
Über den Einfluss von Neuropeptid Y auf die Amplitude und die Entladungsrate
axonterminaler Aktionspotenziale retinaler Ganglienzellen der
Klasse R2 und R3 im Tectum opticum während visueller
Stimulation der Rotbauchunke *Bombina orientalis*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

- Dr. rer. nat. -

des Fachbereiches Naturwissenschaften

Institut für Biologie

Abteilung Neurobiologie

der

Universität Kassel

vorgelegt von

Frauke Ribbekamp

aus Brebach/Fechingen

Kassel 2006

Vom Fachbereich 18 (Naturwissenschaften) der Universität Kassel als
Dissertation angenommen

Tag der Disputation : 17.08.2006

Referent:

Prof. Dr. J.-P. Ewert

Leiter der Abteilung Neurobiologie

Universität Kassel

Co-Referentin:

Prof. Dr. A. Wöhrmann-Repenning

Abteilung Zoologie/Vergleichende Anatomie

Universität Kassel

Mein herzlicher Dank gilt dem Leiter der Abteilung Neurobiologie, Herrn Prof. Dr. J.-P. Ewert für die Anregung zum Thema meiner Dissertation, die wissenschaftliche Betreuung während dieser Zeit, seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie für die Bereitstellung eines Forschungslabors. Ohne sein Engagement wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Prof. Dr. Wöhrmann-Repenning danke ich für die Übernahme des Co-Referates.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Neurobiologie für die Unterstützung in allen Phasen dieser Promotion bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. Evelyn Schürg-Pfeiffer und Herrn Dr. Wolfgang W. Schwippert für ihren fachlichen Rat und die stete Unterstützung, weit über das kollegiale Maß hinaus.

Dank gilt auch meinen Freunden und meiner Familie, die es mir ermöglichten diese Arbeit fertig zu stellen, hierbei besonders Ännie und Boris.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 4 |
| 2 | Anatomische Grundlagen | 6 |
| 2.1 | Das visuelle System der Anuren | 6 |
| 2.1.1 | Aufbau der Retina | 6 |
| 2.1.2 | Praetectum | 7 |
| 2.1.3 | Tectum opticum | 9 |
| 2.1.4 | Retinale Ganglienzellen | 12 |
| 2.1.5 | Neuronen der Klasse R2 | 13 |
| 2.1.6 | Neuronen der Klasse R3 | 13 |
| 2.1.7 | Neuronen der Klasse R4 | 13 |
| 3 | Material und Methode | 14 |
| 3.1 | Versuchstier, <i>Bombina orientalis</i> (Chinesische Rotbauchunke) | 14 |
| 3.1.1 | Habitus und Lebensweise | 14 |
| 3.1.2 | Tierhaltung | 15 |
| 3.1.3 | Narkose und Operation | 16 |
| 3.1.4 | Demobilisierung | 18 |
| 3.2 | Neuropeptid Y (NPY) | 20 |
| 3.2.1 | Wirkungsweise von NPY | 20 |
| 3.2.2 | NPY Rezeptoren | 21 |
| 3.3 | Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung | 23 |
| 3.3.1 | Intrazelluläre Ableitung | 24 |
| 3.4 | Visuelle Stimulation | 25 |
| 3.5 | Markierung des Ableitortes | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6 Mikroelektroden | 28 |
| 3.6.1 Herstellung der Ableitelektroden | 28 |
| 3.6.2 Mikroelektrodentest | 29 |
| 3.6.3 Applikationskapillaren | 29 |
| 3.7 Bestimmung der Spike-Amplituden und der Spike-Raten mit Hilfe der Software Spike 2 | 30 |
| 3.7.1 Kontrollversuche | 30 |
| 3.7.2 Bestimmung der Spike-Amplituden | 31 |
| 3.7.3 Bestimmung der Spike-Raten | 33 |
| 3.8 Statistik | 35 |
| 4 Ergebnisse | 36 |
| 4.1 Kontrollversuche: Reizmusterserien auf visuelle Bewegungsmuster | 36 |
| 4.1.1 Vorbemerkungen | 36 |
| 4.1.2 Spike-Amplitude | 37 |
| 4.1.3 Spike-Rate | 44 |
| 4.2 Der Einfluss von NPY auf visuelle Antworten retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 | 51 |
| 4.2.1 Einfluss auf die Spike-Amplituden | 51 |
| 4.2.2 Einfluss auf die Entladungsrate | 57 |
| 4.3 Der Einfluss von NPY auf visuelle Antworten retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 | 65 |
| 4.3.1 Einfluss auf die Spike-Amplituden | 65 |
| 4.3.2 Einfluss auf die Entladungsrate | 71 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5 | Diskussion | 78 |
| 5.1 | Kontrollversuche: Reizmuster-Serien | 78 |
| 5.2 | Vorbemerkungen zu Neuropeptid Y | 79 |
| 5.3 | Der Einfluss von NPY auf die Amplituden der Entladungen retinaler Ganglienzellen | 81 |
| 5.4 | Der Einfluss von NPY auf die Entladungsrate retinaler Ganglienzellen | 85 |
| 5.5 | Kritik an der Methode bezüglich Schlussfolgerungen | 86 |
| 5.6 | Abschließende Diskussion der Ergebnisse | 88 |
| 6 | Zusammenfassung | 92 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 95 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 109 |
| 9 | Anhang | 117 |
| 9.1 | Abkürzungsverzeichnis | 117 |
| 9.2 | Angewandte statistische Verfahren | 118 |
| 9.2.1 | Mittelwert | 118 |
| 9.2.2 | Standardabweichung | 118 |
| 9.2.3 | Standardfehler | 118 |
| 9.2.4 | Friedman-Test (Rangvarianzanalyse) | 119 |
| 9.2.5 | Wilcoxon-Test für Paardifferenzen | 120 |
| 9.3 | Physiologische Blutersatzlösung (Ringerlösung) für Unken und Kröten | 120 |
| 9.4 | Erklärung | 121 |
| 9.5 | Curriculum Vitae | 122 |

1 Einleitung

Vergleicht man das Gehirn eines Amphibium mit dem Gehirn des Menschen, so fällt auf, dass beiden ein gemeinsamer Bauplan zu Grunde liegt. Mit Ausnahme des beim Menschen deutlich ausgeprägten zerebralen Kortex finden sich auch im Amphibiengehirn die beim Menschen vorkommenden Strukturen wie Vorderhirn, Zwischenhirn, Mittelhirn, Tectum opticum, Thalamus, Kleinhirn, Nachhirn und Rückenmark, wenn auch in deutlich unterschiedlicher Ausprägung und Differenzierung. Gelingt es, die grundsätzlichen Zusammenhänge der visuellen Informationsverarbeitung bei Amphibien zu analysieren, könnte dies einen Beitrag zum Verständnis der neurophysiologischen Zusammenhänge bei höheren Vertebraten ergeben.

Neuropeptid Y (NPY) ist ein potenter Neurotransmitter/modulator im zentralen und peripheren Nervensystem der Mammalia. Er wurde erstmals 1982 von TATEMOTO in Schweinehirnen nachgewiesen und ist bei der Steuerung einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen von Bedeutung, wie beispielsweise der Regulation der Nahrungsaufnahme (INUI 1999), der Fettspeicherung (INGENHOVEN & BECK-SICKINGER 1999) oder der Sekretion von Wachstumshormonen (KARLA et al. 1992).

Auch bei Amphibien konnte NPY in verschiedenen Hirnstrukturen nachgewiesen werden, unter anderem im Pallium, im praetectalen Thalamus (Lpd und Lpv), im Tectum opticum, dem Torus semicircularis sowie im Tegmentum (DANGER 1985, TONON 1992, LÁZÁR 1993). Die genaue Wirkungsweise von NPY im retino-tectalen Transfer bei Anuren ist noch nicht hinreichend geklärt, es ist jedoch unumstritten, dass es unter anderem bei der visuellen Mustererkennung sowie bei der tectalen Erregungsausbreitung eine entscheidende Rolle spielt. Es gilt als wahrscheinlich, dass der retino-tectale Transfer u. a. mittels NPY kontrolliert wird, denn die lokale NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche führt zur Reduktion excitatorischer Komponenten visuell evozierter Feldpotentiale (SCHWIPPERT & EWERT 1995, SCHWIPPERT et al. 1998).

Weiterhin konnten NPY-immunoreaktive Fasern im Tectum nachgewiesen werden, die von ipsilateralen, praetectalen thalamischen Arealen stammen (KOZICZ & LÁZÁR 1993, CHAPMAN et al. 1995).

Die Retina bildet bei Amphibien die erste Instanz der Verarbeitung visueller Informationen. Die Weiterverarbeitung erfolgt direkt über das Tectum opticum und den Thalamus (EWERT 1997). Retinale Ganglienzellen stehen indirekt über praetecto-tectale Projektionsbahnen mit dem Tectum in Verbindung (EWERT et al. 1974a, WEERASURYIA & EWERT 1983, KOZICZ & LÁZÁR 1993, NORTHCUTT 1999). Mit Hilfe von Läsionsversuchen, in denen die praetectale Lpd/P Region entweder mechanisch oder pharmakologisch ausgeschaltet wurde, konnte der Nachweis hemmender thalamischer-praetectaler Einflüsse erbracht werden. Als Projektionsneuronen kommen bei Kröten TH3 und TH4-Neuronen in Frage (BUXBAUM-CONRADI & EWERT 1995, EWERT 1974, EWERT et al. 1996).

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zur Klärung des retino-tectalen Transfers bei Anuren geliefert werden. Hierbei war die Wirkung von Neuropeptid Y auf die Amplitude und die Spike-Rate axonterminaler Aktionspotenziale durch Einzelleitungen retinaler Ganglienzellen der Klassen R2 und R3 bei der Chinesischen Rotbauchunke (*Bombina orientalis*) zu untersuchen. Diese Neuronen liefern den größten Input in das praetectal-tectale Netzwerk u. a. für die konfigurale Mustererkennung (EWERT 1984, 1987, 1991).

Falls bei retinalen Ganglienzellen im Tectum von *Bombina orientalis* eine Beeinflussung der Spike-Amplitude und der Spike-Rate durch NPY nachweisbar sein sollte, so wird dies Rückschlüsse auf die Wirkung von NPY im Tectum zulassen.

2 Anatomische Grundlagen

2.1 Das visuelle System der Anuren

Die Vorverarbeitung visueller Informationen findet bei Anuren, wie bei allen Vertebraten, in der Retina statt. Bei Amphibien erfolgt die Weiterverarbeitung des visuellen Inputs in erster Linie im Tectum opticum (TO) und im praetectalen Thalamus (EWERT 1997), zusätzlich sind verschiedene Strukturen des Vorderhirns und des Hirnstammes an der weiteren Verarbeitung beteiligt. Abbildung 1 zeigt eine schematische Übersicht der an der Verarbeitung visueller Information beteiligten Strukturen.

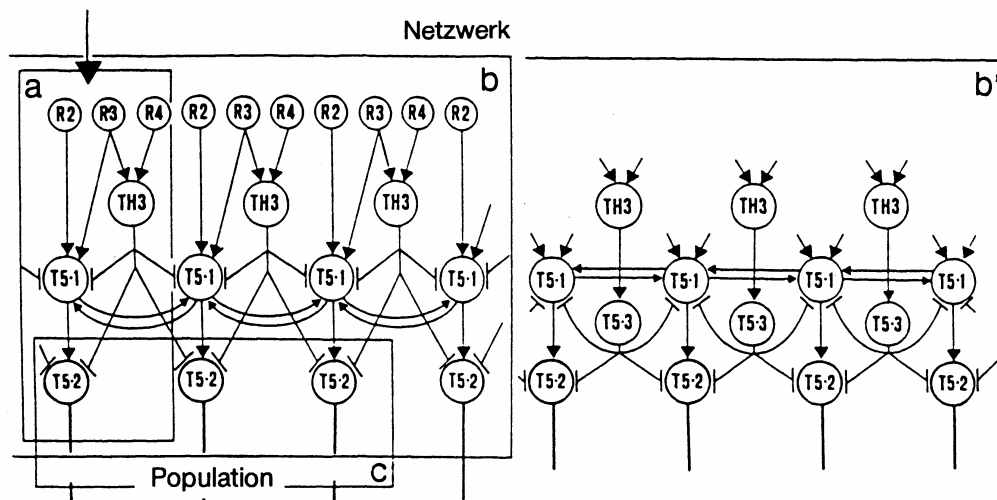


Abbildung 1: Projektionsbahnen des Nervus opticus zu den verarbeitenden Hirnarealen. Dargestellt werden mögliche Verschaltungen in retino-praetectalen und retino-tectalen Netzwerken sowie im praetecto-tectalen Netzwerk. Die Funktionseinheit (a) ist in ein praetecto-tectales Netzwerk (b) integriert, dessen Output von tectalen Neuronenpopulationen, z.B. T 5.2 Neuronen (c), verarbeitet und weitergeleitet wird. Im rechts dargestellten Netzwerk b' ist eine direkte hemmende Einflussnahme praetectaler Neuronen (TH3) auf tectale Neuronen dargestellt. Der Ausschnitt des neuronalen Netzwerkmodells rechts zeigt die indirekte inhibitorische Kontrolle des Praetectum über tectale Interneuronen (T 5.3), die auf Erregung durch TH3, einen hemmenden Input an T 5.1 und T 5.2 weitergeben. R2, R3, R4 = retinale Ganglienzellen; TH3 = thalamische Neuronen; T 5.2, T 5.3 = tectale Neuronen (nach EWERT 1991).

2.1.1 Aufbau der Retina

Die Retina ist eine dünne Schicht neuralen Gewebes am Augenhintergrund (CAJAL 1892). Die Retina aller Vertebraten hat prinzipiell einen gemeinsamen

Grundbauplan. Dies konnte aufgrund mikroskopisch-anatomischer Untersuchungen gezeigt werden (DOWLING 1976). Es bestehen allerdings Unterschiede bezüglich der Zahl und Dichte der synaptischen Verbindungen, der zellulären Verschaltungsmuster sowie der Topographie von Zelltypen. Hieraus resultieren unterschiedliche Antwortcharakteristika der Ganglienzelltypen verschiedener Species. Neben Rezeptorzellen, Stäbchen und Zapfen, sind in der Retina vier weitere Neuronentypen lokalisiert, Bipolarzellen, Horizontalzellen, amakrine Zellen und Ganglienzellen. Jede Ganglienzelle steht über vertikale Verknüpfungen mit mehreren Rezeptorzellen in Verbindung (DOWLING 1970).

Jeder Ganglienzelle ist ein Gesichtsfeldausschnitt zugeordnet, der als rezeptives Feld (RF) bezeichnet wird. Das RF gliedert sich in ein zentrales excitatorisches rezeptives Feld (ERF) und ein umgebendes inhibitorisches rezeptives Feld (IRF) (LETTVIN et al. 1959). Bei Anuren liegt eine nahezu vollständige Kreuzung der Ganglienzellaxone im Chiasma opticum zu kontralateralen Gebieten im praetectalen Thalamus und zum TO vor (LARZAR 1971, GRÜSSER & GRÜSSER-CORNEHLS 1976). Vom Chiasma ziehen Projektionen zur ventrolateralen Wand des Diencephalon, bilaterale zum Nucleus Belonci, Corpus geniculatum und anterioren Nucleus sowie zum postdorsalen Teil des lateralen praetectalen thalamischen Nucleus und zum posterioren praetectalen thalamischen Nucleus. Die erste Stufe der Verarbeitung bildet die Retina. Die Lokalisation, Auswertung und Zuordnung der retinalen Eindrücke erfolgt durch Zusammenwirken mit nachgeschalteten komplexen Funktionseinheiten des zentralen visuellen Systems (EWERT 1976, 1984).

2.1.2 Praetectum

Tectum opticum und Praetectum bilden die sekundären und tertiären Verarbeitungsstrukturen bei der Kodierung und Analyse optischer Signale. Wichtig hierbei ist die parallele und interaktive Verarbeitung der optischen Signale in beiden Hirnarealen (EWERT 1986, 1987). Beim praetectalen Thalamus handelt es sich um ein Areal zwischen Diencephalon und Mesencephalon bzw. zwischen caudalem Thalamus und rostralem Tectum opticum, das dem Diencephalon zugeordnet wird (NEARVY & NORTHCUTT 1983). Er setzt sich zusammen aus dem lateralen posteroventralen Nucleus (Lpd), dem posteroventralen Nucleus

(Lpv) und dem posterioren Nucleus (P). Diese Nuclei fungieren als Schaltstellen zwischen verschiedenen Vorderhirnstrukturen und dem Tectum opticum im Zusammenhang mit Lern- und Startprogrammen (EWERT 1971).

Im Tectum sind laterale Erregungsprozesse von besonderer Bedeutung. Diese müssen zur Vermeidung einer ungehinderten Erregungsausdehnung über weitere inhibitorische Mechanismen kontrolliert werden. Hier werden sowohl eine interne tectale Hemmung als auch eine Inhibition des Tectum durch das Praetectum diskutiert. Diese extra-tectale Inhibition konnte mit Hilfe von Läsionsexperimenten nachgewiesen werden. Hierbei wurde die praetectale Lpd/p-Region mechanisch oder pharmakologisch ausgeschaltet, wodurch die inhibitorischen Einflüsse entfielen und ein unkontrolliertes Beutefangverhalten ausgelöst wurde (EWERT 1968, INGLE 1973, 1980, EWERT et al. 1974, EWERT & v. WIETERSHEIM 1974, EWERT 1987, BENEKE et al. 1992, SCHWIPPERT et al. 1995a). Im Zusammenhang mit diesen Experimenten muss die retinale Topographie bei der praetecto-tectalen Projektion Berücksichtigung finden (SZÉKELY & LÁZÁR 1976). Vergleicht man die retino-tectale mit der retino-praetectalen Projektion, so sind die retinalen Projektionsverhältnisse im Praetectum, bezogen auf die rostro-caudale Achse, spiegelverkehrt abgebildet (EWERT et al. 1974a).

Immunocytochemische Untersuchungen an *Rana esculenta* und *Rana pipiens* zeigen, dass Axone von praetectalen Lpd- und Lpv-Zellen unter Vermittlung von NPY zur Oberfläche des ipsilateralen Tectum projizieren (KOZICZ & LÁZÁR 1994, CHAPMAN & DEBSKI 1995). Mit Hilfe von antidromer Stimulations- und Ableittechnik konnten bei Kröten hierfür TH3- und TH4-Neuronen identifiziert werden (BUXBAUM-CONRADI & EWERT 1995). ROTH (2003) bestätigt für *Bombina orientalis* TH4 analoge Neuronen als inhibitorisch wirksame praetectale Projektionsneuronen zum Tectum opticum. Es ist wahrscheinlich, dass der retino-tectale Transfer mittels NPY kontrolliert wird, denn die lokale NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche führte zur Reduktion excitatorischer Komponenten visuell evozierter Feldpotentiale (SCHWIPPERT & EWERT 1995, SCHWIPPERT et al. 1998).

Das Praetectum fungiert als Schaltstelle zwischen Tectum und telencephalen Strukturen. Einerseits wirkt es modulierend auf das Tectum und vermittelt andererseits zwischen Tectum und Telencephalon. In diesem Zusammenhang wird eine "Gating Loop" diskutiert, die die hemmende Wirkung des Praetectum auf das Tectum durch das Striatum inhibitorisch kontrolliert und somit durch eine Enthemmung tectaler Neuronen visomotorische Reaktionen wie Beutefang startet (EWERT 1987, 1997). Folglich unterläge das Praetectum seinerseits einer telencephalen inhibitorischen Steuerung.

2.1.3 Tectum opticum

Das Tectum opticum bildet zwei ovale Körper (Lobi optici) im Bereich des dorsalen Mesencephalon. Es weist bei *Bombina orientalis* eine Gesamtdicke von etwa 500µm auf (FUNKE 2005). Aufgrund seines deutlich größeren Umfangs im Vergleich zum Praetectum, kann man bereits auf seine bedeutenderen und vielseitigeren Funktionen rückschließen. Das TO gliedert sich alternierend in zellreiche und faserhaltige Schichten. Sie werden als Layer 9 – 1 in distal-proximaler Richtung bezeichnet (SZÉKELY & LÁZÁR 1976). Die ventrikelnahen Schicht 1 enthält Gliazellen, die verzweigte Fortsätze zur Oberfläche entsenden. In den Schichten 2, 4 und 6 sind neuronale Somata lokalisiert. Die Faserschichten 3, 5, 7 und 9 enthalten nur wenige Zellkörper. Im Unterschied zu den angrenzenden Schichten ziehen die Fasern der Schichten 3 und 5 zu entsprechenden Schichten des contralateralen Tectum opticum und bilden so die tectale Kommissur (Commissura tecti). Die oberen Bereiche der Schicht 6 und die Schicht 7 beinhalten die Hauptafferenzen des Tectum in das Tegmentum und die Medulla oblongata. Die äußerste und dickste Schicht 9 wird in 6 Laminae (A – F) unterteilt, die die Endigungen retinaler Ganglienzellen enthalten (LÁZÁR 1989).

EWERT (1984, 1997) konnte mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungsmethoden verschiedene Neuronentypen in den unterschiedlichen Tectumschichten klassifizieren. Diese unterscheiden sich von axonalen Eingängen retinaler Ganglienzellen sowohl durch die Größe ihrer excitatorischen rezeptiven Felder (ERFs) als auch in ihren Antwortcharakteristika gegenüber bewegten Mustern (EWERT & BORCHERS 1971, GRÜSSER & GRÜSSER-

CORNEHLS 1976, MATSUMOTO et al. 1985, zusgef. s. EWERT 1984, 1996, 1997). Physiologisch werden sieben Hauptklassen (T1 – T7) tectaler Neuronen unterschieden (GRÜSSER & GRÜSSER-CORNEHLS 1976), die im Falle von T5 noch weiter differenziert werden können (EWERT 1984, 1997).

Morphologisch können sechs Neuronentypen klassifiziert werden, unterschieden nach Form, Lage und Größe der Zellkörper, Verzweigungseigenschaften und der axonalen Verzweigungsmuster (SZÉKELY & LÁZÁR 1976).

Abbildung 2 gibt einen Überblick darüber.

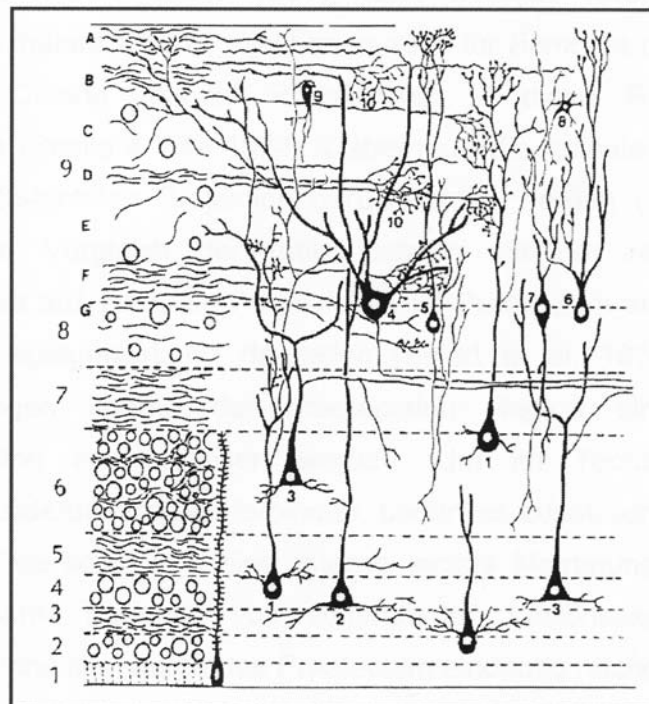


Abbildung 2: Laminarer Aufbau des Tectum opticum bei Amphibien (nach SZÉKELY & LÁZÁR 1976). Dargestellt sind die einzelnen beschriebenen tectalen Schichten (nummeriert von 1-9 am linken Rand) sowie die in den Schichten vorkommenden Neuronentypen (nummeriert von 1-10 innerhalb der Abbildung). 1, 2 = große birnenförmige Zellen; 3 = Pyramidenzellen; 4 = ganglionäre Zellen; 5, 6 = kleine birnenförmige Zellen; 7 = bipolare Neuronen; 8 = Sternzellen; 9 = amakrine Zellen; 10 = optische Endigungen.

Eine morphologische Gruppe wird von Neuronen mit birnenförmigen Somata gebildet, sie stellen den Hauptanteil der Neuronen in den Schichten 2, 4, 6 und 8 (SZÉKELY & LÁZÁR 1976). Ein Apikaldendrit zieht bis zur Tectumoberfläche, am Soma entstehen unterschiedlich viele Basaldendriten. Dem Dendritenschaft oder großen sekundären Dendriten entspringen Axone, die sich in Schicht 9 verzweigen. In Schicht 6 liegen die Somata pyramidalen Neuronen, die in Form und Größe den birnenförmigen Neuronen ähnlich sind, deren Somata allerdings eine deutlich spitzere Form haben. Ihr Apikaldendrit ist kürzer und verzweigt sich schon in Schicht 6. Vom dendritischen Schaft ziehen lange Axone in die Schicht 7, über die sie das Tectum verlassen und efferente Wege für den tectalen Output bilden. T5.2-Neuronen sind hierfür ein Beispiel, ihre Axone konnten bis in die Medulla oblongata verfolgt werden (WEERASURIYA & EWERT 1983, SCHWIPPERT et al.1990).

In den Schichten 6, 7 und 8 sind große ganglionische Zellen zu finden, sie weisen ein unterschiedliches Verzweigungsmuster auf. Manche ihrer Dendriten ziehen bis zur Tectumoberfläche, andere verlaufen horizontal und ziehen über die Commissura tecti hin zur contralateralen Tectumhälfte. Ihre Axone verlaufen in der Regel in Schicht 7. Diese Neuronen gehören, wie die pyramidalen Zellen, zu den efferenten Neuronen des Tectum.

Ausschließlich in Schicht 9 sind relativ kleine Sternzellen und amakrine Zellen lokalisiert, wobei die amakrinen Zellen in deutlich geringerer Zahl anzutreffen sind als die Sternzellen. Bei Sternzellen wird davon ausgegangen, dass sie als hemmende Interneuronen fungieren. Sowohl Sternzellen als auch amakrine Zellen erhalten Axonendigungen der birnenförmigen Neuronen. Weiterhin lassen sich noch Bipolarzellen differenzieren, die sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Ausrichtung angeordnet sind. Ihre physiologische Funktion muss noch abschließend geklärt werden (SZÉKELY & LÁZÁR 1976).

Es muss davon ausgegangen werden, dass Vertreter dieser morphologisch verschiedenen Neuronentypen zu spezifischen Funktionseinheiten (Modulen) zusammengefasst sind und dementsprechend unterschiedliche Merkmale aufweisen (siehe hierzu Abb. 1; EWERT 1984, 1997). Sie bilden die Grundlage für die Auslösemechanismen visuell gesteuerter Verhaltensweisen.

2.1.4 Retinale Ganglienzellen

Ganglienzellen bilden die innerste Schicht der Vertebratenretina. Sämtliche Informationen, die vom Auge zum Gehirn gelangen, werden über ihre Axone im Sehnerv geleitet. Bei Anuren lassen sich vier verschiedene Ganglienzell-Typen mit retino-tectaler Projektion differenzieren. Unter Berücksichtigung ihres Ursprunges werden sie als Neuronen der Klassen R1 bis R4 bezeichnet (LETTVIN et al. 1959, EWERT und HOCK 1972, GRÜSSER und GRÜSSER-CORNEHLS 1976, SCHÜRIG-PFEIFFER 1979). Sie unterscheiden sich in ihren Antwortcharakteristika visueller Reizparameter, wie Reiz-Hintergrundkontrast, Bewegungsgeschwindigkeit und Sehwinkelgröße der Muster bzw. abrupte Lichtwechsel (on/off). Gemeinsam ist diesen Neuronen, dass sie ihre stärkste Erregung dann zeigen, wenn das bewegte Reizmuster der Größe ihres ERF entspricht, wobei die Aktivität deutlich sinkt, wenn das Reizmuster die Größe des ERF übersteigt, wodurch es zu einer Erregung des IRF kommt. R2 und R3 Neuronen liefern hierbei den größten visuellen Input im praetectalen/tectalen Netzwerk, das für die konfigurale Mustererkennung verantwortlich ist (EWERT 1984,1987,1991).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von NPY auf die Aktivität retinaler Ganglienzellen an Neuronen der Klassen R2 und R3 untersucht, wobei anzumerken ist, dass der Nachweis von Neuronen der Klasse R3 im Tectum von *Bombina orientalis* relativ schwierig ist, da hier offensichtlich die Dichte dieser Neuronen geringer ist als beispielsweise bei *Bufo marinus*. Wenn eine Aktivität nachgewiesen wurde, handelte es sich in erster Linie um Neuronen der Klasse R2, die bei Anuren in den oberen Schichten des Tectum opticum zu finden sind (GRÜSSER and GRÜSSER-CORNEHLS 1976). Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen zur neuronalen Aktivität im Tectum bei *Bombina orientalis* und deren Nachweis mit Hilfe der ¹⁴C-2-Desoxyglukose-Technik (mündliche Mitteilung FUNKE 2003).

2.1.5 Neuronen der Klasse R2

Neuronen der Klasse R2 sind bei *Bombina orientalis* in den oberen Schichten des Tectum opticum in einer Tiefe von 20 bis 60 μm zu finden. Das rezeptive Feld (RF) dieser Zellen ist $2^\circ - 5^\circ$ groß. Neben der deutlichen Empfindlichkeit gegenüber ERF-durchquerender Objekten zeigen R2 Neuronen "sustained response" für Muster, die in ihrem Feldzentrum gestoppt werden. Plötzlicher Wechsel einer diffusen Beleuchtung wird von ihnen gar nicht oder nur mit einer geringen ON-Entladung beantwortet. Sie werden am stärksten aktiviert durch Quadrate oder kreisförmige Objekte mit einem Durchmesser von 4° bis 5° .

2.1.6 Neuronen der Klasse R3

Neuronen der Klasse R3 sind im Tectum von *Bombina orientalis* in einer Tiefe von 60 bis 200 μm zu finden. Das RF dieser Ganglienzellen ist $7^\circ - 12^\circ$ groß. Sie antworten auf Lichtwechsel mit ON-OFF-Aktivierung und sind richtungsunabhängig aktiviert durch Objekte, die das RF durchqueren (LETTVIN et al. 1959, 1961). Diese Neuronen sind durch Quadrate oder kreisförmige Objekte mit einem Durchmesser von ca. 9° am besten zu aktivieren.

2.1.7 Neuronen der Klasse R4

Die bei *Bombina orientalis* vorkommenden Neuronen der Klasse R4 befinden sich in einer Tiefe von 200 bis 270 μm . Das RF hat eine Größe von 15° . Sie haben eine anhaltende OFF-Aktivierung mit häufig gruppierten Entladungsformen.

3 Material und Methode

3.1 Versuchstier, *Bombina orientalis* (Chinesische Rotbauchunke)

3.1.1 Habitus und Lebensweise

Bei den Versuchstieren handelt es sich um Discoglossidae der Art *Bombina orientalis* (BOULENGER 1890).



Abbildung 3: *Bombina orientalis* (Chinesische Rotbauchunke)

Diese zu den Tetrapoden zählenden Tiere werden systematisch wie folgt eingeordnet (REMANE et al. 1991)

Classis: Amphibia
Ordo: Anura
Subordo: Opisthocoela
Familia: Discoglossidae
Genus: *Bombina*
Species: *Bombina orientalis*

Bombina orientalis gehört als Scheibenzünger zu einer der ursprünglichsten Anurengattung. Zu dieser zählen neben *Bombina orientalis* auch die Arten

Bombina maxima (Riesenunke), *Bombina variegata* (Gelbbauchunke) und *Bombina bombina* (Rotbauchunke). Das distinktive anatomische Merkmal dieser Familie ist die scheibenförmige Zunge, die nicht weiter als über den Rand des Mauls hinausgestreckt werden kann, da sie mit ihrer gesamten Fläche am Mundboden verwachsen ist (SIMON 1975).

Bei *Bombina orientalis* handelt es sich um einen der farbenprächtigsten Froschlurche. Die Dorsalseite zeigt eine kräftige grüne Färbung mit schwarzen Flecken, wohingegen die Ventralseite leuchtend rot ist bzw. bei *Bombina variegata* gelb gefärbt und ebenfalls mit schwarzen Flecken unterbrochen ist. *Bombina orientalis* erlangt mit 5 bis 6 Jahren die Geschlechtsreife und kann ein Alter von ca. 25 Jahren erreichen. Adulte Tiere erreichen in der Regel eine Größe von 53 bis 56 mm (Kopf-Rumpf-Länge) (HERRMANN et al. 1987).

Beheimatet ist *Bombina orientalis* als tag- und nachtaktiver Bewohner stehender und leicht fließender Gewässer im nördlichen China sowie in den Bergflüssen von Schantung, in der Mandschurei, Korea, Russland (Primorje) und Japan (auf den Inseln Tsusshima und Kiuschu). Die Vertikalverbreitung von *Bombina orientalis* reicht von Meereshöhe bis über 500 m ü. NN. Es handelt sich um einen Kulturfolger des Menschen, der Einzug hielt in Reisfeldern und Teichen mit landwirtschaftlicher Nutzung. Das natürliche Nahrungsspektrum besteht unter anderem aus terrestrischen Evertebraten wie Insekten (hauptsächlich Raupen, Käfer, Homopteren, Hymenopteren und Dipteren), Schnecken, Würmern und aquatischen Wirbellosen (Gastropoda, Notonectidae und Dystiscidae), die im natürlichen Umfeld bis zu 50% des Beutespektrums ausmachen (KUZMIN 1995).

3.1.2 Tierhaltung

Sämtliche bei den Versuchen verwendeten Tiere stammen aus eigenen Nachzuchten.

Die Unken wurden in einem Amphibienraum in biotop-angeglichenen Terrarien mit einer Größe von 0,95 x 0,6 x 0,4 m unter konstanten Bedingungen gehalten. Die Terrarien wurden zu einem Drittel mit einer Landzone (Schaumstoffmatten mit einer Dicke von 3 cm) und zu zwei Dritteln mit einer Wasserzone einge-

richtet (Temperatur 20° C), so dass die natürlichen Lebensgewohnheiten und Lebensbedingungen der Tiere annähernd eingehalten werden konnten (vgl. Richtlinien des Europarates ETS123, Appendix A, EWERT et al. 2005). Als Unterschlupfmöglichkeiten dienten Korkrindenstücke, halbierte Tontöpfe, Steine und künstliche Pflanzen. Die Tiergruppengröße betrug in der Regel maximal 15 Tiere pro Becken. Die Raumtemperatur betrug Sommer wie Winter konstant 22°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60%. Die Tiere waren einem regelmäßigen Tag-Nachtzyklus von 12 Stunden ausgesetzt. Das Nahrungsangebot bestand aus Gammariden, roten Zuckmückenlarven, Pimkielarven und *Drosophila*. Um eine Modifikation des speciesspezifischen Beutefangverhaltens zu verhindern, wurde auf eine direkte Fütterung verzichtet. Stattdessen wurde die Nahrung in kleinen Schalen angeboten.

Die zur Vermehrung herangezogenen Tiergruppen wurden einer Winterruhe ausgesetzt. Hierzu wurden die Zuchtgruppen von den übrigen Tieren getrennt und in einem separaten Raum überwintert. Die Haltung der Versuchstiere wurde durch das "Staatliche Veterinäramt der Stadt Kassel" kontrolliert und überwacht. Die Versuchsdurchführung wurde vom Regierungspräsidenten Kassel und der Ethikkommission der Universität Kassel genehmigt.

3.1.3 Narkose und Operation

Zur Gewährleistung einer schmerzfreien Operation wurden die Versuchstiere mit Ketavet® (Parke-Davis & Company, Berlin, 1 %) narkotisiert.

