

Universität Ulm
WS 2003 / 2004



Versuche:

1. Intrazelluläre Ableitungen im stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses
2. Simulation eines neuronalen Netzwerkes

Gruppe C: **Alexandra Süß**

Christiane Marinc

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	4
3. Material und Methoden.....	9
4. Ergebnisse.....	12
5. Diskussion	28
6. Literaturverzeichnis	33
7. Anhang.....	34

1. Zusammenfassung

Das stomatogastrische Nervensystem des Taschenkrebses (*Cancer pagurus*) eignet sich wegen seiner im Vergleich zu anderen Nervensystemen relativ geringen Komplexität hervorragend zur Untersuchung des morphologischen und physiologischen Aufbaus neuronaler oszillatorischer Netzwerke. Das stomatogastrische Nervensystem setzt sich aus zwei, zum Teil miteinander verknüpften und sich ergänzenden, Teilen zusammen, dem pylorischen und dem gastrischen Netzwerk. Das pylorische Netzwerk generiert den pylorischen Rhythmus, einen Dreier-Takt, der die Filtration der Nahrung im pylorischen Filter steuert. Das gastrische Netzwerk hingegen erzeugt einen deutlich langsameren Rhythmus, den gastrischen Rhythmus, durch den das Zerkleinern der Nahrung in der gastrischen Mühle durch die Magenzähne gesteuert wird.

Die 26 Nervenzellen des pylorischen und gastrischen Netzwerkes liegen im stomatogastrischen Ganglion und sind durch elektrische und chemische Synapsen miteinander verknüpft. Diese Neuronen können in elektrophysiologischen Versuchen sowohl extra- als auch intrazellulär abgeleitet werden.

Bei unseren Versuchen wurden im ersten Praktikumsteil die Neurone des stomatogastrischen Ganglions durch elektrophysiologische Methoden identifiziert und deren Konnektivität bestimmt. Die Identifikation der Neurone erfolgte durch gleichzeitige extra- und intrazelluläre Ableitung und durch Vergleich der beiden Ableitungen unter Beachtung der Laufzeitdifferenz. Die Konnektivität der Neurone konnte durch gleichzeitige intrazelluläre Ableitung und gezielte Reizung zweier bereits identifizierter Nervenzellen überprüft werden. Ob es sich bei den Verknüpfungen zwischen zwei Neuronen um elektrische oder chemische Synapsen bzw. um mono- oder polysynaptische Verbindungen handelt, kann mit Hilfe spezieller Ringerlösungen (*lowCa²⁺*- bzw. *HIDI*-Ringer) untersucht werden.

Zum besseren Verständnis der Funktionsweise neuronaler Netzwerke können die in elektrophysiologischen Versuchen gewonnenen Erkenntnisse mit Hilfe geeigneter Computerprogramme überprüft werden. Im zweiten Praktikumsteil haben wir aufbauend auf den von der Elektrophysiologie erhaltenen Daten mit Hilfe des windowsbasierten Programmes *madSim* den gastrischen Rhythmus simuliert. Mit Hilfe dieses Programmes können zum einen die im Netzwerk real existierenden Verbindungen exakt nachgebaut und simuliert werden. Zum anderen können aber auch Verbindungen eingefügt und untersucht werden, die man so im realen Netzwerk noch nicht gefunden hat. Das Programm *madSim* ermöglicht es also, verschiedene Charakteristika der Verschaltung und der einzelnen Neurone zu verändern und die Auswirkungen dieser Veränderungen zu beobachten. In elektrophysiologischen Untersuchungen können im Anschluss daran existierende Verbindungen zwischen Neuronen untersucht werden und evtl. auch die Auswirkungen der Änderung verschiedener Parameter durch chemische Stoffe beschrieben werden.

Durch die beiden Praktikumsteile wurde deutlich, dass das Zusammenwirken und die Interaktion von Neurobiologie und Informatik für das bessere Verständnis der Funktionsweisen neuronaler Netzwerke von großer Bedeutung ist.

2. Einleitung

Das Neuron kann als die strukturelle und funktionelle Grundeinheit jedes Nervensystems bezeichnet werden, und stellt damit den Kern der neurobiologischen Forschung dar. In primitiven Lebewesen sind neuronale Netzwerke in der Lage, einfache Reaktionen zu steuern, während sie organisiert im menschlichen Gehirn eine atemberaubende Komplexität erreichen, die jeden hochmodernen Computer übertrifft.

Jeder Vorgang, von einfachen Reflexen bis hin zu komplizierten motorischen Mustern, wird durch eine Vielzahl an Neuronen gesteuert und kontrolliert. Die Art der Verschaltung zwischen diesen Neuronen und deren Interaktion unterliegen sowohl bei Vertebraten, als auch bei Invertebraten denselben grundlegenden Mechanismen. Es ist eine der Aufgaben der Neurobiologie, diese Mechanismen aufzuklären und damit auch zu einem Verständnis darüber zu gelangen, wie das menschliche Nervensystem es uns ermöglicht, mit unserer Umwelt zu interagieren. Die neuronalen Netzwerke, die das menschliche Verhalten steuern, bestehen aus einer enormen Anzahl an Nervenzellen, so dass die resultierende Komplexität es fast unmöglich macht, die Funktionsweise dieser Systeme aufzuklären. Daher werden in der modernen Wissenschaft oft Modellsysteme der Invertebraten genutzt, die sich auf Grund der geringen Zahl der an einem System beteiligten Neurone besser für elektrophysiologische Untersuchungen eignen. Zu diesen Modellsystemen gehören die sog. zentralen Mustergeneratoren (**Central Pattern Generators**), die die Erzeugung rhythmisch motorischen Verhaltens, wie z.B. der Lokomotion oder der Atmung, kontrollieren. Ein Vorteil dieser CPG liegt neben der relativ geringen Anzahl an beteiligten Neuronen auch darin, dass sie auch im isolierten Zustand, also ohne neuronalen Eingang durch das sensorische System, noch funktionsfähig bleiben.

Eines der bekanntesten Modellsysteme zur Untersuchung neuronaler Netzwerke ist das stomatogastrische Nervensystem (STNS) der *Decapoda* (Abb.1). Dieses kann als eine Erweiterung des ZNS der Crustaceen angesehen werden und enthält die Netzwerke, welche die Aktivitätsmuster für die Magenbewegungen steuern. Das STNS ist aufgebaut aus vier Ganglien und den diese verbindenden Nerven, sowie den peripheren Nerven, die sowohl zum Gehirn als auch zu den zu steuernden Muskeln ziehen. Während im Oesophagealganglion und in den beiden Kommissuralganglien die Rhythmen zur Steuerung der Oesophagus- und Magensackbewegung erzeugt werden, generiert das Stomatogastrische Ganglion (STG) den pylorischen Rhythmus zur Steuerung des pylorischen Filters und den gastrischen Rhythmus, welcher die Bewegungen der gastrischen Mühle kontrolliert.

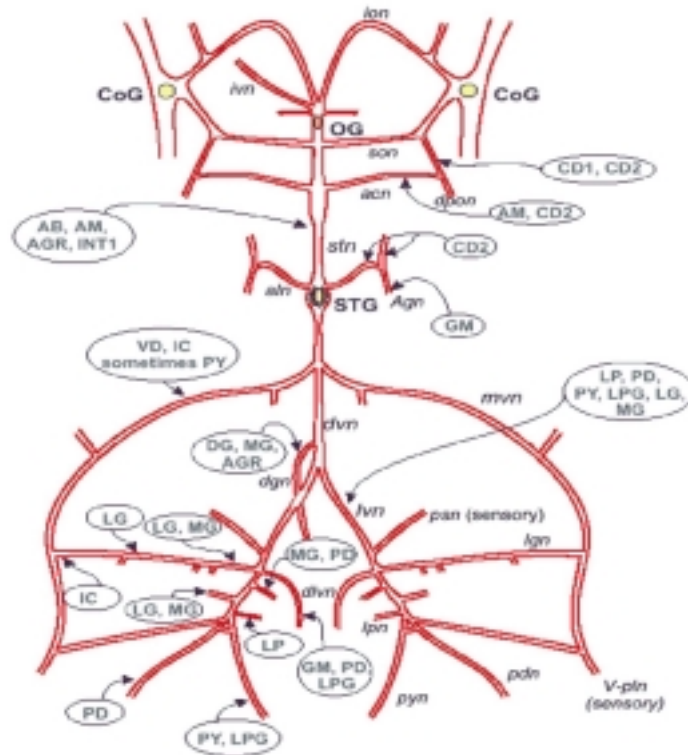


Abb.1: Schematische Darstellung des stomatogastrischen Nervensystems

[aus: Praktikumsskript Fortgeschrittenenpraktikum Neurobiologie 2004, Modul III/IV, Intrazelluläre Ableitungen im stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses und Simulation eines neuronalen Netzwerkes]

Nahrung, die von den Krebsen aufgenommen wird, wird durch die Mundwerkzeuge nur grob zerkleinert. Das Zermahlen der Nahrung erfolgt erst durch die Magenzähne der gastrischen Mühle, welche diese durch Kontraktionen des Oesophagus erreicht. Neben dem Oesophagus, dem Magensack (Nahrungsspeicherung) und der gastrischen Mühle ist auch der pylorische Filter ein Teil des Kaumagens, dieser dient der Trennung von festen und flüssigen Nahrungsbestandteilen.

Das stomatogastrische Ganglion ist aus 26 Neuronen aufgebaut, die alle entweder am pylorischen oder am gastrischen und zum Teil auch an beiden Rhythmen beteiligt sind und durch elektrische oder chemische Synapsen miteinander verbunden sind (Abb.2).

Beim pylorischen Rhythmus handelt es sich um einen Dreier-Takt, der durch die Abfolge der Aktivitätsmuster in drei pylorischen Neuronen charakterisiert ist: dem Pylorischen Dilator-Motoneuron (PD), dem Lateralen Pylorischen Motoneuron (LP) sowie dem Pylorischen Konstriktor-Motoneuron (PY). Bei dem PD-Neuron handelt es sich um ein sog. Schrittmachenneuron, welches zusammen mit einem anderen Schrittmacher, dem AB-Neuron, den Takt für den pylorischen Rhythmus vorgibt. Diese Schrittmachenneurone besitzen durch bestimmte intrinsische Eigenschaften die Fähigkeit, ohne einen externen Eingang eine rhythmische Oszillation des Membranpotentials zu erzeugen. Der pylorische Rhythmus hat eine Periodendauer von etwa 0,5 - 2 Sekunden.

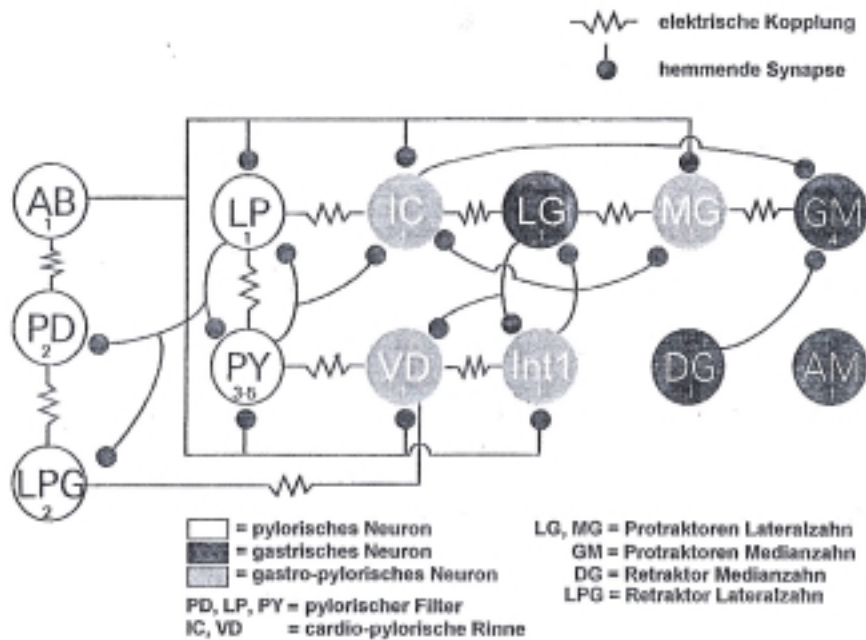


Abb.2: Schematische Übersicht über das neuronale Netzwerk innerhalb des stomatogastrischen Ganglions mit relevanten Synapsen und Kopplungen. (Die Zahlen geben die Anzahl der jeweiligen Neurone an.)
 [aus: Praktikumsskript Fortgeschrittenenpraktikum Neurobiologie 2004, Modul III/IV, Intrazelluläre Ableitungen im stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses und Simulation eines neuronalen Netzwerkes]

Der gastrische Rhythmus hat eine wesentlich längere Periodendauer von ca. 6 - 25 Sekunden. Das gastrische Netzwerk ist aus zwei Untersystemen aufgebaut: den Motoneuronen, die die Muskeln des Medianzahnes ansteuern und den Motoneuronen, die den Medianzahn direkt ansteuern. Im Gegensatz zum pylorischen Netzwerk enthält das gastrische keine Schrittmachneurone. Die Aktivität des gastrischen Netzwerkes beruht allein auf den Mechanismen der synaptischen Verschaltung der gastrischen Neurone. Kontrolliert wird der Rhythmus im Wesentlichen durch neuromodulatorische Transmitter. Diese werden von Projektionsneuronen ausgeschüttet, die synaptische Verbindungen mit den Netzwerkneuronen eingehen und das STG von den Kommissuralganglien her innervieren. Wenn von den Projektionsneuronen eine externe Erregung des gastrischen Netzwerkes geliefert wird, ist es möglich, dass in bestimmten Zellpaaren eine alternierende Aktivität ausgelöst wird; dieses Zellpaar kann dann als zentraler Mustergenerator des Netzwerkes agieren. Im gastrischen Netzwerk liegt eine gegenseitige Hemmung des Interneurons 1 (Int1) und des Lateralen Gastrischen Neurons (LG) vor. Ein solches System aus Zellpaaren oder Triplets, das durch eine hemmende Verschaltung eine autonom alternierende Schwingung hervorrufen kann, bezeichnet man als *half-center*.

Das oben beschriebene *half-center* zeigt bereits die Bedeutung der synaptischen Hemmung für das stomatogastrische System, die synaptische Inhibition ist ein vorherrschendes Charakteristikum aller CPG.

Im stomatogastrischen Nervensystem sind alle transmitterassoziierten Aktionen inhibitorisch und damit verantwortlich für die inaktiven Phasen der meisten STG-Neurone. Zur Aktivität bestimmter Neurone kann es durch die Veränderung spannungsabhängiger

Membraneigenschaften kommen, die aus der vorangegangenen Hemmung resultieren. Man bezeichnet diesen Effekt als *postinhibitorischen Rebound* (Darstellung eines *postinhibitorischen Rebounds* siehe Anhang 13).

Bei Na⁺-Kanälen führt die vorausgehende Hyperpolarisation zu einer Erniedrigung der Anzahl der geöffneten Na⁺-Aktivierungstore und gleichzeitig zu einer steigenden Zahl geöffneter Na⁺-Inaktivierungstore. Bei einer Beendigung der Hyperpolarisation benötigen die Inaktivierungstore mehr Zeit, um auf ihre ursprüngliche, geringere Öffnungsrate zu gelangen. Die Öffnung der Aktivierungstore hingegen erfolgt um einiges schneller. Das heißt, dass sich das Öffnungsverhältnis zu Gunsten der Aktivierungstore verbessert, womit es durch eine erhöhte Na⁺-Leitfähigkeit ohne äußere Reize zu einer Depolarisation kommen kann, die bei einer Überschreitung des Schwellenwertes auch ein AP auslösen kann. Die Auslösung eines *postinhibitorischen Rebounds* allein durch die Aktivität der Na⁺-Kanäle ist jedoch wenig verbreitet, sie spielen aber meist eine Rolle, indem sie mit anderen Kanälen zusammenwirken.

