

Das Biologische Netzwerk aus Nervenzellen als Computer

Gefördert durch ein do.it IT und Medienoffensive Baden-Württemberg Karl-Steinbuch-Stipendium

Stipendiat: Christoph Zrenner, cdfz@gmx.net

Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen (Prof. Thier)

Technion Israel Institute of Technology, Haifa (Prof. Marom)

Zeitraum: 01.12.2005 bis 31.05.2007

Abstract

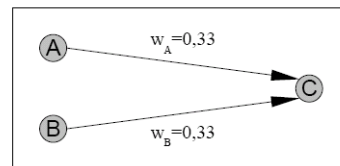
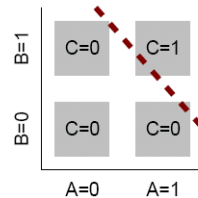
Eine *ex-vivo* Zellkultur aus ca. 10.000 stark untereinander vernetzten Nervenzellen dient als Modellsystem für einen „biologischen Computer“. Über eine in der Gewebekulturschale integrierte Matrix aus 60 Elektroden wird eine bi-direktionale Schnittstelle hergestellt, um mit dem biologischen Netzwerk zu interagieren. Dabei werden spontan auftretende Nervenzell-Aktionspotentiale gemessen bzw. über ein Stimulations-System ausgelöst. Ziel des Projektes war es, die in einem solchen „biologischen Computer“ vorhandenen Logik-Gatter zu charakterisieren. Dabei stand die Suche nach dem „Exklusiv-Oder (XOR) Gatter“ im Vordergrund, welches als einfachstes nicht-triviales (nicht linear separables) Problem in Hinblick auf die zugrundeliegende Netzwerk-Architektur als interessant gilt. Tatsächlich konnten in verschiedenen Zellkulturen solche Logik-Gatter nachgewiesen werden sodass sich die Frage, ob ein biologisches Nervenzellnetzwerk das XOR-Problem lösen kann mit einem klaren „Ja“ beantworten lässt.

1. Einführung

Elektronische Rechenmaschinen und biologische Gehirne lösen die Ihnen gestellten Aufgaben auf sehr unterschiedliche Weise. Der Mikrocomputer verwendet einen zentralen "Kern", um binär gestellte Aufgaben sequentiell auf einer Zeitskala von Nanosekunden abzuarbeiten, während Nervenzellen im Gehirn ihre um den Faktor eine Million langsamere Operationsgeschwindigkeit von Millisekunden durch ihre große Anzahl ausgleichen und dabei parallel arbeitend mit widersprüchlichen Informationen umgehen müssen. Wie dieses scheinbar chaotische Ensemble von scheinbar simplen "Nervenzell-Operatoren" das Gehirn befähigt, unzureichend spezifizierte Probleme mit großer Zuverlässigkeit und Geschwindigkeit zu lösen bleibt eine der großen offenen Fragen in der Computer- und Neurowissenschaft.

Das AND Problem:

A	B	C
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1



Das XOR Problem:

A	B	C
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	0

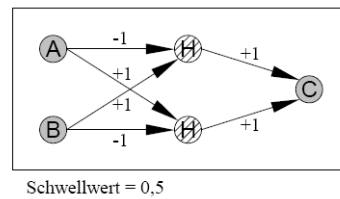
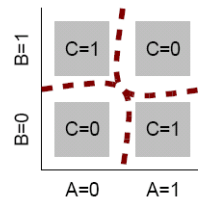


Abb. 1: Das "XOR-Problem" gehört zu der Gruppe der "linear nicht separablen Problemen", welche von einem klassischen Perzeptron, einem Neuronalen Netzwerk ohne interne (versteckte) Schichten nicht gelöst werden kann.

In diesem Projekt wurde nicht versucht, auf einem Computer die Biologie zu imitieren, sondern es wurde die Fähigkeit eines auf einem 60-Elektroden Interface kultivierten biologischen Nervenzellnetzwerkes von ca. 10.000 Neuronen untersucht, ein präzise gestelltes, einfaches aber nicht triviales Logik-Problem zu lösen: das "Exklusiv-Oder" (XOR) Problem. Dieses klassische Problem ist nur durch ein Netzwerk mit zwischengeschalteten Neuronen lösbar.

