

Charakterisierung der transienten Änderung der  
cytoplasmatischen Calciumkonzentration während des  
Aktionspotentials in der Grünalge *Chara corallina* mit  
Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
Michael Wacke

Kiel  
2001

Referent/in:

Prof. Dr. U.-P. Hansen

---

Korreferent/in:

Prof. Dr. G. Thiel

---

Tag der mündlichen Prüfung:

14.06.2001

---

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

---

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iv
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Chara</i> .....	5
2.2 Versuchsmedium.....	6
2.3 Ratiometrie .....	6
2.3.1 Farbstoffe .....	7
2.3.2 Kalibrierung.....	8
2.4 Herstellung von Injektionspipetten sowie Einstich- und Erdelektroden.....	10
2.4.1 Injektionspipetten .....	11
2.4.2 Einstichelektroden .....	11
2.4.3 Erdelektroden .....	11
2.5 Beladen der Zellen mit dem Farbstoff.....	11
2.5.1 Fixieren der Zelle auf dem Objektivtisch .....	12
2.5.2 Aufbau zur Farbstoffinjektion.....	12
2.5.3 Beladungsvorgang .....	13
2.6 Meßaufbau mit dem Photometer.....	15
2.7 Meßaufbau mit dem Fluoreszenzmikroskop .....	16
2.7.1 Optischer Aufbau.....	16
2.7.2 Optisches Auflösungsvermögen.....	17
2.7.3 Elektronischer Aufbau .....	18
2.7.4 Meßkammer .....	19
2.8 Synchrone Messungen von $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ und Membranspannung.....	20
2.9 Datenaufnahme und Verarbeitung .....	20
2.9.1 Datenstruktur.....	21
2.9.2 Synchronisation der beiden Datenspuren.....	22
2.9.3 Aufnahmefrequenz .....	23
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
3.1 Synchrone Messungen von $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ und Membranspannung.....	26
3.2 Charakterisierung des $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Signals .....	27
3.2.1 Kinetik des Calciumsignals.....	27
3.2.2 Abschätzung der minimal ausgeschütteten Calcium Menge .....	35
3.2.3 Reproduzierbarkeit der transienten $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ Änderung bei Membranerregung ..	35
3.2.4 Verzögerung der Calcium Antwort nach einem Stimulus .....	37
3.2.5 Die Stimulierung der <i>TRC</i> gehorcht einem Alles-oder-Nichts Prinzip .....	38

3.2.6	Inhibition der <i>TRC</i> durch Neomycin .....	40
3.3	Änderungen der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ während der Stimulation mit Serienpulsen hoher Frequenz .....	41
3.4	Bei der Stimulation von <i>TRC</i> gilt ein Reiz-Menge-Gesetz .....	45
3.5	Stimulation der Zelle mit aufeinanderfolgenden schwachen Pulsen .....	46
3.5.1	Stimulation mit zwei Pulsen.....	46
3.5.2	Stimulation mit mehr als zwei unterschwelligen Pulsen .....	49
3.5.3	Für schwache Pulse gibt es einen minimalen Pulsabstand .....	51
3.5.4	Variation des zweiten Pulses im Doppelpuls-Experiment.....	52
<b>4</b>	<b>Modellierung.....</b>	<b>55</b>
4.1	Begründung des Modells.....	55
4.2	Formulierung des Modells.....	56
4.3	Diskussion des Ansatzes für die Spannungsabhängigkeit.....	62
4.4	Ableitung eines Tests für das Modell.....	63
4.5	Numerische Bestimmung der Ratenkonstanten durch ein Fitprogramm .....	66
4.5.1	Konstruktion einer Fehlerfunktion .....	69
4.5.2	Verschärfung der Fit-Bedingungen .....	69
4.5.3	Abhängigkeit des Fitergebnisses von den Startwerten.....	74
4.5.4	Ergebnisse der numerischen Berechnung der Ratenkonstanten.....	75
4.6	Simulation der Reiz-Mengen Relationen für einen Einzelpuls und für den zweiten von zwei aufeinanderfolgenden unterschwelligen Pulsen.....	78
4.6.1	Simulation der Reiz-Mengen Relation für einen Einzelpuls.....	78
4.6.2	Simulation der Reiz-Mengen Relation für den zweiten von zwei unterschwelligen Pulsen.....	79
4.6.3	Ergebnisse der Simulation der Reiz-Mengen Relation.....	81
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>
5.1	Das Calcium stammt aus internen Speichern.....	85
5.2	Der <i>second messenger</i> muß eine lange Lebensdauer haben .....	86
5.3	Exogenes $Ca^{2+}$ ist nicht der <i>second messenger</i> .....	86
5.4	Der <i>second messenger</i> ist endogenen Ursprungs .....	87
5.5	Der <i>second messenger</i> ist möglicherweise Inositol-1,4,5-trisphosphat .....	88
5.6	Die Rolle des extrazellulären $Ca^{2+}$ .....	90
5.7	Interne Speicher und Refraktärzeit.....	90
<b>6</b>	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>96</b>

---

<b>Anhang A: Lösung der Differentialgleichungen.....</b>	<b>102</b>
<b>Anhang B: Bestimmung der Extremalstellen.....</b>	<b>106</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>113</b>

## Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
Abb.	Abbildung
AP	Aktionspotential
APW	<i>artificial pond water</i> ("künstliches Teichwasser")
ATP	Adenosintriphosphat
$c_2$	Eichkonstante für die Spannungsabhängigkeit von $k_2$
$[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$	Die freie cytoplasmatische Calciumkonzentration
CIRC	<i>calcium induced calcium release</i>
CPU	<i>central processing unit</i> ("Hauptprozessor")
DAQ	<i>data acquisition board</i> ("Datenaufnahmekarte")
$\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$	Differenz zwischen Ruhekonzentration des $Ca^{2+}_{\text{cyt}}$ und maximaler $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ während eines <i>TRC</i>
$\Delta t_i$	Dauer des $i$ -ten Intervalls eines Pulsprotokolls
$\Delta t_{2\text{max}}$	maximaler Abstand den zwei $p_1$ haben dürfen, um gerade noch einen <i>TRC</i> hervorzurufen
$\Delta t_{2j\text{max}}$	maximaler Abstand den $j$ $p_1$ haben dürfen, um gerade noch einen <i>TRC</i> hervorzurufen
$\Delta t_{2\text{min}}$	minimaler Abstand den zwei $p_1$ haben müssen, um einen <i>TRC</i> hervorzurufen
DGL	Differentialgleichung
DG	1,2- Diacylglycerol
EGTA	Ethyleneglycol bis(2-aminoethylether)-tetraacetic acid
ggf.	gegebenenfalls
Gl.	Gleichung
Gln.	Gleichungen
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny] ethanesulfonic acid
IP <sub>2</sub>	Inositol 1,4-bisphosphat
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphat
$k_1$	spannungsunabhängige Produktionsrate von $Q_1$

