum et al., 2001). Die Kombination aus verschiedenen potentiellen Ausschüttungsstrategien und Rezeptorkombination auf verschiedene Zielneurone in einem neuronalen Netzwerk zeigt die enorme Flexibilitätsmöglichkeit solcher Multi-Transmitter Neurone. Untersuchungen zur Aufklärung dieser Mechanismen sind noch in den Anfangsstadien, selbst in den am besten zugänglichen Modellsystemen. Im stomatogastrischen sind Nervensystem des Krebses inzwischen die Transmitter mehrerer identifizierter Projektionsneurone und sensorischer Neurone bekannt, die das STG beeinflussen. Dies gibt uns die Möglichkeit herauszufinden, wie das Zentralnervensystem zentrale und sensorische Bahnen und deren Transmitter nutzt, um verschiedene motorische Muster aus ein und demselben Netzwerk zu selektieren.

Der gastrische Mühlenrhythmus steuert die Bewegung der drei im Magen liegenden Zähne (Abb. 7A), die für das Zerkleinern von Nahrung verantwortlich sind. Zwei Lateralzähne und ein Medianzahn zerkleinern verschlungene Nahrungsbrocken. Die Bewegung dieser Zähne wird hauptsächlich durch die Protraktormotoneurone des Medianzahns, die GM Neurone (gastrische Motoneurone), das Retraktormotoneuron des Medianzahns. DG (dorsales gastrisches Motoneuron), die Protraktormotoneurone der Lateralzähne, LG (laterales gastrisches Motoneuron) und MG (medianes gastrisches Motoneuron) und den Retraktormotoneuronen der Lateralzähne LPG (laterales pylorischgastrisches Neuron) bestimmt. Die Aktivität vieler dieser Neurone kann simultan intra- und extrazellulär abgeleitet werden (Abb. 7B). Der zentrale Mustergenerator, welcher den gastrischen Rhythmus generiert, besteht aus einer klassischen 'Half-Center' Verschaltung, nämlich einer gegenseitigen Hemmung zwischen LG und Interneuron 1 (siehe Abb. 6B). Die abwechselnde Aktivität dieser Neurone steuert über elektrische Synapsen die Aktivität der gastrischen Folgeneurone MG und GM. Das Retraktormotoneuron des Medianzahns, DG, wird dagegen hauptsächlich von Projektionsneuronen erregt und nur indirekt vom 'Half-Center' beeinflusst (Bartos & Nusbaum, 1997). Eine Aktivierung des 'Half-centers' und damit ein Starten des gastrischen Rhythmus wird durch die Ausschüttung von Neuromodulatoren aus Projektionsneuronen auf das Neuropil des STG bewirkt. Ungefähr 20 Projektionsneurone, deren Somata sich in den Kommissuralganglien, dem Cerebralganglion oder dem Ösophagealganglion befinden, innervieren das STG. Einige wurden bereits identifiziert, ebenso ihre Transmitter (C. borealis, Tabelle 1).



Abb. 7. A. Foto der zwei Lateralzähne und des Medianzahns in der gastrischen Mühle von *Cancer borealis*. (Dirk Bucher, *http://www.bio.brandeis.edu/marderlab/figcentral.html*). B. Foto des Aufbaus für simultane Mehrfach-Intrazellulärableitung gastrischer und pylorischer Neurone. Zusätzlich wurden mehrere extrazelluläre Ableitungen angefertigt.

Projektions- neuron	gastrischer Rhythmus	Pylorischer Rhythmus	Identifizierte Transmitter	¹ Blitz & Nusbaum, 1997 ² Blitz & Nusbaum, 1999 ³ Nusbaum &
MPN	unterdrückt ^{1,2}	moduliert ^{1,3}	GABA ¹⁰ Proctolin ^{3,10}	Marder,1989a,b
MCN1	aktiviert ⁴⁻⁷	moduliert ^{4,7,8}	GABA ¹⁰ Proctolin ¹⁰ CabTRP 1a ¹⁰	⁴ Nusbaum et al, 1992 ⁵ Coleman & Nusbaum,1994 ⁶ Coleman et al., 1995 ⁷ Wood et al., 2000
CPN2	modifiziert ^{1,9}	moduliert ^{1,9}	Keine	⁸ Bartos & Nusbaum, 1997 ⁹ Norris et al., 1994
ivn	aktiviert ¹¹	moduliert ¹¹	Histamine ¹¹ FLRF _{amide} -like ¹¹ Orcokinine ¹²	¹⁰ Blitz et al., 1999 ¹¹ Christie et al., 2004 ¹² Skiebe, 2001

Tabelle 1. Einfluss identifizierter Projektionsneurone auf Rhythmen im STG von C. borealis.

MPN = Modulatory Proctolin Neuron, MCN1 = Modulatory Projection Neuron 1, CPN2 = Commissural Projection Neuron 2, *ivn* = Inferior Ventricular Nerv. Der pylorische Rhythmus wird moduliert, weil er bereits aktiv ist. Die Modulation ist unterschiedlich zwischen verschiedenen Projektionsneuronen. Der gastrische Rhythmus, der durch die Projektionsneurone aktiviert wird, ist spezifisch für jedes Projektionsneuron. CPN2 löst keinen gastrischen Rhythmus aus, sondern modifiziert vorhandene Rhythmen.

Jeder dieser Neuromodulatoren findet sich in den Terminalen der Projektionsneurone im Neuropil des STG, aber nicht in den STG-Neuronen selbst (Harris-Warrick et al., 1992; Coleman et al., 1992). Es gibt eine starke Ko-Lokalisation von Transmittern innerhalb dieser STG Eingänge (Marder et al., 1995; Blitz et al., 1999). Ähnlich wie bei Untersuchungen mit der Perfusion einzelner Modulatoren, führt auch die individuelle Aktivierung einzelner Projektionsneurone im isolierten STNS zu ganz spezifischen pylorischen und gastrischen Rhythmen (Tabelle 1). Eine Ko-Aktivierung mehrerer Projektionsneurone löst einen anderen, spezifischen gastrischen Rhythmus aus (Blitz & Nusbaum, 1997).

Die Aktivität der Projektionsneurone spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Selektion verschiedener Rhythmen aus einem multifunktionellen Netzwerk. Welche Projektionsneurone tatsächlich an der Generierung der Rhythmen beteiligt sind, bzw. welche Projektionsneurone ko-aktiv sind und welche Rolle dabei die verschiedenen Ko-Transmitter spielen, ist bisher nicht untersucht und kann auch nicht am isolierten STNS geklärt werden. Verschiedene Möglichkeiten könnten zur Aktivierung der Projektionsneurone benutzt werden, z.B. sensorische Eingänge, die die Kommissuralganglien oder das Cerebralganglion innervieren oder Eingänge vom Cerebralganglion, die wiederum die Kommissuralganglien innervieren.

Der inferiore Ventricularnerv (*ivn*) stellt die einzige direkte Verbindung zwischen dem Cerebralganglion (dem Gehirn) und dem stomatogastrischen Nervensystem dar (Coleman et al., 1992). Er enthält 6 - 8 Axone, je nach Krustazeenart. In *Orconectes limosus* nimmt die Aktivität des *ivn in vivo* bei einer Nahrungsaufnahme stark zu und korreliert mit der Nahrungsmenge (Böhm et al., 2001). Sie geht dem Beginn eines gastrischen Mühlenrhythmus voraus. Die *ivn* Aktivität könnte daher eine wichtige Rolle bei der Informationsübertragung von höheren Ganglien zum stomatogastrischen

Nervensystem spielen und damit auch bei der Selektion verschiedener motorischer Muster. Der *ivn* enthält die Axone der paarigen inferioren Ventricularneuronen (IV-Neurone). Diese Neurone innervieren neben dem STG zusätzlich auch beide CoGs. Die Aktivität der IV-Neurone löst in verschiedenen Krustazeenspezies verschiedene Reaktion aus (Skiebe, 2001). Das Hauptaugenmerk meiner Arbeit aber fokussiert auf die funktionellen Auswirkungen dieser Neurone auf die motorischen Muster im STG und den Strategien, die diese Neurone benutzen, um die Netzwerke im STG zu beeinflussen. Diese Fragen sind bisher in keiner Krustazeenart untersucht. In den bisher untersuchten Arten wurde jeweils Histamin als Transmitter gefunden und zusätzlich FLRFamide (Skiebe, 2001) und Orcokinine (Skiebe, Marder, persönliche Mitteilungen). Weiterhin unklar ist die Aktivierung der IV-Neurone selbst. Welche sensorischen Meldungen die Aktivität der IV-Neurone bei der Nahrungsaufnahme erhöhen, ist bisher nicht untersucht. Da die IV-Neurone im Gehirn lokalisiert sind, liegt die Vermutung nahe, dass optische oder olfaktorische Eingänge (z.B. von den Antennen) die IV-Neurone aktivieren.

Neben den vom Gehirn absteigenden neuronalen Bahnen beeinflussen mehrere sensorische Bahnen die Rhythmen des STGs. Im Krebs sind die beiden am besten charakterisierten Bahnen die des anterioren gastrischen Rezeptors (AGR: Simmers & Moulins, 1988a,b; Combes et al., 1995) und des gastro-pylorischen Rezeptors (GPR: Katz & Harris-Warrick, 1989, 1990, 1991). Diese Neuronen werden durch Kontraktion bzw. Streckung verschiedener gastrischer Muskeln aktiviert und wurden bisher nur am isolierten System untersucht.

AGR ist ein sensorisches Neuron, dessen Dendriten in der Sehne des Protraktormuskels (GM1, gastric mill muscle 1; Abb. 8) des medianen Zahns arborisieren (Combes et al., 1995). Es funktioniert daher wie ein Golgi-Sehnenorgan und ist sensitiv gegenüber erhöhter Spannung im Muskel gm1 (welcher von den gastrischen Motoneuronen GM innerviert wird). Der AGR hat keine synaptischen Verbindungen im STG, er beeinflusst die Rhythmen durch einen indirekten Weg: Durch eine kurze AGR Reizung wird selektiv das Projektionsneuron CPN2 (commissural projection neuron 2) aktiviert (Norris et al., 1994; Abb. 8). CPN2 hat synaptische Verbindungen zu den STG-Neuronen und partizipiert im gastrischen Rhythmus (Norris et al., 1994; Blitz & Nusbaum, 1997), indem es die Protraktormotoneurone der gastrischen Mühle inhibiert (Norris et al., 1994). Zusätzlich hemmt CPN2 die pylorischen Neurone IC und VD.



Abb. 8. Schematische Darstellung des STNS mit dem sensorischen Neuron AGR und den Motoneuronen GM und DG und den jeweiligen Projektionen. AGR innerviert den gastrischen Muskel gm1 und besitzt ein Axon, welches zu den Kommissuralganglien aufsteigt. Dort befinden sich die Projektionsneurone MCN1 (1), CPN2 (2) und MCN5 (5) (siehe auch Tabelle 1). Die GM Neurone aktivieren die gm1 Muskeln. DG aktiviert die gm4a,b Muskeln.

Der gastro-pylorische Rezeptor GPR ist ein Muskelstreckrezeptor, der bei Muskeldehnung aktiviert wird. Es gibt zwei bilateral symmetrische und funktionell equivalente GPR Paare (Katz et al., 1989), deren Somata jeweils im *lvn* (lateraler Ventrikularnerv) bzw. *gpn* (gastro-pylorische Nerv) lokalisiert sind (Abb. 9A). Ein GPR Neuron innerviert den gastrischen Muskel gm9 und den pylorischen Muskel cpv3a (Abb. 9B), das andere innerviert den gastrischen Muskel gm8. Die Antwortcharakteristika des GPR während einer Dehnung des Muskels gm9 bzw. gm8 wurde detailliert untersucht: Mit zunehmender linearer Dehnung des Muskels nimmt auch die Aktionspotentialfrequenz des GPR linear zu.



Abb. 9. A. Schematische Darstellung des Vorderarms mit stomatogastrischem Nervensystem. Die Lage von GPR2 ist angedeutet. B. GPR1 innerviert den gastrischen Muskel gm8, GPR2 den gastrischen Muskel gm9 und den pylorischen Muskel cpv3a. Aus: Katz et al. (1989).

GPR enthält mehrere Transmitter (Acetylcholin, Serotonin und ein Allatostatin-ähnliches Peptid, C. borealis) und löst sowohl klassische, kurzfristige als auch modulatorische Antworten in STG-Neuronen aus (Katz & Harris-Warrick, 1989). Die Arbeiten des Harris-Warrick Labors (Katz & Harris-Warrick, 1989, 1990; Kiehn & Harris-Warrick, 1992; Zhang & Harris-Warrick, 1994) zeigen, dass GPR keine offensichtliche Peptidwirkung im STG besitzt, aber mehrere gastrische und pylorische Neurone erregt (LP, IC, MG, LG, DG). Der auffälligste Effekt zeigt sich im gastrischen Retraktormotoneuron DG, welches während einer GPR-Aktivität Plateaupotentiale ausbilden kann. DG innerviert die gm4 Muskeln, die durch ihre Kontraktion und bedingt durch ihre Lage an der Magenwand die Muskeln gm8 und gm9 dehnen. Dies sollte wiederum zu einer Zunahme der GPR-Aktivität führen, was wiederum DG stärker aktivieren sollte. Das GPR - DG System bildet offensichtlich, im Gegensatz zu den meisten sensorischen Rückkopplungen, eine positive Rückkopplung aus. Obwohl die GPR Wirkung auf DG gut beschrieben ist, wurde die Aktivierung von GPR durch DG und die daraus resultierende positive Rückkopplung bisher nicht untersucht. Der Einfluss einer GPR-Aktivität auf einen bereits vorhandenen gastrischen Rhythmus ist nicht bekannt. Alle bisherigen Arbeiten wurden allerdings am isolierten STG durchgeführt, d.h. ohne Eingänge von den anterioren Ganglien, den CoGs und dem OG, und somit auch ohne den Einfluss eines gastrischen Rhythmus. GPR projiziert neben dem STG auch zu den CoGs und besitzt dort auch Verzweigungen (Katz et al., 1989). Das heißt auch, dass GPR aktivitätsabhängige Wirkungen besitzt, die auf die CoGs beschränkt sind. Über die Verbindungen zu den CoGs ist bislang nichts bekannt, es bietet sich hier aber die Möglichkeit, in die positive Rückkopplung des GPR - DG Systems einzugreifen.

GPR zeigt eine weitere interessante Besonderheit für ein sensorisches Neuron: Es kann sich entweder in einem 'Spike-' oder einem 'Burstmodus' befinden (Birmingham et al., 1999). Im Spikemodus ist GPR tonisch aktiv und zeigt eine lineare Zunahme der Aktivität mit zunehmender Dehnung des innervierten Muskels. Im Burstmodus hingegen zeigt GPR Bursts von Aktionspotentialen, sogar ohne Dehnung des innervierten Muskels. Bei einer tonischen Dehnung des Muskels nimmt die Häufigkeit der Bursts linear zu, die Aktivität innerhalb eines Bursts dagegen verändert sich kaum. Es zeigt sich eine gute Korrelation der Bursthäufigkeit mit der Reizamplitude. Während eines sich schnell verändernden Reizes hingegen, wie z.B. einer Sinusreizung, verändert sich die Aktivität des GPR im Burstmodus kaum. Die Bursthäufigkeit korreliert nicht mit der Reizamplitude bzw. der Reizfrequenz. D.h. im Burstmodus ist GPR hauptsächlich sensitiv für eine langsame, tonische Dehnung der innervierten Muskeln. GPR wechselt *in vitro* spontan zwischen beiden Zuständen, selbst wenn das Soma von anderen Zellen und dem Muskel isoliert wird (konditioneller Burster). Es ist bisher unbekannt, welche Mechanismen für diese Wechsel verantwortlich sind.

Der Einfluss einer weiteren sensorischen Bahn im STNS wurde beschrieben (Nusbaum & Beenhakker, 2002; Beenhakker et al., 2004), nämlich der des dorsalen posterioren Ösophagealnervs (*dpon*). Elektrische Stimulation dieses Nervs beeinflusst sehr stark die Rhythmen des STGs. Der *dpon* innerviert den Magensack, sowie pylorische und gastrische Regionen des Vorderdarms und enthält sowohl Axone von Motoneuronen und sensorischen Neuronen (Maynard & Dando, 1974). Kein STG-Neuron projiziert durch diesen Nerv. Wiederholte Stimulation des *dpons* (1-2 Minuten insgesamt) aktiviert einen lang anhaltenden (bis 45 Minuten) gastrischen Rhythmus und moduliert den pylorischen Rhythmus. Der relevante sensorische Apparat ist in einem Stück der Magenwand lokalisiert, welches zur gastrischen Mühle gehört. Mechanische Reize dieser Magenregion lösen die gleichen Reaktionen im STNS aus wie eine elektrische Reizung des *dpons* (Beenhakker et al., 2004). Dieser gastrische Rhythmus gleicht dem gastrischen Rhythmus, der durch eine Ko-Aktivierung von MCN1 und CPN2 ausgelöst wird (Blitz & Nusbaum, 1997; Beenhakker et al., 2000). Die Aktivitäten dieser beiden Projektionsneurone sind notwendig und hinreichend für die Effekte des *dpon* auf die STG Netzwerke (Beenhakker et al., 2004).

