



INSEKTEN - ERG

EINFÜHRENDE BEMERKUNGEN

Während des heutigen Kurstages werden bestimmte Eigenschaften von Photorezeptoren (z.B. Kennlinie, Farbempfindlichkeit, Latenzzeit, zeitliches Auflösungsvermögen) experimentell durch elektrophysiologische Ableitung (objektive Sinnesphysiologie) am Fliegenauge dargestellt. Einige Eigenschaften des Facettenauges werden mit den Eigenschaften des visuellen Systems des Menschen verglichen.

THEORETISCHE VORAUSSETZUNGEN

Theoretische Vorkenntnisse aus der Vorlesung "Grundlagen der Tierphysiologie". Grundlegende Kenntnisse der Neurophysiologie (Bau und Funktion der Nervenzelle, Ruhepotential, Aktionspotential etc., siehe Nervkurs).

Allgemeine Sinnesphysiologie: Phasische und tonische Rezeptoren (Beispiele), Kennlinien, Beziehung zwischen Reiz, Rezeptorpotential und Impulsfrequenz, adäquater Reiz.

Sehphysiologie: Bau und Funktion des Wirbeltierauges am Beispiel des menschlichen Auges: Aufbau, dioptrischer Apparat, Bildentstehung, Akkomodation, Fehlsichtigkeit, Aufbau der Netzhaut, Photorezeptoren (Besonderheiten des Ruhe- und Belichtungspotentials), Sehpigmente und Transduktionsprozeß, Farbempfindlichkeit, Adaptation, räumliches und zeitliches Auflösungsvermögen.

Bau und Funktion des Insektenauges: Bau eines Ommatidiums, Appositionsauge, optisches Superpositionsauge, neurales Superpositionsauge, Umwandlung der Photopigmente, Transformationsprozess, räumliches Auflösungsvermögen, zeitliches Auflösungsvermögen (Flimmerverschmelzungsfrequenz), Spektralempfindlichkeit, Elektroretinogramm (ERG).

Methodische Kenntnisse, die Sie im Praktikum erwerben sollen:

Präparation der Fliege, Durchführen einer extrazellulären Summenableitung. Bedienung des Oszilloskops: Grundkenntnisse über den Aufbau und die Funktion des Oszilloskops werden vorausgesetzt. Eine Einführung in die Bedienung (Triggern, Speichern, Bestimmung der Amplitude und Zeitmessung) der im Praktikum verwendeten Oszilloskope, Schreiber und anderen technischen Geräte wird durch den Kursbetreuer gegeben. Grundlagen eines psychophysischen Experiments.

LITERATUR

MÜLLER: Tier- und Humanphysiologie, Springer -- Erläutert die Prinzipien der Sehphysiologie wie z.B. den Mechanismus der Phototransduktion und die anatomischen Verhältnisse beim Säugerauge und bei den verschiedenen Facettenaugen-Typen der Insekten.

ECKERT/RANDALL: Animal Physiology, Freeman.. (Deutsche Übersetzung: Thieme) -- Erläutert die Prinzipien der Sehphysiologie wie z.B. den Mechanismus der Phototransduktion und die

anatomischen Verhältnisse beim Säugerauge. Bei den Facettenaugen liegt die Betonung nicht auf den Insekten.

SCHMIDT/THEWS: Einführung in die Physiologie des Menschen, Springer. -- Erläutert ausführlich die Prinzipien der Sehphysiologie wie z.B. den Mechanismus der Phototransduktion und die anatomischen und physiologischen Verhältnisse beim Säugerauge. Leider ohne vergleichende tierphysiologische Aspekte.

Weiterhin empfehlenswert:

NACHTIGALL: Zoophysiologischer Grundkurs, Verlag Chemie

KIRSCHFELD K: (1971) Aufnahmen und Verarbeitung optischer Daten im Komplexauge der Insekten. Naturwissenschaften 58: 201-209. - neuronales Superpositionsauge.

