
Erregungsleitung im Bauchmark des Regenwurms

BIOLOGISCHER HINTERGRUND

Mittels Aktionspotentialen werden im Nervensystem Informationen (Erregungen) über weite Strecken weitergeleitet. Mit welcher Geschwindigkeit dies geschieht, ist größtenteils abhängig von den passiven Eigenschaften der Nervenfasern. Zur Erinnerung: Diese sind der Membranwiderstand (R_m), der Längs- oder Innenwiderstand (R_i), die Membrankapazität (C_m) und der Durchmesser des Neurons.

Natürlich spielt auch die Ionenkanaldichte, d.h. die Anzahl der Ionenkanäle pro Fläche eine wichtige Rolle. Der Aufbau eines Aktionspotentials kann bei einer größeren Ionenkanaldichte schneller erfolgen. Evolutionäre Gründe für die Notwendigkeit einer schnellen Erregungsleitung sind unmittelbar einsichtig. Je schneller eine Information (z.B. sensorische Information) zum entsprechenden Ziel weitergeleitet wird, desto geringer ist die Zeit, die für eine adäquate Reaktion (Flucht- oder Meidereaktionen, Abwehrmechanismen) benötigt wird. Dies erklärt auch den evolutiven Vorteil von Arten, bei denen sich Anpassungen zur schnellen Weiterleitung von Aktionspotentialen (APs) entwickelten. Zwei Lösungen kristallisierten sich im Laufe der Evolution heraus: Bildung von Riesenaxonen und Myelinisierung.

BILDUNG VON RIESENAXONEN

Die Bildung von Riesenaxonen führte in der Tat zu einer höheren Weiterleitungsgeschwindigkeit. Dies liegt daran, dass durch eine Erhöhung des Durchmessers der Längswiderstand sinkt (Gl. 1).

$$R_i = R_m / (\pi \cdot d)^2 \quad (1)$$

Gleichung 1: Längswiderstand R_i , Durchmesser des Neurons d , Membranwiderstand R_m

Der Längswiderstand sinkt, wenn der Durchmesser des Neurons größer wird. Dies hat zur Folge, dass auf die in das Neuron einströmenden Ladungsträger geringere Reibungskräfte wirken und diese somit weniger stark von schon im Neuron vorhandenen Ladungsträgern abgebremst werden. Somit kann sich ein durch einen Einstrom hervorgerufenen Potential schneller ausbreiten (passive Weiterleitung). Diese Strategie zur Erhöhung der Fortleitungsgeschwindigkeit führte zur Bildung von Riesenfasern in zeitkritischen neuronalen Schaltkreisen. Riesenfasern wurden in vielen modernen Vertretern der Bilateria gefunden, unter anderem bei Krebsen, Tintenfischen, Insekten und bei Oligochaeten. Bei all den genannten Vertretern vermitteln die Riesenfasersysteme Fluchtreaktionen.

MYELINISIERUNG

Eine andere Möglichkeit, die Fortleitungsgeschwindigkeit zu erhöhen, ist die Erhöhung des Membranwiderstandes (R_m) bzw. die Verringerung der Membrankapazität (C_m). In allen Organismengruppen, in denen das realisiert wurde, geschah dies durch die Entwicklung von Myelinscheiden. **Myelinscheiden** sind lipidreiche multilamellare Ausbildungen von Gliazellen, die sich auf die Membran des Neurons auflagern. Durch die Myelinauflagerung kommt es zu einer Erhöhung des Membranwiderstandes oder mit anderen Worten: Durch die Myelinauflagerung wird das Zellinnere sehr viel besser gegen das Zelläußere isoliert. Ein Ion, das die nun myelinisierte Membran "passieren möchte", muss einen enormen Widerstand überwinden. Dies bedeutet, dass der Leckstrom sehr klein wird. Ein durch Natriumeinstrom entstehendes Potential breitet sich nun über eine längere Strecke aus. Erinnern Sie sich daran, dass sich bei einer Erhöhung des Membranwiderstandes auch die Längskonstante erhöht.

OPTIMIERUNG DER FORTLEITUNGSGESCHWINDIGKEIT BEI LUMBRICUS TERRESTRIS

Beim Regenwurm *Lumbricus terrestris* wurde das Problem der Erhöhung der Fortleitungsgeschwindigkeit durch eine Kombination der oben erwähnten Strategien gelöst. Der Kanadische Tauwurm, wie er im Anglerbedarf genannt wird (Abb. 2), hat zwei im Bauchmark gelegene Riesenfasersysteme (ein medianes Riesenfasersystem MRF und ein laterales Riesenfasersystem LRF).

