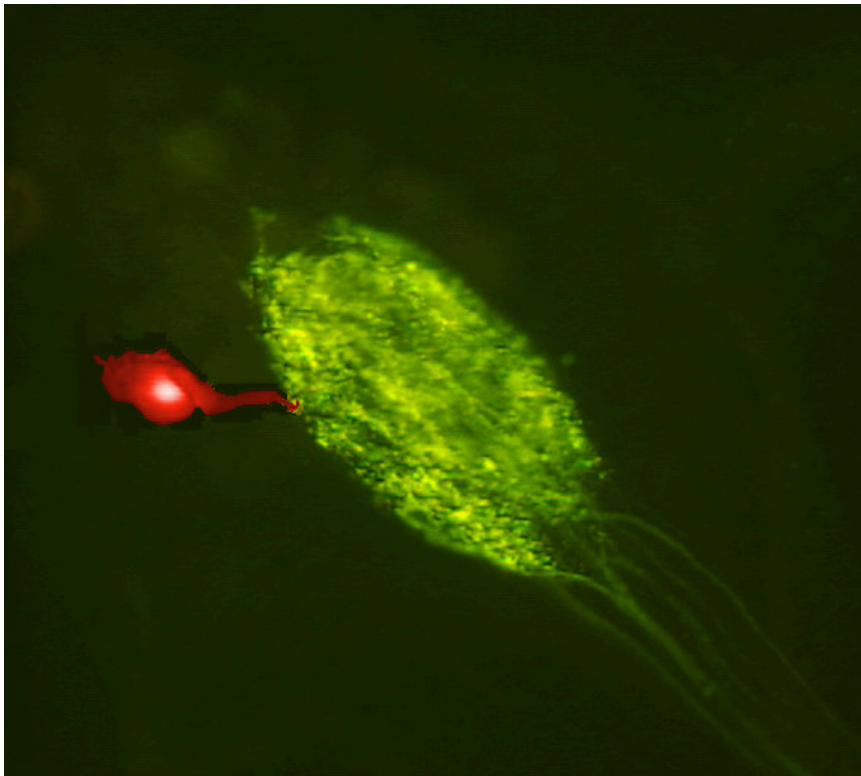


Abteilung Neurobiologie, Universität Ulm

Neurobiologisches Großpraktikum

Intrazelluläre Ableitungen im Stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses und Simulation eines neuronalen Netzwerks



Antikörperfärbung (anti-Proctolin) der Projektionsneurone des Stomatogastrischen Nervensystems des Taschenkrebses und Lucifer Yellow Färbung des LG Neurons. © W. Stein.

Ort: M25/Raum 5105 Niveau 5, Abteilung Neurobiologie, www.neurobio.de

Betreuer: Dr. Wolfgang Stein	wstein@neurobiologie.de	0731-50-22636
Ulrike Hedrich	uli@neurobiologie.de	0731-50-22647
Jessica Ausborn	jessica.ausborn@uni-ulm.de	0731-50-22644

Der Praktikumsteil „Intrazelluläre Ableitungen im Stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses / Simulation eines neuronalen Netzwerks“ hat zum Ziel, Ihnen einen Einblick in die grundlegenden Prinzipien der Verarbeitung und der Organisation eines neuronalen Netzwerks zu geben. Sie werden sich im Verlauf des Kurses einige anatomische, sowie physiologische und zelluläre Grundlagen erarbeiten, die wichtig für die Generierung eines motorischen Musters sind. Darüber hinaus werden Sie Techniken erlernen und anwenden, die sich in der experimentellen Elektrophysiologie als Standard etabliert haben. Im zweiten Teil werden Sie die gewonnenen Daten in einer Computersimulation umsetzen und die Grenzen und Fähigkeiten des untersuchten neuronalen Netzwerkes und der angewandten Simulation testen.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Erzeugung von jeglichem Verhalten ist der adäquate Aufbau des Nervensystems und die entsprechende Ansteuerung der jeweils ausführenden Muskeln durch die Neuronen des Nervensystems. Aus diesem Grund ist die Registrierung der Neuronenaktivität zur Beschreibung des Verhaltens von zentraler Bedeutung für die neurobiologisch orientierte Verhaltensforschung. Gleichzeitig trägt die Analyse der neuronalen Verschaltungen zum Verständnis darüber bei, wie das Nervensystem sich speziellen Anforderungen anpasst. Ergebnisse aus den unterschiedlichsten Präparationen tragen heute zu einem immer besser werdenden Verständnis der neuronalen Funktionsprinzipien bei. Diese Prinzipien werden dann in Simulationen genutzt, um letztendlich anwendungsbezogene Probleme aller Art zu lösen. Beispiele hierfür sind künstliche Intelligenz und die Implementation neuronaler Netze in Robotern.

Die Ergebnisse elektrophysiologischer Forschung bilden weiterhin einen Tragpfeiler für modernste medizinische Heil- und Behandlungsmethoden, wie z.B. bei Krankheiten des Nervensystems wie Alzheimer und Parkinson, oder auch beim Anpassen von Prothesen, die verloren gegangene Körperteile ersetzen (neuronal gesteuerte Beinprothesen für Querschnittsgelähmte oder auch Augenprothesen mit CCD Sichtfeldern).