$k_2$	spannungsabhängige Produktionsrate von $Q_2$
$k_3$	spannungsunabhängige Abbaurrate von $Q_1$
PCI	<i>peripheral component interconnect</i>
$p_h$	überschwelliger Einzelpuls
PIP <sub>2</sub>	1,2-Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
$p_1$	unterschwelliger Puls
PLC	Phosphoinositidase C
$Q_1$	Vorgängersubstanz von $Q_2$ im Modell
$Q_2$	<i>second messenger</i> im Modell
$[Q_1]_0$	<i>Setpoint</i> (Sollwert) von $[Q_1]$
$[Q_2]_{\max 1}$	maximale durch einen Einzelpuls hervorgerufene $[Q_2]$
$[Q_2]_{\max 2}$	maximale durch einen zweiten Puls hervorgerufene $[Q_2]$
$[Q_2]_{\text{thres}}$	Schwellenwert von $[Q_2]$ zum Auslösen eines <i>TRC</i>
RAM	<i>random access memory</i> ("Hauptspeicher", "Arbeitsspeicher")
rel. E.	relative Einheiten
<i>SNR</i>	<i>signal to noise ratio</i> ("Signal zu Rausch Verhältnis")
$t_{i0}$	Startzeitpunkt des Intervalls $\Delta t_i$
$t_{\max 1}$	Zeitpunkt des Maximums von $[Q_2]$ im Intervall $\Delta t_1$
$t_{\max 2}$	Zeitpunkt des Maximums von $[Q_2]$ im Intervall $\Delta t_3$
$t_{\text{iend}}$	Endzeitpunkt des Intervalls $\Delta t_i$
<i>TRC</i>	<i>transient rise of calcium</i> ("transiente Änderung der $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ ")
U73122	1-(6-[17 $\beta$ -3-Methoxyestra-1,3,5-(10)trien-17-yl]amino/hexyl)1H-pyrrol-2-5dion
$u_h$	Pulsspannung des Pulses $p_h$
$u_1$	Pulsspannung des Pulses $p_1$
$U_N$	Umkehrpotential, Nernstspannung
$V_m$	Membranpotential
vgl.	vergleiche
$[X]$	Konzentration von X
$  [X]  $	normierter Wert von $[X]$
$\bar{X}$	Mittelwert von X
$[X]_{i0}$	Startwert von $[X]$ zu Beginn des i-ten Intervalls eines Pulsprotokolls



## 1 Einleitung

Die Membran der Riesenalge *Chara* ist elektrisch erregbar. Das bedeutet, daß auf eine erzwungene Depolarisation der Membran von der Ruhespannung (-120 bis -200 mV) um ca. 30 mV ein sogenanntes Aktionspotential (AP) ausgelöst wird. Im Verlauf eines APs, bei dem die Spannung transient bis zu einem Wert von ca. 0 mV depolarisiert, steigt die Konzentration des freien cytosolischen  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) vorübergehend vom Ruhewert (ca. 100 nM) auf ungefähr 1  $\mu\text{M}$  an (Williamson und Ashley, 1982, Plieth et al., 1998). Diesem vorübergehenden Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  (*TRC = Transient rise of calcium*) wird eine zentrale Rolle im Prozeß der elektrischen Erregung zugeschrieben, da durch den Anstieg vermutlich  $Ca^{2+}$  sensitive *Cl* Kanäle in der Zellmembran aktiviert werden. Diese Kanäle sind wiederum für die transiente Depolarisation der Membran verantwortlich sind (Tazawa et al., 1987; Thiel et al., 1997).

Der kausale Zusammenhang zwischen der Stimulierung von APs durch positive Membranspannungen und dem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  ist jedoch noch unbekannt. Allgemein wird angenommen, daß die elektrische Stimulierung der Zelle durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus zu einer Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern führt (Plieth et al., 1998; Thiel und Dityatev, 1998). Die Vorstellung, daß  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern freigesetzt wird und nicht, wie von anderen vorgeschlagen (Kikuyama and Tazawa, 1998), durch Kanäle im Plasmalemma in die Zelle gelangt, wird durch Experimente gestützt, in denen  $Mn^{2+}$  als ein Quencher der Fura-2 Fluoreszenz benutzt wurde. Dabei stellte sich heraus, daß die *TRC* bei Anwesenheit von extrazellulärem  $Mn^{2+}$  nicht mit dem Quenching der Fluoreszenz von im Cytoplasma befindlichem Farbstoff einhergingen (Plieth et al., 1998). Solches Quenching wäre zu erwarten, wenn die Änderung der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  hauptsächlich auf den Einfluß von  $Ca^{2+}$  durch Kanäle im Plasmalemma erfolgen würde (Merrit et al., 1989). Die Schlußfolgerung, daß der *TRC* durch die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern erfolgt, wird weiter durch Experimente unterstützt, in denen die vermuteten internen Speicher der *Chara* Zellen indirekt von außen über das Cytoplasma vor Versuchsbeginn mit  $Mn^{2+}$  beladen wurden (Plieth et al. 1998). Unter dieser Voraussetzung waren die APs sogar dann mit einem Quenching der Fura-2 Fluoreszenz gekoppelt, wenn keinerlei externes  $Mn^{2+}$  anwesend war. Es liegt nahe, daß in diesem Fall das Quenching durch die Freisetzung von  $Mn^{2+}$  zusammen mit der Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus denselben internen Speichern erfolgte (Plieth et al., 1998).

Bei tierischen Zellen sind die Mechanismen, die zu solchen  $Ca^{2+}$ -Ausschüttungen führen, sehr gut bekannt. Einer dieser Mechanismen beruht auf einem System von Phosphoinositiden,

welche durch schrittweise Phosphorylierung und Hydrolyse auf- und abgebaut werden, wodurch sich komplexe Möglichkeiten zur Signalübertragung eröffnen.

Als auslösender Reiz dient dabei vielfach ein rezeptorgekoppeltes, Guanosintriphosphat (GTP) bindendes membranständiges Protein (G-Protein), welches auf einen exogenen Reiz hin das Enzym Phosphoinositidase C (Phospholipase C, PLC) aktiviert. Inzwischen sind auch Isoformen der PLC bekannt, welche durch  $Ca^{2+}$  aktiviert werden könnten (Essen et al. 1996). In jedem Fall hydrolysiert die aktivierte PLC das ebenfalls membranständige Phospholipid 1,2-Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) in 1,2-Diacylglycerol (DG) und Inositol 1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) (Berridge 1987). Während das DG in der Plasmamembran verbleibt, diffundiert das polare  $IP_3$  durch das Cytoplasma zu internen  $Ca^{2+}$ -Speichern. Dort öffnet es durch Bindung an entsprechende Rezeptoren  $Ca^{2+}$ -Kanäle, durch welche  $Ca^{2+}$  in das Cytoplasma ausgeschüttet wird (Berridge 1989, 1993).

