

NEUROBIOLOGIE FÜR BIOINFORMATIKERINNEN:
PRAKTIKUM B

PROTOKOLL ZUM 3. PRAKTIKUMSTAG AM 21.01.2019

Neurosim
Computersimulation von Nervensignalen

GRUPPE V

Gruppenmitglieder

ALIA ROTHKEGEL
MARA STEIGER

alia.rothkegel@fu-berlin.de
mara.steiger@fu-berlin.de

Lehrveranstalter

Prof. Dr. P.R. HIESINGER
Dr. D. MALUN
Prof. Dr. M. WERNET

TutorInnen

LISA PETERS
JOHANNES BRÜNER HAMMACHER
CLAUDIA HAUSHALTER

1 Einleitung

1.1 Membranpotential von Neuronen

Die Fortleitung von Informationen wird von Zellen des Nervensystem übernommen und basiert auf Spannungsunterschieden zwischen dessen Zellinnerem und dem extrazellulären Raum.

Aufgrund der Semipermeabilität der Membran von Neuronen liegt ein sogenanntes Ruhepotential von ca. -70mV vor. Die Membran ist für größere Ionen wie Natrium (Na^+) nicht permeabel, aber Kalium (K^+) kann frei diffundieren. Daher entspricht das Ruhemembranpotential in etwa dem Gleichgewichtspotential von Kalium. Durch die geringere Konzentration von Kalium-Ionen außen ergibt sich ein negatives Membranpotential, d.h. die Nervenzelle ist gegenüber der Außenseite negativ geladen. Außerdem trägt eine Natrium-Kalium-Pumpe ($Na^+-K^+-ATPase$) zum Erhalt des Membranpotentials bei.

1.2 Nernst-Gleichung

Mit Hilfe diese Gleichung lässt sich das Gleichgewichtspotential E_{ion} für Ionen berechnen, d.h. das Membranpotential bei dem sich die Ionenbewegungen im Gleichgewicht befinden. Dieses Potential ist abhängig von der Ionenkonzentration außen c_a und innen c_i . Außerdem wird vereinfachend eine Temperatur von 20 Grad angenommen.

$$E_{ion} = 58mV \cdot \log \left(\frac{c_a}{c_i} \right) \quad (1)$$

1.3 Goldman-Gleichung

Um mehrere Ionen für das Membranpotential von Neuronen zu berücksichtigen, benötigt man die komplexere Goldman-Gleichung. Sie bezieht zusätzlich für jedes Ion die entsprechende Permeabilität der Membran mit ein:

$$V_m = \frac{RT}{F} \cdot \ln \left(\frac{p_K[K^+]_o + p_{Na}[Na^+]_o + p_{Cl}[Cl^-]_i}{p_K[K^+]_i + p_{Na}[Na^+]_i + p_{Cl}[Cl^-]_o} \right) \quad (2)$$

1.4 Voltage-Clamp-Methode

Um Strom durch Ionenkanäle der Nervenzellmembran zu messen verwendet man die Voltage-Clamp-Technik. Dabei wird eine Elektrode verwendet,

die die Spannung an der Membran misst und mit einer Sollspannung vergleicht. Dazu wird noch eine zweite Elektrode benötigt, die entsprechende Abweichungen von der Sollspannung ausgleichen soll. Dieser benötigte Stromfluss entspricht dem Ionenstrom durch die Membran.

1.5 Aktionspotentiale

Eine Nervenzelle wird durch die Bindung eines Neurotransmitters an einen ligandengesteuerten Ionenkanal in der Plasmamembran aktiviert. Dieser Kanal öffnet sich durch die Bindung, woraufhin Na^+ entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle einströmt und eine Depolarisation bewirkt. Spannungsabhängige Na^+ -Kanäle entlang des Axons einer Nervenzelle, die durch die Depolarisation in benachbarten Regionen der Zelle kurz geöffnet werden, sorgen für die Ausbreitung des Aktionspotentials in Form einer Depolarisationswelle durch das Neuron. Kurz nach der Depolarisation durch den Natrium-Einstrom öffnen sich auch spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle entlang des Axons, die wiederum eine Repolarisation durch den Ausstrom von Kalium bewirken. Da diese Kalium-Kanäle etwas langsamer schließen, kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Anschließend wird das Ruhepotential durch Leckströme von Ionen und die Aktivität der Natrium-Kalium-Pumpe wiederhergestellt.

1.6 Refraktärphase

Nachdem die Natrium-Kanäle während der Depolarisation kurz geöffnet waren, sind sie für eine bestimmte Zeit inaktiviert. Diese Phase nennt man Refraktärphase. Währenddessen können diese Natrium-Kanäle nicht aktiviert werden und ein weiteres Aktionspotential auslösen. Dadurch wird erreicht, dass sich die Depolarisationswelle, d.h. das Aktionspotential, nur in eine Richtung entlang des Axons ausbreitet.

Man unterscheidet zwischen der absoluten und relativen Refraktärphase. Während der absoluten Refraktärphase ist eine Erregung überhaupt nicht möglich, auch nicht durch eine starke Depolarisation.

