

Methodenpraktikum der Neurobiologie

Intrazelluläre Registrierung elektrischer Potentiale

1. Einleitung

Zur Registrierung der elektrischen Aktivität von Nervenzellen und Muskelfasern werden in der Forschung eine Vielzahl von Methoden verwendet. Zur direkten Messung elektrischer Vorgänge werden im Groben zwei Methoden hinsichtlich ihres Ableitortes unterschieden: i) intrazelluläre und ii) extrazelluläre Ableitungen. Extrazelluläre Ableitungen (Registrierungen) stellen eine relativ einfache und effektive Methode zur Messung elektrischer Aktivität dar. Hierzu wird im Praktikumsteil 'Registrierung elektrischer Aktivität durch extrazelluläre Ableitungen' näher eingegangen. Im Gegensatz zu extrazellulären Ableitungen können mit intrazellulären Ableitungen transmembrane Spannungen gemessen werden. Intrazelluläre Ableitungen sind zwar methodisch aufwendig, besitzen aber den Vorteil, dass die Elektrode direkt in die zu untersuchenden zellulären Strukturen eindringt. Dadurch können die Mechanismen der Potentialerzeugung direkt gemessen werden und Membranpotential sowie beteiligte (Ionen-)Ströme gemessen und auch beeinflusst werden. Somit kann direkt in die Verarbeitung neuronaler Impulse eingegriffen werden und eine Untersuchung der Konnektivität eines neuronalen Netzwerks wird (durch den zusätzlichen Einsatz von extrazellulären oder weiteren intrazellulären Ableitungen) ermöglicht.

2. Methodik

2.1. Biophysikalische Grundlagen

Die Grundlagen der Bioelektrizität beruhen auf der Wanderung elektrischer Ladungen durch die Zellmembran. Neurone weisen zwischen den beiden Seiten der Plasmamembran eine Potentialdifferenz auf, die gemessen werden kann, indem man eine feine Mikroelektrode in die Nervenzelle einsticht und das dort gemessene Potential auf das Potential einer Referenzelektrode im extrazellulären Medium bezieht. Wenn die Zelle sich in Ruhe befindet, dann nennt man das gemessene Potential 'Ruhepotential'. Es beruht auf der asymmetrisch verteilten Ionenkonzentration auf den beiden Seiten der Zellmembran und der selektiven Permeabilität der Zellmembran für verschiedene Ionentypen. Vereinfacht dargestellt schaffen Ionenpumpen in der Zellmembran eine hohe Kaliumkonzentration im Zellinneren, und eine hohe Natriumkonzentration außen. Da die Zellmembran selektiv permeabel für Kaliumionen ist, wird Kalium zum Zelläußeren diffundieren und somit positive Ladung aus der Zelle schaffen. Da die Zellmembran natriumimpermeabel ist, kann kein ausgleichender Natriumstrom ins Zellinnere stattfinden. Es entsteht im Zellinneren ein negatives Ruhepotential.

Das Membranpotential einer Zelle kann aus der Goldman-Gleichung errechnet werden (vereinfacht auf 3 Ionentypen):

$$V_m = -58mV * \log\left(\frac{PK[K^+]_o + PNa[Na^+]_o + PCl[Cl^-]_i}{PK[K^+]_i + PNa[Na^+]_i + PCl[Cl^-]_o}\right)$$

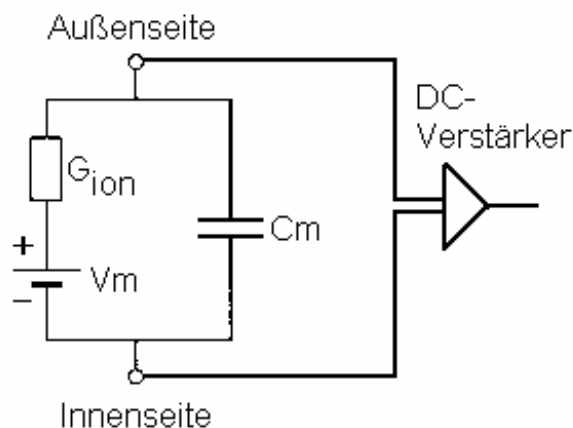
P stellen dabei die Gesamtpermeabilitäten der jeweiligen Ionen dar. o = außen, i = innen.