Der Nachweis in Pflanzen von  $PIP_2$  (Drøbak et al., 1991, Irvine 1989), PLC (McMurray und Irvine 1988) und verschiedener Phosphatidylinositol- und Phosphatidylinositolphosphatkinasen (Sommarin und Sandelius 1988) sowie Enzymen, welche an der Hydrolyse von Inositolphosphaten beteiligt sind (Drøbak et al. 1988, Joseph et al. 1989), ließ schon bald nach der Entdeckung des Phosphoinositid-Signalsystems in tierischen Zellen darauf schließen, daß ähnliche Signaltransduktionsmechanismen bei der Regulation des cytoplasmatischen  $Ca^{2+}$  in Pflanzen eine Rolle spielen könnten (Drøbak 1991, 1992).

Tatsächlich konnte in der Folge nachgewiesen werden, daß diese Substanzen auch in Pflanzenzellen Bausteine für ein Signalsystem bilden, welches zur Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern führen kann. So konnte gezeigt werden, daß PLC existieren, welche  $PIP_2$  hydrolysieren (Brearley 1997, Kopka 1998), daß der Einsatz von Inhibitoren der PLC die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  inhibiert (Chen und Boss, 1991), daß  $IP_3$  auch in Pflanzenzellen zur Entlassung von  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern führt (Schumaker und Sze, 1987) und daß die durch  $IP_3$  stimulierte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  durch Inhibitoren der PLC ganz oder teilweise unterdrückt wird (Franklin-Tong et al. 1996).

Der direkte Beweis für die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern durch  $IP_3$ , dessen Bildung durch PLC katalysiert wurde, steht indes noch aus. Als Hauptproblem gilt hierbei der schwierige *in vivo* Nachweis des  $IP_3$  in Pflanzenzellen (Brearley et al. 1997).

Dennoch ist die Bedeutung der Inositolphosphate für die Signalübertragung in Pflanzen allgemein akzeptiert.

Daher liegt die Hypothese nahe, daß die Inositolphosphate auch ein Teil des Mechanismus der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung im Verlauf elektrischer Erregung bei *Chara* sind. Denn obwohl das AP von *Chara* sehr gut untersucht ist, konnte der kausale Zusammenhang zwischen elektrischer

Erregung und darauffolgendem transienten  $Ca^{2+}$ -Anstieg bisher nicht entschlüsselt werden. Gerade weil das AP von *Chara* aber so gut untersucht ist, bietet sich dieses als Modellsystem zur Untersuchung der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung an. Dabei gewonnene Informationen dienen dann möglicherweise nicht nur der Erklärung des APs von *Chara*, sondern können dazu beitragen, die Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern auch in anderen Pflanzenzellen besser zu verstehen.

Einen erste Hinweis darauf, daß die Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  in *Chara* in Folge elektrischer Stimulierung auf das System der Inositolphosphate zurückgeführt werden kann, lieferte die Beobachtung, daß die Erhöhung der cytoplasmatischen Konzentration von  $IP_3$  nach Mikroinjektion ins Cytoplasma APs stimuliert (Thiel et al. 1990). Außerdem konnte in *Chara* unter Einwirkung von Inhibitoren der PLC eine Verzögerung und Abnahme der elektrisch stimulierten *Cl*-Leitfähigkeit beobachtet werden, also der Leitfähigkeit, welche die Depolarisation des APs verursacht (Biskup et al., 1999).

Vor dem Hintergrund der bekannten Elemente des Phosphoinositid-Stoffwechsels in pflanzlichen Zellen unterstützen diese Experimente zusammen die These, daß  $IP_3$  in *Chara* im verbindenden Mechanismus zwischen elektrischer Stimulierung und Entlassung von  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern als *second messenger* dient. Solange jedoch der vermutete Botenstoff  $IP_3$  der direkten Messung nicht zugänglich ist, kann der Zusammenhang zwischen Botenstoff und  $Ca^{2+}$  Freisetzung nur indirekt untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Zusammenhang zwischen elektrischer Erregung und der Kinetik der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung im Verlauf eines AP untersucht. Ausgehend vom bekannten Alles-oder-Nichts Prinzip bei der Depolarisation (Beilby 1979) sollte zunächst geklärt werden, ob sich diese Alles-oder-Nichts Charakteristik in der Änderung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  wiederfindet oder ob es einen linearen Zusammenhang zwischen der Intensität der elektrischen Erregung und Freisetzung des Calciums gibt. Die Frage dieser Arbeit ist also, ob der Alles-oder-Nichts Schritt zwischen dem *TRC* und der Depolarisation der Zellmembran oder der exogenen elektrischen Erregung und dem *TRC* liegt. Wenn der Alles-oder-Nichts Schritt bereits bei der Freisetzung des  $Ca^{2+}$  stattfindet, wäre das ein Hinweis für eine zwischen elektrischer Erregung und  $Ca^{2+}$ -Freisetzung liegende Signalkette, in welcher es an einer Stelle einen Schwellenwert gibt, der überschritten werden muß, damit ein *TRC* ausgelöst wird. Denn eine solche Alles-oder-Nichts Kinetik kann nicht durch eine direkte Spannungsabhängigkeit der  $Ca^{2+}$ -Zufuhr in das Cytoplasma erklärt werden.

Es zeigte sich, daß die Auslösung von *TRC* in der Tat einem Alles-oder-Nichts Prinzip gehorcht. Dieses Ergebnis führte auf die Frage, ob mehrere Reize, die jeder für sich kein *TRC* hervorrufen, ein *TRC* hervorrufen können, wenn sie dicht genug aufeinander folgen. Wenn das der Fall ist, wäre ein Zwischenspeicher nötig, in dem die Information des ersten Stimulus

gespeichert wird. Möglicherweise kann dann aus den Gesetzen, nach denen sich die Reize auf addieren, auf die Natur des Zwischenspeichers geschlossen werden.

Durch Experimente mit Folgen von Stimuli konnte nachgewiesen werden, daß *TRC* tatsächlich durch zwei oder mehrere aufeinanderfolgende unterschwellige Pulse ausgelöst werden können, wenn der Abstand zwischen den Pulsen nicht zu groß war. Die erstaunlichste Entdeckung aber war, daß zwei aufeinanderfolgende schwache Pulse außerdem nur dann ein *TRC* auslösen können, wenn sie einen Mindestabstand haben.

Um zu überprüfen, ob aus diesen Daten auf eine Wirkungskette geschlossen werden kann, in der ein *second messenger* eine Rolle spielt, wurden die mathematischen Zusammenhänge bei der Reizauslösung durch ein kinetisches Modell mit einem solchen *second messenger* modelliert.

Dieses Modell beschreibt die spannungsabhängige Produktion eines *second messenger*  $Q_2$  aus dem endlichen Vorrat einer Vorgängersubstanz  $Q_1$ . Als Folge der Produktion von  $Q_2$  (die mit einem Abbau von  $Q_1$  einhergeht) steigt die Konzentration von  $Q_2$  im Cytoplasma vorübergehend an und erreicht je nach Stärke der elektrischen Stimulation einen Schwellenwert, bei dessen Erreichen es zu einer Ausschüttung von  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern kommt.