Zur Bestimmung der benötigten Narkosemitteldosierung war es erforderlich Ketavet® Dosierungsversuche durchzuführen. Aus diesen Experimenten ergab sich für *Bombina orientalis* eine letale Dosis von 80mg/kg Körpergewicht. Zur Durchführung der präparativen Schädelöffnung wurde 35mg/kg Körpergewicht subcutan injiziert. Es ist jedoch festzustellen, dass die erforderliche Ketavetmenge nicht proportional zum Körpergewicht zunimmt, sondern sich ab einem Körpergewicht der Tiere von 10 g um ca. 15% nach unten verschiebt.

Ketavet® wird nachweislich bei *Bombina orientalis* langsamer abgebaut als beispielsweise bei *Bufo marinus*. Bei dieser Species konnte schon etwa 3 Stunden nach der Präparation mit der neurophysiologischen Ableitung begonnen werden

(BUXBAUM-CONRADI 1996), wohingegen bei *Bombina orientalis* eine Wartezeit von ca. 24 Stunden eingehalten werden musste. Dies wurde in Vergleichsableitungen vom Tectum opticum festgestellt. Ohne Einhaltung einer Wartezeit zeigte sich eine deutliche Verringerung der Grundaktivität im Vergleich zu der Grundaktivität nach Einhaltung einer 24stündigen Frist.

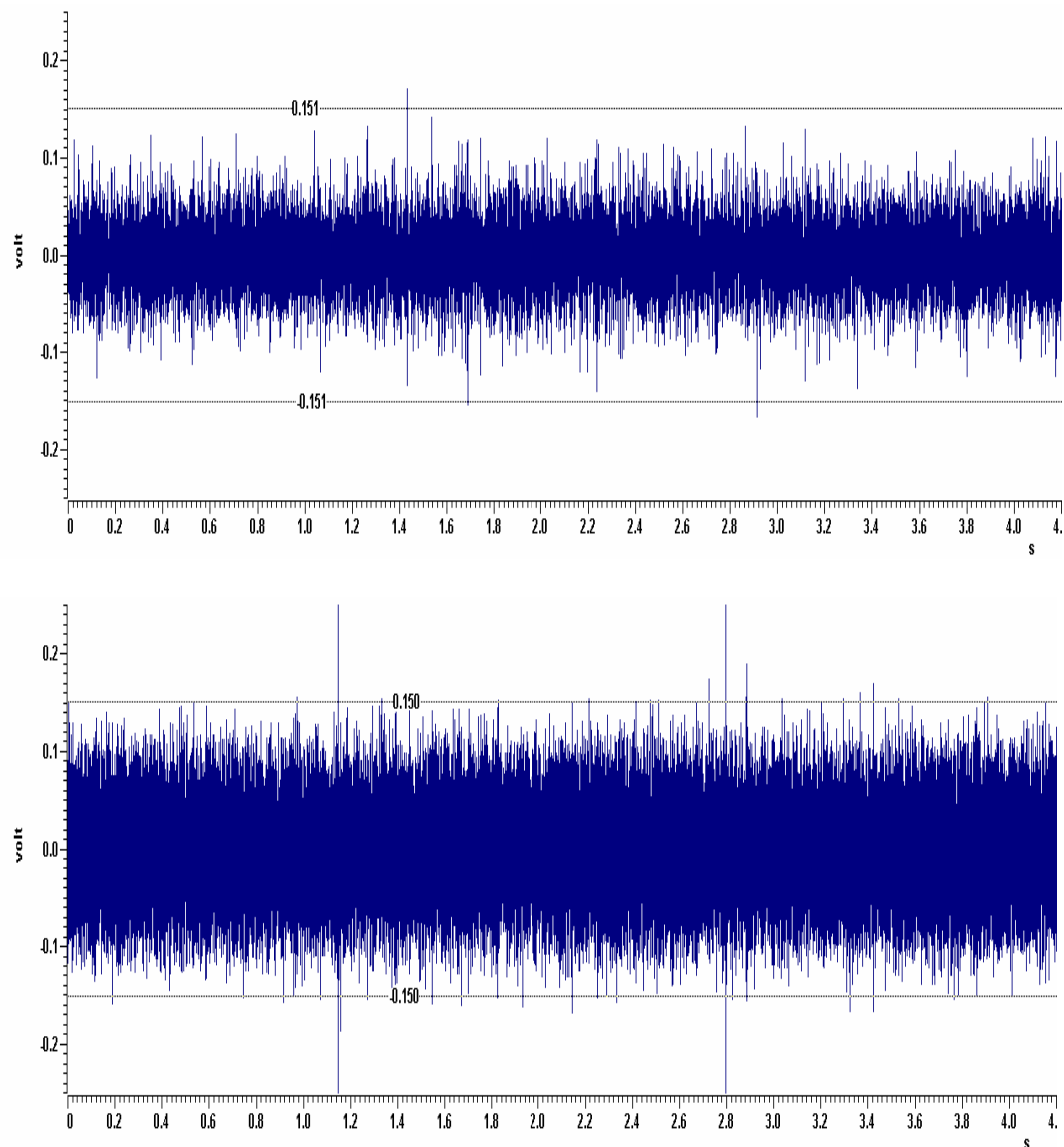


Abbildung 4: Gegenüberstellung der abgeleiteten Grundaktivität (Grundrauschen) zur Darstellung des Einflusses von Ketavet® auf die Grundaktivität retinaler Ganglienzellen. In der oberen Abbildung wird die Ableitung der Grundaktivität 3 Stunden nach der Präparation dargestellt; In der unteren Abbildung wird die Ableitung der Grundaktivität 24 Stunden nach der Präparation dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Grundaktivität von *Bombina orientalis* 3 Stunden nach der Präparation deutlich reduziert ist.

Zur präparativen Öffnung des Schädeldaches wurden die Versuchstiere je nach Körpergewicht 1 bis 2 min mit CO₂ begast. Durch diese „Blitznarkose“ in ihren Bewegungen eingeschränkt, konnte das Narkotikum subcutan in den Bauchraum injiziert werden. Bei Ketavet® (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid) handelt es sich um ein Anästhetikum mit raschem Wirkungseintritt. So konnte schon ca. 30 min nach der Injektion mit der Präparation begonnen werden. Hierfür wurden in der Regel 10 bis 20 min benötigt. Zur Freilegung des Tectum wurde zunächst der dorsale Kopfhautlappen entfernt und anschließend die Schädeldecke mit Hilfe eines Elektrobohrers beseitigt. Die Pia mater konnte nicht entfernt werden, da diese, wie zum Beispiel auch bei *Rana temporaria*, fest mit dem Tectum opticum verwachsen ist. Um eine Wundinfektion zu vermeiden, wurden die Wundränder nach der abgeschlossenen Präparation mit Nebacetin® (Firma Yamanouchi, Wirkstoff: Neomycinsulfat, Bacitracin) behandelt. Eine Schädigung des Gehirns durch Austrocknen wurde sowohl durch die natürliche Bedeckung mit Liquor als auch durch das Aufbringen von chemisch reinem Paraffinöl (Firma Merck) verhindert.

3.1.4 Demobilisierung

Zur Sicherstellung einer stabilen Positionierung der Versuchstiere über den gesamten Versuchszeitraum war eine vollständige Ruhigstellung der Tiere zwingend notwendig. Zur Demobilisierung wurde den Tieren Succinylcholin (Succinyl-Asta®, 0,2%) in einer Dosis von 37µl pro 10g Körpergewicht subcutan verabreicht. Diese Menge stellte sicher, dass die Tiere während der gesamten Versuchszeit nicht in der Lage waren sich zu bewegen. Ebenso wie die Dosierung von Ketavet®, wurden diese Werte durch zahlreiche Dosierungsversuche im Vorfeld ermittelt. Durch den raschen Wirkungseintritt des Pharmakons, konnte schon ca. 15 bis 20 min nach Injektion mit den Untersuchungen begonnen werden.

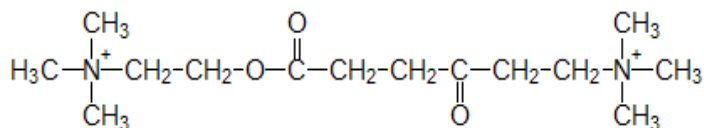


Abbildung 5: Strukturformel Succinyl(di)cholin

Bei Succinylcholin handelt es sich um ein Muskelrelaxans mit dem Wirkstoff Suxamethoniumchlorid. Succinylcholin führt, durch eine anhaltende Depolarisierung der motorischen Endplatten, zu einer neuromuskulären Blockade der Erregungsübertragung und somit zur Relaxation der Skelettmuskulatur. Dies hat auch einen Ausfall der Lungenatmung zur Folge. Da *Bombina orientalis* ca. 80% ihres Sauerstoffbedarfes über die Hautatmung abdeckt, tritt auch bei fehlender Lungenatmung keine Sauerstoffunterversorgung des Gehirns ein. Die Versuchstiere wurden mit feuchtem Zellstoff abgedeckt, wodurch das Austrocknen der Haut verhindert und eine ausreichende Sauerstoffversorgung sichergestellt wurde.

Die folgenden neurophysiologischen Untersuchungen am freigelegten Gehirn verursachten bei den Tieren keinerlei Schmerzen, da das Gehirn der Wirbeltiere schmerzunempfindlich ist. Die dermalen Wundränder der Operationsflächen wurden, um Schmerzfreiheit der Tiere zu erreichen, mit Mevarin® behandelt.

3.2 Neuropeptid Y (NPY)

NPY wurde erstmals 1982 von TATEMOTO aus Schweinehirn isoliert (TATEMOTO, 1982). NPY ist ein aus 36 biologisch aktiven Aminosäuren bestehendes Peptid. Die Namensgebung ist auf die Tyrosinreste an beiden Enden und an den Positionen 20, 21 und 27 zurückzuführen. Es gehört einer Familie von pankreatischen Polypeptiden an, zu der neben NPY auch Peptid YY (PYY) und das pankreatische Polypeptid (PP) angehören. Sowohl PYY als auch PP weisen eine hohe strukturelle Homologie zu NPY auf, 50 % mit PP und 70 % mit PYY (LARHAMMAR 1996, SUNDLER et al. 1993). NPY und PYY ist in allen Vertebraten zu finden, wohingegen PP lediglich bei den Tetrapoden vorhanden ist.

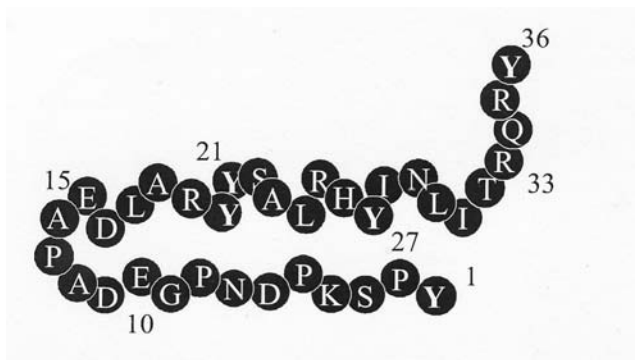


Abbildung 6: Primärstruktur von Neuropeptid Y (NPY).

3.2.1 Wirkungsweise von NPY

NPY fungiert als Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem, wohingegen PYY und PP hauptsächlich Hormoncharakter zeigen (CONLON et al. 1991). NPY hat sich evolutionär nur wenig verändert. So unterscheiden sich NPY von Mensch und Schwein nur in einer Aminosäure an Position 17 (hNPY: Methionin, pNPY: Leucin). Erstaunlicherweise unterscheidet sich die NPY-Sequenz des Menschen von der Sequenz bei *Torpedo marmorata* (Rochen) nur in 3 Positionen (LARHAMMAR 1996), obgleich dieser entwicklungsgeschichtlich sehr weit vom Menschen entfernt ist. Diese evolutionäre "Standhaftigkeit" erklärt wohl die Rolle von NPY an der Regulation fundamentaler physiologischer Prozesse. Die Freisetzung von NPY führt unter anderem zur Steigerung der

Nahrungsaufnahme (INUI 1999) und erhöht die Aktivität von Lipoproteinlipase, wodurch die Fettspeicherung gesteigert wird (INGENHOVEN & BECK-SICKINGER 1999). Innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) wird die Sekretion des luteinisierenden Hormons und von Insulin durch NPY gesteigert, die Sekretion von Wachstumshormonen verringert (KARLA et al. 1992). Diese Erkenntnisse führen zu der Annahme, dass NPY in der Pathophysiologie von Adipositas und Diabetes eine entscheidende Rolle zukommt. Im peripheren Nervensystem reguliert NPY den zirkadianen Rhythmus von Säugern (HALL et al. 1999), verstärkt Gedächtnisleistungen (FLOOD et al. 1989) und vervielfacht die vasokonstriktorische Wirkung von Noradrenalin und Angiotensin II (MATURI et al. 1989, WAHLSTEDT & HAKANSON 1986). Aufgrund dieser vielfältigen Beteiligung von NPY an den verschiedensten physiologischen Prozessen muss eine komplexe Signaltransduktion zur Generierung selektiver Steuerungssignale in den einzelnen Effektororganen vorliegen. Man geht davon aus, dass unterschiedliche Rezeptorsubtypen durch Bindung verschiedener NPY-Konformationen und spezifischer Aminosäureseitenketten des Neuropeptidhormons selektiv aktiviert werden (BECK-SICKINGER 1996).

3.2.2 NPY Rezeptoren

Es werden zur Zeit sechs NPY-Rezeptorsubtypen unterschieden: Y₁, Y₂, Y₃, Y₄, Y₅, Y₆. Sie sind in verschiedensten Geweben lokalisiert, wobei die Expressionsdichten für Blutgefäße, Nieren, Pankreas, Darm und Gehirn erhöht sind (INGENHOVEN & BECK-SICKINGER 1999).

3.2.2.1 Y₁-Rezeptor

Die mRNA dieses Rezeptors wird im Gehirn (Hypothalamus Cortex Amygdala), in peripheren Organen wie Herz, Niere, Milz, Lunge und in der Skelettmuskulatur exprimiert. In der Peripherie ist er hauptsächlich postsynaptisch an Blutgefäßen lokalisiert. Er hat eine hohe Affinität zu NPY, PYY und zur NPY-Mutante NPY [P³⁴]. Die Aktivierung des Y₁-Rezeptors löst in der Peripherie eine langanhaltende Vasokonstriktion aus und verstärkt die Wirkung anderer gefäßverengender Substanzen wie Noradrenalin und Angiotensin II. Weiterhin scheint der Y₁-Rezeptor zusammen mit anderen Subtypen die Nahrungsaufnahme zu regulieren.

3.2.2.2 Y₂-Rezeptor

Dieser Rezeptor gilt als dominierender NPY-Rezeptorsubtyp im Gehirn. Er wird in besonders hoher Dichte im Hippocampus gefunden (DUMONT et al 1991). NPY inhibiert durch Ankopplung an praesynaptische Y₂-Rezeptoren die Freisetzung von Glutamat im ZNS (GRUNDEMAR 1991), das für die antikonvulsiven Wirkungen von NPY von Bedeutung sein könnte. Außerdem inhibiert NPY die Freisetzung von Noradrenalin und Acetylcholin im peripheren Nervensystem und beeinflusst dadurch regional die Durchblutung. Auch die analgetische Wirkung von NPY soll auf einer Stimulation des Y₂-Rezeptors beruhen.

3.2.2.3 Y₃-Rezeptor

Die Existenz dieses Rezeptortyps wurde aufgrund pharmakologischer Ergebnisse postuliert, ist aber noch nicht hinreichend belegt. Daher wird in diesem Zusammenhang von einem "mutmaßlichen" ("putativen") Y₃-Rezeptor gesprochen. Hauptunterscheidungsmerkmal zu den Rezeptoren der Typen Y₁ und Y₂ ist, dass der Y₃ Rezeptor kein PYY erkennt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass er modulierend auf Glutamateffekte und die Herzkreislaufregulation wirkt (GRUNDEMAR 1993).

3.2.2.4 Y₄-Rezeptor

Die mRNA des humanen Y₄-Rezeptors wird vorrangig im Verdauungstrakt detektiert. Es wird davon ausgegangen, dass er gastrointestinale Funktionen beeinflusst. Im ZNS wurden auch Y₄-Rezeptorsubtypen nachgewiesen, über die NPY eine Stimulation der Gonadotropinfreisetzung induzieren kann (BUSCHAUER 2000).

3.2.2.5 Y₅-Rezeptor

Über diesen Rezeptortyp reguliert NPY die Nahrungsaufnahme bzw. Appetitregulation. Er wurde fast ausschließlich in Gehirnarealen nachgewiesen, in besonders hoher Konzentration im Hypothalamus, die für die Appetitregulation und die Modulation Krampf auslösender Stimuli wichtig sind (GERALD et al. 1996). In der Peripherie konnte bei Ratten, mit Ausnahme der Hoden, keine Y₅-mRNA detektiert werden. In Tierversuchen mit Nagern konnte durch NPY-Injektionen eine deutliche Steigerung der Nahrungsaufnahme beobachtet werden.

Weiterhin wird eine Beteiligung von Y_5 -Rezeptoren in Zusammenhang mit der NPY-induzierten Steigerung der Diurese und Natriurese sowie mit der Erniedrigung des Glucosespiegels diskutiert (BUSCHAUER 2000).

3.2.2.6 Y_6 -Rezeptor

Dieser Rezeptor wurde zunächst als Y_5^- , Y_{2B} oder als PP_2 -Rezeptor bezeichnet. Zentrale Effekte konnten bisher jedoch nur bei Mäusen und Kaninchen nachgewiesen werden.

3.3 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

Bombina orientalis zeigt bei wärmeren Temperaturen zwei Aktivitätsspitzen, zwischen 10-12 Uhr und 18-20 Uhr (KUZMIN 1995). Die Versuche wurden im Zeitraum der ersten Aktivitätsspitze durchgeführt. Zur Durchführung der neurophysiologischen Ableitungen wurden die demobilisierten Tiere derart in dem Versuchsbecken fixiert, dass sie einen ungehinderten Blick auf das Areal der Musterpräsentation hatten.

Zur Verringerung bzw. Vermeidung von Störpotenzialen wurden die Versuchstiere unter eine geerdete Kupfermatte platziert. Die indifferente Elektrode wurde am Schädelknochen platziert, die Ableitelektrode wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators in die zu untersuchende Gehirnregion eingeführt. Die Verwendung des Mikromanipulators stellte sicher, dass die genaue Tiefe bzw. Schicht im Tectum erreicht wurde.

Die Auswahl der Ableitareale erfolgte, in Anlehnung an die in der Abteilung Neurobiologie der Universität Kassel durchgeführten Arbeiten, mittels Stahlelektroden an neun standardisierten Ableitorten des Tectum (BENEKE et al. 1992 SCHWIPPERT et al. 1995). Auf Grundlage der Kartierungsversuche von *Bufo marinus* und *Bufo bufo spinosus*, hier konnten hinsichtlich der Feldpotenzialamplituden Unterschiede festgestellt werden, je nachdem von welchem der neun Punkte abgeleitet wurde (SCHWIPPERT et al. 1993, 1995, 1995b, GERNERT 1995, RÖTTGEN 1999). Bei *Bombina orientalis* diente der Bereich E des Tectum als Ableitort. Es zeigte sich, dass die größten Amplituden, wie auch bei GERNERT (1995), im Bereich E registriert werden konnten.

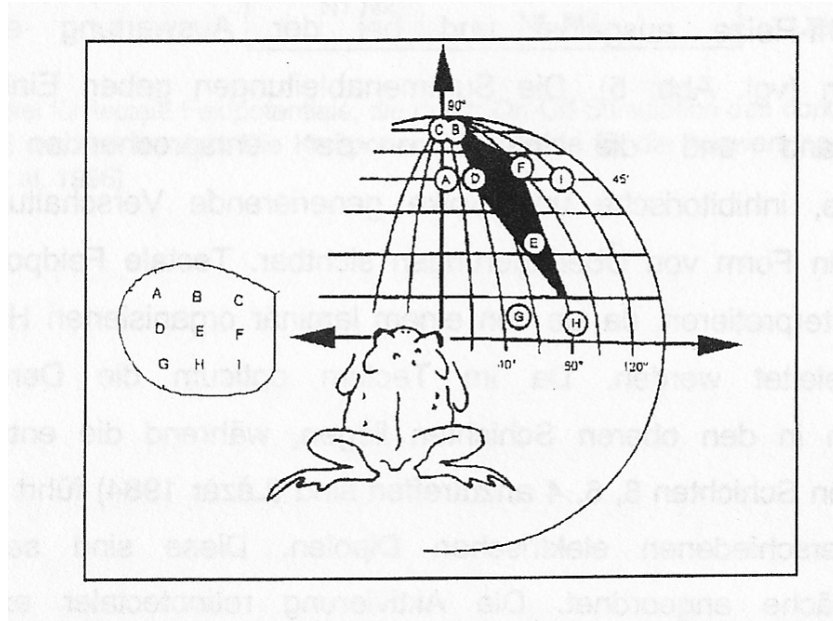


Abbildung 7: Position tectaler Ableitorte und ihre Entsprechungen im Gesichtsfeld der Kröte. Der binokulare Bereich des Gesichtsfeldes ist schwarz unterlegt.

3.3.1 Intrazelluläre Ableitung

Messbare Potenzialänderungen liegen im Bereich von 10 bis 500 μV . Bedingt durch den hohen Widerstand der Messelektroden und einer daraus resultierenden Abnahme der messbaren Spannung, wurden die Potenziale mit Hilfe eines hochohmigen Differenzverstärkers (Burr Brown Ina 110 DG) mit anschließender Frequenzfilterung um das 100fache verstärkt und zur Sichtbarmachung an ein Elektronenstrahl-Oszilloskop (Tektronic 5113) weitergeleitet. Über einen angeschlossenen Lautsprecher konnten die Signale akustisch bewertet werden. Dies ermöglichte eine erste Einschätzung der neuronalen Aktivität, nachdem die Ableitelektrode in das Nervengewebe eingeführt wurde. Über einen Analog-Digital-Wandler (CED 1401 plus interface, Cambridge Electronic) wurden die abgeleiteten Signale simultan in einem PC aufgezeichnet und anschließend mit der Software "Spike 2" weiterverarbeitet.

3.4 Visuelle Stimulation

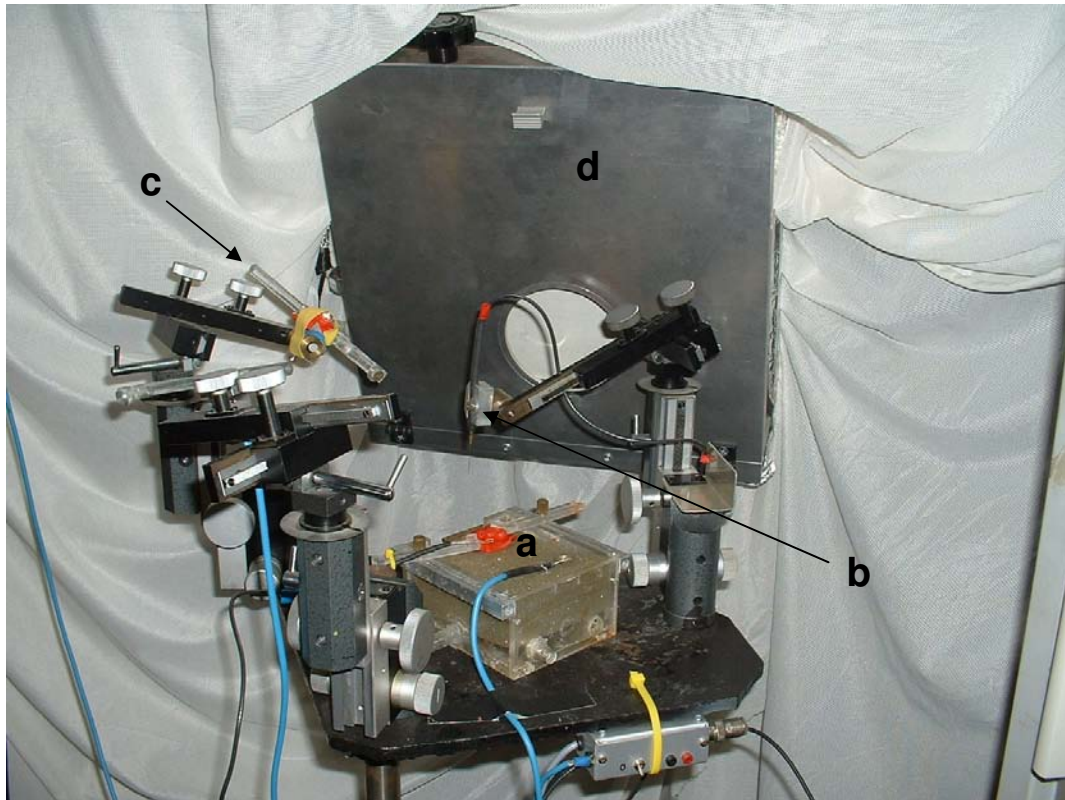


Abbildung 8: Darstellung der Versuchsanordnung. Das Versuchsbecken (a) diente zur Fixierung der Tiere während der Versuche. Mit Hilfe des Mikromanipulators (b) wurde die Ableitelektrode positioniert. Durch Mikromanipulator (c) wurde die Applikationskapillare platziert. Im Hintergrund ist der elektrisch gesteuerte Musterpräsentationsapparat (d) zu sehen.

Zur visuellen Stimulation wurden den Versuchstieren im Laufe des Experiments Quadrate mit der Kantenlänge 10 X 10 mm präsentiert, die aus schwarzem, nichtreflektierendem Karton angefertigt wurden. Für die Dauer der Experimente wurde die Versuchsanordnung durch zwei Halogenstrahler beleuchtet, so dass eine diffuse Beleuchtung herrschte.

Quadrate stellen eine sehr reizwirksame Beuteattrappe für *Bombina orientalis* dar (KUHN 2003) und erschienen somit zur Untersuchung der Antwortcharakteristika von retinalen Ganglienzellen der Klassen R2 und R3 am sinnvollsten. Diese Muster wurden in einem immer gleichen Reizmusterschema, mit einer Geschwindigkeit von 2,4 mm/sec, horizontal durch das Gesichtsfeld der Unken bewegt. Der Abstand des Versuchstieres zum präsentierten Muster betrug 15 cm. Die erste Musterpräsentation erfolgte immer von links nach rechts.

Nach einer Pause von 2 Sekunden wurde das Muster von rechts nach links präsentiert. In dieser Art wurde das Muster während der Ableitung viermal durch das Gesichtsfeld des rechten Auges des Versuchstieres bewegt.

Dieses Musterschema wurde

- ohne Applikation von NPY
- mit NPY
- nach einer Erholungsphase (recovery)

durchgeführt.

Mit Hilfe zweier Lichtschranken konnte der Ein- bzw. Austritt des präsentierten Musters in das Gesichtsfeld kontrolliert werden. Über eine Verschaltung mit dem CED-Interface konnten diese simultan zur neuronalen Impulsfolge aufgezeichnet werden, so dass die neuronalen Impulsfolgen dem entsprechend präsentierten Muster zugeordnet werden konnten.

Chronologische Kurzfassung der Versuchsdurchführung:

1. Prüfung der Beutefangaktivität
2. Narkose und anschließende operative Eröffnung des Tectum opticum
3. Nach 24-stündiger Erholung der Versuchstiere Demobilisierung mit Succinylcholin und Präsentation des 1. Reizmusterschemas
4. Applikation von NPY und 4 weitere Präsentationen des Reizmusterschemas
5. Markierung der Ableitorte
6. Tötung der Versuchstiere und Anfertigung histologischer Schnitte

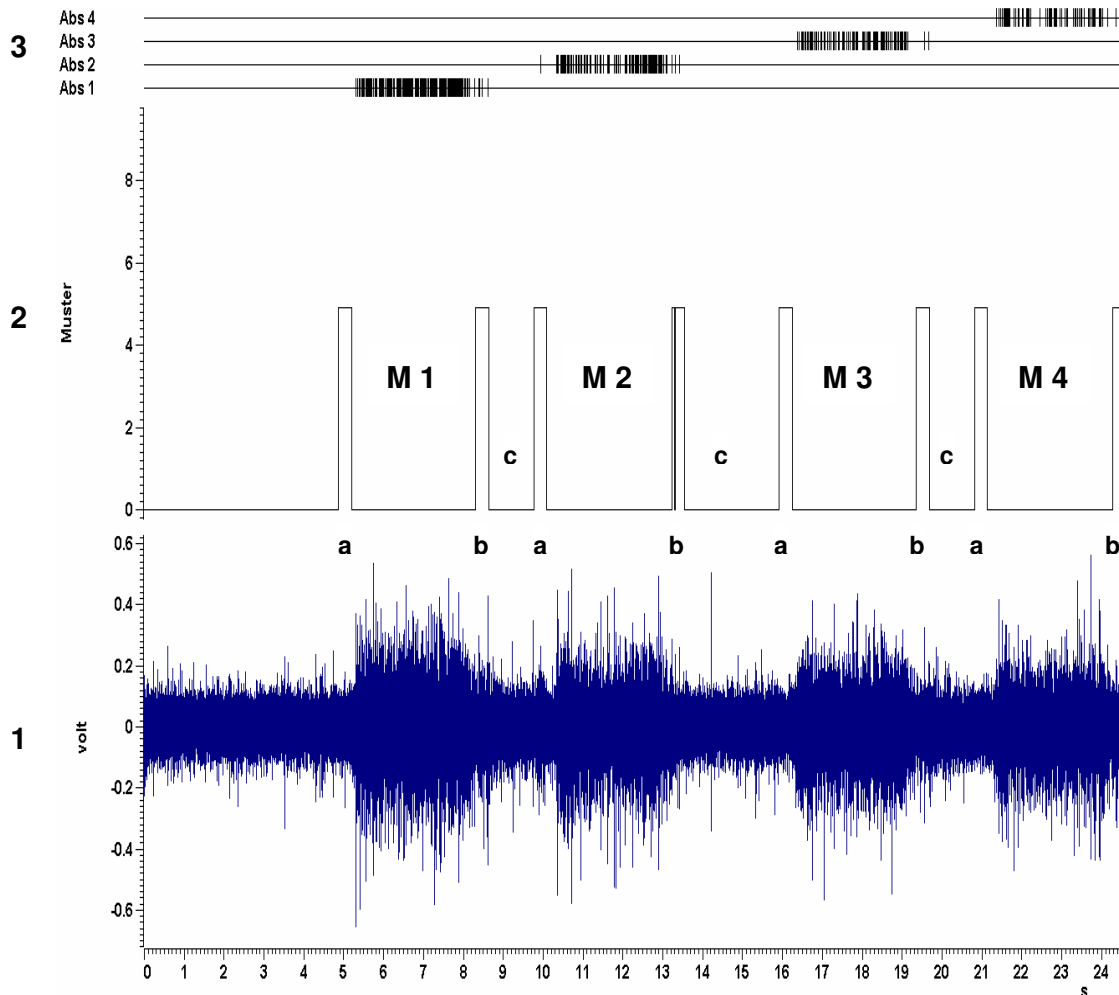


Abbildung 9: Beispiel für einen Screenprint des Spike 2 Analyseprogramms. Darstellung einer Originalableitung ("Multi-Unit" Spike-Aktivität) mit stark gestauchter Zeitachse. Kanal 1 zeigt die Originalmesssignale. Kanal 2 stellt das präsentierte Reizmusterschema dar (M1 = 1. Musterpräsentation (Abschnitt 1), M2 = 2. Musterpräsentation (Abschnitt 2), M3 = 3. Musterpräsentation (Abschnitt 3), M4 = 4. Musterpräsentation (Abschnitt 4), wobei a den Eintritt und b den Austritt der Reizmustertrappe in das Gesichtsfeld der Unke kennzeichnen. Die Pausen von 2 s zwischen den Musterpräsentationen sind mit c gekennzeichnet. Kanal 3 symbolisiert jeden detektierten Spike durch einen senkrechten Strich.

3.5 Markierung des Ableitortes

Um exakte Aussagen über die morphologische Lage des Ableitortes treffen zu können, wurden diese nach Beendigung der Versuche durch anodischen Gleichstrom ($10\mu\text{A}$ für 9 s) markiert. Da die Widerstände der verwendeten Elektroden nicht immer exakt gleich waren, wurde dabei eine Konstantstromquelle mit stromproportionaler Rückkopplung verwendet. Die hierdurch an der unisolierten Elektrodenspitze freigesetzten Eisenionen (Fe^{2+}) können nach

Oxidation zu Fe^{3+} durch die Berliner-Blau-Methode bei Kernechtrot-Gegenfärbung dargestellt werden. Der sich bildende blaue Komplex ist lichtmikroskopisch gut von den rötlichen Neuronen zu unterscheiden. Zur histologischen Aufarbeitung der markierten Gehirne wurden Querschnitte (14 μm) angefertigt, anhand derer die genaue Position der Elektrodenspitze zugeordnet werden konnte.

3.6 Mikroelektroden

Um elektrophysiologische Potenziale einzelner Neuronen im Tectum opticum ableiten zu können, hat sich die Anwendung von Stahlelektroden bewährt (SCHÜRIG-PFEIFFER 1979, BUXBAUM-CONRADI 1995, GLAGOW 1999). Diese Ableitungstechnik wurde auch bei *Bombina orientalis* verwendet.

3.6.1 Herstellung der Ableitelektroden

Zur Herstellung der Ableitelektroden wurden ausschließlich rostfreie Insektenstahlnadeln (Austria 000) verwendet. Diese wurden nach der "Gottschalk-Methode" angespitzt. Dabei wurden die Nadeln mit dem Kopf nach unten in eine 25%-ige HCl-Lösung getaucht und durch das Anlegen eines Wechselfeldes ($U_{\text{eff}} = 5\text{V}$, $f = 50\text{ Hz}$) elektrolytisch "angespitzt". Um den erforderlichen Spitzendurchmesser der Elektroden von 1 bis 3 μm zu erhalten, musste der Vorgang ca. 10-mal wiederholt werden. Der Spitzendurchmesser der Elektroden wurde unter dem Mikroskop überprüft. Anschließend wurden die Elektroden in einem Ultraschallgerät (Transsonic T 310, Elma) mit einer Reinigungsflüssigkeit gesäubert und zur Entfernung eventueller Rückstände in Aqua dest. und 70%-igem Alkohol gespült. Zur Isolierung der Elektroden wurden diese mit einem Speziallack (Insl-X-33) überzogen, wobei zu beachten war, dass an der Spitze eine Fläche von ca. 2 bis 3 μm^2 frei bleiben musste. Dies erreichte man durch sofortiges Senkrechtstellen der Elektroden nach der Lackierung oder durch leichtes Streichen über sehr feines Sandpapier. Nach einer Trockenzeit von 3 bis 4 Stunden konnten die Elektroden auf ihre Leitfähigkeit hin überprüft und für Ableitungsversuche verwendet werden. Die Leitfähigkeit der Elektroden wurde nach der „Schürg-Pfeiffer-Methode“ getestet.

3.6.2 Mikroelektrodentest

Der von SCHÜRIG-PFEIFFER 1979 entwickelte Test bietet eine galvanische Methode, bei der während der Bildung eines galvanischen Elementes chemische in elektrische Energie umgewandelt wird. Das Grundprinzip eines galvanischen Elementes besteht aus zwei Elektroden, die in ein Elektrolyt eintauchen. Handelt es sich um Elektroden aus unterschiedlichen Metallen, so sind ihre elektrochemischen Potenziale in der Flüssigkeit unterschiedlich. Das Prinzip der „Schürg-Pfeiffer-Methode“ ist es, die beiden Elektroden miteinander zu verbinden, so dass Elektronen von der Katode zur Anode wandern. Dies hat zur Folge, dass in dem verbindenden Leiter ein messbarer Strom fließt, der als Maß für die Elektrodenqualität angesehen werden kann. Als Elektrolyt dient bei diesem Testverfahren einfaches Leitungswasser, in das als indifferente Anode ein Platinplättchen eingetaucht wird. Der mit einem hochohmigen Spannungsmesser (Phillips PM 2503 elektronik VA) versehene Stromkreis wird über die zu testende Mikroelektrode geschlossen. Lag die messbare Spannungsspitze in einem Bereich von 20 – 30 mV, konnten die Stahlelektroden für die neurophysiologischen Ableitungen verwendet werden.