HANDWERKSZEUG

Transparentpapier, Schreibzeug, Geodreieck und Protokollheft.
Zur Auswertung wird ein Taschenrechner benötigt.

VERSUCHE

Die Leistungsfähigkeit des optischen Systems eines Organismus wird durch sein räumliches Auflösungsvermögen, sein zeitliches Auflösungsvermögen, seine spektrale Empfindlichkeit und seine absolute Lichtempfindlichkeit beschrieben. Diese Eigenschaften sollen am Fliegenauge nachgeprüft werden und, falls möglich, mit dem menschlichen Auge verglichen werden.

1. Räumliches Auflösungsvermögen

Wie exakt und feinkörnig das Bild der Umwelt von einem Wirbeltier wahrgenommen wird, hängt von der Größe der rezeptiven Felder und der Dichte der Rezeptoren in der Retina ab, da die Umwelt kontinuierlich auf die Retina abgebildet wird. Das räumliche Auflösungsvermögen eines Komplexauges wird im wesentlichen von zwei Parametern bestimmt: dem physiologischen Öffnungswinkel, der die Richtungsempfindlichkeit des Rezeptors wiedergibt (er kann nur durch komplizierte intrazelluläre Ableittechnik aus einem Photorezeptor oder durch Verhaltensexperimente bestimmt werden), und dem Divergenzwinkel, der die optischen Achsen benachbarter Ommatidien einschließen (er kann aus der Anatomie des Komplexauges ermittelt werden).

Achtung: Der klassische Versuchsaufbau wurde weiter modernisiert, die Diaprojektoren wurden durch sehr helle Leuchtdioden ersetzt. Eine detaillierte Einweisung in die neue Apparatur wird vom Kursassistenten durchgeführt.

Messung des räumlichen Auflösungsvermögens

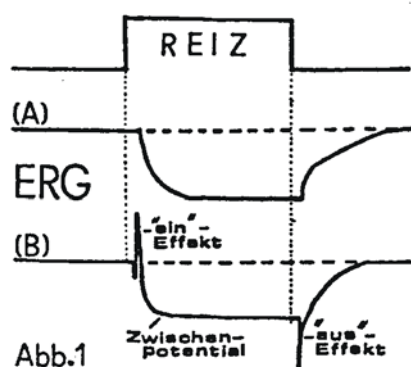
Die Horizontalschnitte (Fotos) von zwei Insektenaugen werden zur Verfügung gestellt:

- Wachsmotte (hell- und dunkeladaptiert)
- Kaisermantel

- Um welche Augentypen handelt es sich?
- Identifizieren Sie die wichtigsten Teile des Insektenauges und der angrenzenden Gehirnteile. Zeichnen Sie den Verlauf der Ommatidien mit dem Lineal auf transparentem Papier nach, und verlängern Sie die Linien zu einem Schnittpunkt.
- Bestimmen Sie den Divergenzwinkel der beiden Augenpräparate durch Auswertung und Mittelwertbildung von 5 benachbarten Ommatidien.
- Berechnen Sie für das Auflösungsvermögen von Mensch, Wachsmotte und Kaisermantel, welcher Abstand zwischen zwei Punkten in 1 m Entfernung nötig ist, damit diese gerade noch getrennt wahrgenommen werden können.