Der Praktikumsteil wird sich in zwei Abschnitte gliedern. Zunächst werden Sie einen Teil des neuronalen Netzwerkes des stomatogastrischen Nervensystems des Taschenkrebses untersuchen und dort die Lage und Verschaltung der beteiligten Neurone feststellen. Sie werden die Reaktion des Netzwerkes in verschiedenen Zuständen testen. Anschließend sollen Sie die gewonnenen Daten Ihren Kollegen im Simulationsteil zur Verfügung stellen, die dann versuchen werden, die gewonnenen Daten zu simulieren und zu interpretieren. Das bedeutet, dass gewonnene Daten schnellstmöglich verarbeitet und dann auch weitergegeben werden müssen.

Die Versuche, die in diesem Praktikumsteil stattfinden, sind Teil der aktuellen Forschung am stomatogastrischen Nervensystem, d.h. die Versuche sind in dieser Art noch nie vorher durchgeführt worden. Das bedeutet aber auch, dass die Versuche dynamisch der jeweiligen Situation angepasst werden müssen, und erzielte Ergebnisse an nachfolgende Gruppen weitergegeben werden müssen, damit diese an den Versuchen anknüpfen können. Die erzielten Resultate werden möglicherweise Teil zukünftiger Veröffentlichungen oder tragen zum Gestalten neuer Projekte (z.B. Diplomarbeit) oder neuer Praktikumsversuche bei.

Aus dem gleichen Grund gibt es auch keine festgelegten Arbeitszeiten, da sich Versuche nie vollständig im Voraus planen lassen. Es wird von Ihnen erwartet, dass Sie sich verantwortungsvoll den Materialien und den Versuchstieren gegenüber verhalten und entsprechende Genauigkeit und Vorsicht walten lassen. Viel Erfolg!

Voraussetzungen:

Bitte informieren Sie sich **im Voraus** über folgende Themen:

Membranpotential

Aktionspotentiale (Generierung / Frequenz / Ausbreitung)

Aktive / passive Ausbreitung

Ionenkanäle (Typen und grobe Funktionsweise)

Depolarisation, Hyperpolarisation

Graduierte Potentiale

EPSPs / IPSPs

Membranströme

Rezeptorpotentiale

Synaptische Übertragung

Transmitter

Umkehrpotential

Elektrische Synapsen

Neuromodulatoren

Synaptische Gifte (z.B. Tetrodotoxin)

Bahnung

Saltatorische Erregungsleitung

Multiterminale, multilineare Innervierung

Extra- und intrazelluläre Ableitungen

Querwiderstand und Längswiderstand, Kapazität, Zeitkonstante, Leitungsgeschwindigkeit

Nernst-Gleichung, Goldman Gleichung

Schrittmacherzellen

Oszillatoren (zentrale Mustergeneratoren, Verschaltung)

Netzwerkanalyse

Netzwerkaufbau und Funktion des stomatogastrischen Nervensystems

Für Angaben zum Stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses folgen Sie bitte diesem Link: http://www.neurobiologie.de/STNS_warum_und_wieso_Ulm.pdf

Elektrophysiologie

Machen Sie sich mit den extra- und intrazellulären Ableitmethoden und den Geräten vertraut. Ihr Betreuer wird Ihnen zeigen, welche Geräte welche Funktionen besitzen und wie sie bedient werden. Bitte lassen Sie hierbei besondere Vorsicht walten, da die Ableitgeräte mit hohen Verstärkungen arbeiten und schon durch kleine Missgeschicke wie z.B. statische Aufladung **zerstört** werden können. Bitte erden Sie sich immer, bevor sie einen Verstärkerkopf anfassen.

Wenn Sie mit den Geräten einigermaßen vertraut sind, zeigt Ihnen der Betreuer, wie Sie Daten aufzeichnen und ausdrucken können. Sie verwenden dazu eine Datensoftware auf einem Computer.

Zu Beginn sollten Sie versuchen, sich mit dem System vertraut zu machen, indem Sie einfach die spontane Aktivität der verschiedenen Nerven beobachten. Zeichnen Sie die Aktivität verschiedener Nerven auf und versuchen Sie, das erhaltene Muster zu beschreiben. Können Sie Abfolgen / Wiederholungen erkennen? Beschreiben Sie den pylorischen Rhythmus anhand der Aktivitäten auf den *dvn* oder *lvn* und *mvn* Nerven. Ist ein gastrischer Rhythmus aktiv? Charakterisieren Sie beide Rhythmen (falls vorhanden) mittels Periodendauer / Phasenlage der verschiedenen Neurone (= duty cycle) und Anzahl der Aktionspotentiale pro Burst. **Siehe auch Aufgabe 1 weiter unten.**

Wenn Sie denken, sie kennen das System zur Genüge, beginnen Sie mit intrazellulären Ableitungen. Ihr Betreuer wird Ihnen zeigen, wie Elektroden gefertigt werden und wie diese positioniert werden. **Bevor** Sie anfangen abzuleiten fertigen Sie bitte eine Zeichnung an, die die Lage der Neurone innerhalb des Ganglions möglichst genau zeigt. Während des ganzen Versuchs werden Sie Protokoll führen, was genau sie tun (bitte auch Kleinigkeiten aufschreiben), da dies für eine spätere Auswertung essentiell werden kann. Zu Beginn der Ableitung versuchen Sie bitte, verschiedene Neurone abzuleiten und die Aktivität dieser Neurone mit den extrazellulären Signalen zu vergleichen.

