

---

---

# NEUROSIM - COMPUTERSIMULATION VON NERVENSIGNALEN

PROTOKOLL ZUM PRAKTIKUM NEUROBIOLOGIE FÜR BIOINFORMATIKER  
AM 21.01.2019

---

---

## GRUPPE 2

### AUTOREN:

- CEDRIC LAIER - *cedric.laier@fu-berlin.de*
- TILMAN MEHL - *tilmanmehl@zedat.fu-berlin.de*

### LEHRVERANSTALTER:

- PETER ROBIN HIESINGER
- MATTHIAS WERNET

### TUTOREN:

- LISA
- JOHANNES
- CLAUDIA

# 1 Einleitung

Inhalt des Praktikumstages war die Simulation von grundlegenden elektrophysiologischen Experimenten mit Neurosim[1]. Konkret wurde betrachtet:

- Auswirkung sich ändernder Ionenkonzentration auf das Ruhemembranpotential
- Zusammenhang zwischen Reizstärke und Frequenz von Aktionspotentialen
- Aktivierung von spannungsabhängigen  $K^+$  und  $Na^+$ -Kanälen
- Modellierung neuronaler Netze zur Bewegungswahrnehmung

Zentrales Betrachtungsobjekt unseres Praktikums ist das Neuron, bzw. deren Membran. Die Zellmembran ist aus einer Doppellipidschicht und Membranproteinen aufgebaut. Die unterschiedliche Verteilung von fünf Arten von Ionen auf den beiden Seiten der Membran beeinflusst das Membranpotential, also die elektrische Spannung zwischen Extrazellulär- und Intrazellulärraum.

Die unterschiedliche Verteilung der Ionen führt zu einem Konzentrationsgradient, der primär durch die Natrium-Kalium-Pumpe aufrechterhalten wird. Deren Aktivität führt auch zu einem elektrischen Gradienten, da mehr Natriumionen aus der Zelle hinausbefördert, als Kaliumionen in die Zelle hineinbefördert werden.

Für jedes Ion lässt sich mittels der Nernst-Gleichung ein Gleichgewichtspotenzial berechnen, d.h. eine Spannung die an der Membran anliegt, so dass Ein- und Ausstrom des Ions im Gleichgewicht ist.

$$E_{ion} = 58mV \cdot \log \left( \frac{c_o}{c_i} \right)$$

Um das gesamte Membranpotential zu ermitteln müssen alle beteiligten Ionen betrachtet werden. Dies ist mit der Goldman-Gleichung möglich, bei der alle Ionenkonzentration und -permeabilitäten einbezogen werden.

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{p_K[K^+]_o + p_{Na}[Na^+]_o + p_{Cl}[Cl^-]_i}{p_K[K^+]_i + p_{Na}[Na^+]_i + p_{Cl}[Cl^-]_o} \right)$$

Das Ruhemembranpotential ist das Membranpotential, wenn keine Erregung vorliegt. Es liegt in der Regel zwischen -90 und -40 mV. Wie an der Goldman-Gleichung zu erkennen, ist das Ion mit der größten relativen Permeabilität (Kalium) maßgeblich am Ruhemembranpotential beteiligt.

Hodgkin und Huxley veröffentlichten 1952 eine Reihe von Artikeln, die ihre Beobachtungen eines Voltage-Clamp Experiments am Riesenaxon eines Tintenfisches beschreiben.

Unter anderem wurden darin die an Membranpotential und Erregung maßgeblich beteiligten Ionen ermittelt.[2]

Das Barlow-Levick Modell, beschreibt Bewegungswahrnehmung in eine Richtung durch neuronale Netze.[3]

In der einfachsten Form werden zwei Neuronen(N1, N2) durch optischen Reiz zeitversetzt stimuliert. Die Neuronen sind über erregende Synapsen mit einem dritten Neuron(N3) verbunden. Zwischen dem Neuron, das zuerst gereizt wird (N1) und dem dritten Neuron(N3) besteht eine synaptische Verzögerung.

Der Schwellwert für das Auslösen eines Aktionspotentials an N3 wird durch die Erregung nur eines vorgeschalteten Neurons nicht überschritten. Nur wenn Aktionspotentiale von N1 und N2 zeitgleich in N3 eintreffen können sich diese summieren und den Schwellwert überschreiten. Damit an N3 die Aktionspotentiale aus N1 und N2 zeitgleich ankommen, muss die synaptische Verzögerung der Verzögerung zwischen der Reizung von N1 und N2 entsprechen. Eine solche neuronale Einheit kann also nur Bewegungen einer bestimmten Geschwindigkeit wahrnehmen.

Ein erweitertes Modell, das die Wahrnehmung von bidirektionaler Bewegung erlaubt, ist der Reichardt-Detektor[4].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Modul Goldman

Im ersten Teil des Praktikumstags wurde gemessen, wie eine sich ändernde Kaliumkonzentration auf das Membranpotential auswirkt.

In Neurosim wurde das Modul Goldman gestartet. Die Temperatur lag bei 20°C, die Ionenkonzentrationen und Permeabilitäten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Ionenkonzentrationen und Permeabilität

| Ion    | Relative Permeabilität | Extrazelluläre Konzentration | Intrazelluläre Konzentration |
|--------|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| $K^+$  | 1.0                    | 20                           | 400                          |
| $Na^+$ | 0.04                   | 440                          | 50                           |
| $Cl^-$ | 0.45                   | 560                          | 75                           |

Für den Versuch wurde die extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration schrittweise (50mM je Schritt) von 10mM auf 810mM erhöht, und Gleichgewichtspotential für Kalium sowie das Membranpotential gemessen.

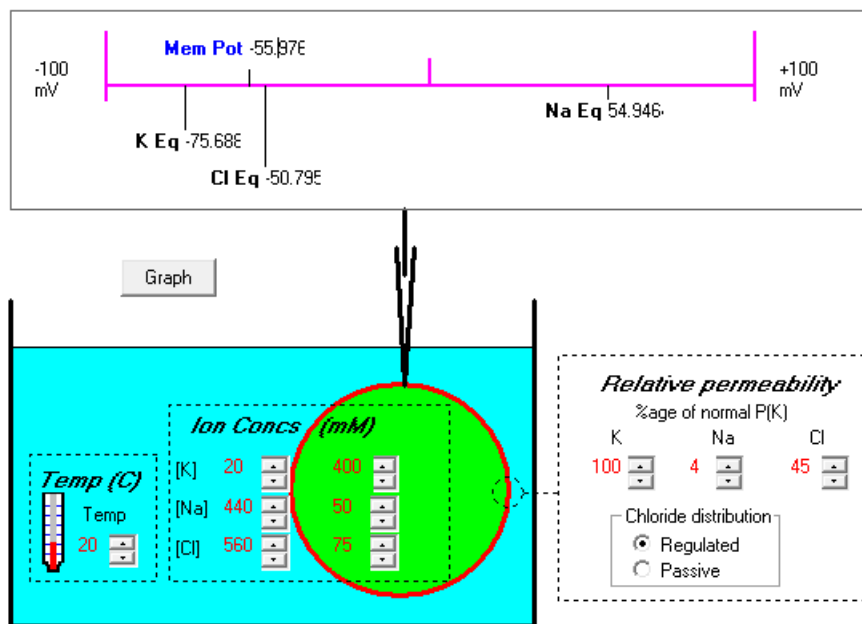


Abbildung 1: Startparameter für Modul Goldman

Anschließend wurden für einige Beispielwerte von Ionenkonzentrationen und -permeabilitäten mit Hilfe der Nernst'schen Gleichung die jeweiligen Gleichgewichtspotentiale bestimmt. Mit Hilfe der Goldman Gleichung wurde für die Werte das Membranpotential berechnet.