2. Methode

Für die bi-direktionale elektrische multi-Elektroden Schnittstelle und Stimulation wurde das kommerziell verfügbare MEA1060BC/STG System von Multichannelsystems, Reutlingen, verwendet. Die Messdaten wurden über eine im Rahmen dieses Projektes entwickelte Mathworks Matlab basierte Mess-Software aufgezeichnet und analysiert. Die neuronalen Netzwerke wurden als primäre dissoziierte Zellkulturen nach

den standard Methoden steril aus neonatalem murinen Großhirngewebe gewonnen und über einen Zeitraum von 21 Tagen im Inkubator angezchtet.

Um in der Nervenzellkultur über die 60-Elektroden-Schnittstelle möglichst effektiv nach eine großen Anzahl von möglichen Logik-Gattern zu suchen, wurde folgendes experimentelles Paradigma entwickelt: (1) Im ersten Schritt wird auf allen 60 Elektroden nacheinander einzeln stimuliert. (2) Von diesen wurden manuell 10 Elektroden für die Stimulation (Logik-Gatter Eingang) ausgewählt, welche zuverlässig Aktionspotentiale auslösten welche an benachbarten Elektroden ableitbar waren, die restlichen 50 Elektroden dienten als potentielle Antwort-Elektroden (Logik-Gatter Ausgang). (3) Von den 10 Elektroden wurden jeweils zwei für die gleichzeitige Stimulation ausgewählt (45 mögliche Paare), über einen Zeitraum von 6 bis 10 Stunden wurde alle 5 Sekunden an einem neuen zufällig ausgewählten Elektroden-Paar elektrisch stimuliert. Die Mess-Ergebnisse wurden für jede der Stimulations-Kombinationen getrennt gemittelt und als sog. „post-stimulus time histogram“ (PSTH, 50 Kanäle, +0 bis +30 Millisekunden) für die Analyse aufbereitet.

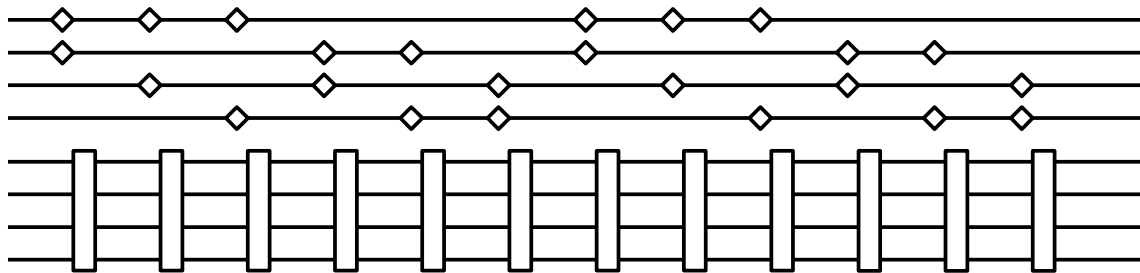


Abb. 2: Für die automatische Abtastung wurden an einem Untersatz der Kanäle sequentiell in hoher Frequenz alle möglichen Kombinationen angelegt (${}^2C_4=6$ in diesem Beispiel) und jeweils die neuronale Antwort unmittelbar nach dem Stimulismuster abgeleitet. Durch Wiederholung der Muster kann die Antwort gemittelt werden um die Zuverlässigkeit zu untersuchen.

Für die Analyse wurde für jedes zu untersuchende Logik-Gatter (AND, OR, XOR) alle möglichen Kombinationen an „Input-Kanälen“ nacheinander analysiert und in den PSTHs jeweils nach einem „Output-Kanal“ gesucht, der die dem jeweiligen Gatter entsprechenden Antworten beinhaltet. Abb. 2 zeigt die Methode schematisch für 4 Stimulationskanäle und 4 Ableitungskanäle. In den eigentlichen Experimenten wurden 8 oder 10 Kanälen für die Stimulation und 45-50 für die Ableitung verwendet (ca. 1.000 mögliche Kombinationen pro Experiment).

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden nach dem Aufbau und der Programmierung des experimentellen Systems über einen Zeitraum von mehreren Monaten 19 Experimente mit verschiedenen Kulturen durchgeführt, die jeweils zwischen 10h und 30h stimuliert und abgeleitet wurden. Abb. 3 zeigt die Rohdaten einer typischen Messung während spontaner Aktivität und als Reaktion auf eine paarweise Stimulation.