Mit Hilfe des Modells sollte untersucht werden, ob es möglich ist, den beobachteten, minimal erforderlichen Abstand, den zwei aufeinanderfolgende Reize haben müssen, um gemeinsam einen *TRC* hervorzurufen, auf eine eingeschränkte Verfügbarkeit des Ausgangstoffes  $Q_1$  für die Produktion des *second messenger*  $Q_2$  zurückzuführen.

Weiter sollte untersucht werden, ob sich mit Hilfe dieses Modells Aussagen über die Zeitkonstanten machen lassen, die ein *second messenger*  $Q_2$  bzw. sein Ausgangstoff  $Q_1$  haben müssen, damit die beobachteten Effekte erklärt werden können.

Schließlich sollte aufgrund der Ergebnisse der Messungen und der Modellation eine Aussage darüber gemacht werden, ob  $IP_3$  als der gesuchte *second messenger* in Frage kommt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 *Chara*

Die für die Versuche verwendeten Grünalgen *Chara corallina* KLEIN ex WILD., (= *Chara australis* BROWN) gehören genau wie *Nitella* zu den Armleuchteralgen, die ihren Namen aufgrund ihrer Gestalt erhalten haben. In der Elektrophysiologie haben diese Algen aufgrund der Größe ihrer Zellen von Anfang an eine wichtige Rolle gespielt (Osterhout 1931). Die einzelnen Zellen erreichen Längen von einigen Zentimetern bei Durchmessern bis zu 1 mm und wurden deshalb als Alternative zum Squid-Axon benutzt (Cole und Curtis 1938, 1939).

Die Pflanzen wurden in mit wöchentlich erneuertem Leitungswasser gefüllten Kunststoffaquarien auf autoklavierter Gartenerde unter natürlichen Lichtbedingungen bei Raumtemperatur kultiviert.

Für die Versuche wurden möglichst junge Internodialzellen mit einer Länge von 35 bis 45 mm ausgewählt und zunächst in künstliches Teichwasser (APW) überführt. Die maximale Länge war durch die Meßkammer vorgegeben. Für die Versuchsanordnung war eine Länge von 40 mm ideal, aber nicht immer standen Zellen der gewünschten Länge in ausreichender Zahl zur Verfügung, so daß gegebenenfalls auch kürzere Zellen verwendet wurden.

Möglichst junge Zellen sollten verwendet werden, weil diese noch wenig calcifiziert sind und daher eine weichere und dünnere Zellwand haben als ältere Zellen. Dieses ist für ein erfolgreiches Beladen des Cytoplasmas mit Fluoreszenzfarbstoff von entscheidender Bedeutung.

Erstens gelingt es bei einer weichen Zellwand einfacher mit einer relativ großen Pipettenöffnung in das Cytoplasma vorzustößen. Zweitens ist eine dünnere Zellwand lichtdurchlässiger, so daß unter einem Lichtmikroskop die Zellstrukturen wenigstens ansatzweise noch zu erkennen sind. Dies war für die zum Beladen der Zellen benutzte Methode der Mikroinjektion (siehe unten) unabdingbar, weil die Beobachtung der Zelle durch das Mikroskop während des Beladungsvorganges die einzige Möglichkeit war, festzustellen, ob aus der Pipette Lösung in das Cytoplasma floß oder nicht.

## 2.2 Versuchsmedium

Als Versuchs- und Aufbewahrungsmittel für beladene Zellen diente künstliches Teichwasser (*artificial pond water*, APW) folgender Zusammensetzung:

0,5 mMol CaCl <sub>2</sub>	(Merck, Darmstadt)
0,5 mMol KCl	(Merck, Darmstadt)
1 mMol NaCl	(Merck, Darmstadt)
2 mMol 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid	(HEPES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Der pH-Wert wurde durch Titration mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

Zum Waschen nach der Injektion diente APW, dessen Zusammensetzung sich lediglich um 0,1 mM MnCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt) von oben angeführtem APW unterschied.

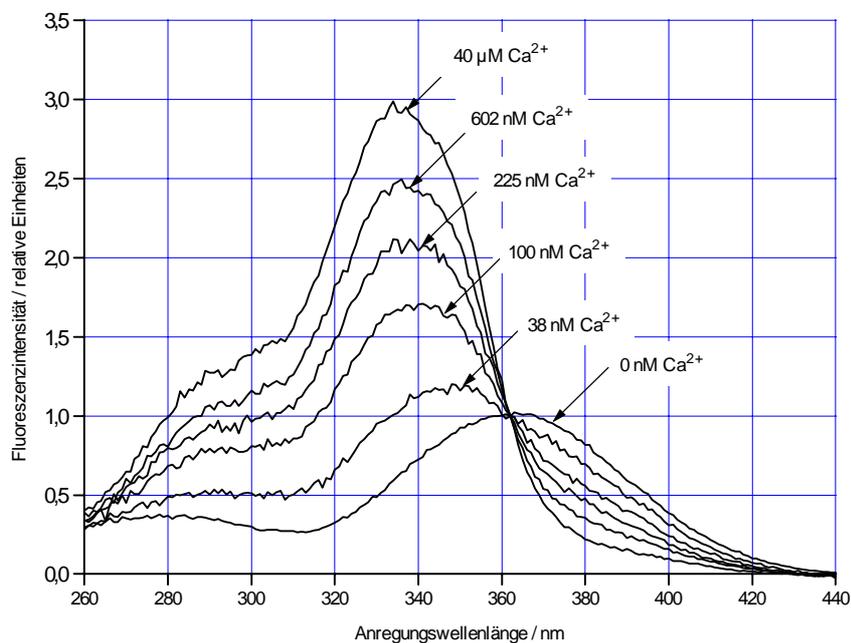
## 2.3 Ratiometrie

Die Messung der freien cytoplasmatischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) erfolgte durch das ratiometrische Meßverfahren von Grynkiewicz und Mitarbeitern (Grynkiewicz et al. 1985). Bei diesem Verfahren werden Farbstoffe als Fluoreszenzindikator benutzt, die im ungebundenen Zustand mit ähnlicher Intensität fluoreszieren wie bei Bindung an das nachzuweisende Ion, wobei entweder die Anregungs- oder die Emissionsspektren beider Zustände jedoch verschieden sind.

Im Falle der hier verwendeten sogenannten *double-excitation-dyes* unterscheiden sich die Anregungsspektren, welche der Farbstoff je nach Bindungszustand auf einer für alle Zustände gleichen Emissionswellenlänge zeigt (Abb. 2.1).

Der Quotient (Ratio) der Fluoreszenzintensitäten zweier geeigneter Anregungswellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  (z.B. der Wellenlängen mit jeweils maximaler Intensität für freien und gebundenen Zustand) ist dann mit einer geeigneten Kalibrierung ein direktes Maß für die Konzentration des nachzuweisenden Ions.