Neben dem beschriebenen Na⁺-Strom lässt sich ein *postinhibitorischer Rebound* ebenfalls durch einen sog. *I_H-current* auslösen. Dies ist ein Strom, der durch Hyperpolarisation aktiviert wird und dieser entgegenwirkt. Bei diesem Strom fließen die Ionen durch einen unspezifischen Kationen-Kanal. Das Membranpotential wird durch den Einstrom positiver Ladungen bei noch anhaltender Hyperpolarisation erhöht. Dieser Anstieg des Membranpotentials wird als *sag-current* bezeichnet. Da die unspezifischen I_H-Kanäle nach der Beendigung der Hyperpolarisation nicht sofort schließen, kommt es anschließend durch den weiteren Kationeneinstrom zur Depolarisation und bei Überschreitung des Schwellenwertes zur Generierung eines AP.

Aus den ausgeführten Beschreibungen wird ersichtlich, dass bereits relativ einfache neuronale Netzwerke mit einer relativ geringen Anzahl beteiligter Neurone eine sehr hohe Komplexität erreichen können. Um diese Netzwerke und die Mechanismen, die ihrer Kontrolle zu Grunde liegen, verstehen zu können, reicht es nicht aus, alleine den Output eines Systems zu beobachten. Es ist ein möglichst vollständiges Wissen über die beteiligten Neurone, deren zelluläre Eigenschaften und Art der synaptischen Verschaltung notwendig. Außerdem ist eine Kenntnis über die Wirkung von externen modulatorischen Einflüssen (Neuromodulatoren) nötig. Das Zusammenwirken all dieser Faktoren führt letztendlich zu einem spezifischen, der jeweiligen Situation angepassten rhythmischen Muster einer Verhaltensweise.

Nachdem man durch vorangegangene morphologische und elektrophysiologische Methoden ein ausreichendes grundlegendes Wissen über ein neuronales Netzwerk erhalten hat, ist es möglich, durch Computersimulationen die Ergebnisse zu unterstützen und weiter auszubauen. So können mit Hilfe geeigneter Computerprogramme neuronale Schaltkreise nachgebaut und so durch eine Simulation bestimmte Erkenntnisse untermauert oder Möglichkeiten einer Verschaltung überlegt werden, die später durch Untersuchungen am Präparat überprüft werden können.

In unseren Versuchen sollen zum einen mit Hilfe des auf Windows basierenden Programmes *madSim* neuronale Netzwerke simuliert werden, an Hand derer grundlegende Prinzipien der rhythmischen Aktivität von Neuronengruppen und Charakteristika der einzelnen Neuronen sowie der Netzwerke untersucht werden können. Als Grundlage für diese Simulation sollen in einem der beiden Praktikumsteile die Originaldaten der intrazellulären Ableitungen einer anderen Praktikumsgruppe genutzt werden. Andererseits sollen aber im zweiten Teil des Praktikums auch durch eigene intrazelluläre Ableitungen der Aufbau des stomatogastrischen Nervensystems sowie die Eigenschaften der einzelnen Neuronen und deren Verschaltung untersucht werden. In späteren Versuchen sollen ebenfalls die morphologischen Charakteristika einzelner Neuronen durch die spezifische Injektion einer fluoreszierenden Markersubstanz beobachtet werden.

3. Material und Methoden

Im elektrophysiologischen Praktikumsteil werden durch intra- und extrazelluläre Ableitungen die einzelnen Neurone des stomatogastrischen Ganglions identifiziert und anschließend deren Konnektivität untersucht.

Dazu wird zunächst vom Versuchsbetreuer das stomatogastrische Nervensystem des Taschenkrebses aus dem Tier herauspräpariert und auf einer mit Sylgard bedeckten und mit Ringerlösung gefüllten Schale festgesteckt. Anschließend werden mit einer Spritze Vaselinekringel um die Bereiche der Nerven gezogen, an denen extrazellulär abgeleitet werden soll. Diese Vaselinekringel isolieren den Nerven von dem ihn umgebenden Medium und verhindern so einen Ladungsausgleich. Auf diese Weise kann man bei einer Aktivität des Nerven eine Potentialdifferenz zwischen dem Medium innerhalb des Vaselinekringels und dem Medium außerhalb des Kringels messen. Dazu muss jeweils eine Drahtelektrode neben dem Nerv innerhalb des Kringels in das Sylgard gestochen werden, die indifferente Elektrode wird außerhalb des Kringels fixiert. Die erwähnte Potentialdifferenz kann als biphasisches Signal abgeleitet und nach einer Vergrößerung durch Verstärker (*SEC - 10 L npi* und *BA - 1 S npi*) auf einem Oszilloskop (*DL 708 E Yokogawa*) und mit Hilfe des Programms *Spike2* auf einem Computer dargestellt werden. Auf diese Weise soll die Aktivität der Nerven *mvn*, *dvn*, *lvn Hi*, *lvn Lo*, *pdn*, *Ign* und *dgn* beobachtet werden. Über die Aktivität des *mvn* und des *lvn* wird die Periodendauer des pylorischen Rhythmus, sowie die Phasenlage der Aktivität der einzelnen Neurone und deren Spikefrequenz bestimmt. Gleiches wird auch für den gastrischen Rhythmus über die Aktivität des *Ign* durchgeführt.

Neben den eben beschriebenen extrazellulären Ableitungen wird von jedem der drei Präparate eine schematische Zeichnung erstellt, um anschließend die Neurone durch intrazelluläre Ableitungen identifizieren zu können. Dazu wird unter einem Binokular eine Zeichnung des stomatogastrischen Ganglions angefertigt, in die die Lage und Größe der einzelnen Neurone eingetragen wird. An Hand dieser Zeichnung können nun gezielt einzelne Neurone mit Glaselektroden angestochen und deren Aktivität abgeleitet werden. Die Elektroden werden mit 4 M Kaliumacetat + 0,05 M Kaliumchlorid gefüllt und mittels eines Mikromanipulators über dem Ganglion platziert. Wenn die Elektrodenspitze möglichst dicht über dem abzuleitenden Neuron steht, wird die Elektrode soweit heruntergedreht, bis sie die Membran berührt. Anschließend kann sie durch ein leichtes Klopfen auf den Mikromanipulator und ein gleichzeitiges vorsichtiges Herunterdrehen in die Zelle eingestochen werden.

Durch einen Vergleich der intrazellulären Ableitung mit den extrazellulären Ableitungen der verschiedenen Nerven kann auf die Identität des jeweiligen Neurons geschlossen werden. Durch eine Strominjektion über die Elektrode in das Neuron kann dieses sowohl hyper- als auch depolarisiert und bei überschwelliger Depolarisation zum Spiken gebracht werden. Wenn das "Spikemuster" mit der Aktivität eines Neurons auf einer der extrazellulären Ableitungen identisch ist und synchron mit diesem auftritt, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um dasselbe Neuron. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die

Aktivität der Neurone auf den extrazellulären Ableitungen mit einer gewissen Verzögerung auftritt. Der Laufzeitunterschied der extrazellulären im Vergleich zur intrazellulären Ableitung kann im Programm *Spike2* bestimmt werden. Die Leitungsgeschwindigkeit kann berechnet werden, indem man den Abstand von der abgeleiteten Zelle (im stomatogastrischen Ganglion) zum Vaselinekringel um den Nerven, an dem extrazellulär abgeleitet wurde, ausmisst und anschließend durch den Laufzeitunterschied dividiert. Der Abstand der Ableitstellen dividiert durch den Laufzeitunterschied sollte eine Leitungsgeschwindigkeit von ca. 1 m/s ergeben, damit die angestochene Zelle als eindeutig identifiziert angesehen werden kann. Identifizierte Zellen werden anschließend in die Zeichnung eingetragen.

Durch die Verwendung einer zweiten Elektrode können zwei Neurone gleichzeitig intrazellulär abgeleitet werden; so kann auf die Art deren Verschaltung geschlossen werden. Zu diesem Zweck werden die Neurone einzeln durch die Injektion von positivem oder negativem Strom de- oder hyperpolarisiert und die Reaktion der jeweils anderen Zelle wird beobachtet.

Zur genaueren Charakterisierung der Konnektivität der Neurone werden außerdem Messungen in verschiedenen Ringerlösungen durchgeführt. Mit Hilfe eines *lowCa²⁺-Ringers*, also eines Ringers mit geringer Ca²⁺-Konzentration, kann überprüft werden, ob die Neurone über eine elektrische oder eine chemische Synapse verbunden sind. Bei der Signalweiterleitung an chemischen Synapsen wird Ca²⁺ benötigt, damit der Vesikelzyklus ablaufen kann. Dabei strömt bei einer ankommenden Erregung Ca²⁺ durch spannungsabhängige Kanäle ein und führt zur Exocytose, also zur Verschmelzung der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran und damit zur Transmitterfreisetzung und Weiterleitung des Signals an die postsynaptische Zelle. Durch eine geringe Ca²⁺-Konzentration kann der Ablauf des Vesikelzyklus verhindert und so die Weiterleitung an chemischen Synapsen unterbrochen werden, die Übertragung an elektrischen Synapsen hingegen bleibt dadurch unbeeinflusst.

Neben dem *lowCa²⁺-Ringer* wurde ein sog. *HIDI-Ringer* verwendet; dieser ist gekennzeichnet durch eine hohe Konzentration an divalenten Kationen, wodurch die AP-Schwelle erhöht wird. Mit Hilfe dieses Ringers kann überprüft werden, ob es sich zwischen zwei Nervenzellen um eine mono- oder eine polysynaptische Verbindung handelt.

Nach Zugabe des *HIDI-Ringers* können auf Grund der hohen AP-Schwelle nur noch durch Injektion von positivem Strom APs ausgelöst werden. Somit werden nur noch in den Zellen, die direkt (monosynaptisch) mit der gereizten Zellen verbunden sind, EPSPs ausgelöst.

Neben den intra- und extrazellulären Ableitungen soll auch eine Zelle spezifisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Lucifer Yellow* gefärbt werden. Ein Tropfen dieses Farbstoffes wird mit der Glaselektrode aufgezogen, die vollständige Befüllung erfolgt mit einer 3M KCl-Lösung. Die Elektrode wird, wie für die intrazelluläre Ableitung beschrieben, in ein Neuron eingestochen. Anschließend wird durch die Elektrode mit Hilfe eines Pulsengenerators (*Master 8 A.M.P.*) ein negativer Strom (45 Minuten lang -6 nA in 2s-Pulsen) in die Zelle injiziert. Dadurch wird der negativ geladene Farbstoff ebenfalls in die Zelle injiziert. Da es sich bei

dem Farbstoff um einen fluoreszierenden Marker handelt, kann man nach dem Färben die Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten. Nach der ersten Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop wird das Ganglion herauspräpariert und über das Wochenende in 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach der Fixierung wird das Präparat mittels einer Alkoholreihe (5 Minuten 30% Ethanol, 5 Minuten 50% Ethanol, 1 Stunde 70% Ethanol, 5 Minuten 90% Ethanol und 5 Minuten 100% Ethanol) dehydriert und anschließend in Methylsalicylat gegeben. Im Anschluss daran kann das Präparat wieder unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Neben den elektrophysiologischen Versuchen sollen in einem anderen Praktikumsteil ebenfalls die Ergebnisse, die andere Gruppen durch elektrophysiologische Untersuchungen erhalten haben, simuliert werden. Zur Simulation des neuronalen Netzwerks wird das auf Windows basierende Programm *madSim* (SWIM-Hodgin-Huxley-Modell) verwendet. In diesem Programm können Neurone simuliert werden, diese werden als Soma mit einem Dendriten dargestellt und können untereinander synaptisch verknüpft werden.

Zum einen können die zellulären Eigenschaften der einzelnen Neurone verändert werden, dazu zählen u.a. die Kapazität, das Membranpotential und die Art der vorhandenen Ströme sowie deren Leitfähigkeit. Außerdem können die synaptischen Eigenschaften verändert werden, Neurone können exzitatorisch, inhibitorisch oder elektrisch verbunden werden, anschließend kann die Stärke und Geschwindigkeit der synaptischen Übertragung variiert werden. Das simulierte Netzwerk kann durch variable Stromreize am Soma oder am Dendrit in unterschiedlicher Entfernung vom Soma gereizt werden.

Vor der Simulation der aus der Elektrophysiologie erhaltenen Daten werden zunächst verschiedene Tutorien am Computer durchgeführt, die mit dem Programm vertraut machen sollen.

4. Ergebnisse

Die bei den elektrophysiologischen Versuchen erhaltenen Daten aller extrazellulären Ableitungen sind beispielhaft in Anhang 1 dargestellt. Man kann auf diesem Ausdruck die Spuren bzw. extrazellulären Ableitungen von sechs verschiedenen Nerven (*lgn*, *pdn*, *lvn LO*, *dgn*, *mvn* und *lvn HI*) erkennen.

Auf den lateralen Ventrikelnerven *lvn LO* und *lvn HI* ist der pylorische Rhythmus, der von den Neuronen PD (pylorisches Dilatator-Motoneuron), LP (laterales pylorisches Motoneuron) und PY (pylorisches Konstriktor-Motoneuron) gebildet wird, erkennbar. Es handelt sich dabei um einen sehr charakteristischen Rhythmus, bei dem meist zwischen PD- und LP-Spikes eine deutliche Pause liegt. Die PY-Spikes sind meistens deutlich kleiner als die LP- und PD-Spikes. Die PD-Spikes sind außer auf dem *lvn (LO und HI)* auf dem *pdn* deutlich erkennbar. Auf der Ableitung des medialen Ventrikelnerven *mvn* sind zwei verschiedene Gruppen unterschiedlich hoher Spikes zu sehen; es handelt sich dabei um die Neurone IC (inferiores cardia-Motoneuron) und VD (Ventrikel-Dilatator-Motoneuron). In der Regel sind die IC-Bursts etwas kleiner als die VD-Bursts. Die vom *mvn* abgeleiteten Neurone zählen zum gastro-pylorischen Rhythmus.

Zum gastrischen Rhythmus gehören die Neurone LG (laterales gastrisches Neuron) und DG (dorsales gastrisches Neuron). LG ist auf der Ableitung des *lgn* (lateraler gastrischer Nerv), DG auf der Ableitung des *dgn* (dorsaler gastrischer Nerv) zu sehen.

Die aus den extrazellulären Ableitungen mit Hilfe des Programmes *Spike2* ermittelten Daten zum pylorischen, zum gastro-pylorischen und zum gastrischen Rhythmus sind in den Tabellen 1 bis 4, sowie in Abbildung 3 dargestellt.

In der folgenden Tabelle sind die mittlere Periodendauer eines pylorischen Dreiertaktes sowie die mittlere Dauer und der Beginn der Bursts von PD, LP, PY, IC und VD eingetragen.

	Perioden- dauer [s]	Dauer PD [s]	Beginn LP [s]	Dauer LP [s]	Beginn PY [s]	Dauer PY [s]	Beginn IC [s]	Dauer IC [s]	Beginn VD [s]	Dauer VD [s]
Tier 1	0,775	0,175	0,361	0,173	0,574	0,165	0,318	0,094	0,601	0,177
Tier 2	0,774	0,166	0,329	0,221	0,562	0,213	0,272	0,082	0,611	0,147
Tier 3	0,825	0,157	0,302	0,227	0,559	0,196	0,277	0,091	0,639	0,151
Mittelwert	0,792	0,166	0,331	0,207	0,565	0,191	0,289	0,089	0,617	0,158

Tab.1: Pylorischer bzw. gastro-pylorischer Rhythmus. Mittlere Periodendauer, mittlere Dauer und Beginn von PD, LP, PY, IC und VD. [Periodendauer, Dauer und Beginn sind gemittelt aus den Werten von drei Tieren (N=3). Pro Tier wurden 10 Einzelmessungen durchgeführt (n=10).]