4. Experimentelles.

Verwendet wurden in meinen Studien hauptsächlich Standardmethoden der Neurobiologie, besonders der Elektrophysiologie und (Rezeptor-)Pharmakologie, sowie die Modellierung neuronaler Netze. Details sind den jeweiligen Publikationen (im Anhang) zu entnehmen. In Kürze: Neuronale Aktivitäten wurden sowohl mit extrazellulären als auch mit intrazellulären Ableitungen aufgezeichnet. Für extrazelluläre Ableitungen wurden entweder Hakenelektroden (bei Stabheuschrecken), Cuff-Elektroden (bei Untersuchungen an intakten Krebsen) oder Drahtableitungen mit Vaseline-Abdichtung (bei Experimenten am isolierten stomatogastrischen Nervensystem) verwendet. Intrazelluläre Ableitungen wurden mit scharfen Glasmikroelektroden durchgeführt. Diese wurden entweder unter visueller Kontrolle in die Zellkörper der Neurone eingebracht (Krebse) oder in das Neuropil (Stabheuschrecken) eingestochen. Weiterhin verwendet wurden Methoden zur selektiven Färbung von Neuronen oder Neuronenclustern. Hierzu wurden entweder Backfills von Nerven angefertigt oder Einzelneurone durch intrazelluläre Injektion von Fluoreszensfarbstoffen gefüllt. Die Versuche wurden an weiblichen Stabheuschrecken der Art Cuniculina impigra durchgeführt. Weiterhin verwendet wurden beide Geschlechter der Krebsarten Cancer borealis und pagurus. In Untersuchungen mit Modellierung neuronaler Netzwerke wurde madSim verwendet, ein Tool zur Simulation einzelner Neurone und kleiner Netzwerke. MadSim wurde in Zusammenarbeit mit W. Mader (Universität Ulm) entwickelt und den jeweiligen Anforderungen der aktuellen Fragestellung angepasst. Zur Rückkopplung computerberechneter Signale an das Nervensystem wurden selbstprogrammierte Skripte in Spike2 (Version 5, CED, UK) verwendet. Die Auswertung der Elektrophysiologiedaten wurde ebenfalls mit selbstentwickelten Skripten durchgeführt. Individuelle Skripte sind unter www.neurobiologie.de erhältlich.

Meine eigenständigen Projekte habe ich nach Abschluss meiner Doktorarbeit entworfen. Zunächst habe ich in mehreren Projekten als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universitäten Ulm und Bielefeld meine Forschung zur Untersuchung neuronaler Verarbeitung im Nervensystem der Stabheuschrecke begonnen. Nach Abschluss dieser Arbeiten wechselte ich als Post-Doc an die medizinische Fakultät der University of Pennsylvania in Philadelphia, USA. Dort begann ich meine Forschung am stomatogastrischen Nervensystem. Nach meiner Rückkehr nach Deutschland habe ich mit beiden Systemen weitergearbeitet und dabei meine eigene Arbeitsgruppe in der Abteilung Neurobiologie der Universität Ulm aufgebaut. Zurzeit beschäftigen sich zwei Doktorandinnen mit der Charakterisierung sensorischer bzw. zentraler Eingänge zum stomatogastrischen Nervensystem und ein Doktorand mit der Verarbeitung sensorischer Information im Femur-Tibia-Regelkreis der Stabheuschrecke. Seit 2001 wurden drei Diplomarbeiten und zwei Staatsexamensarbeiten erfolgreich in meiner Arbeitsgruppe beendet. Daraus resultierten fünf begutachtete Publikationen und über 15 Kurzveröffentlichungen und Vorträge. Unsere Arbeit wird zurzeit durch eine Einzelförderung der DFG (DFG-STE 937/2-2) gefördert. 2003 erhielten wir eine Anfangsförderung der Universität Ulm.

Im Anschuss soll nun eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse meiner Forschung dargestellt werden. Details können den angefügten Originalpublikationen entnommen werden. Ergänzt wird die Darstellung durch bisher unveröffentlichte bzw. nur als Poster vorgestellten Daten.

5. Sensorische Aktivität und ihr Einfluss auf das Nervensystem.

5.1. Vibrationssensitive Neurone im femoralen Chordotonalorgan der Stabheuschrecke.

Informationen über die Umwelt werden über sensorische Neurone (Afferenzen) wahrgenommen. Dabei wird zwischen Afferenzen unterschieden, die auf äußere Reize reagieren und solchen, die interne Zustände des Körpers messen. Die letzteren werden Propriozeptoren genannt. In der Stabheuschrecke wird die Stellung des Kniegelenkes durch solche Propriozeptoren gemessen. Es soll hier als Beispiel dafür dienen, dass es wichtig ist, die Funktion und die Aktivierung eines Sinnesorgans zu beschreiben, um seinen Einfluss auf das Zentralnervensystem zu charakterisieren. Das femorale Chordotonalorgan (fCO) misst die Position des Unterschenkels (der Tibia) und die Geschwindigkeit von Tibiabewegungen (Bässler, 1965; Hofmann et al., 1985). In der ersten Arbeit, die ich hier vorstelle (Stein & Sauer, 1999), wurde die Funktion eben dieses Sinnesorgans untersucht. Das fCO meldet die genannten Informationen die Tibia betreffend an das Zentralnervensystem (Büschges, 1989; 1990). Im Bein der Stabheuschrecke besteht das fCO aus einem ventralen Skoloparium mit ungefähr 80 Sinneszellen und einem dorsalen Skoloparium mit 420 Sinneszellen (Füller & Ernst, 1973; Kittmann & Schmitz, 1992). Die Sinneszellen im ventralen Skoloparium kodieren entweder die Position, die Geschwindigkeit, die Beschleunigung einer Tibiabewegung oder eine Kombination zweier dieser Parameter (Büschges, 1994). Traditionsgemäß wurde für diese Untersuchungen die Sehne des fCOs mit rampenförmigen Reizen bewegt. Die Beschleunigungen, die bei solchen Reizen auftreten, sind begrenzt auf die Zeiten des Rampenbeginns und des Rampenendes. Beschleunigungen bis maximal 2*10²m*s⁻² wurden getestet. Dies entspricht in Gelenkwinkeln gemessen 2*10⁷°*s⁻² und somit einer extrem abrupt beginnenden bzw. endenden Bewegung, die im intakten Tier aufgrund von Trägheiten und Elastizitäten kaum erreicht werden dürfte. Eine große Anzahl der sensorischen Neurone zeigte allerdings eine Antwort, die von der Beschleunigung des Reizes abhing. Wozu nun diese Sensitivität für hohe Beschleunigungen? Erste Hinweise auf eine weitere Funktion des fCOs zeigten sich bei Wanderheuschrecken (Field & Pflüger, 1989). Hier wurde eine mögliche Sensitivität des fCOs für Vibrationsreize erwähnt. Experimente, in denen neben rampenförmigen fCO-Reizen auch Vibrationsreize getestet wurden (Stein & Sauer, 1999) zeigten, dass das fCO tatsächlich neben der bekannten Detektion von Position, Geschwindigkeit und Beschleunigung einer Tibiabewegung auch eine deutliche Vibrationssensitivität besitzt. Die benutzten Vibrationsreize waren sinusförmig und besaßen somit einen hohen Beschleunigungsanteil. Stimulusfrequenzen im Bereich von 10Hz bis maximal 4kHz wurden wahrgenommen. Die maximale Sensitivität lag dabei zwischen 200Hz und 800Hz. Intrazelluläre Ableitungen zeigten, dass auch einzelne Sinneszellen in diesen gesamten Frequenzbereichen antworteten - im Gegensatz zu einer möglichen Aufteilung des Frequenzspektrums auf mehrere Neurone. Die Antwort der Einzelzellen hing dabei sowohl von der Beschleunigung als auch von der Amplitude des Reizes ab. Alle klassischerweise als beschleunigungssensitiv eingestuften Sinneszellen zeigten eine deutliche Vibrationssensitivität. Interessanterweise waren in diesen Zellen bereits Beschleunigungen von unter 1m*s⁻¹ ausreichend, um eine erhöhte Spikeaktivität auszulösen. Stimulusamplituden von 1µm, entsprechend 0,1° Gelenkwinkeländerung, genügten, um eine Reaktion hervorzurufen. Dies stand im Gegensatz zu den fCO-Sinneszellen, die Position und/oder Geschwindigkeit kodierten. Die Schwelle dieser Sinneszellen lag mindestens um das fünfzigfache höher. Dies war ein deutlicher Beleg dafür, dass der adäquate Reiz für diese Sinneszellen nicht der Beginn einer großen Beinbewegung ist, sondern eine hochfrequente Vibration des Untergrundes mit kleiner Amplitude (wie sie z.B. ausgelöst wird durch die Bewegungen anderer Insekten in der natürlichen Umgebung der Tiere). Es zeigte sich daher also, dass das fCO nicht nur die klassische Funktion eines Gelenkstellungsmessers ausführt, sondern dass es das Tier auch mit Informationen über die Umgebung versorgt. Trotz seiner Propriozeptoreigenschaften agiert das fCO damit auch als Fernsinn, der mögliche Bewegungen anderer Tiere erkennt.

5.2. Verarbeitung sensorischer Information im Zentralnervensystem der Stabheuschrecke.

Wie wird nun die Information der fCO-Afferenzen im Zentralnervensystem verarbeitet? Für eine solche Studie genügt es weder, die Morphologie der neuronalen Bahnen zu kennen, noch die Verhaltensreaktion des Tiers zu beobachten. Es müssen sowohl einzelne sensorische Neurone als auch die nachgeschalteten verarbeitenden Neurone beobachtet bzw. manipuliert werden, um zu erkennen, welche Verarbeitungsmechanismen benutzt werden und wie Information übertragen wird. Mit diesem Thema beschäftigt sich sowohl die soeben bereits ausgeführte Arbeit als auch die beiden nächsten, die ich hier vorstellen möchte. Stein & Sauer (1999) und Stein & Schmitz (1999) charakterisierten die Modulation der sensorischen Information innerhalb sensorischer Neurone, während Sauer & Stein (1999) die weitere Verarbeitung dieser Information aufzeigten. Bevor die Information der fCO-Afferenzen die nachgeschalteten Interneurone erreicht, wird sie durch präsynaptische Inhibition der afferenten Terminalen verändert (Sauer et al., 1997). Solche präsynaptischen Modulationen des sensorischen Eingangs sind in vielen Systemen bekannt (z.B. Wanderheuschrecke: Burrows & Laurent, 1993; Matheson, 1997; Flusskrebs: Sillar & Skorupski, 1986; Cattaert et al., 1992; Schabe: Blagburn & Sattelle, 1987) und haben bedeutende Auswirkungen auf die motoneuronale Aktivität und damit auch auf das Verhalten. Es werden ihnen verschiedene Funktionen zugeordnet, so z.B. könnte eine präsynaptische Inhibition als automatische Verstärkungskontrolle des Sinnesorgans dienen (Burrows, 1996). Weiterhin wird vermutet, dass sie dazu dienen, irrelevante sensorische Informationen zu unterdrücken, während unvorhergesehene Ereignisse unbeeinflusst bleiben (Wolf & Burrows, 1995). In der Stab- und Wanderheuschrecke werden diese präsynaptischen Eingänge von GABA-ergen Chloridströmen getragen. Diese depolarisieren zwar die Zelle ("primary afferent Depolarisation", PAD), reduzieren aber durch einen Kurzschluss der Membran die Amplitude der Aktionspotentiale kurz vor der Ausgangssynapse und damit auch die ausgeschüttete Transmittermenge. Achtzig Prozent der vibrationssensitiven sensorischen Neurone erhielten präsynaptische Eingänge, die durch die Aktivität anderer fCO-Afferenzen ausgelöst wurden (Stein & Sauer, 1999). Im Falle von Vibrationsreizen hing die Amplitude der präsynaptischen Depolarisation dabei von der Stimulusfrequenz und –amplitude der fCO-Reize ab. In einigen Fällen konnte sogar nach jedem Aktionspotential der sensorischen Zelle einzelne Depolarisationen beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Sinneszelle sich selbst hemmt. Diese Hemmung erfolgte indirekt über zwischengeschaltete Interneurone, da die mit mehr 2ms gemessene Latenz zwischen Aktionspotential und Depolarisation zu groß war für eine monosynaptische Verbindung. Ein solcher hemmender Einfluss eines Sinnesorgans auf sich selbst kann eine Sättigung der Aktivität der sensorischen und der nachgeschalteten Neurone vermeiden und damit den dynamischen Bereich einer Sinneswahrnehmung vergrößern.

Stein & Schmitz (1999) zeigten nun, dass präsynaptische Hemmung nicht nur innerhalb desselben Sinnesorgans auftritt, sondern auch zwischen verschiedenen Sinnesorganen. Die Afferenzen des fCOs werden präsynaptisch gehemmt, sowohl von den Campaniformen Sensillen, die die Belastung des Femurs messen (fCS), als auch von coxalen Haarsinneszellen (cxHPv), die eine Vorwärtsbewegung des Beins feststellen. Es zeigte sich eine Depolarisation der fCO-Terminalen, die in Abhängigkeit von der Reizrichtung auftrat. Diese Depolarisation hatte ein Umkehrpotential von -59mV, was nur knapp über dem durchschnittlichen Ruhepotential der fCO-Afferenzen von -63mV lag. Die Depolarisationen lösten eine Zunahme der Membranleitfähigkeit aus und verringerten gleichzeitig die Aktionspotentialamplitude. Sie hatten daher inhibitorischen Charakter. Ein entsprechendes Ergebnis zeigte sich auch in den Terminalen der Campaniformen Sensillen. Diese verursachten nicht nur eine präsynaptische Hemmung der fCO-Afferenzen, sondern wurden von diesen auch präsynaptisch inhibiert. Zwei Sinnesorgane zeigten daher also eine gegenseitige inhibitorische Modulation ihrer Ausgänge. Eine solche neuronale Interaktion könnte den bereits postulierten Rückkopplungsschleifen zur Belastungsreduzierung des Insektenbeins zugrunde liegen (Schmitz, 1993). Die neuronalen Modulationsmöglichkeiten sensorischer Information scheinen daher ebenso komplex zu sein wie die der Vertebraten.

Während spontaner Bewegungen könnten PADs die Efferenzkopie darstellen, die dem Zentralnervensystem erlaubt, hauptsächlich die Abweichung zwischen vorgegebener und tatsächlich ausgeführter Bewegung zu detektieren (Wolf & Burrows, 1995; Zusammenfassung siehe z.B. Clarac & Cattaert, 1996). Auch in der Stabheuschrecke scheinen solche zentral generierte PADs vorhanden zu sein (Stein, Sauer unveröffentlichte Daten). Dies zeigt sich, wenn das Membranpotential von fCO-Afferenzen bei festgelegter fCO-Rezeptorsehne beobachtet wird. In diesem Fall zeigen fCO Afferenzen nur ihre Spontanaktivität oder produzieren keine Aktionspotentiale, da die Rezeptorsehne

nicht bewegt werden kann (Abb. 10, Pfeil). Wenn nun zusätzlich das Tier aktiviert wird, z.B. durch taktile Reizung des Abdomens, zeigen sich PADs immer dann, wenn Ko-Kontraktionen des Extensorund Flexormuskels auftreten.



Abb. 10. Präsynaptische Inhibition in einem vibrationssensitiven sensorischen Neuron des fCO. Das 1. PAD (Pfeil) wurde ausgelöst nach taktiler Reizung des Abdomens. Die mittlere Spur zeigt die motoneuronale Aktivität der Extensor-Motoneurone SETi und FETi anhand einer extrazellulären Ableitung des F2-Nerven. Die unterste Spur zeigt, wann ein Vibrationsreiz appliziert wurde. Es wird nicht die volle Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt.

Diese Art von Ko-Kontraktionen wurde von Pflüger (1976) als "twitching" bezeichnet. Dieses Verhalten wird zentral generiert und tritt ohne propriozeptive Rückmeldungen auf. Nichtsdestotrotz könnten Sinnesorgane in der Peripherie diese PADs auslösen. Zum Beispiel könnten die fCS durch die Kontraktion des Flexor- und Extensormuskels eine erhöhte Belastung des Femurs messen und somit aktiv werden. Dies hätte dann zur Folge, dass durch die fCS-Aktivierung PADs in den fCO-Afferenzen entstehen (siehe oben). Um sicherzustellen, dass die PADs in diesen Experimenten tatsächlich durch ein Kommando des Zentralnervensystems ausgelöst wurden und nicht durch andere Sinnesorgane in der Peripherie, wurden alle efferenten Nerven, die Muskeln versorgen, durchtrennt. Da das Tier festgelegt war, wurde damit verhindert, dass während des twitching andere Sinnesorgane indirekt aktiviert werden. In der Abwesenheit der Aktivität aller Sinnesorgane zeigten sich trotzdem PADs bei Ko-Kontraktionen der Extensor- und Flexormuskeln (Abb. 10).