### 2.2 Modul Hodgkin - Huxley (Current Clamp)

Im Current Clamp Experiment wurde der Zusammenhang zwischen Reizströmen und Frequenz von Aktionspotentialen beobachtet.

Für die ersten beiden Experimente wurde die Datei Param2.nrs in Neurosim geladen.

Die Temperatur wurde auf 20°C gesetzt. Die Stromamplitude des Stimulus wurde, ausgehend von 50μA, so lange verringert, bis die Schwelle gefunden wurde, bei der zum ersten Mal ein Aktionspotential auftritt.

Anschließend wurde der Stimulus schrittweise um  $10\mu\text{A}$  erhöht und die auftretende Maximalspannung sowie die Zeit bis zum auftreten der Maximalspannung notiert.

Für das dritte Experiment wurde die Datei IFCURVE.nrs in Neurosim geladen.

Die Stromstärke wurde schrittweise von  $1\mu\text{A}$  auf  $130\mu\text{A}$  erhöht. Beobachtet wurden Frequenz und Amplituden der Aktionspotentiale.

Die Ionenkonzentrationen lagen innen/außen für Kalium bei 390/10mM und für Natrium bei 70/418mM.

Der Stimulus hatte eine Dauer von 90ms und eine Verzögerung von 0,5ms.

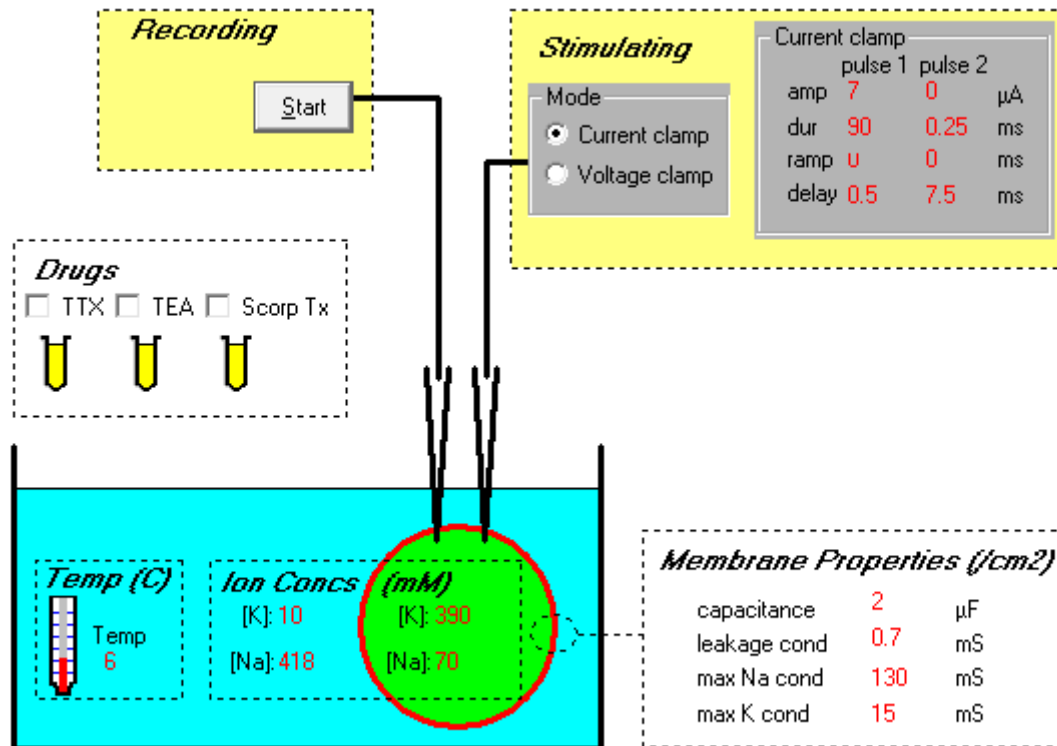


Abbildung 2: Ausgangseinstellungen für Frequenz- und Amplitudenmessung bei steigender Stromstärke

## 2.3 Modul Hodgkin - Huxley (Voltage Clamp)

Im Voltage Clamp Experiment wurde die Aktivierung von spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ -Kanälen beobachtet.

In Neurosim wurde die Datei PARAM4.nrs geladen.

Das Haltepotential lag bei  $-70\text{mV}$ , die Klemmspannung bei  $+30\text{mV}$ . Die Ionenkonzentrationen lagen innen/außen für Kalium bei 302/10mM und für Natrium bei 64/418mM. Die Temperatur lag bei  $6^\circ\text{C}$ .

Zunächst wurde der ausgelöste Gesamtstrom betrachtet.

Weiterhin wurden die selektiven Kanalblocker TTX und TEA verwendet, um Kalium- und Natriumstrom isoliert voneinander zu beobachten.

Anschließend wurde bei einem Haltepotential von  $-100\text{mV}$  die Klemmspannung von  $-50\text{mV}$  schrittweise auf  $+50\text{mV}$  erhöht (10 mV je Schritt). Gemessen wurde hierbei jeweils der maximale Stromfluss von Kalium- und Natriumionen.