3.6.3 Applikationskapillaren

NPY wurde in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l auf das Tectum appliziert. Für die Applikation von NPY wurden Glaskapillaren mit einem definierten Spitzendurchmesser verwendet. Hierbei musste sichergestellt sein, dass eine ausreichende Menge NPY-Lösung in das betreffende Hirngewebe diffundieren konnte. Hierfür haben sich Kapillaren mit einem Spitzendurchmesser von 50 – 70 μm als optimal erwiesen, denn bei einer 2/3-Füllung der Kapillaren wurde das die Kapillare umgebende Gewebewasser auf der Tectumoberfläche durch Kapillarkräfte nicht mehr angesaugt. Die Applikationsmikropipetten wurden kapillar durch Eintauchen in die NPY-Lösung befüllt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die Mikropipetten unter mikroskopischer Kontrolle in Nähe des Ableitortes platziert.

3.7 Bestimmung der Spike-Amplituden und der Spike-Raten mit Hilfe der Software Spike 2

Bei allen neurophysiologischen Ableitungen dieser Arbeit handelt es sich jeweils um "Multi-Unit" Spike Aktivität von verschiedenen Neuronen derselben Klasse. Zur Ermittlung der Amplituden und der Bestimmung der Spikeanzahl/Intervall der abgeleiteten Spikes wurde die Software "Spike 2" für Windows Version 4.18 (CED Software Cambridge Electronic Design) verwendet.

3.7.1 Kontrollversuche

Um Adaptationseinflüsse während der Untersuchungen auszuschließen, wurden im Vorfeld Versuche zum Adaptationsverhalten bei *Bombina orientalis* durchgeführt. Hierbei wurde experimentell der Zeitabschnitt zwischen den Ableitzeitpunkten bestimmt, der nötig ist, um Adaptationseffekte ausschließen zu können.

3.7.1.1 Amplitude

Den Versuchstieren wurde in einem festgelegten Reizmusterschema viermal hintereinander, abwechselnd von links nach rechts, ein Muster präsentiert. Zwischen der Präsentation der Muster (= Musterpräsentation, = Abschnitt) innerhalb des Reizmusterschemas lag eine Pause von 2 Sekunden. Das Reizmusterschema wurde in unterschiedlichen Zeitabständen t präsentiert und die visuell evozierten Aktionspotenziale von R2-Neuronen wurden elektro-physiologisch abgeleitet.

| Ableitung | Reizmusterschema | | | |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| t = 0 | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| t = 2 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| t = 5 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| t = 10 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| t = 20 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |

Die mittels dieser Versuche abgeleiteten Potenziale wurden mit Hilfe der Software "Spike 2" auf ihre unterschiedlichen Amplitudenhöhen hin untersucht. Hierdurch konnte der optimale Zeitraum zwischen den Ableitzeiten als $t = 10$ min ermittelt werden. Nach dieser Zeitspanne hatte die Amplitudenhöhe ihren Ausgangswert annähernd wieder erreicht.

3.7.1.2 Spike-Rate

Um für die Analyse der Spike-Raten der zu untersuchenden R2 und R3 Neuronen den optimalen Ableitzklus zu bestimmen, wurde nach den gleichen Verfahren wie bei den Spike-Amplitudenkontrollversuchen vorgegangen. Auch hier konnte ein optimaler Zeitraum von $t = 10$ min zwischen den einzelnen Ableitungen bestimmt werden, da nach dieser Zeit die Spike-Rate ihren Ausgangswert wieder erreicht hat.

3.7.2 **Bestimmung der Spike-Amplituden**

Die Beeinflussung der Spike-Amplitude retinaler Ganglienzellen durch NPY wurde an Neuronen der Klasse R2 und R3 im Tectum opticum von *Bombina orientalis* durchgeführt. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden nur solche Spikes ausgewertet, die – wie auch bei der Untersuchung der Spike-Rate - oberhalb der Schwelle des einfachen Rauschbandes detektiert wurden. Hierdurch war gewährleistet, dass Amplitude und Spike-Rate direkt miteinander verglichen werden konnten.

Im Folgenden finden die Bezeichnungen „ohne NPY“, „NPY 10 min“, „NPY 20 min“, „rec NPY 10 min“ und „rec NPY 20 min“ für die unterschiedlichen Ableitzeitpunkte/Ableitungen Verwendung. Diese sind wie folgt definiert:

- ohne NPY Präsentation des Reizmusterschemas ohne NPY
- NPY 10 min Präsentation des Reizmusterschemas 10 min nach Beginn der NPY-Applikation
- NPY 20 min Präsentation des Reizmusterschemas 20 min nach Beginn der NPY-Applikation
- rec NPY 10 min Präsentation des Reizmusterschemas 10 min nach Entfernen der NPY-Applikationskapillare
- rec NPY 20 min Präsentation des Reizmusterschemas 20 min nach Entfernen der NPY-Applikationskapillare

Die Unterschiede der Spike-Amplituden während der Musterpräsentationen des Reizmusterschemas wurden für die nachstehenden Versuchsparameter analysiert:

| Ableitung | Reizmusterschema | | | |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 1. | 2. | 3. | 4. |
| ohne NPY | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation |
| NPY 10 min | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation |
| NPY 20 min | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation |
| rec NPY 10 min | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation |
| rec NPY 20 min | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation |

Anhand der so gewonnenen Daten konnte bestimmt werden, inwieweit NPY die Spike-Amplituden retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 und R3 beeinflusst bzw. verringert.

3.7.3 Bestimmung der Spike-Raten

Die Spike-Raten (Anzahl der Spikes pro 4 sec Intervall = Dauer einer Musterpräsentation innerhalb des Reizmusterschemas) wurden für Neuronen der Klasse R2 und R3 bestimmt. Generell wurde die „Rohableitung“ zuerst gefiltert um Störsignale zu eliminieren, ohne jedoch entscheidende Informationen zu gefährden (Lowpass 200, Highpass 1500, Transitiongap 100, Length 367). Bei den so gefilterten Ableitungen wurde zunächst das Rauschband bestimmt, also die Grundaktivität, die während der gesamten Ableitung vorhanden war. Um die Ober- bzw. Untergrenze des Rauschbandes zu bestimmen, wurden über die gesamte Ableitung 2 horizontale Cursor gesetzt, anhand derer die Werte für die Rauschbandgrenzen abgelesen werden konnten.

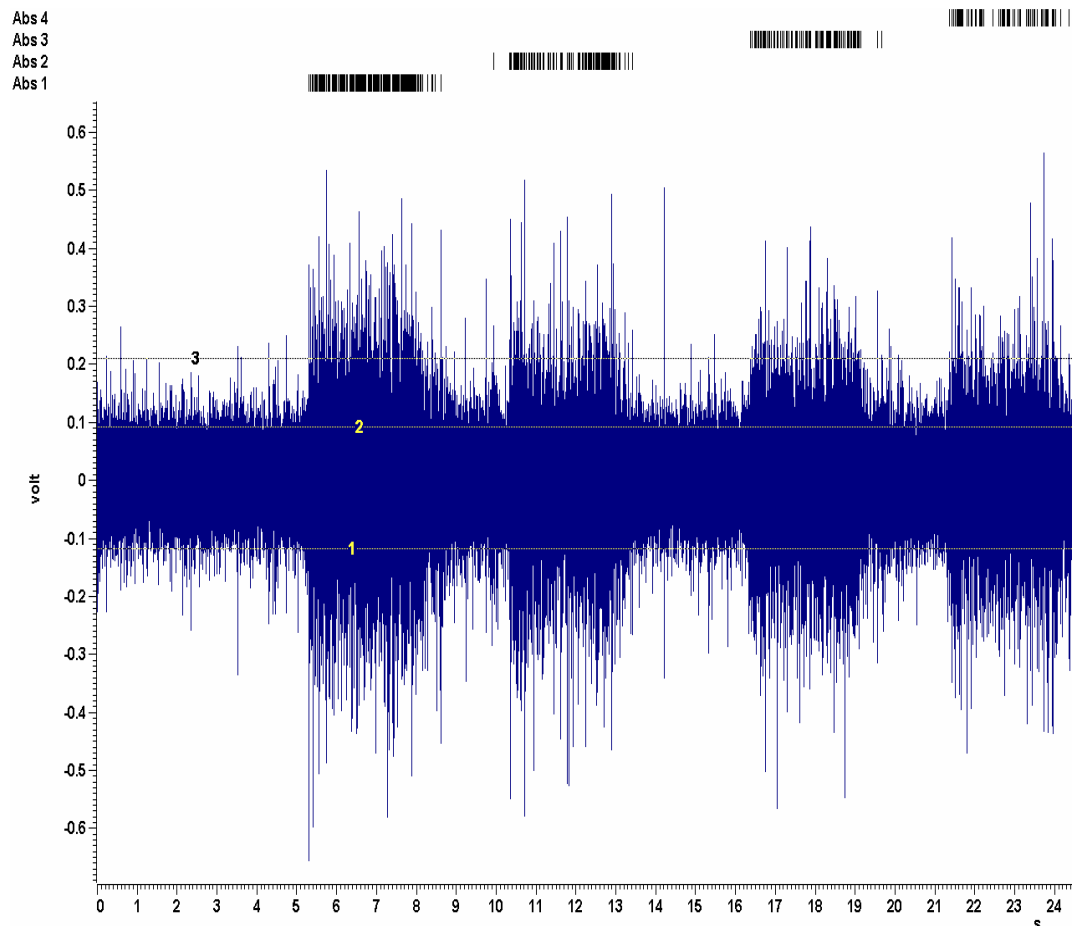


Abbildung 10: Gezeigt wird der Ausschnitt einer "Multi-Unit" Originalableitung. Mit Hilfe zweier horizontal angelegter Cursor (1 und 2) konnte die Höhe des Rauschbandes ermittelt werden, woraus sich die anzulegende Schwelle für die Auswertung ergab, die mit Cursor 3 dargestellt ist. In den Kanälen Abs. 1 – 4 werden die detektierten Spikes, die oberhalb der gesetzten Schwelle (Cursor 3) lagen, als Striche dargestellt.

Der in dieser Weise ermittelte Wert des Rauschbandes zwischen Cursor 1 und 2 wurde halbiert und zur Bestimmung der Schwelle zu der mit Cursor 2 ermittelten oberen Grenze des Rauschbandes addiert. Daraus resultierte der zu setzende Schwellenwert (Cursor 3). Dieser wurde als 1-faches Rauschband definiert.

Zur Auswertung der Spike-Rate wurden sämtliche Spikes herangezogen, die sich oberhalb des 1-fachen Rauschbandes befanden. Diese Anzahl wurde statistisch ausgewertet. Durch diese Auswertungsmethode war es möglich, sowohl die Unterschiede der Spike-Rate vor und nach der Applikation von NPY, als auch die Unterschiede, die sich während der Präsentation des Reizmusterschemas vor und nach NPY-Applikation ergaben, zu untersuchen. Nach diesem Schema wurden die Ableitungen der retinalen Ganglienzellen R2 und R3 untersucht.

Es wurden die Unterschiede der Spike-Raten für die nachstehende Versuchsparameter analysiert:

| Ableitung | Reizmusterschema | | | |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ohne NPY | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| NPY 10 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| NPY 20 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| rec NPY 10 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| rec NPY 20 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |

3.8 Statistik

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse wurden mit Hilfe verschiedener statistischer Tests geprüft. Sämtliche statistischen Tests und Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm STATISTICA 7.1 für Windows durchgeführt.

Ferner wurden Mittelwerte, Standardfehler und Standardabweichungen des Mittelwertes bestimmt.

Das Auftreten signifikanter Unterschiede zwischen den ermittelten Daten wurde unter Verwendung der Rangvarianzanalyse nach Friedman (Friedman-Test) und des Wilcoxon-Test für Paardifferenzen geprüft. Alle verwendeten Formeln werden in Kap. 9.2 aufgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Kontrollversuche:

Reizmusterserien auf visuelle Bewegungsmuster

4.1.1 Vorbemerkungen

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von NPY auf visuelle Antworten retinaler Ganglienzellen der Klassen R2 und R3 bei *Bombina orientalis* zu untersuchen. Hierbei sollte der Einfluss von NPY auf die Spike-Amplitude und die Spike-Rate der elektrophysiologisch abgeleiteten Aktionspotenziale getestet werden. Untersuchungen an *Bufo marinus* ergaben, dass elektrophysiologisch von der Tectumoberfläche abgeleitete visuell evozierte Feldpotenziale retinaler Ganglienzellen durch NPY um 30 – 40 % verringert werden können (SCHWIPPERT & EWERT 1995). Einzelzelleitungen für *Bufo* liegen in diesem Zusammenhang noch nicht vor. Es bedarf also der Klärung, inwieweit tectal abgeleitete Aktionspotenziale von R2 und R3 Neuronen durch NPY beeinflusst werden. Da für *Bombina orientalis* noch keine Ergebnisse aus Einzelzelleitungen vorlagen, war es notwendig das Antwortverhalten der Klasse R2 und R3 Neuronen zu untersuchen. Hierzu wurden an 6 Versuchstieren Kontrollversuche durchgeführt (siehe Kap. 3, Punkt 3.7.1).

Nach wiederholten Musterpräsentationen können sich in den Ableitungen verschiedene Phänomene einstellen:

1. Die Amplitude wird kleiner, Ursache hierfür kann sein, dass sich die Ableitelektrode vom Neuron entfernt.
2. Es kommt zu einer Verringerung der Spike-Rate. Dies kann, ebenso wie die Amplitudenabnahme, an einer Entfernung der Ableitelektrode vom Neuron liegen, denn mit abnehmender Amplitude fallen einige Spikes unter den Level-Cursor und damit nimmt die Spike-Rate insgesamt ab. Ursache für eine Frequenzverringerng der Spikes kann aber auch neuronale Adaptation sein.

Mit Hilfe der Kontrollversuche sollte das Phänomen der neuronalen Adaptation weitgehend ausgeschlossen werden. Anhand der durch die Kontrollversuche erzielten Ergebnisse konnte die optimale Zeitdifferenz t zwischen der Präsentation der einzelnen Reizmusterschemata zu unterschiedlichen Ableitzeitpunkten, sowohl für die Spike-Amplitude als auch für die Spike-Rate mit 10 min bestimmt werden. Nach diesem Zeitraum hatten Amplitude und Spike-Rate der abgeleiteten Neuronen annähernd ihren Ausgangswert erreicht und eine Beeinflussung der unter NPY- Einwirkung durchzuführenden Untersuchungen durch erhöhte neuronale Adaptation auf die präsentierten Reizmusterschemata konnte ausgeschlossen werden. In Kapitel 4.1.1 und Kapitel 4.1.2 werden diese Ergebnisse graphisch dargestellt.

4.1.2 Spike-Amplitude

Mit Hilfe der Kontrollversuche wurde das Adaptationsverhalten an $n = 6$ Versuchstieren untersucht. Abgeleitet wurden die visuell evozierten Potenziale von R2 Neuronen der linken Tectumhälfte in einer Tiefe von 20 bis 60 μm bei *Bombina orientalis*.

Bei sämtlichen Spikes der vier Musterpräsentationen des Reizmusterschemas, die oberhalb der zur Auswertung festgelegten Schwelle des einfachen Rauschbandes detektiert wurden, wurde die Amplitudenhöhe gemessen und hieraus ein Mittelwert errechnet. Diese Mittelwerte wurden sowohl für die vier Musterpräsentationen innerhalb des Reizmusterschemas, als auch zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten miteinander verglichen.

Nachfolgend wird noch einmal tabellarisch dargestellt, zu welchen Zeitpunkten t das Reizmusterschema präsentiert wurde, wobei t die Zeitdifferenz beschreibt, die zwischen den Präsentationen des Reizmusterschemas lag.

| Ableitung/ Zeitdifferenz | Reizmusterschema | | | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| t = 0 | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| t = 2 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| t = 5 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| t = 10 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| t = 20 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |

Im Folgenden finden die Begrifflichkeiten Abschnitt 1, Abschnitt 2, Abschnitt 3 und Abschnitt 4 Verwendung. Diese sind gleichbedeutend mit 1. Musterpräsentation, 2. Musterpräsentation, 3. Musterpräsentation und 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas.

In der nachstehenden Abbildung 11 sind beispielhaft die Einzelergebnisse der Versuchstiere 1 - 6 zum Zeitpunkt $t = 0$ dargestellt. Es wird deutlich, dass, mit Ausnahme einer leichten Erhöhung bei der vierten Musterpräsentation, nur geringe Schwankungen der Spike-Amplituden während der Präsentation der Reizmusterserie vorhanden waren. Diese konnten innerhalb der Originalableitung als leichte Störpotenziale bei zwei Versuchstieren identifiziert werden. Sie vollständig herauszufiltern war nicht möglich, da ansonsten zu viele Informationen innerhalb der Ableitungen verloren gegangen wären. Hieraus resultiert auch der leicht erhöhte Wert für den in der Graphik schwarz dargestellten Wert des errechneten Mittelwertes aus $n = 6$ Versuchstieren. Es wird jedoch deutlich, dass die Spike-Amplituden während der vier Musterpräsentationen der Reizmusterserie nur geringfügigen Schwankungen unterlagen.

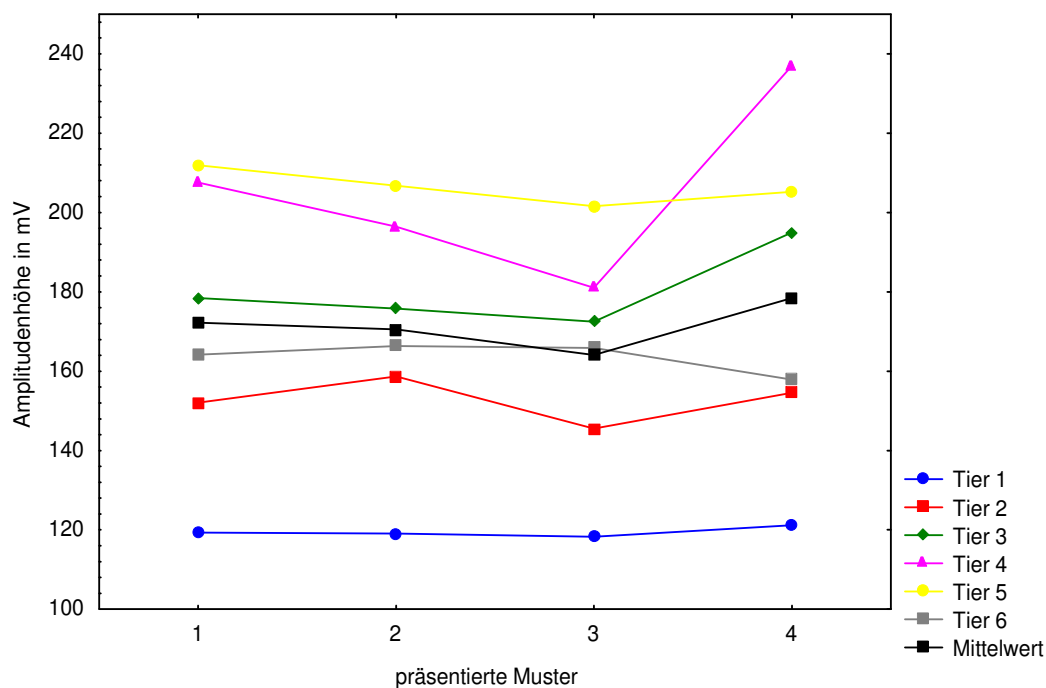


Abbildung 11: Darstellung der Spike-Amplitudenveränderung von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* während der vier Musterpräsentationen der Reizmusterserie zum Zeitpunkt $t = 0$. Die dargestellten Werte zeigen die errechneten Mittelwerte aller detektierten Spikes oberhalb des einfachen Rauschbandes während des jeweilig präsentierten Musters des Reizmusterschemas.

Während der Ableitung $t = 2$ min konnten für 5 Versuchstiere Werte ermittelt werden, die oberhalb der gesetzten Schwelle lagen. Die ermittelten Spike-Amplituden dieser Tiere lagen deutlich unter denen, die während der Ableitung $t = 0$ min gemessen wurden. In der Ableitung $t = 5$ min konnten ebenfalls für 5 Versuchstiere Spike-Amplituden oberhalb der gesetzten Schwelle gemessen werden. Im Mittel zeigte sich eine minimale Erhöhung der Spike-Amplitude im Vergleich zu Ableitung $t = 2$ min. Während der Ableitung $t = 10$ min konnten für 2 Tiere während der Musterpräsentation 3 und 4 und für ein Tier bei der dritten Musterpräsentation keine Werte oberhalb der Schwelle ermittelt werden. Trotzdem war im Vergleich zu den Ableitungen $t = 2$ min und $t = 5$ min ein Anstieg der Spike-Amplituden zu verzeichnen. Während der Ableitung $t = 20$ min konnten für die drei Tiere Werte ermittelt werden, die oberhalb der gesetzten Schwelle lagen.

In der nachstehenden Abbildung 12 werden die errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden von $n = 6$ Versuchstieren während der Präsentation des Reizmusterschemas zu unterschiedlichen Ableitzeitpunkten t dargestellt. Es wird deutlich, dass die Spike-Amplituden während der Präsentation der Muster innerhalb des Reizmusterschemas zum Teil leichten Schwankungen unterlagen.

Die zur statistischen Bewertung herangezogene Rangvarianzanalyse nach Friedman ergab für χ^2 einen kleineren Wert als den Tabellenwert, somit gilt die Nullhypothese H_0 ; die vorliegenden Unterschiede der Spike-Amplituden während der einzelnen Musterpräsentationen innerhalb des Reizmusterschemas sind als zufällig zu erachten und statistisch nicht signifikant. Der ebenfalls zur statistischen Bewertung verwendete Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ergab beim Vergleich der Musterpräsentationen untereinander, zu allen Ableitzeitpunkten, für die Prüfgröße R einen größeren Wert als den Tabellenwert. Somit wurde auch hier H_0 akzeptiert.

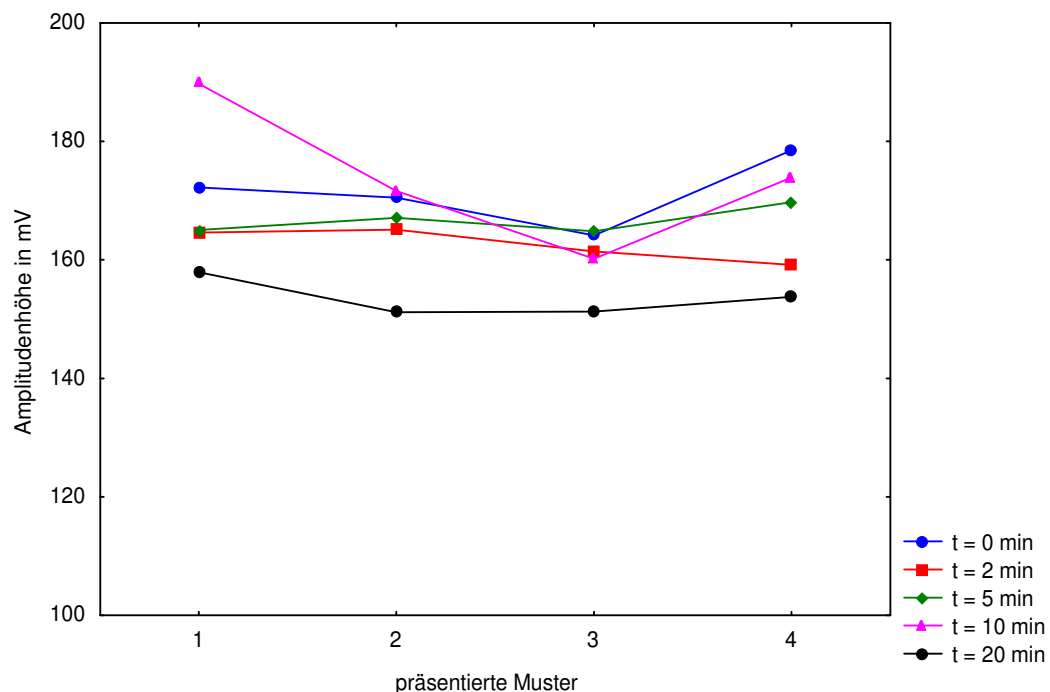


Abbildung 12: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden von R2-Neuronen bei $n = 6$ Tieren während der Präsentation des Reizmusterschemas zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten t bei *Bombina orientalis*.

Zur Ermittlung der optimalen Zeitdifferenz t , zwischen den Präsentationen des Reizmusterschemas für die Untersuchung des Einflusses von NPY auf die Spike-Amplituden retinaler Ganglienzellen der Klasse R2, mussten die gemessenen Spike-Amplituden während der Musterpräsentationen zwischen den Ableitungen untersucht werden (siehe hierzu Schema Seite 38).

In Abbildung 13 sind exemplarisch die Spike-Amplituden der einzelnen Versuchstiere während der ersten Musterpräsentation dargestellt. Für 3 Versuchstiere konnten zum Zeitpunkt $t = 20$ min keine Werte ermittelt werden, daher weist die Graphik hier Lücken auf. Es ist jedoch zu sehen, dass es nach einer Pause von 10 min zwischen den Musterpräsentationen zu keiner weiteren Abnahme der Spike-Amplitude kam.

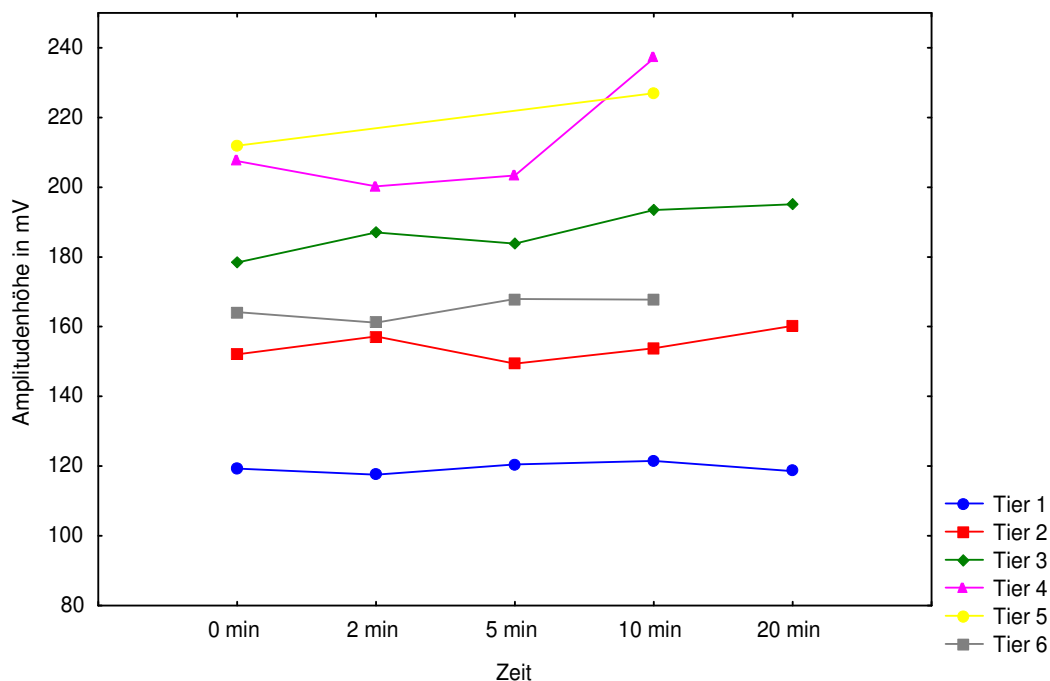


Abbildung 13: Darstellung der Spike-Amplitudenveränderung von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* während der 1. Musterpräsentation (Abschnitt 1) des Reizmusterschemas.

Auch während der zweiten Musterpräsentation konnte, mit Ausnahme von zwei Versuchstieren, ein weitgehend stabiler Verlauf der Spike-Amplituden gemessen werden. Während der dritten und vierten Musterpräsentation wurden deutliche Schwankungen der Spike-Amplituden, sowie ein Abfall der Spike-Amplituden in der Ableitung $t = 20$ min gemessen. In dieser Ableitung konnten

lediglich für drei Versuchstiere Spike-Amplituden oberhalb der gesetzten Schwelle ermittelt werden.

Abbildung 14 zeigt die Spike-Amplitudenmittelwerte von $n = 6$ Versuchstieren der während vier Musterpräsentationen des Reizmusterschemas der Kontrollversuche. Hierbei wird deutlich, dass sich die Amplitudenhöhen bei allen Musterpräsentationen zum Zeitpunkt $t = 10$ min dem Ausgangswert $t = 0$ näherte.

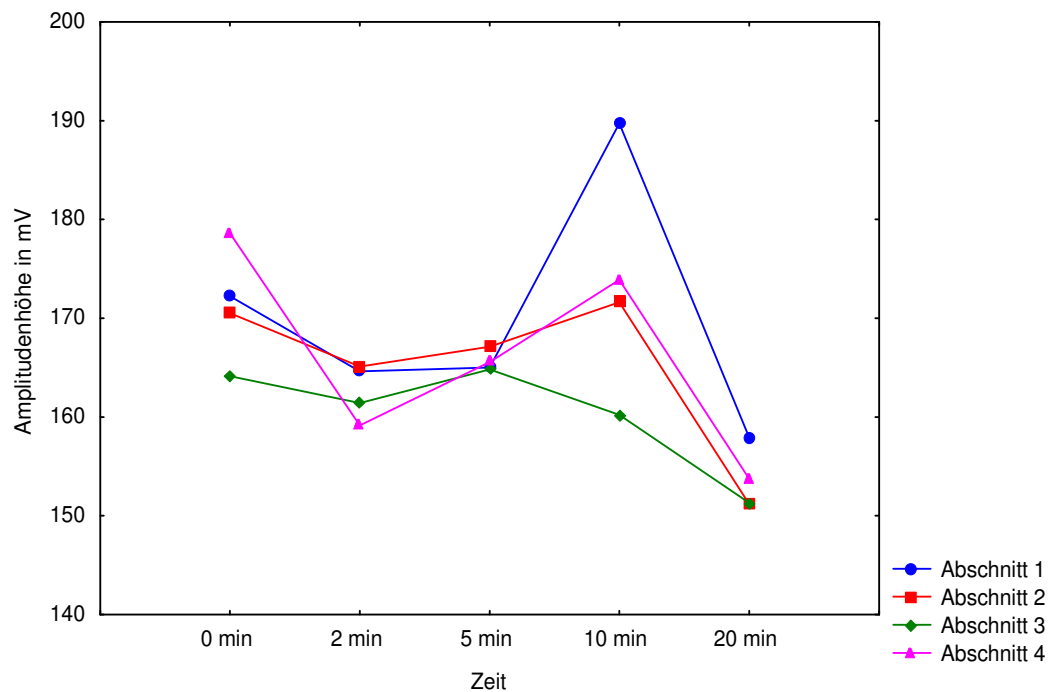


Abbildung 14: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden bei den 4 Musterpräsentationen (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas, zur Untersuchung der Beeinflussung durch Adaptation von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* ($n = 6$).

Die Auswertung der ermittelten Daten zeigt für die Amplitude nach $t = 10$ min einen Wert nahe des Ausgangswertes.

Die geringfügige Erhöhung der Spike-Amplitude in den Abschnitten 1 und 2 ist auf leichte Störpotenziale innerhalb zweier Ableitungen zurückzuführen. Dieses Phänomen ist aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Ableitelektroden nie ganz auszuschließen und birgt demzufolge eine Fehlerquelle. Diese wird in der Darstellung in Abbildung 15 berücksichtigt.

Abbildung 15 zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler für die ermittelten Amplituden über die gesamte Versuchsdauer bei $n = 6$ Tieren.

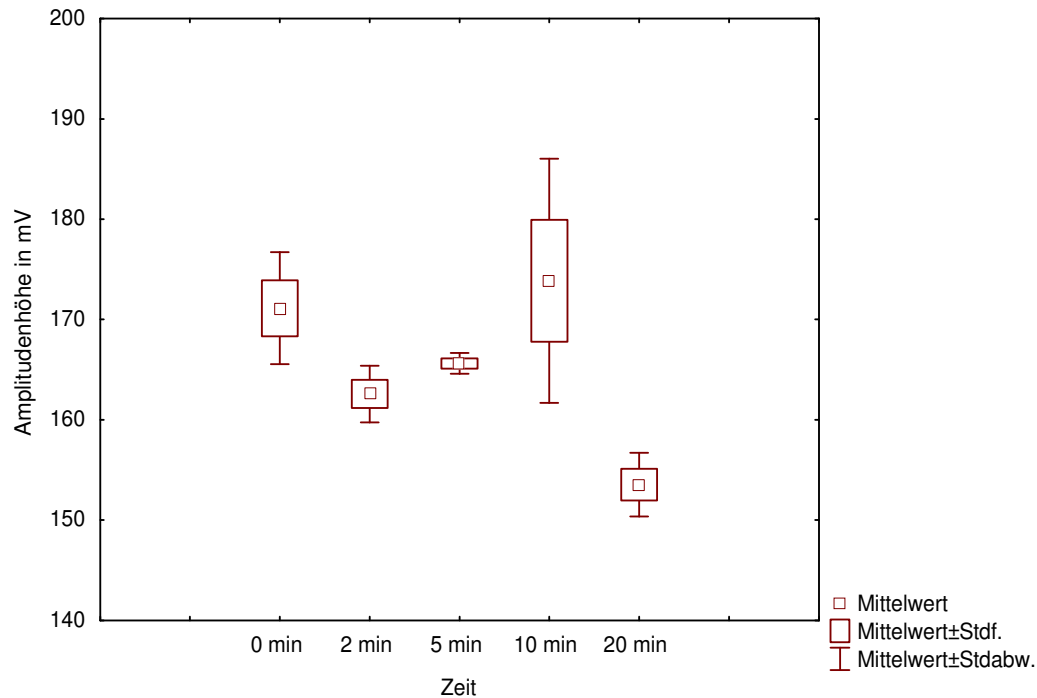


Abbildung 15: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden bei den 4 Musterpräsentationen (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas, unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung, zur Untersuchung der Beeinflussung durch Adaptation von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* ($n = 6$).

Der zur statistischen Bewertung angewendete Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ergab für den Vergleich $t = 0$ min und $t = 10$ min keine signifikanten Unterschiede.

Daraus erwies sich eine Zeitdifferenz von 10 min zwischen der Präsentation des Reizmusterschemas als optimal für die weiteren Untersuchungen an R2 und R3 Neuronen.

4.1.3 Spike-Rate

Die Spike-Raten (Anzahl der Spikes pro 4 sec Intervall = Dauer einer Musterpräsentation innerhalb des Reizmusterschemas) wurde an $n = 6$ Versuchstieren untersucht. Abgeleitet wurden die Potenziale von R2 Neuronen der linken Tectumhälfte in einer Tiefe von 20 bis 60 μm bei *Bombina orientalis*. Die Auswertung der Daten erfolgte nach dem in Kapitel 3.7.2 beschriebenen Verfahren. Konnten in einzelnen Ableitungen keine Spikes oberhalb der gesetzten Schwelle (einfaches Rauschband) lokalisiert werden, so fanden diese innerhalb der Graphiken keine Berücksichtigung.