Die Methode hat gegenüber Messungen mit sogenannten *single-excitation-dyes*, bei denen Anregung und Fluoreszenzmessung auf jeweils nur einer Wellenlänge erfolgen, den Vorteil, daß sie weitgehend unabhängig von Schwankungen der Farbstoffkonzentration in der Zelle ist, weil Änderungen der Farbstoffkonzentration sich lediglich auf die Fluoreszenz der beiden einzelnen Wellenlängen, nicht aber auf deren Ratio auswirken.



**Abbildung 2.1:** Anregungsspektren von Fura 2 bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Emission bei 510 nm. (Lösungen mit 5  $\mu\text{M}$  Fura 2 (Molecular Probes F-1200) und den in der Abbildung genannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7,2) kein  $\text{Mg}^{2+}$  (C-3009)). Der isobestrische Punkt liegt bei einer Anregungswellenlänge von 362 nm. Die Aufnahmen der Spektren erfolgten mit dem Photometer RF-5001 PC (Shimadzu, Japan).

Änderungen der Farbstoffkonzentration können bei Ratio-Farbstoffen an Änderungen der Fluoreszenz im isobestrischen Punkt erkannt werden. Der isobestrische Punkt bezeichnet diejenige Anregungswellenlänge (bzw. diejenige Emissionswellenlänge bei *double-emission-dyes*), bei der die Fluoreszenz nur von der Farbstoffkonzentration, nicht aber von der vorliegenden Ionenkonzentration abhängig ist (vgl. Abb. 2.1).

Eine ausführliche Beschreibung und Diskussion der Anwendung des ratiometrischen Meßverfahrens an *Charazellen* findet sich bei Plieth (1995).

### 2.3.1 Farbstoffe

#### 2.3.1.1 Furadextran

Die ersten Messungen wurden mit dem Dextranderivat von Fura 2 (Grynkiewicz et al. 1985), Furadextran, mit dem Molekulargewicht (MW) 3.000 (F-6764, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) durchgeführt. Als dieser nicht mehr lieferbar war, verwendete ich Furadextran MW 10.000 (F-3029, Molecular Probes).

Die Dextranderivate kamen zum Einsatz, weil sie nicht wie der Ausgangsfarbstoff Fura-2 nach der Injektion binnen kurzer Zeit aus dem Cytoplasma verschwinden und in die Vakuole gelangen, was Messungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  vereitelt. Durch ihre Größe sind die Dextrane membranimpermeabel und verteilen sich statt dessen gleichmäßig im Cytoplasma, was stabile cytoplasmatische Fluoreszenzsignale über Stunden und Tage ermöglicht.

Angeregt wurden beide Farbstoffe mit Licht der Wellenlängen von  $\lambda_1 = 340$  nm bzw.  $\lambda_2 = 380$  nm. Die Fluoreszenz wurde auf  $510 \pm 30$  nm gemessen.

### 2.3.1.2 Fura-C<sub>18</sub>

In 31 Zellen wurde statt Furadextran Fura C-18 (Molecular Probes, F-6792) injiziert. Dieser Indikator, welcher aus einem Fura-2 Molekül besteht, an welches eine lipophile Aldehydkette gebunden ist, lagert sich nach der Mikroinjektion an der Zellmembran an (Etter et al. 1994, Takahashi et al. 1999). Ziel dieser Versuche war es, genaueren Aufschluß über die cytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Konzentration unmittelbar an der Zellmembran ( $[Ca^{2+}]_M$ ) zu erhalten.

Allerdings konnte an keiner der Zellen ein Fluoreszenzsignal gemessen werden, welches sich nach erfolgreicher Erregung der Zellen signifikant von der Autofluoreszenz der Zelle unterschied. (Daß die Erregung erfolgreich war, war am Stoppen der Plasmaströmung erkennbar. Siehe dazu Abschnitt 2.5.3) Daß in keine der Zellen Farbstoff gelangte, ist unwahrscheinlich, da zum Zeitpunkt der Versuche die Erfolgsquote für das Beladen mit Furadextran bei 50 % lag. Der Schluß, daß nun während der Erregung kein  $Ca^{2+}$  von außen einströmt, kann daraus aber nicht gezogen werden. Denn weil bei einem globalen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  auch die  $[Ca^{2+}]_M$  ansteigt, sollte bei erfolgreicher Erregung der Zelle und einer für Messungen ausreichenden Konzentration des Fura-C<sub>18</sub> in jedem Fall ein deutlicher Anstieg der  $[Ca^{2+}]_M$  angezeigt werden. Aussagen über die membranahen  $Ca^{2+}$ -Flüsse lassen sich nach Etter et al. (1994) vor allem aus den unterschiedlichen Kinetiken in den Zeitreihen der Fluoreszenzsignale von cytosolischem und membrangebundenem Farbstoff ableiten. Die hier mit Fura-C<sub>18</sub> angestellten Versuche lassen also keine Aussage darüber zu, ob bei den TRC Calcium von außen eintritt oder nicht.

### 2.3.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte mit dem von Plieth (1995) entwickelten Verfahren zur *in vitro* Kalibrierung.

Kalibrierlösungen wurden unter Verwendung von fest eingestellten  $Ca^{2+}$ -Pufferlösungen hergestellt. Zum Einsatz kamen die von Molecular Probes angebotenen Kalibrierungs-Kits (C-3009; C-3722; Haugland 1996) mit folgender Zusammensetzung: 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7,2) ohne (C-3009) bzw. mit zusätzlich 1 mM  $Mg^{2+}$  (C-3722) und freien Calciumkonzentration zwischen 0 und 39,8  $\mu$ M.

Die Farbstoffkonzentration in den fertigen Kalibrierlösungen betrug 5  $\mu$ M.

Die schließlich aus den Ratio-Messungen berechneten  $[Ca^{2+}]$ -Werte stimmten wesentlich besser mit den Werten anderer Arbeiten überein, wenn die Berechnung mit Kalibrierungen erfolgte, bei deren Erstellung 1 mM  $Mg^{2+}$  in den Kalibrierlösungen war. Dies steht im Einklang mit den bekannten cytoplasmatischen  $Mg^{2+}$ -Konzentration von  $\geq 1$  mM in lebenden Zellen (Okihara und Kiyosawa 1988, Wayne und Staves 1991).