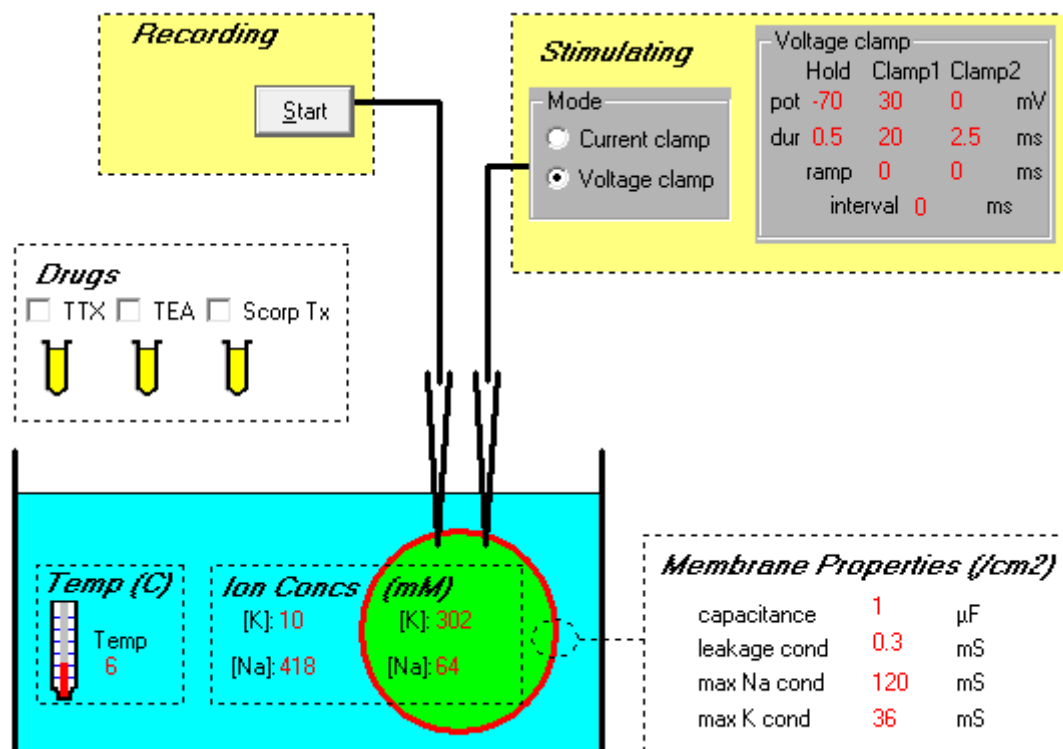


Abbildung 3: Ausgangseinstellungen für Voltage Clamp Experiment

## 2.4 Bewegungswahrnehmung - Modul Networks

In diesem Versuch wurden zwei neuronale Netzwerke modelliert, die Bewegung detektieren können. Dazu wurde in Neurosim das Modul Networks geladen.

### 2.4.1 Barlow-Levick

Zunächst wurde ein neuronales Netz nach dem Barlow-Levick Modell erstellt.

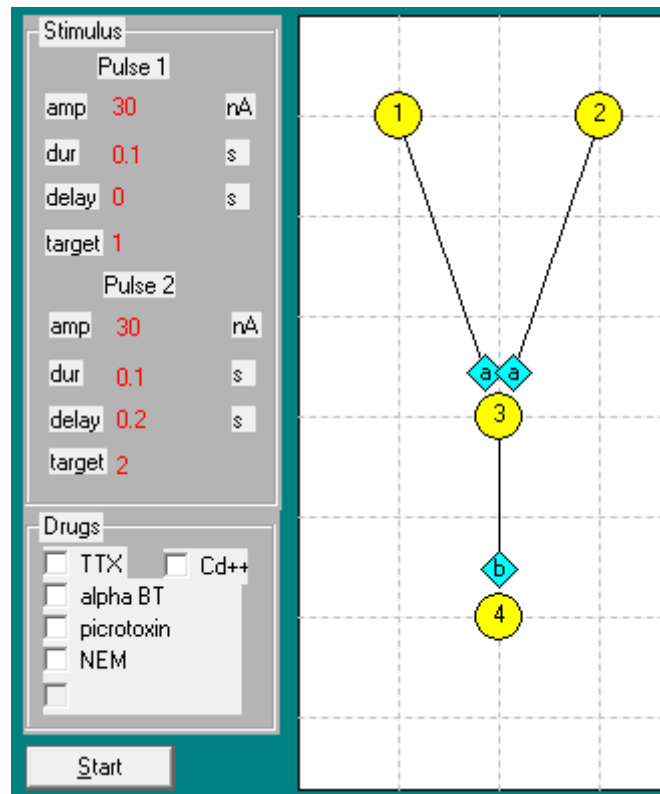


Abbildung 4: Verschaltung von Neuronen nach dem Barlow-Levick Modell

Neuron 1 (N1) und Neuron 2 (N2) sind je über eine erregende Synapse mit Neuron 3 (N3) verbunden. N3 ist über eine inhibierende Synapse mit Neuron 4 (N4) verbunden. Die Synapse zwischen N1 und N3 überträgt mit einer Verzögerung von 200ms. Die Synapsen zwischen N2 und N3, sowie zwischen N3 und N4 übertragen ohne Verzögerung.

Es wurden die Erregungen von N1 bis N4 gemessen, zunächst bei Simulation einer Bewegung von links nach rechts, anschließend von rechts nach links. Eine links-rechts Bewegung wird simuliert, indem zunächst ein Stimulus auf N1 gegeben wird, und mit 200ms Verzögerung auf N2. Für die rechts-links Bewegung wird zuerst N2 stimuliert, und N1 verzögert.

Der Stimulus hatte eine Stromstärke von  $30\mu\text{A}$  und eine Dauer von 100ms.

#### 2.4.2 Reichardt-Detektor

Im nächsten Versuch wurde das Modell um ein Neuron (N5) erweitert, um einen Reichardt-Detektor zu modellieren, und Bewegung in beide Richtungen zu messen.

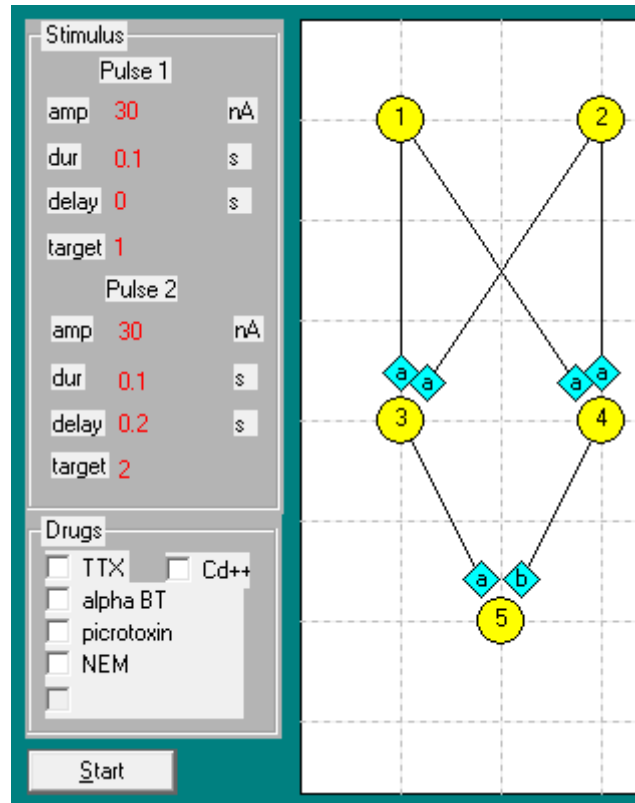


Abbildung 5: Verschaltung von Neuronen eines Reichardt-Detektors

N1 und N2 sind über je eine erregende Synapse mit N3 und N4 verbunden. N3 ist über eine erregende Synapse mit N5 verbunden. N4 ist über eine inhibierende Synapse mit N5 verbunden. Die erregenden Synapsen zwischen N1 und N3 bzw. N2 und N4 übertragen jeweils mit einer Verzögerung von 200ms. Der Parameter 'Initial Threshold' von N5 wurde auf -50mV gesetzt. Es wurden die Erregungen an allen 5 Neuronen für simulierte links-rechts und rechts-links Bewegungen gemessen.

