

Vorbemerkungen:

Sinnesorgane wandeln in vielzelligen Tieren mechanische, chemische und optische Information (= Reize) von außerhalb oder innerhalb des Körpers zuerst in veränderte Membranpotentiale (=Rezeptorpotentiale) ihrer Sinneszellen um. Mechanorezeptoren haben hierfür einen oder viele sensible Dendriten mit mechanisch gesteuerten Ionenkanälen in ihren Membranen. Dort erzeugen mechanische Reize Ionenflüsse (Na/Ca einwärts) durch die Membran als Ursache für Rezeptorpotentiale. Deren Amplitude ist von der Stärke des jeweils einwirkenden Reizes abhängig und löst Ströme entlang dem Dendriten und von dort in die angrenzenden Membranen der restliche Sinneszelle aus. Die Amplitude schwächt sich aber mit zunehmender Entfernung ab. Trotzdem sind Rezeptorpotentiale oft genügend stark um Aktionspotentiale (APs) im Bereich weiter entfernter, spannungs-gesteuerten Membrankanäle (=Triggerzone am Ursprung des Axons) auszulösen. Das geschieht so in primären Sinneszellen (also mit direktem Axon zum ZNS). Die Amplitude Rezeptorpotentials bestimmt die zeitliche Aufeinanderfolge der entstehenden Aktionspotentiale, die nun über das Axon zum Zentralnervensystem (ZNS) weitergeleitet werden. Die so fortgeleiteten Frequenzmuster der APs aus der Sinneszelle liefern (als sogenannte Afferenzen) dem Zentralnervensystem „verständliche“ Informationen über den ursprünglich an der Sinneszelle angekommenen Reiz.

Synaptische Verschaltungen im ZNS bewirken, dass nachgeschaltete Neurone (Interneurone oder Motoneurone) erregt werden können. So werden im ZNS die Informationen ausgewertet, weitergeleitet und für die Regelung des Verhaltens und oft auch für nicht-motorische Reaktionen (Hormone, Stoffwechsel etc.) im Körper genutzt.

Versuchsziel: In diese Versuch wird an einem Insekt als Modelltier die Reizaufnahme durch ein Tasthaar mit nur einer Sinneszelle registriert und die Integration der entstehenden neuralen Sinnesinformation durch Interneurone im ZNS studiert.

Experiment

A. Vorbereitung und Präparation:

1. Eine durch Kühlung vollständig narkotisierte Heuschrecke wird zu einem geeigneten Abdomen-Thorax-Präparat reduziert (Abbildung unten

und siehe Film) und mit der Ventralseite nach oben auf dem Präparattisch mit feinen Nadeln (Minutiennadeln) befestigt. Ringer-Lösung (isotonisch) soll immer nur die Innenseite (=Unterseite) des Präparates ausfüllen und benetzen.

2. Mit einer Schere und Rasierklingsplitter-Halter wird in den Metathorax mit flach unter die Kutikula verlaufenden Schnitten ein rechteckiges Fenster geschnitten (siehe Abbildung).