Aus Tabelle 1 kann man ablesen, dass die mittlere Periodendauer des pylorischen Dreiertaktes bei 0,792 Sekunden liegt. Am kürzesten ist die Dauer von den IC-Bursts (0,089 s). Die Bursts der anderen Neurone dauern zwischen 0,158 s (VD) und 0,207 s (LP) an.

Aus der mittleren Periodendauer und der Burstdauer der einzelnen Neuronen kann deren jeweilige Phasenlage errechnet werden, indem man für jedes Neuron die mittlere Burstdauer durch die mittlere Periodendauer dividiert. Die dabei ermittelten Ergebnisse (Beginn, Dauer und Ende der Aktivität der unterschiedlichen Nervenzellen) sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

	Beginn	Dauer	Ende
PD	0	0,211	0,211
LP	0,419	0,261	0,680
PY	0,714	0,241	0,956
IC	0,366	0,112	0,478
VD	0,780	0,200	0,980

Tab.2: Pylorischer bzw. gastro-pylorischer Rhythmus. Phasenlagen von PD, LP, PY, IC und VD (Beginn, Dauer und Ende). [Die Phasenlage der Neurone ist gemittelt aus den Werten von drei Tieren (N=3). Pro Tier wurden 10 Einzelmessungen durchgeführt (n=10).]

Zur Veranschaulichung werden die in Tabelle 2 eingetragenen Werte in einem Phasendiagramm des pylorischen Rhythmus (PR) dargestellt (Abb.3).

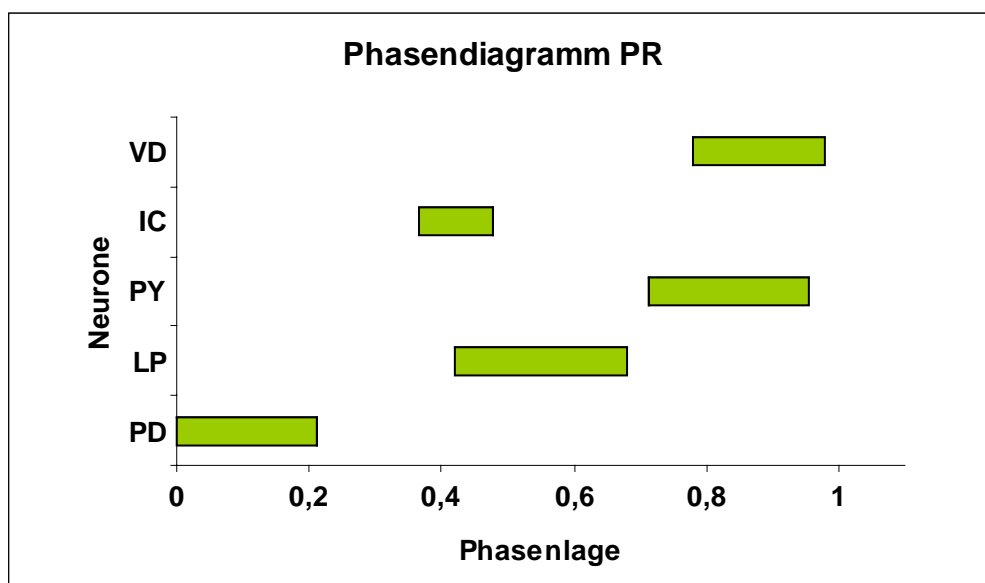


Abb.3: Phasendiagramm des Pylorischen Rhythmus PR. [Die Phasenlage der Neurone ist gemittelt aus den Werten von drei Tieren (N=3). Pro Tier wurden 10 Einzelmessungen durchgeführt (n=10).]

Aus Tabelle 2 und Abbildung 3 wird ersichtlich, dass IC mit 11,2 % die kürzeste Aktivität aufweist, alle anderen untersuchten Nervenzellen sind im Vergleich zu IC deutlich länger aktiv (von 20% bei VD bis 26,1% bei LP). Man kann erkennen, dass die Neurone des gastro-

pylorischen Rhythmus (IC und VD) mit 11,2% bzw. 20% eine kürzere Aktivität zeigen als die Neurone des pylorischen Rhythmus (PY, LP, PD) mit 24,1%, 26,1% bzw. 21,1%.

In der folgenden Tabelle (Tab.3) sind die mittlere Anzahl, die mittlere Dauer sowie die mittlere Frequenz von PD-, LP-, IC- und VD-Spikes aufgeführt.

	Anzahl PD-Spikes	Dauer PD-Burst [s]	Spike-Frequenz PD [Hz]	Anzahl LP-Spikes	Dauer LP-Burst [s]	Spike-Frequenz LP [Hz]
Tier 1	5	0,175	22,983	6,17	0,173	30,131
Tier 2	5	0,166	24,257	8	0,221	31,723
Tier 3	3,1	0,157	13,409	7,4	0,227	28,348
Mittelwert	4,37	0,166	20,216	7,19	0,207	30,067
	Anzahl IC-Spikes	Dauer IC-Burst [s]	Spike-Frequenz IC [Hz]	Anzahl VD-Spikes	Dauer VD-Burst [s]	Spike-Frequenz VD [Hz]
Tier 1	3,83	0,094	30,798	3,83	0,177	16,023
Tier 2	3,5	0,082	30,424	3,1	0,147	14,562
Tier 3	3	0,091	22,617	2,9	0,151	12,536
Mittelwert	3,44	0,089	27,946	3,28	0,158	14,374

Tab.3: Pylorischer bzw. gastro-pylorischer Rhythmus. Anzahl, Dauer und Frequenz von PD-, LP-, IC- und VD-Spikes. [Anzahl, Dauer und Frequenz der Spikes sind gemittelt aus den Werten von drei Tieren (N=3). Pro Tier wurden 10 Einzelmessungen durchgeführt (n=10).]

Aus Tabelle 3 wird ersichtlich, dass die Anzahl der VD-Spikes mit durchschnittlich 3,28 pro Burst am geringsten ist. Im Vergleich dazu ist die Zahl der LP-Spikes pro Burst mit 7,19 am höchsten. PD und IC liegen mit einer durchschnittlichen Anzahl von 4,37 bzw. 3,44 zwischen diesen beiden Werten. Entsprechend der Spikeanzahl ist die Spikefrequenz bei VD mit ca. 14,4 Hz am geringsten und bei LP mit etwa 30,1 Hz am höchsten.

In der folgenden Tabelle sind die mittlere Periodendauer des gastrischen Rhythmus sowie Dauer, Anzahl und Frequenz von LG-Spikes eingetragen.

	Periodendauer [s]	Dauer LG-Spikes [s]	Anzahl LG-Spikes	Spike-Frequenz LG [Hz]
	10,234	3,295	38	11,230
	9,604	3,498	42	11,722
	10,248	3,463	43	12,130
	12,682	3,575	42	11,470
	12,661	3,980	44	10,803
	11,759	4,176	50	11,733
Mittelwert	11,198	3,664	43,167	11,515

Tab.4: Gastrischer Rhythmus des Präparates 2.
Mittlere Periodendauer sowie Dauer, Anzahl und Frequenz der LG-Spikes (n=6).

Aus Tabelle 4 wird ersichtlich, dass die mittlere Periodendauer des gastrischen Rhythmus mit 11,198 s um etwa den Faktor 14 größer ist als die mittlere Periodendauer des pylorischen Rhythmus (0,792 s). Ein LG-Burst dauert mit ca. 43 Spikes in etwa 3,7 s. Die Spikefrequenz von LG liegt bei ca. 11,5 Hz.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wurden neben den extrazellulären auch intrazelluläre Ableitungen gemacht. Bevor die einzelnen Zellen des stomatogastrischen Ganglions angestochen wurden, wurde von jedem Präparat zunächst eine Skizze des Ganglions angefertigt (siehe Anhang 2-4).

Im Anschluss daran wurden die einzelnen Neuronen des Ganglions mit einer Glaselektrode angestochen, also intrazellulär abgeleitet und durch Vergleich mit den Spuren der extrazellulären Ableitungen konnte deren Identität ermittelt werden (genaues Vorgehen siehe Methodenteil). Beispiele zur Identifikation der einzelnen Nervenzellen finden sich im Anhang (Anhang 5 und Anhang 6). In Anhang 5 ist die intrazelluläre Ableitung von VD dargestellt. Identifiziert werden kann das Neuron dadurch, dass sich auf dem *mvn* fast zeitgleich genau dieselben Spikes befinden: Ist auf der Spur der intrazellulären Ableitung kein Spike zu sehen, so fehlt er auch auf der *mvn*-Spur. In Anhang 6 findet man die intrazelluläre Ableitung des pylorischen Neurons PY. Es kann durch dieselbe Vorgehensweise wie oben beschrieben identifiziert werden. Das bedeutet, die Spikes der intrazellulären Ableitung treten in etwa zeitgleich (immer mit derselben Verzögerungszeit) mit den PY-Spikes auf der *lvn LO*- bzw. *lvn HI*- Ableitung auf.

Wie im Methodenteil bereits beschrieben, wurde die als IC identifizierte Zelle des stomatogastrischen Ganglions mit *Lucifer Yellow* angefärbt. Die gefärbte Zelle wurde mit Hilfe einer mit dem Fluoreszenzmikroskop verbundenen Kamera fotografiert. Verschiedene Aufnahmen dieser Zelle sind in den folgenden Abbildungen 4 bis 6 dargestellt.

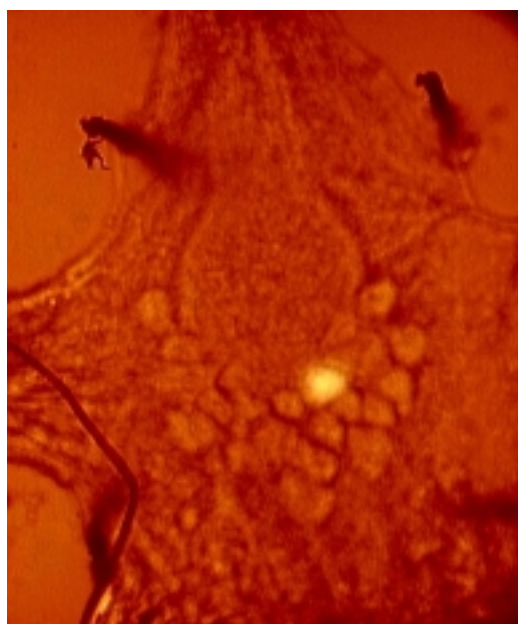


Abb.4: *Lucifer Yellow*- Färbung der Zelle IC im stomatogastrischen Ganglion. (IC ist gelb markiert.)

In Abbildung 4 kann man erkennen, dass die gefärbte, gelb markierte Zelle direkt unterhalb des Neuropils liegt. Diese Aufnahme wurde vor der Fixierung direkt nach der Injektion des Farbstoffes gemacht.

Die folgenden Abbildungen zeigen die gefärbte, hellblau markierte Zelle bei Emission von Licht im blauen Bereich. Während in Abbildung 5 das Soma mit dem weißen ungefärbten Zellkern sehr gut zu erkennen ist, sieht man in Abbildung 6 das Axon und die Axonverzweigungen sowie die umliegenden ungefärbten Zellen sehr gut.

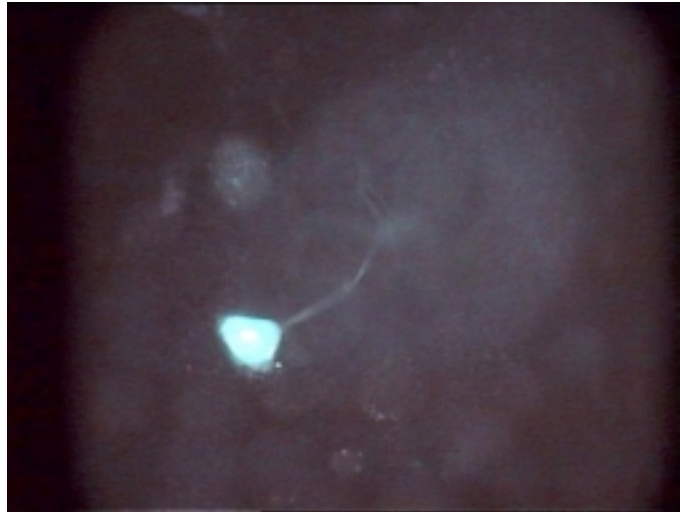


Abb.5: *Lucifer Yellow*- Färbung der Zelle IC im stomatogastrischen Ganglion. (IC ist hellblau markiert.)

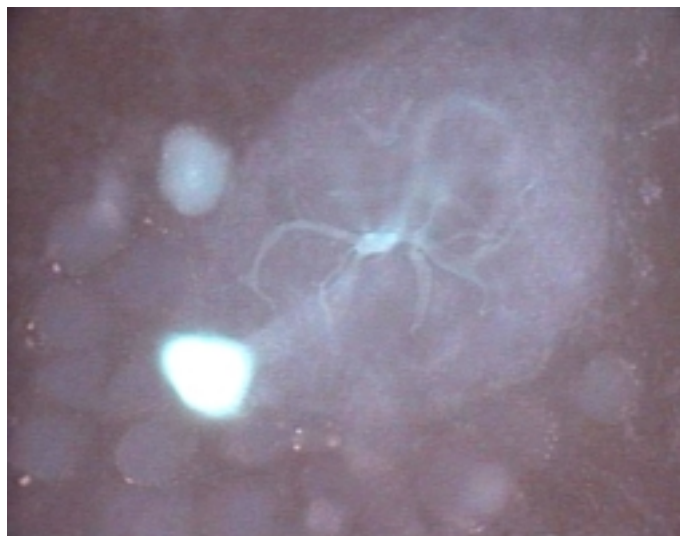


Abb.6: *Lucifer Yellow*- Färbung der Zelle IC im stomatogastrischen Ganglion. (IC ist hellblau markiert.)

Nach der Identifikation der einzelnen Zellen des stomatogastrischen Ganglions wurden die Verbindungen zwischen einzelnen Zellen durch die gleichzeitige intrazelluläre Ableitung zweier verschiedener Zellen untersucht. So haben wir in den verschiedenen Präparaten die Art der Verbindung zwischen LP und IC, zwischen LP und PD, zwischen LG und GM und zwischen GM und GM untersucht.

Die gleichzeitige intrazelluläre Ableitung von IC und LP ist in Anhang 7 dargestellt. Die Neurone konnten wieder durch Vergleich mit den extrazellulären Ableitungen von *lvn LO* bzw. *mvn* identifiziert werden. Beim Vergleich der beiden intrazellulären Spuren ist auffällig, dass bei IC und LP genau gleichzeitig IPSPs auftreten. Aus Anhang 8 wird ersichtlich, dass nach LP-Spikes (Depolarisation mit 2 nA) auch IC depolarisiert und spikt. Daraus kann man schließen, dass LP und IC chemisch oder elektrisch gekoppelt sind. Betrachtet man die Darstellung des neuronalen Netzwerkes (Abb.2), so müsste es sich zwischen LP und IC theoretisch um eine elektrische Synapse handeln. Die Überprüfung, ob es tatsächlich um eine elektrische Synapse handelt, kann mit *lowCa²⁺-Ringer* stattfinden. Nach Zugabe des *lowCa²⁺-Ringers* wird IC tonisch aktiv (Anhang 9), außerdem nimmt die Aktivität von LP deutlich ab. Auf dem *lvn* (nicht im Anhang dargestellt) fällt der Dreierhythmus weg. Laut unseren Ergebnissen (Anhang 9) dürften die beiden Zellen nicht elektrisch gekoppelt sein, da bei es bei einer Depolarisation von LP nicht zu einer erhöhten Spikefrequenz von IC kommt.