Die relative Refraktärphase beginnt direkt nach der absoluten Refraktärphase. Hier ist eine erneute Erregung zwar möglich, aber das Schwellenpotential ist deutlich höher. Das heißt, um erneut ein Aktionspotential auszulösen ist ein stärkerer Reiz nötig. Außerdem ist während dieser Zeit die Amplitude des resultierenden Aktionspotentials verringert.

1.7 Bewegungsdetektion

Die Informationen aus wahrgenommenen Reizen der Photorezeptoren müssen mittels Interneuronen entsprechend verschaltet werden, um Bewegungen an sich und deren Richtung und Geschwindigkeit wahrnehmen zu können.

Im Folgenden werden zwei Modelle für Bewegungswahrnehmung vorgestellt.

Beim **Barlow-Levick Modell** (auch Halbdetektor) ist eine Unterscheidung zwischen Vorzugs- und Nullrichtung möglich. Er besteht aus zwei Neuronen, von denen eins das Signal zeitverzögert an ein drittes Neuron weiterleitet. Wird ein Reiz in Null-Richtung wahrgenommen, kommen so beide Signale zeitgleich am dritten Neuron an, welches über eine hemmende Synapse somit eine Hemmung schließlich an ein viertes Neuron weiterleitet. Würde dagegen eine Bewegung in der bevorzugten Richtung wahrgenommen werden, kämen die beiden Signale der ersten beiden Neurone nicht zeitgleich am dritten Neuron an, wodurch keine Hemmung an das vierte Neuron weitergeleitet werden würde. (siehe Skript) Das **Reichardt-Hassenstein Modell** besteht quasi aus zwei gespiegelten Halbdetektoren. Somit kann dieses Detektor Bewegungen in beide Richtungen wahrnehmen, da beide der Untereinheiten eine Bewegungsrichtung erkennen kann. Das Modell besteht aus 5 Neuronen, die so verschaltet sind (auch mit Zeitverzögerung), dass das Signal für beide Bewegungsrichtungen wahrgenommen wird und entsprechend mit entgegengesetztem Vorzeichen weitergegeben wird.

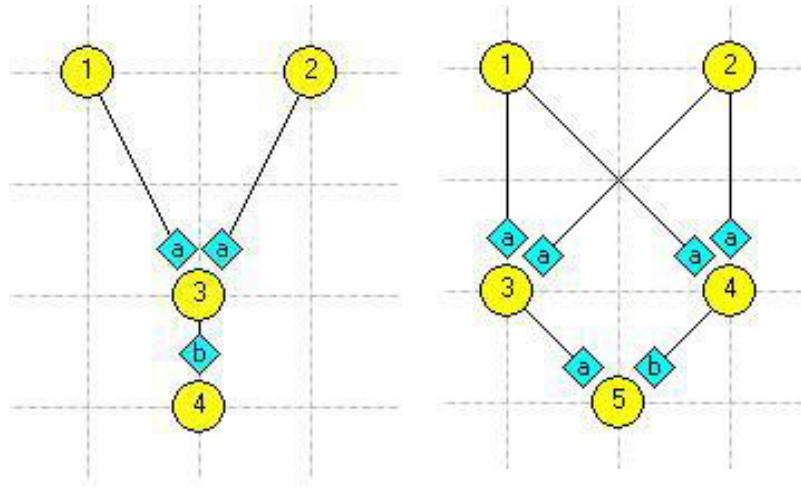


Abbildung 1: Die Abbildung zeigt links schematisch den Aufbau eines Barlow-Levick Modells und recht den eines Reichhardt-Hassenstein Modells. a steht dabei für erregende Synapsen und b für hemmende Synapsen. Hier wäre die Vorzugsrichtung von links nach rechts. Die gelben Kreise repräsentieren Neurone.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Für diesen Versuch benötigten wir lediglich einen Computer mit der Software Neurosim.

2.2 Versuchsaufbau

1. Modul Goldmann

Wie in Abb. ?? zu erkennen handelt es sich um einen simplen Versuchsaufbau. Von der gegebenen Skala können das Membranpotential, sowie die Gleichgewichtspotentiale der K^+ -, Na^+ - und Cl^- -Ionen in mV abgelesen werden.