Sämtliche Spikes der vier Musterpräsentationen des Reizmusterschemas, die sich oberhalb der zur Auswertung festgelegten Schwelle des einfachen Rauschbandes detektieren ließen, wurden gezählt und hieraus ein Mittelwert pro Musterpräsentation errechnet. Diese errechneten Werte wurden sowohl für die vier Musterpräsentationen innerhalb des Reizmusterschemas, als auch zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten miteinander verglichen. Die nachstehende Tabelle zeigt, zu welchen Zeitpunkten das Reizmusterschema präsentiert wurde, wobei t die Zeitdifferenz beschreibt, die zwischen den Präsentationen des Reizmusterschemas lag.

| Ableitung/ Zeitdifferenz | Reizmusterschema | | | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| $t = 0$ | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| $t = 2 \text{ min}$ | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| $t = 5 \text{ min}$ | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| $t = 10 \text{ min}$ | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| $t = 20 \text{ min}$ | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |

Die Abbildung 16 zeigt exemplarisch die Spike-Ratenveränderungen während der 4 Musterpräsentationen des Reizmusterschemas zum Ableitzeitpunkt $t = 0$. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der Spikes pro Zeit von der ersten bis zur vierten Musterpräsentation stetig abnahm, wobei sie zwischen der ersten und zweiten Musterpräsentation am höchsten war.

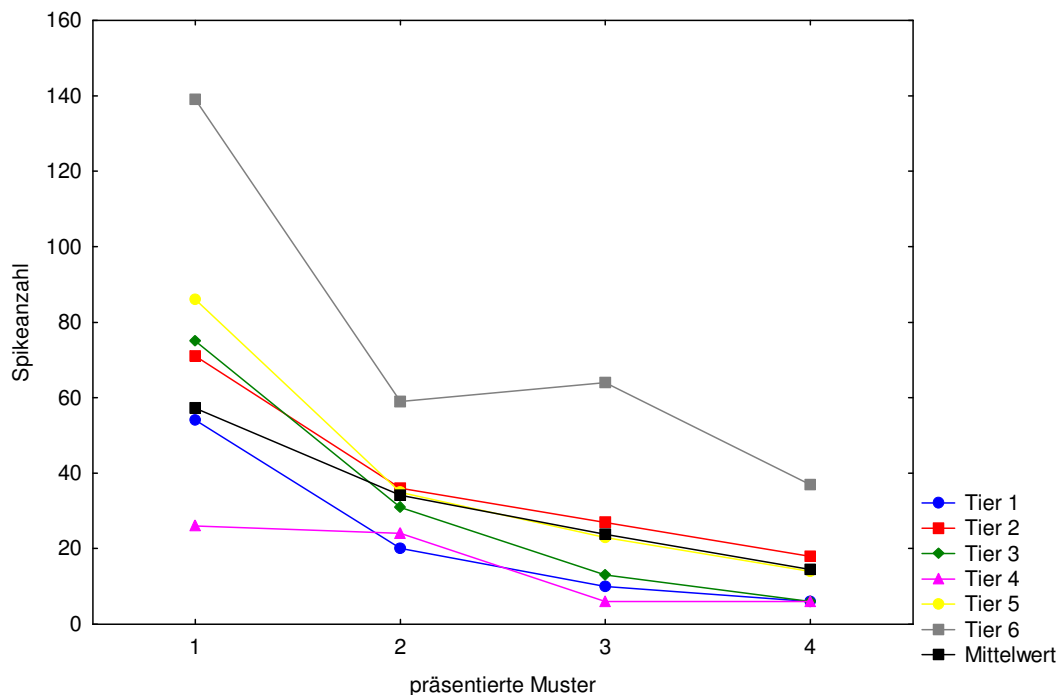


Abbildung 16: Darstellung der Spike-Ratenveränderung von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* während der vier Musterpräsentationen der Reizmusterserie zum Zeitpunkt $t = 0$. Die dargestellten Werte zeigen die errechneten Mittelwerte aller detektierten Spikes oberhalb des einfachen Rauschbandes während des jeweilig präsentierten Musters des Reizmusterschemas.

Bei der Ableitung $t = 0$ min konnten noch bei allen Versuchstieren während sämtlicher Musterpräsentationen des Reizmusterschemas Spikes identifiziert werden. Bei Ableitung $t = 2$ min konnten bei 5 Tieren Spikes identifiziert werden, die oberhalb der gesetzten Schwelle lagen, ebenso bei Ableitung $t = 5$ min. Der errechnete Mittelwert ($n = 6$) der Spikeanzahl pro Intervall war bei der Ableitung $t = 5$ min gegenüber der Ableitung $t = 2$ min geringfügig höher. Für 2 Tiere konnten bei der Ableitung $t = 10$ min lediglich während der ersten und zweiten Musterpräsentation Spikes identifiziert werden, der Mittelwert der identifizierten Spikes pro Intervall lag jedoch höher als bei $t = 2$ min bzw. $t = 5$ min. Bei der dritten Musterpräsentation ist im Mittel, sowie bei Tier 1 eine Erhöhung

der Spikeanzahl pro Intervall zu erkennen. Bei der Ableitung $t = 20$ min konnten lediglich für drei Tiere Spikes identifiziert werden, bei Musterpräsentation 4 für vier Tiere. Der errechnete Mittelwert der aufgezeichneten Spike-Raten lag aber bei allen 4 Musterpräsentationen wesentlich höher als bei den Ableitungen $t = 0$ min, $t = 2$ min, $t = 5$ min und $t = 10$ min. In der nachstehenden Abbildung 17 werden die errechneten Mittelwerte der Spikeanzahl pro Intervall bei $n = 6$ Versuchstieren während der vier Musterpräsentationen des Reizmusterschemas zu unterschiedlichen Ableitzeitpunkten t dargestellt. Es war zu allen Ableitzeitpunkten ein deutlicher Abfall der Spikeanzahl während der zweiten, dritten und vierten Musterpräsentation des Reizmusterschemas gegenüber der ersten Musterpräsentation zu beobachten.

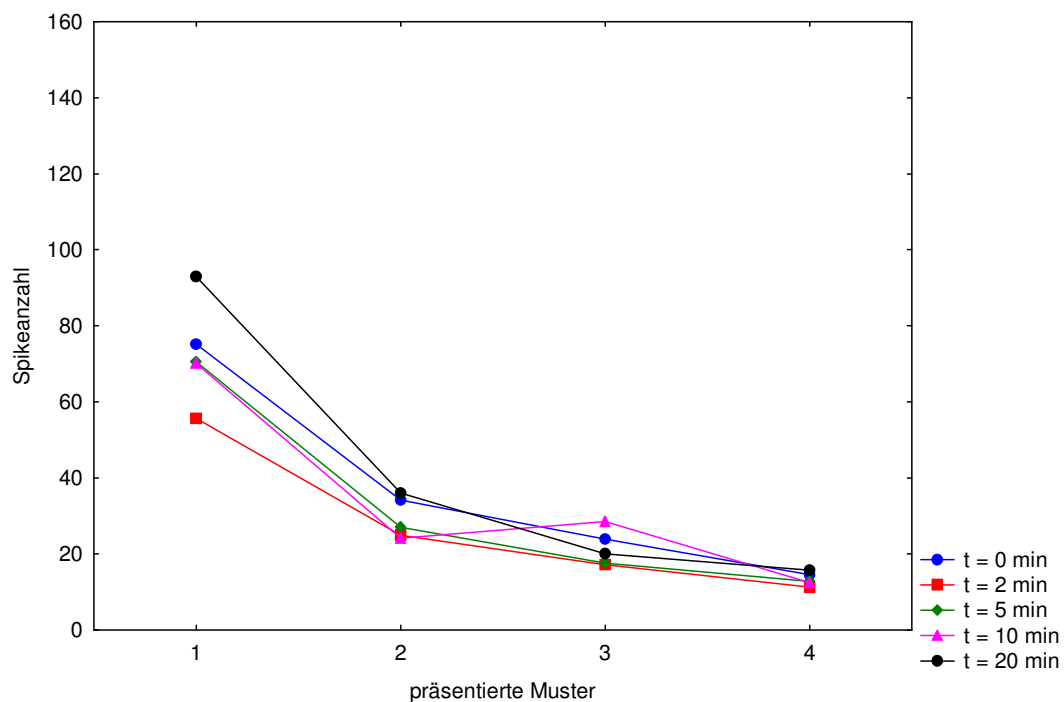


Abbildung 17: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spike-Raten von R2-Neuronen bei $n = 6$ Tieren während der 4 Musterpräsentationen innerhalb des Reizmusterschemas zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten t bei *Bombina orientalis*.

Der zur statistischen Bewertung verwendete Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ergab beim Vergleich der ersten Musterpräsentation zu den Musterpräsentationen zwei, drei und vier, zu allen Ableitzeitpunkten t , für die Prüfgröße R einen geringeren Wert als den Tabellenwert. H_0 wurde somit verworfen und H_1 bei

einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ akzeptiert. Resultierend daraus konnte der für retinale Ganglienzellen der Erdkröte *Bufo bufo* typische Verlauf der Entladungsraten bei wiederholter Reizgebung auch bei *Bombina orientalis* bestätigt werden.

Zur Ermittlung der optimalen Zeitdifferenz t , zwischen den Präsentationen des Reizmusterschemas bei der Untersuchung des Einflusses von NPY auf die Spike-Amplituden retinaler Ganglienzellen der Klasse R2, mussten die gemessenen Spikeanzahlen pro Intervall während der Musterpräsentationen zwischen den Ableitungen analysiert werden (siehe hierzu Schema Seite 38). Die folgende Abbildung 18 zeigt hierzu exemplarisch die Einzelergebnisse der detektierten Spikeanzahl pro Intervall während der ersten Musterpräsentation des Reizmusterschemas.

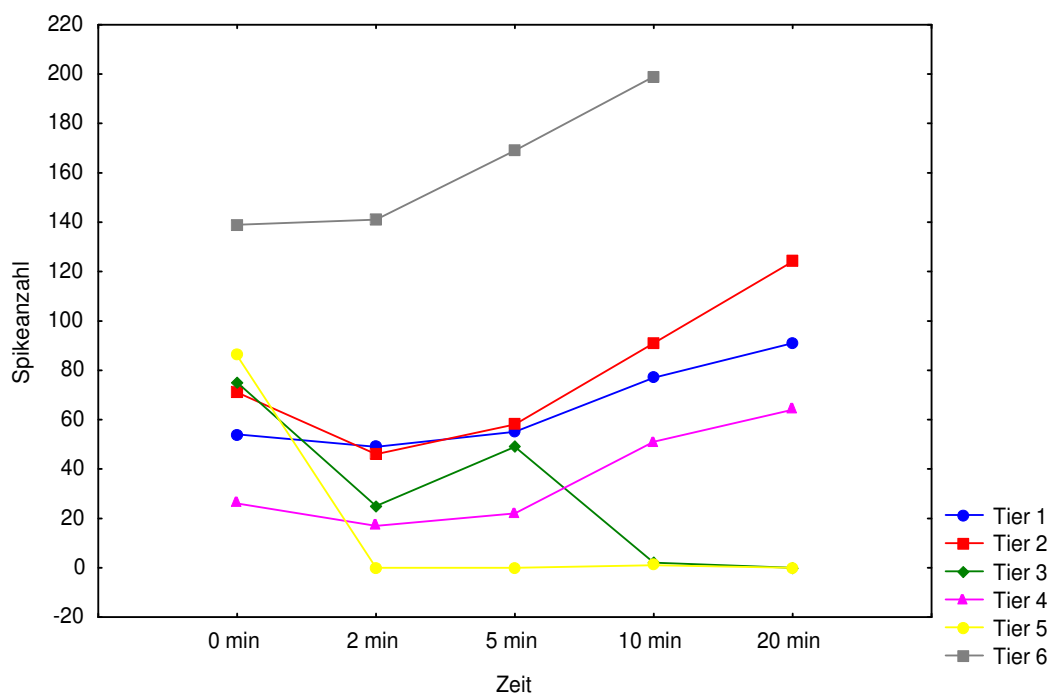


Abbildung 18: Darstellung der Veränderung der Spikeanzahl pro Intervall von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten während der 1. Musterpräsentation (Abschnitt 1) des Reizmusterschemas.

In Abbildung 19 werden die errechneten Mittelwerte der Spike-Raten der abgeleiteten R2-Neuronen während der Kontrollversuche dargestellt. Es wird deutlich, dass die Spike-Rate zu den Ableitzeitpunkten $t = 2$ min und $t = 5$ min abfällt und zum Ableitzeitpunkt $t = 10$ min, mit Ausnahme von Abschnitt 2, ansteigt. Erstaunlicherweise zeigen die Werte für den Ableitzeitpunkt $t = 20$ min im Mittel einen deutlichen Anstieg der Spikeanzahl pro Intervall bezogen auf den Ausgangswert. Eine Ausnahme zeigt Abschnitt 3, hier ist ein Abfall der Spike-Rate zu verzeichnen. Dies kann auf unterschiedliche Antwortbereitschaften der einzelnen Versuchstiere zurückzuführen sein, da es innerhalb der einzelnen Zeitintervalle nicht zu solchen extremen "Ausreißern" kam.

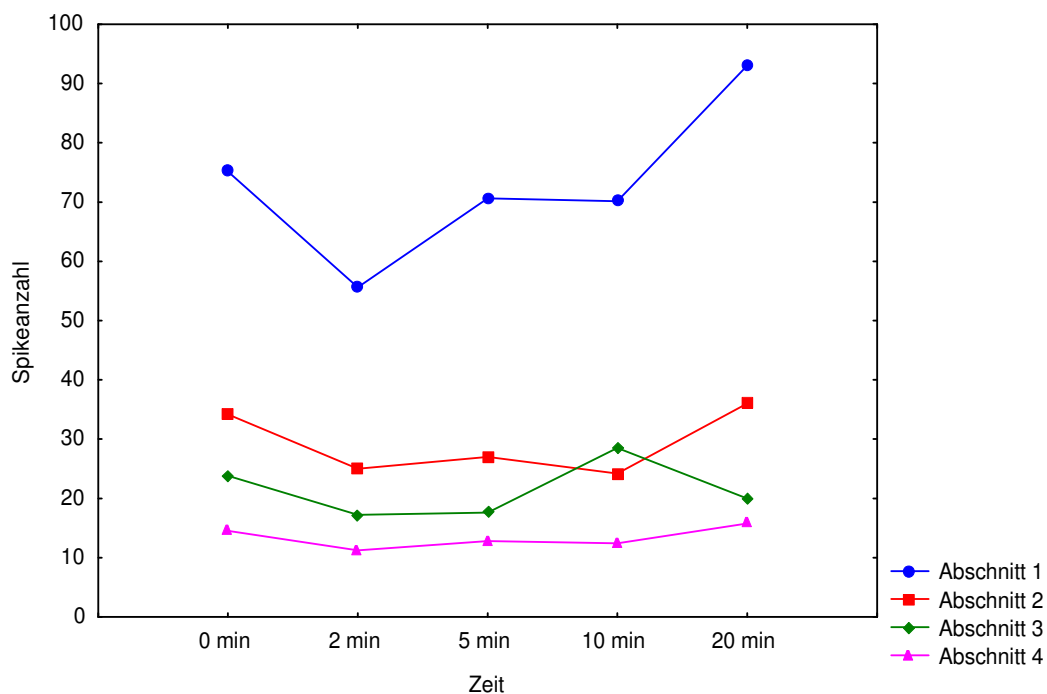


Abbildung 19: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Raten bei den 4 Musterpräsentationen (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas, zur Untersuchung der Beeinflussung durch Adaptation von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* ($n = 6$).

Die Auswertung der ermittelten Daten zeigt für die Spike-Rate nach $t = 10$ min einen Wert nahe dem Ausgangswert.

Die Erhöhung der mittleren Spike-Rate in Abschnitt 3 ist vermutlich auf Störungen während einer Ableitung zurückzuführen, die auch durch eine entsprechende Filterung nicht zu eliminieren waren. Diesem Umstand wird in der

Darstellung in Abbildung 20 Rechnung getragen. Die vergleichsweise große Streuung findet ihre Begründung in der individuellen Beeinflussbarkeit der einzelnen Versuchstiere. So haben Stoffwechsellage, Motivation, Alter, wie auch äußere Faktoren (Temperatur, Jahreszeit etc.) unterschiedlichen Einfluss auf die Versuchstiere. Es wird aber deutlich, dass die Spike-Raten, mit denen die abgeleiteten R2 Neuronen auf die präsentierten Muster antworteten, im Mittel nach 10 Minuten nahe ihrem Ausgangswert liegen.

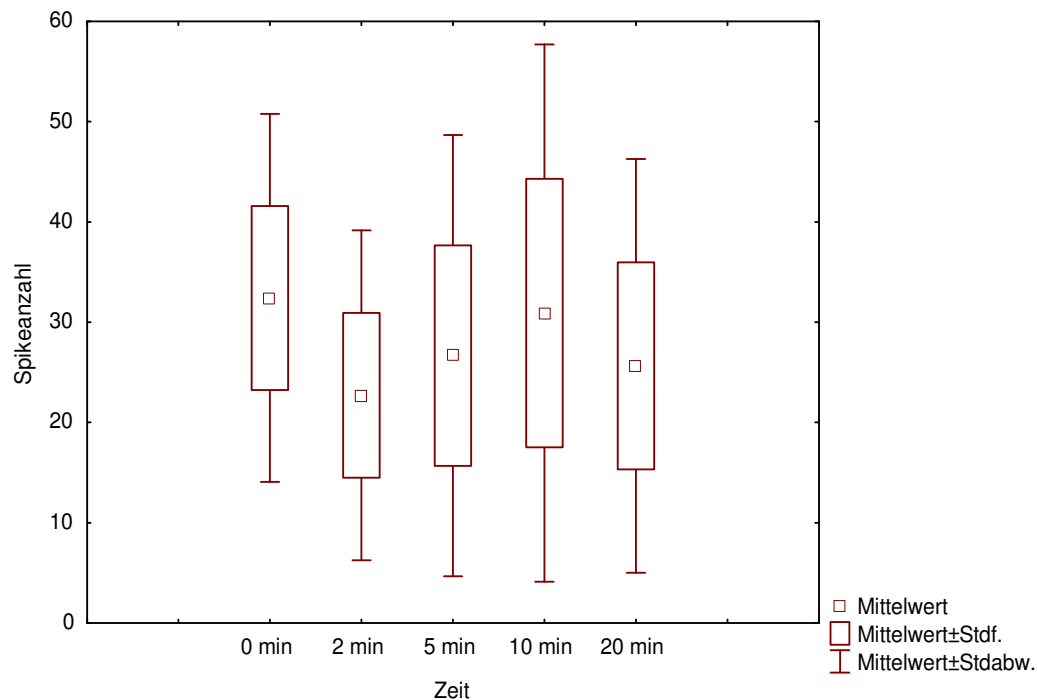


Abbildung 20: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Raten bei den 4 Musterpräsentationen (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas, unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung, zur Untersuchung der Beeinflussung durch Adaptation von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* ($n = 6$).

Der zur statistischen Bewertung angewandte Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ergab für den Vergleich der Ableitungen $t = 0$ min mit den Ableitungen $t = 10$ min und $t = 20$ min, für die Prüfgröße R einen größeren Wert über dem Tabellenwert und H_0 wurde somit akzeptiert.

Mit Hilfe der Kontrollversuche konnte festgestellt werden, dass weder die ermittelten Spike-Amplituden noch die Anzahl der Spikes pro Intervall während der vier Musterpräsentationen des Reizmusterschemas zu den Ableitzeitpunkten $t = 0$ min und $t = 10$ min signifikante Unterschiede aufwiesen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Untersuchungen der Wirkungsweise von NPY auf R2 Neuronen ein Zeitraum von 10 min zwischen der Präsentation des Reizmusterschemas gewählt. So konnte sichergestellt werden, dass die erzielten Ergebnisse miteinander vergleichbar sind. Für R3-Neuronen wurden keine derartigen Kontrollversuche durchgeführt, da bekannt ist, dass bei diesen Neuronen kaum ein Adaptationsphänomen bei wiederholter Reizgebung stattfindet.

4.2 Der Einfluss von NPY auf visuelle Antworten retinaler Ganglienzellen der Klasse R2

4.2.1 Einfluss auf die Spike-Amplituden

Der Einfluss von NPY auf die Spike-Amplituden retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 im Tectum opticum von *Bombina orientalis* wurde bei $n = 8$ Tieren untersucht. Den durch Succinylcholin demobilisierten Tieren wurde in Ringerlösung gelöstes NPY in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l auf die Tectumoberfläche appliziert. Anhand des, durch die Kontrollversuche ermittelten, optimalen Zeitabstandes zwischen der Präsentation des Reizmusterschemas, wurde den Versuchstieren im Abstand von 10 min viermal eine Musterattrappe in Form eines schwarzen Quadrates (Größe: 10 X 10 mm) präsentiert. Während dieser Musterpräsentationen wurden die visuell evozierten Aktionspotenziale der R2 Neuronen in einer Tiefe von 20 – 60 μ m von der linken Tectumhälfte abgeleitet (siehe dazu auch Kap.3.3 und 3.4). Bei sämtlichen Spikes der vier Musterpräsentationen des Reizmusterschemas, die sich oberhalb der zur Auswertung festgelegten Schwelle des einfachen Rauschbandes detektieren ließen, wurde die Amplitude gemessen und hieraus ein Mittelwert errechnet. Diese errechneten Werte wurden sowohl für die vier Musterpräsentationen innerhalb des Reizmusterschemas, als auch zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten miteinander verglichen. Nachfolgend wird noch einmal tabellarisch gezeigt, zu welchen Zeitpunkten t das Reizmusterschema präsentiert wurde.

| Ableitung | Reizmusterschema | | | |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ohne NPY | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| NPY 10 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| NPY 20 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| rec NPY 10 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| rec NPY 20 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |

Die so gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Analysesoftware "Spike 2" ausgewertet (siehe Kap. 3.7). In der folgenden Abbildung 21 sind exemplarisch die Einzelergebnisse der Versuchstiere $n = 8$ während der Ableitung ohne NPY, sowie der aus diesen Daten errechnete Mittelwert dargestellt.

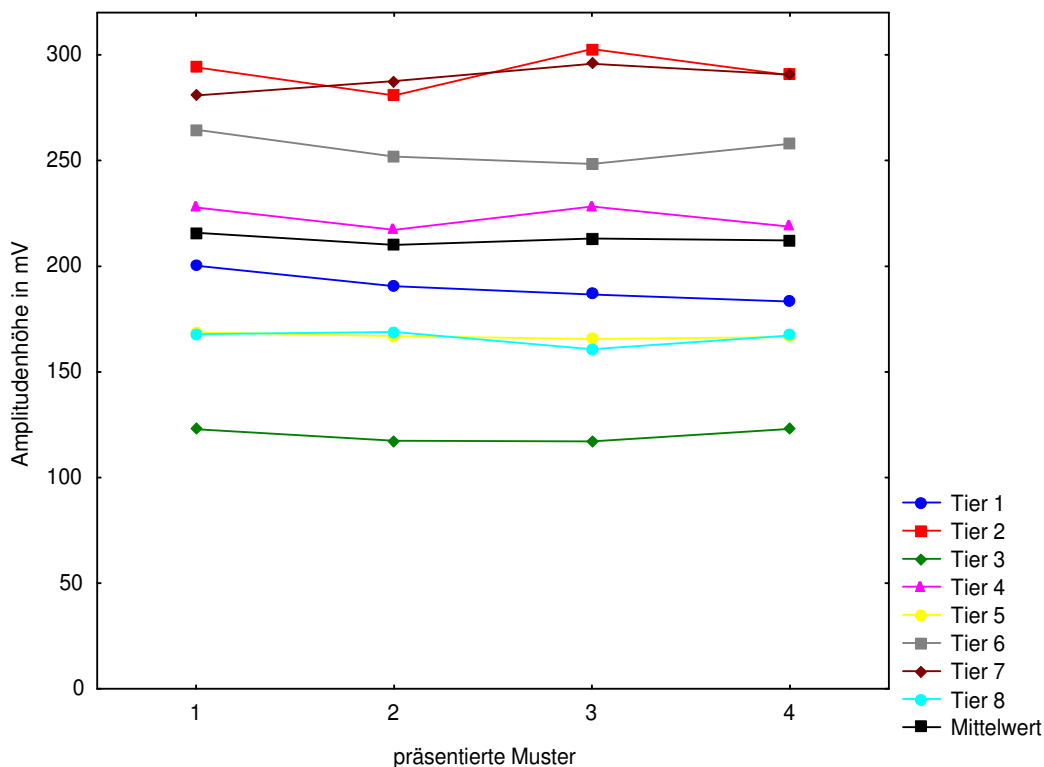


Abbildung 21: Darstellung der Spike-Amplituden von R2-Neuronen bei den Musterpräsentationen 1 bis 4 des Reizmusterschemas bei *Bombina orientalis* ohne eine Beeinflussung durch NPY. Farblich dargestellt sind die für die einzelnen Versuchstiere ermittelten Daten. Der daraus errechnete Mittelwert (Tier 1-8) ist schwarz in der Graphik dargestellt.

Nach diesem Prinzip wurde die NPY induzierte Veränderung der Spike-Amplituden zwischen den Musterpräsentationen des Reizmusterschemas für alle durchgeführten Ableitungen untersucht. Die aus diesen Einzelergebnissen errechneten Mittelwerte der Spike-Amplitudenhöhen aller Versuchstiere $n = 8$ werden in Abbildung 22, für durchgeführten Untersuchungen ohne NPY-Beeinflussung und 20 min nach NPY-Applikation, graphisch dargestellt.

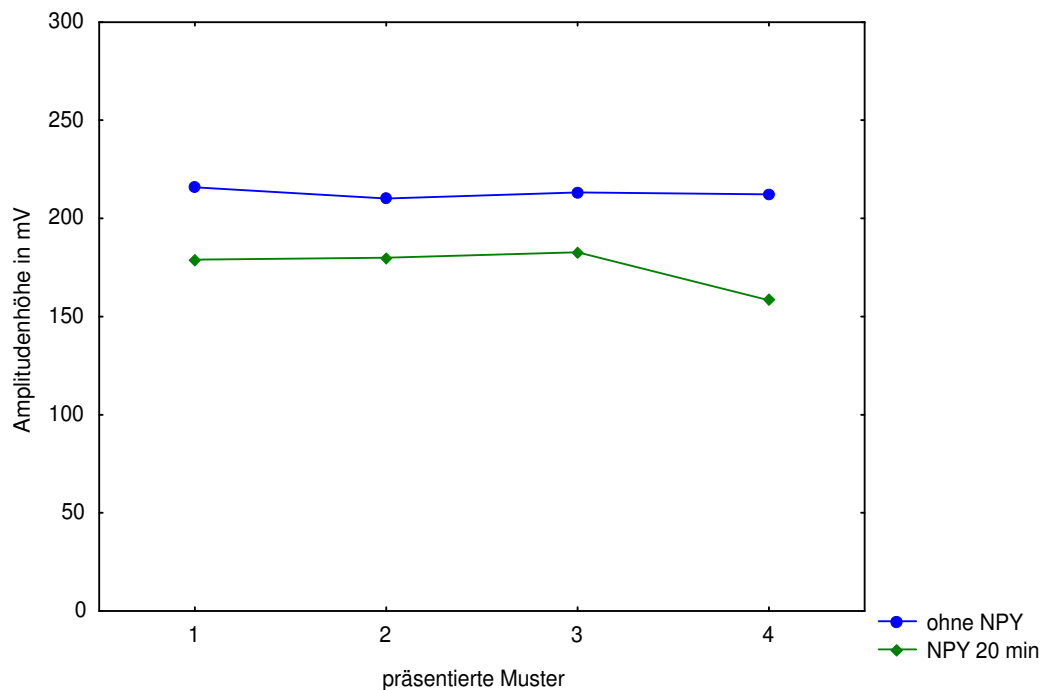


Abbildung 22: Darstellung der errechneten Mittelwerte ($n = 8$) der Spike-Amplituden von R2-Neuronen bei den Musterpräsentationen 1 bis 4 des Reizmusterschemas bei *Bombina orientalis* während der durchgeführten Untersuchungen ohne NPY-Applikation (ohne NPY) sowie der durchgeführten Untersuchungen mit NPY-Applikation (NPY 20 min).

Es wird deutlich, dass die Spike-Amplituden bei allen Versuchstieren innerhalb eines Reizmusterschemas weitgehend stabil blieben, auch unter NPY.

Die zur statistischen Bewertung verwendete Rangvarianzanalyse nach Friedman ergab für χ^2 einen geringeren Wert als den kritischen Tabellenwert, somit wurde H_0 akzeptiert. Zwischen den gemessenen Spike-Amplituden konnten während der vier Musterpräsentationen innerhalb des Reizmusterschemas keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Allerdings unterscheiden sich die Spike-Amplituden nach der Applikation von NPY.

Bei der weiteren Auswertung der Ableitungen bei $n = 8$ Versuchstieren und der Gegenüberstellung der verschiedenen Ableitungen ließen sich 10 min nach der Applikation von NPY auf die Tectumoberfläche (Ableitung NPY 10 min) noch für alle Versuchstiere Spike-Amplituden messen, die oberhalb der zur Auswertung gesetzten Schwelle (einfaches Rauschband) lagen. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Spike-Amplituden bereits 10 min nach der NPY-Applikation leicht gesunken waren. Während der Ableitungen 20 min nach

Beginn der NPY-Applikation (Ableitung NPY 20 min) wurde eine deutliche Reduzierung der Spike-Amplituden, im Vergleich zu den Ableitungen ohne NPY, gemessen. Es konnten nur noch bei 5 Versuchstieren Amplituden oberhalb der gesetzten Schwelle erfasst werden und auch die Werte der gemittelten Daten der Spike-Amplituden lagen deutlich unter denen ohne eine Beeinflussung durch NPY.

Zehn Minuten nach Beendigung der NPY-Applikation durch Entfernen der Applikationskapillare von der Tectumoberfläche ließen sich für 7 Versuchstiere wieder Spikes mit Amplituden oberhalb der Schwelle identifizieren. Es konnte ein Anstieg der Amplitude gegenüber NPY 10 min und NPY 20 min verzeichnet werden. Die gemessenen Amplitudenhöhen erreichten fast ihren Ausgangswert (ohne NPY-Beeinflussung). Auch während der Ableitungen rec NPY 20 min (20 min nach Entfernen der NPY-Applikationskapillare von der Tectumoberfläche), konnte im Vergleich zu den Ableitungen NPY 10 min und NPY 20 min ein Anstieg der Spike-Amplitudenhöhen gemessen werden.

Im Vergleich zu den Ableitungen rec NPY 10 min weisen diese Ergebnisse eine Besonderheit auf. Wie bei rec NPY 10 min konnten bei rec NPY 20 min nicht für alle Tiere Spike-Amplituden oberhalb der gesetzten Schwelle ermittelt werden. Weiterhin kam es im Vergleich zu den Ableitungen rec NPY 10 min zu einer Verringerung der gemessenen Spike-Amplituden. Dies war in dieser Form nicht zu erwarten und muss an anderer Stelle diskutiert werden. Hierbei ist die Versuchslänge in Betracht zu ziehen.

In der folgenden Abbildung 23 werden die errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden aller Versuchstiere ($n = 8$) während der vier Musterpräsentationen (Abschnitt 1 bis 4) des Reizmusterschemas bei allen durchgeführten Ableitungen gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass die gemessenen Spike-Amplituden visuell ausgelöster Aktionspotenziale von retinalen Ganglienzellen der Klasse R2 bei *Bombina orientalis* durch den Einfluss von NPY deutlich vermindert wurden. Bei allen Musterpräsentationen wurde die Amplitude 20 min nach Beginn der NPY-Applikation am stärksten reduziert.

Setzt man die gemessenen Spike-Amplituden vor der NPY-Applikation willkürlich gleich 100 %, wurden 20 min nach NPY-Applikation Amplitudenhöhen von

- 82,92 % in Abschnitt 1
- 85,93 % in Abschnitt 2
- 85,74 % in Abschnitt 3
- 74,57 % in Abschnitt 4

des Ausgangswertes erreicht, im Mittel erfolgte eine Reduktion auf 82,29 %.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die durch NPY verursachte Amplitudenreduzierung reversibel ist. Nach einer Erholungsphase von 10 Minuten wurden wieder erhöhte Amplitudenwerte gemessen. Diese verringerten sich bei der Ableitung rec NPY 20 min wieder leicht, lagen aber dennoch höher als unter einer NPY-Gabe.

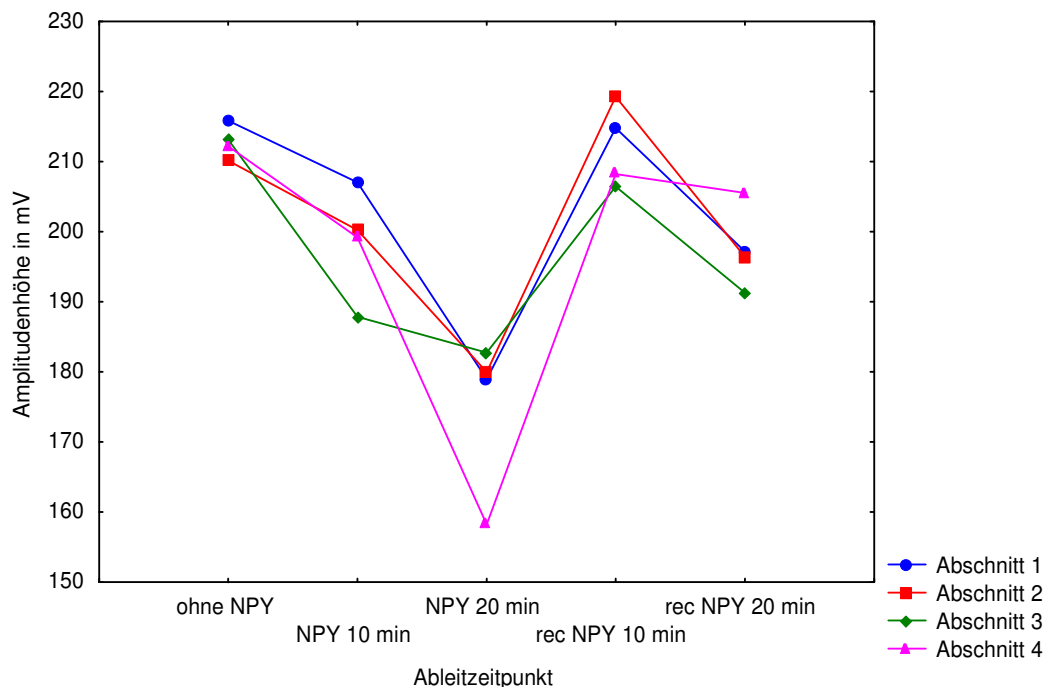


Abbildung 23: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden während der 4 Musterpräsentationen des Reizmusterschemas (Abschnitt 1 – 4) aller Versuchstiere ($n = 8$) zur Untersuchung des Einflusses von NPY auf die Spike-Amplituden.

In Abbildung 24 werden diese Daten unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung des Mittelwertes ($n = 8$) dargestellt.