### 2.3.2.1 Erstellen von Kalibrierkurven

Die Kalibrierkurve bzw. die analytischen Funktion zur Berechnung der  $[Ca^{2+}]$  aus den gemessenen Ratiowerten  $R$  wurde folgendermaßen bestimmt: Für jede der Kalibrierlösungen mit bekannter  $[Ca^{2+}]_j$  wurde das entsprechende Ratio  $R_j$  ermittelt (siehe die nächsten beiden Abschnitte). Mit  $pCa_j = -\log_{10}([Ca^{2+}]_j)$  erhält man die Kalibrierpunkte ( $pCa_j; R_j$ ), welche sich mit der Sigmoidale

$$y(x) = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{d_x}}} + A_2 \quad (2.1)$$

mit den freien Parametern  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $x_0$  und  $d_x$  anfitzen lassen. Die analytische Funktion  $[Ca^{2+}](R)$  zur Berechnung von  $[Ca^{2+}]$  aus den gemessenen Ratiowerten  $R$  lautet dann

$$[Ca^{2+}] = 10^{-x_0 + d_x \cdot \ln\left(\frac{R-A_1}{A_2-R}\right)} \quad (2.2)$$

Beladungen ins Cytosol gelangen in 12% aller Fälle. Allerdings waren auch die Messungen an Zellen, bei denen durch Verletzung der Vakuolenmembran während der Beladung ein erheblicher oder sogar der größte Anteil des Farbstoffes in die Vakuole gelangt war, nicht völlig wertlos, weil häufig im Zuge eines stimulierten AP anhand des Ratios ein *TRC* zu erkennen war. Eine realistische Berechnung der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  auf Basis der Ratioidaten konnte in diesen Fällen aber nicht erfolgen. Denn die gemessenen Gesamtratos von Vakuole und Cytoplasma sind dann durch die mehrere mM hohe  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Okihara und Kiyosawa) in der Vakuole gegenüber dem cytoplasmatischen Signal sehr stark erhöht.

Da der Anteil und die genaue Konzentration des in die Vakuole gelangten Farbstoffes nicht bekannt sind, kann das vakuolische Signal nicht herausgerechnet werden. Dennoch ist das Fluoreszenzsignal in diesen Fällen immer noch ein Indikator für die relativen Änderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Denn durch die sehr geringe Konzentration des Fura (femtomolar) bei gleichzeitig relativ hohen Calciumkonzentrationen in der Vakuole (mehrere mM, Okihara und Kiyosawa, 1988) liegt der Farbstoff in der Vakuole in jedem Fall gesättigt vor. Änderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{vak}}$  haben daher keine Änderung des vakuolischen Fluoreszenzsignals zur Folge, so daß Änderungen im gemessenen Fluoreszenzsignal auf Änderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  zurückzuführen sind.

### **2.3.2.2 Kalibrierung für Messungen mit dem Photometer**

Dieselbe Quarzglasküvette, die auch für die Messungen vorgesehen war, stand mit der jeweiligen Kalibrierlösung gefüllt im Strahlengang des Photometers. Dann wurden in einer 200 Punkte langen Meßreihe abwechselnd die Fluoreszenz  $F(\lambda_1)$  bzw.  $F(\lambda_2)$  gemessen und aus den Meßwertpaaren die Ratiowerte ermittelt. Der Mittelwert aus den daraus berechneten Ratiowerten diente als Wert für die Kalibrierung.

### **2.3.2.3 Kalibrierung für Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop**

Die Kalibrierung erfolgte analog zu Plieth (1995) unter Verwendung von Microslides (*path length* 0.1 mm, Camlab, Cambridge, UK), die mit Kalibrierlösung gefüllt wurden und in APW in die Meßkammer gelegt wurden. Damit kein APW in die Microslides eindringen konnte, wurden ihre Enden mit Vaseline abgedichtet.

Für jede der Kalibrierlösungen wurde dann eine 30 s lange Meßreihe, deren Ratio-Mittelwert als Wert für die Kalibrierung diente, aufgenommen.

## **2.4 Herstellung von Injektionspipetten sowie Einstich- und Erdelektroden**

Sämtliche Pipetten und Elektroden wurden aus Borosilikatglas mit Filament (Außendurchmesser 1,5 mm, Wandstärke 0,2 mm, Hilgenberg, Malsfeld) hergestellt.

### 2.4.1 Injektionspipetten

Die Pipetten zur Farbstoffinjektion wurden mit einem zweistufigen Vertikalpuller (PP-83, Narishige, Japan) derart gezogen, daß die fertigen Micropipetten einen Widerstand von 0,5 M $\Omega$  in APW bei Füllung mit 3 M KCl hatten.

Diese sehr große Öffnung war nötig, um das Verstopfen der Pipetten bei Einstich in das Cytoplasma zu verhindern. Da der herrschende Zellturgor von ca. 1 MPa fast immer zu einem anfänglichen Rückfluß in die Pipette führte, verstopfte diese beim Anlegen des Gegendruckes bei zu kleiner Öffnung schnell mit aus der Zelle eingeschwemmtem Material.

### 2.4.2 Einstichelektroden

Einstichelektroden, die nur zum Messen der Membranspannung, nicht aber zur Farbstoffinjektion dienen sollten, wurden mit dem gleichen Gerät wie die Injektionspipetten hergestellt. Die Einstellungen waren derart, daß die fertigen Microelektroden einen Widerstand von 5 M $\Omega$  in APW bei Füllung mit 3 M KCl hatten. Dieselbe Kaliumchloridlösung diente auch als Meßlösung.

### 2.4.3 Erdelektroden

Als Referenzelektrode bei der Messung der Membranspannung diente eine 8 cm lange Kapillare, deren eines Ende (1,5 cm) über einer Bunsenbrennerflamme um ca. 90° abgebogen wurde. Das abgebogene Ende wurde blasenfrei mit einer Agarbrücke (3% Agaragar, 3Mol KCl) befüllt. Am offenen Ende wurde ein chlorierter Silberdraht eingeführt, der durch eine 3 molare KCl Lösung elektrisch leitend mit der Agarbrücke verbunden war.

## **2.5 Beladen der Zellen mit dem Farbstoff**

Zum Beladen der Zellen mit dem Farbstoff wurde ein Verfahren in Anlehnung an die von Plieth (1995) verwendete Methode benutzt (Abb. 2.2).