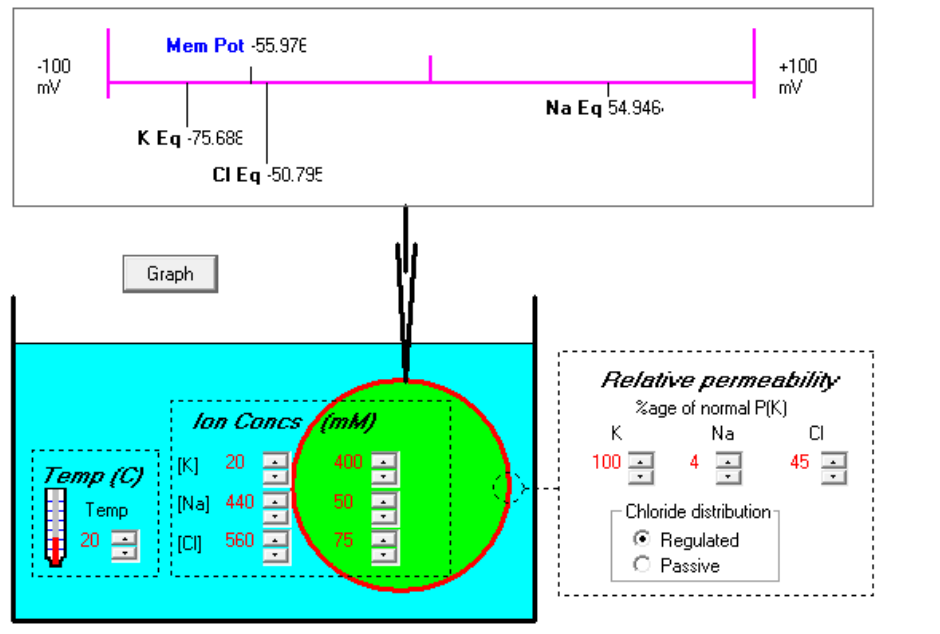


Abbildung 2: Die Abbildung zeigt den Versuchsaufbau innerhalb der Simulation Neurosim. Der grüne Kreis stellt eine Zelle dar, die sich in einem Außenmedium, der blauen Umgebung befindet. Der Pfeil steht für eine Elektrode, die neben den Gleichgewichtspotentialen der Ionen auch das Membranpotential misst.

Zusätzlich konnten Temperatur, Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle, sowie die relative Permeabilität der Zellmembran in Bezug zu der Permeabilität gegenüber K⁺-Ionen verändert werden. Für unseren Versuch wählten wir folgende Parameter (s. Abb. ??): Die Temperatur der Lösung wurde auf 20°C heraufgesetzt. Die relative Permeabilität für K⁺-Ionen wurde auf 100 gesetzt, die von Na⁺-Ionen auf 4 und die der Cl⁻-Ionen auf 45. Die Konzentration der K⁺-Ionen innerhalb der Zelle lag bei 400 mM, außerhalb bei 20 mM. Na⁺-Ionen hatten im Äußeren der Zelle eine Konzentration von 440 mM und im Zellinneren eine von 50 mM, während Cl⁻-Ionen im Außenmedium eine Konzentration von 560 mM aufwiesen und im Inneren 75 mM.

2. Modul Hodgkin-Huxley (Current-Clamp)

Auch in diesem Teil des Versuches wird eine Zelle in einem Außenmedium simuliert (s. Abb. ??). Allerdings wird in diesem Aufbau eine Reizelektrode ergänzt, die an eine current clamp angeschlossen ist.

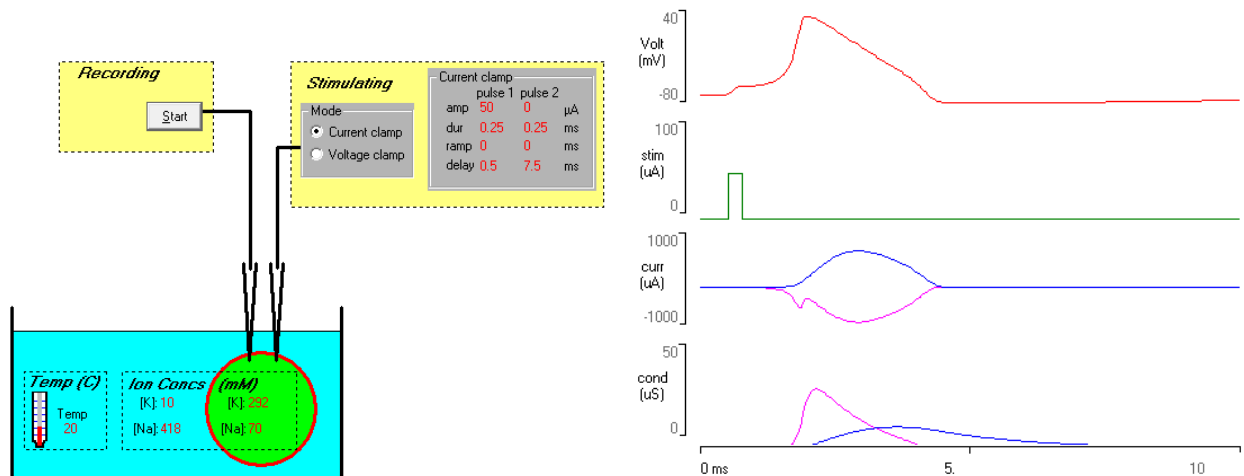


Abbildung 3: Die Abbildung zeigt den anfänglichen Versuchsaufbau innerhalb der Simulation Neurosim. Links ist der Versuchsaufbau dargestellt, das Zellinnere in grün mit roter Zellmembran und das Außenmedium in blau. Es gibt zwei Elektroden die ins Zellinneren reichen, eine Messelektrode und eine Reizelektrode, die mit einer current clamp verbunden ist. Rechts zeigen Kurven die Werte der Reizungen, sowie die im Zellinneren gemessenen Werte.