Die gleichzeitige intrazelluläre Ableitung von LP und PD ist in Anhang 10 dargestellt. Vergleicht man die beiden Kurven, so fällt auf, dass mit einer Laufzeitdifferenz von ca. 2 bzw. 5 ms nach den Bursts von LP IPSPs auf der PD-Ableitung sichtbar werden. Bei Hyperpolarisation von LP sind keine IPSPs auf der PD-Spur zu sehen (nicht im Anhang dargestellt). Man kann daraus schließen, dass LP PD durch eine inhibitorische Synapse hemmt. Um zu überprüfen, ob es sich um eine monosynaptische oder eine polysynaptische Verbindung handelt, verwendet man statt normaler Ringerlösung sog. *HIDI-Ringer* (hohe Zahl an divalenten Elektronen), der die AP-Schwelle hochsetzt. Nach Zugabe des *HIDI-Ringers* nimmt sowohl die Aktivität von PD als auch von LP ab. Mit Strom können allerdings trotzdem noch APs ausgelöst werden. Depolarisiert man nun LP, so dürften, wenn es sich um eine polysynaptische Verbindung handelt, keine IPSPs mehr auf der PD-Ableitung sichtbar sein; in unserem Versuch war dies allerdings nicht der Fall (Darstellung in Anhang 11). Durch Zugabe von *HIDI-Ringer* und anschließender Depolarisation von LP wurde also nachgewiesen, dass es sich theoretisch um eine polysynaptische Verbindung zwischen LP und PD handelt. Um zu überprüfen, ob die AP-Schwelle auch wieder nach unten gesetzt werden kann, tauscht man den *HIDI-Ringer* durch normalen Ringer aus. Bei leichter Depolarisation (mit 1 nA) von PD beginnt auch LP zu spiken; der Normalzustand ist wieder hergestellt (Anhang 13).

Die gleichzeitige intrazelluläre Ableitung von LG und GM ist nicht im Anhang dargestellt. Laut Literaturangaben (Abb.2) sollten LG und GM (disynaptisch über MG) elektrisch gekoppelt

sein, doch konnte diese Kopplung auf Grund des fehlenden gastrischen Rhythmus nicht nachgewiesen werden.

Die gleichzeitige intrazelluläre Ableitung von zwei verschiedenen GM-Zellen (nicht im Anhang dargestellt) führte zu dem Ergebnis, dass die beiden Zellen nicht elektrisch gekoppelt sind. Allerdings war beim Vergleich der beiden Ableitungen auffällig, dass beide Zellen zeitgleich IPSPs zeigten, die beiden Kurven hatten also denselben Verlauf.

Im 2. Praktikumsteil, der Simulation, sollten zunächst an Hand einfacher neuronaler Netzwerke die Grundlagen und Mechanismen der rhythmischen Aktivität erarbeitet werden. Es war zunächst unsere Aufgabe, drei Neurone zu einem zyklisch rekurrenten Inhibitionsnetzwerk zu verbinden, so dass diese alternierend rhythmisch aktiv sind. Zu diesem Zweck haben wir die Neurone über hemmende Synapsen miteinander verbunden und jeweils über einen elektrischen Dauerreiz von $1 \cdot 10^{-10}$ V erregt. Die alternierende Aktivität wurde über eine Verkürzung der Übertragungsdauer der Synapse von Neuron 3 auf Neuron 1 von 3ms auf 2ms erreicht. Zur Verstärkung des Effekts wurde zusätzlich die Leitfähigkeit der Synapse von Neuron 2 auf Neuron 3 von $6 \cdot 10^{-6}$ auf $0,5 \cdot 10^{-6}$ erniedrigt.

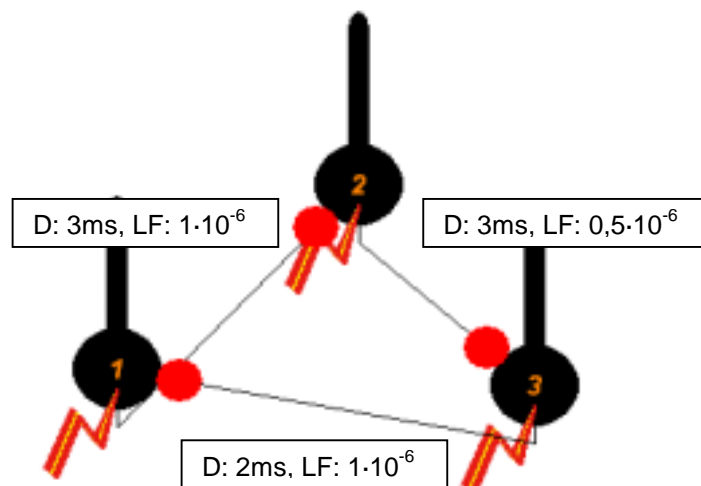


Abb.7: half-center-Verschaltung von drei Neuronen.

Bei Reizung der einzelnen Neurone bursten diese nun alternierend und bilden einen Dreier-Rhythmus (siehe Anhang 15). Dies beruht darauf, dass Neuron 3 durch die kürzere synaptische Übertragungszeit Neuron 1 hemmt, noch bevor es selbst Neuron 2 hemmen kann. Neuron 1 ist somit inaktiv, wodurch die Hemmung auf Neuron 2 entfällt. Durch die aufgehobene Hemmung beginnt Neuron 2 zu spiken und hemmt dadurch Neuron 3, welches im Anschluss daran aufhört zu spiken. Dadurch wird die Hemmung auf Neuron 1 unterbrochen, dieses wird aktiv und kann nun Neuron 2 hemmen. Auf diese Weise läuft die Erregung entgegen dem Uhrzeigersinn, also in entgegengesetzter Richtung der Hemmung durch das Netzwerk.

Anschließend sollte ein unbekannter Ionenstrom charakterisiert und seine Eigenschaften untersucht werden. Dazu wurden in einem simulierten Neuron alle anderen Ströme ausgeschaltet und ein als Teststrom bezeichneter Ionenstrom eingeschaltet. Durch verschieden starke de- und hyperpolarisierende Strominjektionen fanden wir heraus, dass der Teststrom durch Hyperpolarisation aktiviert wird. Im Anschluss daran sollte das Umkehrpotential des Stromes sowie dessen Öffnungskinetik bestimmt werden. Das Umkehrpotential des zu untersuchenden Stromes lag bei ca. $-9,3$ mV, Abbildung 8 zeigt das Diagramm, über welches das Umkehrpotential bestimmt wurde.

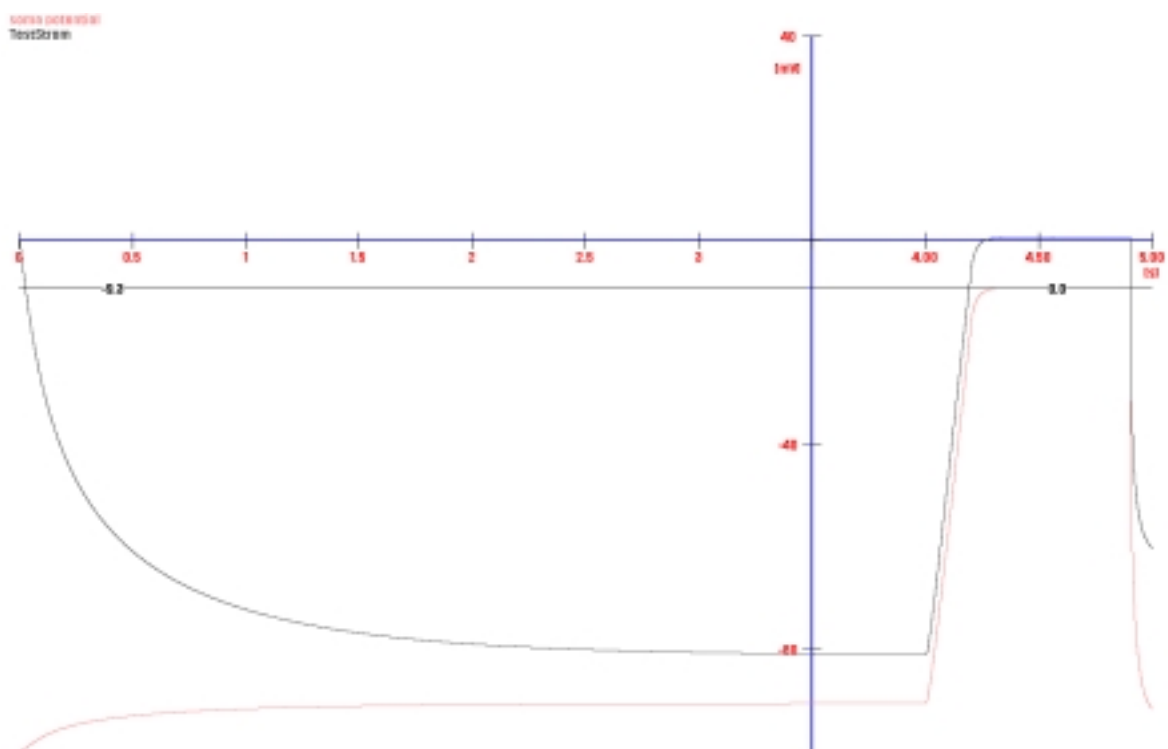


Abb.8: Darstellung des Umkehrpotential ($-9,3$ mV) des unbekanntes Ionenstroms (die braune Kurve zeigt den Stromverlauf, die rote Kurve das Somapotentiale).

Aus Abbildung 8 ist ersichtlich, dass bei Einstellen des Somapotentiale auf $-9,3$ mV (durch vorhergehende Hyperpolarisation) der Nettostromfluss gleich Null ist. Dies ist daran erkennbar, dass die Stromkurve eine Amplitude von Null aufweist.

Das folgende Diagramm (Abb.9) zeigt das ebenfalls für den Kanal bestimmte Strom-Spannungsverhältnis und damit den Zeitverlauf seiner Öffnung.

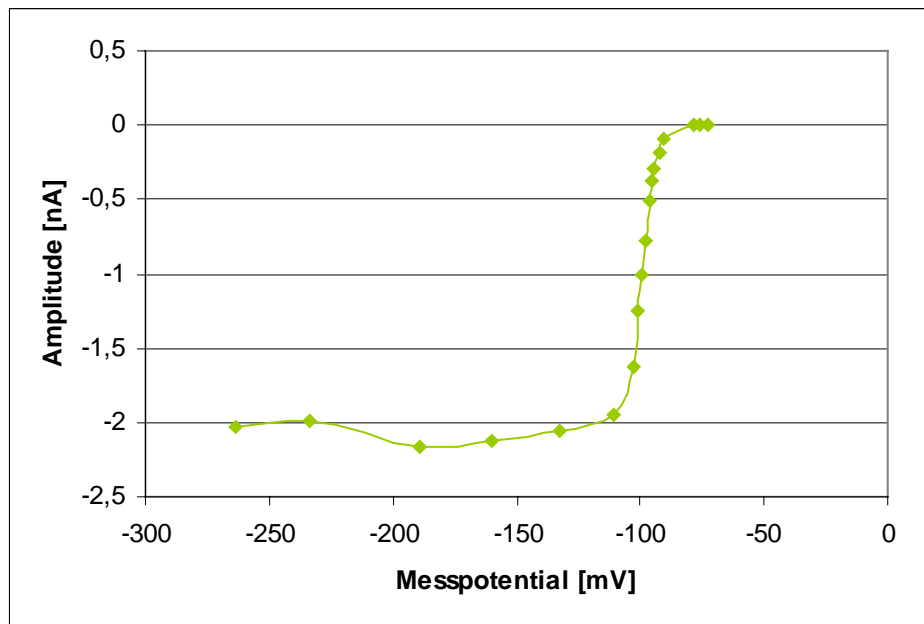


Abb.9: Strom-Spannungskurve des getesteten Stroms.

Die Kurve zeigt einen sigmoiden Verlauf (Abb.9). Man erkennt, dass bei einem Potential um ca. 100 mV bereits sehr kleine Potentialänderungen zu einer sprunghaften Veränderung des Stromes führen. Bis ca. -175 mV und ab -75 mV verläuft die Kurve annähernd eben, was bedeutet, dass hier auch größere Potentialänderungen kaum einen Einfluss auf die Stromstärke haben.

Nach diesen der Vorbereitung und Einarbeitung dienenden Aufgaben sollte anhand der in elektrophysiologischen Untersuchungen gesammelten Daten der gastrische Rhythmus des STNS simuliert werden. In allen folgenden schematischen Abbildungen der Netzwerke sind erregende Synapsen in grün, hemmende in rot und elektrische in schwarz dargestellt.

Zu Beginn wurde uns die Information gegeben, dass der gastrische Rhythmus durch die alternierende Aktivität zweier gastrischer Neurone, LG und Int1, gebildet wird. Diese Neurone werden extern durch das Projektionsneuron MCN1 erregt, außerdem ist der gastrische Rhythmus vom pylorischen Rhythmus abhängig.

Das Netzwerk wurde durch das schrittweise Hinzufügen der beteiligten Elemente nacheinander zusammengefügt und simuliert.

Zunächst stellten wir den Stromreiz auf MCN1 so ein, dass dieses mit einer Frequenz von ca. 25 Hz zu spiken begann; dies ergab sich durch einen elektrischen Reiz von $4,48e^{-10}$, für die weitere Simulation wurde das Neuron durch einen Dauerreiz erregt.

Im Anschluss daran stellten wir die synaptische Verbindung zwischen dem Projektionsneuron und dem LG-Neuron her. MCN1 liefert über eine erregende Synapse die Grunderregung für LG, außerdem hemmt LG MCN1 in einer Rückkopplung über eine hemmende Synapse auf die MCN1-Terminale. Da in *madSim* Neurone nur als Soma mit einem Dendriten dargestellt werden können, wurde das Axon von MCN1 über ein zusätzliches Neuron simuliert, welches als Nicht-Spiker eingestellt und als MCN1-Terminale bezeichnet wurde; auf die gleiche Weise wurde auch das Axon von LG simuliert. Die Erregung von MCN1 auf LG wird über eine langsame chemische Synapse vermittelt. Um diese im Programm simulieren zu können, wurde ebenfalls ein als "langsame Synapse" bezeichnetes Neuron in das Netzwerk eingebaut. Die Abbildungen 10 und 11 zeigen schematisch die bis zu diesem Zeitpunkt simulierte Verbindung zwischen MCN1 und LG.

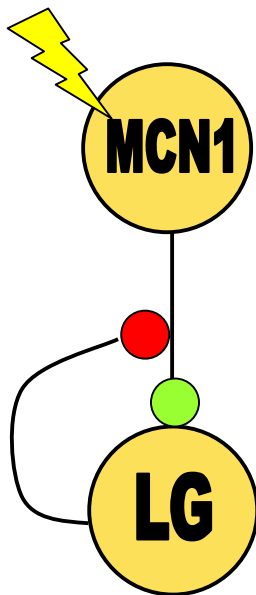


Abb.10: Synaptische Verbindung zwischen MCN1 und LG ohne elektrische Synapse.

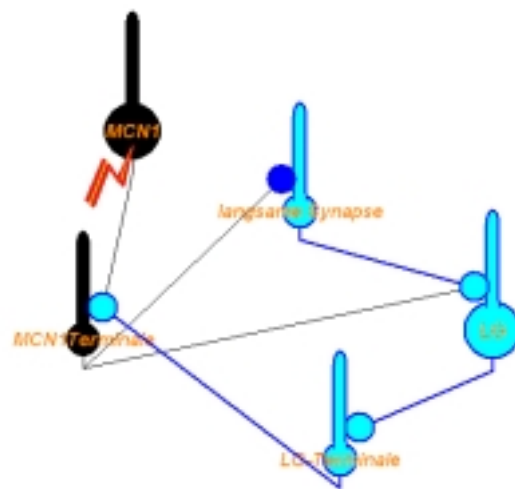


Abb.11: Synaptische Verknüpfung zwischen MCN1 und LG mit "Hilfsneuronen" ohne elektrische Synapse, dargestellt in *madSim*.