Folgende Aufgaben stehen zur Auswahl, bzw. sollen ausgeführt werden:

Pflichtaufgaben für alle präparierten Tiere (außer Spezialprojekte):

Bitte geben Sie bei allen Aufgaben, in denen Sie Mittelwerte ausrechnen, auch Standardabweichung und N-Zahl an!

1. Charakterisieren Sie den pylorischen Rhythmus: Nehmen Sie die pylorischen Schrittmacherneurone als Ausgangspunkt und geben Sie die durchschnittliche Periodendauer (bzw. Frequenz) an, sowie die durchschnittliche Phasenlage (+ duty cycle) und die Anzahl der Aktionspotentiale pro Burst der anderen Neurone an. Identifizieren Sie die extrazellulär abgeleiteten Neurone (und dann entsprechend später auch die intrazellulär abgeleiteten).
2. Beschreiben Sie auf gleiche Weise den gastrischen Rhythmus, falls er spontan aktiv ist.
3. Zeichnen Sie eine Karte der Somata im stomatogastrischen Ganglion.
4. Leiten Sie intrazellulär mehrere Neurone ab. Vergleichen Sie deren Aktivität mit der extrazellulär abgeleiteten Aktivität der verschiedenen Nerven. De- bzw. Hyperpolarisieren Sie die Neurone. Welchen Effekt können Sie erkennen? Ziehen Sie Rückschlüsse auf die Verschaltung der Neurone.

Liefere Sie alle Ergebnisse sofort an die Simulation!

Spezialprojekt I:

Der gastrische Rhythmus kontrolliert die Bewegungen der Zähne im Kaumagen des Taschenkrebses. Das laterale gastrische Motoneuron LG steuert dabei die Protraktion der Lateralzähne (also das Vorwärtsbewegen der seitlichen Zähne). Es innerviert z.B. den gastrischen Muskel gm6, dessen Kraft die Lateralzähne bewegt. Die neuromuskuläre Synapse zwischen LG und gm6 zeigt eine große Plastizität, d.h. die EPSPs, die in gm6 sichtbar sind, variieren sehr stark in ihrer Amplitude. So bestimmen z.B. Fazilitation, Augmentierung und post-tetanische Potenzierung die Amplitude der EPSPs.

Bisher wurde gezeigt, dass diese synaptischen Eigenschaften einen Zeitverlauf besitzen, die dem Muskel erlauben, während eines gastrischen Rhythmus eine große Kraft zu entwickeln. Die auf einen kurzen Zeitraum beschränkte Fazilitation kann hierbei durch in der Hämolymphe vorhandene Hormone / Neuromodulatoren verändert werden. Ihre Betreuerin wird Ihnen entsprechende Literatur zur Verfügung stellen. In Ihrem Projekt sollen Sie klären, ob auch länger andauernde Formen der synaptischen Plastizität (Augmentierung / post-tetanische Potenzierung) von diesen Modulatoren beeinflusst werden.

Führen Sie folgende Versuche durch (Ihre Betreuerin wird Ihnen bei Reizprotokollen und Auswertungsprozeduren helfen):

- a) Stimulieren Sie das gastrische Motoneuron LG mit einer extrazellulären Elektrode am *l_{vn}* oder *d_{vn}*. Leiten Sie den Muskel gm6 intrazellulär ab und beobachten Sie die ausgelösten EPSPs. Messen Sie das Muskelmembranpotenzial.
- b) Benutzen Sie ein paired-pulse Protokoll zur Reizung von LG. Führen Sie eine Messreihe durch, in der Sie jeweils 2 kurz aufeinanderfolgende Reize applizieren. Variieren Sie den zeitlichen Abstand der Pulse. Verändert sich die Größe des 2. EPSPs?
- c) Benutzen Sie ein Stimulusprotokoll, in dem LG zehnmal nacheinander mit einer Reizfrequenz von 5Hz aktiviert wird („Reiztrain“). Danach folgt eine Pause von 4 Sekunden, dann beginnen die nächsten 10 Reize. Insgesamt sollen 10 dieser Trains durchgeführt werden. Nach Ende des 10. Trains müssen Sie eine Pause von mindestens 1 Minute einhalten, damit sich der Einfluss der lang anhaltenden synaptischen Plastizität abbauen kann. Wiederholen Sie dann die gleiche Reizung mit 10Hz Reizfrequenz, danach mit 20 Hz.
- d) Stimulieren Sie LG so, dass es eine Aktivität aufweist, die es während eines gastrischen Rhythmus besitzt. Benutzen Sie dazu eine zuvor aufgenommene Ableitung von LG (Betreuerin fragen).
- e) Perfundieren Sie ihr Präparat anstatt mit Normalringer mit CCAP oder Allatostatin, zwei Hormonen, die im Blutkreislauf des Taschenkrebses vorkommen. Führen Sie den gleichen Test wie in b), c) und d) durch. Protokollieren Sie die Veränderungen der EPSP-Amplituden.