Zu Anfang wählten wir für das Außenmedium eine Temperatur von 20° C und eine Na⁺-Konzentration von 418 mM und eine K⁺-Konzentration von 10 mM auf. Im Inneren der Zelle liegen Na⁺-Ionen mit einer Konzentration von 70 mM und K⁺-Ionen mit einer Konzentration von 292 mM vor.

Über die Reizelektrode können zwei Reize voreingestellt und mit Start in die Zelle übertragen werden. Mithilfe der Parameter konnten jeweils die Amplitude in μ A (s. Abb. ?? : " amp"), die Dauer (s. Abb. ?? : " dur") in ms und die Verzögerung (s. Abb. ?? : " delay") in ms eingestellt werden.

Für die zweite Hälfte dieses Versuchsteils wurde die Temperatur auf 6° C herabgesetzt und die K⁺-Konzentration innerhalb der Zelle

auf 390 mM erhöht. Zusätzlich wurde die Dauer des Reizes auf 90 ms erhöht.

3. Modul Hodgkin-Huxley (Voltage-Clamp)

Für diesen Teil des Versuchs wurde der Aufbau erneut leicht angepasst. Die current clamp wurde durch eine Voltage Clamp ersetzt (s. Abb. ??).

Für die Voltage Clamp können Halte- und Klemmspannung in mV sowie die Dauer in ms eingestellt werden. Außerdem können zusätzlich die Gifte "TTX", "TEA" und "Scorp Tx" in das System eingeleitet werden.

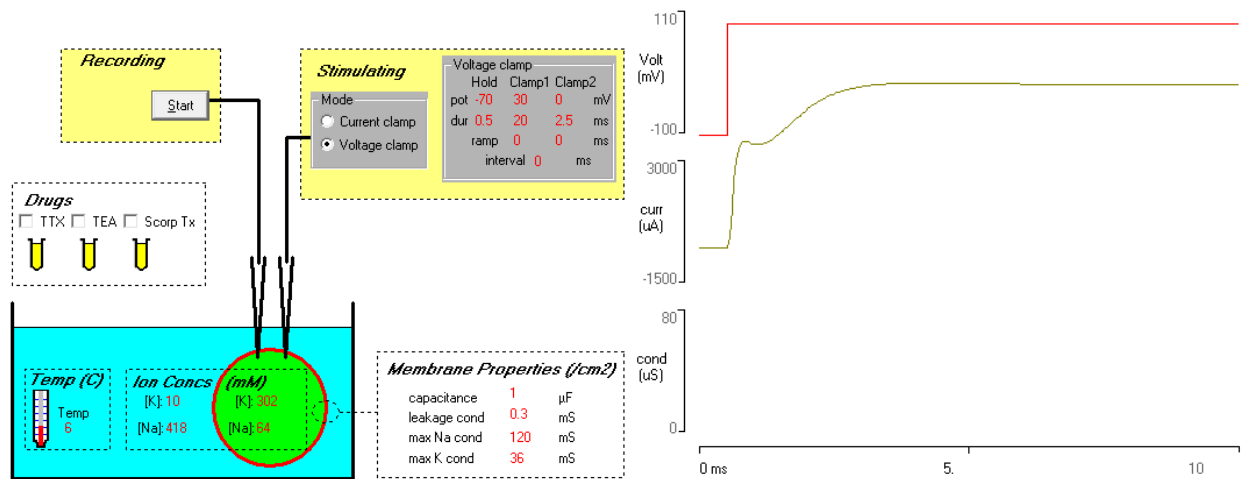


Abbildung 4: Die Abbildung zeigt den Versuchsaufbau für den dritten Versuchsteil mit der Voltage Clamp. Rechts der Versuchsaufbau mit Voltage Clamp. Links die dazugehörigen Werte als Graphen.

Diesmal wurde für das Außenmedium eine Temperatur von 6° eingestellt. Die Ionenkonzentrationen innerhalb der Zelle betrugen 302 mM für K⁺ und 64 mM für Na⁺. Außerhalb der Zelle waren die K⁺-Konzentration auf 10 mM und die Na⁺-Konzentration auf 418 mM eingestellt.

An der Haltespannung der Voltage Clamp wurde auf -70 mV gestellt, die Klemmspannung auf +30mV.

Die Graphen (s. Abb. ?? links) zeigten die Spannung in mV und die Stromstärke in μA.

4. **Bewegungswahrnehmung**

Für den letzten Versuchsteil zur Bewegungswahrnehmung wurde in Neurosim eine neue Oberfläche geladen in der Neuronen und Synapsen zu neuronalen Netzwerken verknüpft werden konnten.

2.3 **Versuchsdurchführung**

1. **Modul Goldman**

Die Konzentration der K^+ -Ionen im Außenmedium wurde von 10 mM in 50er Schritten auf 800 mM heraufgesetzt. Bei jedem Schritt notierten wir das Gleichgewichtspotential (E_q) von K^+ in mV und das Membranpotential (V_m) in mV.