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild: Die Mechanismen, die der Verarbeitung sensorischer Information unterliegen, können anhand von detaillierten elektrophysiologischen Experimenten charakterisiert werden. Intrazelluläre Ableitungen von sensorischen Neuronen zeigten, dass selbst innerhalb der Sinneszellen bereits eine Veränderung der perzipierten Information stattfindet. Diese Modulation findet präsynaptisch in der Terminale des Axons der Sinneszelle statt. Durch einen Kurzschluss der Membran wird die Aktionspotentialamplitude verringert und somit auch die Auswirkung der Sinneszelle auf die nachgeschalteten Neurone. Die präsynaptische Hemmung wird 1. durch eine Aktivität des eigenen Sinnesorgans, 2. durch eine Aktivität anderer Sinnesorgane und 3. durch das Zentralnervensystem ausgelöst. Somit könnten mehrere Funktionen durch den gleichen Modulationsmechanismus bedient werden: Eine dynamische Anpassung der sensorischen Wahrnehmung (1.), eine Korrektur der Körperhaltung (2.) und eine selektive Wahrnehmung sensorischer Information bei geplanten Bewegungen (3.).

Die oben genannten Arbeiten zeigten, dass das fCO dem Zentralnervensystem verschiedene Informationen mitteilt. Zum Einen wird die Position und die Geschwindigkeit einer Tibiabewegung gemeldet, zum Anderen eine Vibration des Substrats. Wie werden diese Sinnesinformationen in den dem fCO nachgeschalteten Neuronen verarbeitet? Existieren getrennte Verarbeitungswege oder konvergiert die sensorische Information auf die gleichen Neurone? Sauer & Stein (1999) untersuchten hierzu die weitere Verarbeitung von Vibrationsinformation im Vergleich zur Verarbeitung von Bewegungsinformation.

Position- und Geschwindigkeitsinformationen werden von einem gut charakterisierten neuronalen Netzwerk aus nichtspikenden Interneuronen verarbeitet (Büschges, 1990; Stein & Sauer, 1998) und lösen Widerstandreflexe in den tibialen Motoneuronen aus. Der Einfluss von Vibrationsreizen auf die motoneuronale Aktivität und die dafür verantwortlichen Interneurone hingegen war unbekannt. Vibrationsreize am fCO erregten sowohl die Extensor- als auch die Flexormotoneurone und verursachten damit Ko-Kontraktionen in diesen Muskeln. Die Antwort der Motoneurone zeigte eine schnelle Adaptation. Ein erster Hinweis auf eine getrennte Verarbeitung von Vibrations- und Tibia-Bewegungsinformation ergab sich daraus, dass diese Adaptation der motoneuronalen Aktivität keinen Einfluss hatte auf die Antwort der Motoneurone auf Rampenreize (Tibiabewegungen). Die Antworten der Extensor-Motoneurone bei Tibiabewegungen blieb unverändert, selbst wenn die Tibia zusätzlich für lange Zeit einem Vibrationsreiz ausgesetzt war. Es scheinen daher getrennte Wege für die Verarbeitung der verschiedenen sensorischen Informationen des fCOs zu existieren. Ableitungen von prämotorischen Interneuronen (siehe Tabelle 2) zeigten allerdings, dass sehr wohl neuronale Bahnen existieren, die beide Sinneseindrücke verarbeiten. Einige der bereits bekannten Interneurone, die sowohl Positions- als auch Geschwindigkeitsinformation des fCOs verarbeiten, zeigten auch eine deutliche Antwort bei Vibrationsreizen. Interessanterweise hatte diese Antwort in manchen Neuronen ein anderes Vorzeichen als die Antwort auf Tibiabewegungen. Dies unterstützt die Hypothese, dass Vibration und Bewegungsreize tatsächlich unterschiedliche Sinnesmodalitäten sind und die Beschleunigungs-/Vibrationssensitivität nicht, wie in früheren Studien angenommen, zur Detektion des Beginns einer Tibiabewegung dient.

Interneuron	Effect on extensor motoneuron	Effect of tibia flexion (fCO elongation)	Effect of vibration stimuli (maximal response)	Σ No. of records				
Identified non-spik	dentified non-spiking interneurons [‡]							
E1	Excitatory	Depol.	Depol. $(+)$	2				
E2	Excitatory	Depol.	?	0				
E3	Excitatory	Depol.	Depol. $(-, 1^*)/no$ effect (3)	4				
E4	Excitatory	Depol.	Depol. (+)	4				
E5/E6	Excitatory	Depol.	Depol. (+)	5				
E7	Excitatory	Hyperpol.	Depol. $(+)$	2				
E8	Excitatory	Depol.	no effect	1				
I1	Inhibitory	Hyperpol.	Depol. (–)	2				
12	Inhibitory	Depol.	Depol. $(+)$	2				
I4	Inhibitory	Depol.	Depol. (+)	5				
Non-identified non	n-spiking interneurons [†]							
Group 1	No effect	Depol. (7)/Hyerpol. (4)	Depol. (5)/Hyperpol (3)/no effect (3)	11				
Group 2	No effect	No effect	Depol. (1)/Hyerpol. (1)	2				
Non-identified spik	king interneurons [†]							
Group 1	Excitatory (27)/inhibitory (14)	Depol. (26)/Hyperpol.	Depol. (28)/Hyerpol.	41				
Group 2	No effect	Depol. (16)/Hyperpol. (4)	Depol. (12)/Hyperpol. (6)/no effect (2)	20				
Group 3	No effect	No effect	Depol. (4)/Hyperpol. (1)	5				

-Response smaller than during ramp-and-hold stimuli, + response greater or equal; *the figure in parentheses indicates the number of records * After Büschges (1990), Sauer et al. (1996), Stein and Sauer (1998) * Grouped according to their synaptic drive onto the extensor motoneurons and their response to ramp-and-hold stimuli

Tabelle 2.	Synaptische	Eingänge	der	nichtspikenden	Interneurone	während	Vibrationsreizen	und
rampenförn	niger Stimula	tion des fC	O . A	us: Sauer & Stei	n (1999).			

Zusätzlich konnten wir prämotorische Interneurone charakterisieren, die ausschließlich Vibration, nicht aber Positionsund Geschwindigkeitsinformation verarbeiteten und somit nur Vibrationsinformation an die Motoneurone weiterleiteten. Die neuronalen Bahnen, die beide Sinneseindrücke verarbeiten, sind also nur teilweise identisch. Teile des bekannten neuronalen Netzwerks, das Tibiabewegungen verarbeitet, sind auch an der Verrechnung von Vibrationsreizen beteiligt. Einige der identifizierten nichtspikenden Interneurone wurden sowohl von Vibrations- als auch von Tibiabewegungen erregt (Tabelle 2). Bei genauerer Betrachtung der neuronalen Antworten zeigte sich, dass die Interneurone in drei Klassen unterteilt werden können (Abb. 11): 1. Neurone, die hauptsächlich auf Tibiabewegungen mit großer Amplitude antworten. In diesen Neuronen lösten Vibrationsreize keine oder nur eine sehr schwache Antwort aus. 2. Neurone, die exklusiv auf Vibrationsreize reagierten, und nicht auf Rampenreize. 3. Neurone, die eine deutliche Reaktion auf beide Stimulusklassen zeigten. In der letzten Gruppe befinden sich unter anderen die nichtspikenden Interneurone E4 und I4. Diese beiden Interneurone beeinflussen nicht nur die Motoneurone des Femur-Tibia-Gelenks, sondern auch die benachbarter Gelenke (Büschges et al., 1994). Außerdem sind sie an der Vermittlung kontralateraler Beinbewegungsinformation beteiligt (Stein et al., 2006a) und können im laufenden Tier das Umschalten zwischen Schwing- und Stemmphase (und umgekehrt) auslösen (Bässler et al., 2003). Zusammen mit der Tatsache, dass diese Neurone auch die zwei Sinnesmodalitäten Vibration und Tibiabewegung perzipieren, erscheint es wahrscheinlich, dass die Hauptfunktion dieser Neuronengruppe eher eine Vermittlung von sensorischer Information zwischen verschiedenen Gelenken bzw. Beinen ist, und nicht das Auslösen eines Widerstandsreflexes. Dies führte zu einer Neuinterpretation des dem Widerstandsreflex zugrunde liegenden Netzwerks.



Abb. 11. Darstellung der neuronalen Verarbeitung von sensorischer Information des fCO. Positionsund geschwindigkeitssensitive Afferenzen erregen direkt bzw. hemmen indirekt (gestrichelte Linie) nachgeschaltete spikende und nichtspikende Interneurone. I Neurone dieser Gruppe verarbeiten ausschließlich Positions- und Geschwindigkeitsinformation (vergleiche Büschges, 1989; 1990; Sauer et al., 1995; 1996). II Neurone dieser Gruppe verarbeiten sowohl Vibrations- als auch Positions- und Geschwindigkeitsreize. In dieser Gruppe befinden sich Neurone, die auch sensorische Information anderer Beingelenke bzw. anderer Beine verarbeiten. III Die letzte Gruppe erhält ausschließlich Vibrationsinformation vom fCO. Aus: Sauer & Stein (1999).

Es kann daher gefolgert werden, dass neuronale Netzwerke je nach Verhaltenskontext mehrere Funktionen ausüben können. Dies zeigt sich z.B. auch, wenn man den Einfluss sensorischer Information anderer Beine untersucht. Stein et al. (2006a) zeigten, dass das neuronale Netzwerk des Femur-Tibia-Regelkreises auch die sensorische Information über Tibiabewegungen anderer Beine verarbeitet. Untersucht wurde dies durch Reizung des fCOs des rechten Mittelbeins mit rampenförmigen Reizen, während die Reaktion der Femur-Tibia-Regelkreise der anderen Beine beobachtet wurde. Im inaktiven, stehenden Tier konnte keine Reaktion gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich im aktivierten Tier, dass fCO-Reize ein Umschalten von starker Extensorzu starker Flexoraktivität und umgekehrt im kontralateralen Mittelbein auslösen konnten. Um die neuronalen Bahnen aufzuzeigen, die diesen Effekten zugrunde liegen, wurde Picrotoxin, ein Blocker GABA-erger Inhibition, appliziert. Picrotoxin reduziert die GABA-erge Hemmung im gesamten thorakalen Nervensystem - ein Zustand, der bei Beginn des Laufens eines Tieres wahrscheinlich nicht vorkommt. Wir nutzten diese exzessive Verringerung der Inhibition als Werkzeug, um aktive, möglicherweise erregende, Verbindungen zwischen den Gelenkstellungsregelkreisen verschiedener Beine zu zeigen. In unbehandelten Tieren ist es wahrscheinlicher, dass anstatt einer massiven Unterdrückung von Inhibition spezifisch bestimmte inhibitorische Bahnen unterdrückt werden,

während erregende verstärkt werden. Solche Effekte könnten durch Einflüsse von höheren Zentren im Zentralnervensystem ausgelöst werden. Das Resultat allerdings wäre das gleiche wie bei einer Picrotoxin-Applikation, nämlich, dass die Gewichtung von Erregung und Hemmung zu einem stärkeren Einfluss von erregenden Bahnen führt.

Wenn Picrotoxin anwesend war, zeigten die Tibia-Motoneurone aller Beine spezifische Antworten auf eine Reizung des fCOs des rechten Mittelbeins. Für das Mittelbein konnten wir dabei zeigen, dass die Positions- und Bewegungsinformation des kontralateralen fCOs von den oben genannten identifizierten nichtspikenden Interneuronen verarbeitet wurde, die auch von den Signalen des lokalen fCOs beeinflusst werden und zur Haltungs- und Bewegungskontrolle des Beins beitragen. Die Interneurone erhielten sowohl erregende als auch hemmende Eingänge, so dass manche dieser Neurone den motoneuronalen Ausgang unterstützten, während andere ihm widersprachen. Dieses antagonistische Verhalten kennt man bereits aus der Verarbeitung lokaler fCO-Information (parlamentarisches Prinzip; Bässler, 1993). Die Interneurone E4 und I4 hoben sich auch hier dadurch hervor, dass ihre Reaktion auf kontralaterale Reizung immer größer war als die auf Reizung des lokalen fCOs. Unsere Ergebnisse zeigen daher, dass auf Ebene der prämotorischen nichtspikenden Interneurone eine Interaktion zwischen lokalen sensorischen Signalen und derer von anderen Beinen stattfindet. Einigen der nichtspikenden Interneurone (E4, I4) scheint dabei eine besondere Rolle beim Erfassen der Sinnesinformation anderer Beine und Gelenke zuzukommen. Eine Interaktion der lokalen Sinnesorgane und der Kontrollsysteme anderer Beine ist erforderlich für die Koordination der Beine bei aktiven Beinbewegungen, wie z.B. beim Laufen oder Schwingen (Rocking) (Bässler & Wegner, 1983; Ludwar et al., 2005; Pflüger, 1977; Cruse, 1990).

Dass Interaktionen zwischen verschiedenen Sinnesorganen nicht ausschließlich auf Ebene der Interneurone geschehen, zeigte die nächste Arbeit, die ich hier vorstellen möchte. Schmitz & Stein (2000) zeigten, dass zwei verschiedene Stimulusmodalitäten auch auf Ebene der Motoneurone verrechnet werden. Dazu wurden einerseits die belastungssensitiven trochanter-femoralen Campaniformen Sensillen (CS) gereizt und andererseits das positions- und bewegungssensitive ventrale Haarsinnesfeld der Coxa. Alleinige Stimulation des Haarfeldes, welches Bewegungen des Beins in anteriorer bzw. posteriorer Richtung signalisiert, bzw. der CS, welche Belastungen des Beins messen, lösen Widerstandsreflexe in den Retraktor- bzw. Protraktormotoneuronen eines stehenden Tieres aus. Bei gleichzeitiger Applikation beider Reize zeigte die motoneuronale Aktivität eine nichtlineare Überlagerung beider Signale. Die Reflexantwort hing vom Vorzeichen und der Stärke des jeweilig anderen Reizes ab. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Belastungsinformation der CS als Kraftkontrollmechanismus eines Einzelbeins dient, was wiederum die Kraftverteilung im sechsbeinigen System der Stabheuschrecke optimieren könnte.

Sensorische Information beider Sinnesmodalitäten erregte direkt bzw. hemmte indirekt die Motoneurone des Protraktor-/Retraktorsystem. Die Information verschiedener Sinnesorgane konvergiert daher auch auf Ebene der Motoneurone und wird nicht vollständig auf interneuronaler Ebene verarbeitet. Dies zeigt die Bedeutung der motoneuronalen Membran für die Verrechnung verschiedener sensorischer Eingänge.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Verarbeitung sensorischer Information auf mehreren Ebenen des Zentralnervensystems geschieht. Sensorische Information unterschiedlicher Sinnesorgane konvergiert bereits auf Ebene der sensorischen Neurone in Form von präsynaptischer Inhibition, während auf Ebene der lokalen Interneurone auch die Verarbeitung von Sinneseindrücken weiter entfernterer Bereiche des Körpers stattfindet. Letztlich erreichen verschiedenste sensorische Eingänge selbst die motoneuronale Membran, so dass die ultimative Aktivität der Motoneurone, und damit auch das Verhalten, von einer verteilten Verrechnung sensorischer Information abhängt. vielfältigen Verarbeitungsschritten Entsprechend den ergeben sich zahlreiche Modulationsmöglichkeiten, so dass die zugrunde liegenden neuronalen Netzwerke in Abhängigkeit vom jeweiligen (Verhaltens-)Kontext verschiedenen Funktionen dienen können.

5.3. Das Femur-Tibia-Kontrollsystem als multifunktionelles Netzwerk.

Als Beispiel für die Verwendung solch multifunktioneller Netzwerke in verschiedenen Verhaltenszuständen kann ebenfalls das Regelsystem des Femur-Tibia-Gelenks dienen. Frühere Studien (Büschges, 1990; Stein & Sauer, 1998; Driesang & Büschges, 1996; Kittman et al., 1996) zeigten, dass sowohl für aktive Beinbewegungen, wie sie z.B. beim Laufen vorkommen, als auch bei der Gelenkstellungskontrolle im stehenden Tier (Widerstandsreflexe) das gleiche Set an Interneuronen die sensorische Information des fCOs verarbeitet und an die Motoneurone des Femur-Tibia-Gelenksystems weiterleitet. Der motoneuronale Ausgang zeigt in beiden Situationen aber gegensätzliche Aktivitäten: Während im stehenden Tier Widerstandsreflexe die Gelenkstellung stabilisieren, unterstützt die motoneuronale Aktivität im aktiven Tier bereits vorhandene Beinbewegungen. Hier kommt es zu einer Reflexumkehr, der so genannten "aktiven Reaktion" (Bässler, 1976). Beide Zustände können anhand der Aktivität des Extensormotoneurons SETi (Slow Extensor Tibiae Motoneuron) während einer rampenförmigen Beugung des Beins definiert werden. Obwohl gezeigt wurde, dass die gleichen Interneurone an der Generierung beider Zustände beteiligt sind, kann aufgrund der experimentellen Beschränkungen bei elektrophysiologischen Ableitungen nicht geklärt werden, ob die gefundenen neuronalen Verschaltungen hinreichend sind, um die motoneuronale Aktivität beider Zustände zu erzeugen und zwischen ihnen umzuschalten. So ist zum zusätzliche Beispiel unklar, ob Neurone (von mehreren Tausend vorhandenen im Zentralnervensystem) benötigt werden, um verschiedene Verhaltenszustände zu generieren. In der nächsten Arbeit, die ich vorstellen möchte (Straub et al., 2004), haben wir daher eine Computersimulation des neuronalen Netzwerks des Femur-Tibia-Regelkreises benutzt, um diese Frage zu klären.