2. Das Elektoretinogramm (ERG) der Fliege

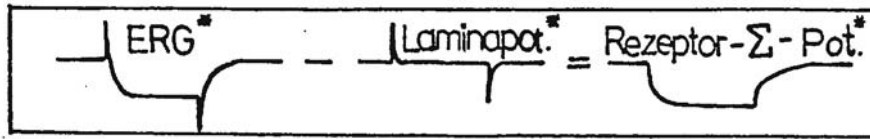
Belichtet man das Auge von Wirbeltieren oder Wirbellosen, so treten infolge der durch den Transduktionsprozeß ausgelösten Membranprozesse Potentialschwankungen im Auge auf. Die Summenpotentiale der gesamten elektrischen Aktivität des Auges kann man mit geeigneten Elektroden als Potentialdifferenz zwischen Auge und Körpermilieu ableiten. Die Potentiale haben z.T. komplizierte Kurvenverläufe, die bis heute nicht endgültig geklärt werden können (vgl. Summenableitungen EKG, EEG), die aber eine einfache Methode darstellen, um quantifizierbare Aussagen über Erregungsvorgänge in den Photorezeptoren zu machen. Die ERG-Kurve der Insekten ist z.B. stark von den Ableitbedingungen abhängig (Alter des Präparats, Lage der Ableitelektrode, Elektrodenmaterial, Eingangswiderstand des Verstärkers etc.).



Während man bei "langsamen" Insekten (Bsp. Heuschrecken, Schaben) tendenziell eher monophasische Potentialverläufe (Abb. 1A) feststellen kann, sind bei schnellfliegenden Formen, zu denen die Schmeißfliege *Calliphora* zählt, diphasische Potentialverläufe (Abb. 1B) charakteristisch.

In dieser Form des diphasischen ERG's spiegelt sich sowohl die summierte Aktivität der Rezeptoren (Depolarisation) als auch die Summenaktivität nachgeschalteter neuronaler Elemente, hauptsächlich vom 1. optischen Ganglion (*Lamina ganglionaris*) wieder. Die Antwort der

Laminaneurone ist ähnlich graduiert von der Reizintensität abhängig wie das Rezeptorpotential (keine Aktionspotentiale!). Die jeweiligen Anteile dieser beiden Strukturen an der Form des ERG lassen sich durch eine Betäubung der Erregungsübertragen in die Lamina darstellen.



- Bei allen abgeleiteten Potentialen handelt es sich um Summenpotentiale, die extrazellulär abgeleitet werden.

VERSUCHSAUFBAU

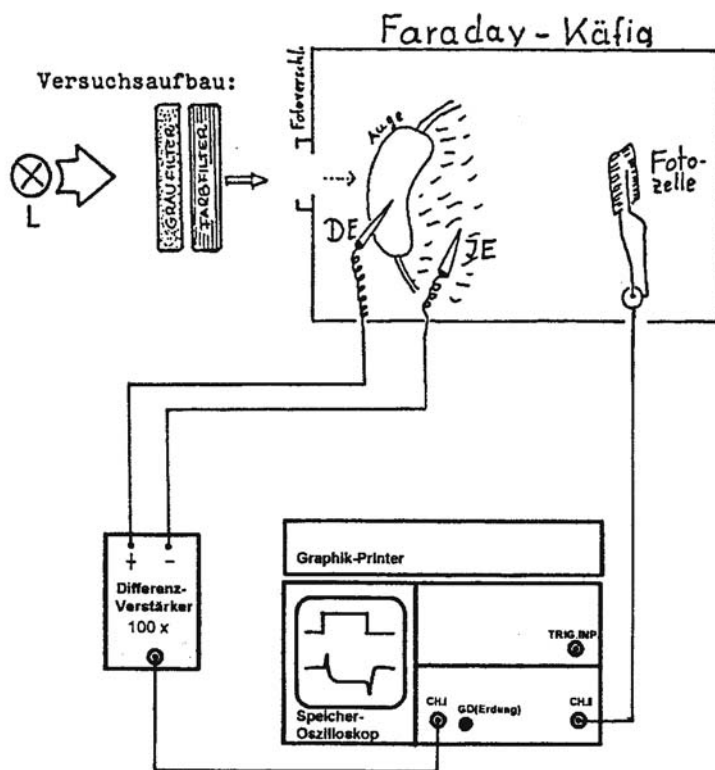
Bevor Sie die Fliege narkotisieren, machen Sie sich mit dem Versuchsaufbau vertraut. Zur Abdunkelung des Objekts und zur Abschirmung gegenüber elektrischen Störfeldern wird ein Kasten als Faraday-Käfig über die Apparatur geklappt. Im Faraday-Käfig ist eine Lichtquelle integriert, deren Lichtintensität und Farbe stufenweise eingestellt werden können. Die Belichtungszeit und Frequenz sind ebenfalls am Faraday-Käfig einstellbar. Der Reizverlauf wird über eine Photozelle am Oszilloskopschirm und Schreiber registriert. Differente (DE) und indifferente (IE) Elektrode sind mit den Eingängen des Differenzverstärkers verbunden.