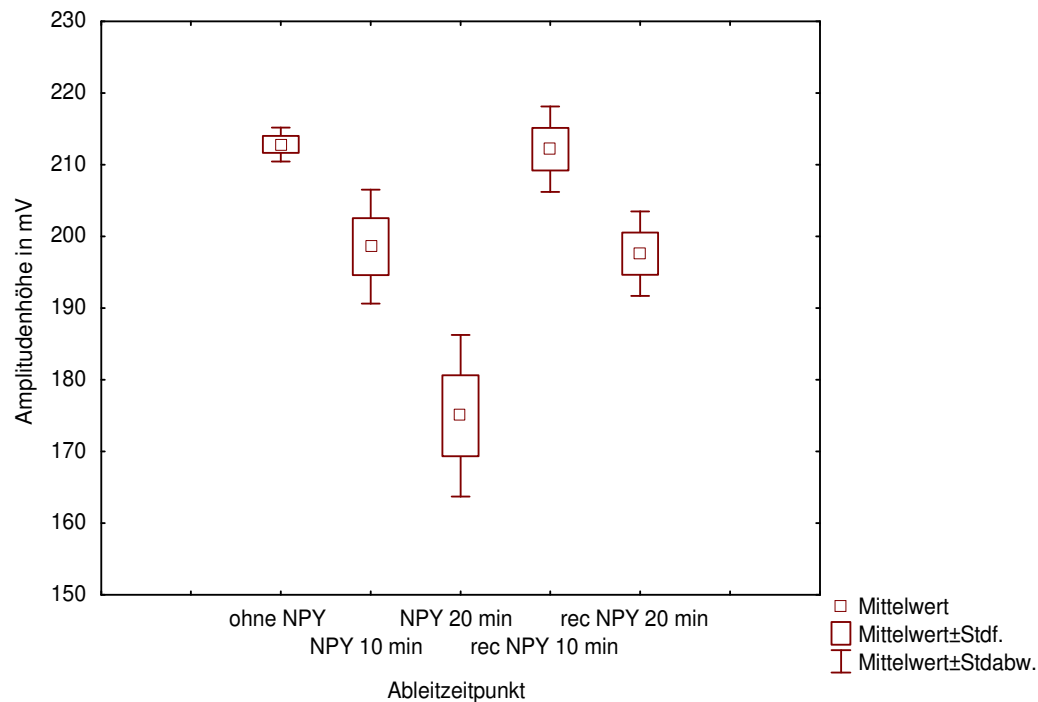


Abbildung 24: Darstellung der errechneten Spike-Amplitudenmittelwerte aller Versuchstiere ($n = 8$) während der 1. - 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas (Abschnitt 1 – 4) bei der Ableitung retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 bei *Bombina orientalis* zur Untersuchung des Einflusses von NPY auf die Spike-Amplituden, unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung.

Der zur statistischen Bewertung durchgeführte Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, zur Prüfung signifikanter Unterschiede der Spike-Amplituden der einzelnen Musterpräsentationen des Reizmusterschemas zwischen den durchgeführten Ableitungen, ergab für den Vergleich der Ableitungen ohne NPY und NPY 20 min für die Prüfgröße R einen geringeren Wert als den Tabellenwert, so dass H_0 abgelehnt wurde und H_1 sich bei einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ akzeptieren ließ.

Auch beim Vergleich der Ableitungen NPY 20 min und rec NPY 10 min wurde die Nullhypothese abgelehnt und H_1 bei einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ akzeptiert.

4.2.2 Einfluss auf die Entladungsrate

Der Einfluss von NPY auf die Entladungsrate retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 im Tectum opticum von *Bombina orientalis* wurde bei $n = 11$ Tieren untersucht. Nach der Demobilisierung der Versuchstiere durch Succinylcholin wurde in Ringerlösung verdünntes NPY in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l auf die Tectumoberfläche appliziert. Die Ableitungen wurden wie bei den Untersuchungen der Spike-Amplituden für alle Versuchstiere nach folgendem Schema durchgeführt:

| Ableitung | Reizmusterschema | | | |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 1. | 2. | 3. | 4. |
| ohne NPY | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation | Musterpräsentation |
| NPY 10 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| NPY 20 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| rec NPY 10 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |
| rec NPY 20 min | 1. Musterpräsentation | 2. Musterpräsentation | 3. Musterpräsentation | 4. Musterpräsentation |

Wie auch bei den Untersuchungen der Spike-Amplituden wurden die ermittelten Daten mit Hilfe der Analysesoftware "Spike 2" ausgewertet. Hierbei wurde eine Schwelle (einfaches Rauschband) gesetzt und nur die Spikeanzahl pro Intervall, die oberhalb dieser Schwelle lag, zur Auswertung herangezogen. Somit war gewährleistet, dass nur die neuronalen Antworten auf die präsentierten Muster ausgewertet wurden, nicht aber Spikes, die im Rauschband (Grundrauschen) der Ableitungen lagen (siehe Kap. 3.7). Die ermittelten Werte wurden sowohl für die vier Musterpräsentationen innerhalb des Reizmusterschemas, als auch zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten miteinander verglichen.

In der nachstehenden Abbildung 25 wird beispielhaft die ermittelte Anzahl der Spikes pro Intervall für die 11 Versuchstiere ohne eine Beeinflussung durch NPY während der 4 Musterpräsentationen des Reizmusterschemas dargestellt. Hierbei sind die ermittelten Daten der einzelnen Versuchstiere farbig und der aus diesen Daten errechnete Mittelwert schwarz dargestellt.

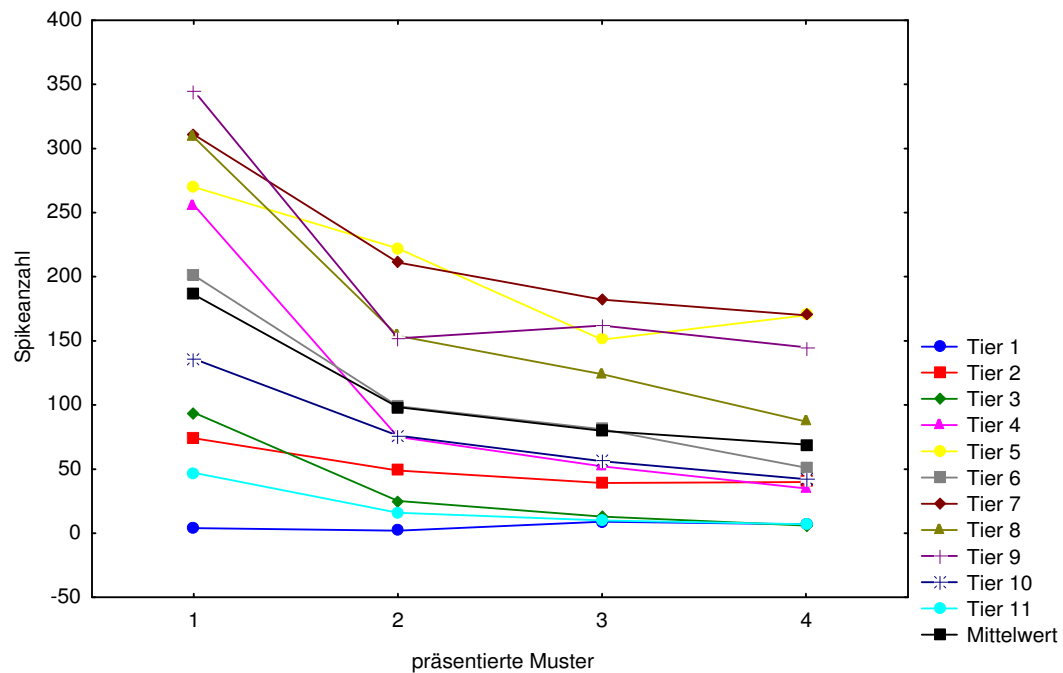


Abbildung 25: Darstellung der Veränderung der Spike-Rate während der Musterpräsentationen 1 – 4 des Reizmusterschemas bei *Bombina orientalis* ($n = 11$). Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 ohne eine Applikation von NPY auf die Tectumoberfläche.

Die NPY induzierte Veränderung der Spike-Rate während der einzelnen Musterpräsentationen des Reizmusterschemas wurde für alle Versuchstiere ($n = 11$) nach diesem Prinzip untersucht. Die daraus berechneten Mittelwerte für $n = 11$ Tiere, zu allen durchgeführten Untersuchungen, sind in Abbildung 26 dargestellt.

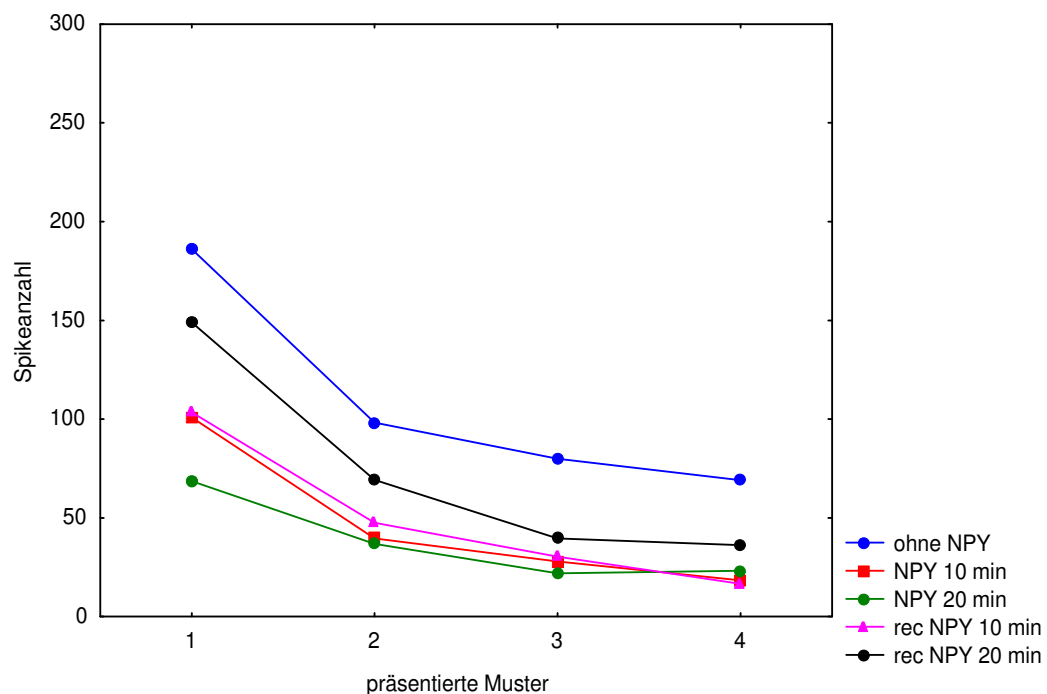


Abbildung 26: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spikeanzahl pro Intervall aller Versuchstiere ($n = 11$) während der Präsentation des Reizmusterschemas (Musterpräsentation 1 bis 4), ohne NPY-Beeinflussung (ohne NPY), nach NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche (NPY 10 min, NPY 20 min) und nach Beendigung der NPY-Applikation während der Erholungsphase (rec NPY 10 min, rec NPY 20 min). Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale von R2 Neuronen im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.

Wie aus der Abbildung 26 hervorgeht, folgen die neuronalen Antworten einem klaren Schema. Die Antwortbereitschaft auf die 1. Musterpräsentation des Reizmusterschemas war am höchsten und nahm im Laufe der 2. bis 4. Musterpräsentation stetig ab.

Dies ist typisch für retinale Ganglienzellen der Klasse R2.

Die Auswertung der Ergebnisse der einzelnen Versuchstiere ergab, dass es bereits 10 min nach der NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche zu einem deutlichen Abfall der Entladungsfrequenz bei allen Versuchstieren kam. Zum Teil sogar so weit, dass keine Spikes mehr oberhalb der Schwelle identifiziert

werden konnten. Diese Verringerung der Entladungsfrequenz wurde 20 min nach der NPY-Applikation noch verstärkt. Zu diesem Zeitpunkt konnten nur noch für 6 Versuchstiere Spikes oberhalb der Schwelle identifiziert werden. Es kam bei einzelnen Tieren zu einer Entladungsfrequenzverringerng von bis zu 74 %. Für die Musterpräsentationen 10 min nach Beendigung der NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche, durch Entfernen der Applikationskapillare, konnte ein deutlicher Anstieg der Entladungsfrequenz gegenüber den Ableitungen NPY 10 min und NPY 20 min verzeichnet werden. Es konnten für 9 Tiere Spikes identifiziert werden, jedoch erreichten die errechneten Mittelwerte der Spikezahlen pro Intervall nicht den Ausgangswert ohne eine NPY-Beeinflussung. Nach einer weiteren Erholungsphase und 20 min nach Beendigung der NPY-Applikation konnten für 10 Versuchstiere wieder Spikes detektiert werden. Gegenüber den Ableitungen rec NPY 10 min kam es zu einem Anstieg der Entladungsfrequenz der retinalen Antworten. Jedoch wurden auch hier nicht die Werte erreicht, die während der Ableitungen ohne eine Beeinflussung durch NPY gemessen wurden.

Obwohl in den Ableitungen der einzelnen Versuchstiere eine große Streuung der Ergebnisse konstatiert werden muss, kam es bei allen vier Musterpräsentationen zu einer NPY induzierten signifikanten Verringerung der Entladungsfrequenz nach 10 min bzw. 20 min.

Die Abbildung 27 zeigt beispielhaft die gemessenen Spikezahlen pro Intervall für die erste Musterpräsentation des Reizmusterschemas während der durchgeführten Ableitungen.

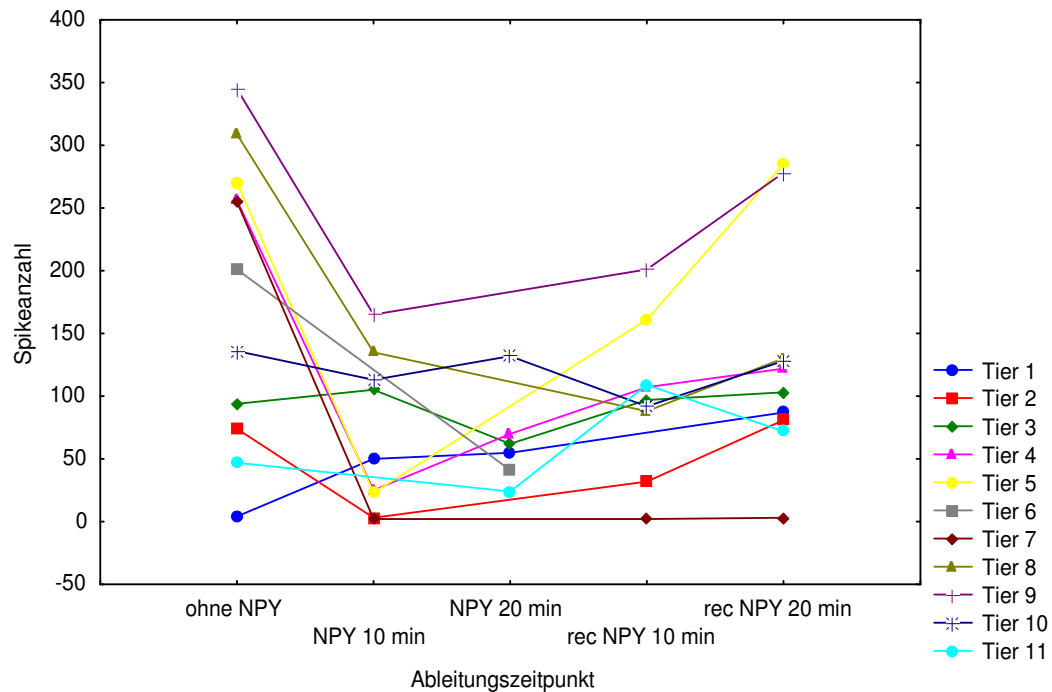


Abbildung 27: Darstellung der ermittelten Entladungsraten aller Versuchstiere ($n = 11$) während der ersten Musterpräsentation des Reizmusterschemas während der Ableitungen ohne NPY, NPY 10 min, NPY 20 min und nach Beendigung der NPY-Applikation rec NPY 10 min und rec NPY 20 min. Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale von R2 Neuronen im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.

Trotz der weiter oben bereits angesprochenen Streuung der Ergebnisse, ist eine deutliche Verringerung der Entladungsfrequenz bei fast allen Versuchstieren zu beobachten.

Um den Effekt von NPY auf die Entladungsraten retinaler R2 Neuronen bei *Bombina orientalis* quantitativ zu prüfen, wurden in Abbildung 28 die errechneten Mittelwerte der Versuchstiere ($n = 11$) während der 4 Musterpräsentationen (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas graphisch dargestellt.

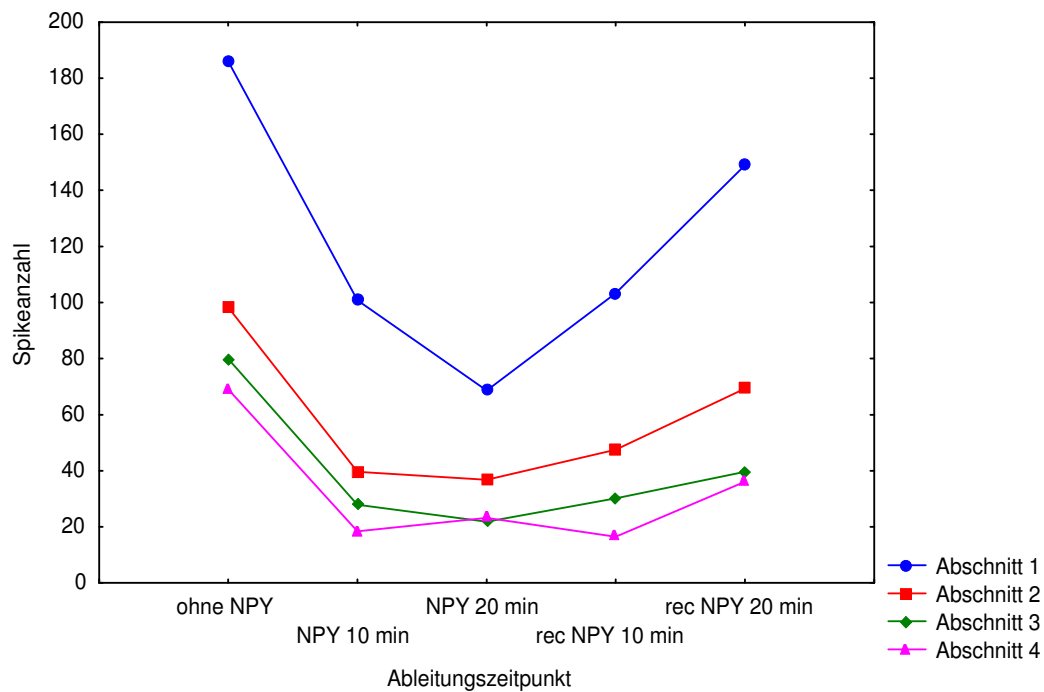


Abbildung 28: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ausgewerteten Spikezahlen pro Intervall aller Versuchstiere ($n = 11$). Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 im Tectum opticum bei *Bombina orientalis* zur Untersuchung der Beeinflussung der Spike-Raten durch NPY.

Wie oben bereits angesprochen, unterlagen die Ergebnisse einer relativ großen Streuung. Dies kann u. U. mit der individuell unterschiedlichen Antwortbereitschaft der einzelnen Versuchstiere erklärt werden. Die Tiere wurden zwar vor Versuchsbeginn auf ihre Antwortbereitschaft und ihre Motivation hin getestet, dennoch reagierten sie während der Versuche unterschiedlich. Dies ist ein vom Experimentator nicht beeinflussbarer Umstand und muss als eine mögliche "Fehlerquelle" gesehen werden.

Der Streuung der Ergebnisse wird in Abbildung 29 Rechnung getragen. Der Trend der Ergebnisse innerhalb eines Abschnitts ist jedoch für alle Abschnitte gleich. Dargestellt sind in Abbildung 29 die errechneten Mittelwerte von $n = 11$ Versuchstieren während der 4 Musterpräsentationen zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung.

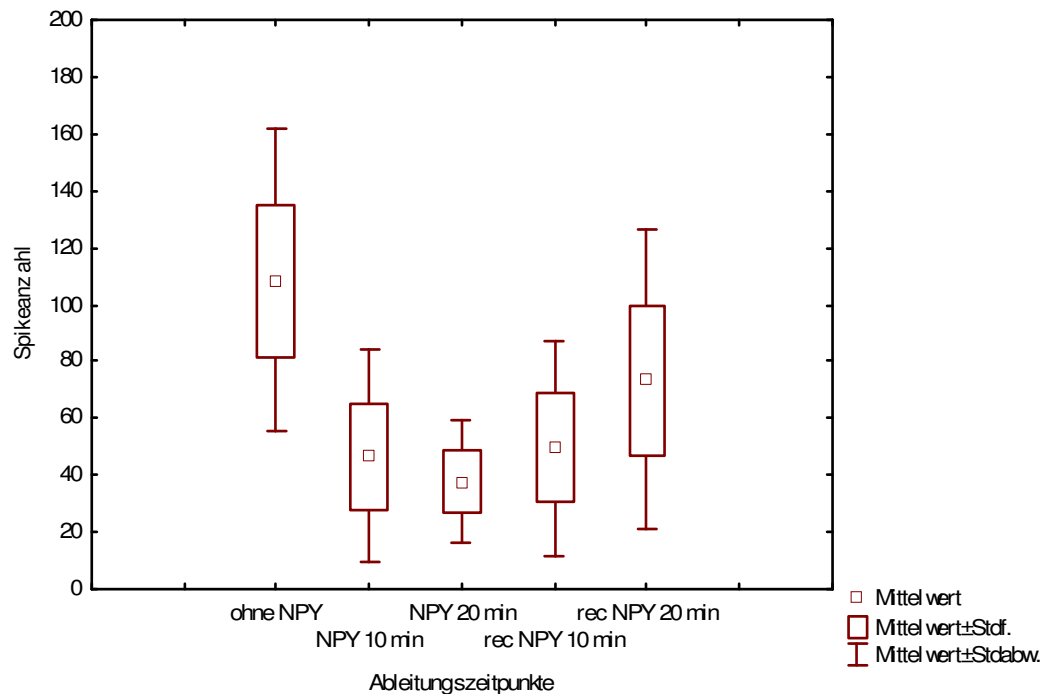


Abbildung 29: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Entladungsraten aller Versuchstiere ($n = 11$) für die 1. - 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas während der Ableitung retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 bei *Bombina orientalis* unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung.

Es konnte gezeigt werden, dass NPY die Entladungsfrequenz retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 bereits 10 min nach Applikation auf die Tectumoberfläche deutlich reduziert. Dieser Effekt war 20 min nach Applikation auf die Tectumoberfläche weiter verstärkt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt reversibel ist, denn 10 min nach Beendigung der Applikation durch Entfernen der Applikationskapillare kam es wieder zu einer Erhöhung der Entladungsraten. Diese waren 20 min nach Beenden der NPY-Applikation verstärkt, es wurden jedoch nicht die Ausgangswerte ohne NPY-Beeinflussung erreicht.

Der zur statistischen Prüfung angewandte Wilcoxon-Test für Paardifferenzen für den Vergleich der Musterpräsentationen des Reizmusterschemas zwischen den Ableitungen ohne NPY und NPY 10 min sowie NPY 20 min, ergab für die Daten von $n = 11$ Tieren für die Prüfgröße R einen kleineren Wert als den kritischen Tabellenwert, somit wurde H_0 abgelehnt und H_1 bei einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ akzeptiert.

Dies traf ebenfalls für den Vergleich der Ableitungen ohne NPY mit den Ableitungen rec NPY 10 min und rec NPY 20 min zu. Weiterhin konnte ein signifikanter Anstieg der Spike-Raten beim Vergleich der Ableitungen NPY 20 min und rec NPY 20 min verzeichnet werden.

Somit ist nachgewiesen, dass NPY die Rate der Spikes von R2 Neuronen bereits nach 10 min signifikant beeinflusst. Auch 10 min nach Beendigung der NPY-Applikation sind die Auswirkungen von NPY auf die Spike-Rate noch als signifikant nachweisbar. Erst 20 min nach Beendigung der NPY-Applikation durch Entfernen der Applikationskapillare konnte ein signifikanter Anstieg der Spike-Rate verzeichnet werden.

4.3 Der Einfluss von NPY auf visuelle Antworten retinaler Ganglienzellen der Klasse R3

4.3.1 Einfluss auf die Spike-Amplituden

Die Beeinflussung der Spike-Amplituden retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 wurde bei *Bombina orientalis* an $n = 5$ Tieren untersucht. Sowohl Untersuchungskriterien als auch der Versuchsablauf entsprachen denen der Untersuchungen der R2 Neuronen (siehe dazu Kap. 3.7 und Kap. 4.2.1).

Die folgende Abbildung 30 zeigt exemplarisch die ermittelten Spike-Amplitudenhöhen für alle untersuchten Tiere während der vier Musterpräsentationen des Reizschemas bei den Ableitungen ohne NPY. Die Ergebnisse für die einzelnen Versuchstiere sind innerhalb der Graphik farblich und der daraus errechnete Mittelwert ist schwarz dargestellt.

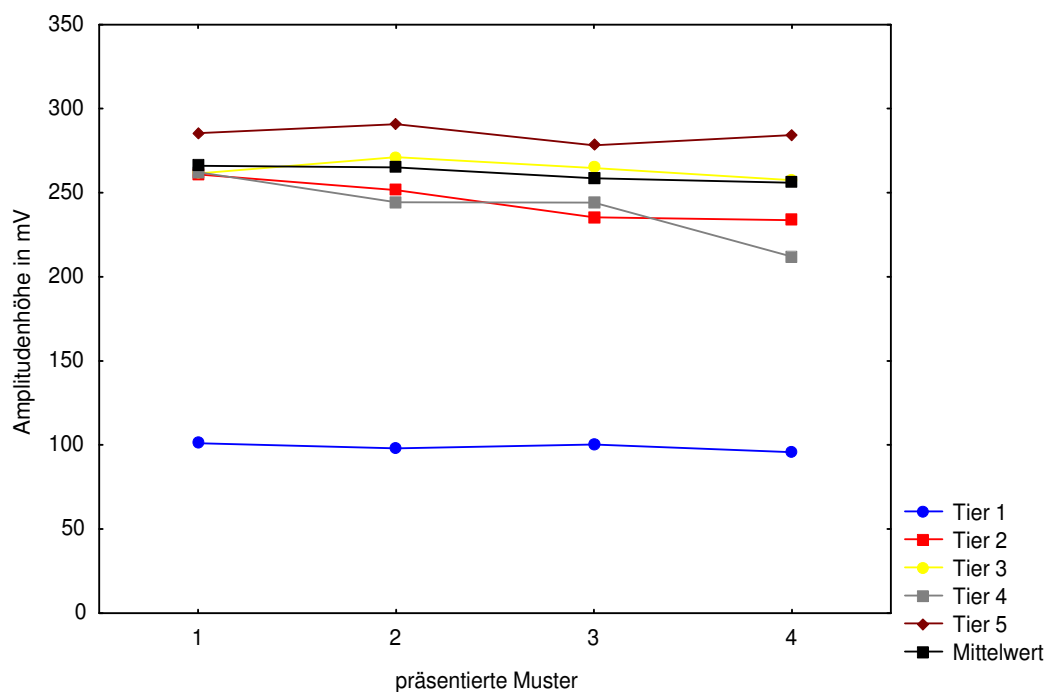


Abbildung 30: Darstellung der gemessenen Spike-Amplitudenhöhen retinaler R3 Neuronen bei *Bombina orientalis* während der 1. - 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas ohne eine Beeinflussung durch NPY.

Alle ermittelten Daten wurden, sowohl für die vier Musterpräsentationen innerhalb des Reizmusterschemas, als auch zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten, miteinander verglichen.

Während der Ableitung ohne NPY konnte bei der Präsentation des Reizmusterschemas ein weitgehend konstanter Verlauf der Höhe der Spike-Amplituden bei allen Versuchstieren verzeichnet werden. Es lag offenbar keine Adaptation vor.

Zehn Minuten nach der Applikation von NPY auf die Tectumoberfläche konnten nur noch für 4 der 5 untersuchten Tiere Spike-Amplitudenwerte gemessen werden, die oberhalb der zur Auswertung gesetzten Schwelle (einfaches Rauschband) lagen. Insgesamt war eine Reduzierung der Spike-Amplitude zu verzeichnen. Dies wird auch in den errechneten Mittelwertdaten deutlich. Durchschnittlich kam es zu einer NPY bedingten Spike-Amplitudenreduzierung von bis zu 63 mV, das entspricht gegenüber der Ausgangsamplitude einem Wert von 75,76 %.

Nach 20minütiger Applikation von NPY auf die Tectumoberfläche konnten wiederum nur für vier der fünf untersuchten Tiere Spike-Amplitudenwerte oberhalb der Schwelle ermittelt werden. Im Vergleich zu den Daten ohne NPY-Beeinflussung, sowie im Vergleich zu den Daten nach 10minütiger NPY-Applikation konnte, mit Ausnahme der 4. Musterpräsentation, ein weiterer Abfall der Spike-Amplitude gemessen werden. Im Mittel ergaben sich auch hier, bezogen auf die Ableitungen ohne NPY, Spike-Amplitudenverringernngen von bis zu 63 mV. Dies entspricht, gegenüber den gemessenen Ausgangsamplituden ohne NPY-Beeinflussung, einem Wert von 75,76 %.

Zum Ableitungszeitpunkt 10 min nach Beendigung der NPY-Applikation durch Entfernen der Applikationskapillare von der Tectumoberfläche (Ableitung rec NPY 10 min), konnten während der 1. Musterpräsentation für alle Versuchstiere Amplituden oberhalb der gesetzten Schwelle ermittelt werden, während der 2. bis 4. Musterpräsentation allerdings nur für 4 Tiere. Offensichtlich war bei einem Versuchstier die Beeinflussung durch NPY deutlich stärker als bei den anderen Versuchstieren, denn für dieses Tier konnten auch nach einer 20minütigen Erholungsphase nach der NPY-Applikation (Ableitung rec NPY 20 min) lediglich

bei der 1. Musterpräsentation Werte oberhalb der Schwelle gemessen werden. Insgesamt konnte bei den Ableitungen rec NPY 10 min und rec NPY 20 min ein Anstieg der Amplituden gegenüber den Ableitungen NPY 10 min und NPY 20 min verzeichnet werden. Wie schon bei den Ergebnissen der R2 Neuronen, lagen auch hier die Spike-Amplituden der Ableitungen unter denen ohne NPY-Beeinflussung.

In der nachstehenden Abbildung 31 werden die Mittelwerte der Spike-Amplituden aller Versuchstiere ($n = 5$) während der Präsentation des Reizmusterschemas in einer Übersichtsgraphik zusammengestellt.

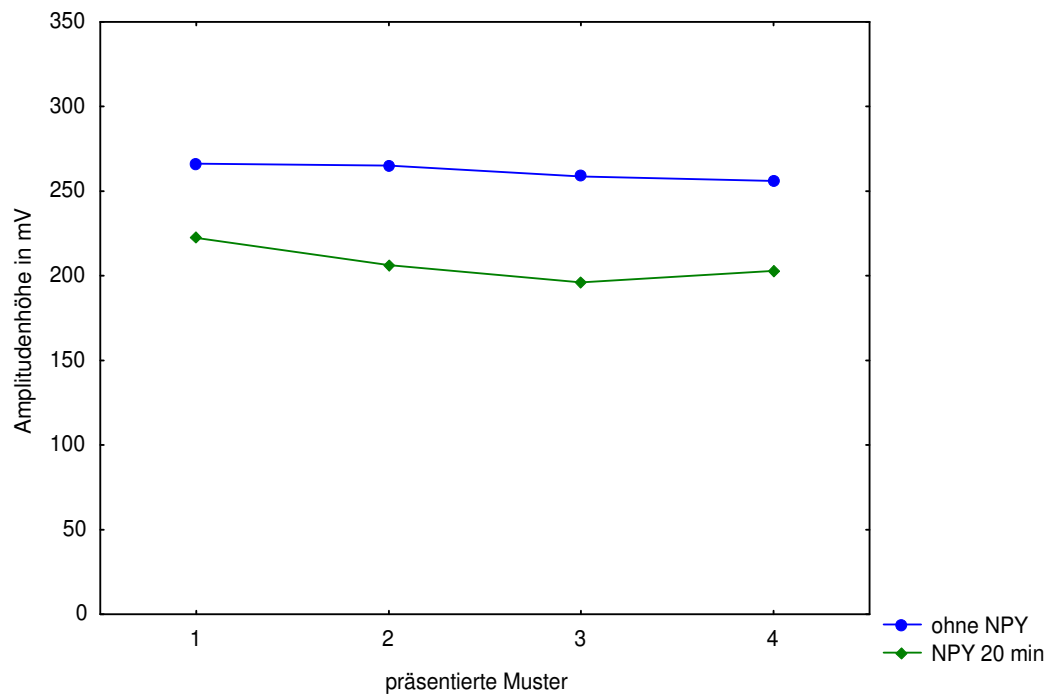


Abbildung 31: Darstellung der errechneten Mittelwerte der gemessenen Spike-Amplituden retinaler R3 Neuronen bei *Bombina orientalis*. Es werden die errechneten Mittelwerte aller Versuchstiere ($n = 5$) zum Zeitpunkt der 1. – 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas während unterschiedlicher Ableitzeitpunkte dargestellt.

In der folgenden Abbildung 32 sind die Mittelwerte der Spike-Amplituden während der Präsentation des Reizmusterschemas unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung während aller durchgeführten Ableitungen dargestellt.

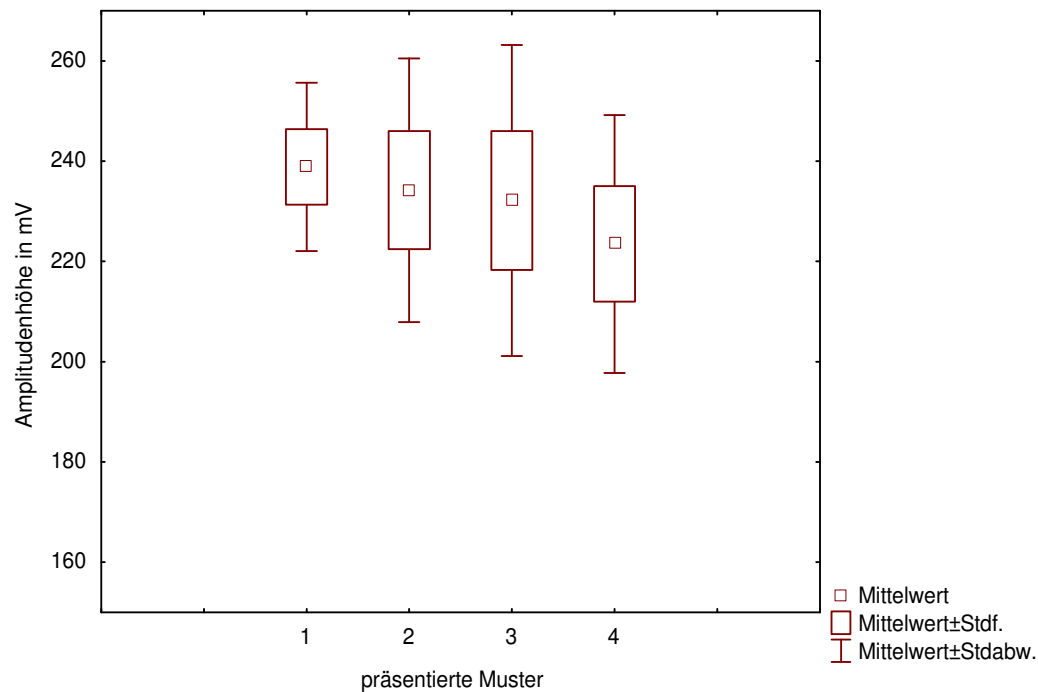


Abbildung 32: Darstellung der errechneten Spike-Amplitudenmittelwerte retinaler R3 Neuronen bei *Bombina orientalis*. Es werden die errechneten Mittelwerte aller Versuchstiere ($n = 5$) unter Berücksichtigung des Standardfehler und der Standardabweichung, zum Zeitpunkt der 1. – 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas während unterschiedlicher Ableitzeitpunkte dargestellt.

Die zur statistischen Bewertung verwendete Rangvarianzanalyse nach Friedman ergab für χ^2 einen geringeren Wert als den kritischen Tabellenwert, somit wurde H_0 akzeptiert. Zwischen den gemessenen Spike-Amplituden während der vier Musterpräsentationen innerhalb des Reizmusterschemas waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Zur weiteren Auswertung wurde ein Vergleich der einzelnen Musterpräsentationen des Reizmusterschemas zwischen den durchgeführten Ableitungen ohne NPY und mit NPY Beeinflussung vorgenommen.