Das Netzwerk entsprach in seiner Topologie einer erweiterten Version von Sauer et al. (1996). Alle aus physiologischen Experimenten (Büschges, 1990; Stein & Sauer, 1998; Akay, 2002) bekannten Verschaltungen und Neuronentypen wurden implementiert (Abb. 12). Als Simulationumgebung nutzten wir madSim, ein Tool zur Modellierung neuronaler Netzwerke. In madSim werden Neurone als Soma mit drei unverzweigten dendritischen Kompartimenten simuliert. Die aktiven und passiven Eigenschaften werden mit Hodgkin-Huxley Gleichungen (Hodgkin & Huxley, 1952) berechnet und sind somit realitätsnah modelliert.

Die sensorische Information des fCOs wurde implementiert, indem die sensorischen Neurone separat über definierte Strominjektionen aktiviert wurden und so entweder die Tibiaposition oder ihre Geschwindigkeit an die nachgeschalteten Interneurone leitete. Die Strominjektionen wurden dabei so dimensioniert, dass die Kennlinien der resultierenden afferenten Aktivität der geschwindigkeits- und positionssensitiven Neurone den im Tier gemessenen Daten entsprachen (Büschges, 1994). Sechzehn parallele Informationswege, die die erregenden (E-Typen) und hemmenden (I-Typen) nichtspikenden Interneuronen repräsentieren, verarbeiteten die fCO-Information (Abb. 12). Geschwindigkeits- und Positionsinformation wurde dabei von den verschiedenen Interneurontypen unterschiedlich stark gewichtet. Der Membranpotentialverlauf der Interneurone basierte dabei auf Büschges (1990), Stein & Sauer (1998) und Akay (2002). Die verteilt verarbeitete Information konvergierte dann auf das Extensormotoneuron SETi, welches dann das motorische Kommando in Form von Aktionspotentialen generierte.



Abb. 12. Aufbau des neuronalen Netzwerks des Femur-Tibia-Kontrollsystems (Extensorteil). Der Pfeil deutet die Richtung des Informationsflusses an. Kleine Pfeile: Strominjektionen. Verändert nach Straub et al., 2004.

Sauer et al. (1996) zeigten, dass dieses Netzwerk hinreichend für die Generierung von Widerstandsreflexen ist. Driesang & Büschges (1996) postulierten, dass das gleiche Netzwerk auch der aktiven Reaktion, also einer Reflexumkehr, zugrunde liegen könnte, und zwar durch eine unterschiedliche Gewichtung von Positions- und Geschwindigkeitsinformation auf Ebene der nichtspikenden Interneurone. Wir testeten diese Hypothese, indem wir verschiedene Fragen an unser Modell stellten: 1. Kann das neuronale Netzwerk bei gleicher Topologie, aber unterschiedlicher Gewichtung der 16 interneuronalen Bahnen die motoneuronale Antwort einer aktiven Reaktion generieren? 2. Falls dies zutrifft, können Aussagen über die Wichtigkeit der einzelnen Bahnen getroffen werden für das jeweilige Verhalten (Widerstandsreflex oder aktive Reaktion)? Diese beiden Fragen wurden in Straub et al. (2004) beantwortet. 3. Sind die in den Experimenten von Driesang & Büschges (1996) gefundenen Veränderungen der Membranpotentialverläufe einzelner Interneurone hinreichend um die Reflexumkehr auszulösen? Die letzte Frage möchte ich anhand von bisher unveröffentlichen Daten beantworten.

1. Um zu testen, ob das vorhandene Netzwerk generell in der Lage ist, die motoneuronalen Aktivitäten von Widerstandsreflex und aktiver Reaktion trotz gleich bleibender Topologie und gleich bleibendem sensorischen Eingang zu erzeugen, benutzten Straub et al. (2004) einen "exhaustive Search" Ansatz (brute force). Durch eine unabhängige Iteration der Übertragungsstärke zwischen Interneuronen und Motoneuronen (Abb. 13) entstand damit eine Datenbank von 43.046.721 motorischen Ausgängen. Es wurden jeweils drei Synapsenstärken pro Interneurontyp getestet (5 nS, 50 nS, 400 nS). Um die Berechnung dieser Datenbank zu beschleunigen, wurden alle von der Iteration nicht betroffenen Netzwerkaktivitäten nur ein einziges Mal berechnet und die Ergebnisse gespeichert und in allen Iterationen ohne Neuberechnung verwendet. Dies reduzierte die Rechenzeit von 175 Tagen auf 6 Tage.



Abb. 13. Variationen der synaptischen Übertragungsstärken zwischen nichtspikenden Interneuronen (NSI) und dem Motoneuron SETi. Drei Übertragungsstärken pro NSI wurden getestet. Aus: Straub (2006).

Der motorische Ausgang tendiert dazu, über einen weiten Parameterbereich stabil zu bleiben, kann aber zu gewissen Zeiten selbst bei kleinen Parameterveränderungen abrupt in ein anderes motorisches Muster umschlagen. Methoden, die die Größe der resultierenden Datenbank durch systematische Parameterauswahl verringern, wie z.B. "error back propagation" oder "simulated annealing", würden die Wahrscheinlichkeit erhöhen, Netzwerkergebnisse zu übersehen und waren daher ungeeignet. Ein weiteres Argument gegen den Einsatz dieser Suchmethoden war, dass wir die Fähigkeiten des Netzwerks ohne vorgegebenes Ziel untersuchen wollten.

Zwei verschiedene Methoden wurden benutzt, um die motorischen Aktivitäten der gesamten Datenbank anhand der Spikeaktivität zu klassifizieren und im Anschluss nach sinnvollen motorischen Mustern zu durchsuchen. Für eine stimulusabhängige Auswertung der Datenbank ermittelten wir zunächst aus den vorliegenden physiologischen Daten den gemittelten Verlauf der Spikeaktivitäten während eines ramp-and-hold Reizes bei einem Widerstandsreflex und bei einer aktiven Reaktion. Anschließend wurde die Datenbank anhand der Reizzeiten nach motorischen Aktivitäten durchsucht und jedes Ergebnis anhand seiner Ähnlichkeit mit Widerstandsreflex und aktiver Reaktion bewertet. Für eine stimulusunabhängige Auswertung der Datenbank (d.h. unabhängig vom Zeitpunkt des applizierten Reizes) wurden hingegen die Ergebnisse in tonische oder burstartige Aktivitäten aufgeteilt und nach Ähnlichkeiten mit Widerstandsreflex oder aktiver Reaktion durchsucht (unabhängig vom Zeitpunkt des applizierten Reizes).

Unsere Analyse zeigte, dass das vorliegende neuronale Netzwerk trotz unverändertem sensorischen Eingang die motorischen Aktivitäten des Widerstandsreflexes und der aktiven Reaktion generieren kann. Es zeigte sich ein breites Spektrum an möglichen motoneuronalen Antworten, das von einem optimalen Widerstandsreflex bis zu einer aktiven Reaktion reichte.

2. Es stellte sich heraus, dass die Gewichtung der unterschiedlichen interneuronalen Bahnen, die die sensorische Information integrieren, verantwortlich dafür war, welcher motorische Zustand generiert wurde. Bestimmte Kombinationen an Synapsenstärken traten bevorzugt bei Widerstandsreflexen auf, während andere sich bei aktiver Reaktion zeigten (Tabelle 3, fett markiert).

NSI	Wide	rstands	sreflex	Aktive Reaktion		
(Name)	5nS	50nS	400nS	5nS	50nS	400nS
1 (I4)	55	61	34	2	3	84
2 (E10)	97	53	0	3	3	83
3 (I2)	62	50	38	20	18	51
4 (IE1)	79	31	40	18	23	48
5 (I3)	79	52	19	29	26	34
6 (E6)	61	87	2	32	37	20
7 (E3)	83	65	2	30	51	8
8 (E4)	56	79	15	53	36	0
9 (E5)	69	78	3	54	35	0
10 (E2)	102	48	0	53	36	0
11 (E7)	122	28	0	51	38	0
12 (E8)	131	19	0	41	48	0
13 (E1)	44	58	48	48	41	0
14 (E9)	3	6	141	45	44	0
15 (I8)	2	3	145	48	33	8
16 (I1)	0	0	150	57	32	0



Tabelle 3. Häufigkeit des Auftretens synaptischer Übertragungsstärken der verschiedenen Interneurone während Widerstandsreflex und aktiver Reaktion. low: 5nS, med: 50nS, high: 400nS. Aus: Straub et al. (2004).



So hatte z.B. Interneuron I1 in allen Widerstandsreflex-Modellen eine Synapsenstärke von 400nS, während bei aktiven Reaktionen sich eher eine Präferenz für 5nS zeigte. Die Synapsenstärken anderer Interneurone hingegen zeigten keine Präferenz für Widerstandsreflex oder aktive Reaktion (z.B. I3). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Stärken einiger weniger interneuronalen Bahnen entscheiden, welcher motorische Ausgang produziert wird. Wir testeten die Hypothese, indem wir die Synapsenstärke all derer Interneurone, die bei Widerstandreflex bzw. aktiver Reaktion eine deutliche Präferenz für eine bestimmte Stärke zeigten (alle, die eine größere normalisierte Auftrittshäufigkeit als 0.6 hatten; Abb. 14, vertikale gestrichelte Linien), auf diesen Wert festsetzten und dann die Synapsenstärke aller anderen Interneurone iterierten. Es zeigte sich, dass allein das Setzen der Synapsenstärken dieser spezifischen Interneurone hinreichend war, um entweder einen Widerstandsreflex oder die aktive Reaktion auszulösen. Eine Vorhersage unserer Simulation ist also, dass nur bestimmte interneuronale Wege gestärkt bzw. abgeschwächt werden müssen, um zwischen stehendem und laufendem Tier umzuschalten.

3. Eine spezifisches Verstellen der Gewichtung interneuronaler Bahnen könnte im Tier durch die Veränderung der synaptischen Eingänge zu bestimmten Interneuronen realisiert sein (Driesang & Büschges, 1996). Um zu testen, ob diese Veränderungen tatsächlich hinreichend sind, um ein Umschalten zwischen Widerstandsreflex und aktiver Reaktion auszulösen, modellierten wir die Antwort dieser Interneurone auf ramp-and-hold Reize. Dies wurde durch Strominjektionen erreicht. Die motoneuronale Aktivität, die durch diese Modifikationen ausgelöst wurde, entsprach der einer aktiven Reaktion (Abb. 15).



Abb. 15. SETi-Membranpotential während eines ramp-and-hold Reizes mit 200°/s. Links: Das Ausgangsnetzwerk generierte einen Widerstandsreflex. Rechts: Wenn die synaptischen Eingänge der NSI so verändert wurden, dass sie denen während einer aktiven Reaktion entsprachen, wurde auch in SETi eine aktive Reaktion ausgelöst. Aus: Straub (2006).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass ein multifunktionelles neuronales Netzwerk der Generierung mehrerer Verhaltensweisen, Widerstandsreflex (Stehen) und aktive Reaktion (Laufen), zugrunde liegt. Das Umschalten zwischen beiden Zuständen wird ausgelöst durch eine spezifische Gewichtung interneuronaler Bahnen, welche es erlaubt, trotz gleich bleibender sensorischer Meldung den motoneuronalen Ausgang zu variieren. Sowohl bei Widerstandsreflex wie aktiver Reaktion wird die sensorische Information des fCOs verwendet. Im Falle der aktiven Reaktion dient der sensorische Eingang mitunter dazu, bei einer bestimmten Tibiaposition von einer starken Hemmung der Extensor-Motoneurone auf eine Erregung umzuschalten (Teil 1 zu Teil 2 der aktiven Reaktion; Bässler, 1988; Driesang & Büschges, 1996). Ein solches Umschalten könnte z.B. durch ein bistabiles System ausgelöst werden, das präsynaptisch zu den nichtspikenden Interneuronen liegt (Bässler & Koch, 1989) und als Relaxationsoszillator realisiert ist (Wang, 1999). Zur Zeit untersuchen wir die Mechanismen des Umschaltens zwischen Widerstandsreflex und aktiver Reaktion anhand von madSim-Simulationen (Stein et al., 2006c). Dabei stießen wir auf ein interessantes Problem: In einem reduzierten Modell des Femur-Tibia-Regelkreises, das mit einem bistabilen System nach den Daten von Bässler & Koch (1989) und Driesang & Büschges (1996) ausgestattet wurde (Abb. 16), konnte dieses zwar zwischen Widerstandsreflex und aktiver Reaktion abhängig.



Abb. 16. Reduziertes Modells zur Generierung der "Aktiven Reaktion" in madSim. Membranpotentialverläufe und Stimulusrampe (S) sind angegeben. Teil 1 und Teil 2 der aktiven Reaktion sind kenntlich gemacht. P/V: Positions-/geschwindigkeitssensitive fCO-Afferenzen. SI: Spikende Interneurone. E/I: Nichtspikende Interneurone. Das bekannte interneuronale Netzwerk wurde reduziert auf die Interneurone I2, E3 und E5/6. Letzteres ist Teil des bistabilen Systems, da seine Aktivität den Umschaltzeitpunkt von Teil 1 zu Teil 2 der aktiven Reaktion beeinflussen kann. Pfeile: Strominjektionen. Farbig unterlegt: Bistabiles System. Aus: Straub (2006).

Der Übergang von Teil 1 zu Teil 2 der aktiven Reaktion veränderte sich vielmehr auch in Abhängigkeit von der Reizgeschwindigkeit. Mit zunehmender Reizgeschwindigkeit verschob sich der Umschaltzeitpunkt zu gebeugteren Tibiapositionen (Abb. 17), ein Effekt, der im Tier nicht auftritt (Bässler, 1988). Bei einer Reizgeschwindigkeit von 100°/s fand das Umschalten bei 68,5% der maximalen Reizamplitude statt. Bei 200°/s trat dies erst bei 81,5% ein.



Abb. 17. SETi-Membranpotentialverlauf bei der aktiven Reaktion. Oben: Geschwindigkeit der Tibiabewegung 200°/s. Unten: Geschwindigkeit der Tibiabewegung 100°/s. Aus: Straub (2006).

Wir stellten bei einer allgemeinen Untersuchung der neuronalen Übertragung rampenförmig ansteigender bzw. sich zeitlich ändernder Information fest, dass dies an einem prinzipiellen Problem der Informationsübertragung von einem Neuron zum nächsten liegt: Das Ausmaß der Erregung des postsynaptischen Neurons hängt nicht nur von der Stärke der Aktivität des präsynaptischen Neurons ab, sondern auch von der Dauer der Aktivität. Ein langsamer, und damit lang andauernder, rampenförmiger Stimulus wird bis zum Erreichen einer definierten Position (also identischer Rampenhöhe), eine größere Erregung im postsynaptischen Neuron auslösen als ein schnellerer, aber kürzerer Stimulus (Abb. 18).



Abb. 18: Unterschiedliches Ausmaß der Erregung in einem Neuron in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Stimulus. _____ integrierte Erregung (entspricht der Fläche unter der Stimulusrampe. Aus: Straub (2006).

Die Position der Tibia wird durch die Feuerfrequenz der positionssensitiven Afferenzen im fCO kodiert, d.h. unabhängig von der Reizgeschwindigkeit ist die Feuerfrequenz bei gleicher Tibiaposition konstant. Wenn diese Tibiaposition aber mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten erreicht wird, ist die Anzahl der bereits erzeugten Aktionspotentiale unterschiedlich und damit auch das Ausmaß der Erregung, die die postsynaptischen Neurone erreicht. Der gleiche Effekt kann in einer einfachen Simulation getestet werden: Wenn ein Neuron, das mit wechselnder Feuerfrequenz aktiv ist, mit einer erregenden Synapse mit einer zweiten Zelle verbunden wird, dann zeigt sich, dass das Ausmaß der Erregung und damit auch die Aktivität des zweiten Neurons bei gleicher präsynaptischer Feuerfrequenz unterschiedlich ist. Beides hängt von der Vorgeschichte der Aktivität des präsynaptischen Neurons ab.

Somit kann nur eine neuronale Verschaltung, die die Feuerfrequenz bzw. die Interspike-Intervalle der positionssensitiven Afferenzen direkt detektiert, für eine rein positionsabhängige Umschaltung von Teil 1 zu Teil 2 der aktiven Reaktion sorgen. Eine solche Verschaltung ist in Abb. 19 gezeigt.