Vereinfacht auf eine Ionenart erhält man die Nernstgleichung, die das Gleichgewichtspotential (E_{Ion}) dieses Ions angibt, also das Membranpotential, welches erreicht wird, wenn nur Ionen dieser Art fließen (d.h. dort fließt kein Nettostrom).

$$V_m = E_{\text{ion}} = -58\text{mV} * \log\left(\frac{[\text{ion}]_o}{[\text{ion}]_i}\right)$$

Das Membranpotential ändert sich entweder durch die Öffnung spannungsgesteuerter (z.B. Aktionspotential) oder ligantengesteuerter (z.B. chemische Synapse) Ionenkanäle oder durch eine elektrische Kopplung mit Nachbarzellen (gap junctions). Zusätzlich kann das Membranpotential durch eine Strominjektion durch die intrazelluläre Elektrode verändert werden.

Als Ersatzschaltbild für die Potentialgenerierung und intrazelluläre Ableitung eines Neurons dient die folgende Abbildung. Quer über die Membran bildet sich ein Widerstand (Ionen können nur begrenzt die Membran passieren), der parallel zu einer Kapazität (der 'Trennung von Ladungen über der Membran) liegt. Auf der 'Innenseite' findet sich die Spannungsquelle (das Membranpotential), und gemessen wird die 'Innenseite' im Verhältnis zur 'Außenseite'.



Da alle Signale DC verstärkt werden (also gleichspannungsverstärkt), können im Gegensatz zur extrazellulären Ableitung auch Ruhepotentiale und sich langsam verändernde Signale gemessen werden.

Mit intrazellulären Ableitungen lassen sich die verschiedenen elektrischen Vorgänge innerhalb von Neuronen darstellen, z.B. graduierte Potentiale (z.B. postsynaptische Potentiale) oder auch alles-oder-nichts Ereignisse (Aktionspotentiale). Während sich mit extrazellulären Ableitungen nur feststellen lässt, dass ein Ereignis aufgetreten ist, kann mit intrazellulären Ableitungen der Verlauf dieser Ereignisse beobachtet werden.

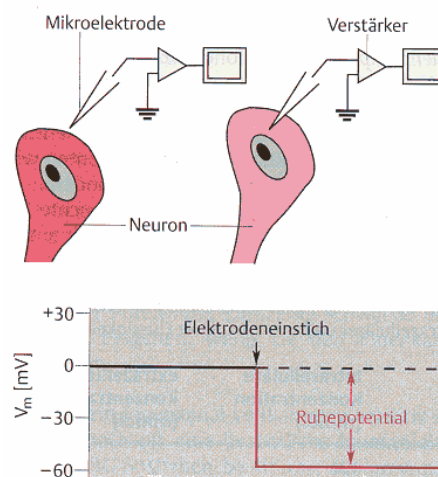


Intrazelluläre Ableitung eines gastrischen Motoneurons (MG)

2.2 Die Messkomponenten und Messanordnung

2.2.1 Elektroden und Messanordnung

So gut wie alle intrazellulären Elektroden, die in der Praxis eingesetzt werden, sind Glasmikroelektroden. Sie werden produziert, indem dünne Glaskapillaren erhitzt und ausgezogen werden, so dass eine sehr feine Spitze entsteht (im μm Bereich). Diese Elektrode wird dann mit einem Elektrolyten gefüllt und in die Nervenzelle eingestochen. Der Elektrolyt stellt den elektrischen Kontakt zum Zellinneren her und hat ebenfalls Kontakt zu einem Draht am entgegengesetzten Ende der Elektrode, der wiederum mit einem Verstärker verbunden ist. Somit hat der Verstärker auch Zugriff auf das Zellinnere, und die elektrische Aktivität der Zelle kann gemessen und beeinflusst werden.



aus: *Neurobiologie*, H. Reichert, Thieme Verlag

Da die Elektrode selbst, und auch der Draht und der Elektrolyt Widerstände und Kapazitäten darstellen, muss der Verstärker gewissen Bedingungen genügen, um diese Phänomene zu kompensieren, da diese die Messung verfälschen können. Unter anderem sind sehr hochohmiger Verstärkerköpfe mit hohen Verstärkungen nötig, die sehr empfindlich auf Entladungen reagieren. **Verstärkerköpfe dürfen niemals ohne Erdung angefasst werden, da diese sonst zerstört werden können!**

Die elektrischen Signale werden gegen eine indifferente Elektrode, die Referenzelektrode, gemessen, die sich im extrazellulären Medium befindet. Üblicherweise wird hierzu ein chlorierter Silberdraht verwendet.