2. **Modul Hodgkin-Huxley: Current clamp**

Als Erstes wurde ausgehend von $50 \mu A$ die Stromamplitude des Reizes reduziert, bis auf zwei Nachkommastellen genau gerade kein Aktionspotential mehr ausgelöst wurde. Ausgehend von dem ermitteltem Wert wurde nun die Amplitude in 10er Schritten erhöht und die Maximalspannung in mV sowie die Dauer bis zum Erreichen der Maximalspannung in ms notiert.

Im zweiten Teil (nach Heruntersetzen der Temperatur auf $6^\circ C$ (s. Abschnitt Versuchsaufbau)) wurde der Reizstrom erst in kleinen ($0.2 \mu A$) und später in größeren (bis $5 \mu A$) Schritten auf $130 \mu A$ gesteigert. Die Anzahl der auftretenden Aktionspotentiale in 100 ms wurde festgehalten und daraus die Frequenz pro Sekunde berechnet.

3. **Modul Hodgkin-Huxley: Voltage clamp**

Es wurde ein Reiz mit den eingestellten Parametern induziert und der ausgelöste Gesamtstrom im Graphen festgehalten.

Die selektiven Kanalblocker TTX und TEA wurden aktiviert um jeweils entweder den Strom der K^+ - bzw. Na^+ -Ionen zu blockieren.

Anschließend wurde von einem Haltepotential von -100 mV ausgehend die Klemmspannungen zwischen -50 mV und +50 mV in 10er Schritten eingestellt und jeweils der maximale Stromfluss der Ionen unter Verwendung der Kanalblocker notiert.

4. **Bewegungswahrnehmung**

Für diesen letzten Versuchsteil wurde ein neuronales Netz nach Barlow-Levick konstruiert, das Bewegungen von links nach rechts detektieren kann und getestet was passiert, wenn sich der Reiz stattdessen

von rechts nach links ausbreitet, bzw. die Bewegung von rechts nach links geht.

Anschließend wurde dieses Netzwerk zu einem Reichardt-Detektor erweitert und die Entwicklung von Aktionspotentialen an den verschiedenen Neuronen bei verschiedenen Arten der Reizung beobachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Modul Goldmann

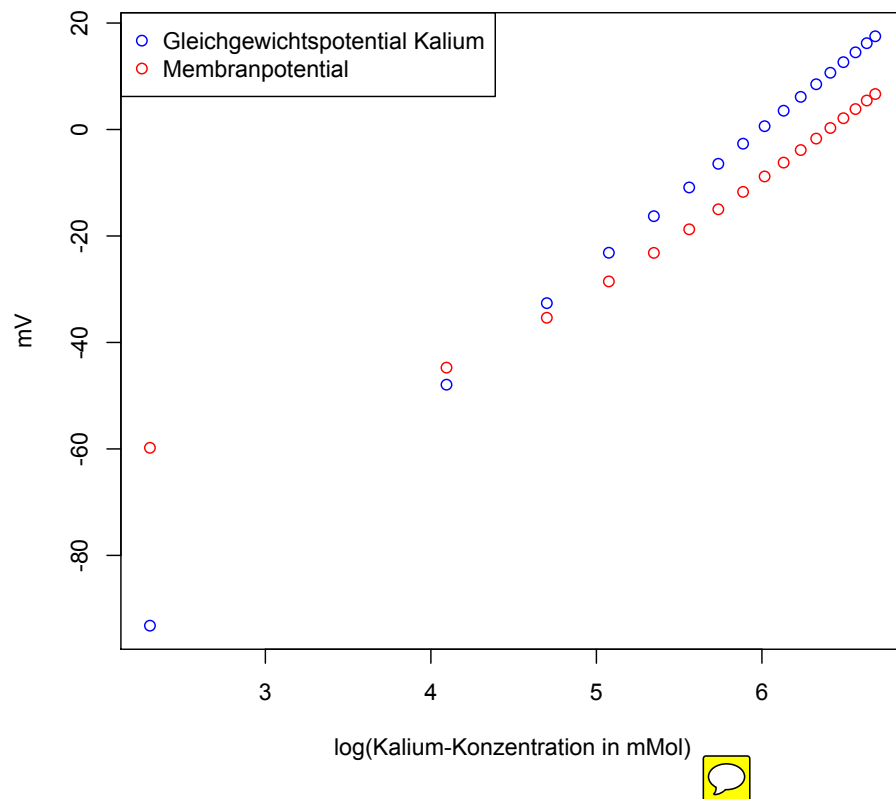


Abbildung 5: Plot mit Graphen des Membranpotentials und des Gleichgewichtspotentials von Kalium in Abhängigkeit der Kalium-Konzentration außen (log-transformiert)

Wie in Abbildung ?? zu sehen weichen das Membranpotential und die Gleichgewichtskonstante von Kalium, insbesondere für kleine Kalium stark voneinander ab. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Membranpotential bei geringen K^+ -Konzentrationen außerhalb der Zelle stärker von den Konzentrationen anderer Ionen (Na^+ , Cl^-) beeinflusst wird. Dies ist bei Betrachtung der Goldmann-Gleichung leicht zu erkennen: Mit kleine-

rer Kalium-Konzentration ist der Einfluss von Kalium auf das resultierende Membranpotential kleiner.