Weiterhin wurde die Impulsdauer gemessen, bei der nur noch ein Aktionspotential ausgelöst wurde. Im letzten Schritt wurde noch für unterschiedliche Reizschwellen an N3 die Anzahl der ausgelösten Aktionspotentiale gemessen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Modul Goldmann

Bei steigender, extrazellulärer  $K^+$ -Konzentration wurde die Spannung für Membranpotential und Kaliumgleichgewichtspotential zunehmend positiver.

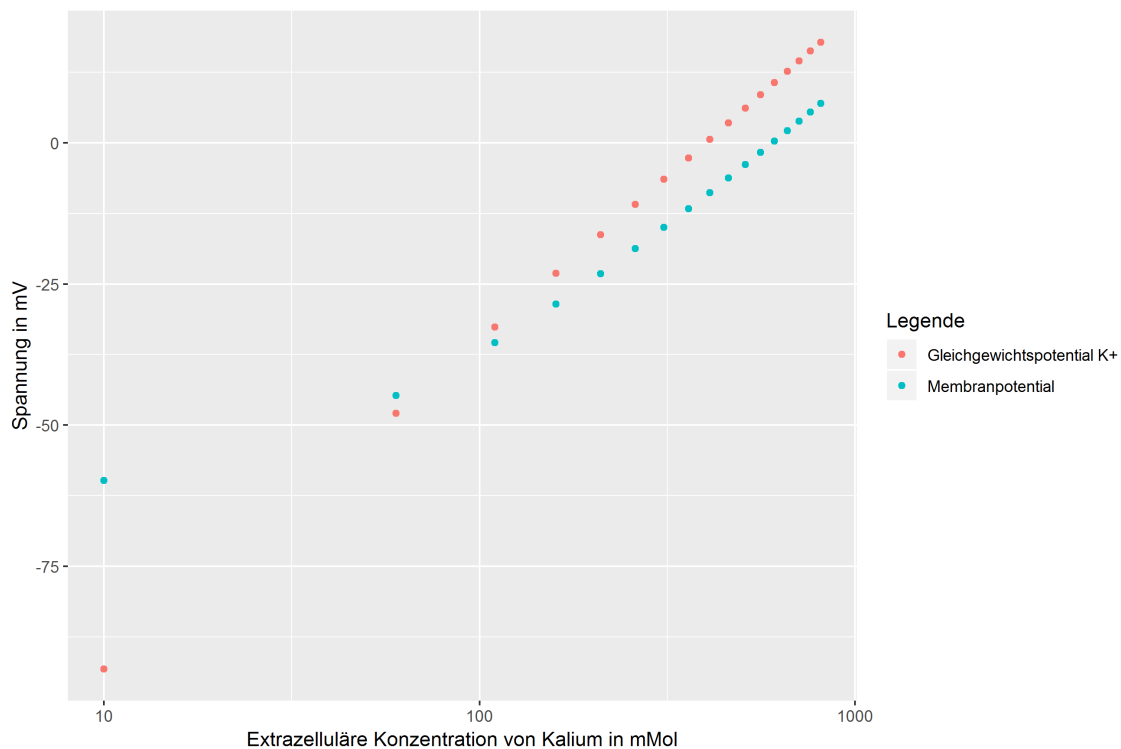


Abbildung 6: Spannungsänderung bei zunehmender Kaliumkonzentration (extrazellulär)

Für beispielhafte Werte in Tabelle 2 ergab sich nach der Goldman-Gleichung ein Membranpotential von -51.35 mV. Die sich laut der Nernst'schen Gleichung ergebenden Gleichgewichtspotentiale  $E_{ion}$  sind in der Tabelle dargestellt.

Tabelle 2: Beispielwerte zur Berechnung eines Membranpotentials

| Ion    | Relative Permeabilität | Konz. innen | Konz. außen | $E_{ion}$ |
|--------|------------------------|-------------|-------------|-----------|
| $K^+$  | 1.0                    | 124         | 4           | -86.5     |
| $Na^+$ | 0.04                   | 50          | 470         | +56.4     |
| $Cl^-$ | 0.3                    | 55          | 580         | +59.3     |

### 3.2 Modul Hodgkin-Huxley (Current Clamp)

Das erste Aktionspotential wurde bei  $40.74\mu A$  beobachtet.

Bei der schrittweisen Erhöhung der Stromstärke um  $10\mu A$  stieg die Maximalspannung, wie in Tabelle 3 erkennbar, bis  $70.74\mu A$  an, und blieb dann weitgehend konstant. Die Dauer bis zum Spannungsmaximum verkürzte sich mit Erhöhung der Stromstärke, flachte aber auch zunehmend ab.

Tabelle 3: Spannungsänderung in Bezug zur Stromstärke

| Stromstärke ( $\mu A$ ) | Maximalspannung (mV) | Dauer bis Maximalspannung (ms) |
|-------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 40,74                   | -13,33               | 2,86                           |
| 50,74                   | 25,00                | 1,33                           |
| 60,74                   | 28,33                | 1,12                           |
| 70,74                   | 31,67                | 1,05                           |
| 80,74                   | 30,00                | 0,96                           |
| 90,74                   | 31,67                | 0,94                           |



Tabelle 4: Änderung von Frequenz und Amplitude in Bezug zur Stromstärke

| Stromstärke ( $\mu\text{A}$ ) | Frequenz (Hz) | 1. Amplitude (mV) |
|-------------------------------|---------------|-------------------|
| 2                             | 10            | 30                |
| 7                             | 60            | 35                |
| 12                            | 70            | 35                |
| 22                            | 90            | 35                |
| 32                            | 100           | 35                |
| 42                            | 110           | 36,67             |
| 67                            | 120           | 36,67             |
| 92                            | 140           | 38,33             |
| 117                           | 140           | 40                |
| 130                           | 40            | 38,33             |

Wie in Abbildung 7 zu sehen, nahm die erste Amplitude zwar mit steigender Stromstärke zu, allerdings verloren die Folgeamplituden zunehmend das charakteristische Aussehen eines Aktionspotentials.