Abb. 19: Interspike-Interval-Detektor mit Membranpotentialverläufen für Neuron D1 (hell unterlegt) und D2 (dunkel unterlegt). • inhibitorische Synapse, • exzitatorische Synapse. D1 erregt D2 und besitzt gleichzeitig eine inhibitorische Synapse zu D2. Diese besitzt aber eine längere Latenz (Delay) als die erregende Synapse. Dadurch wird erreicht, dass D2 erst ab einer definierten Feuerfrequenz von D1 überschwellig wird. Aus: Straub (2006).

Durch den Einbau des Interspike-Interval-Detektors in das reduzierte Modell des Femur-Tibia-Kontrollsystems konnte die Ungenauigkeit in der Position des Umschaltens signifikant vermindert werden. Es blieb ein Unterschied von 3% der maximalen Tibiaamplitude zwischen Widerstandsreflex und aktiver Reaktion. Dieser Wert lag innerhalb der Ungenauigkeit, die durch die Feuerfrequenz des Motoneurons gegeben war. Das vollständige Modell, das der Generierung von Widerstandsreflex und aktiver Reaktion zugrunde liegt, und auch zwischen diesen beiden Verhalten umzuschalten vermag, ist in Abb. 20 gezeigt.



Abb. 20. Vollständiges Modell des Femur-Tibia-Kontrollsystems. P/V: Positions-/ geschwindigkeitssensitive fCO-Afferenzen. SI: Spikende Interneurone. E/I: Nichtspikende Interneurone. Pfeile: Strominjektionen. Orange: Bistabiles System. Gelb: Elemente zur Entfernung der Information über die Höhe der Geschwindigkeit. Blau: Interspike-Interval-Detektor. → inhibitorischer, → exzitatorischer Informationspfad. Neuron A (rot) bewirkt ein Umschalten zwischen Widerstandsreflex und aktiver Reaktion. Aus: Straub (2006).

Der Wechsel zwischen verschiedenen Zuständen wird in diesem Netzwerk durch die Aktivität eines einzigen Neurons (A in Abb. 20) ausgelöst. Im Tier wird das eigentliche Umschalten zwischen Widerstandreflex und aktiver Reaktion durch (bisher unbekannte) absteigende Bahnen aus höheren Zentren des Zentralnervensystems, z.B. des Gehirns, bestimmt. Um zu untersuchen, wie solche absteigenden Bahnen verschiedene motorische Muster aus multifunktionellen Netzwerken selektieren, habe ich ein anderes System ausgewählt. Im stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses sind bereits absteigende Bahnen beschrieben wie auch die zellulären und synaptischen Eigenschaften des der motorischen Aktivität zugrunde liegenden neuronalen Netzwerks. Zwei zentrale Mustergeneratoren generieren diese Aktivität, welche moduliert wird von den absteigenden Bahnen (Zusammenfassung: Nusbaum, 2002).

5.4 Der Einfluss vom Gehirn absteigender neuronaler Bahnen auf die motorischen Netzwerke im stomatogastrischen Nervensystem.

Im Gehirn (Cerebralganglion) des Krebses verarbeitete sensorische Information wird zum STNS geleitet und kann dort die Aktivität von STG-Neuronen modulieren. Einen möglichen Weg stellt der

inferiore Ventrikularnerv *ivn* dar, der die einzige direkte Verbindung zwischen Gehirn und STNS bildet. Diese Bahn wurde von uns (Christie et al., 2004) genauer charakterisiert. Von acht Axonen, die sich im *ivn* befinden, besitzen nur zwei ihr Soma im Gehirn (Abb. 21A,B). Die Somata befinden sich in der anterioren medialen Region des Gehirns, nahe der Eintrittsstelle des *ivn*. Diese IV-Neurone senden jeweils ein Axon über den *ion* und über den *son* zu den Kommissuralganglien (für Morphologie des STNS siehe Abb. 5). Ein Axon projiziert zum STG. Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass die IV-Neurone Histamin und ein FLRFamid als Transmitter besitzen (Abb. 21C).



Abb. 21. A. Schematische Darstellung der Lage der IV-Neurone im Cerebralganglion (Gehirn). B. Ausschnittvergrößerung aus A. (grüner Kasten). Nickelchlorid-Backfill der IV-Neurone. C. Anti-Histamin immunhistochemische Färbung der IV-Neurone.

Eine *ivn* Stimulation zeigt spezifische Einflüsse auf die Netzwerke im STG in Abhängigkeit davon, ob die Kommissuralganglien noch mit dem STG verbunden sind oder nicht. Ohne die Ganglien schwächt eine *ivn* Stimulation reproduzierbar den pylorischen Rhythmus oder stoppt ihn. Vergleichbar zur *ivn* Stimulation beendet oder schwächt eine fokale Applikation von Histamin auf das isolierte STG den pylorischen Rhythmus. Im Gegensatz dazu erregt Applikation von FLRFamid den pylorischen Rhythmus. Die inhibitorischen Wirkungen von Histamin und *ivn* Stimulation können reversibel mit dem Histaminantagonisten Cimetidine (ein H2-Typ Rezeptor-Antagonist) unterdrückt werden. In Gegenwart von Cimetidine zeigt sich keine erregende Komponente einer *ivn* Stimulation, was nahe legt, dass alle *ivn* Wirkungen im STG durch Histamin ausgelöst werden.

Wenn die CoGs mit dem STG verbunden sind, schwächt eine *ivn* Stimulation kurzzeitig den pylorischen Rhythmus, erregt ihn danach und startet dann einen mehrere Minuten anhaltenden gastrischen Rhythmus (Abb. 22A). Extrazelluläre Ableitungen der zum STG ziehenden Nerven legen nahe, dass diese Reaktionen durch die Aktivität der kommissuralen Projektionsneurone MCN1 und CPN2 ausgelöst wurden, die ihrerseits durch die erhöhte *ivn*-Aktivität dauerhaft erregt wurden (Abb. 22B).

Übereinstimmend mit den erregenden Einflüssen der *ivn* auf die CoGs löst eine Applikation von TNRNFLRFamid auf die CoGs einen MCN1/CPN2 gastrischen Rhythmus in *Cancer borealis* aus (Weimann et al., 1993). Dies legt nahe, dass die IV-Neurone ihren Peptid-Ko-Transmitter benutzen, um die kommissuralen Projektionsneurone zu aktivieren, während sie ausschließlich Histamin

benutzen, um das STG zu innervieren. Es zeigt sich also, dass vom Gehirn absteigende Projektionen sowohl direkte Wirkungen auf die motorischen Netzwerke haben, als auch indirekte, die über weitere Projektionsneurone (hier die in den Kommissuralganglien) vermittelt werden. Diese Projektionsneurone wurden hauptsächlich auf ihre modulatorischen Einflüsse auf die STG-Netzwerke hin untersucht. Im Hinblick auf ihre Beteiligung an der Vermittlung von Information vom Gehirn zu den motorischen Netzwerken erschien es daher sinnvoll, deren Rolle bei der Selektion motorischer Muster zu untersuchen.

А





Abb. 22. A. Eine ivn-Reizung löste einen lang gastrischen anhaltenden Rhythmus aus. Intrazelluläre Ableitungen der gastrischen Motoneurone LG und GM, sowie extrazelluläre Ableitungen von DG, GM, VD und IC. B. Extrazelluläre Ableitungen beider Homologe des Projektionsneurons MCN1 vor (links) und nach *ivn*-Reizung (rechts). OMN Osophageales Motoneuron.

Für die Untersuchung der Projektionsneurone haben wir verschiedene Ansätze gewählt. Zunächst war eine Beschreibung der Wirkmechanismen der Projektionsneurone notwendig. Dazu möchte ich die Arbeiten von Wood et al. (2000) und Stein & Ausborn (2004) vorstellen. Die Beteiligung und Aktivierung von Projektionsneuronen möchte ich in Stein et al. (2005) und anhand von unveröffentlichten Ergebnissen vorstellen. Abschließend sollen die Auswirkungen einer Selektion motorischer Muster auf das Verhalten bzw. die Kraftentwicklung am Muskel an einem Beispiel

5.5 Einfluss des Projektionsneurons MCN1 auf die Netzwerke im stomatogastrischen Ganglion.

Das modulatorische Projektionsneuron MCN1 ist ein besonders gut untersuchtes Beispiel für ein absteigendes Projektionsneuron. Seine Aktivität löst einen gastrischen Rhythmus aus und moduliert den pylorischen Rhythmus (Bartos et al., 1999). Seine Beteiligung an der von den IV-Neuronen im Gehirn ausgelösten Reaktion der STG-Netzwerke deutet eine Rolle bei der Selektion motorischer Muster aus multifunktionellen Netzwerken an. Interessanterweise besitzt MCN1, wie viele andere Projektionsneurone auch, mehrere Ko-Transmitter. Im Falle von MCN1 handelt es sich dabei um γ -Amminobuttersäure (GABA), Proctolin und ein tachikininverwandtes Peptid, CabTRP Ia (Cancer borealis tachikinin-related peptide Ia). Es wird angenommen, dass durch die Kombination an Ko-Transmittern bestimmt wird, welcher Ausgang in den motorischen Netzwerken generiert wird. Diese Annahme wurde in Wood et al. (2000) getestet. Ein weiteres Projektionsneuron, das modulatorische Proctolin Neuron MPN, enthält ebenfalls GABA und Proctolin, aber kein CabTRP Ia. Durch den Vergleich der Wirkungen beider Neurone auf die STG-Netzwerke konnten wir daher testen, ob - und wenn ja, wie - das Vorhandensein eines weiteren Transmitters die Selektion von motorischen Mustern beeinflusst. Eine selektive Aktivierung von MPN löst einen pylorischen Rhythmus aus bzw. moduliert einen vorhandenen Rhythmus, während MCN1 zusätzlich einen gastrischen Rhythmus auslöst. Wir untersuchten, wie stark das Vorhandensein von CabTRP Ia zu diesem Unterschied beiträgt. Wir benutzten einen Tachikininrezeptor-Blocker, Spantide I, um die Wirkung von CabTRP Ia zu eliminieren. In Spantide konnte MCN1-Aktivierung keinen gastrischen Rhythmus mehr auslösen und der pylorische Rhythmus war verändert im Vergleich zur Kontrollsituation in Ringer. Obwohl dieser Rhythmus dem durch MPN ausgelösten pylorischen Rhythmus ähnlicher war, blieben doch signifikante Unterschiede bestehen. Das bedeutet, dass CabTRP Ia teilweise die Unterschiede zwischen den ausgelösten Rhythmen bei MCN1 und MPN Aktivierung begründet. Ein wichtigeres Ergebnis aber ist, dass verschiedene Projektionsneurone die gleichen Ko-Transmitter einsetzen können, um verschiedene Rhythmen auszulösen. Wenn CabTRP Ia geblockt wurde, waren die von MPN und MCN1 ausgelösten pylorische Rhythmus verschieden, obwohl beide nun die gleichen Transmitter einsetzten. Der Besatz an Transmittern in absteigenden Neuronen bestimmt also nicht allein die neuronale Antwort der multifunktionellen Netzwerke, sondern weitere Selektionsstrategien müssen eingesetzt werden, um den motorischen Ausgang zu definieren.

5.6. Einfluss motorischer Aktivität auf absteigende Projektionsneurone.

Eine Strategie könnte das Vorhandensein unterschiedlicher Rückmeldungen von den motorischen Netzwerken an die Projektionsneurone sein. Über solche Rückmeldungen ist wenig bekannt. Das STNS eignet sich aber aufgrund der Zugänglichkeit seiner Neurone für elektrophysiologische Untersuchungsmethoden und aufgrund der geringen Anzahl an Neuronen für das Studium solcher

40

Rückmeldungen. Im STNS interagieren motorische Netzwerke und Projektionsneurone auf zwei Ebenen. Die zentralen Mustergeneratoren senden aufsteigende Axone zu den Somata der Projektionsneurone in den Kommissuralganglien. Gleichzeitig modulieren die Mustergeneratoren den Einfluss der Projektionsneurone mittels präsynaptischer Inhibition der Axonterminalen nahe des STGs (Bartos & Nusbaum, 1997). Stein & Ausborn (2004) untersuchten die Auswirkung dieser präsynaptischen Inhibition auf die Generierung von gastrischen Rhythmen. Anhand eines in madSim erstellten Computermodells der Verschaltung von MCN1 mit dem zentralen Mustergenerator des gastrischen Rhythmus (dem 'Half-center' aus LG und Interneuron1, Abb. 6B) konnte gezeigt werden, dass die neuronale Verschaltung nur in Gegenwart einer präsynaptischen Inhibition der MCN1-Terminale hinreichend war, um einen gastrischen Rhythmus auszulösen. Der Zeitverlauf und die Stärke der präsynaptischen Inhibition bestimmten die Ausprägung des Rhythmus. Die präsynaptische Inhibition wird ausgelöst durch eine inhibitorische Synapse eines LG Axons auf die Terminale des MCN1 Axons. Daher löste eine stärkere LG Aktivität auch eine stärkere präsynaptische Inhibition aus. Dies hatte interessanterweise eine gegensätzliche Auswirkung auf den gastrischen Rhythmus im Vergleich zu einer direkten Erhöhung der präsynaptischen Hemmung durch die synaptische Leitfähigkeit der LG-MCN1 Synapse. Dies zeigt, dass eher die synaptischen Parameter der Rückmeldung an die Projektionsneurone bestimmend sind als die Aktivität des rückmeldenden Neurons. Wenn die präsynaptische Inhibition komplett eliminiert wurde, konnten nur Oszillationen im zentralen Mustergenerator ausgelöst werden, wenn LG zusätzlich mit regenerativen Ionenströmen ausgestattet wurde und Interneuron 1 zusätzlich rhythmische Inhibition von pylorischen Neuronen erhielt. Letzteres ist im Tier üblicherweise vorhanden, da der pylorische Rhythmus, im Gegensatz zum gastrischen, ständig aktiv ist. Ob LG intrinsische Eigenschaften besitzt, die Oszillationen ohne präsynaptische Inhibition unterstützen, ist bisher noch nicht geklärt, wird aber zur Zeit von uns geprüft.

Das Modell zeigte also, dass eine präsynaptische Modulierung der Wirkung eines Projektionsneurons auf die zentralen Mustergeneratoren nicht nur dem Tuning des motorischen Ausgangs dient, sondern essentiell für die Generierung der motorischen Aktivität ist. Zwei einfache Parameter der präsynaptischen Hemmung, die Dauer und die Stärke, sind dabei die bestimmenden Faktoren.

Der Einfluss einer Rückmeldung von motorischen Netzwerken an die Projektionsneurone mittels *aufsteigender* Bahnen zu den Kommissuralganglien wurde in Stein et al. (2005) untersucht. Dabei diente der Einfluss des gasförmigen Transmitters Stickstoffmonoxid (NO) als Mittel, um den Einfluss solcher aufsteigender Bahnen auf die Projektionsneurone zu untersuchen. NO erfüllt eine Vielzahl von Funktionen im Nervensystem und spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation von oszillierenden Netzwerken. Im stomatogastrischen Nervensystem wird NO als Transmitter von absteigenden Projektionsneuronen benutzt (Scholz et al., 2001). Stein et al. (2005) belegten, dass zusätzlich dazu

auch NO im STG selbst produziert und auch ausgeschüttet wird. Bad-Applikation verschiedener NO-Blocker ausschließlich auf das STG zeigte, dass bereits aktive gastrische Rhythmen beendet wurden. Dies lag daran, dass die Aktivität der für den gastrischen Rhythmus verantwortlichen Projektionsneurone MCN1 und CPN2 signifikant abnahm. Da die NO-Blocker selektiv auf das STG appliziert wurden, müssen aufsteigende neuronale Bahnen die Information über eine veränderte NO-Konzentration an die Projektionsneurone in den Kommissuralganglien leiten. Wenn diese neuronale Rückmeldung unterbrochen wurde, oder aber die Aktivität der Projektionsneurone künstlich aufrecht erhalten wurde, konnte ein Verringern der NO-Konzentration im STG den gastrischen Rhythmus nicht mehr beeinflussen, was auf eine indirekte aufsteigende Kontrolle der Projektionsneurone hindeutet.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass aufsteigende Information von motorischen Netzwerken entscheidend ist für die entstehende motorische Aktivität. Die aufsteigende Rückmeldung ist zustandsabhängig und kann moduliert werden, um den motorischen Ausgang zu verändern.

5.7. Aktivierung mehrerer Projektionsneurone durch sensorische Bahnen.

Eine weitere Möglichkeit, wie Projektionsneurone zur Selektion verschiedener motorischer Muster aus multifunktionellen Netzwerken beitragen könnten, ist eine Kombinierung der Aktivität verschiedener Projektionsneurone. Dass dies tatsächlich zutrifft, deuten bisher unveröffentlichte Ergebnisse an.