Die Laufzeit der Synapse von MCN1 auf die MCN1-Terminale wurde auf 24 ms eingestellt, da dies mit der über elektrophysiologische Untersuchungen ermittelten Laufzeitdifferenz zwischen einer Erregung in MCN1 und einer daraus resultierenden Erregung in LG entspricht. Um die langsame erregende Synapse von der MCN1-Terminale auf das LG-Neuron einzustellen, erhielten wir von unseren Versuchsbetreuern Ausdrücke, auf denen die Amplitude und deren Zeitverlauf für das LG-Neuron nach einer Reizung durch die chemische Synapse von MCN1 zu sehen waren (siehe Anhang 14). Dementsprechend stellten wir die langsame Synapse zunächst so ein, dass ein Einzel-AP von der MCN1-Terminale ein EPSP von ca.10 mV in der langsamen Synapse auslöste. Die Einstellung der Amplitude wurde durch Veränderung der synaptischen Leitfähigkeit, die Einstellung des zeitlichen Verlaufs des EPSP durch Veränderung der Kapazität erreicht.

Es ist bekannt, dass MCN1 und LG außerdem über eine elektrische Synapse gekoppelt sind, diese wurde anschließend in das Netzwerk zwischen der MCN1-Terminale und dem LG-Neuron eingefügt. Um die Synapse als in beide Richtungen leitend simulieren zu können,

muss sowohl eine elektrische Synapse von der MCN1-Terminale auf LG, als auch von LG auf die Terminale hinzugefügt werden. Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die neue Verschaltung (Abb.12 und Abb.13).

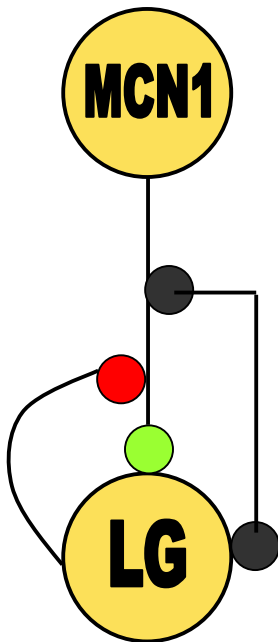


Abb.12: Synaptische Verbindung zwischen MCN1 und LG mit elektrischer Synapse

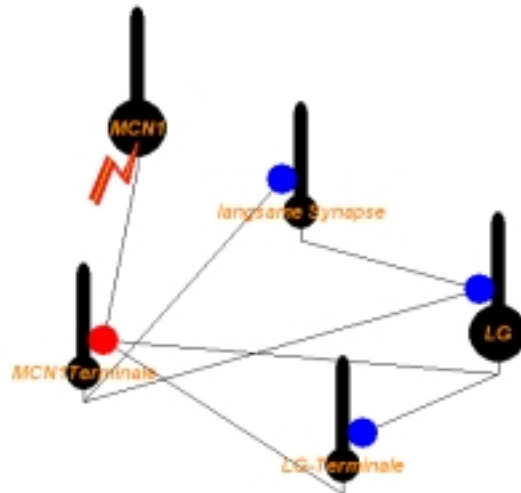


Abb.13: Synaptische Verknüpfung zwischen MCN1 und LG mit "Hilfsneuronen" und elektrischer Synapse, dargestellt in *madSim*.

Nach dem Hinzufügen der elektrischen Synapse konnte man deutlich eine Verlangsamung der Aktivität des LG-Neurons erkennen (Anhang 17), was bedeutet, dass sowohl die Burstdauer als auch die Interburstdauer wesentlich verlängert waren.

Von unseren Betreuern wurde uns mitgeteilt, dass die Dauer eines LG-Burst bei ca. 2 ms und die Interburstdauer bei ca. 4 ms liegen sollte. Dies wurde durch die Veränderung von zwei verschiedenen Parametern erreicht. Zum einen wurde die Kapazität der LG-Terminale erhöht, was zu einer Verlängerung sowohl der Burst- als auch der Interburstdauer führte. Zum anderen wurde die Leitfähigkeit der hemmenden Synapse von der LG-Terminale auf die MCN1-Terminale erhöht. Durch die stärkere Hemmung verändert sich das Verhältnis von Burst zu Interburst zu Gunsten des letzteren, was bedeutet, dass sich die Interburstdauer verlängert, während sich die Burstdauer verkürzt.

Im Anschluss an die Einstellung des Rhythmus von LG wurde das Int1-Neuron in das Netzwerk eingebaut. Dieses bildet mit LG ein *half-center*, LG und Int1 hemmen sich also gegenseitig. Außerdem erhält auch Int1 einen erregenden Eingang von MCN1.

Die Erregung durch MCN1 wurde durch eine direkte chemische Synapse von der MCN1-Terminale auf Int1 dargestellt, die Laufzeit der Synapse wurde ebenfalls auf 24 ms eingestellt. Die Stärke der hemmenden Synapsen von LG auf Int1 und von Int1 auf LG wurden zunächst auf den gleichen Wert eingestellt. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen schematisch das Netzwerk aus MCN1, LG und Int1.

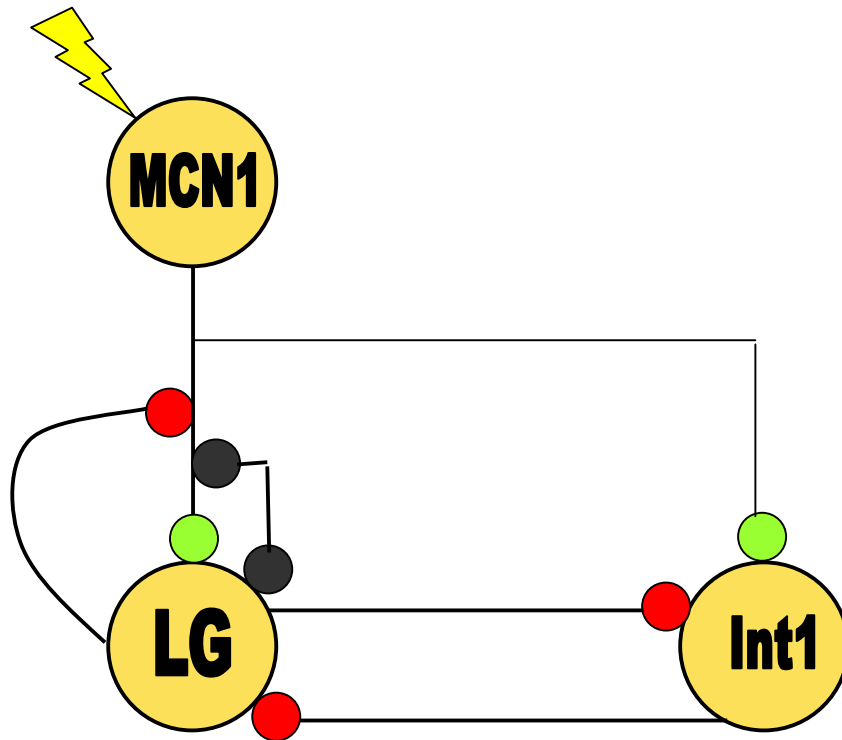


Abb.14: Schematische Darstellung der Verknüpfung von MCN1, LG und Int1

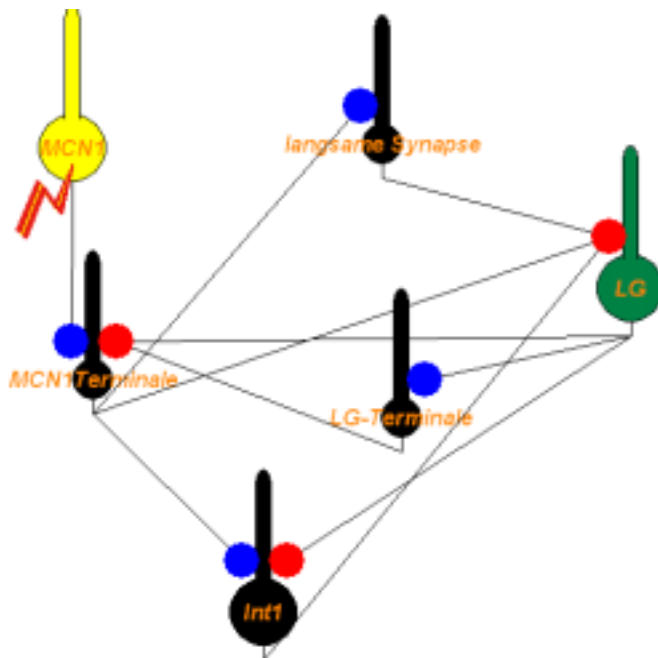


Abb.15: Netzwerk aus MCN1, LG und Int1 mit "Hilfsneuronen", wie es in *madSim* dargestellt wird.

In den Ableitungen in Anhang 18 erkennt man die alternierende rhythmische Aktivität in den Neuronen Int1 und LG, was heißt, dass LG immer dann aktiv ist, wenn Int1 nicht aktiv ist und umgekehrt. Diese alternierende Aktivität der beiden Neurone liegt dem gastrischen Rhythmus zu Grunde.

Zum Abschluss sollten wir den Einfluss des pylorischen Rhythmus auf den gastrischen Rhythmus simulieren und untersuchen. In der Simulation wurde der pylorische Rhythmus durch das Schrittmachenneuron AB dargestellt. Zunächst wurde das AB-Neuron simuliert, in dieses wurde dann ein elektrischer Strom injiziert, um dessen Schrittmachereigenschaften zu simulieren. Der Strompuls war ein Rechteck mit einer Dachdauer von 0,2 ms und einer Pause von 0,8 ms; die Reizstärke wurde so eingestellt, dass aus jedem Stromreiz ein Burst aus ca. 8 AP in AB resultierte. AB wurde anfangs nur über eine hemmende Synapse mit Int1 verbunden.

Nach dem Einbau des AB-Neurons konnte man erkennen, dass Int1 immer dann zu spiken aufhörte, wenn AB aktiv war (Anhang 19). Allerdings konnte man keinen Einfluss von AB auf den gastrischen Rhythmus erkennen, da sich an der Burst- und Interburstdauer von LG nichts geändert hatte. Dies ließ darauf schließen, dass die Hemmung von Int1 auf LG zu schwach und die rhythmische Aktivität von LG unabhängig von Int1 war. Diese Vermutung wurde auch dadurch bestätigt, dass die LG-Bursts immer zu unterschiedlichen Phasenlagen von Int1 begannen, also die letzten Int1-Burst vor einem LP-Burst immer unterschiedlich lang waren. Bei einem hemmenden Einfluss von Int1 auf LG dürfte LG immer nur dann zu spiken beginnen, wenn Int1 zu spiken aufhört. Um den Einfluss von Int1 auf LG zu verstärken, wurde die Leitfähigkeit der hemmenden Synapse erhöht. Außerdem wurde auch die Kapazität von LG erhöht.

Danach wurde die Hemmung auf Int1 so verstärkt, dass Int1 pro Burst ca. 3 - 4 AP generiert. Anschließend wurde der Einfluss des pylorischen Rhythmus auf den gastrischen Rhythmus untersucht. Dazu wurde die Periodendauer von AB schrittweise um 0,5 s von 0,5 s bis auf 5 s erhöht, wobei die Phasenlage der AB-Bursts von 20% beibehalten wurde. Es wurde jeweils die aus der Änderung resultierende Periodendauer des gastrischen Rhythmus sowie die Dauer der LG-Bursts bestimmt. Die folgende Tabelle zeigt die ermittelten Werte.

Periodendauer GR	Dauer LP-Burst	Dauer Interburst	Periodendauer PR	Dauer AB-Burst
7,875	2,541	5,334	0,5	0,1
7,083	2,458	4,625	1	0,2
6,916	2,708	4,208	1,5	0,3
7,917	2,625	5,292	2	0,4
7,041	2,583	4,458	2,5	0,5
8,083	2,625	5,458	3	0,6
8,330	2,375	5,955	3,5	0,7
7,542	2,500	5,042	4	0,8
8,541	2,458	6,083	4,5	0,9
10,209	2,417	7,792	5	1,0

Tab.5: Periodendauer des PR mit daraus resultierender Dauer des GR sowie LP-Burstdauer und Interburstdauer des LP.

Das folgende Diagramm (Abb.16) zeigt die direkte Abhängigkeit des gastrischen Rhythmus von der Dauer des pylorischen Rhythmus, dargestellt durch eine veränderte Periodendauer des AB.

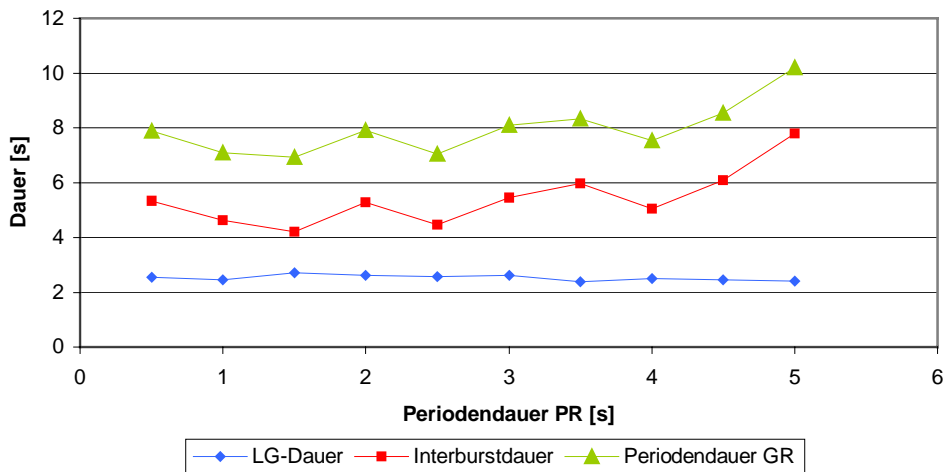


Abb.16: Abhängigkeit der Periodendauer des gastrischen Rhythmus (GR) von der Periodendauer des pylorischen Rhythmus (PR).

Man erkennt, dass bei einer Zunahme der Periodendauer des pylorischen Rhythmus die Periodendauer des gastrischen Rhythmus ebenfalls zunimmt. Die Dauer der LG-Spikes bleibt relativ konstant, während die Interburstdauer mit verlängerter pylorischer Periodendauer in gleichem Maße zunimmt wie die Periodendauer des gastrischen Rhythmus.

Zum Abschluss wurde das AB-Neuron noch über eine hemmende Synapse mit MCN1 verbunden. Die folgende Abbildung 17 zeigt den schematischen Aufbau des kompletten von uns simulierten Netzwerkes.