Tabelle 1: Folgende Werte wurden im Skript gegeben:

Ion	Relative Permeabilität	IntrazelluläreKonzentration	ExtrazelluläreKonzentration
K ⁺	1.0	124	4
Na ⁺	0.04	50	470
Cl ⁻	0.3	55	580

Berechnung der Gleichgewichtspotentiale bei 20° mithilfe der Nernst-Gleichung ??:

$$E_K = 58 \cdot \log \left(\frac{4}{124} \right) = -86.499mV \quad (3)$$

$$E_{Na} = 58 \cdot \log \left(\frac{470}{50} \right) = 56.441mV \quad (4)$$

$$E_{Cl} = 58 \cdot \log \left(\frac{580}{55} \right) = 59.338mV \quad (5)$$

Berechnung des resultierenden Membranpotentials mithilfe der Goldman-Gleichung:

$$V_m = \frac{8.314 \cdot 293.15}{96485.333} \cdot \ln \frac{1 \cdot 4 + 0.04 \cdot 470 + 0.3 \cdot 55}{1 \cdot 124 + 0.04 \cdot 50 + 0.3 \cdot 580} \quad (6)$$

$$= -0.051 \quad (7)$$

3.2 Modul Hodgkin - Huxley: Current Clamp

Ein Aktionspotential wird erstmals bei einer Stromstärke von 40.74 μA ausgelöst.

Tabelle 2: Gemessene Werte bei erhöhen des Stimulus um $10\mu A$ bei $20^\circ C$, ausgehend von $40.74\mu A$

Reizstrom in μA	Zeit bis zur maximalen Spannung in ms	maximale Spannung in mV
40.74	0.84	21.82
50.74	0.61	25.09
60.74	0.52	30.55
70.74	0.44	27.27
80.74	0.42	28.36
90.74	0.4	29.45

Wie in **Tabelle ??** zu erkennen sinkt die Zeit bis zur maximalen Spannung mit steigender Stromstärke des Reizes. Dies liegt daran, dass ein stärkerer Reiz auf Anhieb mehr spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle öffnet, wodurch mehr Na^+ -Ionen in die Zelle einströmen und wiederum schneller weitere Na^+ -Kanäle öffnen.

Tabelle 3: Steigern des Reizstroms auf $130\mu A$

Reizstrom in μA	AP pro 100ms	Entladungsfrequenz in Hz
2	1	10
2,02	2	20
2,06	3	30
2,08	4	40
3	5	50
5,4	6	60
10	7	70
16	8	80
22	9	90
30	9	90
35	10	100
40	10	100
45	11	110
55	12	120
70	12	120
75	13	130
90	13	130
95	14	140
115	14	140
120	14	140
125	14	140
130	1	10



Die in **Tabelle ??** dargestellten Messwerte zeigen die Anzahl der Aktionspotentiale pro 100ms in Abhängigkeit der Stromstärke des Reizes sowie die daraus resultierende Entladungsfrequenz in Hz. Es ist klar zu erkennen, dass die Anzahl der Aktionspotentiale am Anfang noch auf kleine Veränderungen reagiert, später allerdings nur noch bei großer Steigung des Reizstroms größer wird. Die zunehmende Anzahl der Aktionspotentiale allgemein ist darauf zurückzuführen, dass die Stärke von Reizen nicht über die Amplitude der Aktionspotentiale codiert wird sondern über deren Frequenz. Eine hohe Frequenz bedeutet demnach ein starker Reiz. Aufgrund der Refraktärzeit existiert allerdings eine obere Grenze der möglichen Anzahl Aktionspotentiale in einem gewissen Zeitraum (hier: 100 ms). Ist der

Reiz zu stark, so ist die Bildung von mehr als einem Aktionspotential nicht mehr möglich, da die absolute Refraktärzeit noch nicht vorbei und somit die Natrium-Kanäle noch inaktiv sind.

3.3 Modul Hodgkin - Huxley: Voltage Clamp

Wie in Abbildung ?? zu erkennen fällt der Gesamtstrom nach Auslösung des Reizes kurz ab, bevor die Kurve dann klar ansteigt und sich einem Grenzwert annähert.