Spezialprojekt II:

Das Projektionsneuron MCN1 innerviert das gastrische Motoneuron LG mit einer elektrischen und einer chemischen Synapse. Die EPSPs der elektrischen Synapse verändern ihre Amplitude in Abhängigkeit des Membranpotentials der postsynaptischen Zelle LG (Coleman et al., Nature, 1995). Mit zunehmender Depolarisation wird die Amplitude größer. Es ist unklar, ob dieser Effekt durch eine Veränderung der elektrischen Synapse selbst oder postsynaptisch durch intrinsische Eigenschaften des LG Motoneurons ausgelöst wird. Sie sollen in Ihrem Projekt dieses Problem angehen, indem Sie LG intrazellulär ableiten und das Projektionsneuron MCN1 extrazellulär elektrisch aktivieren. Verwenden Sie dazu folgende Versuchsprotokolle:

a) Stimulieren Sie das Axon von MCN1 mit einer Reizfrequenz von 20 Hz und lösen Sie damit einen gastrischen Rhythmus aus. Messen Sie die Amplitude der elektrischen EPSPs in Abhängigkeit vom Membranpotential. Erstellen Sie ein Diagramm.

b) Beenden Sie die MCN1 Stimulation. Verändern Sie den Membranpotentialverlauf von LG durch Strominjektion so, dass er dem Verlauf während einer MCN1 Reizung (Aufgabe a) entspricht. Sie ändern hier also nur das postsynaptische Neuron. Applizieren Sie zusätzlich einmal de- und einmal hyperpolarisierende Strompulse. Die depolarisierenden Strompulse sollen die elektrischen EPSPs imitieren. Wozu dienen die hyperpolarisierenden Pulse? Dieser Versuch wird Ihnen zeigen, ob intrinsische Eigenschaften von LG für die Veränderung der EPSP-Amplituden verantwortlich sein könnten. Messen Sie die Amplituden der Strompulse in Abhängigkeit vom Membranpotential. Erstellen Sie ein Diagramm.

c) Imitieren Sie den Membranpotentialverlauf von LG mit Strominjektion so, dass er dem Verlauf während einer MCN1 Reizung (Aufgabe a) entspricht. Reizen Sie zusätzlich mit einer niedrigen Reizfrequenz (ca. 1 Hz) MCN1 und beobachten Sie die ausgelösten elektrischen EPSPs. Verändern sich die Amplituden der EPSPs? Erstellen Sie ein Diagramm. Was sagt dieses Experiment aus?

d) Stimulieren Sie das Axon von MCN1 mit einer Reizfrequenz von 20 Hz und lösen Sie damit einen gastrischen Rhythmus aus. Applizieren Sie zusätzlich einmal de- und einmal hyperpolarisierende Strompulse. Verändern sich die Amplituden der Strompulse. Erstellen Sie ein Diagramm.

e) Die folgenden Versuche hängen von Ihren bisherigen Ergebnissen ab. Falls die Veränderung der EPSP-Amplituden auf intrinsischen Eigenschaften des LG Neurons beruhen sollten, stellt sich die Frage, welche Eigenschaften dies sind und ob diese Eigenschaften durch die Ausschüttung von Neurotransmittern aus der MCN1 Terminale aktiviert werden. Wiederholen Sie daher Versuch b und applizieren Sie zusätzlich einige der bekannten Neurotransmitter, die in der Terminale von MCN1 vorkommen. Alternativ könnten Sie intrinsische Ionenströme in LG blockieren, z.B. durch Wegnahme von Calcium oder Blockieren der Na-Kanäle durch Lithium. Einen I_h current (fragen Sie an dieser Stelle Ihre Kollegen aus der Simulation nach den Charakteristika dieses Stroms) könnten Sie durch Cäsium blockieren.

Am Ende jeden Tages geben Sie die Präparation bitte Ihrem Betreuer, der dann entscheidet, was mit diesen passiert. Evtl. werden dann noch immunohistologische Färbungen durchgeführt.