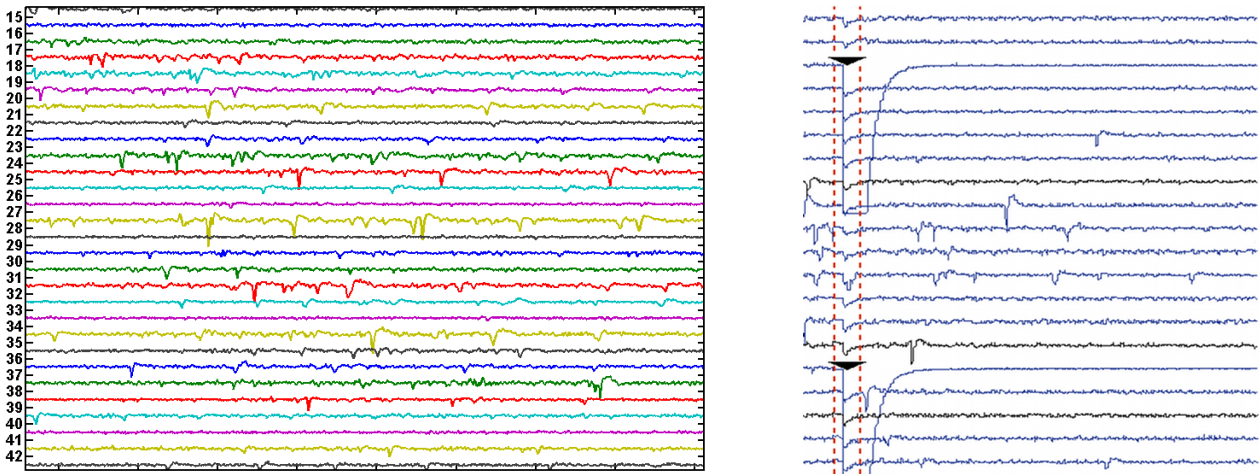


Abb. 3: Die linke Abbildung zeigt eine Auswahl von Ableitungskanälen während spontaner Nervenzellkulturaktivität. Die Rechte Abbildung zeigt die unmittelbare Neuronale Reaktion auf einen Stimulus an zwei Elektroden in den darauf folgenden 100 ms.

Abb. 4 zeigt als Rohdaten-Ergebnis eines Experiments eine Korrelationsmatrix der neuronalen Antworten der Messkanäle auf paarweise Stimulation. Um diese große Datenmenge auf das Vorhandensein von nicht-lineare Exklusiv-Oder Schaltkreisen zu untersuchen, wurde eine Matlab-Skript (Appendix A zeigt einen Auszug) entwickelt welches alle (ca. 1000) möglichen Kombinationen automatisch analysiert.