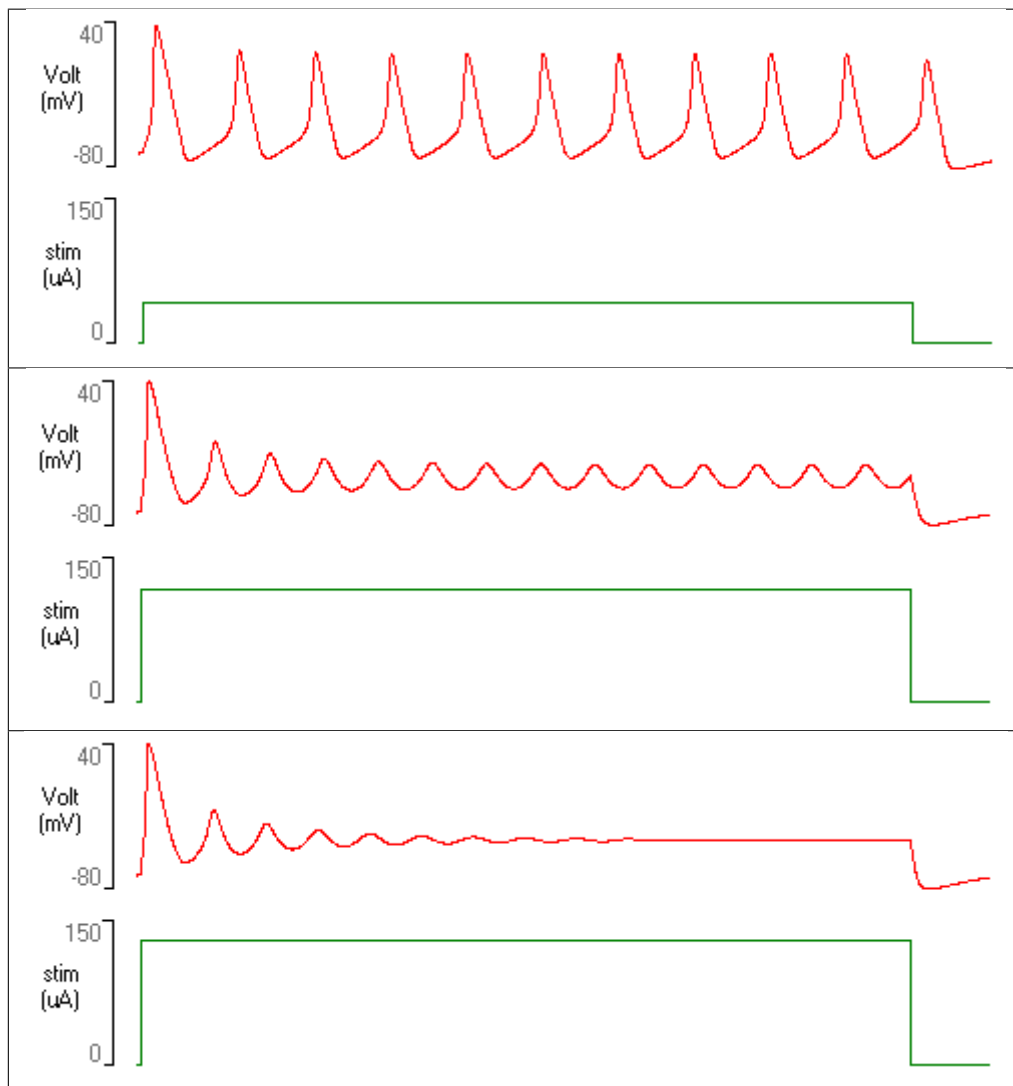


Abbildung 7: Änderung in den Folgeamplituden bei steigender Stromstärke

### 3.3 Modul Hodgkin-Huxley (Voltage Clamp)

Bei einer Haltespannung von  $-70\text{mV}$  und einer Klemmspannung von  $+30\text{mV}$  ließ sich, wie in Abbildung 8 gezeigt, eine logarithmisch verlaufende Stromkurve beobachten.

Beim Blocken von Kaliumkanälen mittels TEA ließ sich der isolierte Natriumstrom beobachten, zu sehen in Abbildung 9. Die Stromstärke wurde anfangs negativer, und nähert sich langsam wieder dem Ausgangsniveau.

Beim Blocken von Natriumkanälen mittels TTX ließ sich der isolierte Kaliumstrom beobachten, zu sehen in Abbildung 10. Die Kurve zeigte einen raschen Ausstrom von Kalium, der langsam ein Maximum annahm.

In Abbildung 11 ist gezeigt, wie die Ströme bei zunehmender Klemmspannung verliefen. Der Kaliumstrom begann bei  $+93.75\mu\text{A}$  und stieg bis  $+4265.63\mu\text{A}$ . Der Natriumstrom sank von  $-328.13\mu\text{A}$  bis auf  $-2390.63\mu\text{A}$  bei  $-10\text{mV}$  und stieg von dort an wieder, bis auf  $+328.13\mu\text{A}$ .

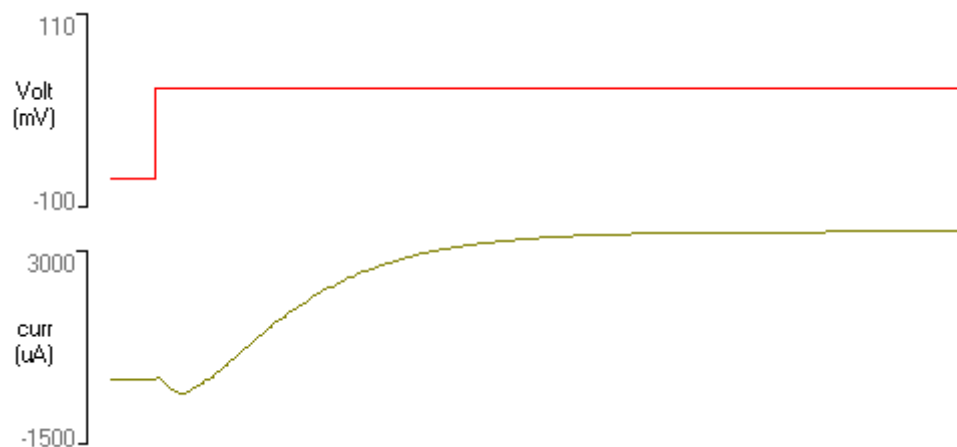


Abbildung 8: Gesamtstrom bei Haltespannung  $-70\text{mV}$  und Klemmspannung  $+30\text{mV}$