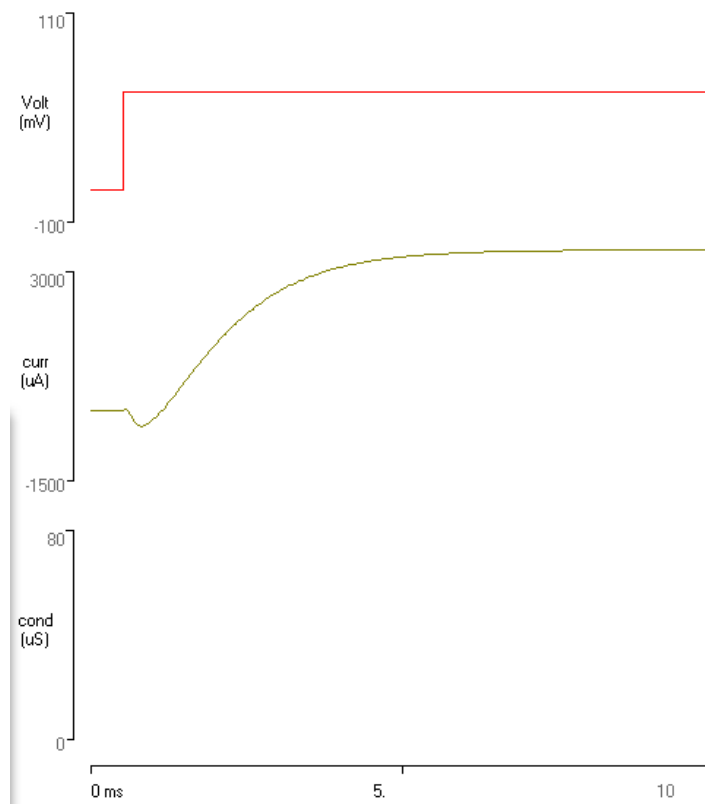


Abbildung 6: In dieser Abbildung sieht man den ausgelösten Gesamtstrom (grüne Kurve) in μA bei -70 mV Halte- und 30 mV Klemmspannung. Der Gesamtstrom erreicht ein Maximum von 3461.54 μA

Aktiviert man die Kanalblocker TTX und TEA und betrachtet die K^+ - und Na^+ -Einströme isoliert, so zeigt sich schnell, woher der Verlauf der Kurve rührt.

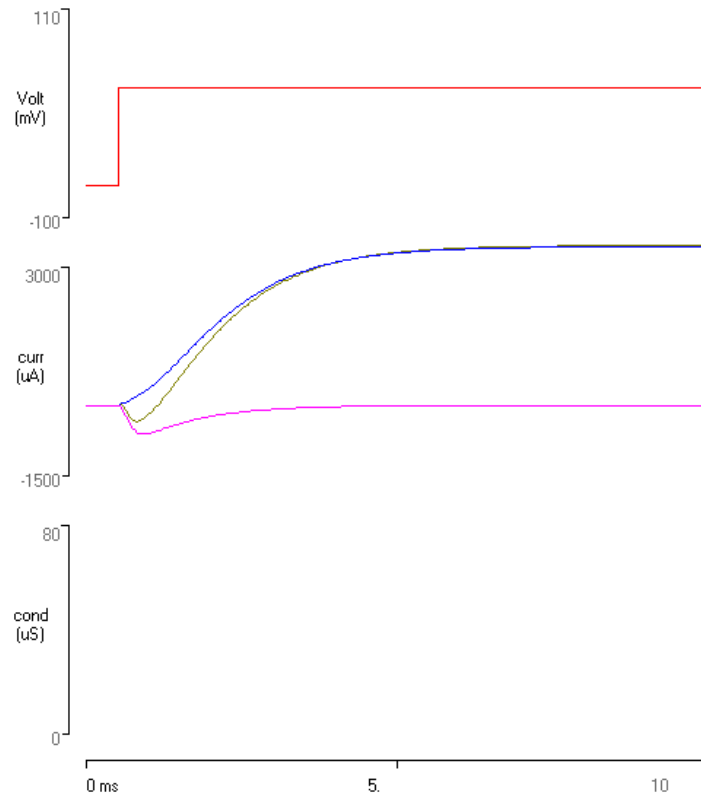


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt im mittleren Graphen die Stromstärke in μA . In grün ist im Hintergrund der totale Strom zu erkennen, die blaue Kurve zeigt den isolierten Kalium-Strom bei Zugabe von TTX und die pinke Kurve den isolierten Natrium-Strom bei Zugabe von TEA.

In der **Abbildung ??** ist zu erkennen, dass der anfängliche Abfall der Kurve des totalen Stroms von den einströmenden Na^+ -Ionen ins Zellinnere stammt. Dieses wird so kurzzeitig positiv, somit muss der ausgleichende Strom negativ sein. Der anschließende Anstieg stammt von den ausströmenden Kalium-Ionen.

Tabelle 4: Messwerte verschiedener Klemmspannungen bei -100 mV Haltespannung

Klemmspannung in -100 mV	maximaler Stromfluss K^+	maximaler Stromfluss Na^+
-50	94,41	-346,15
-40	346,15	-1069,93
-30	692,31	-1793,71
-20	1132,87	-2230,77
-10	1604,9	-2409,09
0	2108,39	-2318,18
10	2548,95	-2090,91
20	2989,51	-1608,39
30	3398,6	-1013,99
40	3870,63	-363,64
50	4248,25	342,66



3.4 Bewegungswahrnehmung

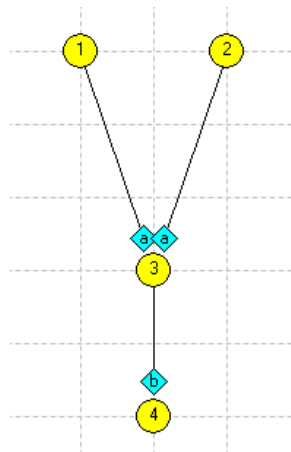


Abbildung 8: Das in dieser Abbildung abgebildeten Barlow-Levick-Model eines neuronalen Netzwerks ist in der Lage Bewegungen von Links nach Rechts zu registrieren. Gelbe Kreise stellen Neuronen dar, die hellblauen Rauten simulieren Synapsen.