Die Graphiken in den folgenden Abbildungen 33 und 34 zeigen die errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden aller Ableitungen ($n = 5$) während aller durchgeführten Untersuchungen. Die Streuung der Ergebnisse wird in der Darstellung berücksichtigt (Abb. 36). Es ist jedoch klar zu erkennen, dass es zu einer NPY-induzierten Spike-Amplitudenverringerng nach 10 bzw. 20 min kam.

Ausgehend von den ermittelten Werten während der Ableitungen ohne NPY konnten 10 min nach NPY-Applikation im Durchschnitt Spike-Amplitudenverringerngen auf

- 85,93 % in Abschnitt 1
- 78,76 % in Abschnitt 2
- 77,76 % in Abschnitt 3
- 75,41 % in Abschnitt 4

festgestellt werden, im Mittel auf 79,55 %.

Eine weitere Verringerung der Spike-Amplitude konnte auch nach einer 20minütigen NPY-Applikation tendenziell beobachtet werden. Allerdings war sie nicht so stark ausgeprägt wie bei den untersuchten R2 Neuronen. Wie auch bei den untersuchten R2 Neuronen, kam es nach einer Erholungsphase von 10 min wieder zu einer Erhöhung der gemessenen Spike-Amplituden. Diese setzte sich 20 min nach Beendigung der NPY-Gabe geringfügig fort.

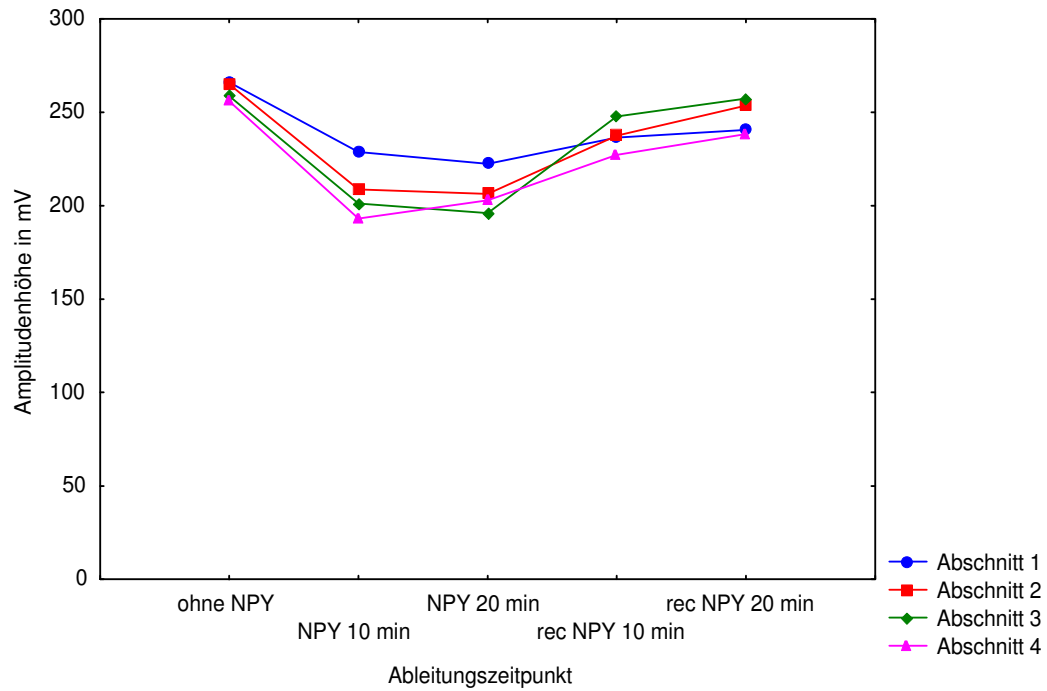


Abbildung 33: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spike-Amplituden für $n = 5$ Versuchstiere bei der Präsentation des Reizmusterschemas während der durchgeführten Ableitungen. Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.

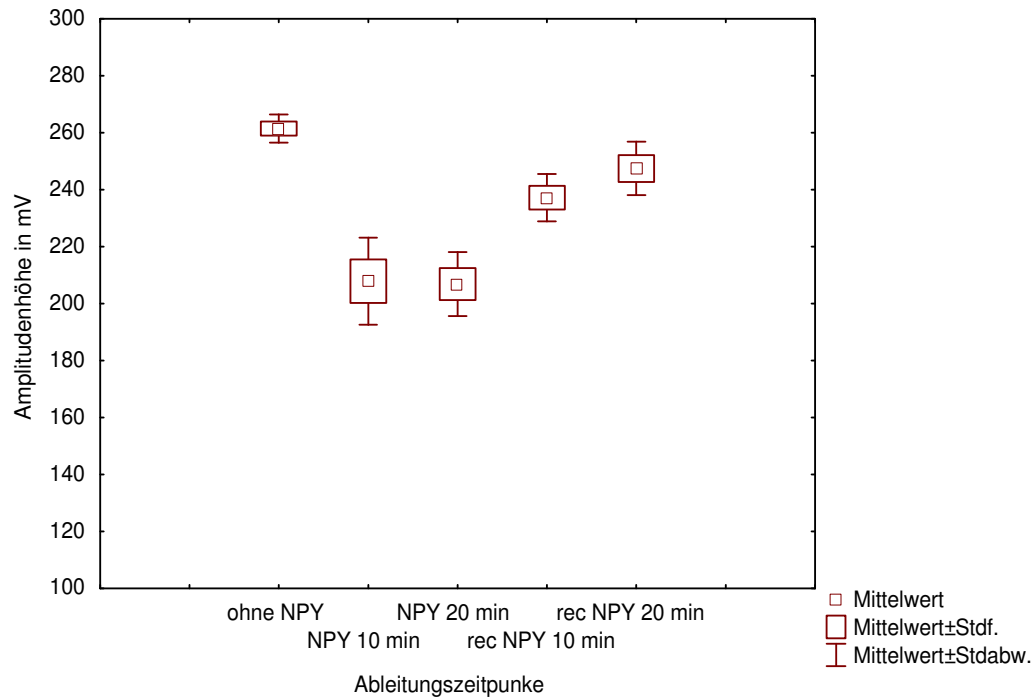


Abbildung 34: Darstellung der errechneten Spike-Amplitudenmittelwerte retinaler R3 Neuronen bei *Bombina orientalis* für $n = 5$ Tiere während der 1. bis 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas, unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung.

Der zur statistischen Bewertung angewandte Wilcoxon-Test für Paardifferenzen für den Vergleich der Musterpräsentationen des Reizmusterschemas zwischen den Ableitungen ohne NPY und NPY 10 min sowie NPY 20 min, ergab für die Daten von $n = 5$ Tieren für die Prüfgröße R einen kleineren Wert als den kritischen Tabellenwert, somit wurde H_0 verworfen und H_1 bei einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ akzeptiert.

Beim statistischen Vergleich der Ableitungen NPY 20 min mit den Ableitungen NPY rec 10 min und den Ableitungen NPY rec 20 min konnten ebenfalls für die Prüfgröße R kleinere Werte als der kritische Tabellenwert erzielt werden, so dass auch hier H_1 bei einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ akzeptiert wurde.

Somit ist gezeigt, dass NPY auch bei R3 Ganglienzellen von *Bombina orientalis* einen hemmenden Einfluss auf die Spike-Amplitude hat. Dieser Effekt ist 10 min nach Applikation von NPY auf die Tectumoberfläche deutlich messbar. Eine weitere tendenzielle Verringerung der Spike-Amplituden 20 min nach NPY-Applikation ist zu beobachten. Ebenfalls konnte die Reversibilität dieses Effektes gezeigt werden.

4.3.2 Einfluss auf die Entladungsrate

Die Untersuchungen der Auswirkung von NPY auf die Spike-Rate retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 bei *Bombina orientalis* wurden an $n = 5$ Tieren durchgeführt. Versuchsdurchführung und Versuchsablauf waren identisch mit denen bei der Untersuchung von R2 Neuronen (siehe dazu Kap. 3.7 und 4.2.2).

In der Abbildung 35 wird beispielhaft die ermittelte Anzahl der Spikes pro Intervall für alle Versuchstiere ($n = 5$) für die 4 Musterpräsentationen des Reizmusterschemas ohne eine Beeinflussung durch NPY dargestellt. Farblich sind in der Graphik die ermittelten Werte für die einzelnen Versuchstiere dargestellt, wohingegen der aus diesen Daten errechnete Mittelwert schwarz dargestellt ist.

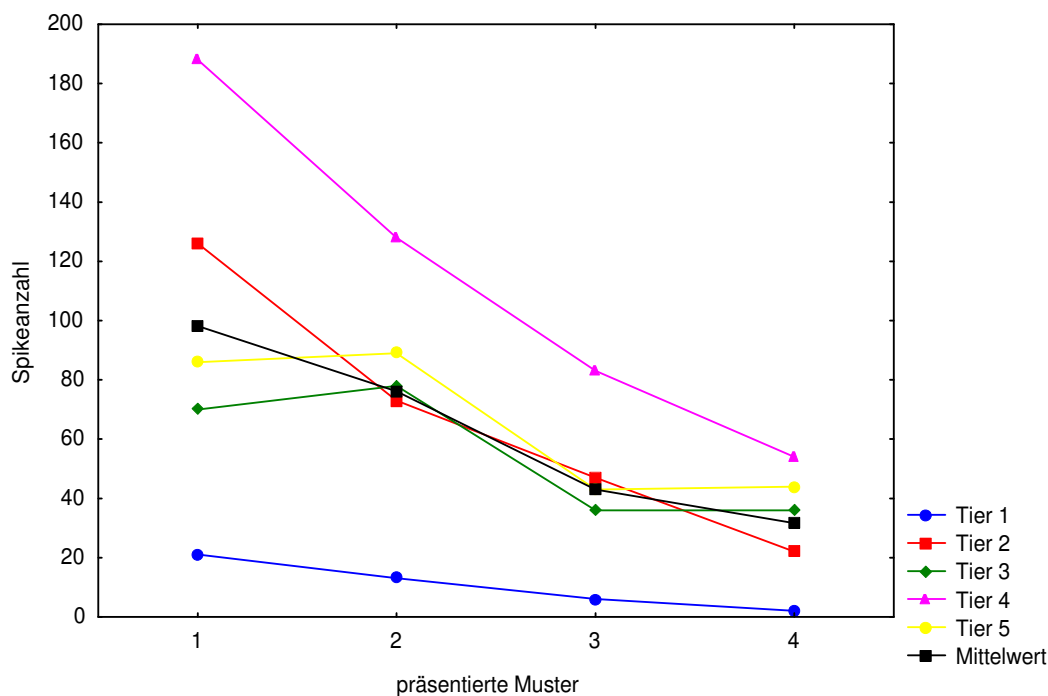


Abbildung 35: Darstellung der Veränderung der Spikeanzahl während den Musterpräsentationen 1 - 4 bei *Bombina orientalis* ($n = 5$). Abgeleitet wurden die Potenziale retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 ohne eine Applikation von NPY.

Ohne Beeinflussung durch NPY konnten für alle Versuchstiere bei allen 4 Musterpräsentationen Spikes ausgezählt werden, die oberhalb der zur Auswertung angelegten Schwelle (einfaches Rauschband) lagen. Wie bei den Ergebnissen der Untersuchungen der Spike-Rate der R2 Neuronen, unterliegen auch diese Werte von Tier zu Tier einer großen Streuung. So konnten zwischen 21 bis 188 Spikes ausgezählt werden, mit denen die abgeleiteten Neuronen auf das präsentierte Muster feuerten. Im Mittel wurde der stetige und typische Abfall der Spike-Rate während der 4 Musterpräsentationen des Reizmusterschemas bestätigt. Nach einer 10minütigen Applikation von NPY auf die Tectumoberfläche konnten nur noch für 4 Versuchstiere Daten ermittelt werden. Bei diesen Versuchstieren verringerte sich die Spike-Rate merklich. Es wurden maximal 147 Spikes während einer Musterpräsentation identifiziert. Auch im Mittel war der Rückgang der Spike-Rate zu erkennen. Erstaunlicherweise konnten 20 min nach Beginn der NPY-Applikation wieder für alle Versuchstiere Spikes oberhalb der gesetzten Schwelle identifiziert werden. Anhand der Originalableitungen konnte eine Beeinflussung der Daten durch Störpotenziale ausgeschlossen werden, so dass diese Ergebnisse zur Auswertung herangezogen werden

konnten. Im Mittel, sowie auch für die einzelnen Versuchstiere, konnte jedoch ein weiterer Abfall der Spike-Rate im Vergleich zu den unbeeinflussten Versuchstieren festgestellt werden. Auch gegenüber den Ergebnissen nach einer 10minütigen Beeinflussung durch NPY war ein weiterer, wenn auch nur geringer, Abfall der Spike-Rate zu verzeichnen.

Nach einer 10minütigen Erholungsphase nach Beendigung der NPY-Applikation durch Entfernen der Applikationskapillare von der Tectumoberfläche (Ableitung rec NPY 10 min), konnten für alle Versuchstiere während der ersten Musterpräsentation Spikes ermittelt werden. Während der 2. bis 4. Musterpräsentation war dies jedoch nur für 4 Versuchstiere möglich. Da die Spikeanzahl bei Tier 1 erheblich von der Spikeanzahl der restlichen Versuchstiere abwich, muss davon ausgegangen werden, dass die Beeinflussung durch NPY bei diesem Versuchstier deutlich höher war, als bei den übrigen Tieren. Dies muss auch bei Beurteilung der errechneten Mittelwerte berücksichtigt werden, die im Vergleich zu den Ableitungszeitpunkten NPY 10 min und NPY 20 min geringer waren.

Zwanzig Minuten nach Beendigung der NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche konnten (Ableitung rec NPY 20 min), wie zum Ableitungszeitpunkt rec NPY 10 min, für alle Tiere während der ersten Musterpräsentation Spikes oberhalb der Schwelle detektiert werden. Bei Tier 1 war auch hier die Beeinflussung durch NPY erheblich länger nachweisbar als bei den übrigen Versuchstieren. Dennoch kam es im Mittel gegenüber den Ableitzeitpunkten NPY 10 min, NPY 20 min und rec NPY 10 min zu einem Anstieg der Spike-Rate. Die Werte waren bei der ersten Musterpräsentation sogar höher als bei den Ableitungen ohne NPY.

Die nachstehende Abbildung 36 zeigt die Mittelwerte der Spike-Raten aller Versuchstiere ($n = 5$) während der 1. bis 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas. In der Graphik werden die errechneten Werte während der unterschiedlichen Ableitzeitpunkte dargestellt. Es wird deutlich, dass es im Verlauf aller Musterpräsentationen mit zunehmender NPY-Applikationsdauer zu einer typischen Verringerung der Spike-Rate der neuronalen Antworten kam.

20 Minuten nach Beendigung der NPY-Applikation konnte wieder ein Anstieg der Spike-Rate registriert werden, wobei auf die Tatsache der Erhöhung der Spike-Rate in Abschnitt 1 zum Ableitungszeitpunkt rec NPY 20 min schon weiter oben Bezug genommen wurde.

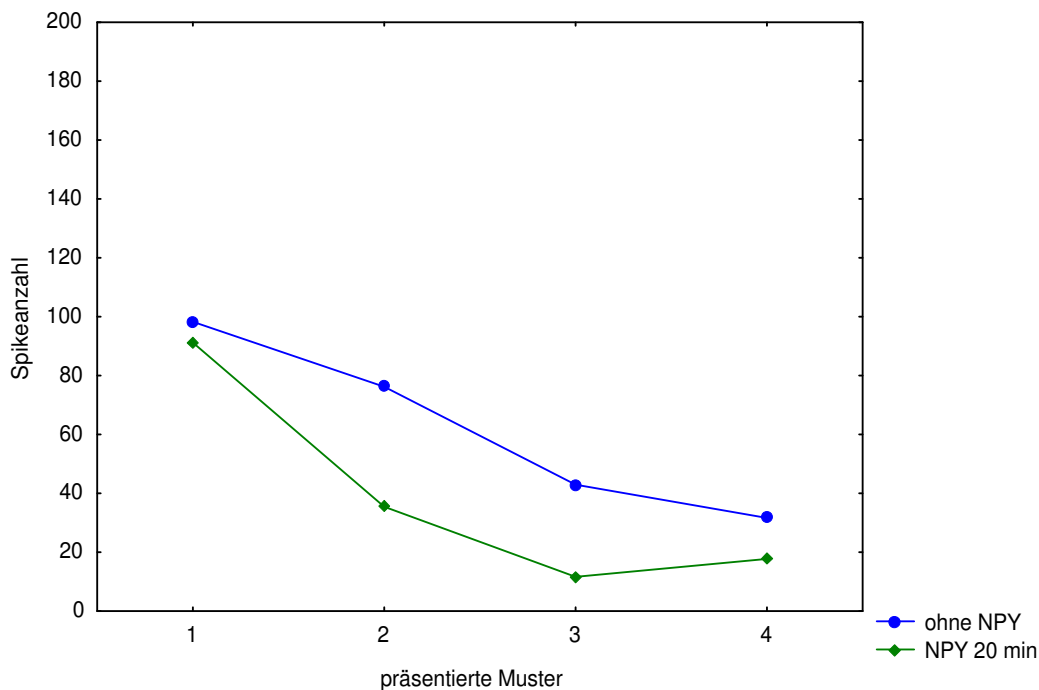


Abbildung 36: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spike-Raten aller Versuchstiere ($n = 5$) während der Präsentation des Reizmusterschemas (präsentierte Muster 1 - 4), ohne NPY-Beeinflussung (ohne NPY), nach NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche (NPY 20 min). Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale von R3 Neuronen im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.

Die Abbildung 37 zeigt die errechneten Mittelwerte der Spike-Raten aller Versuchstiere bei der Präsentation des Reizmusterschemas während aller durchgeführten Ableitungen unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung.

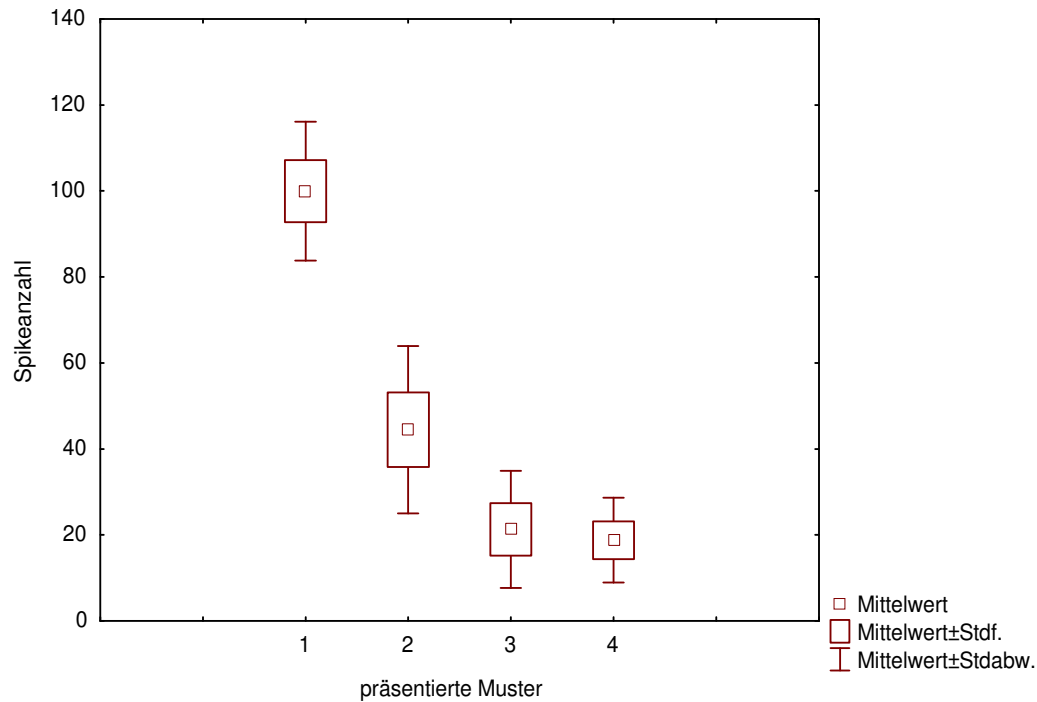


Abbildung 37: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spike-Raten aller Versuchstiere ($n = 5$) unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung bei der Präsentation des Reizmusterschemas (präsentierte Muster 1 - 4) während aller durchgeführten Untersuchungen. Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale von R3 Neuronen im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.

Wie aus der Abbildung 37 hervorgeht, folgen auch die neuronalen Antworten der R3 Neuronen einem klaren Schema. Die Antwortbereitschaft auf die 1. Musterpräsentation des Reizmusterschemas war am höchsten und nahm im Laufe der 2. bis 4. Musterpräsentation stetig ab. Auch für *Bombina orientalis* konnte also der für retinale Ganglienzellen der Erdkröte *Bufo bufo* typische Verlauf der neuronalen Antworten von R3 Neuronen bestätigt werden.

Wie bei der Auswertung zum Einfluss von NPY auf die Spike-Amplituden, wurden auch die ermittelten Spikeanzahlen pro Intervall der einzelnen Muster des Reizmusterschemas während der unterschiedlichen Ableitungen miteinander verglichen.

Abbildung 38 zeigt die Mittelwerte der registrierten Spikes aller Versuchstiere ($n = 5$) zu den verschiedenen Ableitzeitpunkten. Dargestellt wird die gemittelte Spikeanzahl pro Intervall während der Musterpräsentationen 1 bis 4 des Reizmusterschemas. Auffällig hierbei ist, dass bei der 1. Musterpräsentation die Beeinflussung der Spike-Rate durch NPY weniger stark ausgeprägt war als bei den Musterpräsentationen 2 bis 4.

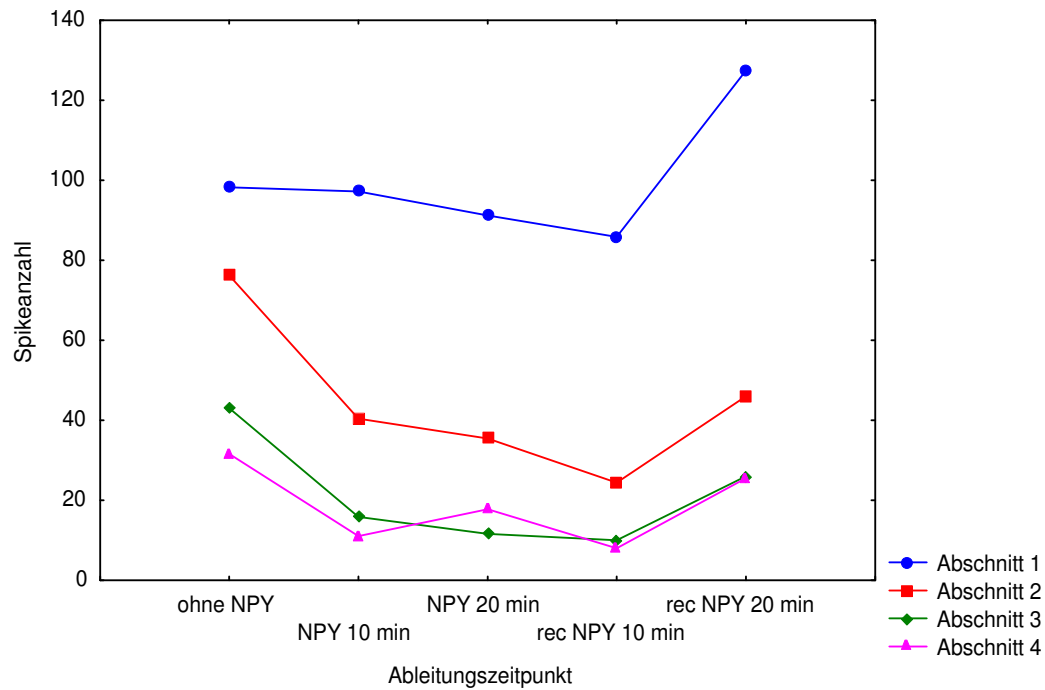


Abbildung 38: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spikezahlen aller Versuchstiere ($n = 5$) während der 1. – 4. Musterpräsentation (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas bei den durchgeführten Ableitungen. Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.

In Abbildung 39 sind diese errechneten Mittelwerte unter Berücksichtigung ihres Standardfehlers und der Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt.

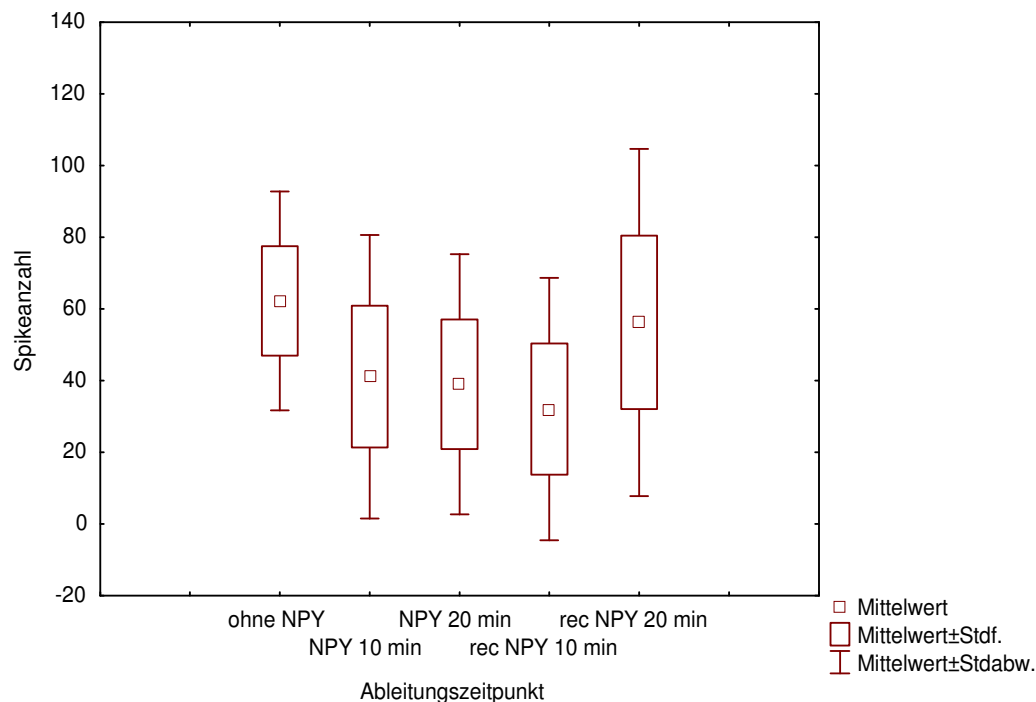


Abbildung 39: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spike-Raten aller Versuchstiere ($n = 5$) während der Musterpräsentationen 1 - 4 des Reizmusterschemas bei der Ableitung von Aktionspotenzialen retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 bei *Bombina orientalis*, unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung.

Mit Hilfe des zur statistischen Bewertung angewendeten Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen konnten beim Vergleich der Ableitungen ohne NPY und rec NPY 10 min, sowie bei dem Vergleich der Ableitungen NPY 20 min und rec NPY 20 min für die Prüfgröße R kleinere Werte als der Tabellenwert errechnet werden, so dass in diesen Fällen H_1 bei einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ akzeptiert wurde.

Es konnte also auch bei retinalen Ganglienzellen der Klasse R3 bei *Bombina orientalis* eine NPY beeinflusste Spike-Ratenverringderung nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Kontrollversuche: Reizmuster-Serien

Ziel dieser Arbeit war es, bei der Unke *Bombina orientalis* den Einfluss von NPY auf die Amplituden und die Entladungsrate retinaler Ganglienzellen der Klassen R2 und R3 auf visuelle Stimulation zu untersuchen. Da in diesem Zusammenhang noch keine Einzelzellableitungen bei *Bombina orientalis* vorgenommen wurden, war es unabdingbar die Spike-Amplituden und die Spike-Raten von R2 Neuronen in Reizmuster-Serien zu untersuchen.

Retinale Ganglienzellen der Klasse R2 und R3 terminieren in unterschiedlichen Tiefen des Tectum opticum (LETTVIN et al 1959, EWERT & HOCK 1972, GRÜSSNER & GRÜSSNER-CORNEHLS 1976, SCHÜRG-PFEIFFER 1979) und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Antwortcharakteristika auf visuelle Reizparameter (EWERT 1984, 1987, 1991). Auf dieser Grundlage wurde ein Versuchsablauf entwickelt (siehe Kap. 3.7.1), der es ermöglichte, bei *Bombina orientalis* den optimalen Zeitrahmen zwischen zwei Reizmusterpräsentationen zu bestimmen und somit den Ableitzeitpunkt zu definieren. Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass ein Zeitraum von $t = 10$ min zwischen den Musterpräsentationen optimal ist. Nach diesem Zeitraum hatten die Spike-Amplituden und die Spike-Raten der abgeleiteten Neuronen ihre Ausgangswerte nahezu wieder erreicht; signifikante Unterschiede waren nicht mehr nachweisbar (siehe Kap. 4.1.1 und 4.1.2). Aufgrund dieser Ergebnisse war eine Basis geschaffen, den Einfluss von NPY auf die Amplituden und die Entladungsraten der R2 und R3 Neuronen zu prüfen: Falls in den Untersuchungen unter tectaler NPY-Einwirkung eine Reduzierung der Amplitude und der Spike-Raten nachgewiesen werden konnte, so war dieser Effekt auf die Wirkung von NPY zurückzuführen.

Eine weitere Intention der Durchführung der Kontrollversuche war die Überprüfung der praktizierten Methode. Auch in dieser Hinsicht lieferten die Kontrollversuche positive Ergebnisse. So konnte gezeigt werden, dass die Spike-Amplituden während der Musterpräsentationen weitgehend stabil verliefen.

Natürlich unterliegen diese Ergebnisse Schwankungen, die allerdings bei der gewählten Ableitmethode nie ganz ausgeschlossen werden können.

Die Kontrollversuche dienten ebenfalls zur Überprüfung des Verlaufes der erfassten Entladungsraten für die abgeleiteten Neuronen. Auch hier erwies sich die gewählte Methode als angemessen.

Die Entladungsrate der Neuronen folgte dem für Klasse R2 Neuronen typischen Muster (SCHÜRIG-PFEIFFER 1979). Es wurde der Ableitzeitpunkt $t = 10$ min zwischen den Musterpräsentationen in der Art bestätigt, dass die Spike-Raten nach dieser Zeit annähernd ihre Ausgangswerte erreicht hatten.

5.2 Vorbemerkungen zu Neuropeptid Y

NPY ist als Neurotransmitter/modulator an der Regulation fundamentaler physiologischer Prozesse bei den Mammalia beteiligt (KARLA et al. 1992, HALL et al. 1999, INUI 1999, INGENHOVEN & BECK-SICKINGER 1999). Es ist davon auszugehen, dass NPY auch bei Amphibien eine zentrale Rolle bei der Regulation neuromodulatorischer Funktionen zukommt. Mit Hilfe immunocytochemischer Untersuchungen konnten KOZICZ und LÁZÁR (1993) dichte NPY-immunreaktive (IR) Strukturen im Gehirn von *Rana esculenta* nachweisen. In Schicht 9 des TO befinden sich dichte Plexi von NPY-IR Fasern, die mit retina-rezipienten Laminae überlappen. Nahe dem Tectum opticum wurden immunpositive Zellen in praetectalen Arealen wie auch im Torus semicircularis lokalisiert. Axone der NPY-IR praetectalen Zellen ziehen bis in tiefe Schichten des Tectum (LÁZÁR et al. 1993). Die Präsenz von NPY-IR Fasern in tiefen tectalen Schichten, wie die im Torus semicircularis gefundenen NPY-IR Zellen, lassen vermuten, dass torale Zellen ebenso in das Tectum projizieren. Mit Hilfe von Läsionsversuchen konnte gezeigt werden, dass die NPY-IR-Fasern eine laminare Anordnung haben, in der Art, dass in Schicht 9 die Lamina A frei von NPY-IR-Fasern ist und im übrigen Teil die Fasern dicht gepackt sind. Diese Ergebnisse finden ihre Bestätigung in Untersuchungen an Hühnern (SZEKELY et al. 1992) und an Goldfischen (PONTET et al. 1989). BAGNOLI et al. (1992) zeigten mit Untersuchungen an Tauben, dass praetectale Zellen nach einer frühen retinalen Abtrennung keine NPY-Immunpositivität mehr aufwiesen und

postulierten, dass der Umfang praetectaler NPY-Immunoreaktivität von dem retinalen Input zu Beginn der neuronalen Entwicklung abhängt. KOSZIS und LÁZÁR (1993) definieren das Praetectum beim Frosch und Goldfisch als Hauptquelle tectaler NPY-IR. NPY-IR-Zellen sind demnach in einer wichtigen strategischen Position im Tectum opticum.

Im Hippocampus der Ratte wurde gezeigt, dass NPY den excitatorischen Input der Pyramidenzellen in der CA1 Region reduziert (COLMERS et al. 1987, DANGER et al. 1985). Beim Frosch wird NPY ein Effekt auf den visuellen Informationsfluss zugesprochen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Lokalisation der von KOZICZ und LÁZÁR cytochemisch bestimmten praetecto-tectalen Projektionszellen übereinstimmt mit den von BUXBAUM-CONRADI & EWERT (1995) physiologisch bestimmten praetectalen thalamischen visuellen TH3 und TH4 Neuronen, die nachweislich zum ipsilateralen Tectum opticum projizieren.

5.3 Der Einfluss von NPY auf die Amplituden der Entladungen retinaler Ganglienzellen

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von NPY auf die Amplitude der visuell evozierten Entladungen retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 und R3 bei *Bombina orientalis* untersucht werden. Hierzu wurden den durch Succinylcholin demobilisierten Tieren Reizmuster in Form eines schwarzen Quadrates präsentiert. Die Untersuchungen der R2 Neuronen wurden an 8 Versuchstieren, die Untersuchungen der R3 Neuronen an 5 Versuchstieren durchgeführt.

Retinale Ganglienzellen der Klasse R2 und R3 liefern den hauptsächlichen Input in das praetectale-tectale Netzwerk, das für die konfigurale Musterdifferenzierung verantwortlich ist. Sie haben unterschiedlich große Empfindlichkeiten gegenüber bewegten Mustern (EWERT 1984, 1987, 1991, EWERT et al. 1983, SCHÜRG-PFEIFFER & EWERT 1981).

Es wird davon ausgegangen, dass R2 Neuronen hauptsächlich Informationen über die Länge relativ kleiner Objekte zum tectalen Netzwerk beisteuern, während R3 Neuronen Informationen über den Kantenkontrast von kleinen oder großen Objekten liefern (EWERT 1991). Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem Beutefangverhalten, wird klar, dass sowohl R2 als auch R3 Neuronen den excitatorischen Input im Beutefang/Vermeidungs-System signifikant versorgen müssen (EWERT 1991).

Mit Hilfe der Präsentation verschieden großer Reizmusterattrappen, konnte bei *Bombina orientalis* die beste Ansprechbarkeit der R2 und R3 Neuronen bei einer Größe des Reizmusters von 10 X 10 mm (4° Sehwinkel) nachgewiesen werden. Dies bestätigt die von WACHOWITZ & EWERT (1996) gezeigte species-typische Mustererkennung.

Die Tatsache, dass auch bei *Bombina orientalis* im Bereich E des Tectum gute Ableitungen erzielt werden konnten, bestätigt die grundsätzlich einheitliche Struktur des Tectum opticum bei Amphibien: im Bereich E zeigten schon *Bufo marinus* und *Bufo bufo spinosus* die größten Amplituden bei tectal abgeleiteten

Feldpotenzialen (SCHWIPPERT et al. 1993, 1995, 1995b, GERNERT 1995, RÖTTGEN 1999). Interessant ist hierbei, dass dies bei *Bombina orientalis*, einem stammesgeschichtlich alten Vertreter der Anuren, bestätigt werden konnte und weist somit auf die evolutionär erhaltene und damit bewährte Strukturierung des Tectum opticum hin.