Ich werde die Rekrutierung von Projektionsneuronen am Beispiel zweier sensorischer Eingänge aufzeigen: dem Sehnenorgan AGR und dem Streckrezeptor GPR2 (siehe Einleitung). Hierzu haben wir zunächst das isolierte STNS benutzt, um AGR intrazellulär abzuleiten und die Auswirkungen seiner Aktivität auf die Netzwerke im STG und den CoGs zu untersuchen. Gleichzeitig zeigten wir die Lage und Morphologie von AGR durch Lucifer Yellow-Injektionen bzw. -Backfills auf. Wie im Hummer (Simmers & Moulins, 1988a,b) besitzt AGR bei *Cancer* einen bilateralen Zellkörper im STG, welcher sich posterior zu den anderen Somata im STG befindet (Abb. 23A). AGR besitzt zwei Axone. Eines projiziert anterior durch das STG über den stomatogastrischen Nerv *stn* und die subösophagealen Nerven (*sons*, bilateral symmetrisch) zu den CoGs (Abb. 23B). Das posteriore Axon innerviert die gm1 Muskeln über den dorsalen gastrischen Nerv *dgn* (Abb. 23B; Abb. 8).

B







Abb. 23. A. Lucifer-Yellow Färbung von AGR (Pfeil). Die Form des STG ist angedeutet. B. Schematische Darstellung der AGR-Projektionen.

Wenn AGR im isolierten STNS abgeleitet wird, besitzt es eine niedrige Spontanaktivität. Mehrere Spike-Initiierungszonen können dabei unterschieden werden. Eine, nahe der Stelle, an der AGR den Muskel innerviert, und eine, die zwischen STG und CoGs liegt. Wenn AGR künstlich hyperpolarisiert wird, zeigt sich ein "sag"-Potential (eine langsame Depolarisation des Membranpotentials trotz anhaltender Strominjektion; Abb. 24A). Nach Ende des hyperpolarisierenden Stroms zeigt sich ein "postinhibitory rebound". Wenn AGR depolarisiert wird, zeigt sich eine deutliche Spikeraten-Adaptation, also eine Abnahme der Feuerfrequenz trotz anhaltender Strominjektion. Wenn AGR feuert, nimmt die Aktivität einiger pylorischer Neurone ab, und die Periode des pylorischen Rhythmus wird länger (Abb. 24B). Dieser Effekt ist unabhängig von möglichen Interaktionen zwischen pylorischem und gastrischem Rhythmus.



Abb. 24. A. Intrazelluläre Ableitung von AGR. Bei hyperpolarisierender Strom-Applikation zeigt sich ein "sag"-Potential, nach Ende der Hyperpolarisation ein "postinhibitory rebound". B. Darstellung des Einflusses von AGR auf die Aktivität der pylorischen Neurone PD, LP, VD und IC, sowie auf die Periode des pylorischen Rhythmus.

Gleichzeitig werden auch die Neurone des gastrischen Rhythmus beeinflusst: AGR aktiviert die Protraktormotoneurone GM des Medianzahns (4 GMs) und das Protraktormotoneuron des Lateralzahns, LG. Gleichzeitig wird der Retraktor des Medianzahns, DG, inhibiert. Rhythmische AGR-Stimulation während eines bereits aktiven gastrischen Rhythmus "entrained" diesen Rhythmus, d.h. die Periode des gastrischen Rhythmus passt sich der Reizperiode an (Abb. 25; Abb. 26A). Die Periodendauer lässt sich so um bis zu 60% erniedrigen bzw. erhöhen. Einzelne AGR-Reize während eines aktiven Rhythmus sind in der Lage, den gastrischen Rhythmus zurückzusetzen, und zwar unabhängig von der Reizphase während des Rhythmus (Abb. 26B).



Abb. 25. Rhythmische AGR Reizung kann den gastrischen Rhythmus (GMR) "entrainen" (d.h. "mitnehmen"). Intrazelluläre Ableitung von AGR und extrazelluläre Ableitung von LG. Oben: Ohne AGR-Stimulation betrug die Periodendauer des gastrischen Rhythmus 6.4s. Mitte: AGR wurde rhythmisch aktiviert, mit einer Periodendauer von 5s. Die Periodendauer des gastrischen Rhythmus passte sich an. Unten: Wenn AGR mit einer Periodendauer aktiviert wurde, die länger war als die Ausgangsperiode des gastrischen Rhythmus (8s), verlangsamte sich der gastrische Rhythmus und synchronisierte sich mit der Reizung.



Abb. 26. A. Die Periodendauer des gastrischen Rhythmus konnte durch rhythmische AGR-Aktivierung um bis zu 60% erhöht bzw. erniedrigt werden. B. "Phase-Response-Curve" für einzelne AGR-Aktivierungen während verschiedener Phasen des gastrischen Rhythmus. AGR konnte den Rhythmus zu allen Phasenlagen zurücksetzen.

Sämtliche Einflüsse von AGR auf die zentralen Mustergeneratoren scheinen allerdings indirekt vermittelt zu werden: Wenn AGRs Axon zu den CoGs durchtrennt wird, sind keine Auswirkungen auf den pylorischen und gastrischen Rhythmus mehr zu erkennen. Diese Ergebnisse werden gestützt von Experimenten, in denen die Aktivität der absteigenden Projektionsneurone in den CoGs während AGR Reizung aufgezeichnet wurde. MCN1, CPN2 und MCN5 (siehe Nusbaum, 2002 für Effekte dieser Projektionsneurone auf die STG-Netzwerke) verändern ihre Aktivität während der Reizung. MCN5 und CPN2 werden erregt, während die MCN1-Aktivität abnimmt (Abb. 27).



Abb. 27. Die Aktivitäten von CPN2, MCN5 und MCN1 werden durch AGR-Entladungen signifikant beeinflusst.

AGR beeinflusst also in spezifischer Weise die Projektionsneurone MCN1, CPN2 und MCN5. Wie sieht dies nun bei GPR2 aus? Diese Frage wurde bearbeitet von meinem Kooperationspartner, Prof. M.P. Nusbaum (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA). Beenhakker et al. (2004) zeigten, dass auch CPN2 selektiv Projektionsneurone in den Kommissuralganglien aktiviert, und zwar MCN1 und CPN2. Beide Neurone werden erregt. MCN5 wird dagegen nicht beeinflusst. Diese Situation unterscheidet sich also von AGR, welcher MCN5 und CPN2 erregt, MCN1 dagegen inhibiert. Entsprechend unterscheiden sich die motoneuronalen Ausgänge, die durch eine Reizung dieser sensorischen Bahnen ausgelöst werden. Sowohl eine Aktivierung von GPR2 als auch von AGR können zwar einen bereits aktiven gastrischen Rhythmus "entrainen", die Aktivitäten der Motoneurone aber unterscheiden sich signifikant.

Die Auswahl verschiedener motorischer Muster beruht also auch darauf, welche Kombination von Projektionsneuronen durch einen sensorischen Eingang rekrutiert wird. Auch ein selektives Ausschalten von einzelnen Projektionen gehört zu dieser Strategie, wie z.B. im Falle von MCN1 bei AGR-Reizung.

Im bisherigen Verlauf dieser Arbeit habe ich gezeigt, wie sensorische Information im Zentralnervensystem verarbeitet wird. Oftmals bestimmt der Einfluss der Sensorik dabei, welche motorische Aktivität in den verarbeitenden, multifunktionellen Netzwerken generiert wird. Ich habe im Weiteren eine Reihe von Mechanismen aufgezeigt, die im Nervensystem verwendet werden, um eine solche Selektion von motorischen Mustern zu erreichen. Eine Vielzahl von Mechanismen ist beteiligt, so unter anderem bestimmte Interaktionen zwischen motorischen Netzwerken und absteigenden Projektionen von höheren Zentren des Nervensystems sowie die Rekrutierung unterschiedlicher absteigender Bahnen. Bedingt durch die Anzahl an Variationsmöglichkeiten können sehr verschiedene motorische Aktivitäten generiert werden. Fraglich ist allerdings, wie relevant diese Aktivitäten, die im isolierten Nervensystem gezeigt wurden, für ein intaktes, sich verhaltendes Tier sind. Zeigt sich eine solche Variabilität auch im intakten System, oder ist sie nur ein Teil eines umfassenden rhythmusgenerierenden Systems, welches durch eine Aktivierung verschiedener neuronaler Wege eine relativ begrenzte Anzahl an Mustern erzeugt? Welche Relevanz besitzt die große Variabilität des isolierten Systems?

Um diese Frage zu klären möchte ich eine letzte Arbeit, Stein et al. (2006b), vorstellen. Wir haben erfolgreich die *in vivo* Ableittechnik an Taschenkrebsen etabliert. Es können bis zu drei extrazelluläre Ableitungen gleichzeitig dauerhaft implantiert werden, die das Beobachten der meisten pylorischen und gastrischen Motoneurone erlauben (Abb. 28). Die Ableitqualität unterscheidet sich nicht von *in vitro* Präparationen.



Abb. 28. Extrazelluläre Ableitungen des *dgn*, *mvn* und *lvn in vivo*. Verschiedene Farben kennzeichnen unterschiedliche pylorische und gastrische Motoneurone.

Zur Identifikation der verschiedenen Motoneurone auf *in vivo* Ableitungen unterscheiden wir die Form ihrer Aktionspotentiale voneinander (Abb. 29). Wir haben dieses Ergebnis inzwischen in Kontrollexperimenten mit zusätzlichen Elektroden am gleichen Nerv abgesichert (der Platzbedarf der Kontrollkonfiguration eignet sich nicht zur chronischen Implantation von Elektroden). Hier konnten zusätzlich die Laufzeitunterschiede genutzt werden, um die Motoneurone zu identifizieren. Es zeigte sich, dass die Identifikation allein durch die Aktionspotentialform in allen Fällen eindeutig war.



Abb. 29. Extrazelluläre Ableitung des dgn (oben) und nach Spikeform klassifizierte Einheiten in Spike2 (unten). Unterschiedliche Farben kennzeichnen die unterschiedlichen Einheiten.

Zur Auswertung der Einheiten verwenden wir die Spike-Template-Matching Funktion von Spike2 (CED,UK) mit anschließender Hauptkomponenten-Analyse der Spikeform und zusätzlich selbstgeschriebene Spike2-Skripte. Die einzelnen Spike2-Skripte sind auf meiner Homepage *www.neurobiologie.de* erhältlich.

Es stellte sich heraus, dass auch *in vivo* die Variabilität der produzierten Rhythmen sehr groß ist. Dies entspricht der Situation im isolierten Nervensystem. Es treten allerdings immer wieder gleiche Rhythmen, sowohl innerhalb eines Tieres als auch zwischen verschiedenen Tieren, auf. Die Rhythmen können somit in verschiedene Klassen kategorisiert werden. Stein et al. (2006b) benutzten drei verschiedene Klassen von gastrischen Rhythmen (Abb. 30), die die gesamte Bandbreite der gefundenen Rhythmen repräsentierten, um deren Auswirkungen auf die Muskelaktivität und damit auch auf das Verhalten zu untersuchen.



Abb. 30. Drei verschiedene Klassen von gastrischen Rhythmen (weak (schwach), inter-mediate (mittel) und strong (stark)) wurden zur Charakterisierung der Muskelaktivität benutzt. Die gastrischen Rhythmen sind anhand von extrazellulären *lvn* Ableitungen dargestellt. Aus: Stein et al. (2006b). Standardisierte Versionen dieser Rhythmen wurden zur Stimulation des LG Motoneurons in einem Nerv-Muskel-Präparat benutzt, während die elektrische Aktivität (Abb. 31) oder die Kraft des gastrischen Muskels gm6 gemessen wurde.



Abb. 31. Intrazelluläre Ableitung des gastrischen Muskels gm6 während unterschiedlicher gastrischer Rhythmen. Der Muskel zeigte deutliche unterschiedliche Reaktionen, da (durch die verschiedenen motorischen Aktivitäten bedingt) Augmentation und Bahnung unterschiedlich stark zum Muskelmembranpotential beitrugen. Gezeigt sind jeweils die Reaktion auf den ersten und zehnten LG Burst. Aus: Stein et al. (2006b).

Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie war, dass synaptische Eigenschaften wie Bahnung oder Augmentation den Membranpotentialverlauf (Abb. 31) und die Kraftentwicklung des Muskels verändern, und zwar in Abhängigkeit von der vorhandenen motorischen Aktivität. Das bedeutet aber auch, dass die Variabilität der Rhythmen tatsächlich eine funktionelle Relevanz im intakten Tier besitzt und somit die Selektion verschiedener motorischer Muster ein wichtiges Instrument zur Bestimmung des Verhaltens ist.

6. Zusammenfassung und Ausblick.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der zentralen Frage, wie sensorische Information im Zentralnervensystem verarbeitet wird. Ich habe am Beispiel des Femur-Tibia-Regelkreises der Stabheuschrecke dargelegt, wie ein und dieselbe sensorische Information in einem neuronalen Netzwerk verarbeitet wird und zu unterschiedlichen motorischen Ausgängen führen kann. Mit den Mechanismen, die einer solchen Modulation des motorischen Ausgangs bei gleich bleibendem sensorischen Eingang unterliegen, habe ich mich anhand von Untersuchungen am stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses beschäftigt.

Ein in meinen Augen sehr wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die Beteiligung absteigender Projektionen an der Verarbeitung sensorischer Information und den daraus resultierenden Freiheitsgraden einer motorischen Antwort. Die an der Verarbeitung sensorischer Information beteiligten neuronalen Netzwerke scheinen in ihrem Design nicht speziell für eine spezifische Aufgabe entstanden zu sein, sondern zeigen sich im Gegenteil als multifunktionell. So kann z.B. das neuronale Netzwerk des Femur-Tibia-Regelkreises nicht nur Widerstandsreflexe, die im stehenden Tier benötigt werden, generieren, sondern auch die aktive Reaktion, die die Beinbewegung beim Laufen unterstützt (Straub et al., 2004). Zusätzlich ist es beteiligt an der Verarbeitung der sensorischen Information über Substratvibrationen (Sauer & Stein, 1999), die ebenso wie Tibiaposition und -bewegung vom femoralen Chordotonalorgan perzipiert werden (Stein & Sauer, 1999). Eine weitere Funktion des gleichen neuronalen Netzes ist es, sensorische Information über die Gelenkstellung anderer Beine zu verarbeiten und an die lokalen Motoneurone weiterzuleiten (Stein et al., 2006a). Es scheint dabei eine Aufteilung des bekannten interneuronalen Netzwerks stattzufinden, in einer Art, die auch schon von früheren Arbeiten vorgeschlagen wurde (Driesang & Büschges, 1996). Bestimmte Interneurone (z.B. E4, I4) scheinen dabei hauptsächlich der Verarbeitung von sensorischer Information anderer Gelenke, Modalitäten oder Beine zu dienen, während andere Interneurone (z.B. E3) hauptsächlich der Verarbeitung lokaler fCO-Information dient. Aber selbst nach dem Konvergieren verschiedener sensorischer Einflüsse auf interneuronaler Ebene beeinflussen sich verschiedene neuronale Netzwerke untereinander, nämlich auf Ebene der Motoneurone (Schmitz & Stein, 2000) und führen so zu einer koordinierten Kontrolle der Körperhaltung.

Sensorische Information kann auf vielen Ebenen des Zentralnervensystems moduliert werden. Eine erste Beeinflussung findet bereits innerhalb der sensorischen Neurone selbst statt, in Form einer präsynaptischen Inhibition der afferenten Terminalen (Stein & Sauer, 1999; Stein & Schmitz, 1999; Sauer et al., 1997). Es zeigte sich hier, dass sowohl Signale von anderen Sinnesorganen (Stein & Schmitz, 1999), als auch vom Zentralnervensystem kommende Signale (Stein, unveröffentlichte Ergebnisse) die Informationsfortleitung der Afferenzen beeinflussen.

Gerade die dem Zentralnervensystem entstammenden Signale sind von Bedeutung dafür, welcher motorische Ausgang letztendlich von den multifunktionellen motorischen Netzwerken generiert wird. Ich habe daher eine Reihe von Mechanismen aufgezeigt, die im Nervensystem verwendet werden, um eine solche Selektion von motorischen Mustern zu erreichen. Es zeigte sich, dass eine Vielzahl von Mechanismen beteiligt ist, die vor allem die zu den motorischen Netzwerken absteigenden Projektionen betreffen. So kann z.B. schon das Vorhandensein von unterschiedlichen Ko-Transmittern und deren unterschiedliche Ausschüttung (Wood et al., 2000; Christie et al., 2004) genauso zur Selektion von motorischen Mustern beitragen wie auch eine spezifische Rekrutierung von Projektionsneuronen (Stein, unveröffentlichte Ergebnisse) und deren selektive Modulation durch von den motorischen Netzwerken aufsteigende und daher rückkoppelnde Bahnen (Stein et al., 2005).