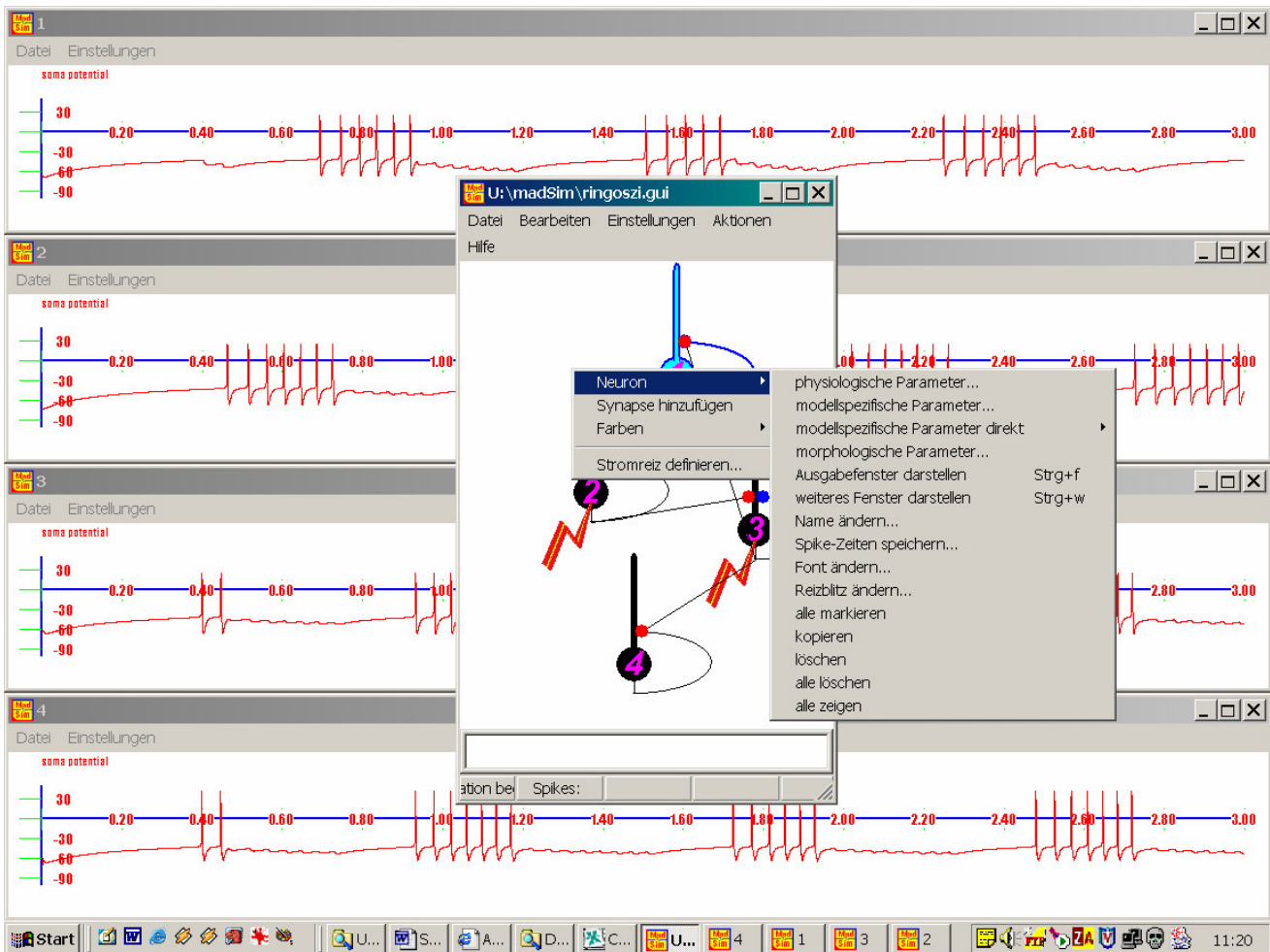
Simulation

In diesem Teil des Praktikums werden Sie sich mit der Simulation neuronaler Netze, bzw. einzelner Nervenzellen beschäftigen. Simulationen real existierender neuronaler Netze werden einerseits dazu benutzt, die gefundenen Mechanismen der Informationsverarbeitung zu bestätigen und andererseits dazu, Voraussagen über das Verhalten der Neurone in bestimmten Testsituationen zu machen. Weiterhin liefern solche Simulationen testbare Vorhersagen für Mechanismen, die dann im elektrophysiologischen Experiment nachgeprüft werden können.

In unserem Falle werden Sie mit Ihren Kollegen, die sich mit der Elektrophysiologie beschäftigen, eng zusammenarbeiten. Diese werden Anforderungen an Sie stellen und bestimmte Vorhersagen von Ihnen erwarten. Sie werden versuchen, den Aufbau des im Experiment untersuchten neuronalen Netzwerks des stomatogastrischen Nervensystems des Taschenkrebses nachzubauen und zu simulieren. Dabei werden Sie auch Aussagen über die Wertigkeit gefundener Fakten feststellen. Zusätzlich werden Sie die Limitierungen der Simulationsumgebung testen.

Beginnen Sie zunächst mit der Simulationsumgebung 'NeuroSim', und wählen Sie dort HHSim (Hodgkin-Huxley Simulation). In diesem Simulationsprogramm finden Sie verschiedene Tutorien (teilweise Englisch), die Sie mit intrazellulären Ableitungen und der Interpretation der Daten vertraut machen. Das Durchführen dieser Tutorien ermöglicht es Ihnen, die weiteren Versuche zügig durchzuführen.