Die Neurone der beiden Riesenfaser weisen im Vergleich zu den anderen Neuronen des Regenwurms einen sehr viel größeren Durchmesser auf. Außerdem sind die Neurone der medianen Riesenfaser myelinisiert. Beim Regenwurm beträgt der Durchmesser der medianen Riesenfaser (MRF) ca. 75 μm und der der beiden lateralen Riesenfaser (LRF) jeweils 50 μm . Der Durchmesser der MRF wird nach posterior und die Durchmesser der beiden LRF werden nach anterior kleiner (Abb. 2). Die lateralen Riesenfaser sind durch Querbrücken (Anastomosen) miteinander verbunden und arbeiten deshalb funktionell wie eine einzelne Nervenfasern. Bei der Ableitung hat dies zur Konsequenz, dass wir nicht zwei APs von beiden lateralen Riesenfaser erhalten, sondern ein Summenpotential, da die APs in beiden LRFs zeitlich synchron laufen.

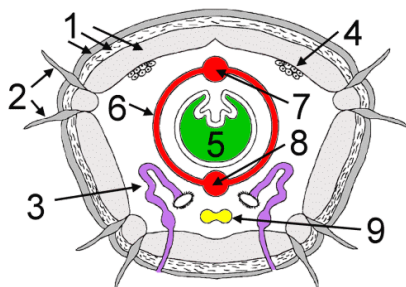


Abb. 2:

Grundbauplan des Regenwurms *Lumbricus terrestris* im Querschnitt. 1 – Hautmuskelschlauch, 2 – Borsten, 3 – Nephridien, 4 – Gonaden, 5 – Darm, 6 – Ringgefäß, 7 – Rückengefäß, 8 – Bauchgefäß, 9 – Bauchmark

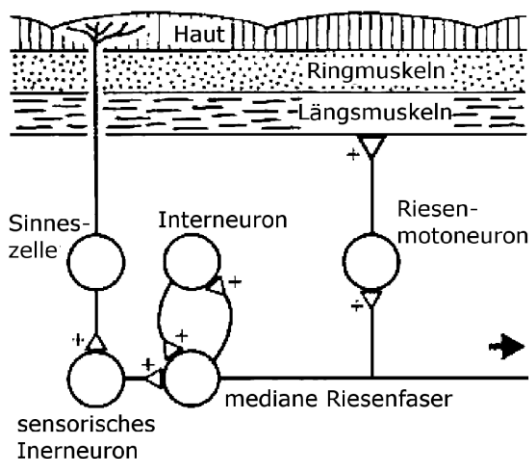


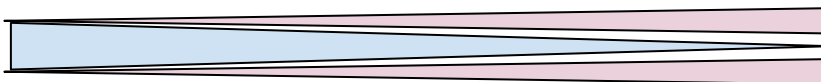
Abb. 3: Verschaltung der anterioren am MRF beteiligten Neurone in *L. terrestris* (schematisch). Sinneszellen in der Haut verschalten über sensorische Interneurone auf die Neurone der MRF. Die MRF selbst hat drei Verbindungen: zum einen mit Interneuronen, die zurück auf die MRF projizieren (positive Rückkopplung), zum anderen auf die lokale Längsmuskulatur und zum dritten auf die Borsten des posterioren Endes (Pfeil). Durch die positive Rückkopplung kann es bei mechanischer Reizung zum Auftreten von paarigen Aktionspotentialen in der MRF kommen, dies ist jedoch nicht immer zu beobachten. Kreise: Zellkörper, Dreiecke: chemische Synapsen.

Während die Erregungsmuster zur Steuerung der meisten Bewegungen beim Regenwurm in polysynaptischen Netzwerken