Methode:

Die Fliege wird kurz mit Äther oder CO₂ narkotisiert (Achtung: weißäugige Fliegen sind besonders empfindlich!). Sobald das Tier ruhig liegt, wird es mit Doppelklebeband auf einem Objektträger befestigt. Mit einigen Tropfen Sekundenkleber in der Nähe der Beine, Flügel, Rüssel fixiert man Körper und Kopf des Tieres. Das Fliegenauge soll so gut wie möglich zum einfallenden Licht und zur differenten Elektrode exponiert sein. Die Fliege darf sich nach der Fixierung nicht bewegen.

Unter dem Binokular wird die indifferente Elektrode nun in den Thorax oder das Abdomen gestochen. Die Ableitelektrode (Silberdraht) wird einjustiert und behutsam durch Drehen des Mikrometerrades auf die Corneaoberfläche aufgelegt. Ein kleiner Tropfen Elektrodenpaste verbessert den elektrischen Kontakt zwischen Elektrode und Auge. Durch Lichtreizung wird die Funktionsfähigkeit von Photozelle, Fliegenauge und Ableitvorrichtung geprüft; der Faraday-Käfig wird über die Apparatur geklappt. Belichtungsdauer auf 1/2 sec stellen.

Das Auge wird mit weißem Licht einer Intensität, die für das Fliegenauge angenehm ist, mehrmals gereizt. Registrieren Sie die Potentialform mit dem Schreiber. Eine gute Registrierung ausschneiden, mit Koordinaten und Messdaten versehen und in das Protokoll einkleben. Beschreiben Sie den Potentialverlauf, und bezeichnen Sie die verschiedenen Potentialkomponenten (Ein-Effekt...). Bitte bei allen Messungen Tierart (evtl. Mutante), Intensität, Belichtungszeit und Achsenskalierung angeben!



3. Reaktions-Intensitäts-Kennlinie (RI)

Das dunkel adaptierte Fliegenauge (ca 2 min.) wird mit Lichtreizen (1/2 sec) verschiedener Intensität gereizt. Zwischen zwei aufeinander folgenden Reizen sollte mindestens die Zeit von 1 Minute liegen, um Adaptationseffekte gering zu halten.

Es liegen 11 bzw. 12 verschiedene Reizintensitäten zur Verfügung, die auf der Apparatur vermerkt sind. Das Reizlicht wird, mit der geringsten Intensität beginnend, stufenweise bis zur maximalen Intensität

Insgesamt werden 3 Potentiale mit dem Speicheroszilloskop und Schreiber registriert und in das Protokoll eingeklebt (Reizstufe 1 oder 2; Reizstufe 6 oder 7 und Reizstufe 12).

Tragen Sie die Amplituden des Zwischenpotentials in einer halblogarithmischen Darstellung gegen die Intensität des Lichtes auf.

Ordinate: ERG-Amplitude in mV (linear)
Abszisse: log. der rel. Reiz-Intensität (Maximalreiz = 1)

Da in diesem Versuchsteil nur der grundsätzliche Verlauf der Kennlinie von Bedeutung ist, genügt es hier (im Gegensatz zum folgenden Versuch), statt der absoluten Lichtintensität nur die *relative Reizstärke* zu verwenden.

Diskutieren Sie den Kurvenverlauf und die allgemeine biologische Bedeutung von logarithmischen Kennlinien.