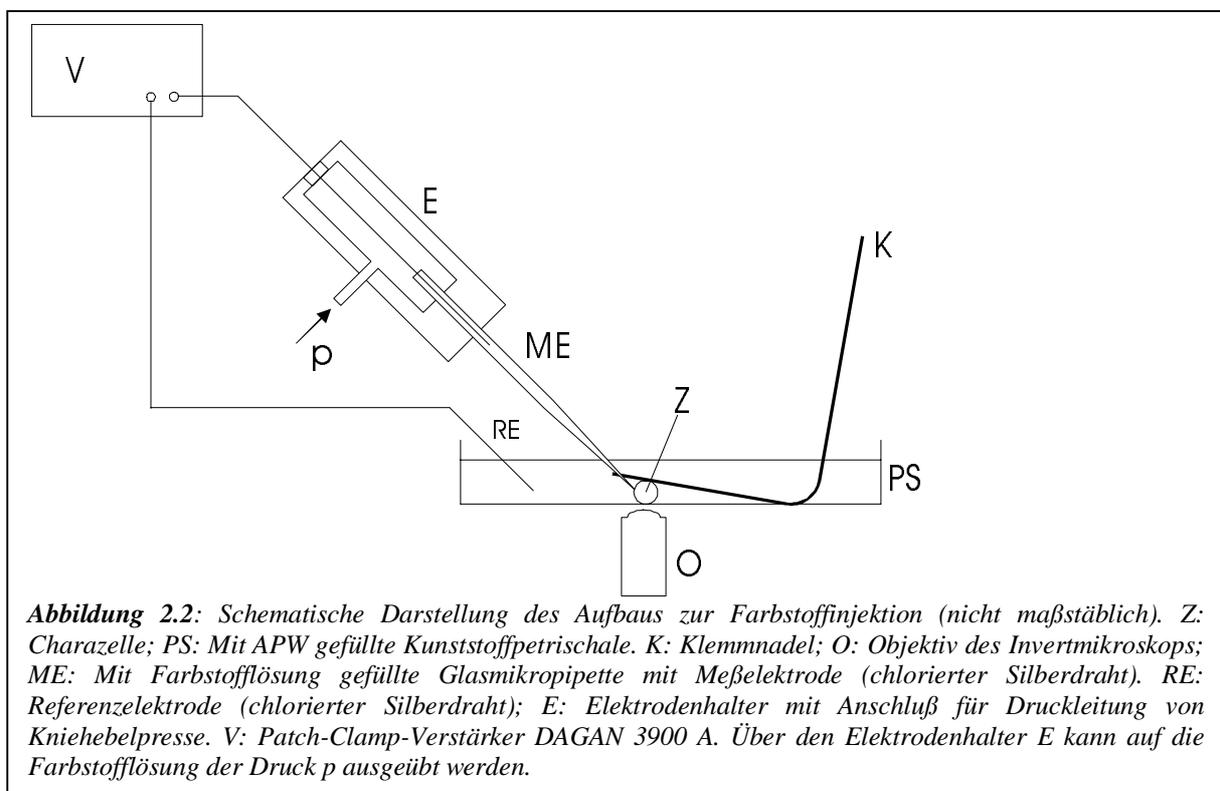
Bei dieser wird eine mit Farbstoff gefüllte Micropipette (ME in Abb. 2.2) in das Cytoplasma der Zelle (Z) eingestochen. Die Micropipette dient dabei gleichzeitig als Spannungsmeßelektrode, mit der kontrolliert werden kann, ob sich die Mündung der Pipette im Cytoplasma befindet. Ist das der Fall, wird die Farbstofflösung unter Druck in das Cytoplasma gepreßt.

### 2.5.1 Fixieren der Zelle auf dem Objektivtisch

Das Fixieren der Zelle vor dem Objektiv erfolgte mit einer Klemmnadel (K in Abb. 2.2), einer in der Bunsenbrennerflamme gebogenen Edelstahl-nadel, welche mit Zwei-Komponenten-Epoxydharzkleber (Uhu plus endfest 300, Uhu, Bühl) in den Deckel einer Polystyrol Petrischale ( $\varnothing$  58 mm, Randhöhe 9 mm, Greiner, Nürtingen) geklebt war.

Die Petrischale (PE in Abb. 2.2) wurde mit BlueTag (Bostik GmbH, Borgholzhausen) auf dem Objektivtisch des Invertmikroskops befestigt.

Unter der Klemmnadel konnten die Zellen für die Injektion ausreichend fest fixiert werden. Der Einstich erfolgte dabei möglichst dicht an der Klemmstelle.



### 2.5.2 Aufbau zur Farbstoffinjektion

Für die Microinjektion selbst stand die schon von Plieth (1995) benutzte Kniehebelpresse zur Verfügung. Mit der Presse konnten von Hand ohne weiteres Drücke bis 2 MPa erzeugt werden. Diese sind nötig, da der zum Beladen angelegte Druck (0,8-1,3 MPa) etwas größer sein muß als der Innenturgor der zu beladenden Zelle.

Die Kniehebelpresse wurde an dem ausführlich bei Weise (1999) beschriebenen Patch-Clamp Meßplatz mit schwingungsgedämpftem Tisch, Invertmikroskop, Mikromanipulator und Verstärker installiert.

Die Druckleitung der Kniehebelpresse konnte an einen entsprechend modifizierten Elektrodenhalter (Plieth 1995, E in Abb. 2.2) angeschlossen werden. Dieser Halter am Vorverstärker wurde dann mit einer mit 10  $\mu$ l einer 1mM Farbstofflösung gefüllten Mikropipette (ME in Abb. 2.2) bestückt. Die zugehörige Elektrode diente zur Kontrolle der Membranspannung. Als Referenzelektrode in der Badlösung diente ein chlorierter Silberdraht (RE in Abb. 2.2).

Mit einem Patch-Clamp-Verstärker vom Typ DAGAN 3900A (V in Abb. 2.2) konnte dann beim Einstich kontrolliert werden, ob die Pipettenspitze im Cytoplasma oder in der Vakuole (was häufig vorkam) war.

### 2.5.3 Beladungsvorgang

Zunächst wurde eine mit 10  $\mu$ l der 1mM-Farbstofflösung gefüllte Micropipette mit der Spitze in unmittelbarer Nähe der Zellwand positioniert. Für den Einstichvorgang wurde der Verstärker in den Voltage-Clamp Modus geschaltet. Anhand der Tonhöhe des Audiomonitors wurde die zunehmende Eindringtiefe in die Membran verfolgt. Diese Funktion ist eigentlich für die Annäherung mit einer Patchpipette an die zu patchende Membran gedacht, eignet sich jedoch auch um den Membrandurchbruch zu verfolgen, was dem Einbrechen in den Whole-Cell Patch-Modus entspricht.

Nach dem mutmaßlichen Durchbruch wurde der Verstärker in den Current-Clamp Mode umgeschaltet: Wenn die Mündung der Micropipette sich im Cytoplasma befand, lag über der Membran eine Spannung von ca. -140 mV. Wurde eine abweichende Spannung gemessen, war entweder der Membrandurchbruch noch nicht erfolgt - oder bereits der Tonoplast durchbrochen.

War die Pipettenmündung zweifelsfrei im Cytoplasma, wurde zunächst einige Minuten gewartet. In dieser Zeit sammelte sich um die Pipettenspitze herum Cytoplasma an (Plieth 1995). In diese Ansammlung wurde dann injiziert. Dazu wurde der Druck langsam auf bis zu 1,3 Mpa erhöht. Wenn Farbstoff aus der Pipette in das Cytoplasma strömte, fing die Ansammlung vor der Pipettenmündung an, sich blasenförmig in das Zellinnere auszudehnen. Erfolgte die Ausdehnung zu stark oder plötzlich, platzte der Tonoplast und Farbstoff gelangte in die Vakuole.

Geschah das nicht, wurde die Farbstoffblase durch die Plasmaströmung in eine Richtung forttransportiert. Durch entsprechende Druckregulierung konnte dann ein Gleichgewicht zwischen einströmender Farbstofflösung und Verteilung derselben durch das Protoplasma über einige Minuten aufrechterhalten werden.

Ein Platzen des Tonoplasten hatte meist einen schnellen Tod der Zelle zur Folge. Kleinere Verletzungen der Vakuolenmembran überlebte die Zelle jedoch offenbar, denn vielfach gelangte Farbstoff in die Vakuole, ohne daß die Zelle starb. Weil die Membran für Furadextran impermeabel ist - was auch in meinen Experimenten durch über Tage gleichmäßig cytoplasmatische Fluoreszenzsignale bestätigt wurde - muß der Farbstoff in diesen Fällen durch kurzzeitige Verwundung des Tonoplasten beim Injizieren in die Vakuole gelangt sein.