mit relativ langsam leitenden Neuronen generiert werden, sind die Riesenfasern an **schnellen und koordinierten Meidereaktionen (Fluchtreflexen)** beteiligt. Die MRF und die LRFs sind unterschiedlich mit sensorischen und motorischen Neuronen verschaltet (Abb. 3). Die MRF kann, wenn der Wurm mechanisch gereizt wird, nur durch Berührung des **anterioren Pols** des Wurms angesprochen werden. Die LRF hingegen wird bei mechanischer Reizung des **posterioren Pols** des Wurms angesprochen. Sowohl die Aktivität der MRF als auch die der LRF wird auf Motoneurone verschaltet, die ihrerseits die Längsmuskulatur innervieren. Die LRF verschalten allerdings zusätzlich auf Motoneurone, die die Muskulatur zum Ausstrecken von Borsten am anterioren Körperende innervieren, wohingegen die MFR auf Motoneurone verschaltet, deren Aktivität zum Ausstrecken der Borsten am posterioren Körperende führt. Daher führt eine Aktivität der LRF dazu, dass das anteriore Körperende am Substrat festgehalten und das posteriore Körperende weggezogen wird. Die Aktivität der MRF dagegen führt zur Abflachung des posterioren Körperendes, wodurch das anteriore Körperende weggezogen wird. Ein weiteres Charakteristikum der MRF ist eine positive Rückkopplung (Abb. 3) im lokalen Netzwerk, die manchmal dazu führt, dass nur paarige Aktionspotentiale in der MRF gemessen werden können, selbst bei sehr niedriger mechanischer Reizstärke.

1. FRAGEN ZUR ÜBERPRÜFUNG IHRES WISSENS

1. Erklären Sie das Prinzip der extrazellulären bipolaren Ableitung.
2. Welche Eigenschaften von Nervenzellen bestimmen die Fortleitungsgeschwindigkeit von Aktionspotentialen?
3. Nach welchen Prinzipien lässt sich die Fortleitungsgeschwindigkeit erhöhen? Warum?
4. Aus welchem Grund ist die Erregungsübertragung an elektrischen Synapsen schneller als an chemischen Synapsen?
5. Erklären Sie folgende schematische Abbildung:



EXPERIMENTELLE AUFGABEN

1. BEOBACHTUNG DER LOKOMOTION DES WURMS

Suchen Sie sich einen ausreichend langen Wurm aus, waschen Sie kurz den Sand ab und legen Sie den "abgetrockneten" Wurm auf ein **angefeuchtetes** Filterpapier und beobachten Sie ihn während der Kriechbewegung. Meidereaktionen werden durch Berühren des anterioren bzw. des posterioren Körperendes des Wurms mit einem stumpfen Gegenstand ausgelöst. **Verwenden Sie für diese Aufgabe nicht mehr als 10 min.**

- 1.1 Protokollieren Sie die Vorgänge während der Kriechbewegung, und vergleichen Sie die aufeinander abgestimmten Bewegungen der Körpersegmente mit der Koordination der Segmente während der Meidereaktionen.
- 1.2 Protokollieren Sie eventuell auftretende Unterschiede in Meidereaktionen, bei Auslösung während der Bewegung oder wenn sich der Wurm sich in Ruhe befindet.

2. IDENTIFIKATION DER RIESENFASER BEI MECHANISCHER REIZUNG

Achtung: Die nachfolgenden Aufgaben sollten schnellstmöglich durchgeführt werden, ohne die Daten komplett auszuwerten. Der Regenwurm wird während des Versuchs sehr wahrscheinlich Schleim absondern und das wird Ihre elektrophysiologische Ableitung negativ beeinflussen.

- 2.1 Lassen Sie den Wurm in die Wurmplatte kriechen (sodass er **ventral** auf beiden Elektrodenpaaren liegt), nachdem Sie die Rinne auf der einen Seite mit Knete blockiert und eine der Plexiglasscheiben mit der Halterung fixiert haben. Wenn der Wurm vollständig verkürzt (aber nicht gequetscht) liegt, blockieren Sie die Rinne auch auf der anderen Seite des Wurmes, sodass er sich nicht mehr vor oder zurück bewegen kann. Fixieren Sie anschließend die zweite Plexiglasscheibe.
- 2.2 Verbinden Sie die Elektroden am posterioren Ende des Wurmes mit dem Verstärker. Der Verstärker muss mit dem AD-Wandler, und dieser wiederum mit dem Computer verbunden sein. Schalten Sie alle Geräte ein. Nachdem der AD-Wandler eingeschaltet ist, starten Sie Spike2 und laden die Konfigurationsdatei "Regenwurm". Überprüfen Sie, ob der Verstärker am richtigen Port angeschlossen ist. Starten Sie eine Aufnahme.
- 2.3 Reizen Sie nun mechanisch 5* Mal das anteriore und posteriore Ende des Wurmes (mit Ruhephasen für den Wurm, mindestens 30 sec.), indem Sie ihn mit einem abgestumpften Zahnstocher durch ein entsprechendes Loch der Plexiglasscheine vorsichtig berühren. Markieren Sie Ihre Reizungen mithilfe der Keyboardmarker von Spike2 (Taste A für anterior, Taste P für posterior drücken). Fragen Sie einen Tutor, ob Ihre Ableitungen ordentlich aussehen! Speichern Sie die Datenspur als .smr-Datei ab.