2.2.2 Signalverstärkung und Filterung

Die gemessenen Signale liegen in der Regel im mV Bereich und müssen gleichspannungsverstärkt werden. Der Gleichspannungsverstärker (DC-Verstärker) besitzt eine Reihe von Funktionen, u.a. Filter, um die gemessenen Signale besser gegen elektrische Artefakte (BigFM, Handys, andere el. Geräte) abzuheben. Z.B. können sehr hochfrequente Signale (Radio) mit Tiefpassfiltern ausgeblendet werden, und 50Hz Netzbrumm durch einen 50Hz Bandpassfilter.



Intrazellulärverstärker NPI SEC

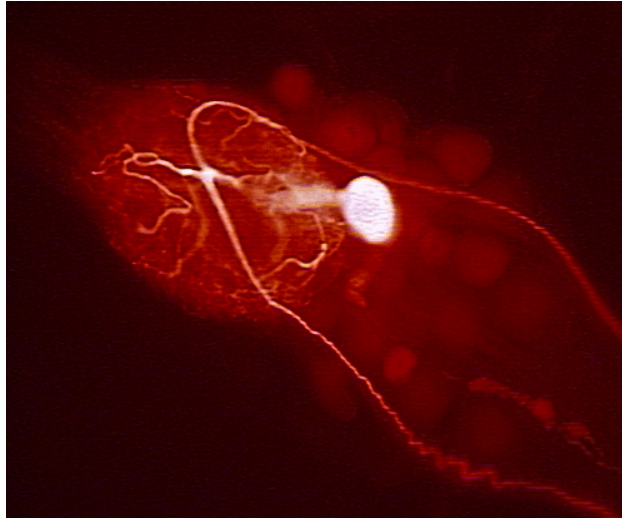
3. Versuche

Der Versuch wird am isolierten stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses durchgeführt. Invertebraten, insbesondere Insekten und Krustaceen, sind in der wissenschaftlichen Praxis als Modellsysteme etabliert.

Es werden Ihnen intrazelluläre Ableitungen aus den Somata der Motoneurone des pylorischen und gastrischen Netzwerkes, welches den Kaumagen des Krebses ansteuert, demonstriert. Diese Netzwerke produzieren rhythmische neuronale Aktivität und stellen eines der best untersuchtesten Systeme für zentrale Mustergeneratoren dar. Die Ergebnisse solcher Versuche tragen zum tieferen Verständnis darüber bei, wie das Nervensystem Verhalten produziert. Die Mechanismen, die an Invertebratensystem gefunden werden, lassen sich im Generellen auf alle Nervensystem, also auch das der Säugetiere, verallgemeinern. Der Vorteil dieser relativ kleinen Netzwerke (hier: 26 Zellen) liegt im einfachen Zugriff und der Überschaubarkeit des Systems.

Zusammen mit extrazellulären Ableitungen der motorischen Nerven, die die Axone der verschiedenen Motoneuronen enthält, wird Ihnen demonstriert, wie man Aussagen über die Konnektivität der Neurone und die Mechanismen der Rhythmus erzeugung treffen kann. Dies wird im Fortgeschrittenenpraktikum 'Intrazelluläre Ableitungen am stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses' vertieft. Dort besteht die Möglichkeit an aktuellen Forschungsprojekten teilzuhaben.

Zusätzlich werden Sie intrazelluläre Färbungen der Motoneurone vornehmen. Dazu wird ein Fluoreszenzfarbstoff (Lucifer Yellow oder Neurobiotin) iontophoretisch in die Zellen injiziert.



Intrazellulär gefärbtes pylorisches Neuron (VD). Neurobiotin Füllung.

