

Protokoll Intrazelluläre Ableitung

Von

Siegfried Bolek, Cornelia Müller

Zum Modul Neurobiologie III/IV

Wintersemester 2005/2006

Inhalt:

Überschrift	Seite
Inhalt	2
Einleitung	3
Material und Methoden	5
Fragestellungen	6
Ergebnisse	6
Diskussion	15
Quellen	16

werden sie von Zellen aus den Kommissuralganglien. Die Zellen im stomatogastrischen Ganglion bilden das pylorische und das gastrische Netzwerk.

Das pylorische Netzwerk generiert den schnellen **pylorische Rhythmus**, der die Bewegungen des pylorischen Filterapparates durch die Abfolge von Aktionspotentialen des PD (Pylorischen-Dilatator)-Motoneuron, LP (Lateralen-Pylorischen)-Motoneuron und PY (Pylorischen-Konstriktor)-Motoneuron steuert. Die dadurch erregten Muskeln erzeugen eine peristaltische Kontraktionswelle, die über den pylorischen Filterapparat läuft. Die Neurone AB und PD dienen als Schrittmacher für das gesamte pylorische Netzwerk.

Der langsamere **gastrische Rhythmus** steuert die Bewegung der Magenzähne, die die Nahrung in der gastrischen Mühle zerkleinern, und wird ohne Schrittmacherzellen generiert. Die Lateralzähne schließen sich zusammen, wenn das LG (Lateral-Gastrische)-Motoneuron und das MG (Mediane Gastrische)-Motoneuron aktiv werden und öffnen sich wieder, wenn das LPG (Lateral Posteriore Gastrische)-Neuron aktiv wird. Kontrolliert wird der Rhythmus vor allem durch Neuromodulatoren, die von bestimmten Projektionsneuronen ausgeschüttet werden und das stomatogastrische Ganglion von den Kommissuralganglien her innervieren. Durch diese Anwendung von verschiedenen Neuromodulatoren ist das System sehr flexibel und kann mehrere Rhythmen erzeugen.

Ein **Projektionsneuron** ist das Neuron **MCN1**, das in den Kommissuralganglien liegt und das das gastrische **Motoneuron LG** mit einer elektrischen und einer chemischen Synapse innerviert, deren Axone über den Nerv ion (inferior oesophageal nerve) laufen. Zusätzlich hat das Motoneuron LG noch eine hemmende Synapse, die die Terminale des MCN1 innerviert (Vgl. Abb. 2).

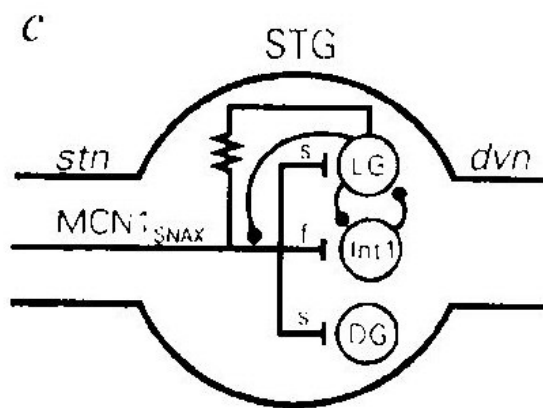


Abb.2: Verschaltung zwischen MCN1 und LG; stn: stomatogastric nerve; STG: Stomatogastrisches Ganglion [Coleman, Meyrand, Nusbaum, 1995]

Die postsynaptischen Potentiale der elektrischen Synapse verändern ihre Amplitude in Abhängigkeit des Membranpotentials des LG-Motoneurons, sind also spannungsabhängig. Mit zunehmender Depolarisation wird die Amplitude des EPSPs größer, mit zunehmender Hyperpolarisation kleiner. In unserem Versuch untersuchten wir diesen ungewöhnlichen Effekt.

Unklar ist, ob die spannungsabhängige Änderung des EPSPs des LG durch eine Veränderung der elektrischen Synapse selbst oder postsynaptisch durch intrinsische Eigenschaften des LG-Motoneurons ausgelöst wird. Um diese Frage zu klären, unternahmen wir an drei isolierten Nervensystemen verschiedene Versuche. Weiter wurden Versuche unternommen, um die intrinsischen Eigenschaften des LG zu untersuchen.

Material und Methoden

Das freipräparierte stomatogastrische Nervensystem des Taschenkrebses *Cancer pagurus* wurde in einer Petrischale auf Sylgard fixiert. Um den Ionenhaushalt aufrecht zu erhalten wurde dauerhaft frische Ringerlösung über das Präparat gespült und dessen Temperatur gemessen. Zur **extrazellulären Ableitung** eines Nervs wurde dieser mit Vaseline gegen die Umgebung isoliert. Die Elektrode in der Vaseline wurde gegen eine Referenzelektrode außerhalb der Vaseline gemessen.

Intrazelluläre Ableitungen wurden mit Kaliumsulfat-gefüllten Glaselektroden durchgeführt, die mit Hilfe eines Mikromanipulators in die Zellen gestochen wurden. Durch eine Strominjektion über diese Elektrode konnte die Zelle zusätzlich hyper- und depolarisiert werden.

Die so gemessenen Ableitungen konnten nach Verstärkung auf einem Oszilloskop und auf einem Computer mit dem Programm Spike2 betrachtet und analysiert werden.

Das **grundsätzliche Verhalten der elektrischen Synapse** wurde analysiert, indem der ion extrazellulär gereizt wurde, um das Projektionsneuron MCN1 zu aktivieren, was einen gastrischen Rhythmus auslöst. Gleichzeitig wurde der LG intracellulär abgeleitet, wobei die Zelle zunehmend hyper- und depolarisiert wurde. Die Amplituden der EPSPs wurden in Abhängigkeit vom Membranpotential gemessen.

Dieser Versuch wurde mit **Normalringer und lowlow-Ca²⁺-Ringer** durchgeführt. Calcium wird von den Nervenzellen zur Transmitterausschüttung benötigt. Da dieses im lowlow-Ca²⁺-Ringer nicht angeboten wird, werden die chemischen Synapsen inaktiviert. Bringt dieser Versuch dieselben Ergebnisse wie mit Normalringer, handelt es sich um einen Nachweis, dass der Effekt von einer elektrischen Synapse ausgeht, die unabhängig von Calcium die Erregung weiterleiten kann.

Um zu testen, ob die spannungsabhängige Änderung der Amplitude des EPSPs des LG durch einen postsynaptischen Effekt, also durch intrinsische Eigenschaften des LG, verursacht wird, wurde direkt in den LG ein künstlicher Puls gegeben (2Hz, depolarisierend). Der Membranpotential-Verlauf von LG wurde also durch Strominjektion so verändert, dass er dem Verlauf während einer MCN1-Reizung entspricht. Dieser Versuch wurde wiederum mit lowlow-Calcium-Ringer durchgeführt.

Zur **weiteren Charakterisierung der intrinsischen Eigenschaften des LG** wurden gemeinsam mit den Praktikumsgruppen aus der Simulation Versuche erstellt, die verschiedene Hypothesen testen sollten. In der ersten Hypothese sollen spannungsabhängige Ionenkanäle, deren Umkehrpotential nahe dem Ruhepotential liegt, bei zunehmender Depolarisation schließen. Die zweite Hypothese besagt, dass spannungsabhängige Ionenkanäle mit einem positiven Umkehrpotential bei zunehmender Depolarisation öffnen. Durch beide Theorien könnte begründet werden, wieso die EPSPs bei zunehmender Depolarisation größer werden. Um die Hypothesen zu testen, wurden in einem weiteren Versuch künstliche Pulse 2Hz hyperpolarisierend gegeben und wiederum die Amplituden in Abhängigkeit vom Membranpotential gemessen. Werden die EPSPs bei zunehmender Depolarisation größer, wäre dies ein Argument für die erste Hypothese, werden sie kleiner, ein Argument für die zweite Hypothese.