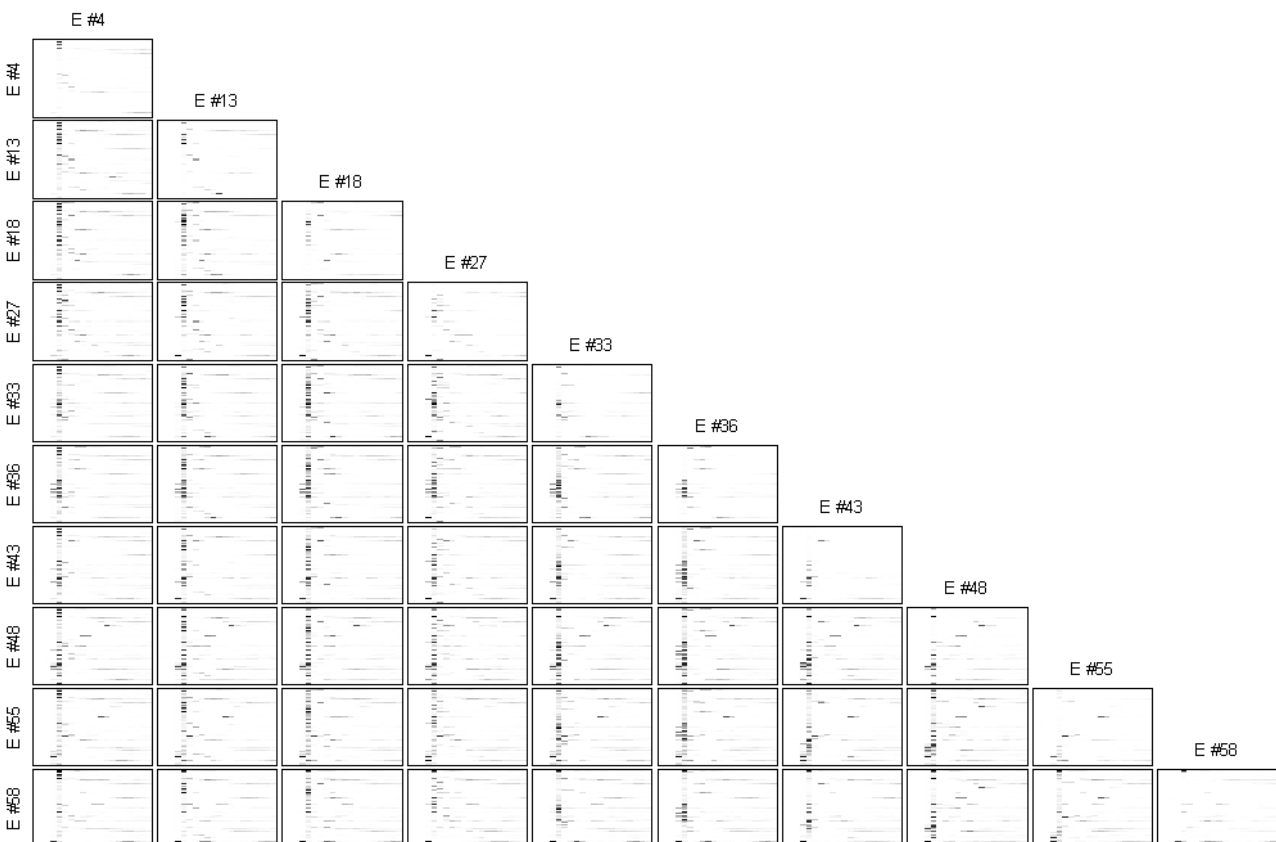


Abb. 4: Matrix der neuronalen Antworten auf paarweise Stimulation. Die Kästen bilden jeweils die gemittelte Aktivität auf den Messkanälen in den 25ms post-Stimulus ab. Der Schwarzton gibt dabei die Stärke der Antwort (Wahrscheinlichkeit eines Aktionspotentials) an.

Bei der automatischen Suche wurden zahlreiche vermeintliche XOR-Gatter gefunden, die bei näherer Inspektion jedoch durch eine zeitliche Verschiebung der Reaktion zu erklären waren. Ein Beispiel für eine tatsächliche (jedoch schwache) XOR-Reaktion wird in Abb. 5 gezeigt.

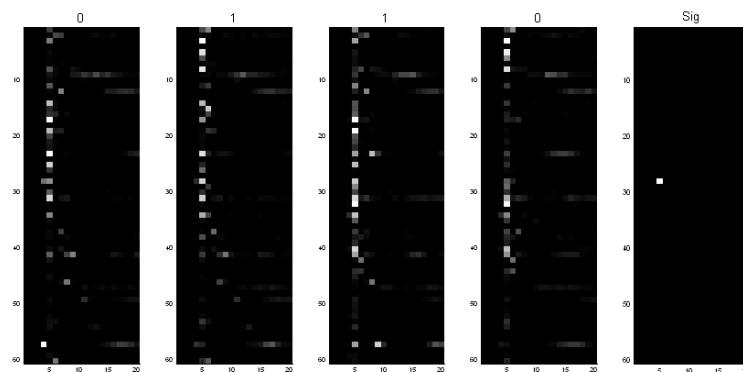


Abb. 5: Exklusiv Oder Reaktion: Diese Abbildung zeigt vier neuronale Antworten auf die vier möglichen Inputs eines XOR-Gatters: „0 0“ „0 1“ „1 0“ und „1 1“. Gewünscht wird eine „1“ Reaktion nur auf die mittleren beiden Kombinationen. Die Position auf dem rechten Panel gibt an zu welchem Zeitpunkt auf welchem Kanal ($t=5ms$, kanal=#28) eine solche Antwort zu finden war.