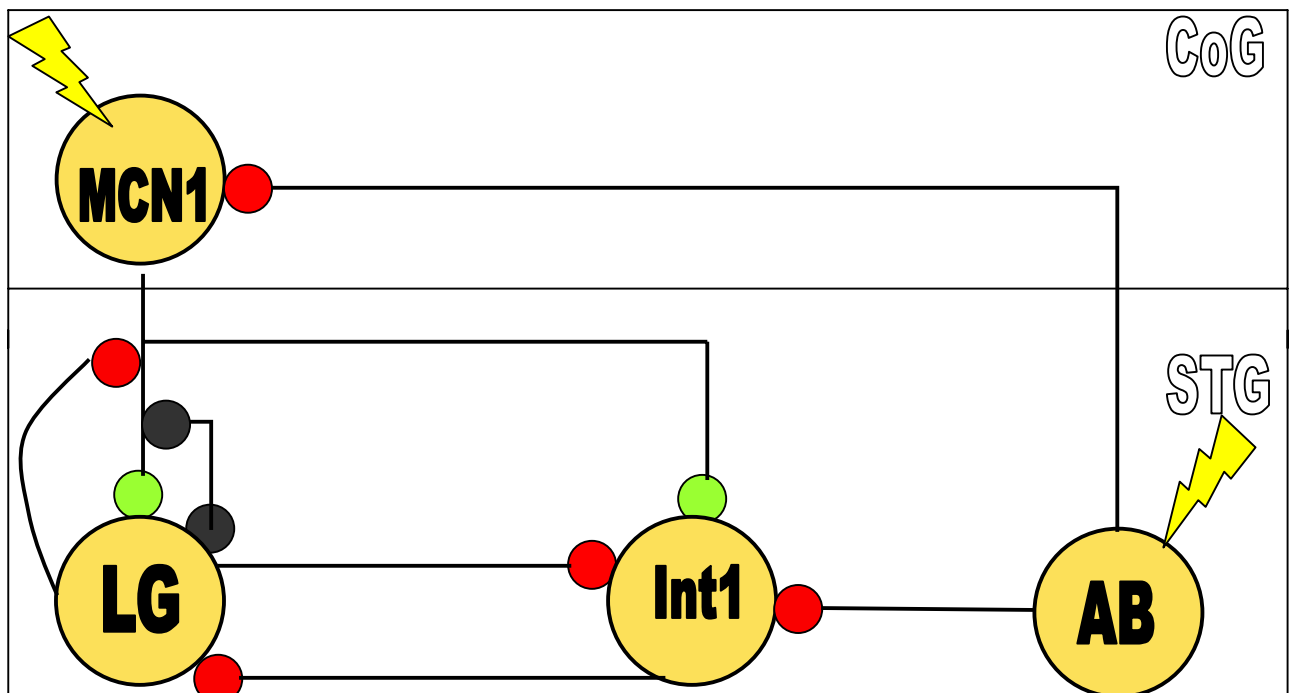


Abb.17: Komplettes Netzwerk aus MCN1, LG, Int1 und AB

Durch die Hemmung von MCN1 über AB sollte der gastrische Rhythmus schneller werden, was eine Abnahme der Periodendauer bedeutet. Um dies zu bestätigen, wurde zunächst die Periodendauer des gastrischen Rhythmus und die LP-Burstdauer unter Einfluss der Hemmung von AB auf MCN1 betrachtet. Es wurde eine Periodendauer von 6,96 s sowie eine Burstdauer von 2,45 s bestimmt. Nach Abschalten des Stromreizes auf AB, also einem Abschalten der Hemmung auf MCN1 wurde eine mittlere Periodendauer von 8,97 und eine Burstdauer von 2,36 ermittelt. Es zeigt sich also ein deutlicher Einfluss der Hemmung auf den gastrischen Rhythmus, von dieser Hemmung betroffen ist allerdings wieder hauptsächlich die Interburstdauer. Man erkennt ebenfalls eine stärkere Aktivität des Int1-Neurons.

Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen von Bartos et al. in "Coordination of Fast and Slow Rhythmic Neuronal Circuits". Die Abbildungen 18 und 19 zeigen Auszüge aus diesen Ergebnissen. Man erkennt dort deutlich, dass sich bei einem inaktiven pylorischen Rhythmus (entsprechend der ausgeschalteten hemmenden Synapse von Int1 auf MCN1) die Periodendauer des gastrischen Rhythmus mehr als verdoppelt (Abb.19).

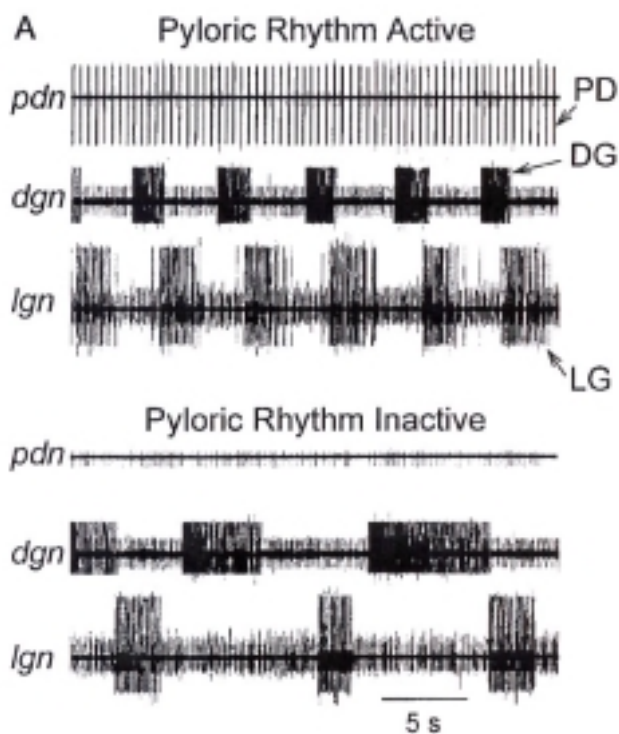


Abb.18: Einfluss des PR auf LG und DG.
[aus: M Bartos et al., Coordination of Fast and Slow Rhythmic Neuronal Circuits]

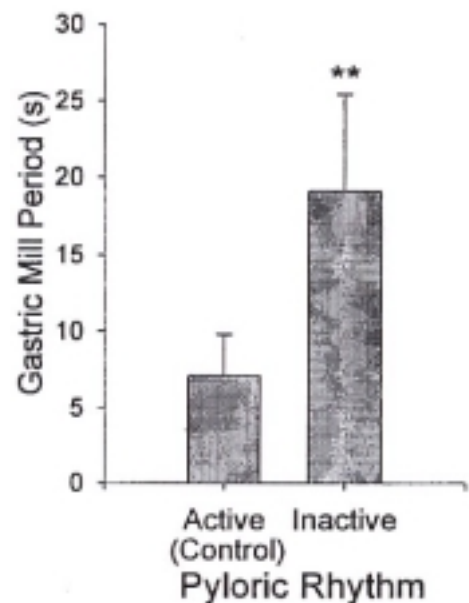


Abb.19: Einfluss des PR auf den GR. [aus: M Bartos et al., Coordination of Fast and Slow Rhythmic Neuronal Circuits]

Die folgende Abbildung 20 zeigt noch einmal das fertige Netzwerk wie es in *madSim* dargestellt wird.

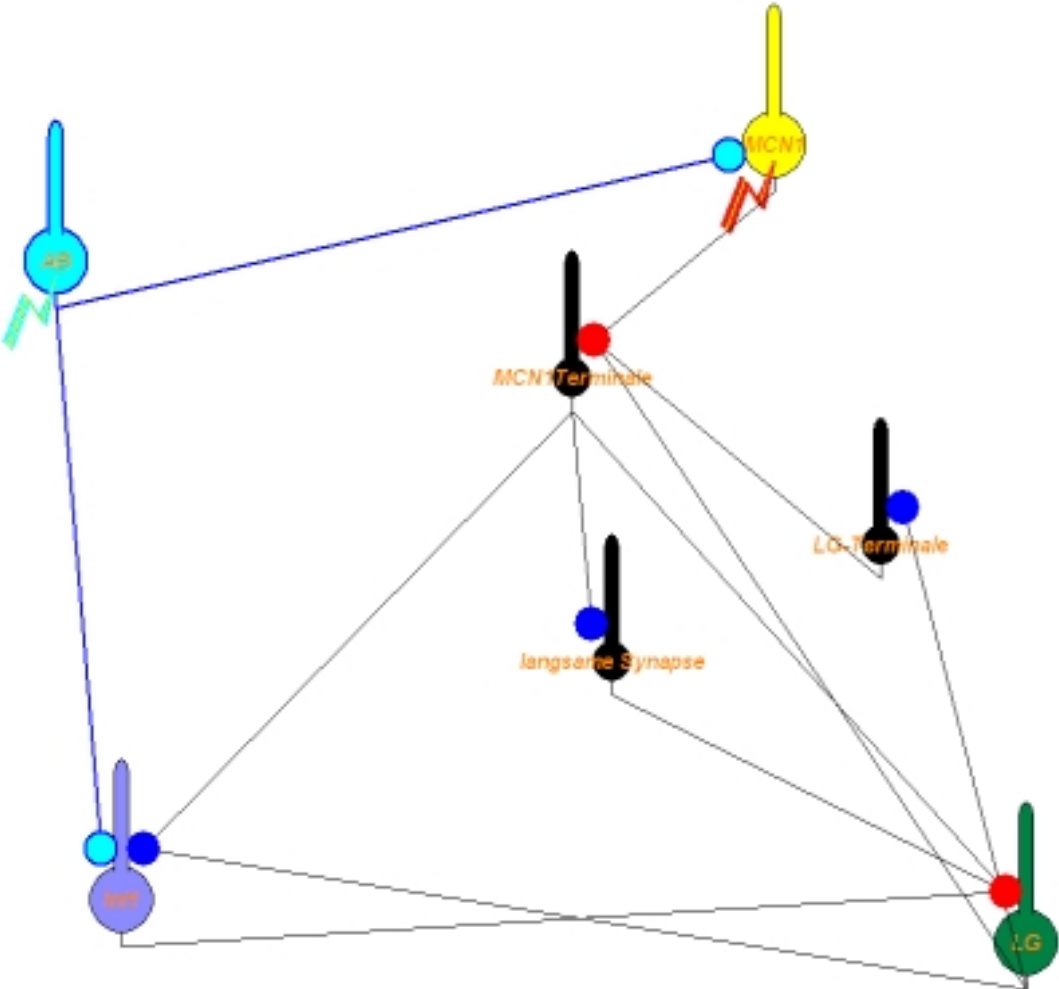


Abb.20: Fertiges Netzwerk zur Erzeugung des gastrischen Rhythmus, dargestellt in *madSim*.

5. Diskussion

Die von uns ermittelten Phasendauern des pylorischen und des gastrischen Rhythmus entsprechen mit 0,79 s bzw. 11,2 s den Literaturangaben. Diese liegen für den pylorischen Rhythmus bei 0,5 bis 2 Sekunden, für den gastrischen Rhythmus bei 6 bis 25 Sekunden.

Die Rhythmusdauer ist sowohl von der Temperatur als auch von anderen Einflüssen (z.B. Neuromodulatoren) abhängig.

Die gleichzeitige intrazelluläre Ableitung von IC und LP (Anhang 7) ergab zunächst, dass die beiden Zellen gekoppelt sein müssen, da nach LP-Spikes (bei Depolarisation mit 2 nA) auch IC depolarisiert wird und spikt (Anhang 8). Aus dieser Tatsache kann man schließen, dass LP und IC chemisch oder elektrisch gekoppelt sein müssen. Betrachtet man die Darstellung der Verschaltungen in diesem neuronalen Netzwerk (Abb.2), so sieht man, dass es sich zwischen LP und IC theoretisch um eine elektrische Synapse handeln. Die Überprüfung dieser Vermutung wird, wie in den Ergebnissen bereits erwähnt, mit *lowCa²⁺-Ringer* durchgeführt. Durch die Verwendung des *lowCa²⁺-Ringers* kann der Vesikelzyklus verhindert werden. Kommt ein AP in der präsynaptischen Zelle an, so strömt im Normalfall Ca²⁺ durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle in die Zelle ein und die an die präsynaptische Membran andockten Vesikel verschmelzen mit dieser. Während diesem als Exocytose bezeichneten Vorgang wird der Transmitter in den synaptischen Spalt entlassen und diffundiert zur postsynaptischen Membran, wo er an Rezeptoren bindet. Bei der Bindung des Transmitters an den Rezeptor kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger Kanäle in der postsynaptischen Membran und so zur Ausbildung postsynaptischer Potentiale (EPSPs und IPSPs). Verwendet man nun anstatt der normalen Ringerlösung *lowCa²⁺-Ringer*, so kann der Vesikelzyklus und somit auch die Exocytose nicht stattfinden und somit das Signal nicht an die postsynaptische Zelle weitergeleitet werden. Würde es sich zwischen LP und IC also um eine chemische Synapse handeln, so könnte ein Depolarisationssignal bei *lowCa²⁺-Ringer* nicht von LP an IC weitergegeben werden. Betrachtet man nun die Ausdrücke in Anhang 9 (Depolarisation von LP mit 2 nA) und Anhang 10 (Depolarisation von IC mit 2 nA), so lässt sich keine Kopplung zwischen LP und IC erkennen. Bei der Depolarisation eines der beiden Neurone zeigt das jeweils andere keine Reaktion. Die elektrische Kopplung zwischen IC und LP (siehe Abb.2) konnte in unserem Versuch also nicht nachgewiesen werden. Daraus kann man schließen, dass die Synapse zum Zeitpunkt des Versuches wohl inaktiv war. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, müsste der Versuch mehrmals und mit verschiedenen Präparaten wiederholt werden. Wie in den Ergebnissen bereits beschrieben, zeigen beide Kurven vor dem Block mit *lowCa²⁺-Ringer* zeitgleich dieselben IPSPs (Anhang 7), was bedeutet, dass beide denselben inhibitorischen Eingang von PY erhalten. Diese Beobachtung bestätigt die Literaturangaben, dass von PY eine hemmende Synapse zu LP und zu IC läuft (Abb.2). Grund für das im Ergebnisteil beschriebene Wegfallen des pylorischen Rhythmus ist das Nachlassen der Hemmung von LP und PY. LP und PY stellen ein sog. *half-center* dar, was bedeutet, dass sie miteinander durch hemmende Synapsen verbunden sind. Durch den *lowCa²⁺-Ringer* wird der Vesikelzyklus verhindert, wodurch die hemmende Wirkung nachlässt.

Die gleichzeitige intrazelluläre Ableitung von LP und PD führte zu der Vermutung, dass PD durch LP über eine inhibitorische Synapse gehemmt wird. Grund für diese Vermutung ist, dass mit einer Laufzeitdifferenz von ca. 2 ms (Versuch 2) bzw. 5 ms (Versuch 1) nach den Bursts von LP IPSPs auf der PD-Ableitung sichtbar werden (Anhang 10). Bei Hyperpolarisation von LP findet man keine IPSPs mehr auf der PD-Ableitung. Wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, verwendet man zur Überprüfung, ob es sich um eine mono- oder eine polysynaptische Verbindung handelt, einen sog. *HIDI-Ringer*. Auf Grund der hohen Anzahl an divalenten Elektronen setzt dieser Ringer die AP-Schwelle hoch; mit positivem Strom können allerdings weiterhin Aktionspotentiale ausgelöst werden. Betrachtet man schematische Darstellungen der Verbindungen im stomatogastrischen Ganglion (Abb.2) und die kurzen Laufzeitdifferenzen bei beiden Versuchen, so erwartet man den Nachweis einer monosynaptischen Verbindung. Würde es sich also um eine monosynaptische Verbindung zwischen LP und PD handeln, so müssten bei Depolarisation von LP weiterhin IPSPs auf der PD-Ableitung zu sehen sein. Doch wir erhielten in beiden Versuchen das Ergebnis, dass es sich wohl um eine polysynaptische Verbindung zwischen LP und PD handeln müsste (Anhang 11). Es waren bei Depolarisation von LP keine IPSPs mehr auf der Ableitung zu sehen, was theoretisch bedeuten würde, dass auf Grund der hochgesetzten AP-Schwelle in den zwischengeschalteten Neuronen keine APs mehr ausgelöst werden und so PD nicht mehr gehemmt werden kann. Da man aber aus Literaturangaben weiß, dass es sich um eine monosynaptische Verbindung handelt (Abb.2) und auch die kurzen Laufzeitdifferenzen dafür sprechen, sollte der Versuch mehrmals an verschiedenen Präparaten wiederholt werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Auch die gleichzeitige intrazelluläre Ableitung von LG und GM bestätigte unsere Vermutungen nicht. Laut Literaturangaben (Abb.2) sollten LG und GM (disynaptisch über MG) elektrisch gekoppelt sein, doch konnte diese Kopplung auf Grund des fehlenden gastrischen Rhythmus nicht nachgewiesen werden. Normalerweise hätte bei elektrischer Kopplung eine De- bzw. Hyperpolarisation des einen Neurons zur De- bzw. Hyperpolarisation des anderen Neurons führen müssen. Diese Tatsache war an unserem Präparat wegen des fehlenden gastrischen Rhythmus nicht nachweisbar. Laut unseren Ergebnissen (nicht im Anhang dargestellt), handelt es sich, wenn überhaupt, um eine nicht direkte elektrische Kopplung, da die Spikes bei Depolarisation auf beiden Ableitungen zu verschiedenen Zeitpunkten auftreten. Man kann bei Vergleich der beiden Ableitungen keine Korrelation feststellen. Auch dieser Versuch sollte, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, mehrmals und nur an Präparaten, die einen gastrischen Rhythmus aufweisen, durchgeführt werden.