4. Aufzeichnung der Signale und Auswertung der Daten

Die gewonnenen Daten werden mittels eines analog/digital Wandlers auf einem Computer aufgezeichnet. Zusätzlich können kurze Sequenzen auf einem Schreiber ausgedruckt werden. Mit Hilfe der Software können z.B. Laufzeiten oder Korrelationen zwischen Ereignissen wie Aktionspotentialen intra- und extrazellulär gemessen werden.

Im Rahmen dieses Versuches werden Sie Rhythmen in verschiedenen Zuständen aufzeichnen. Die Rhythmen werden durch modulatorische Pharmaka verändert werden. Zeichnen Sie diese Veränderungen auf und protokollieren Sie diese für den Praktikumsteil 'Statistische Methoden'. Nehmen Sie hierzu jeweils mindestens 10 Messpunkte von folgenden Ereignissen auf:

1. Periode des pylorischen Rhythmus in zwei verschiedenen modulatorischen Zuständen.
2. Der pylorische Rhythmus ist ein dreiphasischer Rhythmus. Messen Sie die Phasenlage und den 'duty cycle' (prozentualer Anteil der Aktivität dieses Neurons an einer Periode) zweier Neurone im Verhältnis zum dritten Neuron. Zeichnen Sie ein Phasendiagramm.
3. Messen Sie die Dauer des Burstes eines Neurons (z.B. LP).
5. Behalten Sie in jedem Falle eine Originalableitung der vorherigen Aufgaben und fügen Sie diese dem Protokoll bei.



Erstellen sie ein knappes, aber prägnantes Protokoll der Versuche. Nutzen Sie dazu auch die unten angefügte Tabelle. Das **Protokoll** sollte folgende Abschnitte enthalten:

1. Einleitung

2. Material und Methoden

Versuchstiere, Präparation, Versuchsaufbau (Schema, mit Ableitelektroden, Verstärkern, digitale Aufnahme der Daten)

Was wurde gemacht.

Was wurde wie ausgewertet.

3. Ergebnisse

Die wesentlichen Ergebnisse müssen dargestellt werden und evtl. mit Abbildungen versehen werden.

4. Diskussion

Vergleich der Ergebnisse mit Literatur.

Welche möglichen (methodischen) Fehler traten auf.

Welche Schlüsse können aus den gewonnenen Ergebnissen gezogen werden.

5. Vorbereitung

Informieren Sie sich bitte zusätzlich zur allgemeinen Neurobiologie über folgende Themen:

- Ruhepotential / Membranpotential
- Aktionspotential
- EPSP / IPSP
- gradierte Potentiale
- synaptische Übertragung
- Ionenströme
- Membranaufbau und elektrische Eigenschaften (Nernst- und Goldmangleichungen sollten im Groben verstanden sein)
- intrazelluläre Ableittechniken.
- Link zum Download dieses Skripts und anderer Information:
<http://www.neurobiologie.de/student/>

6. Kontakt & Copyright

Dr. Wolfgang Stein
Institut für Neurobiologie
89069 Ulm
wstein@neurobiologie.de

M25/5111
Universität Ulm
0731/50 22636
www.neurobiologie.de

Tabelle zum Ausfüllen während des Versuchs.

1. Kontrolle (Normalringer)

	Periode des pyl. Rhythmus	Phasenende PD	Phasenanstang LP	Phasenende LP	Burstdauer Neuron:
1. Messung					
2. Messung					
3. Messung					
4. Messung					
5. Messung					
6. Messung					
7. Messung					
8. Messung					
9. Messung					
10. Messung					
Mittelwert					
Standardabweichung					

Mittlerer Duty Cycle

2. Modulatorisch veränderter Zustand

	Periode des pyl. Rhythmus	Phasenende PD	Phasenanstang LP	Phasenende LP	Burstdauer Neuron:
1. Messung					
2. Messung					
3. Messung					
4. Messung					
5. Messung					
6. Messung					
7. Messung					
8. Messung					
9. Messung					
10. Messung					
Mittelwert					
Standardabweichung					

Mittlerer Duty Cycle

Benutzen Sie zur Berechnung der Periode [s], der Phasenlage [%] bzw. des Duty-Cycles [%] den Beginn der Aktivität des PD Neurons als Referenz.