In einer zweiten und dritten Versuchsreihe wurden die Versuche vom ersten Versuchstag wiederholt, jedoch diesmal mit einer Discontinuous Current Clamp-Ableitung, mit der das Membranpotential direkt gemessen werden kann. Das Membranpotential wurde durch zunehmende Hyper- und Depolarisation in 5mV-Schritten geändert. Alle Versuche wurden mit Normalringer und lowlow-Ca²⁺-Ringer durchgeführt. Zuletzt wurde jeweils noch die Reversibilität mit Normalringer kontrolliert.

Fragestellungen

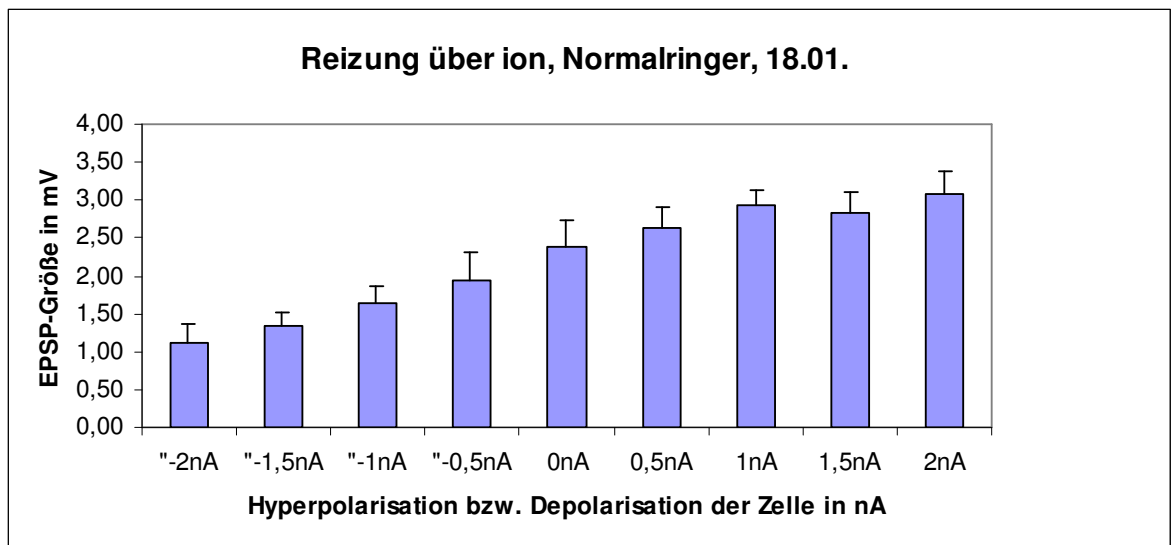
Bei diesem Projekt wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Wodurch zeichnet sich die Verschaltung von MCN1 auf LG aus?
- Ist der Effekt Eigenschaft der Zelle oder der Synapse?
- Wie könnte der Effekt zustande kommen?

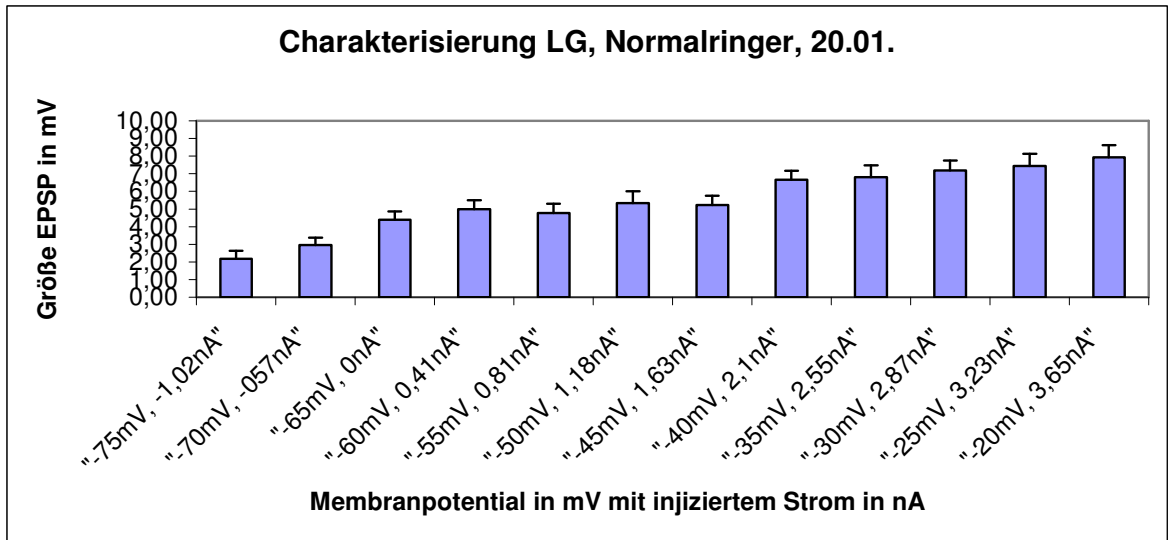
Ergebnisse

Unsere Messungen an der LG-Zelle des Stomatogastrischen Nervensystems (STG) ergaben die in den folgenden Diagrammen, die nach Art der Messung sortiert sind, dargestellten Ergebnisse.

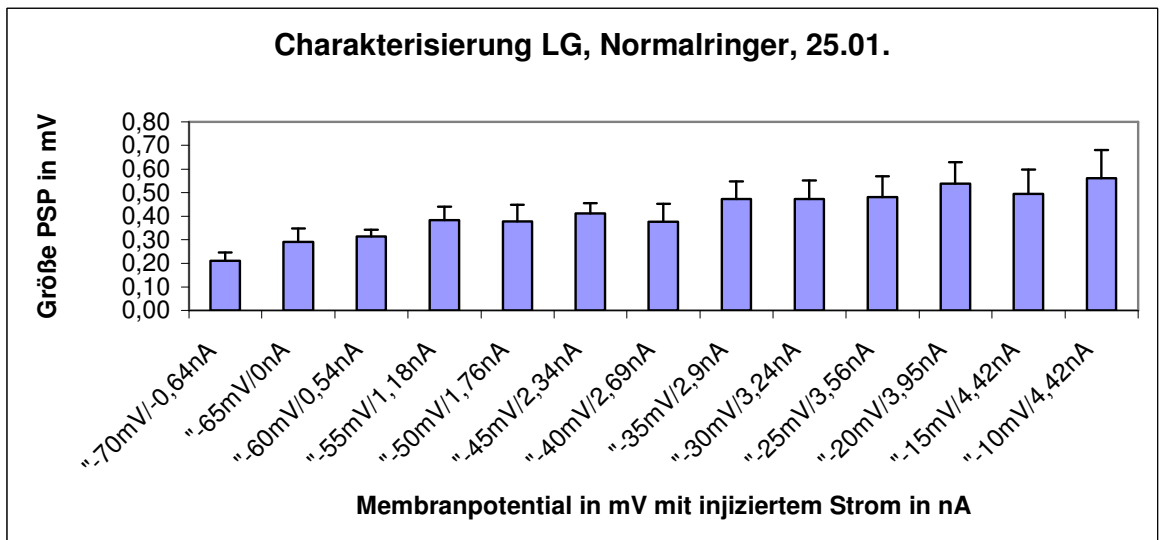
In Diagramm 1 a-c ist die Größe der in LG gemessenen EPSPs zu sehen, die durch eine Reizung über den ion ausgelöst wurden. Während der Messung wurde das Membranpotential der Zelle durch Strom verändert. Anfangs geschah dies in 0,5 nA Stufen von 2 nA hyperpolarisierend bis 2 nA depolarisierend, später wurde das Membranpotential direkt im DCC gemessen und in 5 mV-Schritten verändert. Der t-Test ergab bei allen Messreihen signifikante Unterschiede mit $p < 0,01$ zwischen den Werten bei maximaler Hyperpolarisation, den Werten beim Ruhepotential und den Werten bei maximaler Depolarisation.