4. Spektralempfindlichkeit der Fliegenrezeptoren

Die Absorptionseigenschaften des dioptrischen Apparates und des Photopigments (bzw. mehrerer Sehfärbstoffe) in den Rezeptoren bestimmen die spektrale Empfindlichkeit des Auges. Der Mensch hat im normal helladaptierten Zustand eine Spektralempfindlichkeit von ca 400 nm bis 750 nm mit einem Maximum bei 550 nm. Bei Arthropoden ist der sichtbare Teil des Spektrums weit in den kurzwelligeren Bereich verschoben (z.B. Biene: 300 nm bis 650 nm). Sie können also UV wahrnehmen und sind im längerwelligen Licht blind! Dennoch reicht das sichtbare Spektrum bei *Calliphora erythrocephala* bis etwa 730 nm.

Methode:

Die Potentialamplitude (Zwischenpotential) des ERG's wird bei verschiedenen Wellenlängen (und verschiedenen Intensitäten) bestimmt. Da mehrere Reizparameter geändert werden, müssen Sie für diesen Versuchsteil die *absolute Beleuchtungsstärke* verwenden. Folgende Wellenlängen stehen zur Verfügung.

Wellenlänge [nm]

380 (UV)	420 (violett)	461 (blau)	
515 (grün)	540 (grün-gelb)	575 (gelb)	621 (rot)

Die Lichtintensitäten können für jede Farbe stufenweise verändert werden. Messen Sie für jede Farbe die Zwischenpotentialamplitude des ERG's am Oszilloskop bei 3 verschiedenen Reizintensitäten. Achten Sie bei der Wahl der Intensitäten auf ähnliche Bereiche für alle verwendeten Farben um später eine geeignete Auftragung der Kennlinien vornehmen zu können. Notieren Sie die Werte in einer Tabelle.

Auswertung:

Tragen Sie für jede Wellenlänge die Zwischenpotentialamplituden (mV) als Funktion der Lichtintensität (Leuchtstärke aus der Tabelle) in ein Diagramm ein (halblogarithmische Darstellung). Für jede Wellenlänge erhält man also eine Kennlinie.

Aus diesen Diagrammen ermitteln Sie dann für die einzelnen Farben die Lichtintensitäten, die zur selben Zwischenpotentialamplitude (z.B. 1 mV, 2 mV, 3 mV) führen. Tragen Sie diese Werte in ein weiteres Diagramm (log Reizintensität gegen Wellenlänge) ein. Aus den so erhaltenen Isopotentialkurven ergibt sich die Farbempfindlichkeit des Tieres.

Vergleichen Sie die Kurve mit der Farbempfindlichkeit des Menschen. Was versteht man unter „Farbkonstanz“ (siehe Powerpointpräsentation „Würfel“)?

5. Verschmelzungsfrequenz bei verschiedenen Lichtintensitäten

Zu diesem Versuch wird eine externe Lichtquelle in den Faraday-Käfig direkt vor der Fliege positioniert, deren Lichtintensität und Flickerfrequenz stufenlos einstellbar sind

a) Verschmelzungsfrequenz der Fliege

Mit dem Potentiometerknopf am Netzgerät wird die Reizwiederholrate solange erhöht, bis auf dem Oszilloskop keine Antwort aus dem Fliegenauge mehr registriert wird. Das Oszilloskop wird mit dem Signal der Photozelle getriggert. Wie verändern sich Amplitude und Potentialverlauf bei steigender Frequenz? Die Verschmelzungsfrequenz ist bei 2 oder 3 Lichtintensitäten zu bestimmen. Welche Tendenz ergibt sich?

b) Verschmelzungsfrequenz des Menschen

Die externe Lichtquelle wird in etwa 1m Entfernung vor einem Probanden positioniert, der die Lichtquelle zunächst fixieren soll. . Bestimmen Sie die Verschmelzungsfrequenz für Ihren optischen Sinn bei denselben Lichtintensitäten, die Sie auch bei der Calliphora verwendet haben. Vergleichen Sie den Wert mit dem bei der Fliege gefundenen.

c) Verschmelzungsfrequenz des Menschen in verschiedenen Bereichen des Gesichtsfeldes

Bestimmen Sie Ihre Verschmelzungsfrequenz an mindestens zwei Stellen ihres Gesichtsfelds, an der Stelle des schärfsten Sehens, in der Fovea centralis und im peripheren Gesichtsfeld. Ist diese Frequenz unabhängig vom Ort? Falls nicht, welche Schlüsse können daraus gezogen werden?