* Wenn Sie mehrere APs für eine einzige Reizung bekommen, dann reizen Sie den Wurm nur so oft, um 5 APs zu bekommen.

2.4 Protokollieren Sie die Einstellungen am Verstärker. Notieren Sie sich auch die Polarität der Messelektroden und die Entfernung der Elektrodenpaare von den Enden des Wurmes.

2.5 Beobachten Sie die Amplitude, Dauer und die Form der Impulse, wenn das anteriore bzw. das posteriore Körperende gereizt wird, und ordnen Sie die Impulse den verschiedenen Riesenfasern zu (Abb. 5, Polarität der Elektroden beachten). Ziehen Sie zur Identifikation der Impulse die Abbildungen 5 und 6 heran.

Für Ihr eigenes Verständnis: Wie lange dauert ein typisches Aktionspotential und welche Amplitude wird es in etwa haben? Beachten Sie dabei auch die Polarität der Messelektroden. Vertauschen Sie nötigenfalls die Polarität, um Klarheit zu erlangen.

Nach dem Experiment: Berechnen Sie die durchschnittliche Amplitude und Dauer eines Aktionspotentials (von mind. 5 APs) jeweils für anteriore und posteriore Reizungen. Berechnen Sie außerdem jeweils die Latenzzeit nach einem mechanischen Reiz (ausgehend von Ihrem benutzten Keyboard-Marker). Geben Sie auch jeweils die Standardabweichung an!

Nach dem Experiment: Belegen Sie Ihre Beobachtungen mit jeweils einer Abbildung für eine typische Ableitung nach anteriorer bzw. posteriorer Reizung. "Typisch" bedeutet in diesem Fall, dass die Abbildung die von Ihnen errechneten Amplituden, Dauern und Latenzen beispielhaft belegt (Abb. 5).

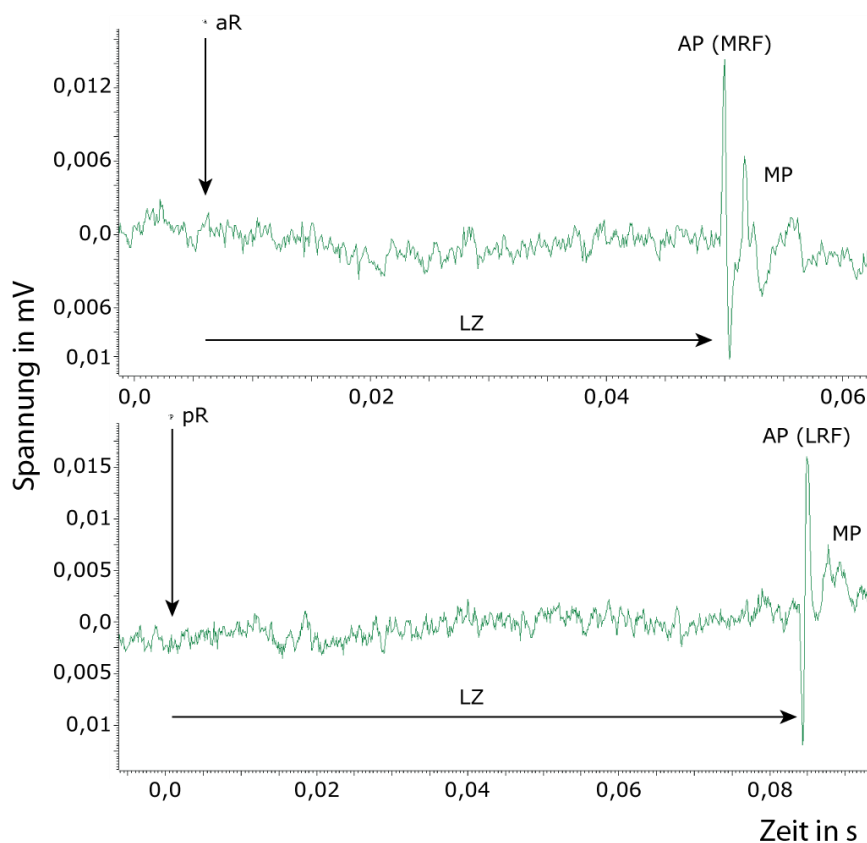


Abb. 5: Ableitung von Aktionspotentialen (AP) nach anteriorer (oben, aR) und posteriorer (unten, pR) mechanischer Reizung. Nach der Reizung benötigt das Aktionspotential eine gewisse Zeit (Latenzzeit, LZ), um vom Ort der Reizung zum Ableitungsort zu gelangen. Muskelpotentiale (MP) folgen der Ableitung der Aktionspotentiale. MRF: Mediane Riesenfaser; LRF: Laterale Riesenfaser
Beachten Sie, dass es sich um eine bipolare Ableitung handelt (Hinweis: Polarität der Elektroden)