Dia.1a: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung des EPSP in der LG-Zelle des STG vom 18.01.06 nach Reizung über den ion bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in Normalringer.

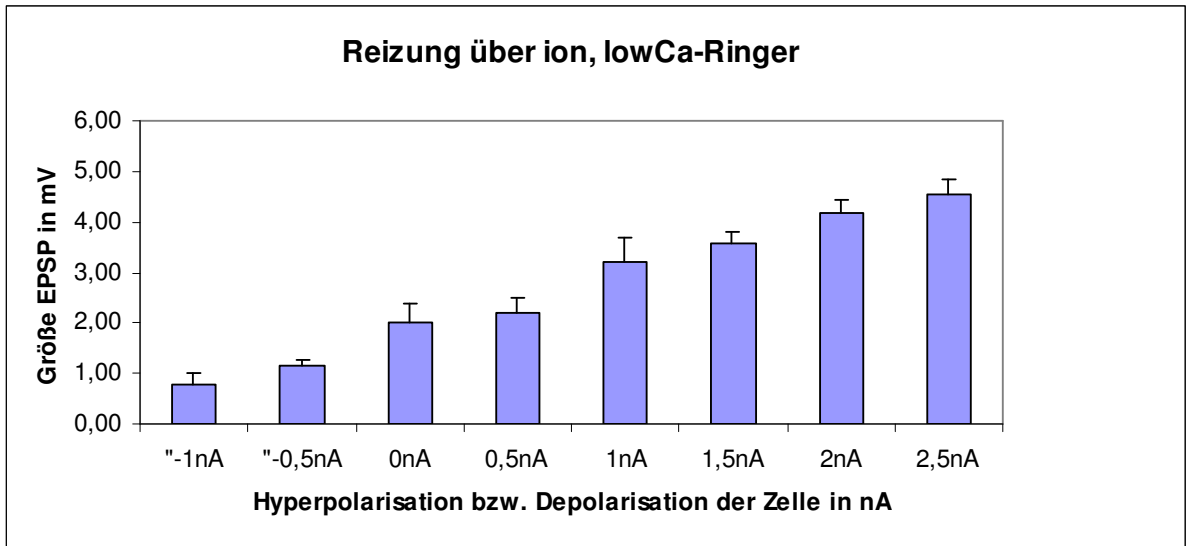


Dia.1b: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung des EPSP in der LG-Zelle des STG vom 20.01.06 nach Reizung über den ion bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in Normalringer.

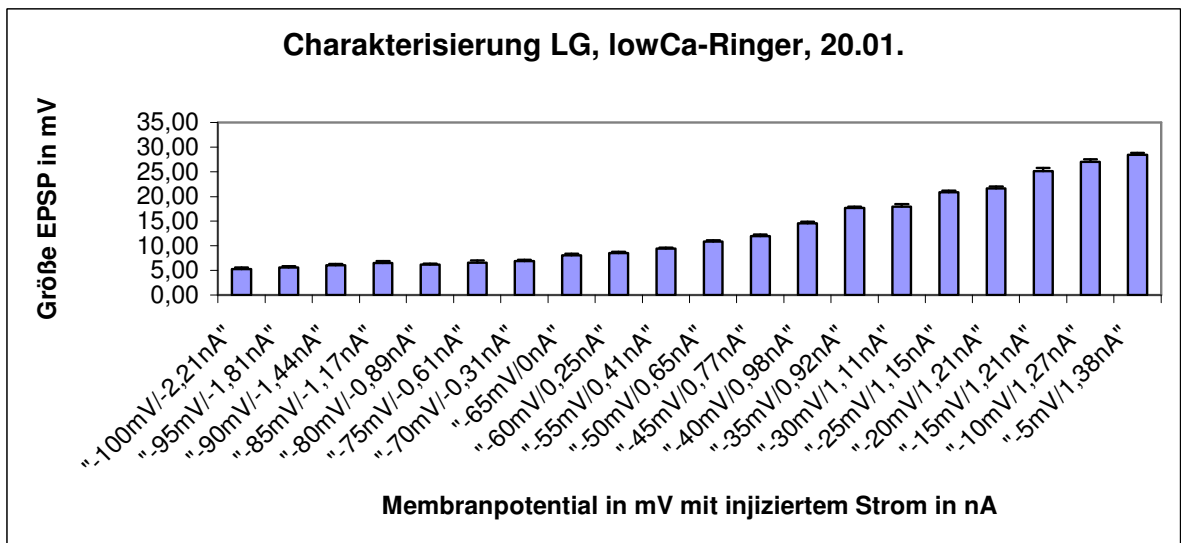


Dia.1c: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung des EPSP in der LG-Zelle des STG vom 25.01.06 nach Reizung über den ion bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in Normalringer.

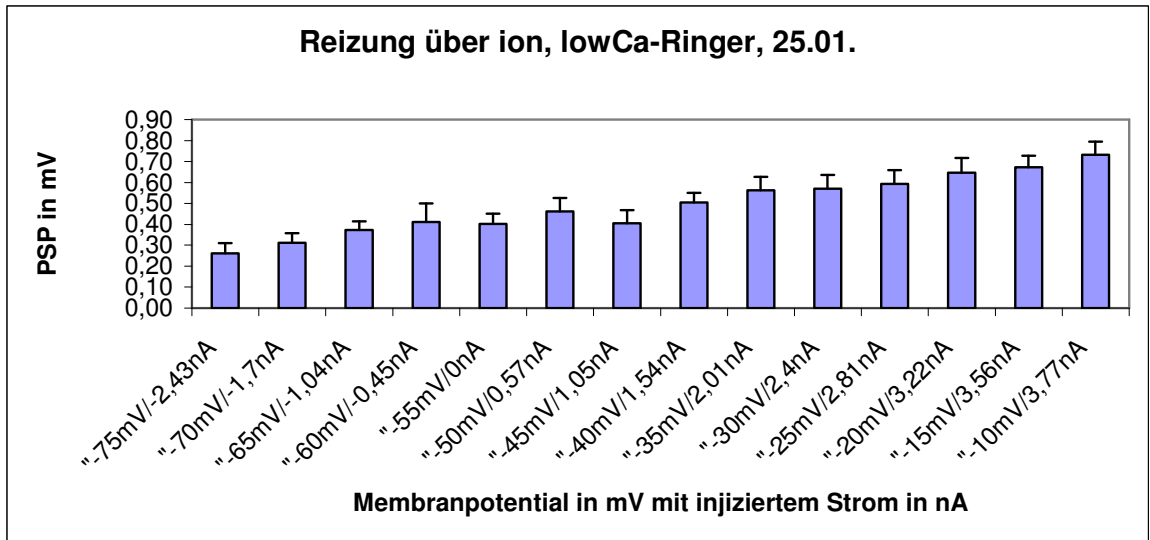
In Diagramm 2 a-c ist wiederum die Größe der EPSPs von LG bei unterschiedlichen Membranpotentialen und Reizung über ion zu sehen, jedoch in lowCa-Ringer. Der t-Test ergab wiederum einen signifikanten Unterschied zwischen den jeweiligen Werten bei maximaler Hyper- und Depolarisation gegenüber den Werten beim Ruhepotential der Zelle ($p < 0,01$).