Bei dem Ergebnis in Abb. 5 ist zu beachten, dass sich die Unterscheidung zwischen einer „1“ und „0“ Antwort nur durch die Mittelung von wiederholten Experimenten erreichen lässt, da die Reaktion in jedem einzelnen Durchlauf aufgrund der spontanen Aktivität sehr variabel ausfällt.

4. Diskussion

Die in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Bausteine eines Computers in Form von „Logik-Gattern“ in einem *ex-vivo* gewachsenen biologischen Nervenzellnetzwerk vorhanden sind. Nach den einfachen „threshold and fire“ Neuronenmodellen lassen sich lineare Funktionen (AND, OR) auf einfache Weise und ohne versteckte Schichten abbilden. Die hier vorgestellten Daten zeigen jedoch, dass auch komplexere Schaltkreise, die aus mehreren spezifisch verschalteten Neuronen bestehen, in biologischen Netzwerk nachweisbar sind.

Der zweite Schritt, der in diesem Projekt noch nicht ausreichend adressiert werden konnte betrifft die Frage nach der Programmierbarkeit der Nervenzellschaltkreise. Es konnte zwar eine beträchtliche Plastizität der Aktivitätsmuster beobachtet werden, eine spezifische Beeinflussbarkeit konnte bisher jedoch noch nicht zufriedenstellend erreicht werden. Die „natürliche“ Variabilität der Aktivität erschwert es, eine statistisch Signifikante „künstliche“ Änderung der Aktivitätsmuster nachzuweisen.

Der Effekt von Stimulationsmustern auf die zeitliche Verschiebung der Aktivität ist ein weiterer Interessanter Effekt, der hier beobachtet werden konnte. Für die weiterführenden Experimente wird jedoch ein „closed-loop setup“ benötigt, um eine engere zeitliche Interaktion mit der Nervenzellkultur zu ermöglichen.

Danksagung

Die Unterstützung der MFG-Stiftung durch ein do.it IT und Medienoffensive Baden-Württemberg Karl-Steinbuch-Stipendium hat dieses Forschungsprojekt ermöglicht wofür ich mich herzlich bedanke. Bei Herrn Dr. Volker Gauck und Herrn Dr. Shimon Marom bedanke ich mich für die Möglichkeit dieses Projekt in ihren Labors durchzuführen und für ihre Hilfe bei der Umsetzung. Unterstützt haben mich außerdem auf verschiedene Weise Ute Großhennig und Thomas Henneck (Universität Tübingen) sowie Danny Eytan, Eleanora Lyakhov und Vladimir Lyakhov (Technion) sowie ausserdem Karl-Heinz Boven (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen).