3. BESTIMMUNG DER REIZSCHWELLE UND DER FORTLEITUNGSGESCHWINDIGKEIT VON MRF UND LRF DURCH ELEKTRISCHE REIZUNG

Um genauere Unterschiede zwischen den beiden Riesenfasersystemen experimentell zu untersuchen, ist es notwendig, die Aktionspotentiale in den Riesenfasern kontrolliert zu erzeugen. Dies ist durch elektrische Reizung möglich.

- 3.1 Schließen Sie die Elektroden am **anterioren** Ende des Wurms an den **Reizgenerator** und stellen Sie die Reizdauer (Duration) auf 0.1 ms ein. Überprüfen Sie mithilfe der Konfigurationsdatei "Regenwurm", ob die Geräte am richtigen Port angeschlossen sind.
- 3.2 Stellen Sie die Reizstärke auf **0.5 V** ein und steigern Sie diese systematisch (**auf höchstens 10 V, BEACHTEN SIE DIE VERSTÄRKUNG!**). Starten Sie eine Aufnahme. Geben Sie nun jeweils einen Single-Puls und markieren Sie die Reizstärke in der Ableitpur mithilfe der Keyboard-Marker.
- 3.3 Protokollieren Sie die Reizstärke, bei der sich **zum ersten Mal ein** Aktionspotential ableiten lässt. Wiederholen Sie die Reizung (mit Ruhephasen für den Wurm mind. 30 sec.), um insgesamt 2 Aktionspotentiale bei dieser Reizstärke abzuleiten.
- 3.4 Protokollieren Sie bei welcher Reizstärke **zwei** Aktionspotentiale auftreten, obwohl nur einmal gereizt wurde. Wiederholen Sie die Reizung 2 Mal (mit Ruhephasen für den Wurm mind. 30 sec.).

Nach dem Experiment: Berechnen Sie die durchschnittlichen Amplituden, Dauern und Latenzen der Aktionspotentiale für die erste Schwelle (1 AP) und die zweite Schwelle (2 APs: das 1. AP und 2. AP getrennt auswerten). Geben Sie jeweils auch die Standardabweichung an!

Nach dem Experiment: Identifizieren Sie die Aktionspotentiale von MRF und LRF. Vergleichen Sie dazu die gemessenen Werte mit denen von Aufgabe 2. Erklären Sie im Material-und-Methoden-Teil, wie Sie diese Identifikation vorgenommen haben (Stichwort: Polarität der Elektroden).

Nach dem Experiment: Berechnen Sie die Geschwindigkeiten der Reizweiterleitung in m/s für MRF und LRF. Verwenden Sie dafür die Latenz und den Abstand zwischen den beiden Elektrodenpaaren.

Nach dem Experiment: Belegen Sie Ihre Resultate mit einer Abbildung, die beide Schwellen und Latenzzeiten verdeutlicht (Abb. 6).