Dia.2a: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung des EPSP in der LG-Zelle des STG vom 18.01.06 nach Reizung über den ion bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in lowCa-Ringer.

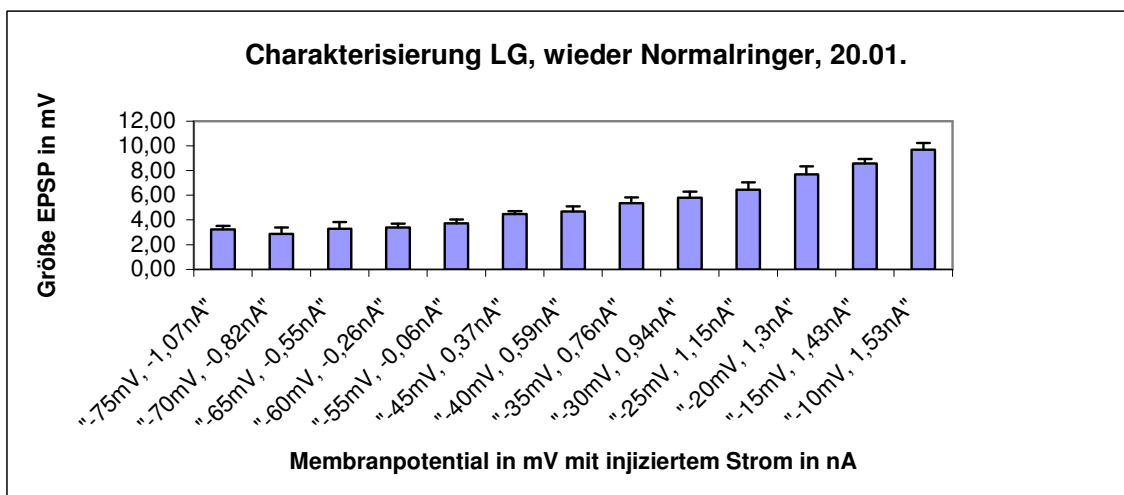


Dia.2b: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung des EPSP in der LG-Zelle des STG vom 20.01.06 nach Reizung über den ion bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in lowCa-Ringer.

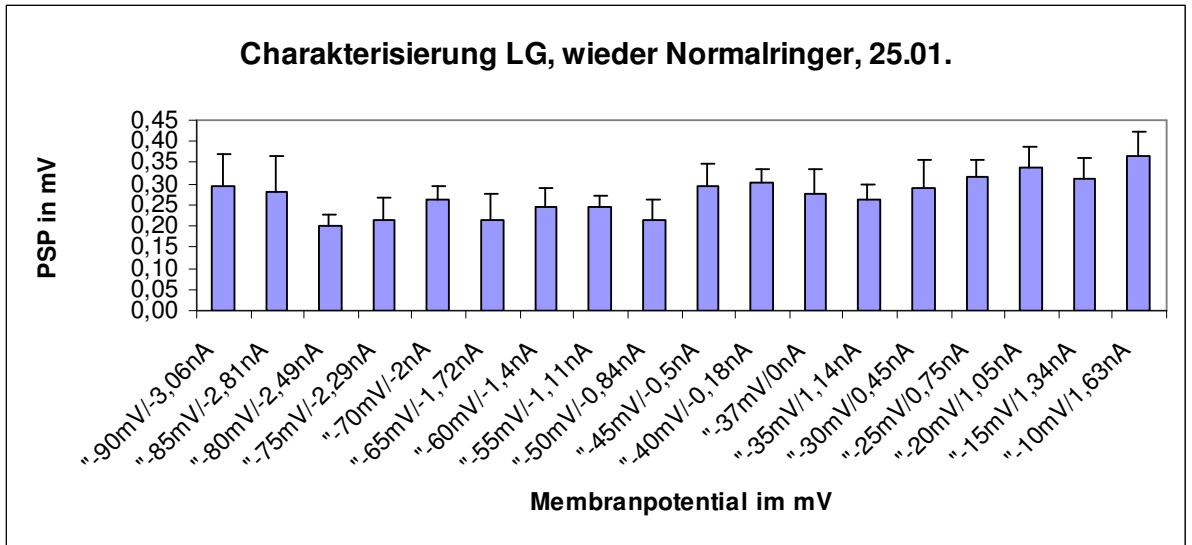


Dia.2c: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung des EPSP in der LG-Zelle des STG vom 25.01.06 nach Reizung über den ion bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in lowCa-Ringer.

In Diagramm 3 a und b ist die Größe der EPSPs zu sehen, die in LP durch Reizung über den ion ausgelöst wurden, nachdem der lowCa-Ringer durch Normalringer ausgewaschen wurde. Die Messungen wurden wieder bei unterschiedlichen Membranpotentialen durchgeführt. Eine Überprüfung der Werte mit dem t-Test ergab für die Messreihe am 20.01. jeweils einen signifikanten Unterschied für die Werte bei maximaler Hyperpolarisation und Depolarisation gegenüber dem Wert beim Ruhepotential ($p < 0,01$) und bei der Messreihe vom 25.01. einen signifikanten Unterschied der Werte beim Ruhepotential gegenüber den Werten bei maximaler Depolarisation, jedoch keinen signifikanten Unterschied der Werte bei maximaler Hyperpolarisation gegenüber den Werten beim Ruhepotential.

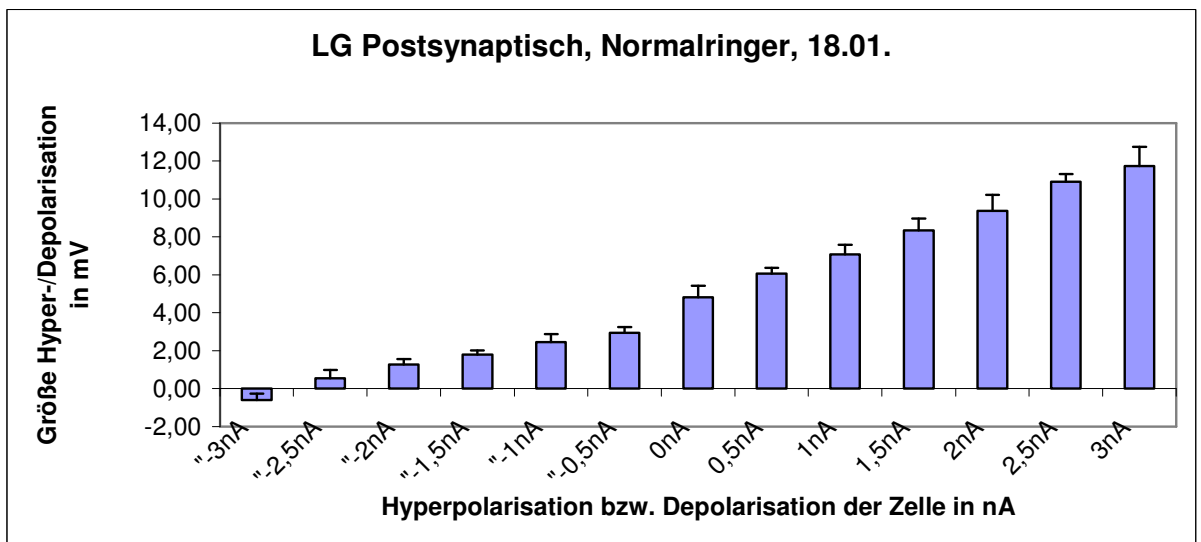


Dia.3a: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung des EPSP in der LG-Zelle des STG vom 20.01.06 nach Reizung über den ion bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle nachdem der lowCa-Ringer mit Normalringer ausgewaschen wurde.