Zur weiteren Simulation benutzen Sie dann das Windows-basierte Simulationsprogramm *madSim*. Es gestattet die Simulation sehr großer Netzwerke, aber auch einzelner Neurone. Es können verschiedene Neuronen und Kanalmodelle ausgewählt werden, die sich in ihrer Komplexität unterscheiden.



Die Anatomie der Zellen beschränkt sich dabei auf ein Soma plus Dendrit, der sich in verschiedene Bereiche untergliedern lässt. Es können Membranpotentiale und die verschiedenen Ströme in diesen Bereichen gemessen werden. Die Einstellungen reichen von sehr einfachen Neuronen mit Leckströmen, Natrium- und Kaliumströmen bis zu extrem komplexen Neuronen mit verschiedensten Strömen. In unserem Experiment werden wir uns auf die wichtigsten Ströme beschränken (Natrium-, Kalium- und Kalziumstrom). Ihr Betreuer wird Sie mit der Simulationsumgebung vertraut machen und Ihnen Hilfestellung bei der Erstellung der Simulationen geben.

Beginnen Sie damit, sich mit der Simulation vertraut zu machen. Bevor die Elektrophysiologie Ihnen Ergebnisse liefern kann, wird einige Zeit verstreichen. Nutzen Sie diese Zeit, um sich mit der Handhabung des Simulationsumgebung vertraut zu machen. Da wir in unseren Experimenten rhythmisch aktive Netzwerke untersuchen, sollten Sie damit beginnen, einfache rhythmische Netzwerke aufzubauen. Diese können Sie dann anhand der von der Elektrophysiologie gefundenen Daten ausbauen, bzw. verbessern.

Erstellen Sie zunächst ein einzelnes Neuron. Lassen Sie sich den Membranpotentialverlauf des Neurons anzeigen für eine Zeitdauer von max. 2 Sekunden. Erregen Sie das Neuron dann ab 500ms überschwellig für eine Dauer von 500ms (Stromapplikation). Beobachten Sie das Membranpotential. Dokumentieren Sie einzelne Aktionspotentiale. Lassen Sie sich auch die verschiedenen Ströme anzeigen. Verändern Sie dann die Leitfähigkeiten des Natriumkanals, dann des Kaliumkanals. Stellen Sie dabei auch einmal die Leitfähigkeiten auf Null und wiederholen Sie die Simulation. Beobachten Sie die Effekte. Gibt es reale Situationen, in denen so etwas vorkommt (Beispiel)?

Erstellen Sie dann ein sehr einfaches neuronales Netz mit nur 2 Zellen. Verbinden Sie diese Zellen mit einer erregenden Synapse (d.h. welche Art von Strom fließt? Welche Kanäle werden geöffnet?). Erregen Sie das erste Neuron überschwellig mit einem depolarisierenden Strom und beobachten Sie die Reaktion des zweiten Neurons. Dokumentieren Sie die Reaktion (Einzel-PSPs – es sollen keine Aktionspotentiale in Neuron 2 generiert werden). Erhöhen Sie den depolarisierenden Strom im ersten Neuron. Welche Reaktion können Sie erkennen? Verändern sich die Amplituden der PSPs? Findet Summation statt? Beginnt das zweite Neuron zu spiken?

Beenden Sie dann den Stromreiz in Neuron 1 und verändern Sie stattdessen dessen Membranpotential. Hängt das Membranpotential des Neuron 1 mit der EPSP-Größe in Neuron 2 zusammen?

Bringen Sie das Membranpotential auf einen Wert zurück, bei dem das Neuron mit einer Feuerfrequenz von ungefähr 2 Hz Aktionspotentiale bildet. Verändern Sie nun das Membranpotential des **2. Neurons**. Verändert sich die Amplitude der EPSPs? Schlussfolgerung? Erstellen Sie ein Diagramm!

Editieren Sie nun die Synapse und ersetzen Sie die Erregung durch eine Inhibition (welche Ströme fließen?). Beobachten Sie die PSPs in Neuron 2. Variieren Sie dessen Membranpotential im Bereich von -60mV bis -120mV (in 5mV Schritten). Was geschieht mit der Amplitude der PSPs? Schlussfolgerung. Erstellen Sie ein Diagramm.

Verändern Sie bei konstantem Membranpotential (z.B. -50mV) die Leckleitfähigkeit des 2. Neurons. Verändert sich Zeitkonstante bzw. Amplitude der PSPs? Schlussfolgerung?

Verändern Sie nun die Stärke der Synapse und testen Sie wiederum die Zeitkonstanten und Amplituden der PSPs in Neuron 2.

Testen Sie im Folgenden auch elektrische Synapsen. Erstellen Sie ein neuronales Netzwerk aus 3 Neuronen, die als Kette mit elektrischen Synapsen (gap junctions) verbunden sind. Die Synapsen sollen in beide Richtungen leitend sein (nicht rektifizierend – was bedeutet das?). Beobachten Sie den Membranpotentialverlauf aller Neurone. Applizieren Sie (überschwellig) Strom in die verschiedenen Neurone und beobachten Sie die Reaktion der anderen Neurone.