6. Blockade der synaptischen Verbindungen zwischen Lamina und Rezeptor (Wahlaufgabe)

Um das eigentliche Rezeptorpotential sichtbar zu machen, wird der Fliege ein Tropfen 2%-ige Procainlösung mit Hilfe einer Injektionskanüle in die hintere Kopfkapselwand appliziert. Von dort diffundiert die Lösung zu den optischen Ganglien.

Registrieren sie die Veränderungen des ERG's; die endgültige Form bitte ins Protokoll einkleben. Erklären Sie die Vorgänge anhand der eingangs gegebenen Erläuterungen. Reizdauer: 1/2 sec

7. Latenzzeit des Rezeptorsummenpotentials beim procainbehandelten Präparat (Wahlaufgabe)

Bestimmen Sie für folgende Reizbedingung die Latenzzeit des Rezeptorpotentials. Verwenden Sie für diese Messung die angegebenen Einstellungen am Oszilloskop.

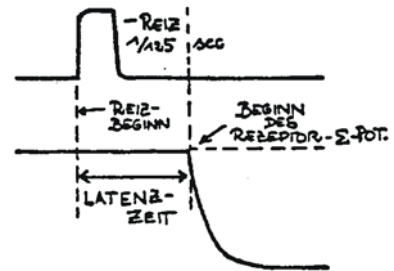
Belichtungszeit: 1/125 sec

Trigger: auf Signal Photozelle

Zeitbasis: 2 - 5 msec/Div

Speicher (store): ein

single sweep: ein



a) Intensitätsabhängigkeit:

Bestimmen Sie die Latenzzeit bei Weißlicht verschiedener Intensitäten.

b) Farbabhängigkeit:

Untersuchen Sie die Latenzzeit für violett (420 nm) und rot (621 nm). Wählen Sie zum Rotfilter passende Lichtintensitäten aus, so dass die Signalamplituden für beide Farben gleich sind.

ERFOLGSKONTROLLE

Nach diesem Praktikumsteil sollten Sie in der Lage sein:

- zu beschreiben, welche Eigenschaften das Rezeptorpotential kennzeichnet, wie es sich vom Aktionspotential unterscheidet,
- die Beziehung zwischen Reiz, Rezeptorpotential und Impulsfolgefrequenz wiederzugeben,
- den Entstehungsmechanismus des diphasischen Fliegen-ERG's zu erläutern und anzugeben, welche Komponenten daran beteiligt sind,
- eine Möglichkeit anzugeben, die Komponenten des ERG's zu trennen, um das Rezeptorsummenpotential darzustellen,
- zu erläutern, was man unter der Kennlinie eines Rezeptors versteht und einige verschiedene Kennlinienverläufe anzugeben,
- die Unterschiede in der Spektralempfindlichkeit zwischen Insekten und Menschen aufzuzeigen (und ihre Ursachen zu nennen),
- das ungefähre zeitliche Auflösungsvermögen von menschlichem Auge und Fliegenauge zu nennen und anzugeben, wie es sich bei geringerer oder größerer Beleuchtungsstärke verhält,
- den prinzipielle Aufbau vom menschlichem Auge und vom Insektenauge darzustellen und die Funktion der einzelnen Komponenten zu erläutern,
- (das Verhalten der Latenzzeit des Rezeptorpotentials bei verschiedenen Intensitäten sowie bei Rot- und Blaulichtreizung wiederzugeben).