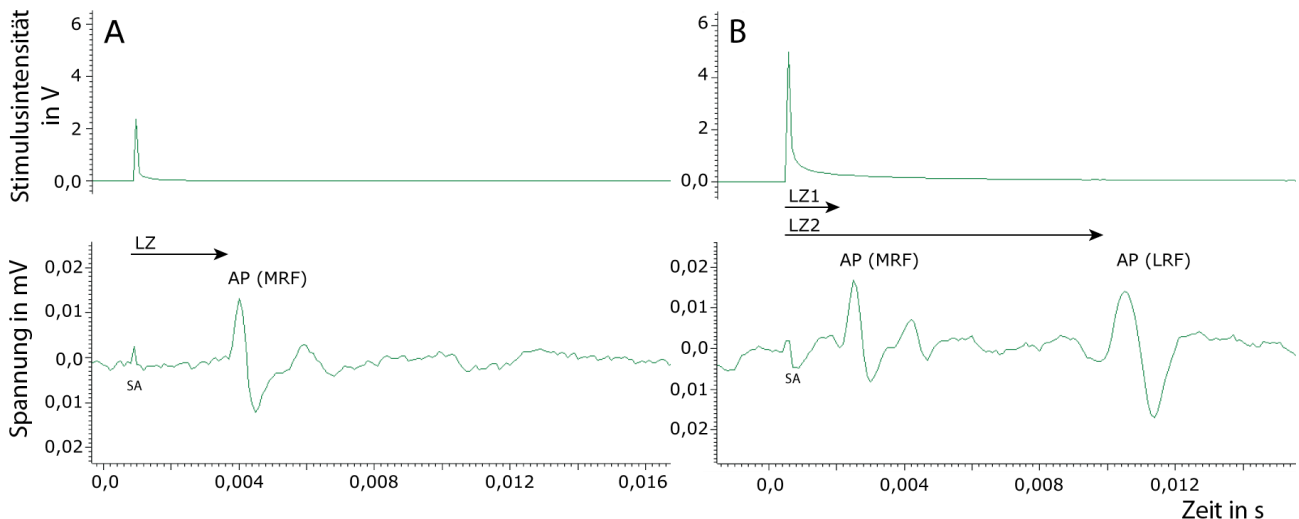


Abb. 6: Schwellwertbestimmung mit elektrischen Reizen. (A) Schwelle der medianen Riesenfaser (MRF). Auf einen Reiz (obere Spur) von 2 V erfolgte nach 3,8 ms Latenz (LZ) ein Aktionspotential (untere Spur, AP (MRF)). (B) Schwelle der lateralen Riesenfaser (LRF). Auf einen Reiz von 5 V (obere Spur) folgte mit einer Latenz (LZ1) von 3,2 ms ein erstes Aktionspotential (untere Spur, AP (MRF)) und nach 10,3 ms (LZ2) ein zweites Aktionspotential (untere Spur, AP (LRF)). In diesem Experiment waren auch kleine Reizartefakte (SA) zu beobachten.

4. BESTIMMUNG DER REFRAKTÄRPHASEN BEI ELEKTRISCHER REIZUNG

Zur Bestimmung von Refraktärphasen werden zwei aufeinanderfolgende Reize gegeben. Der zeitliche Abstand zwischen den beiden Reizen wird systematisch variiert, um das Zeitfenster nach einem Aktionspotential zu ermitteln, in dem **kein** weiteres Aktionspotential mehr ausgelöst werden kann.

- 4.1 Stellen Sie den linken Schiebeschalter des Reizgenerators auf "Twin-Pulse". Mit dem "Delay"-Knopf wird nun der **zeitliche Abstand** zwischen den Reizpulsen reguliert. Stellen Sie die Reizstärke und -dauer auf Werte ein, die verlässlich die Schwelle zur Auslösung **eines einzelnen** Aktionspotentials überschreiten (diese haben Sie in Aufgabe 3, Punkt 3 bestimmt).
- 4.2 Stellen Sie eine Verzögerung (Delay) von 20 ms ein und verringern Sie diese in geeigneten Schritten. Starten Sie eine Aufnahme und geben Sie nun jeweils einen Twin-Pulse.
- 4.3 Protokollieren Sie den Delay-Wert bei dem **kein zweites AP** mehr beobachtet wird.
- 4.4 Wenn Sie diesen Wert gefunden haben, verändern Sie ihn nicht mehr. Erhöhen Sie nun jedoch die Reizstärke schrittweise, bis wieder ein zweites AP ausgelöst wird. Notieren Sie diese Reizstärke und messen Sie die Amplitude der Aktionspotentiale!
Achtung: Überschreiten Sie **nicht** die Schwelle zur Auslösung von zwei Aktionspotentialen. Diese haben Sie in Aufgabe 3, Punkt 4 bestimmt.
Verringern Sie nun wieder den Delay, bis wieder kein zweites Aktionspotential beobachtet werden kann und protokollieren Sie diese Werte.

Nach dem Experiment: Nutzen Sie eine Excel-Tabelle, in der Sie die Verzögerung (Delay), die Reizstärke (Voltage) und die Amplituden von dem einen bzw. den zwei Aktionspotentialen speichern. Die Tabelle könnte so (oder ähnlich) aussehen:

Delay [ms]	Stimulus [V]	Amplitude AP1	Amplitude AP2

Nach dem Experiment: Berechnen Sie aus der absoluten Refraktärzeit die maximal mögliche AP-Frequenz.