Die gleichzeitige intrazelluläre Ableitung von zwei verschiedenen GM-Zellen (nicht im Anhang dargestellt) führte zu dem Ergebnis, dass die beiden Zellen nicht elektrisch gekoppelt sind. Dies konnte dadurch bewiesen werden, dass bei De- bzw. Hyperpolarisation der einen Zelle nicht zeitgleich eine De- bzw. Hyperpolarisation auf der Ableitung der

anderen Zelle zu sehen war. Allerdings war beim Vergleich der beiden Ableitungen auffällig, dass beide Zellen zeitgleich IPSPs zeigten, was bedeutet, dass beide Zellen dieselben Eingänge vom gleichen Projektionsneuron erhalten.

Die im zweiten Praktikumsteil behandelten Aufgaben zeigen sowohl die Möglichkeiten, als auch die Grenzen und Probleme der Simulation neuronaler Netzwerke.

So war es eines unserer ersten Probleme, dass das Programm *madSim* nicht die Darstellung von Axonen erlaubt; dies war allerdings u.a. notwendig um die Hemmung von LG auf das Axon von MCN1 darzustellen. Dieses Problem konnte durch die Einbindung von "Hilfsneuronen" in das Netzwerk gelöst werden. Auch andere synaptische Übertragungen wurden mit Hilfe von zwischengeschalteten Neuronen dargestellt. So ermöglicht der Einbau der LG-Terminale, über welche die Hemmung auf die MCN1-Terminale übertragen wird, die Veränderung der Kapazität zur Veränderung der Übertragungseigenschaften ohne das gesamte Netzwerk zu beeinflussen. In diesem Fall war das Zwischenneuron besonders wichtig, da die Kapazitätsänderung der LG-Terminale eine wichtige Rolle für die Einstellung des richtigen Rhythmus spielte. Eine Erhöhung der Kapazität bewirkte in diesem Fall, dass sich sowohl die Burstdauer als auch die Interburstdauer verlängerten, was gleichbedeutend ist mit einer Verlangsamung des gastrischen Rhythmus. Die Kapazität ist ein Maß für die Menge an Ladung, die bei einer bestimmten Spannung in der Membran gespeichert werden kann. Eine höhere Kapazität bedeutet also, dass mehr Ladung gespeichert werden kann und es damit auch länger dauert, die Membran bei einer ankommenden Erregung umzuladen. Im Fall der LG-Terminale dauert es damit länger, bis sie das MCN1-Neuron hemmt und auch länger, bis die Hemmung wieder aussetzt. Dies führt zu der im Ergebnisteil beschriebenen verlängerten Burst- und Interburstdauer.

Eine andere Möglichkeit, den gastrischen Rhythmus bzw. das Verhältnis von Burst zu Interburst zu beeinflussen, war eine Veränderung der Stärke der präsynaptischen Hemmung. Eine Erhöhung der Leitfähigkeit der hemmenden Synapse von der LG-Terminale auf die MCN1-Terminale bewirkte eine Veränderung des Verhältnisses von Burst- zu Interburstdauer zu Gunsten des Interbursts; das bedeutet eine kürzere Zeit der Aktivität des LG-Neurons mit einer längeren Phase der Hemmung.

Diese beiden Möglichkeiten der Modulation des neuronalen Rhythmus zeigen bereits einen Vorteil des Programms *madSim*. Dieses Programm ermöglicht es, verschiedene Charakteristika der Verschaltung und der einzelnen Neurone zu verändern und die Auswirkungen dieser Veränderungen zu beobachten. In elektrophysiologischen Untersuchungen können existierende Verbindungen zwischen Neuronen untersucht werden und evtl. auch die Auswirkungen der Änderung verschiedener Parameter durch chemische Stoffe beschrieben werden. Allerdings können nicht die Auswirkungen spezifischer Änderungen untersucht werden, auch da man nicht sicher sagen kann, welchen Einfluss bestimmte Chemikalien auf andere Netzwerkparameter haben.

Dies kann aber auch einen Nachteil der Netzwerksimulation durch Computerprogramme darstellen. Diese Programme ermöglichen zwar die Untersuchung ganz spezieller Eigenschaften von Netzwerken und einzelnen Neuronen, sie liefern aber nur theoretische

Werte. Ob sich die untersuchten Änderungen im intakten Organismus auf die gleiche Weise auswirken würden, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da natürliche neuronale Netzwerke eine so hohe Komplexität erreichen, dass sie nie exakt mit Computern nachzustellen sein werden. Allerdings bietet *madSim* eine hervorragende Möglichkeit, elektrophysiologische Untersuchungen zu unterstützen. So können zum einen Vermutungen überprüft werden, die auf den Ergebnissen der Elektrophysiologie basieren. Andererseits ist es aber auch möglich, bestimmte Aspekte am Computer zu untersuchen und anschließend durch geeignete Versuche am Präparat zu überprüfen, ob diese im realen Netzwerk eine Rolle spielen. Wenn in elektrophysiologischen Versuchen Ergebnisse entstehen, die zunächst nicht erklärt werden können, können so verschiedenen Lösungsansätze mit *madSim* getestet werden. So ist es evtl. möglich, bestimmte Vermutungen im Voraus auszuschließen und andere dann gezielt am Präparat zu überprüfen.

Neben der Kapazität der Neurone und der synaptischen Leitfähigkeit kann ebenfalls die synaptische Übertragungszeit variiert werden. So ist es möglich, auch ohne die Simulation eines Axons die Leitungsgeschwindigkeit und die Länge des Axons zu berücksichtigen.

Durch die Injektion von Stromreizen in ein Neuron können u.a. die intrinsischen Burstereigenschaften bestimmter Neurone nachgestellt werden. So wurde der Einfluss des pylorischen auf den gastrischen Rhythmus durch den Einbau des AB-Neurons in das Netzwerk untersucht. Bei diesem Neuron handelt es sich um einen sog. endogenen Oszillator, welcher mit einem anderen Schrittmachenneuron (PD) elektrisch gekoppelt ist und zusammen mit diesem den Rhythmus für das pylorische Netzwerk vorgibt. Durch eine Änderung des injizierten Strompulses ist es möglich, eine Veränderung des pylorischen Rhythmus nachzustellen und so dessen Einfluss auf den gastrischen Rhythmus zu beobachten. Die so erhaltenen Ergebnisse können quantifiziert werden und sind reproduzierbar. Dies gilt für alle Ergebnisse, die durch die Simulation erhalten werden.

Der pylorische Rhythmus in einem lebenden Präparat kann evtl. auch durch Zugabe bestimmter Chemikalien oder durch Temperaturänderungen variiert werden; es ist dann jedoch auch wieder möglich, dass andere unbekannte Faktoren eine Rolle spielen. Bei einer erneuten Durchführung des Versuches kann es sein, dass man ganz andere Ergebnisse erhält. Dies zeigte sich auch bei unseren elektrophysiologischen Untersuchungen. So ließ sich z.B. die elektrische Koppelung zwischen LP und IC nicht nachweisen, ein Grund dafür kann, wie beschrieben, sein, dass die Synapse zum untersuchten Zeitpunkt gerade inaktiv war. Solche störenden Faktoren können bei theoretischen Untersuchungen am Computer ausgeschlossen werden.

Dies zeigt, dass sich die Simulation durch ihre vereinfachte Darstellung vor allem zur Untersuchung grundlegender Prinzipien eignet; diese Vereinfachung begrenzt allerdings auch die Möglichkeiten der Simulation.

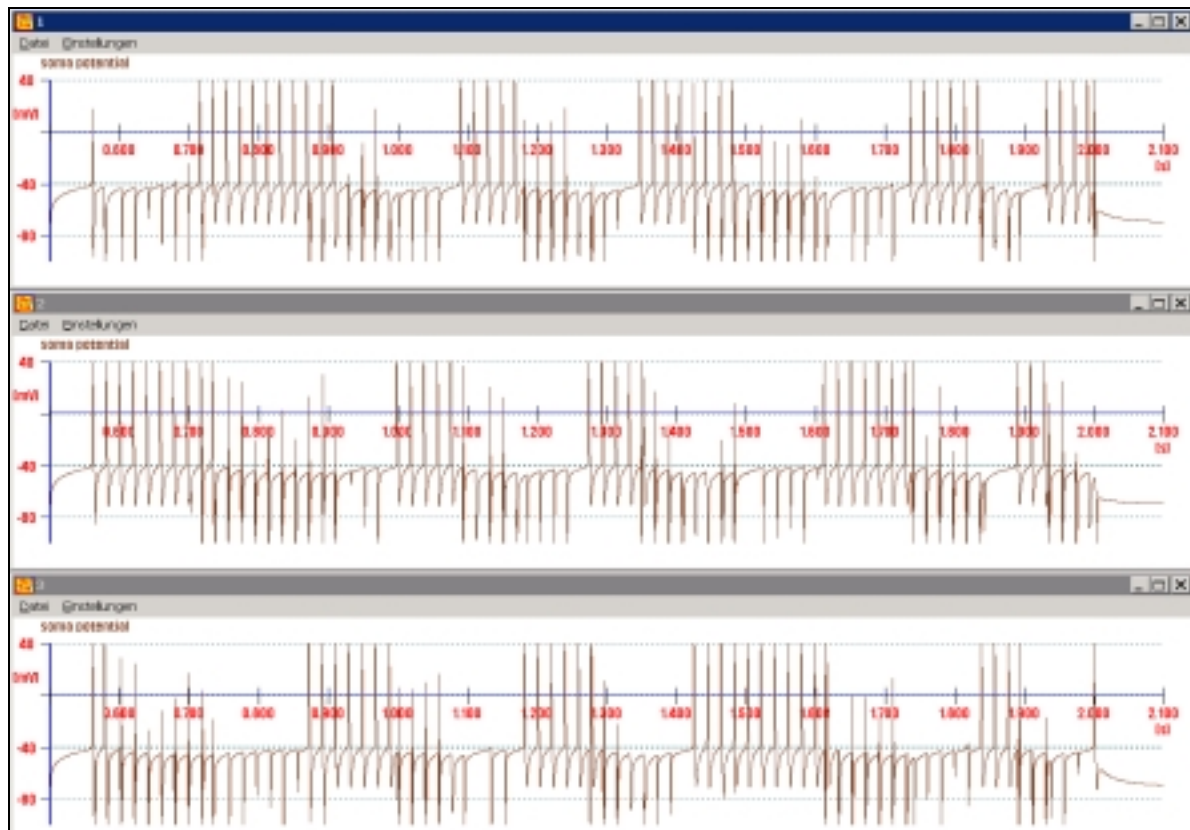
Bei dem in der Simulation untersuchten unbekanntem Ionenstrom handelt es sich um den in der Einleitung beschriebenen I_H -Current, er wird durch Hyperpolarisation aktiviert und wirkt dieser entgegen. Das Umkehrpotential des Stroms wurde bei -9,3 mV bestimmt. Bei dieser

Spannung findet also trotz geöffneter I_H -Kanäle kein Nettoionenstrom statt. Dies zeigt sich in Abbildung 8 durch eine Amplitude der Stromkurve von Null. Abbildung 9 zeigt die Strom-Spannungskurve des Kanals und damit dessen Öffnungskinetik. Sie zeigt die Stärke des Stromflusses durch den I_H -Kanal bei einem gegebenen Membranpotential. Bei Potentialen über ca. -175 mV ist der Kanal maximal geöffnet. Durch den plötzlichen Anstieg der Kurve erkennt man, dass der Kanal bei ca. -100 mV die größte Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit zeigt. Je weiter das Membranpotential von diesem Wert in positiver Richtung abweicht, desto weniger I_H -Kanäle sind noch geöffnet. Bei Potentialen über 25 mV findet kein Stromfluss durch den Kanal mehr statt, bei diesen Spannungswerten kann er nicht mehr aktiviert werden.

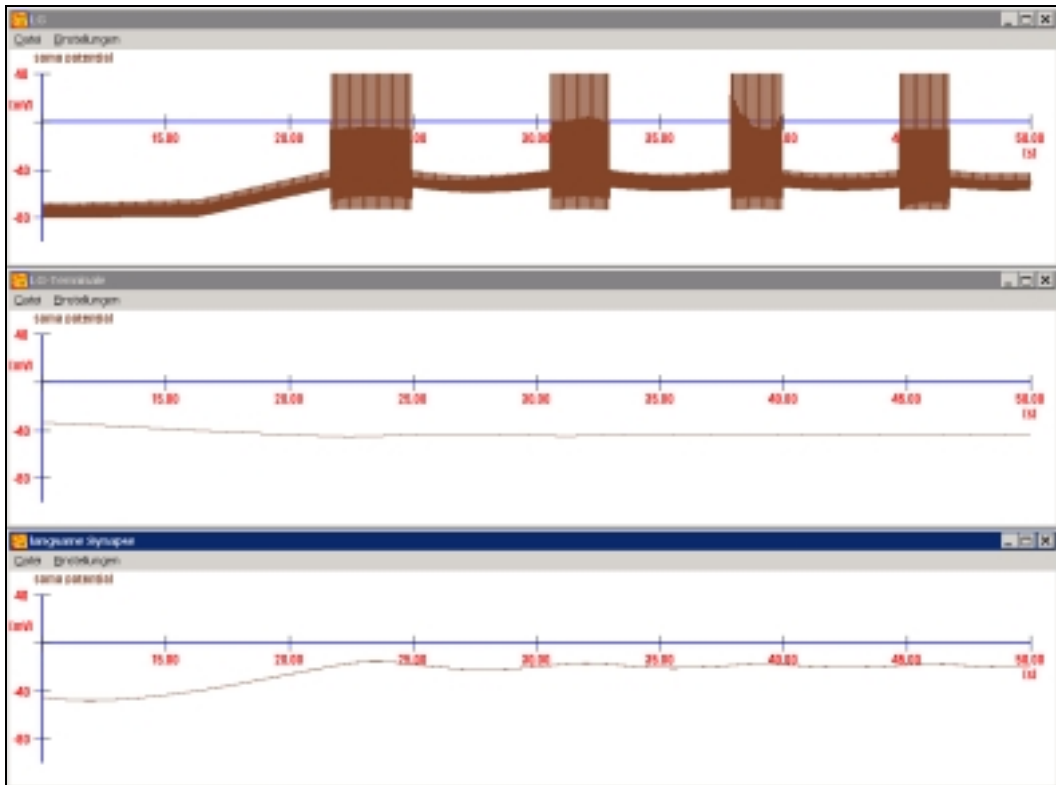
6. Literaturverzeichnis

- Praktikumsskript Fortgeschrittenenpraktikum Neurobiologie 2004, Modul III/IV, Intrazelluläre Ableitungen im stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses und Simulation eines neuronalen Netzwerkes
[aus: <http://www.neurobiologie.de/STG-FP2004.pdf> und http://www.neurobiologie.de/STNS_warum_und_wieso_Ulm.pdf]
- Reichert, H. Neurobiologie. Thieme-Verlag, Stuttgart 2000
- Nusbaum, M. A small-system approach to motor pattern generation, Macmillan Magazines Ltd 2002
- Bartos M., Coordination of Fast and Slow Rhythmic Neuronal Circuits, The Journal of Neuroscience 1999