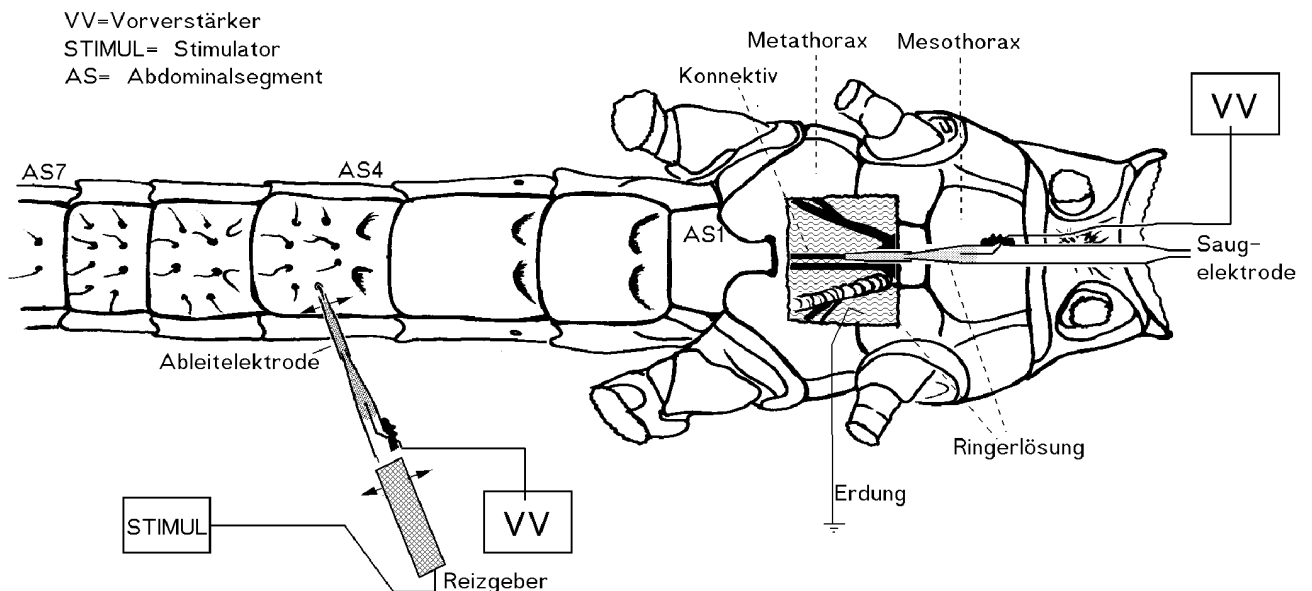
3. Die darunterliegenden und durch eingeschlossene Luft silbrig erscheinenden Tracheensäcke werden vorsichtig angehoben und mit der Feinschere abgetrennt.

4. In die Öffnung werden 2-3 Tropfen Ringerlösung gegeben (Pipette), ohne daneben die intakte Kutikula zu benetzen. Das gelbliche Metathorakalganglion mit seinen caudal wegziehenden Nerven und den Konnektiven zu den nachfolgenden Ganglien wird sichtbar.

5. Mit einer feinen und spitzen Präpariernadel werden oberflächliches Fett und Bindegewebe vom hinteren Drittel des Metathorakalganglions nach hinten geschoben und vorsichtig abpräpariert. „Herumflottierende“ Fett- und Bindegewebsstücke werden mit der Feinpinzette ergriffen und durch Abschneiden mit der Feinschere an ihrer Ansatzstelle vollständig entfernt. Alles störende Gewebe ergreifen und immer weg vom Ganglion ziehen, aber Nerven (meist von einer feinen silbrigen Trachee begleitet) nicht zerren oder jetzt schon schädigen! Neben den schräg nach hinten verlaufenden Nerven zum Metathorax und bis ins 3. Abdominalsegment erkennt man, wie die beiden Konnektive nach hinten (zum nächsten freien Abdominalganglion, Lage im 2. Abdominalsegment) ziehen. In diesen verlaufen u.a. auch die Axone von intersegmentalen Interneuronen, die Informationen von Sinneshaaren der hinteren Abdominalsegmenten integrieren und an die thorakalen Ganglien weiterleiten.

Halt

Hier >> Kursbetreuer zur „Qualitätskontrolle“ herbeirufen!!!



B. Anlegen der Messanordnung

6. Die Erdung des Präparates mit einem Draht in der Badflüssigkeit schafft ein 0-Potential. Gegenüber diesem werden später die Depolarisationen (APs) am Sinneshaar und dem Konnektiv gemessen (monopolare Ableitung). Erdungs-Verbindungen gehen von der Erdungsbuchse am Oszilloskop aus und müssen sternförmig auch zu den Vorverstärkern und den Abschirmungen führen.

7. Sie schneiden mit einer sehr scharfen Feinschere eines der Konnektive nahe am Metathorakal-Ganglion ab. Alle Nerven sollten immer in Ringerlösung schwimmen. Nähern sie mit dem Mikromanipulator die Plastikspitze der bis knapp über den inneren Ableitdraht mit Ringerlösung gefüllten Saugelektrode. Ihr Ende sollte einen geringfügig (~5%) kleineren Innendurchmesser haben als der Stumpf des einzusaugenden Konnektives, damit später nach dem Einsaugen ein wasserdichter Abschluss entsteht. Steht die Elektrodenöffnung genau vor dem Stumpf (evtl. mit leichtem Kontakt und die Elektrodenachse in Verlängerung der Achse des Konnektivstumpfes) so saugen sie diesen vorsichtig (in ca. 0,1ml-Schritten der Spritzenskalierung) an die Spitze der Saugelektrode und schließlich mit etwas mehr Unterdruck in die Saugspitze ein – für ca. 1mm. Bei gutem Verschluss ist kein weiterer Unterdruck nötig. Nach Einschalten des Vorverstärkers sollten spontane APs aus den Abdominalganglien, am Konnektivstumpf abgeleitet, sichtbar sein.