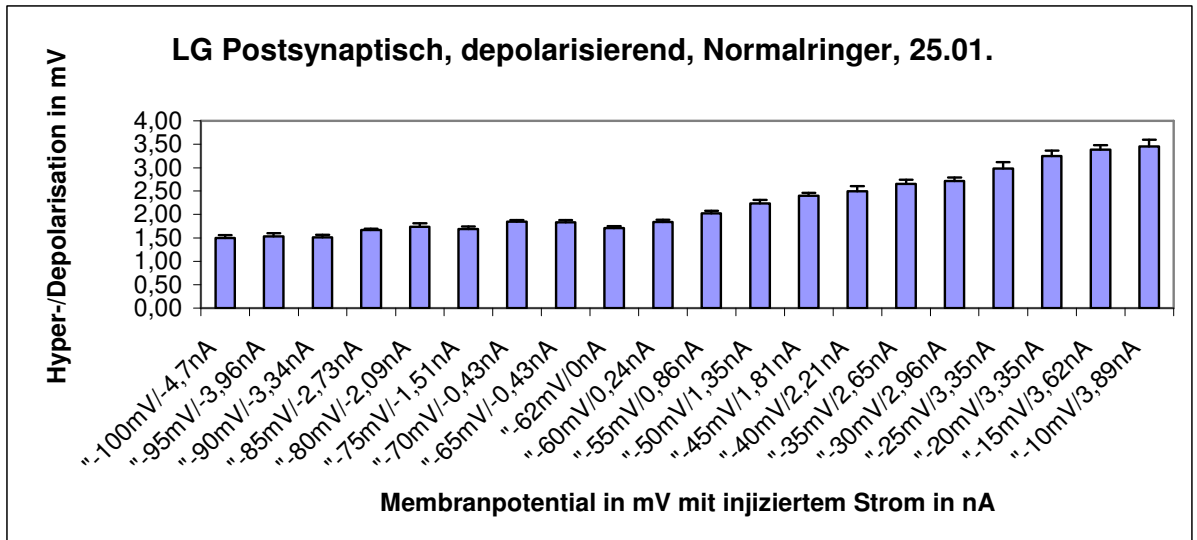


Dia.3b: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung des EPSP in der LG-Zelle des STG vom 25.01.06 nach Reizung über den Ionenkanal bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle nachdem der lowCa-Ringer mit Normalringer ausgewaschen wurde.

In Diagramm 4 a + b sieht man die durchschnittliche Größe der Depolarisationen von LG, die durch depolarisierende Reize konstanter Stromstärke an der Membran des Zellsomas ausgelöst wurden, bei unterschiedlichen Membranpotentialen, die durch die angegebenen Strominjektionen ausgelöst wurden. Der t-Test ergab jeweils signifikante Unterschiede bei beiden Testreihen zwischen den Werten für maximale Hyperpolarisation und Depolarisation gegenüber den Werten beim Ruhepotential ($p < 0,01$).

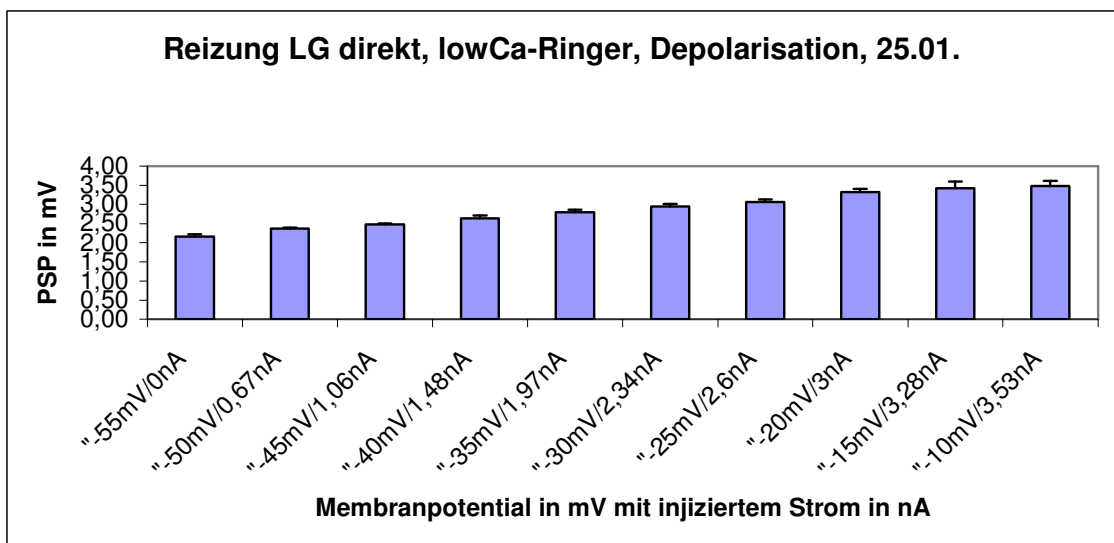


Dia.4a: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung der Hyper- bzw. Depolarisation in der LG-Zelle des STG vom 18.01.06 nach direkter Reizung mit Depolarisierenden Reizen konstanter Stärke im Zellsoma bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in Normalringer.

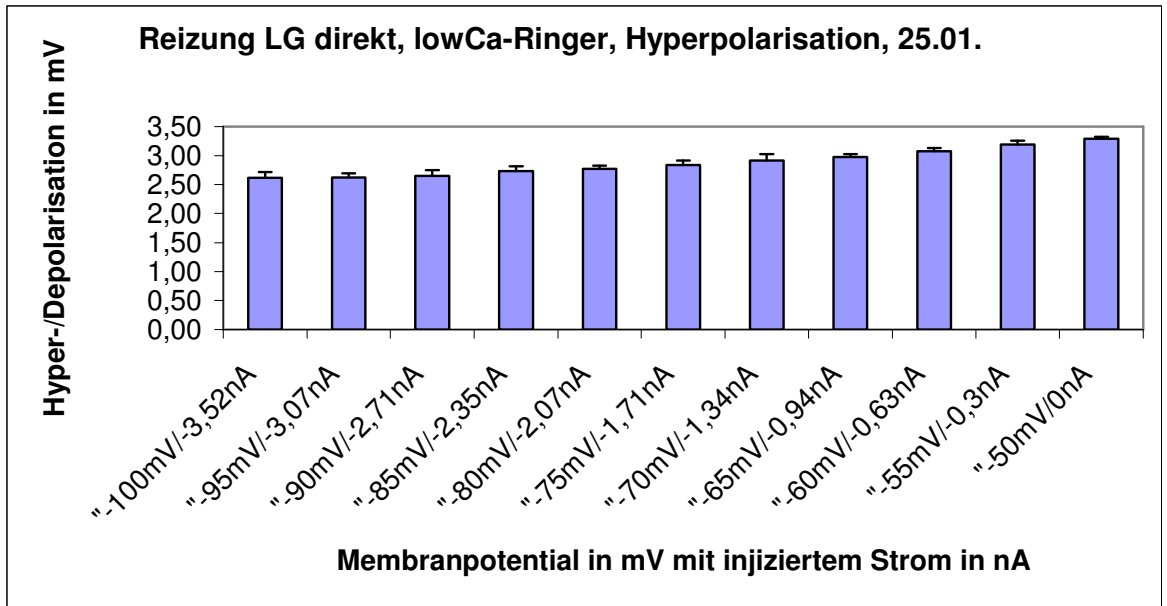


Dia.4b: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung der Hyper-bzw. Depolarisation in der LG-Zelle des STG vom 25.01.06 nach direkter Reizung mit Depolarisierenden Reizen konstanter Stärke im Zellsoma bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in Normalringer