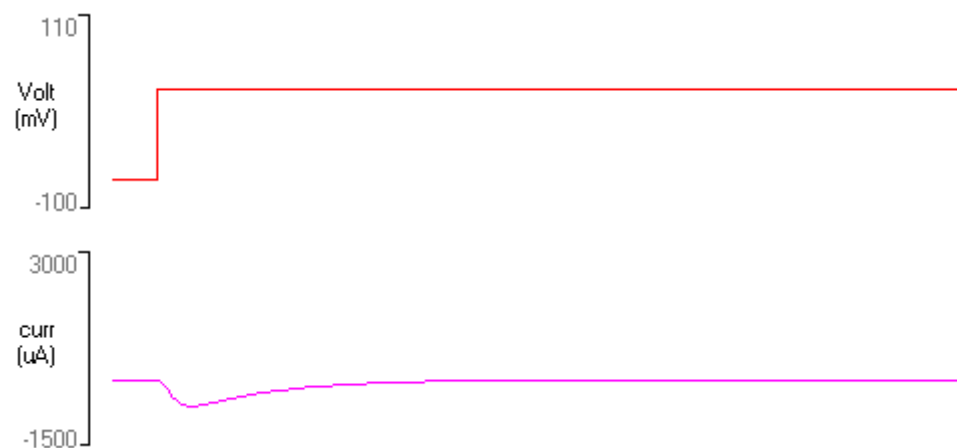


Abbildung 9: Isolierter Natriumstrom durch Blocken der Kaliumkanäle mit TEA

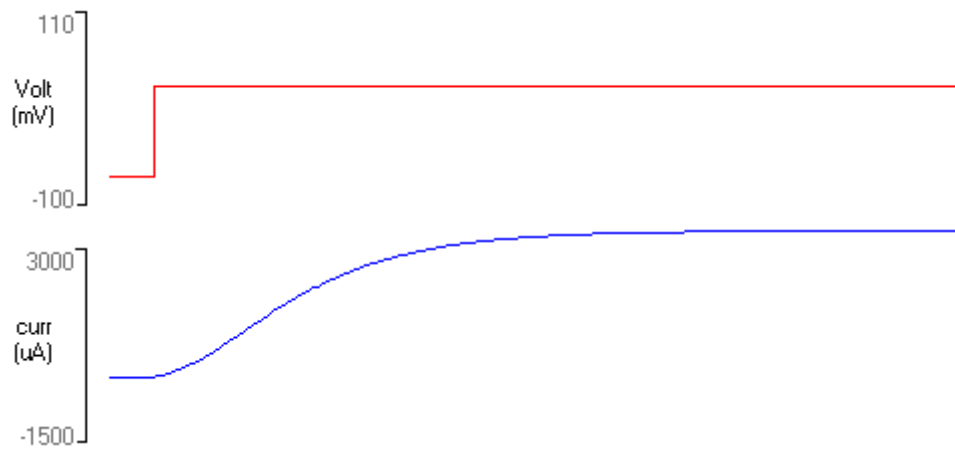


Abbildung 10: Isolierter Kaliumstrom durch Blocken der Natriumkanäle mit TTX

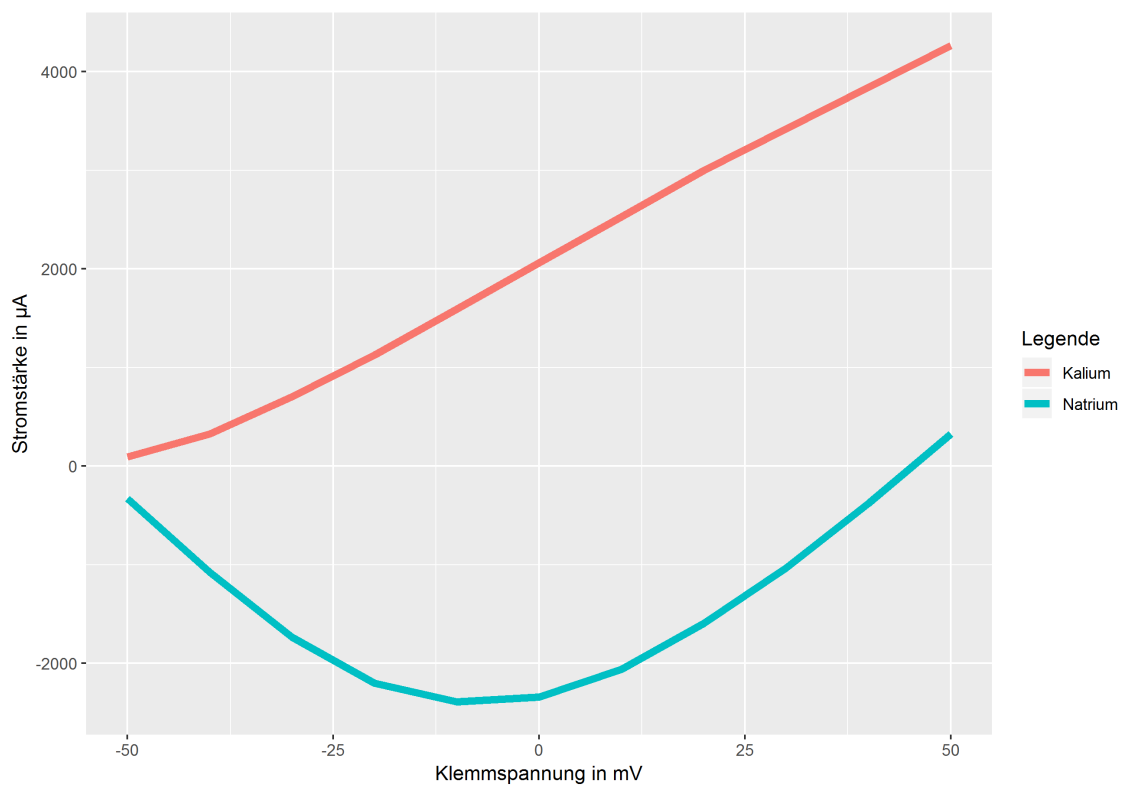


Abbildung 11: Stromstärken  $I_{Na}$  und  $I_K$  in Bezug zur Klemmspannung

### 3.4 Bewegungswahrnehmung

#### 3.4.1 Barlow-Levick-Modell

Für die Wahrnehmung von Bewegung von links nach rechts wurde nach dem Barlow-Levick-Modell ein neuronales Netz bestehend aus 4 Neuronen (N1-N4) erzeugt. Abbildung 12 zeigt den Aufbau grafisch. N1 liegt links von N2 und ist über eine erregende Synapse mit N3 verbunden. Die synaptische Verzögerung betrug 200ms. N2 ist ebenfalls über eine erregende Synapse mit N3 verbunden, allerdings ohne synaptische Verzögerung. N3 ist über eine hemmende Synapse mit N4 verbunden.

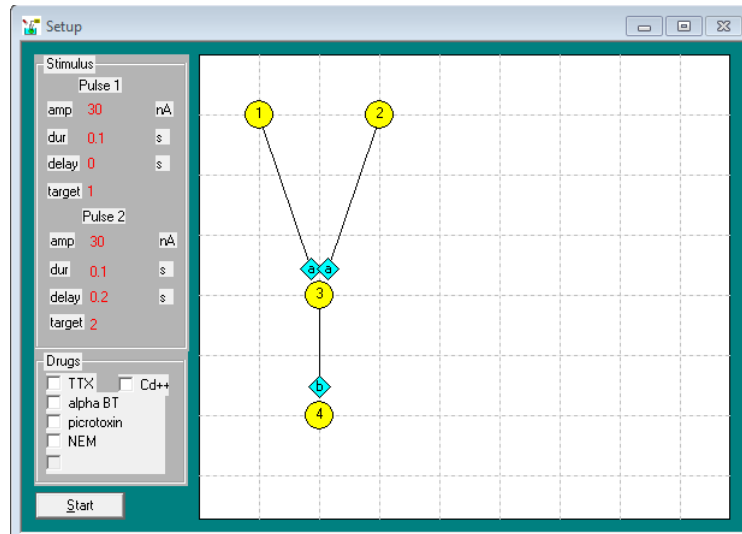


Abbildung 12: Versuchsaufbau Barlow-Levick-Modell

Die Spannungsänderungen an Neuronen für eine links-rechts Bewegung sieht man in Abbildung 13. Bei Simulation eines Reizes, der zuerst N1 und um 200ms verzögert N2 stimulierte (links-rechts Bewegung), wurden an N3 Aktionspotentiale ausgelöst. An N4 war eine Hyperpolarisierung zu beobachten.