Erstellen sie nun in einer neuen Simulation zwei Neurone und stellen sie diese als Nichtspiker ein. Verschalten sie diese beiden Zellen mit je einer rektifizierenden elektrischen Synapse auf ein drittes Neuron, so dass Depolarisationen von den ersten beiden Zellen zur dritten übertragen werden.

Benutzen sie diese Verschaltungen nun um einen Koinzidenz Detektor zu bauen (analog zu Marder, E. (1998) Electrical synapses: beyond speed and synchrony to computation. *Curr Biol* 8(12):R795-797), der ein exakt gleichzeitiges Eintreffen von EPSPs am dritten Neuron detektiert. Lösen sie dazu mit Hilfe eines 6 ms langen Stromreizes Depolarisationen in den ersten beiden Zellen aus.

Überlegen sie sich welche Parameter sie in dieser Simulation verändern können um Ihr Ziel zu erreichen und schreiben sie ein Skript (Betreuer fragen) damit diese Parameter unabhängig voneinander automatisch verändert werden können. Werten Sie die gewonnenen Daten in einem Diagramm aus.

Wann ist ein solches Vorgehen sinnvoll und welche Alternativen gibt es um die Parameter eines Modells einzustellen?

Rhythmisch aktive neuronale Netze beruhen sehr oft auf einigen wenigen Aufbauprinzipien. Dazu gehören die sogenannten 'Halfcenter' und die Schrittmacher, sowie Kombinationen aus diesen beiden. Halfcenter-Verschaltungen bestehen aus mehreren Neuronen, die sich gegenseitig hemmen (siehe z.B. Grafik). Unter bestimmten Bedingungen beginnen diese Neurone, alternierend aktiv zu sein, und einen Rhythmus zu bilden. Überlegen Sie sich, welche Bedingungen dies sein könnten und ob bzw. wie man diese simulieren kann.

Erstellen Sie danach eine Simulation mit 3 Neuronen, die diesen Bedingungen gerecht wird und dokumentieren Sie die erhaltenen Ergebnisse. Zeigen Sie neben dem entstehenden Rhythmus bitte auch den Einfluss der einzelnen Neurone aufeinander (einzelne IPSPs). Können auch 'Ringoszillatoren' mit einer größeren Anzahl von Neuronen (4,5) erfolgreich aufgebaut werden? Verändern sich die Voraussetzungen? Welche Rolle spielt die gegenseitige Hemmung bei solchen Verschaltungen? Beschreiben Sie bei den Oszillatoren mit höherer Wertigkeit genau den Verlauf der Aktivität (z.B. Neuron1 ist aktiv -> Neuron 2 wird gehemmt -> usw...). Können Oszillatoren auch mit erregenden Synapsen erschaffen werden?

Im Gegensatz zu Netzwerkoszillatoren besitzen Schrittmachneurone intrinsische Eigenschaften, die ihnen erlauben, OHNE äußere Einflüsse autorhythmisch aktiv zu sein, d.h. selbst ohne externes Netzwerk oszilliert das Membranpotential dieser Neurone (es de- und hyperpolarisiert in rhythmischer Abfolge). Ein Beispiel hierfür sind die Schrittmacherzellen des Säugetierherzens. Welche Ströme müssten sie in einer Simulation implementieren, um das Membranpotential zum oszillieren zu bringen?

Einen dieser Ströme sollen Sie nun testen: Stellen Sie eine Simulationsdauer von 5 sec ein. Erstellen sie zwei identische Neurone. Wählen Sie für das erste Neuron den Menüpunkt „Neuron -> Modellspezifische Parameter direkt -> Benutzerdefinierte Kanäle“ das Fenster zum Einstellen zusätzlicher Ströme aus. In dem Fenster sollten keine Einträge vorhanden sein. Klicken Sie auf „Kanal laden“ und öffnen Sie die Datei "Kanäle_F-Praktikum.knl". Sie haben Ihrem ersten Neuron nun einen zusätzlichen Ionen-Strom (hier TestStrom genannt) hinzugefügt. Klicken Sie nun auf „Alle Änderungen speichern“ um das Fenster zu verlassen und den TestStrom Ihrem Neuron dauerhaft zuzuweisen.

Überlegen Sie sich Testprotokolle, um diesen TestStrom zu charakterisieren (wann wird er aktiviert; was bewirkt er bei Aktivierung). Nutzen Sie hierzu verschieden starke de- und hyperpolarisierende Strominjektionen. Dokumentieren Sie die Veränderungen des Membranpotentials im ersten Neuron (mit eingeschaltetem TestStrom) im Vergleich zur Situation im zweiten Neuron (ohne TestStrom). Wie würden Sie den Strom beschreiben?

Lassen Sie sich nun den TestStrom im Ausgabefenster anzeigen. Markieren sie dazu das erste Neuron und wählen sie im Hauptfenster das Menü Einstellungen-> Darzustellende Parameter. Im Fenster für die darzustellenden Parameter legen Sie für einen nicht belegten Parameter den TestStrom fest. Danach müssen Sie im Ausgabefenster des ersten Neurons den Menüpunkt Einstellungen -> Neuron Kurven anwählen und dort den Zoomfaktor/den Offset und die Liniendicke für den TestStrom anpassen. Bitte fragen Sie hierzu die Betreuerin.