In Diagramm 5 a sieht man die Größen der PSPs, im Diagramm 5b die Größen der Hyper- bzw. Depolarisation von LG bei direkter Reizung konstanter Stärke zum Einen bei hyperpolarisiertem Membranpotential und zum Anderen bei depolarisiertem Membranpotential. Die Messungen wurden in lowCa-Ringer durchgeführt. Vergleiche mittels des t-Tests der Werte für maximale Depolarisation und maximale Hyperpolarisation mit den Werten beim Ruhepotential ergaben signifikante Unterschiede ($p < 0,01$).

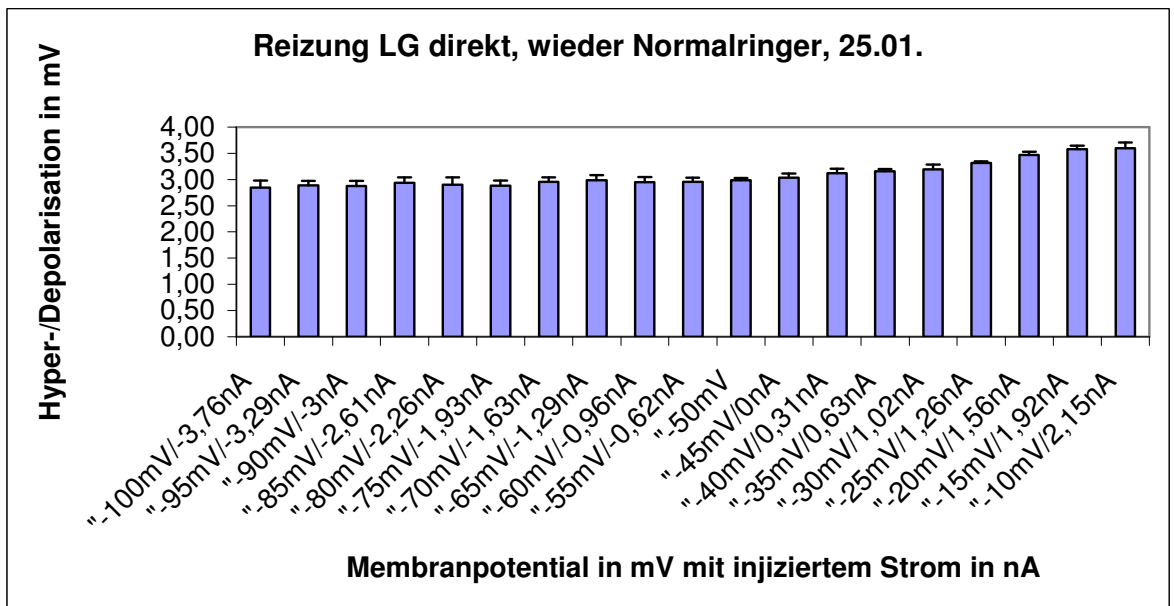


Dia.5a: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung des PSP in der LG-Zelle des STG vom 25.01.06 nach direkter Reizung mit Depolarisierenden Reizen konstanter Stärke im Zellsoma bei Depolarisation der Zelle im Normalringer.



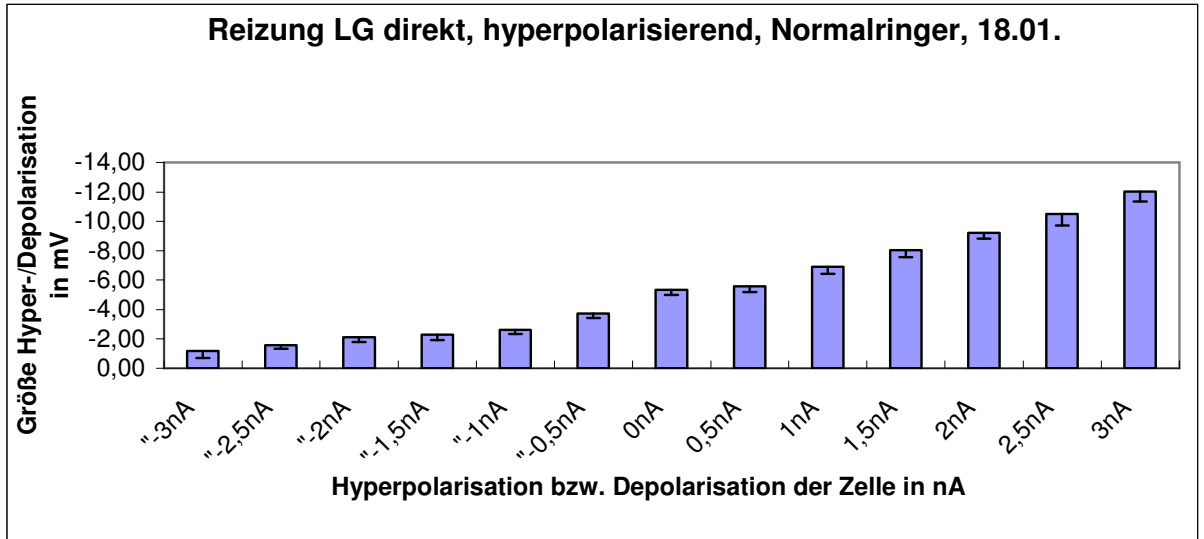
Dia.5b: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung der Hyper- bzw. Depolarisation in der LG-Zelle des STG vom 25.01.06 nach direkter Reizung mit Depolarisierenden Reizen konstanter Stärke im Zellsoma bei Hyperpolarisation der Zelle im Normalringer.

In Diagramm 6 ist die Größe der Hyper- oder Depolarisation aufgetragen, die in LG bei direkter depolarisierender Reizung gemessen wurden, nachdem der lowCa-Ringer ausgewaschen wurde. Der t-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten für die maximale Depolarisation und Hyperpolarisation verglichen mit den Werten für das Ruhepotential ($p < 0,01$).