Die Spannungsänderungen an Neuronen für eine rechts-links Bewegung sieht man in Abbildung 14. Bei Simulation eines Reizes, der zuerst N2 und um 200ms verzögert N1 stimulierte, waren an N3 unterschwellige Spannungsänderungen erkennbar, allerdings keine Aktionspotentiale. An N4 konnten keine Spannungsänderungen beobachtet werden.

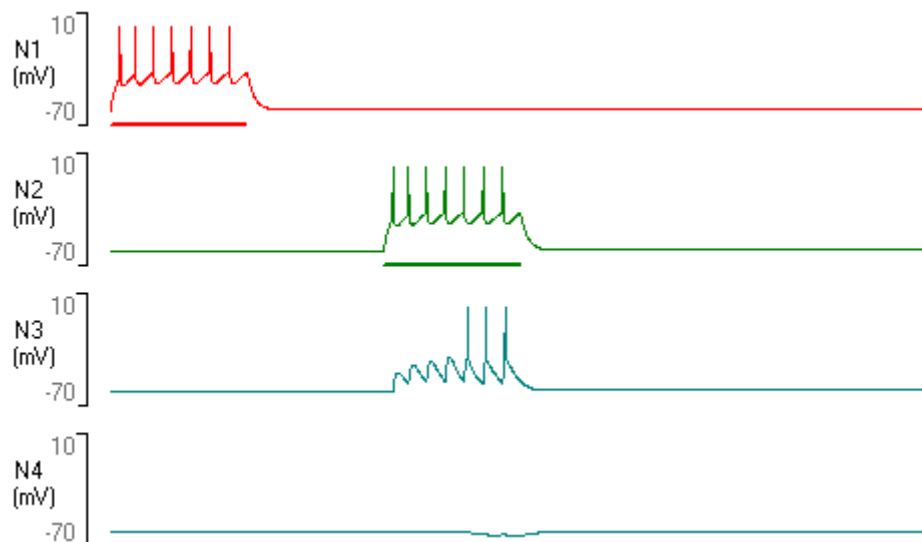


Abbildung 13: Beobachtete Spannungen an Neuronen N1-N4 bei Bewegung von links nach rechts

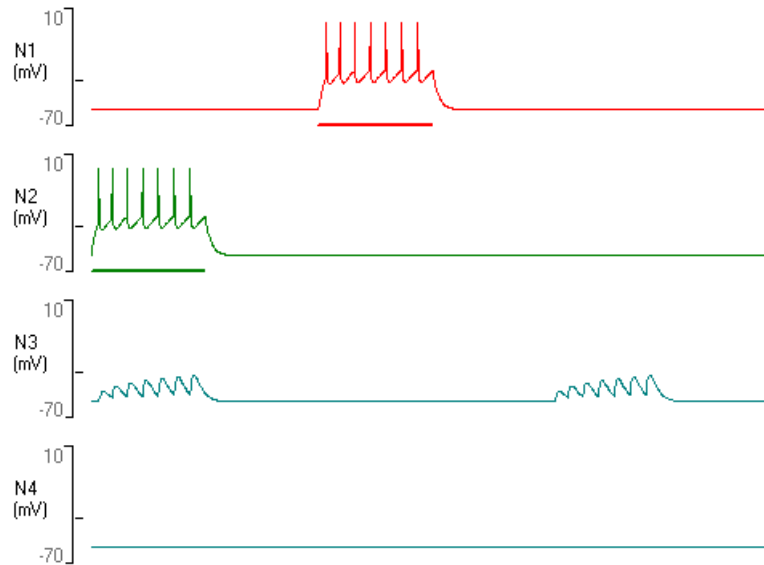


Abbildung 14: Beobachtete Spannungen an Neuronen N1-N4 bei Bewegung von rechts nach links

### 3.4.2 Reichardt-Hassenstein-Modell

Für den Versuchsaufbau für den Reichardt-Detektor wurde unsere Simulation um ein weiteres Neuron erweitert und die synaptischen Verbindungen, wie in Abbildung 15 des Versuchsaufbaus zu sehen ist, verschaltet. Wie in der Abbildung zu sehen, sind N1 und N2 jeweils über Verbindungen gleichzeitig mit N3 und N4 verbunden. N3 und N4 hingegen haben jeweils eine Zielverbindung zu N5.

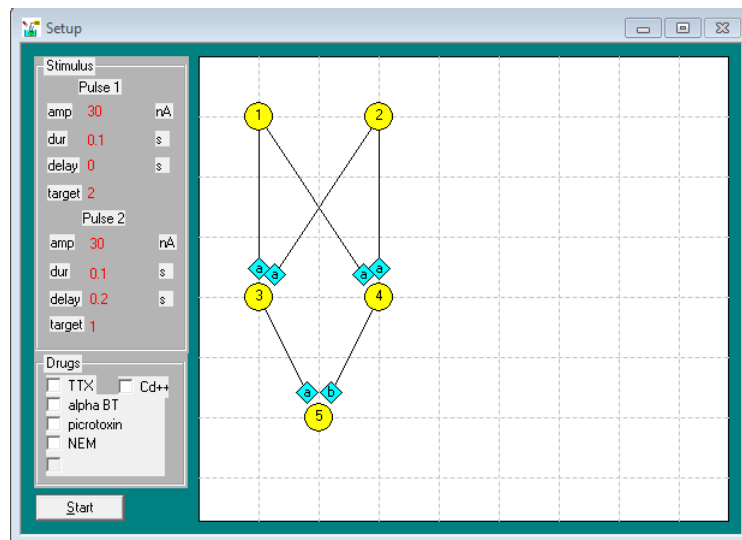


Abbildung 15: Versuchsaufbau Reichardt-Hassenstein-Modell

Um nun eine Bewegung von rechts nach links zu simulieren, wurde N1 so konfiguriert, dass es einen 100ms anhaltenden Impuls nach dem Starten der Simulation mit 200ms Verzögerung zu N2 abgibt. Für eine Bewegung von links nach rechts wurde analog zum Voraufbau die Verzögerung nun auf N2 konfiguriert. Die Abbildung 16 zeigt gemessene Spannung im Verlauf über ca. 600ms auf den Neuronen N1 - N5 bei der rechts-links Bewegung. Die Abbildung 17 zeigt die gemessene Spannung bei einer links-rechts Bewegung.