Literaturhinweise

1. Novellino A, D'Angelo P, Cozzi L, Chiappalone M, Sanguineti V, Martinoia S: Connecting Neurons to a Mobile Robot: An In Vitro Bidirectional Neural Interface. *Computational Intelligence and Neuroscience* 2007, Article ID 12725
2. Karniel A, Kositsky M, Fleming KM, Chiappalone M, Sanguineti V, Alford ST, Mussa-Ivaldi FA: Computational analysis in vitro: dynamics and plasticity of a neuro-robotic system. *J Neural Eng* 2005, 2:250-265.
3. Wolpawa JR, Birbaumer N, McFarland DJ, Pfurtscheller G, Vaughan TM: Brain-computer interfaces for communication and control. *Clinical Neurophysiology* 2002, 113:767-791.
4. Stett A, Egert U, Guenther E, Hofmann F, Meyer T, Nisch W, Haemmerle H: Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Anal Bioanal Chem* 2003, 377:486-495.
5. Chang JC, Brewer GJ, Wheeler BC: Modulation of Neural Network Activity by Patterning. *Biosensors and Bioelectronics* 2001, 16:527-533.
6. Shahaf G, Marom S: Learning in Networks of Cortical Neurons. *J Neurosci* 2001, 21(22):8782-8788.
7. Eytan D, Brenner N, Marom S: Selective adaptation in networks of cortical neurons. *J Neurosci* 2003, 23(28):9349-9356.
8. Van Pelt J, Vajda I, Wolters PS, Corner MA, Ramakers GJ: Dynamics and plasticity in developing neuronal networks in vitro. *Prog Brain Res* 2005, 147:173-188.
9. Eytan D, Minerbi A, Ziv N, Marom S: Dopamine-induced dispersion of correlations between action potentials in networks of cortical neurons. *J Neurophysiol* 2004, 92(3):1817-1824.
10. Maeda E, Robinson HP, Kawana A: The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons. *J Neurosci* 1995, 15(10):6834-6845.
11. Corner MA, van Pelt J, et al.: Physiological effects of sustained blockade of excitatory synaptic transmission on spontaneously active developing neuronal networks - an inquiry into the reciprocal linkage between intrinsic biorhythms and neuroplasticity in early ontogeny. *Neurosci Biobehav Rev* 2002, 26:127-185.
12. Beggs JM, Plenz D: Neuronal avalanches in neocortical circuits. *J Neurosci* 2003, 23(35):11167-11177.
13. Plenz D, Thiagarajan TC: The organizing principles of neuronal avalanches: cell assemblies in the cortex? *Trends Neurosci* 2007, 30:101-110.
14. Van Pelt J, Corner MA, Wolters PS, Rutten WLC, Ramakers GJA: Long-term stability and developmental changes in spontaneous network burst firing patterns in dissociated rat cerebral cortex cell cultures on multielectrode arrays. *Neurosci Lett* 2004, 361(1-3):86-89.
15. Marom S, Shahaf G: Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. *Quart Rev Biophys* 2002, 35:63-87.

Appendix A: Auszug des Analyse Matlab-Skripts

```
%% Look for conditions to test in gate search

gatedef = [0 1 0 1 0; 0 1 1 0 1; 1 0 0 1 1; 1 0 1 0 0]; %XOR
%gatedef = [0 1 0 1 0; 0 1 1 0 1; 1 0 0 1 1; 1 0 1 0 1]; %AND

conditions_to_test = [];
num_elects_in_gate = size(gatedef,2)-1;
elec_combs_for_checking = nchoosek(1:num_electrodes, num_elects_in_gate);
r=0;
for i = 1:size(elec_combs_for_checking,1)
    elec_perms = perms(elec_combs_for_checking(i,:));
    for j = 1:size(elec_perms,1)
        r=r+1;
        for e = 1:num_elects_in_gate
            conditions_match = sum(combinations(elec_perms(j,:),:) == repmat(gatedef(e,1:end-1)',
1,num_conditions));
            c = find(conditions_match == size(gatedef,1), 1);
            conditions_to_test(r,e)=c;
        end
    end
end

%% generate the mean response for each condition
response_for_condition = [];
for c = 1:num_conditions
    response_for_condition(:, :, c) = mean(stack(:, 1:20, Stim_Cond_Randomized==c), 3);
end

%% check each condition

visualize_gatematch = true;
significance = .25;
for i = 1:size(conditions_to_test,1)
    gatecomb_largest_false = zeros(size(response_for_condition,1), size(response_for_condition,2),
'single');
    gatecomb_smallest_true = ones(size(response_for_condition,1), size(response_for_condition,2),
'single');
    for j = 1:size(conditions_to_test,2)
        c = conditions_to_test(i,j);
        response = response_for_condition(:, :, c);
        if (gatedef(j,end) == 0)
            % this lowers the threshold for false responses
            update_logical = gatecomb_largest_false < response;
            gatecomb_largest_false(update_logical) = response(update_logical);
        else
            % increase the threshold for true responses
            update_logical = gatecomb_smallest_true > response;
            gatecomb_smallest_true(update_logical) = response(update_logical);
        end
    end
    % check for significance of any matches
    gatecomb_possiblematch = (gatecomb_smallest_true - gatecomb_largest_false) > significance;
    if (sum(gatecomb_possiblematch(:)) > 0)
        disp(['Match for: ' num2str(conditions_to_test(i,:))]);
        if (visualize_gatematch)
            figure
            for c=1:4
                subplot(1,5,c), imagesc(response_for_condition(:, :, conditions_to_test(i,c)))
                title(num2str(gatedef(c,end)))
            end
            subplot(1,5,5), imagesc((gatecomb_smallest_true - gatecomb_largest_false) > significance)
        end
    end
end
end
```