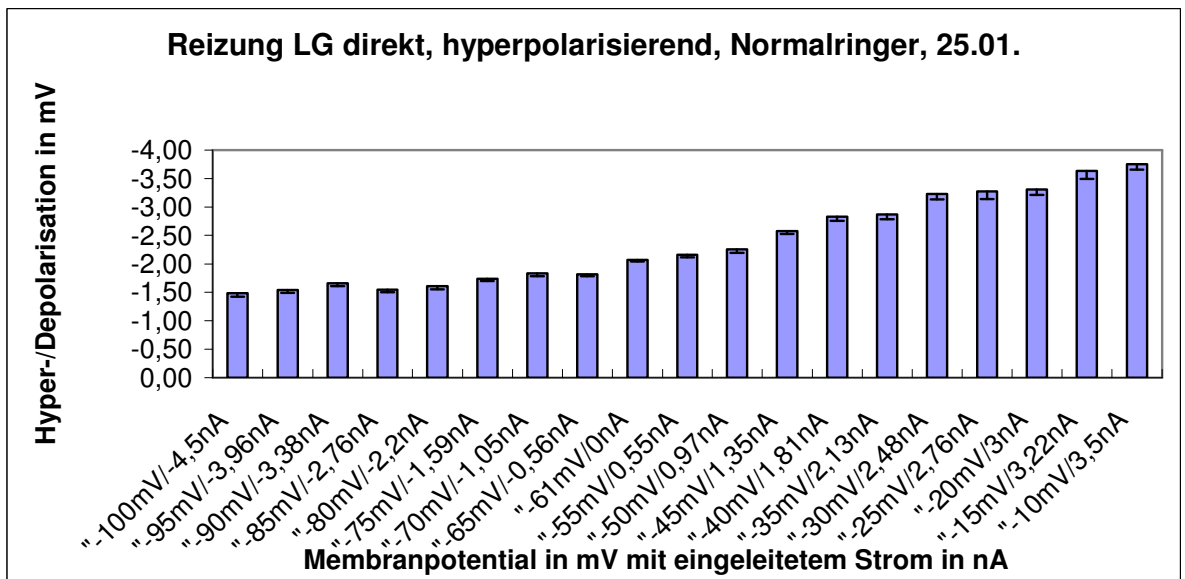


Dia.6: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung der Hyper- bzw. Depolarisation in der LG-Zelle des STG vom 25.01.06 nach direkter Reizung mit Depolarisierenden Reizen konstanter Stärke im Zellsoma bei verschiedenen Membranpotentialen der Zelle nachdem der lowCa-Ringer durch Normalringer ausgewaschen wurde.

Diagramm 7 a + b zeigt die durchschnittliche Hyperpolarisation der Zellmembran von LG, durch hyperpolarisierende Reize derselben Stärke, bei unterschiedlichen Membranpotentialen, die durch die angegebenen Stromeinleitungen ausgelöst werden. Der t-Test ergab jeweils signifikante Unterschiede bei beiden Testreihen zwischen den Werten für maximale Hyperpolarisation und Depolarisation gegenüber den Werten beim Ruhepotential ($p < 0,01$).

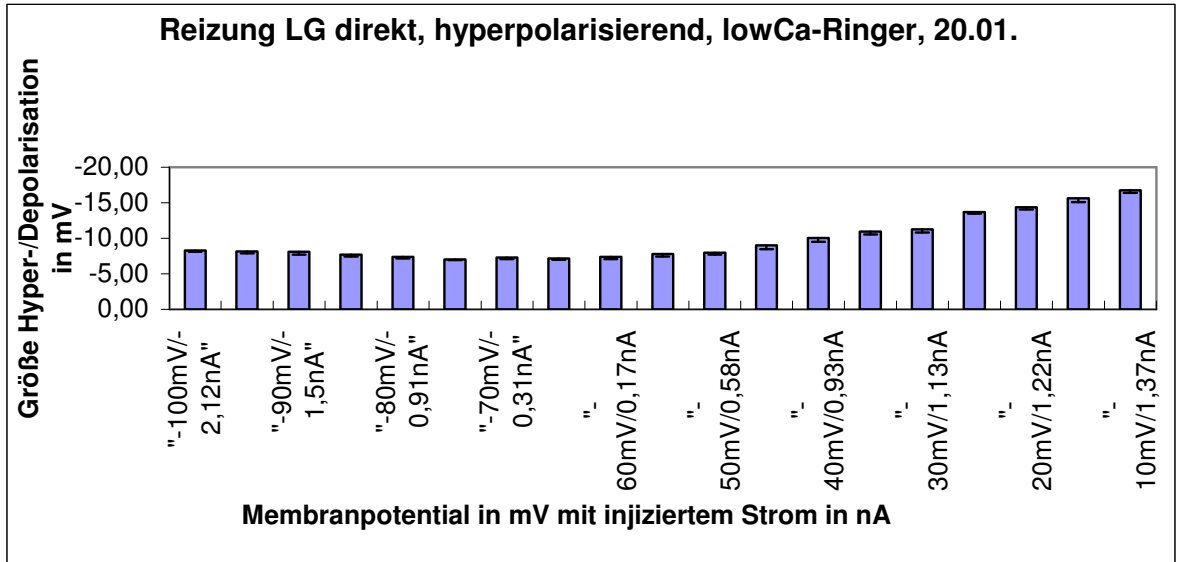


Dia.7a: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung der Hyper- oder Depolarisation in der LG-Zelle des STG vom 18.01.06 nach direkter Reizung mit Hyperpolarisierenden Reizen konstanter Stärke im Zellsoma bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in Normalringer.

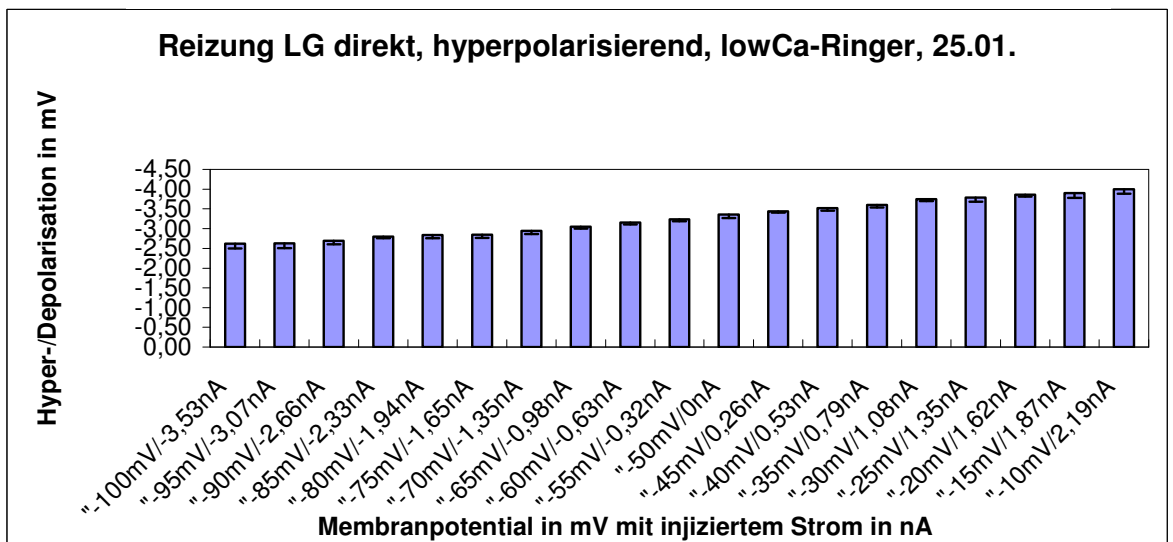


Dia.7b: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung der Hyper- oder Depolarisation in der LG-Zelle des STG vom 25.01.06 nach direkter Reizung mit Hyperpolarisierenden Reizen konstanter Stärke im Zellsoma bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in Normalringer.

Diagramm 8 a + b zeigt die durchschnittliche Größe der Hyper- oder Depolarisation, die in LG gemessen wurden, während hyperpolarisierende Reize konstanter Stärke gegeben wurden und das Membranpotential verändert wurde. Der t-Test ergab jeweils signifikante Unterschiede bei beiden Testreihen zwischen den Werten für maximale Hyperpolarisation und Depolarisation gegenüber den Werten beim Ruhepotential ($p < 0,01$).