In **Abbildung ??** ist ein neuronales Netzwerk nach dem im Skript beschriebenen Barlow-Lewick Modell zu erkennen. Die Neuronen 1 und 2 sind über erregende Synapsen des Typs a mit Neuron 3 verbunden, welches über eine hemmende Synapse des Typs b mit Neuron 4 verbunden ist. In der Synapse von Neuron 2 zu Neuron 3 ist ein 200 ms Delay eingebaut. Wird eine Bewegung von Links nach Rechts registriert, also wird Neuron 1 vor Neuron 2 gereizt so kommt es zu keiner weiteren AP Bildung an den anderen Neuronen. Findet eine Bewegung in die Gegenrichtung mit einem 200 ms Delay statt, so kommt es an Neuron 3 zu einem Aktionspotential, ausgelöst durch die Summierung der von Neuron 1 und Neuron 2 zeitgleich eintreffenden Aktionspotentiale und an Neuron 4 kommt es zu einer Hemmung (s. Abb. ??)

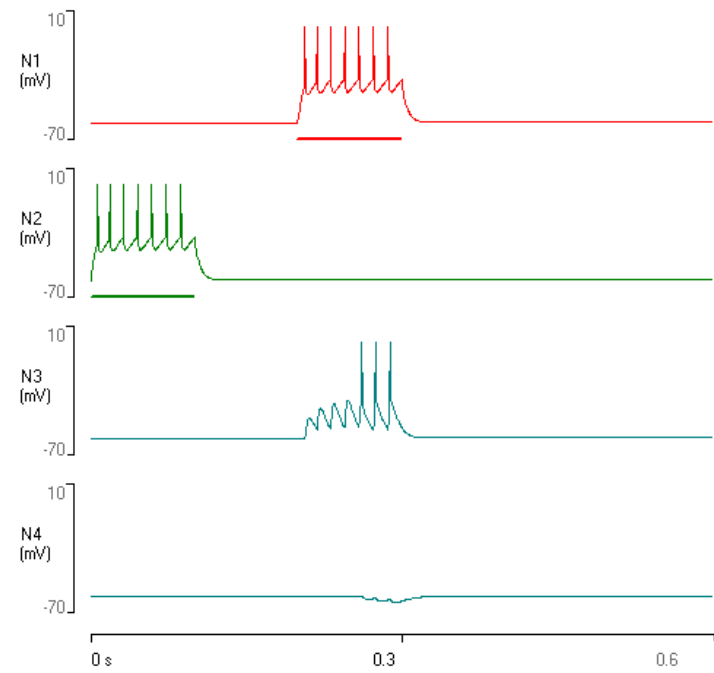


Abbildung 9: In der Abbildung sind die Spannungen (in mV) an den verschiedenen Neuronen graphisch dargestellt.

Bei einer Erweiterung zu einem Reichardt-Detektor (**s. Abb. ??**) wird ein zusätzliches Neuron sowie drei zusätzliche Neuronen benötigt. Erregende Synapsen verschalten mit einem Delay von 200 ms Neuron 1 mit Neuron 3, sowie Neuron 2 mit Neuron 4. Neuron 1 und 4, 2 und 3 sowie 3 und 4 sind

ebenfalls mit erregenden verknüpft, allerdings ohne Delay. Neuron 4 ist mit Neuron 5 über eine hemmende Synapse verbunden. Zusätzlich haben wir den Initial threshold des Neurons 5 von -40 mV auf -50 mV herabgesetzt, da es sonst nicht zur Auslösung eines Aktionspotentials an Neuron 5 kam.

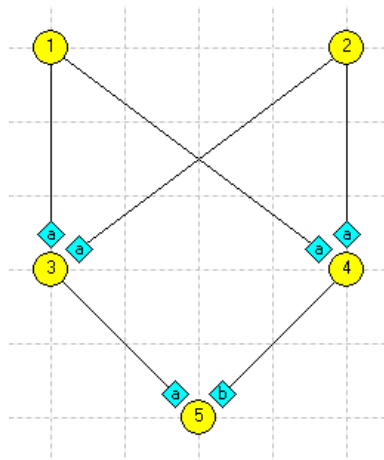


Abbildung 10: Ein neuronales Netzwerk entsprechend des Modells eines Reichardt-Detektors entspricht.

Aktionspotentiale an den Interneuronen 3 und 4 entstehen nicht sofort, sondern erst nach Aufsummierung mehrerer ankommenden AP's. Soll bereits beim ersten eintreffenden AP ein weiteres ausgelöst werden, so kann der Threshold herabgesetzt werden, so dass es bei geringerer Spannung bereits zur Auslösung eines Aktionspotentials kommt. Zusätzlich müssen die beiden Aktionspotentiale der vorherigen Neuronen so gut wie gleichzeitig eintreffen, es gibt lediglich einen Spielraum von -0.004 und +0.0034, der auf den Delay zwischen den Reizen angewendet werden kann.