In zukünftigen Studien sollte daher der Tatsache Rechnung getragen werden, dass in den motorischen Netzwerken selbst zwar Sinnesinformation verarbeitet wird, und das auf vielen Ebenen, aber dass zur vollständigen Charakterisierung des Einflusses eines Sinnesorgans die absteigenden Projektionen in die Untersuchung mit einbezogen werden müssen.

Obwohl bereits viele Mechanismen und Details der Verarbeitung sensorischer Signale geklärt sind, steht der Erforschung dieser Verarbeitung noch eine große Aufgabe bevor: Die Charakterisierung des Einflusses sensorischer Information im intakten Tier bzw. innerhalb eines geschlossenen Regelsystems. Bisherige Experimente wurden großteils im geöffneten Regelsystem durchgeführt, das heißt, es wurden z.B. Sinnesorgane gereizt, ohne dass die motorische Aktivität einen Einfluss auf die Aktivität des Sinnesorgans hatte. In einem intakten Tier ist dies natürlich anders. Bisher konnten Versuche im intakten Tier allerdings aufgrund der komplexen Aktivitäten von Motoneuronen und sensorischen Neuronen und den daraus resultierenden Interaktionen nicht durchgeführt werden.

Durch die Zugänglichkeit des stomatogastrischen Nervensystems für elektrophysiologische Ableitungen ergibt sich nun allerdings die Möglichkeit, ein System mit geschlossenem Regelkreis zu untersuchen, in dem Motorik und Sensorik sich gegenseitig beeinflussen können. Neben der Arbeit am isolierten stomatogastrischen Nervensystem gelang mir die Identifikation sensorischer Aktivität in intakten Tieren. Die Form der Aktionspotentiale unterscheidet sich nämlich deutlich von der der Motoneurone, da der extrazellulär gemessene Stromfluss invertiert ist im Vergleich zu den Aktionspotentialen der Motoneurone (Abb. 32).



Abb. 32. Oben: Extrazelluläre Ableitung des dgn mit einem sensorischen Neuron (AGR, links) und einem Motoneuron (DG, rechts). Vergleich Unten: Bei der Aktionspotentialformen stellte sich heraus, dass die motoneuronalen Aktionspotentiale denen der sensorischen entsprechen, nur um 180° gedreht. Rechts: Das AGR Aktionspotential (grün) wurde um 180° gedreht und neu skaliert.

Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die sensorische Aktivität *in vivo* zu charakterisieren und die Kennlinien der Aktivierung dann im isolierten Nervensystem zu benutzen, um einen künstlich geschlossenen Regelkreis zu erzeugen. Dazu soll ein Computer-Modell der sensorischen Aktivierung (der Transferfunktion zwischen motoneuronaler und sensorischer Aktivität) erstellt werden. Dies steuert dann in Echtzeit die Aktivität des Sinnesorgans im isolierten Nervensystem, und zwar in Abhängigkeit von der vorliegenden motoneuronalen Aktivität (Abb. 33).



Abb. 33. "Geschlossener Regelkreis"-Konfiguration mit Detektion der motoneuronalen Aktionspotentiale und Rückkopplung über das AGR-Modell. Axoclamp 2B: Intrazellulärverstärker Molecular devices (Sunnyvale, USA). NI board: A/D Wandlerkarte von National Instruments (Austin, USA).

Für unser Projekt werden wir das Muskelsehnenorgan AGR benutzen. Dafür adaptierten wir die Simulationsumgebung & 2004; Straub al., 2004; madSim (Stein Ausborn, et http://www.neurobio.de/madsim) für Echtzeit-Verarbeitung von neuronalen Antworten. MadSim benutzt dazu ein Neuronenmodell nach Izhikevich (2003). Dieses Modell ist in der Lage, biologisch realistische Verhalten von einzelnen Neuronen zu berechnen, allerdings mit wesentlich geringeren Rechenanforderungen als andere Modelle (Izhikevich, 2004), wie z.B. das Hodgkin-Huxley Modell (Hodgkin & Huxley, 1952). MadSim liest die Aktivität der Motoneurone und benutzt diese Aktivität um ein modelliertes AGR Neuron zu aktivieren. Die Spikeaktivität dieses Modell-AGRs wird dann benutzt, um sein Pendant im biologischen System zu steuern (Abb. 33).

Vorläufige Experimente, in denen wir den Regelkreis künstlich geschlossen haben, zeigen, dass die Effekte von AGR auf den gastrischen Rhythmus stark davon abhängen, zu welcher Phase eines Zyklus AGR aktiviert wird (Abb. 34). In diesen Experimenten verwendeten wir kein Computermodell von AGR, sondern einen einfacheren Ansatz. Wir aktivierten AGR mit einer definierten Feuerfrequenz entweder zeitgleich mit den Protraktormotoneuronen des Medianzahns (GM) oder in Phase mit dem Retraktormotoneuron DG.



Abb. 34. Im künstlich geschlossenen Regelkreis hängt der gastrische Rhythmus vom Timing der AGR-Aktivität ab. Jeweils obere Spur: LG. Mittlere Spur: AGR. Untere Spur: DG. A. Geöffneter Regelkreis. B. Geschlossener Regelkreis. AGR wurde in Phase mit den Protraktormotoneuronen aktiviert. C. Geschlossener Regelkreis. AGR wurde in Phase mit dem Retraktormotoneuron aktiviert. Skalierungsbalken gelten für A.,B.,C.

Unsere Experimente werden uns helfen, ein besseres Verständnis zustandsabhängiger Effekte von AGR zu erhalten, und im Generellen klären, wie propriozeptive Rückmeldungen das Nervensystem in verhaltensrelevanten Situationen beeinflussen. Sie werden uns zeigen, ob solche zustandsabhängigen Wirkungen auf Veränderungen des Netzwerks beruhen, die den Rhythmus generieren, wie z.B. synaptischen Interaktionen zwischen Projektionsneuronen und Motoneuronen. Zusätzlich sollten unsere Ergebnisse uns Hinweise darauf liefern, ob der zeitliche Verlauf einer sensorischen Aktivität, ihre Intensität und ihr Timing während eines Rhythmus, die Reaktion des Nervensystems bestimmt. Insgesamt wird dieses Projekt neue konzeptionelle Wege aufzeigen, wie neuronale Bahnen spezifische motorische Muster aus einem multifunktionellen Netzwerk auswählen. Dies wird auch unsere Wertschätzung der Freiheitsgrade innerhalb sensorischer Systeme bzw. in rhythmisch aktiven neuronalen Netzwerken erweitern, die koordinierten Bewegungen zugrunde liegen. Dieses Projekt stellt somit auch die Grundlage für entsprechende Studien in schwerer zugänglichen und komplexeren Systemen, wie z.B. dem Zentralnervensystem von Vertebraten, dar.

7. Eigene Literatur, die zu dieser Arbeit beigetragen hat.

- Christie A.E., <u>Stein W.</u>, Quinlan J.E., Beenhakker M.P., Marder E., Nusbaum M.P. (2004) Actions of a histaminergic/peptidergic projection neuron on rhythmic motor patterns in the stomatogastric nervous system of the crab Cancer borealis. *J Comp Neurol* 2004 469:153-69.
- 2. Sauer A.E., <u>Stein W.</u> (1999) Sensorimotor pathways processing vibratory signals from the femoral chordotonal organ of the stick insect. *J comp Physiol* A, 185:21-31.
- Schmitz J., <u>Stein W.</u> (2000) Convergence of Load and Movement Information onto Leg Motoneurons in Insects. *J Neurobiol* 43:424–436.
- 4. <u>Stein W.</u>, Sauer A.E (1998) Modulation of sensorimotor pathways associated with gain changes in a posture-control network of an insect. *J Comp Physiol* A 183(4):489-501.
- <u>Stein W.</u>, Sauer, A.E. (1999) Physiology of vibration sensitive afferents in the mesothoracic femoral chordotonal organ of the stick insect *Cuniculina impigra*. J comp Physiol A, 184:253-263.
- <u>Stein W.</u>, Schmitz J. (1999) Multimodal convergence of presynaptic afferent inhibition in insect proprioceptors. *J Neurophysiol* 83:512–514.
- <u>Stein W.</u>, Ausborn J. (2004) Analog modulation of digital computation in nerve cells: Simulating the stomatogastric nervous system of the crab. In: *Modelling and Simulation '2004*, Eurosis-ETI, Ghent (Belgium), pp.148-152.
- 8. <u>Stein W.</u>, Eberle C.C., Hedrich U.B.S. (2005) Motor pattern selection by nitric oxide in the stomatogastric nervous system of the crab. *Europ J Neurosci* 21(10):2767-2781.
- Stein W., Büschges A., Bässler U. (2006a) Intersegmental transfer of sensory signals in the stick insect leg muscle control system. *J Neurobiol* 66:1253–1269..
- Stein W., Smarandache C.R., Nickmann M., Hedrich U.B.S. (2006b) Functional consequences of activity-dependent synaptic enhancement at a crustacean neuromuscular junction. *J exp Biol* 209:1285-1300.
- 11. <u>Stein W.</u>, Straub O., Ausborn J., Mader W. (2006c) History dependend coding of sensory information. *Biol Cybern* in preparation.
- Straub O., Mader W., Ausborn J., <u>Stein W.</u> (2004) Motor output variability in a joint control system - a simulation study. In: *Modelling and Simulation '2004*, Eurosis-ETI, Ghent (Belgium), pp.135-139.
- Wood D.E., <u>Stein W.</u>, Nusbaum M.P. (2000) Projection Neurons with Shared Cotransmitters Elicit Different Motor Patterns from the Same Neural Circuit. *J Neurosci* 20(23):8943-8953.

8. Zitierte Literatur.

- 1. Akay T. (2002) The role of sensory signals for interjoint coordination in stick insect legs (*Carausius morosus* and *Cuniculina impigra*). Dissertation Universität zu Köln.
- Bartos M., Nusbaum M.P. (1997) Intercircuit control of motor pattern modulation by presynaptic inhibition. *J Neurosci* 17:2247-2256.
- Bartos M., Manor Y., Nadim F., Marder E., Nusbaum M.P. (1999) Coordination of fast and slow rhythmic neuronal circuits. *J Neurosci* 19:6650-6660.
- Bässler U. (1965) Proprioreceptoren am Subcoxal- und Femur-Tibia-Gelenk der Stabheuschrecke *Carausius morosus* und ihre Rolle bei der Wahrenehmung der Schwerkraftrichtung. *Kybernetik* 2:168-193.
- 5. Bässler U. (1973) Control of active movements of the femur-tibia-joint of the stick-insect *Carausius morosus. Kybernetik* 13:38-53
- Bässler U. (1974) Vom femoralen Chordotonalorgan gesteuerte Reaktionen bei der Stabheuschrecke *Carausius morosus*: Messung der von der Tibia erzeugten Kraft im aktiven und inaktiven Tier. *Kybernetik* 16:213-226.
- 7. Bässler U. (1976) Reversal of a reflex to a single motoneuron in the stick insect *Carausius morosus*. *Biol Cybern* 24:47-49.
- Bässler U. (1983) Neural basis of elementary behavior in stick insects. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Bässler U. (1986a) Afferent control of walking movements in the stick insect *Cuniculina impigra*. *J comp Physiol* A 158:345-349.
- Bässler U. (1986b) Afferent control of walking movements in the stick insect *Cuniculina impigra*. II. Reflex reversal and the release of the swing phase in the restrained foreleg. J comp Physiol A 158:351-362.
- Bässler U. (1988) Functional principles of pattern generation for walking movements of stick insect forelegs: The role of the femoral chordotonal organ afferences. *J exp Biol* 136:125-147.
- 12. Bässler U. (1992) Variability of femoral chordotonal organ reflexes in the locust *Locusta* migratoria. Physiol Entomol 17:208-212.
- 13. Bässler U. (1993) The femur-tibia control system of stick insects a model system for the study of the neural basis of joint control. *Brain Res Rev* 18:207-226.
- 14. Bässler U., Wegner U. (1983) Motor output of the denervated thoracic ventral nerve cord in the stick insect *Carausius morosus*. *J exp Biol* 105:127-145.
- Bässler U., Koch U.T. (1989) Modelling of the active reaction of stick insects by a network of neuromimes. *Biol Cybern* 62:141-150.

- 16. Bässler U., Büschges A. (1990) Interneurones participating in the 'active reaction' in stick insects. *Biol Cybern* 62:529-538.
- Bässler U., Nothof U. (1994) Gain control in a proprioceptive feedback loop as a prerequisite for working close to instability. *J comp Physiol* A 175:23-33.
- Bässler U., Stein W. (1996) Contributions of structure and innvervation pattern of the stick insect extensor tibiae muscle to the filter characteristics of the muscle-joint system. *J exp Biol* 199:2185-2198.
- Bässler U., Sauer A.E., Büschges A. (2003) Vibration signals from the FT joint can induce phase transitions in both directions in motoneuron pools of the stick insect walking system. J Neurobiol 56(2):125-38.
- 20. Beenhakker M.P., Nusbaum M.P. (1999) Motor pattern modulation via activation of a peripheral pathway. *Soc Neurosci Abstr* 25:1645.
- 21. Beenhakker M.P., Hertzberg S., Nusbaum M.P. (2000) Neural network modulation by mechanosensory activation. *Soc Neurosci Abstr* 26:449.
- 22. Beenhakker M.P., Blitz D.M., Nusbaum M.P. (2004) Long-lasting activation of rhythmic neuronal activity by a novel mechanosensory system in the crustacean stomatogastric nervous system. *J Neurophysiol* 91:78-91.
- 23. Bentley D., Konishi M. (1978) Neural control of behavior. Ann Rev Neurosci 1:35-59
- Birmingham J.T., Szuts Z.B., Abbott L.F., Marder E. (1999) Encoding of muscle movement on two time scales by a sensory neuron that switches between spiking and bursting modes. J Neurophysiol 82:2786-2797.
- 25. Blagburn J.M., Sattelle D.B. (1987) Nicotinic acetylcholine receptors on a cholinergic nerve terminal in the cockroach, *Periplaneta americana*. J Comp Physiol A 161(2):215-25.
- 26. Blitz D.M., Nusbaum M.P. (1997) Motor pattern selection via inhibition of parallel pathways. *J Neurosci* 17:4965-4975.
- 27. Blitz D.M., Nusbaum M.P. (1999) Distinct functions for cotransmitters mediating motor pattern selection. *J Neurosci* 19:6774-6783.
- Blitz D.M., Christie A.E., Coleman M.J., Norris B.J., Marder E., Nusbaum M.P. (1999) Different proctolin neurons elicit distinct motor patterns from a multifunctional neuronal network. J Neurosci 19:5449-5463.
- 29. Böhm H., Dybek E., Heinzel H.G. (2001) Anatomy and *in vivo* activity of neurons connecting the crustacean stomatogastric nervous system to the brain. *J Comp Physiol* A 187:393-403
- Brezina V., Weiss K.R. (1997) Analyzing the functional consequences of transmitter complexity. *Trends Neurosci* 11:538-543.
- 31. Büschges A. (1989) Processing of sensory input from the femoral chordotonal organ by spiking interneurones of the stick insect. *J exp Biol* 144:81-111.

- 32. Büschges A. (1990) Non-spiking pathways in a joint-control loop of the stick insect *Carausius morosus*. *J exp Biol* 151, 133-160.
- 33. Büschges A. (1994) The physiology of sensory cells in the ventral scoloparium of the stick insect femoral chordotonal organ. *J exp Biol* 189:285-292.
- 34. Büschges A. (1995) Role of nonspiking interneurones in the generation of rhythmic motor activity in the stick insect. *J Neurobiol* 21:488-512.
- 35. Büschges A., Kittmann R., Schmitz J. (1994) Identified nonspiking interneurones in leg reflexes and during walking in the stick insect. *J comp Physiol* A 174:685-700.
- 36. Burrows M. (1996) *The Neurobiology of an insect brain*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press.
- 37. Burrows M., Laurent G. (1993) Synaptic potentials in the central terminals of locust proprioceptive afferents generated by other afferents from the same sense organ. J Neurosci 13(2):808-19.
- Byrne J., Castellucci V. Carew T., Kandel E. (1978a). Stimulus-response relations and stability of mechanoreceptor and motor neurons mediating defensive gill-withdrawal reflex in *Aplysia. J Neurophys* 41(2):402-417.
- Byrne J., Castellucci V., Kandel E. (1978b). Contribution of individual mechanoreceptor sensory neurons to defensive gill-withdrawal reflex in *Aplysia. J Neurophys* 41(2):418-431.
- 40. Cattaert D., el Manira A., Clarac F. (1992) Direct evidence for presynaptic inhibitory mechanisms in crayfish sensory afferents. *J Neurophysiol* 67(3):610-24.
- 41. Christie A.E., Stein W., Quinlan J.E., Beenhakker M.P., Marder E., Nusbaum M.P. (2004) Actions of a histaminergic/peptidergic projection neuron on rhythmic motor patterns in the stomatogastric nervous system of the crab *Cancer borealis*. J Comp Neurol 469:153-69.
- 42. Clarac F., Cattaert D. (1996) Invertebrate presynaptic inhibition and motor control. *Exp Brain Res* 112(2):163-80.
- 43. Coleman M.J., Nusbaum M.P. (1994) Functional consequences of compartmentalization of synaptic input. *J Neurosci* 14:6544-6552.
- 44. Coleman M.J., Nusbaum M.P., Cournil I., Claiborne B.J. (1992) Distribution of modulatory inputs to the stomatogastric ganglion of the crab, *Cancer borealis*. J Comp Neurol 325:581-594.
- 45. Coleman M.J., Meyrand P., Nusbaum M.P. (1995) A switch between two modes of synaptic transmission mediated by presynaptic inhibition. *Nature* 378:502-505.
- 46. Combes D., Simmers J., Moulins M. (1995) Structural and functional characterization of a muscle tendon proprioceptor in lobster. *J Comp Neurol* 363:221-234.
- 47. Cruse, H. (1990) What mechanisms coordinate leg movement in walking arthropods. *TINS* 13:15-21.