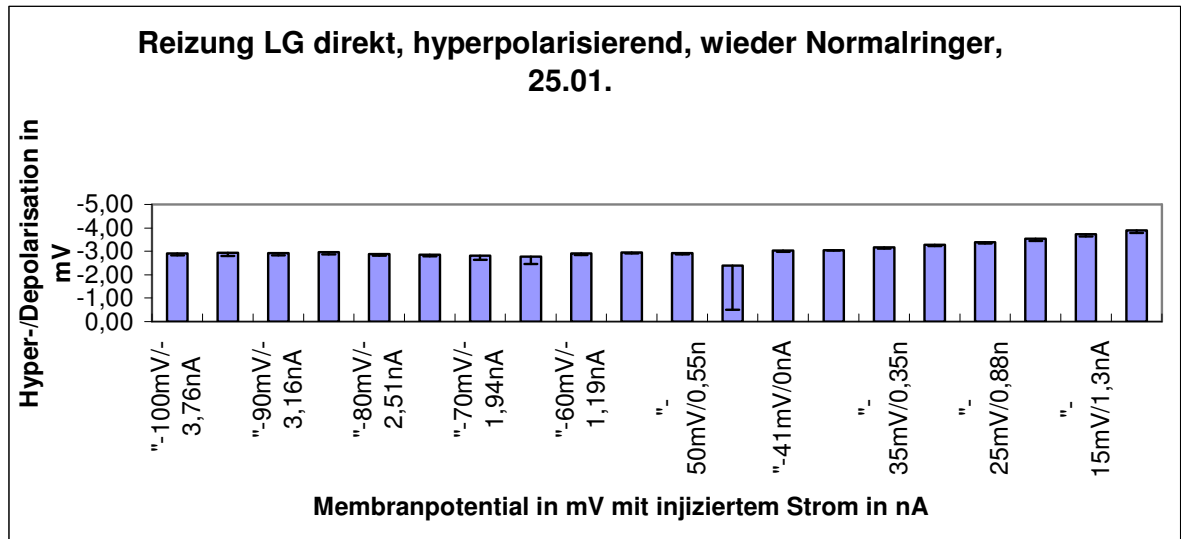


Dia.8a: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung der Hyper- oder Depolarisation in der LG-Zelle des STG vom 20.01.06 nach direkter Reizung mit Hyperpolarisierenden Reizen konstanter Stärke im Zellsoma bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in lowCa-Ringer.



Dia.8b: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung der Hyper- bzw. Depolarisation in der LG-Zelle des STG vom 25.01.06 nach direkter Reizung mit Hyperpolarisierenden Reizen konstanter Stärke im Zellsoma bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle in lowCa-Ringer.

Diagramm 9 stellt die Größe der PSPs von LG dar, die bei Reizung mit hyperpolarisierenden Reizen bei verschiedenen Membranpotentialen zu Messen waren. Die Messung erfolgte wiederum in Normalringer. Eine Überprüfung durch den t-Test ($p < 0,01$) ergab signifikante Unterschiede zwischen den Werten für maximale Hyperpolarisation und Depolarisation gegenüber den Werten beim Ruhepotential.



Dia.9: Durchschnittliche Größe mit Standardabweichung der Hyper- oder Depolarisation in der LG-Zelle des STG vom 25.01.06 nach direkter Reizung mit Hyperpolarisierenden Reizen konstanter Stärke im Zellsoma bei unterschiedlichen Polarisationszuständen der Zelle nachdem der lowCa-Ringer durch Normalringer ausgewaschen wurde.

Diskussion

Die Aufgabenstellung für den Versuch sah vor, zuerst die Verschaltung von MCN1 über ion auf LG zu Charakterisieren. Unsere Ergebnisse decken sich dabei mit den Ergebnissen, die in dem uns zur Verfügung gestellten Paper, dass in LG mit zunehmender Depolarisierung die EPSPs größer werden. Dies kann man sehr gut in den Diagrammen 1a - c sehen. Des weiteren kann man dadurch, dass bei Nutzung von lowCa-Ringer immer noch EPSPs und der Effekt der Verstärkung in LG auftreten wenn man ion reizt, erkennen, dass ion (und damit auch MCN1) mit einer elektrischen Synapse auf LG verschaltet sein muss und dass der beobachtete Effekt der Verstärkung eine Eigenschaft der elektrischen Synapse oder der Postsynapse sein muss. Dies wird in den Diagrammen 2 a - c gezeigt. In den Diagrammen 3 a sieht man, dass auch nach Auswaschen des lowCa-Ringers der Effekt erhalten bleibt, was so auch zu erwarten war.

Nach der Charakterisierung der Verschaltung von MCN1 auf LG war eine weitere Vorgabe, herauszufinden, ob der Effekt der Verstärkung eine Eigenschaft der Synapse oder der LG-Zelle ist. Dazu wurde nicht mehr über den ion gereizt, sondern direkt in LG. Da der Effekt der Verstärkung immer noch vorhanden war (vgl. Dia. 4 a + b; Dia. 5 a + b und Dia.6) lässt dies nur den Schluss zu, dass der Verstärkungseffekt auf Eigenschaften von LG zurückzuführen ist. Die Versuchsreihen, die in den Diagrammen 5 a + b und Diagramm 6 aufgezeigt sind dienen wiederum dazu, zu zeigen, dass lowCa-Ringer keinen sichtbaren Einfluss auf den Effekt hat, und somit keine chemische Synapse für den Effekt verantwortlich ist.

Zuletzt wurden noch zwei Hypothesen für die Ursache des verstärkenden Effekts untersucht, die von der Gruppe entwickelt wurde, die versucht hat, diese Verschaltung am Computer zu

simulieren. Die eine Hypothese besagt, dass für den Effekt Kanäle zuständig sind, die ein Umkehrpotential besitzen, welches höher liegt als das Ruhepotential der Zelle (z.B. Na⁺-Kanäle) und die bei Depolarisierung eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit besitzen, als bei Hyperpolarisierung. Die andere Hypothese geht davon aus, dass für den Effekt Kanäle zuständig sind, die ein Umkehrpotential besitzen, welches niedriger als das Ruhepotential der Zelle ist (z.B. K⁺-Kanäle oder Cl⁻-Kanäle) und die bei Hyperpolarisation eine hohe Öffnungswahrscheinlichkeit und bei Depolarisation eine niedrige Öffnungswahrscheinlichkeit besitzen. Zur Überprüfung wurden hyperpolarisierende Pulse gegeben (Dia. 7 – 9), die dadurch, dass die erzeugten PSPs größer wurden, die zweite Hypothese mit den Kanälen, die ein stark negatives Umkehrpotential besitzen, stützen. Um diese Theorie weiter zu überprüfen und weiterzuentwickeln sollten in folgenden Experimenten Substanzen in den Ringer gegeben werden, die gezielt Kanäle blockieren, die in Frage kommen, um über das Ausbleiben des Effekts eine Aussage über die Art der verantwortlichen Kanäle machen zu können.

Quellen:

http://cuniculina.biologie.uni-ulm.de/fp/STG-Praktikum_2004.pdf

http://cuniculina.biologie.uni-ulm.de/wstein/STNS_warum_und_wieso_Ulm.pdf

Coleman, M. J., Meyrand P. & Nusbaum M. P., Letters to Nature 378, 502-505 (1995)