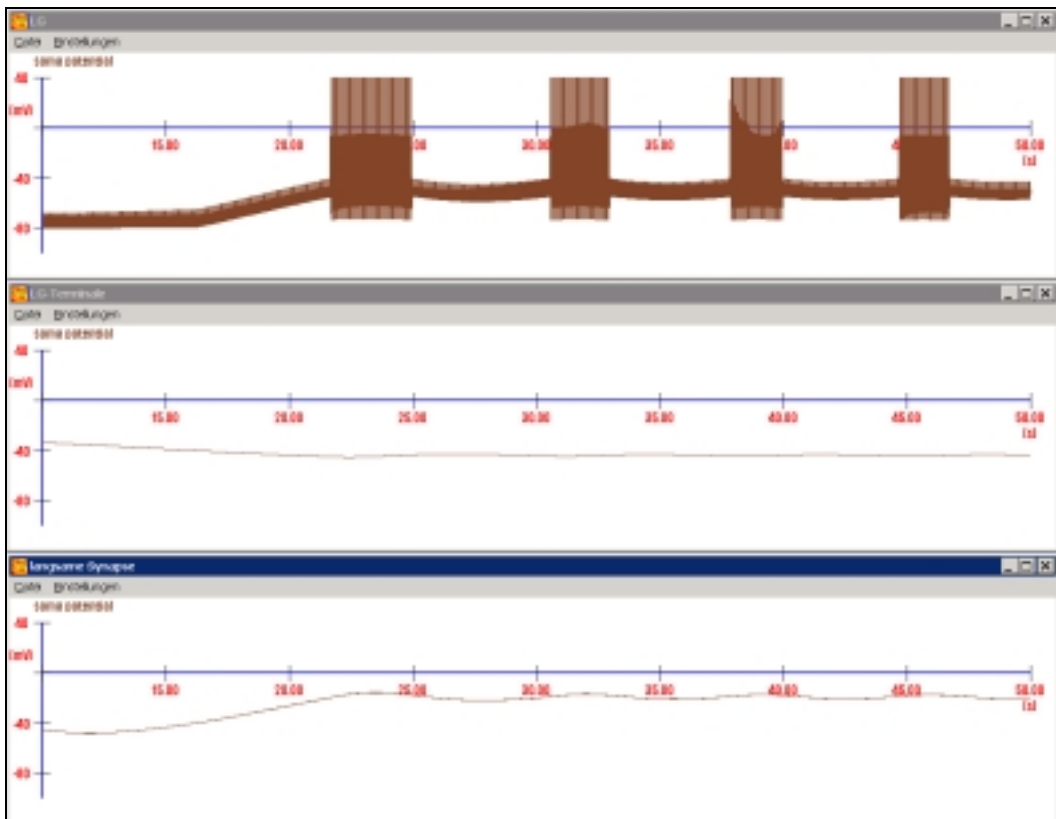
7. Anhang



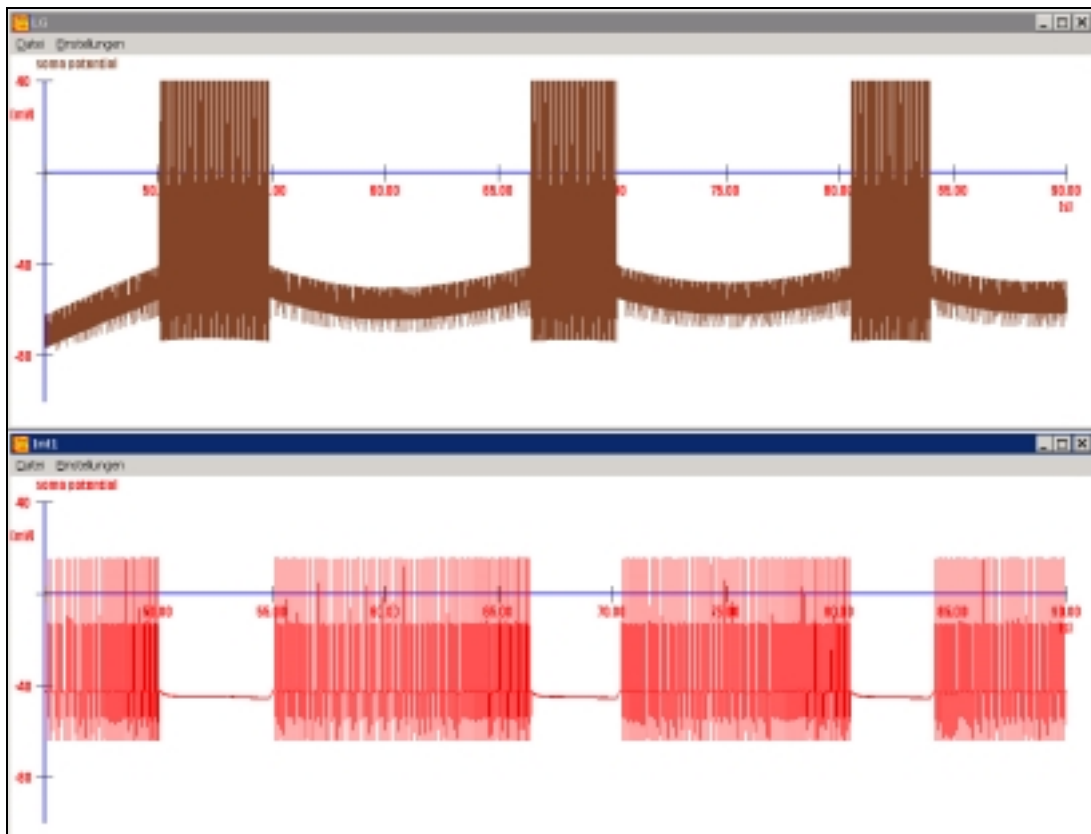
Anhang 15: Dreier-Rhythmus einer *half-center*-Verschaltung der Neurone.



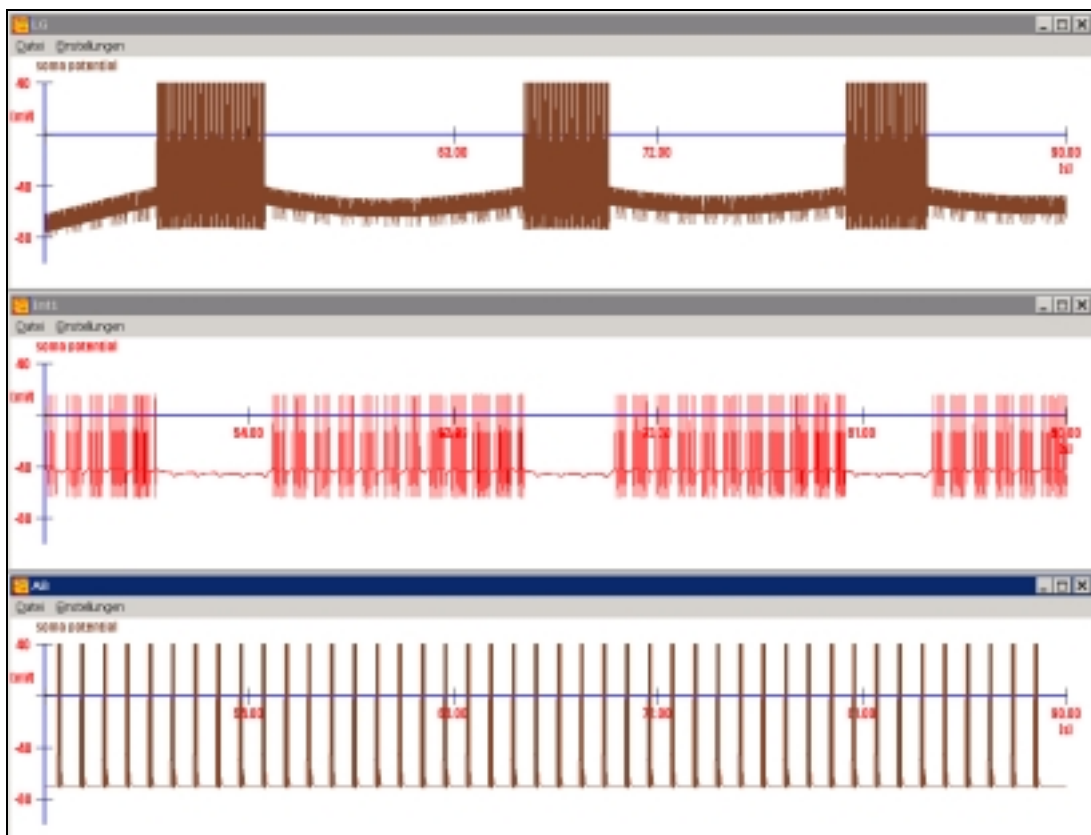
Anhang 16: Erregungsmuster von LG, LG-Terminals und der langsamen Synapse nach Verknüpfung von MCN1 und LG über eine erregende Synapse von der MCN1-Terminals auf LG und einer hemmenden Synapse von LG auf die MCN1-Terminals.



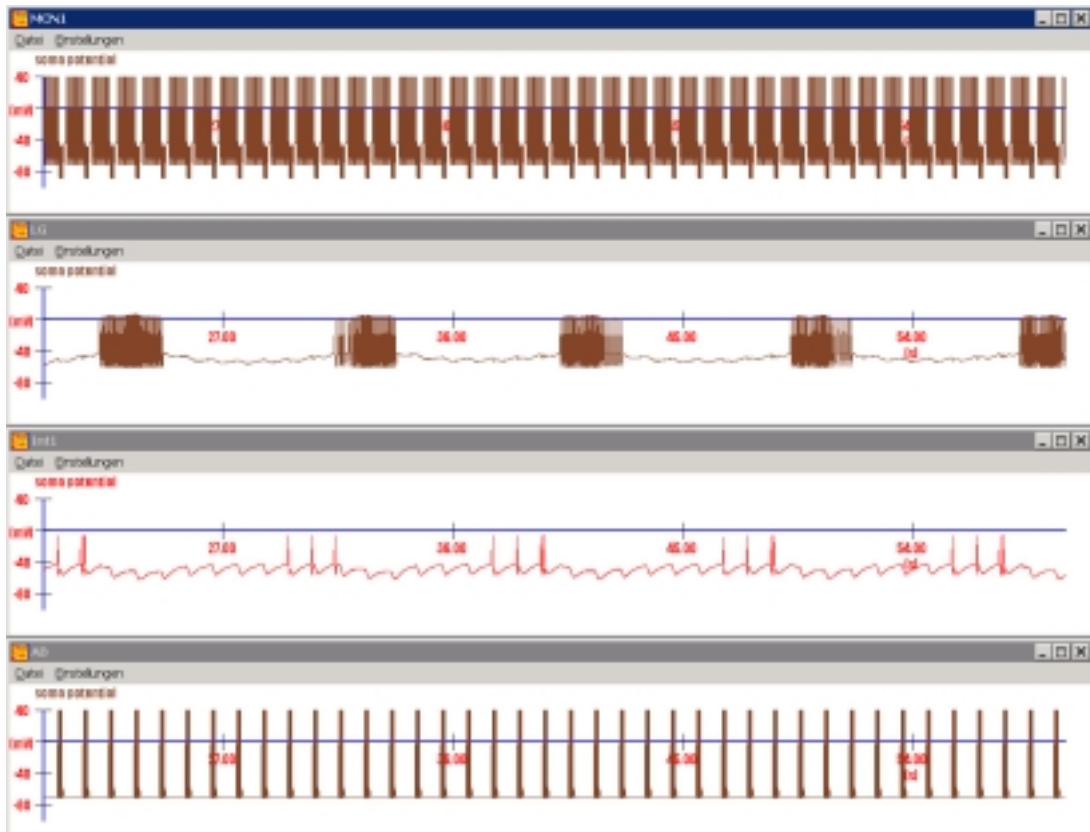
Anhang 17: Aktivität von LG, LG-Terminals und der langsamen Synapse nach Hinzufügen der elektrischen Synapse zwischen MCN1-Terminals und LG.



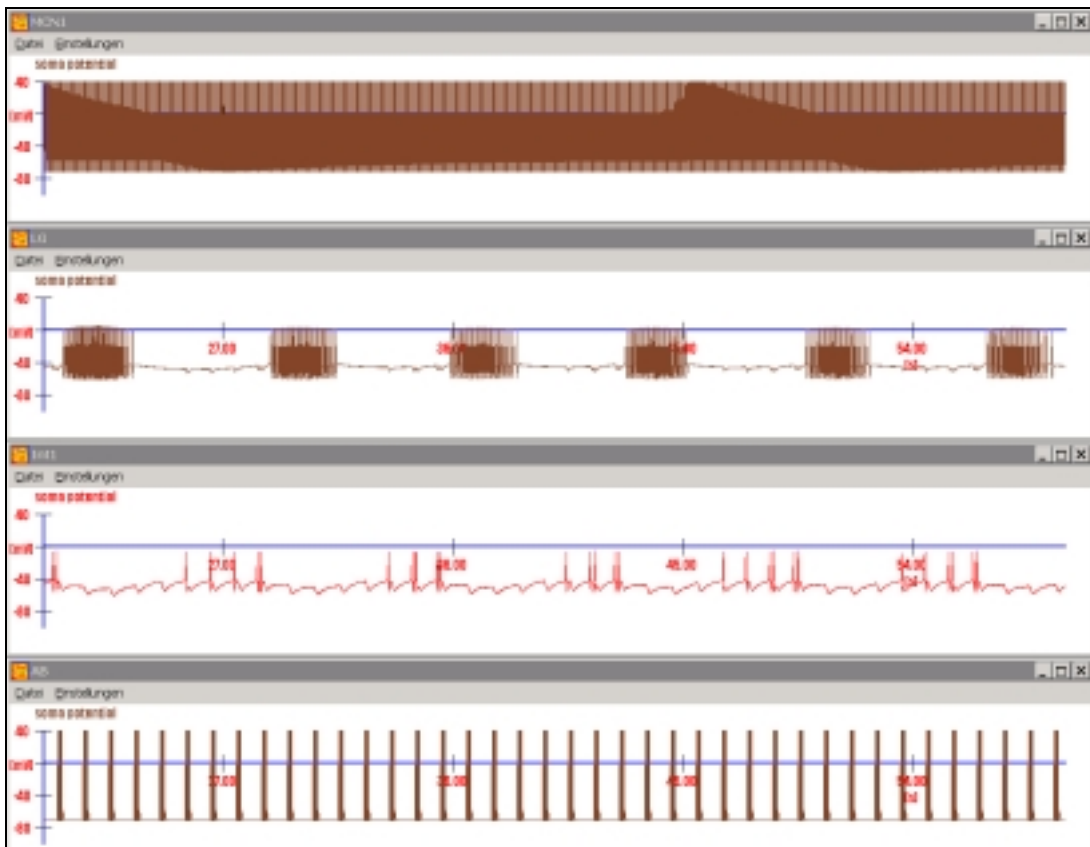
Anhang 18: Alternierende Aktivität von LG und Int1 (*half-center*) nach dem Einbau von Int1 in das Netzwerk.



Anhang 19: Rhythmus von LG und Int1 unter Einfluss der Hemmung von Int1 über AB.



Anhang 20: Der gastrische Rhythmus unter Einfluss der hemmenden Synapse von AB auf MCN1.



Anhang 21: Der gastrische Rhythmus ohne eine Hemmung von MCN1 durch AB.