Prinzipiell sind die Ergebnisse über den Einfluss von NPY auf visuelle Feldpotenziale (SCHWIPPERT & EWERT 1995, SCHWIPPERT et al. 1998) mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit über den Einfluss von NPY auf visuell evozierte Aktionspotenziale retinaler Ganglienzellen konsistent. SCHWIPPERT & EWERT (1995) zeigten in Untersuchungen bei *Bufo marinus*, dass es bei tectal abgeleiteten Feldpotenzialen durch den Einfluss von NPY zu einer Verringerung der N-Welle auf bis zu 24 % kam. Dieser Effekt setzte schon 5 bis 10 min nach Applikation von NPY auf die Tectumoberfläche ein. Eine derart starke und schnelle Verringerung der Spike-Amplitude konnte bei *Bombina orientalis* weder bei R2 noch bei R3 Neuronen nachgewiesen werden. Hier konnten bei R2 Neuronen 10 min nach NPY-Applikation maximale Verringerungen der Amplitude von 16 % verzeichnet werden. Erst 20 Minuten nach Applikation von NPY konnte eine signifikante Abnahme der Spike-Amplitude um 26 % verzeichnet werden (siehe dazu Kap. 4.2.1).

Auch die untersuchten R3 Neuronen zeigten unter NPY keine so erhebliche Reduktion der Spike-Amplitude, wie die von SCHWIPPERT und EWERT (1995) tectal abgeleiteten Feldpotenziale. Bei *Bombina orientalis* konnte bei R3 Neuronen schon 10 min nach NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche eine stärkere und signifikante Reduktion der Spike-Amplituden im Vergleich zu R2 Neuronen ermittelt werden, jedoch lag diese im Mittel bei maximal 24,5 % (siehe dazu Kap. 4.3.1). Ein deutlicher Unterschied in der Beeinflussung der Spike-Amplituden 10 und 20 min nach der NPY-Applikation war bei den untersuchten R3 Neuronen jedoch nicht zu verzeichnen. Diese differenzierte Beeinflussung der Neuronen durch NPY kann nicht mit ihrer unterschiedlichen Lokalisation im Tectum und einem daraus resultierenden, versuchsbedingten, möglichen verzögerten Wirkungseintritt von NPY erklärt werden. Es lässt vielmehr den Schluss zu, dass R2 und R3 Neuronen unterschiedlich stark durch NPY

beeinflusst werden. Dies abschließend zu klären bedarf weitergehender Untersuchungen und eines modifizierten Versuchsablaufes in der Art, dass die Versuchsdauer verlängert wird (Ableitungen nach 10, 20, 30 und 40 Minuten).

Anhand der hier diskutierten Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass die Spike-Amplitude retinaler Ganglienzellen durch NPY unterschiedlich stark beeinflusst wird und daraus folgernd ihr Einfluss auf tectale Feldpotenziale unterschiedlich groß ist. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Ableitungen während der recovery-Phasen wider. Hier erreichten die Spike-Amplituden von R2 Neuronen nach 10 min und die der R3 Neuronen 20 min nach Entfernen der NPY-Applikationskapillare von der Tectumoberfläche annähernd ihre Ausgangswerte. Allerdings erreichten R2 und R3 Neuronen bereits 10 min nach Beendigung der NPY-Applikation signifikant höhere Spike-Amplituden als bei den Ableitungen 20 min nach NPY-Applikation (siehe hierzu Kap. 4.2.1 und 4.3.1). Der von SCHWIPPERT et al. 1995 beschriebene Anstieg der Amplituden der tectal abgeleiteten Feldpotenziale auf 65 % könnte auf den Einfluss anderer Neuronen zurückgeführt werden. Dies zeigt einmal mehr, dass im neuronalen Wirkungsgefüge keine isolierten Betrachtungsweisen zulässig sind, sondern vielmehr zweckgebundenes Interagieren der unterschiedlichen Funktionsstrukturen relevant ist (EWERT 1999, 2000, EWERT & SCHWIPPERT 2005).

Die in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen liefern den Beweis des inhibitorischen Einflusses von NPY auf die Spike-Amplitudenmodulation retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 und R3. Sie zeigen weiterhin, dass tectal abgeleitete Feldpotenziale erheblich mehr durch andere Faktoren beeinflusst werden müssen, als durch Klasse R2 und R3 Neuronen. Die von FUNKE (2005) erzielten Ergebnisse finden mit den hier vorgestellten Ergebnissen Bestätigung. FUNKE (2005) konnte mit Hilfe der ^{14}C -2-Desoxyglukose-Technik bei visuell stimulierten Unken unter NPY-Einfluss einen geringeren Glukoseverbrauch in Tectumbereichen von 30 bis 90 μm nachweisen. Dies entspricht, bei einer Gesamtdicke des Tectum von 500 μm bei *Bombina orientalis*, histologisch den oberen Schichten von Layer 9.

Wenn berücksichtigt wird, dass die retinalen Ganglienzelltypen R2 und R3 hauptsächlich in den Laminae G, F, D und B der Schicht 9 (LETTVIN et al. 1959, SCALIA 1976) endigen, sind die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse mit denen von FUNKE (2005) praktisch deckungsgleich. Fraglich ist jedoch, inwieweit die Ergebnisse der von FUNKE (2005) durchgeführten ¹⁴C-2-Desoxyglukose-Technik einen Bezug zur Spike-Amplitude oder zur Spike-Rate retinaler Ganglienzellen von NPY haben. Ob diese Frage korrekt gestellt ist, darüber können Auswertungen der Spike-Raten Aufschluss geben.

5.4 Der Einfluss von NPY auf die Entladungsrate retinaler Ganglienzellen

Der Einfluss von NPY auf die Entladungsrate visuell evozierter Antworten retinaler Ganglienzellen bei *Bombina orientalis* wurde für n = 11 Klasse R2 Neuronen und n = 5 Klasse R3 Neuronen untersucht.

Bei R2 Neuronen konnte eine signifikante Beeinflussung der visuell evozierten Spike-Raten, vermittelt durch NPY, nachgewiesen werden. Diese war bereits 10 min nach der NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche signifikant nachweisbar und sie war nach 20 min geringfügig verstärkt (siehe dazu Kap. 4.2.2 und 4.3.2).

Die untersuchten R3 Neuronen zeigten 10 min und 20 min nach der NPY-Applikation im Durchschnitt signifikante Unterschiede der Entladungsrate in Bezug zu den ohne NPY-Beeinflussung erzielten Werten. Bemerkenswert ist, dass es 20 min nach Beendigung der NPY-Applikation, durch Entfernen der Applikationskapillare von der Tectumoberfläche, zu einem signifikanten Anstieg der Spike-Raten kam.

Wie schon in Kapitel 4.2 und 4.3 angesprochen, unterliegen die erzielten Ergebnisse einer nicht unerheblichen Streuung. Ziel der Untersuchungen war es, mit Hilfe von Einzelzelleitungen Aufschlüsse über den Einfluss von NPY auf die Spikes der Zelltypen R2 und R3 zu erhalten, um rückschließend Erkenntnisse ihrer selektiven Wichtung im neuronalen Wirkgefüge von Amphibien zu erhalten. Hierzu war eine Untersuchung in vivo notwendig. Bei Ableitungen verschiedener Versuchstiere sind jedoch kaum standardisierbare Ergebnisse zu erwarten. Sowohl der Wirkungseintritt als auch der pharmakologische Effekt von NPY unterlag Schwankungen von Tier zu Tier. Dies ist wahrscheinlich auf den physiologischen Zustand des jeweiligen Versuchstieres, sowie auf die zwischen den einzelnen Versuchen eventuell vorhandenen, geringfügigen Schwankungen im Abstand der Ableitelektroden zur Applikationskapillare zurückzuführen. Hervorzuheben ist jedoch der Befund, dass die Trends innerhalb

eines Versuchsablaufes im Prinzip gleich waren (vergl. hierzu z.B. Abb. 11, 16, 17, 21, 23, 25, 26, 28, 30, 33, 38)

Die nachgewiesene signifikante Verringerung der Entladungsrate der R2 und R3 Neuronen durch NPY zeigt auch den in Kapitel 5.3 angesprochenen Zusammenhang mit den Ergebnissen von FUNKE (2005) auf. Der Nachweis der geringeren Strahlungsintensität bei der ^{14}C -2-Desoxyglukose-Technik 10 Minuten nach NPY-Gabe weist, durch die geringere Glukosemetabolisierung, eindeutig auf eine verringerte neuronale Aktivität hin, die in der dort beschriebenen Form nur auf den Einfluss von R2 und R3 Neuronen zurückzuführen ist. Auch die Verminderung der von FUNKE (2005) beschriebenen Beutefangaktivität scheint in der hier nachgewiesenen Reduktion der Entladungsraten der R2 und R3 Neuronen ihre neuronale Bestätigung zu finden.

5.5 Kritik an der Methode bezüglich Schlussfolgerungen

Nachdem der Einfluss von NPY auf visuell evozierte Spikeantworten von R2 und R3 Neuronen bezüglich Spike-Amplitude und Spike-Rate vorhergehend hinreichend erörtert worden ist, muss die Frage nach Phänomenen und Epiphänomenen gestellt werden. Folgende methodische Problematik besteht: zwar wurden in dieser Arbeit Spikeantworten abgeleitet; diese stammen jedoch nicht von einem einzelnen Neuron, sondern von jeweils mehreren Neuronen derselben Klasse (zugeordnet zu dieser Klasse gemäß der gewählten Antwortkriterien). Registriert wurde also „Multi-Unit“ Spike-Aktivität, innerhalb der die Spike-Amplituden verschieden groß sind, was z.B. darauf zurückzuführen ist, dass die Axonterminalen von der Ableitelektrode unterschiedlich weit entfernt sind. Bei den Amplitudenmessungen unter NPY wurden die Spikes der "Multi-Unit" Aktivität erfasst, und zwar jene, die oberhalb des Standard-Cursors lagen. Folgerichtig informiert das Ergebnis dieser Messungen über den Einfluss von NPY auf den durchschnittlichen Amplitudenverlauf der Spikes in der "Multi-Unit" Ableitung, vorausgesetzt, dass die Ableitungen während der Versuchszeit stabil sind. Es besteht kein Anlass zu möglicher Kritik, dass sich eine Einzelableitung grundsätzlich anders verhalten würde.

Die Spikeamplitude könnte theoretisch von verschiedenen Faktoren abhängen: (a) neuronale Adaptation, (b) shift der Ableitelektrode, (c₁) Spike-Rate, (d) Wirkung von NPY. Da (a) bis (c) durch Kontrollvorversuche bzw. Vorüberlegungen ausgeschlossen werden konnten, handelt es sich bei der in dieser Arbeit gemessenen Amplitudenabhängigkeit retinaler Spikes um ein durch NPY bestimmtes Phänomen.

Wie steht es mit der Änderung der visuell evozierten Spike-Rate unter NPY? Bei „Multi-Unit“ Ableitungen wird nicht die Entladungsfrequenz bzw. Entladungsrate eines einzelnen Neurons erfasst, sondern die Anzahl der von verschiedenen Neuronen stammenden Spikes pro Zeitintervall. Diese „Spike-Rate“ kann theoretisch von verschiedenen Faktoren abhängen: (a) neuronale Adaptation, (b) shift der Ableitelektrode, (c₂) Spike-Amplitude, (d) Wirkung von NPY. Ausgeschlossen werden konnten auch hier (a) und (b) durch Kontrollvorversuche bzw. Vorüberlegungen, nicht jedoch (c₂) und (d). Da jedoch (c₁) abhängig ist von (c₂) und (c₂) abhängig ist von NPY, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich beim Einfluss von NPY auf die Spike-Rate um ein Epiphänomen handelt. Diese Vermutung wird durch den Befund gestützt, dass die NPY-abhängige Reduktion der mittleren Spike-Rate stärker erscheint als die NPY-abhängige Reduktion der mittleren Spike-Amplitude. Denn bei der Berechnung der Spikes pro Intervall fallen auch diejenigen Spikes ins Gewicht, die infolge Absinken der Amplitude unterhalb des Cursors liegen; jene können nämlich bei der Berechnung der Spike-Amplitude nicht erfasst werden.

5.6 Abschließende Diskussion der Ergebnisse

Das Tectum bildet ein Zentrum visueller Informationsverarbeitung und wird über das Praetectum durch inhibitorischen Einfluss kontrolliert (EWERT 1974, 1987, SZÉKELY & LÁZÁR 1976).

Man geht davon aus, dass NPY über die praetecto-tectalen Projektionsneuronen im Tectum opticum praesynaptisch an retino-tectalen Axonendigungen über Y_2 -Rezeptoren wirkt und so die Glutamat vermittelte retino-tectale Übertragung hemmt.

Hierbei wäre folgende mögliche Wirkung von NPY im retino-praetector/tectalen Netzwerk denkbar. Substrat wäre eine axo-axonische Synapse: Axonendknoten von praetectoralen (TH3, TH4) Neuronen bilden im Tectum opticum eine Synapse mit Axonendknoten von retinalen (R2, R3) Neuronen nach dem Prinzip der praesynaptischen Inhibition. Praetectorales NPY dockt an Y_2 -Rezeptoren des retinalen Axonendknoten an und bewirkt dort über eine G-Protein und second-messenger vermittelte Signalkaskade die Schließung von Ca^{2+} Kanälen; der resultierende verminderte Ca^{2+} Einstrom führt zu reduzierter Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat, der normalerweise die retino-tectale Erregungsübertragung vermittelt. In diesem Falle würde sich der Einfluss von NPY auf Spikes der retinalen Axonendigungen im Tectum opticum nicht auswirken.

Da jedoch NPY die Spike-Amplitude der retinalen Axonendigungen senkt – wie die vorliegende Arbeit eindeutig zeigt –, ist es denkbar, dass (alternativ oder zusätzlich) eine second-messenger vermittelte Signalkaskade zur Öffnung von spannungsgesteuerten K^+ Kanälen führt, wodurch die Amplitude der praesynaptisch eintreffenden Spikes vermindert und dadurch die Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} Kanäle beeinträchtigt werden würde; der damit einhergehende verminderte Ca^{2+} Einstrom führt zu reduzierter Ausschüttung von Glutamat.

Die sehr starke Reduktion der visuell evozierten tectalen Feldpotenziale bei tectaler Applikation von NPY (SCHWIPPERT & EWERT 1995) sowie die sehr starke Reduktion der visuell evozierten ^{14}C -2DG-Aufnahme in retina-rezipienten

Tectumschichten unter NPY (FUNKE & EWERT 2005) stützen die Vermutung, dass beide durch NPY auslösbaren Prozesse dafür verantwortlich sind.

Mit Hilfe der Untersuchungen von GÁBRIEL & STRAZNICKY (1995) konnten die Neurotransmitter der retinalen Afferenzen identifiziert werden. Bei 88 % der retinalen Ganglienzellen wird als excitatorischer Neurotransmitter Glutamat verwendet, bei 6 % γ -Aminobuttersäure (GABA). Die Annahme, dass die Aktivierung der Y_2 -Rezeptoren durch NPY die Glutamatafreisetzung verhindert, wird auch von COLMERS et al. (1987), GREBER, et al. (1994), SUN et al. (1997) diskutiert. Berücksichtigt man die Ergebnisse von XIAO et al. (1999), die letztlich von 5 Kombinationen retinaler und isthmischer Afferenzen zu tectalen Zellen in der Kröte ausgehen, wird die zentrale Rolle von NPY im neuromodulatorischen Netzwerk der Anuren noch deutlicher. Diese Afferenzen sind in erster Linie glutaminerg oder GABAerg.

Kommt es zu einem Verlust der Kontrolle des Praetectum über das Tectum, führt dies zu einer tectalen Übererregung und zu einer erhöhten, wenn auch unkontrollierten Beutefangaktivität. Dieser Anstieg der Entladungsrate tectaler Zellen gegenüber bewegten Mustern konnte in Läsionsversuchen im Bereich der praetectalen Lpd/P-Region mittels Durchtrennung der ipsilateralen praetecto-tectalen Projektionen gezeigt werden. (EWERT 1974, 1984, EWERT et al. 1996, INGLE 1983). Auch die Untersuchungen von XIAHONG et al. (2005) unterstreichen den enormen Einfluss des Praetectum auf das Tectum. Hier konnten bei 98 % der abgeleiteten tectalen Neuronen bei *Rana catesbeiana* nach praetectaler Lpd/P Stimulation deutlich verringerte Antworten verzeichnet werden.

Folgt man dem von EWERT (1991) entwickelten Modell der Verschaltungen in retino-praetectalen und retino-tectalen Netzwerken und im praetecto-tectalen Netzwerk (Abb. 1), muss aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass eine Aktivierung der praetecto-tectalen Projektionsneuronen u.a. die Freisetzung von NPY bewirkt.

Retinale Ganglienzelltypen R2 und R3 stehen in unmittelbarer Verbindung zu tectalen Neuronenpopulationen, z.B. T5.1, und zu praetectalen Neuronen, z.B. TH3. Kommt es, wie in dieser Arbeit nachgewiesen, zu einer Verringerung der Amplitude und der Entladungsrates retinaler Ganglienzellen durch NPY, muss auch die Beutefangaktivität vermindert werden, da hauptsächlich R2 und R3 Neuronen den Input für das praetectale-tectale Netzwerk liefern, das für die konfigurale Mustererkennung verantwortlich ist. FUNKE (2005) konnte an *Bombina orientalis* mit Hilfe der ^{14}C -2-Desoxyglukose-Technik in ihren Untersuchungen einen deutlich verringerten Glukoseverbrauch etwa 10 min nach tectaler NPY-Applikation verzeichnen. Diese Befunde sind konsistent mit der hier dargestellten Abnahme von Amplitude und Entladungsrates retinaler R2 und R3 Neuronen.

Bringt man die in dieser Arbeit nachgewiesenen Ergebnisse der NPY-vermittelten Amplitudenverringerng retinaler R2 und R3 Neuronen der Entladungsrates bei *Bombina orientalis*, die von FUNKE (2005) festgestellte NPY-vermittelte Abnahme der retino-tectalen Aktivität bei *Bombina orientalis* und die von XIAHONG et al. (2005) ermittelte Verringerung der Antworten tectaler Neuronen bei *Rana catesbeiana* in Zusammenhang, so lässt dies den Schluss zu, dass die Aktivierung praetecto-tectaler Projektionsneurone NPY im Tectum opticum bei *Bombina orientalis* freisetzt. Die von ROTH et al. (2003) an *Bombina orientalis* nachgewiesenen TH4-analoga Neuronen stützen diese These weiter.

Bombina orientalis gehört stammesgeschichtlich zu den ältesten Vertretern der Anuren. Vor diesem Hintergrund ist die Tatsache, dass auch bei *Bombina orientalis* die Verarbeitung visueller Informationen nachhaltig durch NPY beeinflusst wird, umso bedeutender. Sie gibt Grund zu der Annahme, dass bei Anuren die grundlegenden neurochemischen Effekte des retino-tectalen Informationsgefüges evolutionär konserviert sind. NPY hat sich entwicklungsgehistorisch nur wenig verändert. Zwischen Mensch und Schwein unterscheidet sich die NPY-Struktur nur in einer Aminosäure an Position 17 (hNPY: Methionin, pNPY: Leucin). Ebenso erstaunlich ist, dass es zwischen Mensch und Frosch eine hohe Homologie in der Struktur von NPY gibt. Auch hier besteht der Unterschied nur an Position 19 (MCKAY et al. 1992).

Diese evolutionäre Beständigkeit erklärt wohl die Rolle von NPY bei der Regulation fundamentaler physiologischer Prozesse. Auch wenn die neuroendokrinen Systeme und ihre Peptide phylogenetisch alt sind, könnte ein erhöhtes Wissen über ihre Organisation und ihre Entwicklung einige der fundamentalen Funktionen im Nervensystem höherer Vertebraten aufklären (MCKAY et al. 1992).

Mit Hilfe der vorliegenden Untersuchung konnte ein weiterer Beweis dafür geliefert werden, dass der retino-tectale Informationstransfer der Inhibition durch NPY unterliegt.

6 Zusammenfassung

1. Neuropeptid Y gehört zu den potenten Neurotransmittern/modulatoren im zentralen und peripheren Nervensystem der Mammalia. Es ist an der Regulation einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt und scheint auch im retino-tectalen Transfer des visuellen Systems von Anuren eine zentrale Funktion einzunehmen. Die Retina bildet die erste Funktionseinheit bei der Verarbeitung visuellen Inputs. Für die Weiterverarbeitung sind primär das Tectum opticum und das Praetectum verantwortlich. Man geht davon aus, dass ein Teil des praetecto-tectalen Inputs durch NPY vermittelt wird. Es ist bekannt, dass NPY-immunoreaktive Fasern im oberflächlichen Tectum von ipsilateralen, praetectalen thalamischen Arealen abstammen und diese deckungsgleich sind mit den Aufnahmeorten der TH3 und TH4 praetecto-tectalen Projektionszellen der Kröte. Bei *Bombina orientalis* existieren ebensolche Projektionsstrukturen.

Es ist ferner bekannt, dass die Applikation von NPY auf die Tectumoberfläche die anfängliche Erregungswelle der visuell evozierten Feldpotenziale stark abschwächt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, sollte erstmalig mittels Einzelzelleableitungen der Einfluss von NPY auf die Spike-Amplitude und die Spike-Rate retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 und R3 bei *Bombina orientalis* analysiert werden, da überwiegend retinale Ganglienzellen der Klasse R2 und R3 den Input des für die konfigurale Musterunterscheidung verantwortlichen praetectale/tectalen Netzwerkes liefern. Vor diesem Hintergrund erschien die Auswahl gerade dieser Neuronentypen sinnvoll.

2. Um Adaptationseinflüsse bei den neuronalen Antworten auf wiederholte visuelle Reizgebung ausschließen zu können, wurde mit Hilfe eigens entwickelter Kontrollversuche der optimale Zeitabstand $t = 10$ min zwischen aufeinander folgenden Musterpräsentationen ermittelt. Nach diesem Zeitraum waren sowohl die Spike-Amplituden als auch die Spike-Raten wieder weitgehend unbeeinflusst.

3. Zur Untersuchung des Einflusses von NPY auf die Spike-Amplituden und die Spike-Raten retinaler Ganglienzellen wurden visuell evozierte Aktionspotenziale elektrophysiologisch von R2 und R3 Neuronen im Tectum von *Bombina orientalis* abgeleitet. Diese wurden mit Hilfe der Analysesoftware Spike 2 bearbeitet und analysiert.
4. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Spike-Amplituden der R2 Neuronen 20 min nach Applikation von NPY auf die Tectumoberfläche signifikant reduziert werden. Nach einer recovery-Phase von 10 min nach Beendigung der NPY-Applikation durch Entfernen der Applikationskapillare von der Tectumoberfläche, konnte ein signifikanter Wiederanstieg der Spike-Amplituden gemessen werden. Dieser wurde 20 min nach Beendigung der NPY-Applikation erhöht. Die Spike-Amplituden der abgeleiteten R3 Neuronen waren bereits 10 min nach NPY-Applikation signifikant reduziert. Ein weiterer Abfall der Spike-Amplituden zeigte sich nicht. Auch bei den R3 Neuronen konnte ein signifikanter Anstieg der Spike-Amplituden 10 min nach Beendigung der NPY-Applikation festgestellt werden. Dieser setzte sich 20 min nach Beendigung der NPY-Applikation weiter fort. Bei beiden Neuronentypen wurden 20 min nach Beendigung der NPY-Applikation Spike-Amplituden nahe der Ausgangsamplitudenhöhe gemessen. Ein Vergleich dieser zwei Zelltypen zeigte, dass die Spike-Amplituden der R2 Neuronen etwas weniger stark durch NPY beeinflusst werden als die Spike-Amplituden der R3 Neuronen.
5. Die Spike-Raten retinaler Ganglienzellen der Klassen R2 und R3 werden durch NPY beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen, dass es bei R2 Neuronen 10 min nach NPY-Applikation zu einem signifikanten Abfall der Spike-Rate kommt, 20 min nach NPY-Applikation zeigen die gemessenen Daten einen weiteren Abfall der Spike-Rate. Bei R3 Neuronen konnte ein signifikanter Abfall der Spike-Raten deutlich zeitverzögerter nachgewiesen werden. Zehn Minuten nach Beendigung der NPY-Applikation war bei den R2 Neuronen ein signifikanter Wiederanstieg der Spike-Raten zu verzeichnen, der sich 20 min nach Beendigung der NPY-Applikation fortsetzte, jedoch

blieben die Werte signifikant unter den Ausgangswerten ohne NPY-Beeinflussung. Auch bei den R3 Neuronen konnte ein signifikanter Anstieg der Spike-Raten 20 min nach Beendigung der NPY-Applikation verzeichnet werden. Die ermittelten Werte der Spike-Rate unterschieden sich jedoch nicht mehr signifikant von den ohne NPY-Beeinflussung ermittelten Daten. Der Vergleich der R2 und R3 Neuronen ergab, dass die Spike-Raten der R2 Neuronen in der recovery-Phase noch erheblich mehr durch NPY verringert wurden als die Spike-Raten der R3 Neuronen.

6. Eine kritische Würdigung der Versuchsergebnisse der "Multi-Unit" Ableitungen lässt den Schluss zu, dass es sich bei der Reduktion der Spike-Amplituden um ein durch NPY induziertes Phänomen handelt. Demgegenüber kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der im gleichen Zusammenhang auftretenden Reduktion der Spike-Rate um ein Epiphänomen handelt, das – messtechnisch bedingt – auf der NPY induzierten Amplitudenreduktion basiert.
7. Die hier vorgestellten Ergebnisse – im Vergleich mit früheren Ergebnissen unserer Abteilung über tectale Feldpotenziale und ^{14}C -2DG-Aufnahmen unter NPY- weisen darauf hin, dass NPY über zwei verschiedene second-messenger vermittelte Prozesse den retino-tectalen Signaltransfer inhibitorisch steuert. Einer von diesen führt zur Beeinflussung der Spike-Amplituden im Bereich retinaler Axonendknoten im Tectum opticum.
8. *Bombina orientalis* ist ein phylogenetisch basaler Vertreter der Anuren. Der Neurotransmitter NPY beeinflusst nachweisbar den visuellen Informationstransfer im praetecto-tectalen Wirkgefüge und steuert somit das Fress- und Beutefangverhalten dieser Species. Die Aufklärung der Zusammenhänge in solch stammesgeschichtlich alten Funktionssystemen bietet die Möglichkeit, fundamentale Arbeitsweisen im Nervensystem höherer Vertebraten zu entschlüsseln und zu verstehen.

7 Literaturverzeichnis

Bagnoli, P., Fontanesi, G., Alesci, R., Erichsen, J.T. (1992): Distribution of neuropeptide Y, substance P, choline acetyltransferase in the developing visual system of the pigeon and effects of unilateral retina removal. *Journal of comparative Neurology* 318, pp 392 – 414.

Blomqvist, A.G. (1994): Molecular Characterization of the Neuropeptide Y Family and the NPY Receptor Y1. *Acta Universitatis Upsaliensis*, Uppsala.

Bonath, K. (1977): Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische. 1. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin, Heidelberg.

Borchers, H.-W. (1975): Methodische Grundlagen für die Erforschung des visuellen Systems. Dissertation aus der OE 03 Naturwissenschaften und Mathematik der Gesamthochschule Kassel.

Bortz, J., Lienert, G.A. (2003): Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Bruun, A., Ehinger, B., Ekman, R. (1991): Characterization of Neuropeptide Y-like Immunoreactivity in Vertebrate Retina. *Exp. Eye Res.* 53, pp 539 – 543.

Buxbaum-Conradi, H. (1996): Untersuchung von prosencephalo-tectalen Verbindungen mit Hilfe der antidromen Stimulation/Ableit-Technik an der Erdkröte *Bufo bufo spinosus* (L.) und der Agakröte *Bufo marinus* (L.). Shaker Verlag GmbH, Aachen.

Buxbaum-Conradi, H., Ewert, J.-P. (1995): Pretecto-tecal influences. I. What the toad's pretectum tells its tectum: an antidromic stimulation/recording study. *J. Comp. Physiol. A* 176, pp 169 – 180.

Buxbaum-Conradi, H., Ewert, J.-P. (1999): Responses of single neurons in the toad's caudal ventral striatum to moving visual stimuli and test their efferent projection by extracellular antidromic stimulation/recording techniques. *Brain Behav. Evol.* 54, pp 338 – 354.

Buschauer, A., Bernhardt, G., Dove, S. (2000): NPY-Rezeptoren als Zielstrukturen für neue Arzneistoffe. Pharmazeutische Zeitung.

Carew, T.J., (2000): Behavioral neurology: The cellular organization of natural behaviour. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Chapman, A.M., Debski, E.A. (1995): Neuropeptide Y immunoreactivity of a projection from the lateral thalamic nucleus to the optic tectum of the leopard frog. *Vis. Neuroscience* 12, pp 1 – 9.

Cochran, Doris M. (1970): Amphibien Knauer Tierreich in Farben. Droemersch Verlagsgesellschaft Th. Knauer Nachf., München/Stuttgart.

Colmers, W.F., Lukowiak, K., Pittman, Q.J. (1987): Presynaptic action of neuropeptide Y in area CA1 of the rat hippocampal slice. *J. Physiol.* 383, pp 285 – 301.

Colmer, W.F., Bleakman, D. (1994): Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons. *Trends in Neurosciences* Vol. 17, No. 9, pp 373 – 379.

Colmers, W.F., Wahlestedt, C. (eds.) (1993): The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Chapman, A.M., Debski, E.A. (1995): Neuropeptide Y immunoreactivity of a projection from the lateral nucleus to the optic tectum of the leopard frog. *Visual Neuroscience* 12, pp 1 – 9.

D'Aniello, B., Vallarino, M., Pinelli, C., Fiorentino, M., Rastogi, R. K. (1996): Neuropeptide Y: localization in the brain and pituitary of the developing frog (*Rana esculenta*). *Cell Tissue Res.* 285, pp 253 – 259.

Danger, J.M., Tonon, M.C., Jenks, B.G., Saint-Pierre, S., Martel, J.C., Fasolo, A., Breton, B., Quirion, R., Pelletier, G., Vaudry, H., (1990): Neuropeptide Y: localization in the central nervous system and neuroendocrine functions. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 4, pp 307 – 340.

Dumont, Y., Martel, J.-C., Fournier, A., St-Pierre, S., Quirion, R. (1991): Neuropeptide Y and Neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Progress in Neurobiology* 38, pp 125 – 167.

Dumont, Y., Cadieux, A., Doods, H., Pheng, L.H., Abounader, R., Hamel, E., Jacques, D., Regoli, D., Quirion, R., (2000): BIIE0246, a potent and highly selective non peptide Y Y(2) receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 129, pp 1075 – 1088.

Dowling, J.-E., (1976): Physiology and morphology of the retina. In: Llinás, R., Precht, W. (eds.): *Frog neurobiology*. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 278 – 296.

Dowling, J.-E., Werblin, F.S. (1971): Synaptic organisation of the vertebrate retina. *Vision Res. Supplement No. 3*, pp 1 – 15.

Ebersole, T.J., Conlon, J.M., Goetz, F.W., Boyd, S.K. (2001): Characterization and distribution of neuropeptide Y in the brain of a caecilian amphibian. *Peptides* 22, pp 325 – 334.

Ewert, J.-P., (1968): Der Einfluss von Zwischenhirndefekten auf die Visomotorik im Beute- und Fluchtverhalten der Erdkröte (*Bufo bufo* L.). *Z. Vergl. Physiol.* 61, pp 41 – 70.

Ewert, J.-P., (1970): Neural mechanisms of prey-catching and avoidance behavior in the toad (*Bufo bufo* L.). *Brain, Behavior and Evolution* Vol. 3, pp 36 – 56.

Ewert, J.-P. (1974): The neural basis of visually guided behaviour. *Scientific American* 230, 3, pp 34 – 44.

Ewert, J.-P., (1976): The visual system of the toad: behavioral and physiological studies on a pattern recognition system. In: Fite, K.K. v. (ed.): *The amphibian visual system: a multidisciplinary approach*. Academic Press, New York, pp 141 – 202.

Ewert, J.-P., (1984): Tectal mechanism that underlie prey-catching and avoidance behaviors in toads. In: Vanegas, H. (eds.): *Comparative neurology of the optic tectum*. Plenum Press, New York, London, pp 247 – 416.

Ewert, J.-P., (1987): Neuroethology of releasing mechanism: prey-catching in toads. *Behav. Brain Sci.* 10, pp 337 – 405.

Ewert, J.-P., (1991): Challenges from Neuroethology for Neural Engineering. In: Ewert, J.-P., Werner, H. (eds.): Models of Brain Function & Artificial Neurons Nets. GhK Edition, Kassel.

Ewert, J.-P., (1997): Neural correlates of key stimulus and releasing mechanism: a case study and two concepts. Trends in Neuroscience Vol. 20, No 8, pp 332 – 339.

Ewert, J.-P., (1997): Schlüsselreiz und Auslösemechanismus – Heutiger Stand der Konzepte am Beispiel des Beutefangs der Erdkröte – 2. Teil. PdN-Bio 6/46, pp 42 – 47.

Ewert, J.-P., (1999): Instinct, evolving concept: Toad model. In: Adelman, G., Smith, B.H. (eds.): Elsevier's Encyclopaedia of Neuroscience, 2nd edition. ELSEVIER SCIENCE B. V., pp 967 – 972.

Ewert, J.-P., (2004): Motion perception shapes the visual world of amphibians. In: Prete, F. R. (ed.): Complex worlds from simpler nervous systems. The MIT Press, pp 117 – 160.

Ewert, J.-P., Cooper, J.E., Langton, T., Matz, G., Reilly, K., Schwantje, H. (2004): Background information on the species-specific proposals for amphibians. Working party for the preparation of the fourth multilateral consultation of parties to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose (ETS 123), Part B, pp 1 – 49.

Ewert, J.-P., Hock, F.J., v. Wietersheim, A. (1972): Movement-sensitive neurones in the toad's retina. Exp. Brain Res. 16, pp 41 – 59.

Ewert, J.-P., Schwippert, W.W. (2005): Modulation of visual perception and action by forebrain structures and their interactions in amphibians. In: Levin, E.D., Butcher, L., Decker, M. (eds.): Neurotransmitter Interactions and Cognitive Function.

Ewert, J.-P., Burghagen, H. (1979): Configurational prey selection by *Bufo*, *Alytes*, *Bombina* and *Hyla*. Brain Behav. Evol. 16, pp 157 – 175.

Ewert, J.-P., Burghagen, H., Schürg-Pfeiffer, E. (1983): Neuroethological analysis of the innate releasing mechanism for prey-catching behaviour in toads. In: Ewert, J.-P., Capranica, R.R., Ingle, D .J. (eds.): Advances in vertebrate neuroethology. Plenum Press, New York, London, pp 413 – 475.

Ewert, J.-P., Finkenstädt, TH., Weerasuriya, A. (1984): Concepts for neuronal correlates of Gestalt perception: Visual prey recognition in toads. In: Aoki, K. et al. (eds.): Animal Behavior: Neurophysiological and Ethological Approaches. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, pp 137 – 159.

Ewert, J.-P., Matsumoto, N., Schwippert, W.W. (1985): Morphological identification of prey-selective neurons in the grass frog's optic tectum. *Naturwissenschaften* 72, pp 661.

Ewert, J.-P., Schürg-Pfeiffer, E., Schwippert, W.W. (1996): Influence of pretectal lesions on tectal responses to visual stimulation in anurans: field potential, single neuron and behavior analyses. *Acta Biol. Hung.* 47 (1-4), pp 89 – 111.

Ewert, J.-P., Framing, E.M., Schürg-Pfeiffer, E., Weerasuriya, A. (1990): Responses of medullary neurons to moving visual stimuli in the common toad. *Journal of Comparative Physiology* 167, pp 495 – 508.

Ewert, J.-P., v. Wietersheim, A. (1974): Ganglienzellklassen in der retino-tectalen Projektion der Kröte (*Bufo bufo* L.). *Acta Anatomica*, Vol 88, No. 1, pp 55 – 56.