Bestimmen Sie nun das Umkehrpotential des TestStroms. Tipp: Benutzen Sie dazu ein nichtspikendes Neuron. Aktivieren Sie den TestStrom der ersten Zelle dauerhaft und injizieren Sie einen zusätzlichen Strompuls (Rampe mit schneller Anstiegszeit, z.B. 0.2sec), der das Membranpotential der Zelle so verändert, dass das von Ihnen vermutete Umkehrpotential über- bzw. unterschritten wird (was passiert bei Über/Unterschreiten des Umkehrpotentials mit dem TestStrom?).

Bestimmen Sie nun die Leitfähigkeit des Kanals (also NICHT den Strom) in Abhängigkeit vom Membranpotential. Diese Abhängigkeit wird zur mathematischen Beschreibung des Kanals verwendet. Verwenden Sie zur Leitfähigkeitsbestimmung folgendes Protokoll: Injizieren Sie verschiedene Ströme (Rechteck, Beginn: 0,5sec, Ende: 4,5 sec) um das Membranpotential (Messpotential) zu verändern. Injizieren sie einen zweiten Strom (Rechteck, Beginn: 3,5sec, Ende: 3,7 sec) der an seinem Maximum immer ein Membranpotential von ca. -55 mV erreicht (von nun am Referenzpotential genannt). Messen Sie die Amplitude des TestStroms am Referenzpotential und tragen sie diese gegen das Messpotential (kurz vor Beginn des 2. Strompulses) auf. Benutzen Sie zu Ihrer Messung vertikale Cursor und die Einstellung „Werte in Legende anzeigen“.

Dokumentieren Sie Ihre Ergebnisse in einer graphischen Darstellung und überlegen Sie warum dieses Testprotokoll geeignet ist, um die Leitfähigkeit zu messen.

Benutzen Sie nun die von der Elektrophysiologie gewonnenen Daten dazu, Ihr(e) Netzwerk(e) zu erweitern, bzw. zu verbessern. Dazu werden Sie u.a. auch elektrische Synapsen benutzen. Versuchen Sie mit der von der Elektrophysiologie vorgeschlagenen

Konnektivität ein Netzwerk zu bilden, das einen Rhythmus bildet, der dem des pylorischen Rhythmus des stomatogastrischen Nervensystems sehr ähnlich ist. Versuchen Sie Voraussagen zu machen, was für Komponenten Sie noch hinzufügen müssen, um das Netzwerk zum Oszillieren zu bringen. Können Sie Verbindungen / Synapsencharakteristika fordern? Informieren Sie Ihre Kollegen und diskutieren Sie dies im Hinblick auf die weiteren physiologischen Experimente bzw. Simulationen.

An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Physiologie Ihnen Daten liefern wird, die an diesem Tier möglicherweise noch nie untersucht wurden. Die Simulation dient dazu, die realen Daten zu interpretieren und zu verifizieren. Sie tragen damit zum weiteren Verständnis des Systems bei und unterstützen die aktuelle Forschung in unserem Labor. Daher kann die weitere Vorgehensweise der Simulation auch hier nicht vorgegeben werden.

Erstellen Sie schnellstmöglich ein Protokoll, das auch Ihren Nachfolgern bei der Simulation helfen soll. Die von Ihnen geschaffenen Simulationen werden von diesen übernommen (bis auf die im Skript beschriebenen Übungsaufgaben) und überprüft, bzw. verbessert werden.

Protokolle:

Protokolle sollten in Form einer Veröffentlichung erstellt werden, d.h. beginnend mit einer Zusammenfassung, gefolgt von Einleitung, Material und Methoden, Ergebnisteil und Diskussion. Alle Originaldaten / Simulationen müssen den Protokollen beigefügt werden, ebenso die Verlaufsprotokolle der elektrophysiologischen Experimente.

Die Protokolle sollten in einer Form abgegeben werden, die es 'unbeteiligten' Fachpublikum ermöglicht, den Versuch/die Simulation nachzuvollziehen und die Ergebnisse zu verstehen. Bedenken Sie, dass nicht jeder ein Skript besitzt. *Erwähnen Sie immer die aktuelle Fragestellung*, und was sie getan haben, um diese Frage zu beantworten. Vermeiden Sie unter allen Umständen Ausdrücke wie 'Frage 1 aus Skript:'. Beachten Sie, dass bekannte Tatsachen in Gegenwartsform geschrieben werden, aktuelle (Ihre!!) Ergebnisse in Vergangenheitsform. Seien Sie genau in Ihren Formulierungen, kurz und prägnant. Es gibt keine zusätzlichen Punkte für lange Protokolle. Es werden nur computergeschriebene Protokolle akzeptiert. Bitte keine Grafiken einkleben, sondern besser einscannen und zusammen mit dem Dokument ausdrucken.