- 48. Cruse H., Dean J., Kindermann T., Schmitz J. (1997) Simulation komplexer Bewegungen mit Hilfe künstlicher neuronaler Netze. *Neuroforum* 4/97:133-139.
- 49. DiCaprio R.A., Clarac F. (1981) Reversal of a walking leg reflex elicited by a muscle receptor. *J exp Biol* 90:197-203.
- 50. Driesang R.B., Büschges A. (1996) Physiological changes in central neuronal pathways contributing to the generation of reflex reversal. *J comp Physiol* A 179:45-57.
- 51. Eidmann H. (1956) Über rhythmische Erscheinungen bei der Stabheuschrecke *Carausius morosus. Br Z Vgl Physiol* 38:370-390.
- 52. Field L.H., Pflüger H.-J. (1989) The femoral chordotonal organ: A bifunctional orthopteran sense organ? *Comp Biochem Physiol* 93:729-743.
- 53. Forssberg H., Grillner S., Rossignol S. (1975) Phase dependent reflex reversal during walking in chronic spinal cats. *Brain Res* 85:103-107.
- 54. Füller H., Ernst A. (1973) Die Ultrastruktur der femoralen Chordotonalorgane von *Carausius morosus. BR Zool Jb Anat* 91:574-601.
- 55. Godden D., Goldsmith T.H. (1972) Photoinhibition of arousal in the stick insect *Carausius*. Z vergl Physiologie 76:135-145.
- 56. Grillner S., Georgopoulus A.P., Jordan L.M. (1997) Selection and initiation of motor behavior. In: *Neurons, networks and motor behavior*, (eds, Stein PSG, Grillner S, Selverston A.I., Stuart D.G.), pp.3-20. Cambridge, MA:MIT Press.
- 57. Harris-Warrick R.M., Marder E., Selverston A.I., Moulins M. (1992) *Dynamic biological networks: the stomatogastric nervous system.* Cambridge, MA:MIT Press.
- 58. Harris-Warrick R.M., Baro D.J., Coniglio L.M., Johnson B.R., Levini R.M., Peck J.H., Zhang B. (1997) Chemical modulation of crustacean stomatogastric pattern generator networks. In: *Neurons, networks, and motor behavior* (eds, Stein P.S.G., Grillner S., Selverston A.I., Stuart D.G.), pp.209-215. Cambridge, MA:MIT Press.
- 59. Heinzel H.G., Weimann J.M., Marder E. (1993) The behavioral repertoire of the gastric mill in the crab, *Cancer pagurus*: an *in situ* endoscopic and electrophysiological examination. J *Neurosci* 13:1793-1803.
- 60. Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117(4):500-44.
- 61. Hofmann T., Koch U.T. (1985) Acceleration receptors in the femoral chordotonal organ of the stick insect, *Cuniculina impigra*. *J exp Biol* 114:225-237.
- 62. Hofmann T., Koch U.T., Bässler U. (1985) The physiology of the femoral chordotonal organ in the stick insect, *Cuniculina impigra*. *J exp Biol* 114:207-223.
- 63. Izhikevich E.M. (2003) Simple Model of Spiking Neurons. *IEEE Transactions on Neural Networks* 14:1569-1572.

- 64. Izhikevich E.M. (2004) Which Model to Use for Cortical Spiking Neurons? *IEEE Transactions* on Neural Networks 15:1063-1070.
- 65. Jacobs G.A., Theunissen F.E. (1996) Functional organization of a neural map in the cricket cercal sensory system. *J Neurosci* 16:796-784.
- 66. Kalmus H. (1938) Tagesperiodisch verlaufende Vorgänge an der Stabheuschrecke Dixippus morosus. Z vgl Physiol 25:494-508.
- Katz P.S., Harris-Warrick R.M. (1989) Serotonergic/cholinergic muscle receptor cells in the crab stomatogastric nervous system. II. Rapid nicotinic and prolonged modulatory effects on neurons in the stomatogastric ganglion. *J Neurophysiol* 62:571-581.
- 68. Katz P.S., Harris-Warrick R.M. (1990) Neuromodulation of the crab pyloric central pattern generator by serotonergic/cholinergic proprioceptive afferents. *J Neurosci* 10:1495-1512.
- 69. Katz P.S., Harris-Warrick R.M. (1991) Recruitment of crab gastric mill neurons into the pyloric motor pattern by mechanosensory afferent stimulation. *J Neurophysiol* 65:1442-1451.
- Katz P.S., Eigg M.H., Harris-Warrick R.M. (1989) Serotonergic/cholinergic muscle receptor cells in the crab stomatogastric nervous system. I. Identification and characterization of the gastropyloric receptor cells. *J Neurophysiol* 62:558-570.
- 71. Kiehn O., Harris-Warrick R.M. (1992) Serotonergic stretch receptors induce plateau properties in a crustacean motor neuron by a dual-conductance mechanism. *J Neurophysiol* 68:485-495.
- 72. Kittmann R. (1991) Gain control in the femur-tibia feedback system of the stick insect. *J exp Biol* 157:503-522.
- 73. Kittmann R. (1997) Neural mechanisms of adaptive gain control in a joint control loop: Muscle force and motoneuronal activity. *J exp Biol* 200:1383-1402.
- 74. Kittmann R., Schmitz J. (1992) Functional specialization of the scoloparia of the femoral chordotonal organ in stick insects. *J exp Biol* 173:91-108.
- 75. Kittmann R., Schmitz J., Büschges A. (1996) Premotor interneurons in generation of adaptive leg reflexes and voluntary movements in stick insects. *J Neurobiol* 31(4):512-32.
- 76. Kristan W.B. Jr., Shaw B.K. (1997) Population coding and behavioral choice. *Curr Opin Neurobiol* 7:826-831.
- Lieske S.P., Thoby-Brisson M., Telgkamp P., Ramirez J.M. (2000) Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat Neurosci* 6:600-607.
- Ludwar B.Ch., Goritz M.L., Schmidt J. (2005) Intersegmental coordination of walking movements in stick insects. *J Neurophysiol* 93(3):1255-65.
- 79. Marder E. (2000) Motor pattern generation. Curr Opin Neurobiol 10:691-698.
- 80. Marder E., Calabrese R.L. (1996) Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* 76:687-717.

- 81. Marder E., Christie A.E., Kilman V.L. (1995) Functional organization of cotransmission systems: lessons from small nervous systems. *Invert Neurosci* 1:105-112.
- Matheson T. (1997) Octopamine modulates the responses and presynaptic inhibition of proprioceptive sensory neurons in the locust *Schistocerca gregaria*. J exp Biol 200:1317-1325.
- Maynard D.M., Dando M.R. (1974) The structure of the stomatogastric neuromuscular system in Callinectes sapidus, Homarus americanus and Panulirus argus (Decapoda Crustacea). Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 268:161-220.
- Norris B.J., Coleman M.J., Nusbaum M.P. (1994) Recruitment of a projection neuron determines gastric mill motor pattern selection in the stomatogastric nervous system of the crab, *Cancer borealis. J Neurophysiol* 72:1451-1463.
- 85. Nusbaum M.P. (2002) Regulating peptidergic modulation of rhythmically active neural circuits. *Brain Behav Evol* 60:378-387.
- Nusbaum M.P., Marder E. (1989a) A modulatory proctolin-containing neuron (MPN). I. Identification and characterization. *J Neurosci* 9:1591-1599.
- 87. Nusbaum M.P., Marder E. (1989b) A modulatory proctolin-containing neuron (MPN). II. Statedependent modulation of rhythmic motor activity. *J Neurosci* 9:1600-1607.
- Nusbaum M.P., Beenhakker M.P. (2002) A small-systems approach to motor pattern generation. *Nature* 417:343-350.
- Nusbaum M.P., Weimann J.M., Golowasch J., Marder E. (1992) Presynaptic control of modulatory fibers by their neural network targets. *J Neurosci* 12:2706-2714.
- 90. Nusbaum M.P., Blitz D.M., Swensen A.M., Wood D., Marder E. (2001) The roles of cotransmission in neural network modulation. *Trends Neurosci*, 24:146-154.
- 91. Pearson K.G. (1995) Reflex reversal in the walking systems of mammals and arthropods. In: *Neural control of movement*, edited by Ferrell W.R. and Proske U., New York: Plenum Press, pp.135-141.
- 92. Pearson K.G., Collins D.F. (1993) Reversal of the influence of group Ib afferents from plantaris on activity in medial gastrocnemius muscle during locomotor activity. J Neurophys 70:1009-1017.
- 93. Pfüger H.-J. (1976) Zur Steuerung der Schaukel- und Laufbewegungen bei den Phasmiden *Carausius morosus* und *Extatosoma tiaratum*. Dissertation Universität Kaiserslautern.
- 94. Pflüger H.-J. (1977) The control of the rocking movements of the phasmid *Carausius morosus*. *Br J comp Physiol* 120:181-202.
- 95. Robertson R.M., Pearson K.G. (1985) Neural circuits in the flight system of the locust. J Neurophys 53:110-128.
- 96. Sauer A.E., Stein W. (1999) Sensorimotor pathways processing vibratory signals from the femoral chordotonal organ of the stick insect. *J comp Physiol* A 185:21-31.

- 97. Sauer A.E., Driesang R.B., Büschges A., Bässler U. (1995) Information processing in the femurtibia control loop of stick insects 1. The response characteristics of two nonspiking interneurones result from parallel excitatory and inhibitory inputs. *J comp Physiol* A 177:145-158.
- 98. Sauer A.E., Driesang R.B., Büschges A., Bässler U. (1996) Distributed processing on the basis of parallel and antagonistic pathways. Simulation of the femur-tibia control system in the stick insect. *J comput Neurosci* 3:179-198.
- 99. Sauer A.E., Büschges A., Stein W. (1997) The role of presynaptic afferent inhibition in tuning sensorimotor pathways in an insect joint-control network. *J Neurobiol* 32:359-376.
- 100. Schmitz J. (1993) Load compensatory reactions in the proximal leg joints of stick insects during standing and walking. *J exp Biol* 183:15–33.
- 101. Schmitz J., Stein W. (2000) Convergence of Load and Movement Information onto Leg Motoneurons in Insects. J Neurobiol 43:424–436.
- 102. Scholz N.L., de Vente J., Truman J.W., Graubard K. (2001) Neural network partitioning by NO and cGMP. *J Neurosci* 21:1610-1618.
- 103. Selverston A.I., Moulins M. (1987) The crustacean stomatogastric system. Springer Verlag.
- 104. Sillar K.T., Skorupski P. (1986) Central input to primary afferent neurons in crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, is correlated with rhythmic motor output of thoracic ganglia. J *Neurophysiol* 55(4):678-688.
- 105. Simmers J., Moulins M. (1988a) A disynaptic sensorimotor pathway in the lobster stomatogastric system. J Neurophysiol 59:740-756.
- 106. Simmers J., Moulins M. (1988b) Nonlinear interneuronal properties underlie integrative flexibility in a lobster disynaptic sensorimotor pathway. *J Neurophysiol* 59:757-777.
- 107. Skiebe P. (2001) Neuropeptides are ubiquitous chemical mediators: Using the stomatogastric nervous system as a model system. *J exp Biol* 204:2035-2048.
- 108. Skorupski P., Sillar K.T. (1986) Phase-dependent reversal of reflexes mediated by the thoracocoxal muscle receptor organ in the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. J Neurophys 55:689-695.
- 109. Sparks D.L. (1999) Conceptual issues related to the role of the superior colliculus in the control of gaze. *Curr Opin Neurobiol* 9:698-707.
- 110. Sparks D.L., Kristan W.B. Jr., Shaw B.K. (1997) The role of population coding in the control of movement. In: *Neurons, networks and motor behavior*. (eds, Stein P.S.G., Grillner S., Selverston A.I., Stuart D.G.), pp.21-32. Cambridge, MA:MIT Press.
- 111. Stein P.S.G., Grillner S., Selverston A.I., Stuart D.G. (1997) *Neurons, networks, and motor behavior*. Cambridge, MA:MIT Press.
- 112. Stein W., Sauer A.E. (1998) Modulation of sensorimotor pathways associated with gain changes in a posture-control network of an insect. *J Comp Physiol* A 183(4):489-501.

- 113. Stein W., Sauer A.E. (1999) Physiology of vibration sensitive afferents in the mesothoracic femoral chordotonal organ of the stick insect *Cuniculina impigra*. J comp Physiol A 184:253-263.
- 114. Stein W., Schmitz J. (1999) Multimodal convergence of presynaptic afferent inhibition in insect proprioceptors. J Neurophysiol 83:512–514.
- 115. Stein W., Ausborn J. (2004) Analog modulation of digital computation in nerve cells: Simulating the stomatogastric nervous system of the crab. In: *Modelling and Simulation '2004*, Eurosis-ETI, Ghent (Belgium), pp.148-152.
- 116. Stein W., Eberle C.C., Hedrich U.B.S. (2005) Motor pattern selection by nitric oxide in the stomatogastric nervous system of the crab. *Europ J Neurosci* 21(10):2767-2781.
- 117. Stein W., Büschges A., Bässler U. (2006a) Intersegmental transfer of sensory signals in the stick insect leg muscle control system. *J Neurobiol* accepted.
- 118. Stein W., Smarandache C.R., Nickmann M., Hedrich U.B.S. (2006b) Functional consequences of activity-dependent synaptic enhancement at a crustacean neuromuscular junction. J exp Biol 209:1285-1300.
- 119. Stein W., Straub O., Ausborn J., Mader W. (2006c) History dependend coding of sensory information. *Biol Cybern* in preparation.
- 120. Steininger F. (1933) Die Erscheinung der Katalepsie bei Stabheuschrecken und Wasserläufern. Z Morphol Ökol Tiere 26:592-708.
- 121. Straub O. (2006) Simulation des Gelenkstellungskontrollsystems für Stehen und Laufen durch Modellierung eines Neuronennetzwerkes auf der Basis physiologischer Eigenschaften. Dissertation, Universität Ulm.
- 122. Straub O., Mader W., Ausborn J., Stein W. (2004) Motor output variability in a joint control system - a simulation study. In: *Modelling and Simulation '2004*, Eurosis-ETI, Ghent (Belgium), pp.135-139.
- 123. Wang D.L. (1999) *Relaxation Oscillators and Networks*. In: Webster J.G. (Hrsg.). Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering. Vol.18. Wiley & Sons, 396-405.
- 124. Weiland G., Koch U.T. (1987) Sensory feedback during active movements of stick insects. *J exp Biol* 133:137-156.
- 125. Weimann J.M., Marder E. (1994) Switching neurons are integral members of multiple oscillatory networks. *Curr Biol* 4:896-902.
- 126. Weimann J.M., Meyrand P., Marder E. (1991) Neurons that form multiple pattern generators: identification and multiple activity patterns of gastric/pyloric neurons in the crab stomatogastric system. *J Neurophysiol* 65:111-122.
- 127. Weimann J.M., Marder E., Evans B., Calabrese R.L. (1993) The effects of SDRNFLRFamide and TNRNFLRFamide on the motor patterns of the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis. J exp Biol* 181:1-23.

- 128. Wolf H. (1991) Sensory feedback in locust flight patterning. In: Locomotor neural mechanism in arthropods and vertebrates. Edited by Armstrong, D.M. and Bush, B.M.H. Manchester:Manchester Univ Press, pp.134-148.
- 129. Wolf H. (1992) Reflex modulation in locusts walking on a treadwheel intracellular recordings from motoneurons. *J comp Physiol* A 170:443-462.
- 130. Wolf H., Burrows M. (1995) Proprioceptive sensory neurons of a locust leg receive rhythmic presynaptic inhibition during walking. *J Neurosci* 15:5623-5636.
- 131. Wood D.E., Stein W., Nusbaum M.P. (2000) Projection neurons with shared cotransmitters elicit different motor patterns from the same neural network. *J Neurosci* 20:8943-8953.
- 132. Yang J., Stein R. (1990) Phase-dependent reflex reversal in human leg muscles during walking. J Neurophysiol 63(5):1109-1117.
- 133. Zhang B., Harris-Warrick R.M. (1994) Multiple receptors mediate the modulatory effects of serotonergic neurons in a small neural network. *J exp Biol* 190:55-77.