Auslenkung von ipsilateralen Haaren auf den Sterniten des 4. bis 7. Abdominalsegmentes sollten zusätzlich hohe APs auslösen.

C. Messungen:

8. Suchen sie die langen Tasthaare auf den Sterniten des 4.-7. Segmentes auf (größte Länge, oft mehrfach verbogene Spitze, senkrecht zur Oberfläche) reizen sie diese zunächst einzeln durch Abbiegen mit einer Minutiennadel oder Pinselborste und beobachten sie die Reaktionen an den APs im Konnektiv bei mehrfach wiederholten Reizen sowie bei ipsi- und kontralateralen Haaren dieses Typs im Vergleich.

9. Nachdem Sie eine mehr qualitative Vorstellung von den Reaktionen auf Tasthaar-Reizung haben soll mit Messreihen nun genauer untersucht werden, wie einzelne Haare primär mit AP-Serien (Afferenzen) auf Abbiegung reagieren und was nachgeschaltete Interneurone davon weiterleiten:

a) Registrierung von Tasthaaren:

Nachdem ein langes Tasthaar mit einer sehr feinen Schere bis auf ein Drittel seiner ursprünglichen Länge abgeschnitten ist und damit der Hohlraum mit der Rezeptorlymphe eröffnet ist, kann mit Ringerlösung

oder Ableitpaste eine leitende Verbindung hergestellt werden und Potentialänderungen der Sinneszelle gemessen werden. Wir interessieren uns hier nur für die entstandenen APs, die zuverlässig auch aus dem Rezeptorlymphraum zu registrieren sind. Deshalb wird die Ableitelektrode, ein kleines mit gut leitender Elektrodenpaste oder mit Ringer gefülltes Rohr das auf einem Bewegungsgeber sitzt, vorsichtig über das Haar gestülpt (Mikromanipulator). Über den ableitenden Elektrodendraht zum Vorverstärker werden die APs registriert während der Bewegungsgeber den Haarstumpf kontrolliert auslenkt ohne den Kontakt mit dem Haar zu verlieren.

Datenauswertung:

Die Reaktionen eines einzelnen Haares werden auf dem Oszilloskop-Bildschirm gespeichert und mit darübergerlegter Folie abgezeichnet:

- a) bei verschiedenartiger Auslenkung (Winkel von ca. 5/ 10/ 15 Grad Abbiegung),
- b) mit verschiedener Auslenkungsgeschwindigkeit bei gleichem Winkel (15 Grad)
- c) bei konstantem Winkel und Auslenkgeschwindigkeit mit Wiederholungsraten von 10/ 5/ 1/ 0,5/ 0,1/ 0,05 Sekunden.

9b) Registrierung von immer denselben Interneuronen bei gleichzeitiger Reizung und Ableitung eines (i) ipsilaterales medianen Tasthaares im 5. oder 6. Abdominalsegment. Einzelreizungen und regelmäßig wiederholte Reizungen werden eingesetzt um möglich Adaptationsphänomene zu erfassen (Programm s.u. unter Datenauswertung). Das gleiche geschieht mit einem (ii) medianen Haar der kontralateralen Seite und dann mit einem (iii) lateralen Tasthaar dort. Die Adaptation ist unterschiedlich und soll aufgrund der Messungen interpretiert werden. Die Wiederholungsraten der Haarreizungen sollen 10/ 5/ 1/ 0,5/ 0,1 Sekunden sein, um Adaptationsraten quantitativ zu erfassen.

Datenauswertung:

Die Reaktionen jeweils einer einzelnen Haarafferenz (Kanal1) nach Auslenkung des zugehörigen Haares um 15 Grad und gleicher Auslenk-Geschwindigkeit wird zusammen (synchron) mit der Reaktion des/der Interneurone im Konnektiv (Kanal2) auf dem Oszilloskop-Bildschirm gespeichert.