Ewert, J.-P., Hock, F.J., v. Wietersheim, A. (1974a): Thalamus, Praetectum, Tectum: Retinale Topographie und physiologische Interaktionen bei der Kröte *Bufo bufo* (L.). *J. Comp. Physiol.* 92, pp 343 – 356.

Ewert, J.-P. et al. (1996): Verarbeitung visueller Information in biologischen und künstlichen neuronalen Netzen im BMBF-Verbundprojekt "SEKON". In: Statusseminar "Neuroinformatik und künstliche Intelligenz" München, 17. – 19. April 1996.

Ewert, J.-P., Buxbaum-Conradi, H., Glagow, M., Röttgen, A., Schürg-Pfeiffer, E., Schwippert, W.W. (1999): Forebrain and midbrain structures involved in prey-catching behavior of toads: Stimulus-response mediating circuits and their modulating loops. *European Journal of Morphology* 37, pp 111 – 115.

Ewert, J.-P., Buxbaum-Conradi, H., Dreisvogt, F., Glagow, M., Merkel-Harff, C., Röttgen, A., Schürg-Pfeiffer, E., Schwippert, W.W. (2001): Neural modulation of visuomotor functions underlying prey-catching behaviour in anurans: perception, attention, motor performance, learning. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 128, pp 417 – 461.

Funke, S. (2005): Der Einfluss von Neuropeptid Y auf die Glukoseaufnahme im dorsalen Tectum opticum während visueller Stimulation der Unke *Bombina orientalis*: Quantitative Analyse mit Hilfe der ¹⁴C-2-Desoxiglukose-Technik. Dissertation, Universität Kassel.

Funke, S., Ewert, J.-P. (2006): Neuropeptide Y suppresses glucose utilization in the dorsal optic tectum towards visual stimulation in the toad *Bombina orientalis*: A [¹⁴C]2DG study. *Neuroscience Letters* 392, 43-46.

Gábrriel, R., Straznicky, C. (1995): Synapses of optic axons with GABA- and glutamate-containing elements in the optic tectum of *Bufo marinus*. *J. Brain. Res.* 36, 3, pp 329 – 340.

Gamlin, P.D.R., Reiner, A., Keyser, K.T., Brecha, N., Karten, H.J. (1996): Projection of the nucleus pretectalis to a retinorecipient tectal layer in the pigeon (*Columba livia*). *J. Comp. Neurol.* 368, pp 424 – 438.

Greber, S., Schwarzer, C., Sperk, G. (1994): Neuropeptide Y potassium-stimulated glutamate release through Y2 receptors in rat hippocampal slices in vitro. *Br. J. Pharmacol* 113, pp 737 – 740.

Gernert, M. (1995): Pharmakologische Beeinflussung visuell evozierter Feldpotentiale im Tectum opticum der Agakröte *Bufo marinus* L.. Shaker Verlag GmbH, Aachen.

Glagow, M. (1999): Dopaminerge Modulation visueller Antworten der Erdkröte *Bufo bufo spinosus* L.: Analyse von Verhalten, neuralem Metabolismus und neuronaler Aktivität unter Apomorphin. Dissertation Universität/Gesamthochschule Kassel.

Grobstein, P. (1992): Directed movement in the frog: motor choice, spatial representation, free will?. In: Kien, J., McCrohan, C.R., William, W. (eds.): Neurobiology of motor programme selection. Pergamonn Press, Oxford, New York, Seoul, Tokyo, pp 250 – 279.

Grouzmann, E., Buclin, T., Martire, M., Cannizzaro, C., Dörner, B., Razaname, A., Mutter, M. (1997): Characterization of selective antagonist of neuropeptide Y at the Y2 receptor. J. Biol. Chem. 272, pp 7699 – 7706.

Grouzmann, E., Cressier, F., Walker, Oh., Hofbauer, K., Waeber, B., Brunner, H.R. (1993): Interactions between NPY and its receptor: assessment using anti-NPY antibodies. Regulatory Peptides 54, pp 439 – 444.

Grüsser, O.-J., Grüsser-Cornehls, U. (1968): Neurophysiologische Grundlagen visueller angeborener Auslösemechanismen beim Frosch. Zeitschrift für vergleichende Physiologie 59, pp 1 – 24.

Grüsser, O.-J., Grüsser-Cornehls, U. (1969): Neurophysiologie des Bewegungssehens, Ergebnisse der Physiologie. 61, pp 178 – 265.

Grüsser, O.-J., Grüsser-Cornehls, U. (1976): Neurophysiology of the Anuran Visual System. In: Llinás, R., Precht, W. (eds.): Frog neurobiology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 297 – 385.

Grundemar, L., Sheikh, S. P., Wahlestedt, C. (1993): Characterization of Receptor Types for Neuropeptide Y and Related Peptides. In: Colmers, W.F., Wahlestedt, C. (eds.): The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides. Humana Press, Totowa, New Jersey pp 197 - 239.

- Hendry, S. (1993):** Organization of Neuropeptide Y Neurons in the Mammalian Central Nervous System. In: Colmers, W.F., Wahlestedt, C. (eds.): The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides. Humana Press, Totowa, New Jersey pp 65 - 156.
- Herrmann, H.-J. (1987):** Systematik, Verbreitung, Biologie, Ökologie und Terrarienhaltung der Discoglossidae GÜNTHER, 1859, (Amphibia, Anura). Veröff. Naturhist. Mus. Schleusingen.
- Ingle, D. (1983):** Brain mechanisms of visual localization by frogs and toads. In: Ewert, J.-P., Capranica, R.R., Ingle, D.J. (eds.): Advances in vertebrate neuroethology. Plenum Press, New York, London, pp 413 – 475.
- Insel, T., Young, L. (2000):** Neuropeptides and the evolution of social behaviour. Current Opinion in Neurobiology 10, pp 784 – 789.
- Inui, A. (1999):** Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved?. Trends Pharmacol. Science 20, pp 43 – 46.
- Kahl, H., Wiggers, W. (2000):** Influence of muscarinic ligands on the amplitude of evoked surface potential's late components in the optic tectum of the urodele *Plethodon jordani*. Neuroscience Letters 285, pp 17 – 20.
- Kalra, P.S., Kalra, S.P. (2000):** Use of antisense oligodeoxynucleotides to study the physiological functions of neuropeptide Y. Methods 22, pp 249 – 254.
- Kandel, E.R. (1976):** Cellular Basis of Behavior. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Klüver, H. (ed.) (1968):** The vertebrate visual system. The University of Chicago Press, Chicago, London.
- Köhler, W., Schachtel, G., Voleske, P. (1995):** Biostatistik. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- Kozicz, T., Lázár, G. (1993):** The origin of tectal NPY immunopositive fibers in the frog. Brain Research 635, pp 345 – 348.

Kuhn, P. (2003): Quantitative Untersuchungen über die Steuerung des Beutefangs der Chinesischen Rotbauchunke *Bombina orientalis* während der Ontogenese. Dissertation, Universität Kassel.

Kuschinsky, G., Lüllmann, H., Mohr, K. (1993): Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Kuzmin, S.L. (1995): Die Amphibien Russlands und angrenzender Gebiete. Magdeburg: Westarp-Wiss, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Lázár, G., Maderdrut, J., Trasti, S., Liposits, Z., Tóth, P., Kozicz, T., Merchenthaler, I. (1993): Distribution of Proneuropeptide Y-Derived Peptides in the Brain of *Rana esculenta* and *Xenopus laevis*. The Journal of Comparative Neurology 327, pp 551 – 571.

Llinás, R., Precht, W. (eds.) (1976): Frog Neurobiology a Handbook. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

Lozán, J.L. (1992): Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler. Verlag Paul Parey, Berlin, Heidelberg.

Manso, M.J., Anadón, R. (1991): Specialized presynaptic dendrites in the stratum cellulare externum of the optic tectum of an elasmobranch, *Scyliorhinus canicula* L.. Neuroscience Letters 129, pp 291 – 293.

Matsumoto, N., Schwippert, W.W., Ewert, J.-P. (1986): Intracellular activity of morphologically identified neurons of the grass frog's optic tectum in response to moving configurational visual stimuli. J. Comp. Physiol. A 159, pp 721 – 739.

Matsumoto, N., Schwippert, W.W., Beneke, T.W., Ewert, J.-P. (1991): Forebrain-mediated control of visually guided prey-catching in toads: investigation of striato-pretectal connections with intracellular recording/labeling methods. Behavioural Processes 25, pp 27 – 40.

Matthews, J.E., Jansen, M., Lyerly, D., Cox, R., Chen, W.-J., Koller, K.J., Daniels, A.J. (1997): Pharmacological characterization and selectivity of the NPY antagonist GR231118 (1229U91) for different NPY receptors. Regulatory Peptides 72, pp 113 – 119.

McKay, D.M., Shaw, C., Halton, D.W., Thim, L., Buchanan, K.D. (1992): The primary structure and tissue distribution of an amphibian neuropeptide Y. *Regulatory Peptides*, 37, pp143 – 153.

Minkoff, E.C. (1975): A Laboratory Guide to Frog Anatomy. Pergamon Press INC, New York.

Mühlenbrock-Lenter, S., Endepols, H., Roth, G., Walkowiak, W. (2005): Immunohistological characterization of striatal and amygdalar structures in the telencephalon of the fire-bellied toad *Bombina orientalis*. *Neuroscience* 134, pp 705 – 719.

Nagano, K., Li, Q.-L., Tamada, A., Matsumoto, N. (1988): An analysis of postsynaptic potentials of tectal neurons of the frog: correlation with impulses recorded from the terminals of retinotectal afferents. *Exp. Brain Res.* 70, pp 429 – 432.

Nakagawa, H., Matsumoto, N. (1999): Current source density analysis of ON/OFF channels in the frog optic tectum. *Progress in Neurobiology* 61, pp 1 – 44.

Northcutt, G.R. (1999): Evolution of vertebrate brains. In: Adelman, G., Smith, B.H. (eds.): Elsevier's Encyclopedia of Neuroscience, 2nd edition. ELSEVIER SCIENCE B.V., pp 688 - 692.

Osborne et al. (1985): Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactive amacrine cells in retinas of frog and goldfish. *Cell Tissue Res* 241, pp 651 – 656.

Remane, A., Storch, V., Welsch, U. (1991): Systematische Zoologie. 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

Röttgen, A. (1999): Über den Einfluss von Neuropharmaka auf die visuelle Ansprechbarkeit in der retino-tectalen Projektion der Agakröte. Dissertation, Universität Kassel.

Roth, G., Grunwald, W., Dicke, U. (2003): Morphology, Axonal Projection Pattern, and Responses to Optic Nerve Stimulation of Thalamic Neurons in the Fire-Bellied Toad *Bombina orientalis*. *J. Comp. Neurology* 461, pp 91 – 110.

Sachs, L. (1992): Angewandte Statistik. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Scalia, F. (1976): The optic pathway of the frog. In: Llinás, R., Precht, W. (eds.): Frog Neurobiology. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp 386 - 406.

Schürg-Pfeiffer, E. (1979): Quantitative neurophysiologische Untersuchungen zur Frage nach Gestaltdetektoren im visuellen System des Frosches *Rana temporaria*. Dissertation, Universität Kassel.

Schürg-Pfeiffer, E. (1991): Properties of Prey-Selective Neurons in the Behaving Toad. In: Ewert, J.-P., Werner, H. (eds.): Models of Brain Function & Artificial Neuronals Nets. GhK Edition, Kassel.

Schürg-Pfeiffer, E., Ewert, J.-P. (1981): Investigation of neurons involved in the analysis of gestalt prey features in the frog *Rana temporaria*. J. Comp. Physiol., 141, pp 139 – 152.

Schwippert, W.W., Ewert, J.-P., (1995): Effects of Neuropeptide-Y on tectal field potentials in the toad. Brain Research 669, pp 150 – 152.

Schwippert, W.W., Beneke, T.W., Ewert, J.-P., (1990): Responses of medullary neurons to moving visual stimuli in the common toad. J. Comp. Physiol. A 167, pp 509 – 520.

Schwippert, W.W., Beneke, T.W., Ewert, J.-P., (1993): Codierung bewegter figuraler Muster durch verteilte (tectale und praetectale) Netzwerke und deren Interaktion. In: Ewert, J.-P. (ed): BMFT/DLR-Bericht 1991 – 1993: Verbundprojekt "SEKON". Verarbeitungsprinzipien und Modulation visueller Information, pp 6 – 34.

Schwippert, W.W., Beneke, T.W., Ewert, J.-P. (1995): Disproportionate Distribution of Field Potentials Across the Toad's Tectal Visual Map in Response to Diffuse Light ON and OFF Stimulations. Vision Res. Vol. 36, No. 1, pp 19 – 26.

Schwippert, W.W., Beneke, T.W., Ewert, J.-P., (1995a): Pretecto-tectal influences. II. How retinal and pretectal inputs to the toad's superficial tectum interact: a study of electrically evoked potentials. *J. Comp. Physiol.* 176, pp 181 – 192.

Schwippert, W.W., Röttgen, A., Ewert, J.-P. (1998): Neuropeptide Y (NPY) or fragment NPY 13-36, but not NPY 18-36, inhibit retinotectal transfer in cane toads *Bufo marinus*. *Neuroscience Letters* 253, pp 33 – 36.

Simon, H. (1975): Frogs and Toads of the world. J.B. Lippincott Company, Philadelphia and New York.

Spreckelsen, C. (1998): Neurophysiologische Untersuchungen zum Größenkonstanz-Phänomen an freibeweglichen Kröten. Dissertation Universität Kassel.

Strake, J. (1995): Atmung und Rufgenerierung bei *Bombina orientalis* und *Discoglossoidea pictus* (Discoglossoidea, Anura), Morphologische und physiologische Untersuchungen. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln.

Sun, L., Philipson, L.H., Miller, R.J. (1997): Regulation of K⁺ and Ca⁺⁺ Channels by a Family of Neuropeptide Receptors¹. *JPET* 284, pp 625 – 632.

Sundler F., Böttcher, G., Ekblad, E., Håkanson, R. (1993): PP, PYY, and NPY Occurrence and Distribution in the Periphery. In: Colmers, W.F., Wahlestedt, C. (eds.): *The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 157 - 196.

Székely, G., Lázár, G. (1976): Cellular and synaptic architecture of the optic tectum. In: Llinás, R., Precht, W. (eds.): *Frog Neurobiology*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp 407 – 434.

Székely, A.D., Csillag, A., Görcs, T. (1992): Neuropeptide Y innervation of retinorecipient layers of the chick optic tectum. *Journal of Neurocytology* 21, pp 148 – 156.

Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V. (1982): Neuropeptide Y – a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 296, pp 659 – 660.

Tonon, M.-C., Bosler, O., Stoeckel, M.-E., Pelletier, G., Tappaz, M., Vaudry, H. (1992): Co-localization of tyrosine hydroxylase, GABA and neuropeptide Y within axon terminals innervating the intermediate lobe of the frog *Rana ridibunda*. *J. Comp. Neurol.* 319, pp 599 – 605.

Wachowitz, S., Ewert, J.-P. (1996): A key by which the toad's visual system gets access to the domain of prey. *Physiol Behav.* 60 (3), pp 877 – 887.

Walkowiak, W. (1979): Eigenschaften des Gehörs und Antwortverhalten akustischer Neuronen aus dem Torus semicircularis der Rotbauchunke (*Bombina bombina* L.) und des Grasfrosches (*Rana T. temporaria* L., Anura, Amphibia) bei Reizung mit artspezifischen Signalen und arteigenen Rufen. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn.

Wang, S.-R. (2003): The nucleus isthmi and dual modulation of the receptive field of tectal neurons in non-mammals. *Brain Research Reviews* 41, pp 13 – 25.

Wang, D., Ewert, J.-P. (1992): Configurational pattern discrimination responsible for dishabituation in common toads *Bufo bufo* (L.): Behavioral tests of the predictions of neural model. *J. Comp. Physiol.* 170, pp 317 – 325.

Weerasuryia, A., Ewert, J.-P. (1983): Afferents of some dorsal retino-recipient areas of the brain of *Bufo bufo*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 9, pp 536.

Westhoff, G., Roth, G., Strake, H. (2004): Topographic representation of vestibular and somatosensory signals in the anuran thalamus. *Neuroscience* 124, pp 669 – 683.

Wieland, H., Hamilton, B., Krist, B. (1998): Hammerhead Ribozymes That Selectively Cleave the NPY Y1, Y4 and Y5 Receptor Full-Length RNA. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 8, pp 435 – 440.

Xiao, J., Wang, Y., Wang, S.-R. (1999): Effects of glutamatergic, cholinergic and gabaergic antagonists on tectal cells in toads. *Neuroscience*, 90, pp 1061 – 1067.

Xiaohong, L., Tsurudome K., Matsumoto, N. (2005): Postsynaptic potentials of tectal neurons evoked by electrical stimulation of the epretectal nuclei in bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Brain Research* 1052, pp 40 – 46.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Projektionsbahnen des Nervus opticus zu den verarbeitenden Hirnarealen. Dargestellt werden mögliche Verschaltungen in retino-pretectalen und retino-tectalen Netzwerken sowie im praetecto-tectalen Netzwerk. Die Funktionseinheit (a) ist in ein praetecto-tectales Netzwerk (b) integriert, dessen Output von tectalen Neuronenpopulationen, z.B. T 5.2 Neuronen (c), verarbeitet und weitergeleitet wird. Im rechts dargestellten Netzwerk b' ist eine direkte hemmende Einflussnahme praetectoraler Neuronen (TH3) auf tectale Neuronen dargestellt. Der Ausschnitt des neuronalen Netzwerkmodells rechts zeigt die indirekte inhibitorische Kontrolle des Praetectum über tectale Interneuronen (T 5.3), die auf Erregung durch TH3, einen hemmenden Input an T 5.1 und T 5.2 weitergeben. R2, R3, R4 = retinale Ganglienzellen; TH3 = thalamische Neuronen; T 5.2, T 5.3 = tectale Neuronen (nach EWERT 1991)..... 6

Abbildung 2: Laminarer Aufbau des Tectum opticum bei Amphibien (nach SZÉKELY & LÁZÁR 1976). Dargestellt sind die einzelnen beschriebenen tectalen Schichten (nummeriert von 1-9 am linken Rand) sowie die in den Schichten vorkommenden Neuronentypen (nummeriert von 1-10 innerhalb der Abbildung). 1, 2 = große birnenförmige Zellen; 3 = Pyramidenzellen; 4 = ganglionäre Zellen; 5, 6 = kleine birnenförmige Zellen; 7 = bipolare Neuronen; 8 = Sternzellen; 9 = amakrine Zellen; 10 = optische Endigungen.....10

Abbildung 3: *Bombina orientalis* (Chinesische Rotbauchunke).....14

- Abbildung 4: Gegenüberstellung der abgeleiteten Grundaktivität (Grundrauschen) zur Darstellung des Einflusses von Ketavet® auf die Grundaktivität retinaler Ganglienzellen. In der oberen Abbildung wird die Ableitung der Grundaktivität 3 Stunden nach der Präparation dargestellt; In der unteren Abbildung wird die Ableitung der Grundaktivität 24 Stunden nach der Präparation dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Grundaktivität von *Bombina orientalis* 3 Stunden nach der Präparation deutlich reduziert ist.17
- Abbildung 5: Strukturformel Succinyl(di)cholin18
- Abbildung 6: Primärstruktur von Neuropeptid Y (NPY).20
- Abbildung 7: Position tectaler Ableitorte und ihre Entsprechungen im Gesichtsfeld der Kröte. Der binokulare Bereich des Gesichtsfeldes ist schwarz unterlegt.24
- Abbildung 8: Darstellung der Versuchsanordnung. Das Versuchsbecken (a) diente zur Fixierung der Tiere während der Versuche. Mit Hilfe des Mikromanipulators (b) wurde die Ableitelektrode positioniert. Durch Mikromanipulator (c) wurde die Applikationskapillare platziert. Im Hintergrund ist der elektrisch gesteuerte Musterpräsentationsapparat (d) zu sehen.25
- Abbildung 9: Beispiel für einen Screenprint des Spike 2 Analyseprogramms. Darstellung einer Originalableitung ("Multi-Unit" Spike-Aktivität) mit stark gestauchter Zeitachse. Kanal 1 zeigt die Originalmesssignale. Kanal 2 stellt das präsentierte Reizmusterschema dar (M1 = 1. Musterpräsentation (Abschnitt 1), M2 = 2. Musterpräsentation (Abschnitt 2), M3 = 3. Musterpräsentation (Abschnitt 3), M4 = 4. Musterpräsentation (Abschnitt 4), wobei a den Eintritt und b den Austritt der Reizmusteratmosphäre in das Gesichtsfeld der Unke kennzeichnen. Die Pausen von 2 s zwischen den Musterpräsentationen sind mit c gekennzeichnet. Kanal 3 symbolisiert jeden detektierten Spike durch einen senkrechten Strich.27

- Abbildung 10: Gezeigt wird der Ausschnitt einer "Multi-Unit" Originalableitung. Mit Hilfe zweier horizontal angelegter Cursor (1 und 2) konnte die Höhe des Rauschbandes ermittelt werden, woraus sich die anzulegende Schwelle für die Auswertung ergab, die mit Cursor 3 dargestellt ist. In den Kanälen Abs. 1 – 4 werden die detektierten Spikes, die oberhalb der gesetzten Schwelle (Cursor 3) lagen, als Striche dargestellt.33
- Abbildung 11: Darstellung der Spike-Amplitudenveränderung von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* während der vier Musterpräsentationen der Reizmusterserie zum Zeitpunkt $t = 0$. Die dargestellten Werte zeigen die errechneten Mittelwerte aller detektierten Spikes oberhalb des einfachen Rauschbandes während des jeweilig präsentierten Musters des Reizmusterschemas.39
- Abbildung 12: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden von R2-Neuronen bei $n = 6$ Tieren während der Präsentation des Reizmusterschemas zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten t bei *Bombina orientalis*.40
- Abbildung 13: Darstellung der Spike-Amplitudenveränderung von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* während der 1. Musterpräsentation (Abschnitt 1) des Reizmusterschemas.41
- Abbildung 14: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden bei den 4 Musterpräsentationen (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas, zur Untersuchung der Beeinflussung durch Adaptation von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* ($n = 6$).42
- Abbildung 15: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden bei den 4 Musterpräsentationen (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas, unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung, zur Untersuchung der Beeinflussung durch Adaptation von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* ($n = 6$).43

- Abbildung 16: Darstellung der Spike-Ratenveränderung von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* während der vier Musterpräsentationen der Reizmusterserie zum Zeitpunkt $t = 0$. Die dargestellten Werte zeigen die errechneten Mittelwerte aller detektierten Spikes oberhalb des einfachen Rauschbandes während des jeweilig präsentierten Musters des Reizmusterschemas.45
- Abbildung 17: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spike-Raten von R2-Neuronen bei $n = 6$ Tieren während der 4 Musterpräsentationen innerhalb des Reizmusterschemas zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten t bei *Bombina orientalis*.46
- Abbildung 18: Darstellung der Veränderung der Spikeanzahl pro Intervall von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* zu den unterschiedlichen Ableitzeitpunkten während der 1. Musterpräsentation (Abschnitt 1) des Reizmusterschemas.47
- Abbildung 19: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Raten bei den 4 Musterpräsentationen (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas, zur Untersuchung der Beeinflussung durch Adaptation von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* ($n = 6$).48
- Abbildung 20: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Raten bei den 4 Musterpräsentationen (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas, unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung, zur Untersuchung der Beeinflussung durch Adaptation von R2-Neuronen bei *Bombina orientalis* ($n = 6$).49
- Abbildung 21: Darstellung der Spike-Amplituden von R2-Neuronen bei den Musterpräsentationen 1 bis 4 des Reizmusterschemas bei *Bombina orientalis* ohne eine Beeinflussung durch NPY. Farblich dargestellt sind die für die einzelnen Versuchstiere ermittelten Daten. Der daraus errechnete Mittelwert (Tier 1-8) ist schwarz in der Graphik dargestellt.52

- Abbildung 22: Darstellung der errechneten Mittelwerte ($n = 8$) der Spike-Amplituden von R2-Neuronen bei den Musterpräsentationen 1 bis 4 des Reizmusterschemas bei *Bombina orientalis* während der durchgeführten Untersuchungen ohne NPY-Applikation (ohne NPY) sowie der durchgeführten Untersuchungen mit NPY-Applikation (NPY 20 min).53
- Abbildung 23: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spike-Amplituden während der 4 Musterpräsentationen des Reizmusterschemas (Abschnitt 1 – 4) aller Versuchstiere ($n = 8$) zur Untersuchung des Einflusses von NPY auf die Spike-Amplituden.55
- Abbildung 24: Darstellung der errechneten Spike-Amplitudenmittelwerte aller Versuchstiere ($n = 8$) während der 1. - 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas (Abschnitt 1 – 4) bei der Ableitung retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 bei *Bombina orientalis* zur Untersuchung des Einflusses von NPY auf die Spike-Amplituden, unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung.56
- Abbildung 25: Darstellung der Veränderung der Spike-Rate während der Musterpräsentationen 1 – 4 des Reizmusterschemas bei *Bombina orientalis* ($n = 11$). Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 ohne eine Applikation von NPY auf die Tectumoberfläche.58
- Abbildung 26: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Spikeanzahl pro Intervall aller Versuchstiere ($n = 11$) während der Präsentation des Reizmusterschemas (Musterpräsentation 1 bis 4), ohne NPY-Beeinflussung (ohne NPY), nach NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche (NPY 10 min, NPY 20 min) und nach Beendigung der NPY-Applikation während der Erholungsphase (rec NPY 10 min, rec NPY 20 min). Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale von R2 Neuronen im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.59

- Abbildung 27: Darstellung der ermittelten Entladungsraten aller Versuchstiere (n = 11) während der ersten Musterpräsentation des Reizmusterschemas während der Ableitungen ohne NPY, NPY 10 min, NPY 20 min und nach Beendigung der NPY-Applikation rec NPY 10 min und rec NPY 20 min. Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale von R2 Neuronen im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.61
- Abbildung 28: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ausgewerteten Spikezahlen pro Intervall aller Versuchstiere (n = 11). Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 im Tectum opticum bei *Bombina orientalis* zur Untersuchung der Beeinflussung der Spike-Raten durch NPY.62
- Abbildung 29: Darstellung der errechneten Mittelwerte der Entladungsraten aller Versuchstiere (n = 11) für die 1. - 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas während der Ableitung retinaler Ganglienzellen der Klasse R2 bei *Bombina orientalis* unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung.63
- Abbildung 30: Darstellung der gemessenen Spike-Amplitudenhöhen retinaler R3 Neuronen bei *Bombina orientalis* während der 1. - 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas ohne eine Beeinflussung durch NPY.65
- Abbildung 31: Darstellung der errechneten Mittelwerte der gemessenen Spike-Amplituden retinaler R3 Neuronen bei *Bombina orientalis*. Es werden die errechneten Mittelwerte aller Versuchstiere (n = 5) zum Zeitpunkt der 1. – 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas während unterschiedlicher Ableitzeitpunkte dargestellt.67
- Abbildung 32: Darstellung der errechneten Spike-Amplitudenmittelwerte retinaler R3 Neuronen bei *Bombina orientalis*. Es werden die errechneten Mittelwerte aller Versuchstiere (n = 5) unter Berücksichtigung des Standardfehler und der Standardabweichung, zum Zeitpunkt der 1. – 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas während unterschiedlicher Ableitzeitpunkte dargestellt.68

- Abbildung 33: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spike-Amplituden für $n = 5$ Versuchstiere bei der Präsentation des Reizmusterschemas während der durchgeführten Ableitungen. Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.70
- Abbildung 34: Darstellung der errechneten Spike-Amplitudenmittelwerte retinaler R3 Neuronen bei *Bombina orientalis* für $n = 5$ Tiere während der 1. bis 4. Musterpräsentation des Reizmusterschemas, unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung.70
- Abbildung 35: Darstellung der Veränderung der Spikeanzahl während den Musterpräsentationen 1 - 4 bei *Bombina orientalis* ($n = 5$). Abgeleitet wurden die Potenziale retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 ohne eine Applikation von NPY.72
- Abbildung 36: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spike-Raten aller Versuchstiere ($n = 5$) während der Präsentation des Reizmusterschemas (präsentierte Muster 1 - 4), ohne NPY-Beeinflussung (ohne NPY), nach NPY-Applikation auf die Tectumoberfläche (NPY 20 min). Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale von R3 Neuronen im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.74
- Abbildung 37: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spike-Raten aller Versuchstiere ($n = 5$) unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung bei der Präsentation des Reizmusterschemas (präsentierte Muster 1 - 4) während aller durchgeführter Untersuchungen. Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale von R3 Neuronen im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.75
- Abbildung 38: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spikezahlen aller Versuchstiere ($n = 5$) während der 1. – 4. Musterpräsentation (Abschnitt 1 – 4) des Reizmusterschemas bei den durchgeführten Ableitungen. Abgeleitet wurden die Aktionspotenziale retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 im Tectum opticum bei *Bombina orientalis*.76

Abbildung 39: Darstellung der errechneten Mittelwerte der ermittelten Spike-Raten aller Versuchstiere ($n = 5$) während der Musterpräsentationen 1 - 4 des Reizmusterschemas bei der Ableitung von Aktionspotenzialen retinaler Ganglienzellen der Klasse R3 bei *Bombina orientalis*, unter Berücksichtigung des Standardfehlers und der Standardabweichung.77

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| ERF | excitatorisches rezeptives Feld |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| IRF | inhibitorisches rezeptives Feld |
| Lpv | posterioventraler Nucleus |
| Lpd | lateraler posteriodorsaler Nucleus |
| Lpd/P | lateraler posteriodorsaler/posteriorer thalamischer Nucleus |
| P | posteriorer Nucleus |
| NPY | Neuropeptid Y |
| NPY-IR | NPY-immunoreaktiv |
| PP | pankreatisches Polypeptid |
| PYY | Peptid YY |
| R2 - R4 | retinale Ganglienzellen der Klasse 2 – 4 |
| RF | rezeptives Feld |
| TO | Tectum opticum |

9.2 Angewandte statistische Verfahren

9.2.1 Mittelwert

Der arithmetische Mittelwert \bar{x} dient zur Informationsverdichtung für mehrere bis zahlreiche nicht zu heterogene Daten (nach SACHS 1997).

Er berechnet sich wie folgt:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n) = \sum_{i=1}^n x_i$$

wobei x die einzelnen Ereignisse und n die Summe der Ereignisse (Anzahl der Versuchstiere) beschreibt.

9.2.2 Standardabweichung

Die Standardabweichung s gibt Aufschluss über die Variabilität der Werte und ist auch die beste Schätzung der Streuung in der Grundgesamtheit (LOZÁN 1992). Sie wird berechnet nach:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n-1}}$$

9.2.3 Standardfehler

Der errechnete arithmetische Mittelwert einer Verteilung ist nur eine Schätzung des Mittelwertes der Grundgesamtheit. Der wahre Mittelwert μ bleibt unbekannt. Über die Berechnung des Standardfehlers des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ erhält man die Möglichkeit, eine Aussage über die Abweichung des Mittelwertes gegenüber dem wahren Mittelwert der Verteilung zu treffen (LOZÁN 1992).

Der Standardfehler der Mittelwertes errechnet sich:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

9.2.4 Friedman-Test (Rangvarianzanalyse)

Der Friedman-Test führt eine einfaktorielles Varianzanalyse durch. Es handelt sich um ein parameterfreies Verfahren, wobei keine Normalverteilung vorausgesetzt wird. Hierbei wird getestet, ob k Bedingungen (unterschiedliche Ableitzeitpunkte) bei n Wiederholungen (Anzahl der Versuchstiere) systematische Unterschiede aufweisen. Mit Hilfe des Friedman-Schemas werden Rangsummen R gebildet. Werden unter Annahme der Nullhypothese Rangsummen für jede der k Bedingungen gebildet, so werden diese nicht oder nur zufällig voneinander abweichen. Besteht zwischen den einzelnen Bedingungen jedoch ein systematischer Einfluss, so werden überzufällig unterschiedliche Rangsummen auftreten (SACHS 1991).

Als Prüfgröße wird χ_R^2 errechnet:

$$\chi_R^2 = \left[\frac{12}{nk(k+1)} \sum_{i=1}^k R_i^2 \right] - 3n(k+1)$$

wobei:

n = Anzahl der Zeilen (Individuen)

k = Anzahl der Spalten (Wiederholungen)

$\sum_{i=1}^k R_i^2$ = Summe der Quadrate der Rangsummen für die k zu vergleichenden Wiederholungen

beschreibt.

Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgt anhand der χ^2 -Verteilung für Freiheitsgrade (FG) = $k - 1$. Wobei gilt:

ist $\chi_{\text{errechnet}}^2 \leq \chi_{\text{Tabelle}}^2$ gilt die Nullhypothese, d.h. es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Messungen. Ist $\chi_{\text{errechnet}}^2 > \chi_{\text{Tabelle}}^2$ wird die Nullhypothese verworfen und es gilt die Alternativhypothese H_1 , es bestehen signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen.

9.2.5 Wilcoxon-Test für Paardifferenzen

Dieser Test dient dem Vergleich von Paardifferenzen. Er hat für kleine und große Stichproben eine Wirksamkeit von 95 % des t-Tests.

Zur Berechnung der Prüfgröße werden Paardifferenzen gebildet, die nach einer aufsteigenden Rangordnung sortiert werden. Es werden Summen der positiven und negativen Rangzahlen gebildet. Als Prüfgröße R wird die kleinere der beiden Rangsummen gewählt. Übersteigt $R_{\text{errechnet}}$ den Tabellenwert für die entsprechende Anzahl n , wird die Nullhypothese angenommen; der beobachtete Unterschied ist als zufällig zu betrachten.

9.3 Physiologische Blutersatzlösung (Ringerlösung) für Unken und Kröten

Die angegebenen Mengen wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit dem pH-Meter überprüft und auf pH 7,0 eingestellt.

Rezept für Blutersatzlösung:

6,50 g NaCl

0,14 g KCl

0,12 g CaCl₂

0,20 g NaH₂PO₄

2,00 g C₆H₁₂O₆*H₂O (Glucose)

9.4 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt und andere als in der Dissertation angegebene Hilfsmittel nicht verwendet habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, Juli 2006

9.5 Curriculum Vitae

Persönlich Daten

Name: Frauke Ribbekamp, geb. Dreisvogt
Geboren am: 26.06.1968 in Brebach/Fechingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

08/1974 – 07/1978 Grundschule Hildebrandtstraße, Kassel
08/1978 – 07/1984 Mädchenrealschule Luisenschule, Kassel
08/1984 – 07/1988 Gymnasium Goetheschule, Kassel
08/1988 – 07/1990 Ausbildung zur Gärtnerin,
Abschluss: Blumen- und
Zierpflanzengärtnerin
10/1991 – 04/1998 Studium der Biologie an der Universität
Kassel,
Schwerpunkte:
Zoologie, Tierphysiologie/Neurobiologie,
Ökologie und Bodenkunde

Berufstätigkeit:

08/1990 – 09/1991 Firma Blumen Schmid, Kassel
angestellt als Gärtnergesellin
10/1991 – 08/1998 Firma Blumen Schmid
Arbeit als Gärtnerin zur Finanzierung des
Studiums
09/1998 – 08/2003 Universität Kassel, Abteilung Neurobiologie
angestellt als wissenschaftliche
Mitarbeiterin, Beginn der Promotion
06/2005 – 02/2006 Honorartätigkeit als Biologin im Tierpark
Sababurg, Hofgeismar
seit 03/2006 Pflanzenhof Nordshausen, Kassel

Praktika und Weiterbildungen:

07/1996 – 08/1996 Firma Braun Melsungen Abteilung
Biochemie-Labor, Sparte Pharma
03/2005 – 05/2005 Training Schlüsselqualifikationen für
akademische Führungskräfte