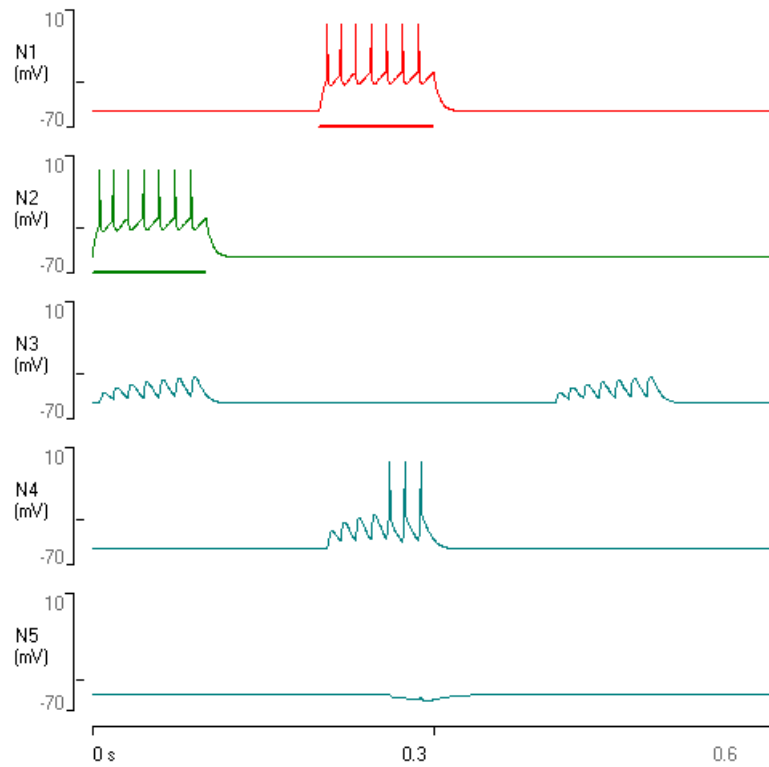


Abbildung 16: Simulierte Bewegung von rechts nach links

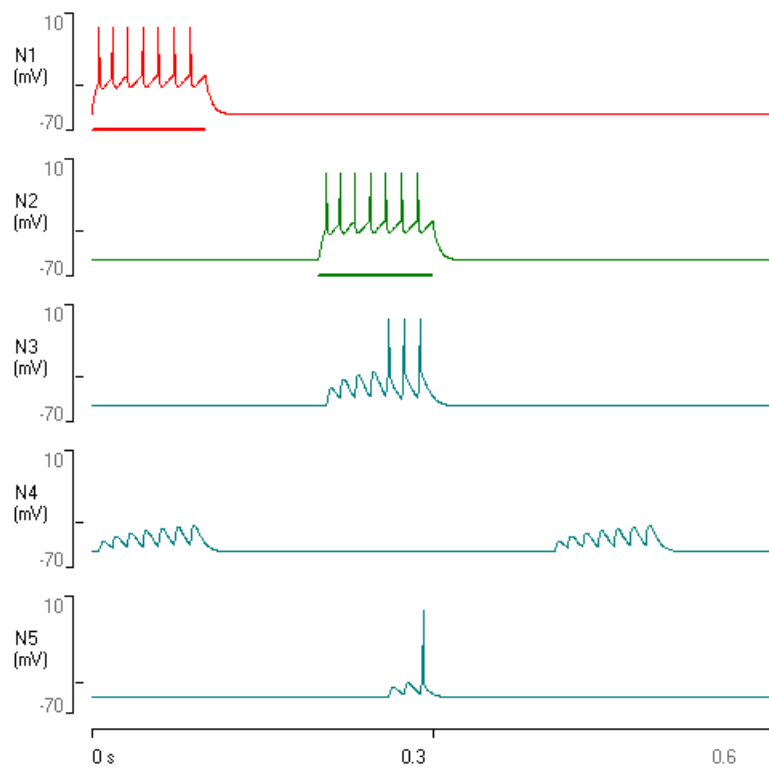


Abbildung 17: Simulierte Bewegung von links nach rechts

Bei Änderung der Reizschwelle an N3 konnten die in Tabelle 5 dargestellten Aktionspotentiale gemessen werden. Je negativer die Reizschwelle, desto mehr Aktionspotentiale wurden ausgelöst. Zudem wurde beobachtet, dass ab einer Reizschwelle von -46mV bereits einseitige Erregung von N1 oder N2 ausreichte um ein Aktionspotential an N3 auszulösen.

Tabelle 5: Aktionspotentiale an N3 bei Änderung der Reizschwelle

| Reizschwelle | Anzahl Aktionspotentiale |
|--------------|--------------------------|
| -50          | 7                        |
| -45          | 6                        |
| -42          | 4                        |
| -40          | 3                        |
| -38          | 1                        |
| -37          | 0                        |
| -30          | 0                        |

## 4 Diskussion

### 4.1 Modul Goldman

### 4.2 Modul Hodgkin-Huxley (Current Clamp)

### 4.3 Modul Hodgkin-Huxley (Voltage Clamp)

### 4.4 Bewegungswahrnehmung

#### 4.4.1 Barlow-Levick-Modell

Wie erwartet werden an N3 nur Aktionspotentiale erzeugt, wenn die APs aus N1 und N2 zeitgleich eintreffen. Durch die Summation der beiden APs kann der Schwellwert an N3 überschritten, und APs Richtung N4 geleitet werden.

#### 4.4.2 Reichardt-Hassenstein-Modell

Über dieses Modell konnte gezeigt werden, dass es mithilfe des Reichardt-Detektor möglich ist, durch eine simulierte Bewegung in eine bestimmte Richtung das Feuern eines Neurons zu erreichen. Hierbei wird der Detektor nur aktiviert, wenn der Reiz zuerst an N1 und dann mit Verzögerung bei N2 eintrifft (s. Abb. 17, Kapitel 3.4.2). Bei einer umgekehrten Reizung (s. Abb. 16, Kapitel 3.4.2) wird der Detektor hingegen gehemmt. Der Detektor wird also abhängig von der Verzögerung der Reize an N1 und N2 gefeuert, was bedeutet, dass für jede Bewegung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ein Detektor abgebildet werden muss.

## Literatur

1. *Neurosim: Neural Function Simulator* <http://www.biosoft.com/w/neurosim.htm>. aufgerufen 2019-01-22.
2. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology* **116**, 449–472 (1952).
3. Barlow, H. B. & Levick, W. R. The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. *The Journal of Physiology* **178**, 477–504 (1965).
4. Reichardt, W. Evaluation of optical motion information by movement detectors. *Journal of Comparative Physiology A* **161**, 533–547. ISSN: 1432-1351 (Juli 1987).