Nach erfolgtem Beladen wurde die Mikropipette vorsichtig entfernt. Nach einigen Minuten wurden die Zellen aus der Halterung genommen und 1 min in 0,1 mMol  $Mn^{2+}$  haltigem APW gewaschen. Dies diente dazu, eventuell außen an der Membran befindlichen Farbstoff zu quenchen, um so ungewollte Fluoreszenz aus der Zellwand zu vermeiden.

Danach wurden die Zellen über Nacht in APW gelegt. Diejenigen, die am nächsten Morgen noch lebten (im Lichtmikroskop an der Plasmaströmung erkennbar) wurden zunächst auf ihre Eignung für Experimente untersucht.

Dazu wurden bei gleichzeitiger Beobachtung im Lichtmikroskop zunächst eine Pulsstärke gesucht, bei der die Zelle erregbar war. Blieb nach einem Puls die Plasmaströmung stehen, so war eine zur Erregung der Zelle ausreichende Pulsstärke gefunden, denn die AP von *Chara* gehen mit einem vorübergehenden Stillstand der Plasmaströmung einher (z.B. Tazawa und Kishimoto, 1968). Dieser Effekt beruht auf der Abhängigkeit der Plasmaströmung von der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ .

Die Plasmaströmung erreicht ihre höchste Geschwindigkeit ( $70 \mu m s^{-1}$ , Tominaga und Tazawa 1981) bei einer  $[Ca^{2+}]_{cyt} < 100 nM$ . (Williamson 1975). Bei höheren  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  verlangsamt sich die Strömungsgeschwindigkeit (z.B. Tominaga und Tazawa 1981, Williamson und Ashley 1982). Die  $Ca^{2+}$ -Konzentration, bei welcher die Strömung schließlich stoppt wird zwischen  $1 \mu M$  (Shimmen und Tazawa 1983) und  $1 mM$  (Hayama et al. 1979) angegeben.

In jedem Fall können Änderungen der Strömungsgeschwindigkeit als Maß für die Änderungen der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  angesehen werden (Plieth und Hansen 1992, Clarkson 1986). Ein Stillstand der Plasmaströmung ist somit ein sicheres Zeichen für eine Änderung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ .

Wenn in der darauffolgenden ratiometrischen Messung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , bei der die Zelle mit dem gleichen Pulsprotokoll wie im Vorversuch erregt wurde, auf den Puls innerhalb einiger 100 ms eine deutliche Zunahme des Ratios folgte, konnte von einem cytoplasmatischen Fluoreszenzsignal ausgegangen werden. Die Zelle war für weitere Messungen geeignet.

In Fällen, in denen das Ratio bei einem Ausgangsratio von 0,3 (das entspricht einer  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  von ca. 200 nM) oder weniger nach einem Puls binnen weniger (max. 3) Sekunden auf ca. 0,6

( $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  ca. 1  $\mu\text{M}$ ) anstieg, konnte auf ein rein cytoplasmatisches  $Ca^{2+}$  Signal geschlossen werden. Aber auch bei Ausgangsratios von 1 konnte bei einigen Zellen nach einem Puls noch ein cytoplasmatisches Signal beobachtet werden.

Ein niedriges Ratio allein war nur in Verbindung mit einer hohen Fluoreszenzintensität ein sicheres Zeichen für ein cytoplasmatisches Fluoreszenzsignal, denn das Ratio aus der Autofluoreszenz lag bei geringerer Intensität immer im gleichen Bereich. Die Unterscheidung zwischen unbeladenen Zellen und erfolgreich mit wenig Farbstoff (ebenfalls geringe Intensität) beladenen Zellen, war anhand des Ausgangsratios also nicht möglich.

Die cytoplasmatische Farbstoffkonzentration nach dem Beladen konnte für die Zellen, in denen der Farbstoff ausschließlich ins Cytoplasma gelangt war, grob zu 0,1 - 2,5  $\mu\text{M}$  abgeschätzt werden. Die Abschätzung beruht auf dem Vergleich der Meßfenstergrößen, welche bei den *in vitro* Kalibriermessungen (mit bekannter Farbstoffkonzentration) nötig waren, um ein Fluoreszenzsignal gleicher Intensität wie bei den Messungen an der Zelle zu erzielen. Insgesamt konnte bei 34 von 283 Zellen (gezählt ab dem ersten erfolgreichen Beladen einer Zelle), bei denen ein Beladen mit einem der beiden Dextranderivate versucht wurde, ein deutliches cytoplasmatisches Calciumsignal aufgenommen werden. Dieses entspricht einer mittleren Erfolgsquote von 12%. Rechnet man noch die Versuche vor dem ersten erfolgreichen Beladen mit ein, sinkt die Quote deutlich unter 10%. Andererseits nahm durch stetige Optimierung und mit zunehmender Routine die Erfolgsquote wesentlich zu. Am Ende erreichte die Tagesquote bis zu 75%.

## 2.6 Meßaufbau mit dem Photometer

Ursprünglich war geplant, die Messung des  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  mit Hilfe eines Photometers (RF-5001PC, Shimadzu, Japan) vorzunehmen. Dazu wurden die (mutmaßlich) beladenen Zellen senkrecht in eine mit APW gefüllte Quarzglas-Küvette gestellt. Der untere Teil der Küvette in dem sich das Meßfenster befand, war so eng, daß er gerade Raum für die Zelle bot. Durch die enge Küvette wurde gewährleistet, daß die Zelle sich auch tatsächlich im Strahlengang befand.

War eine geeignete Zelle gefunden, so wurde diese in der Küvette in den Küvettenhalter im Strahlengang des Fluormeters eingesetzt. In den Strahlengang des Fluoreszenzlichtes des Photometers wurde noch ein Bandpaßfilter (BG 18, Schott, Mainz) zur Unterdrückung der Autofluoreszenz der Chloroplasten eingefügt.

Es zeigte sich jedoch, daß der Monochromator des Photometers nur sehr langsame Änderungen der Anregungswellenlängen zuließ. Deshalb war das System nicht in der Lage,

das Ratio mit der geforderten Frequenz von mehreren Hz zu messen. Zweitens lieferten auch nachweislich beladene Zellen kein brauchbares Fluoreszenzsignal. Vermutlich war die Fluoreszenzintensität bei der im Photometer vorhandenen Streuung zu schwach, um ein signifikantes Signal zu erzeugen.

Da mit dem System also letztlich keine brauchbaren Messungen durchgeführt wurden, wird auf eine weitere Beschreibung des Aufbaus verzichtet.

## **2.7 Meßaufbau mit dem Fluoreszenzmikroskop**

Der schließlich zur ratiometrischen Messung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration verwendete Aufbau bestand aus dem optischen System sowie zwei elektronischen Teilen.

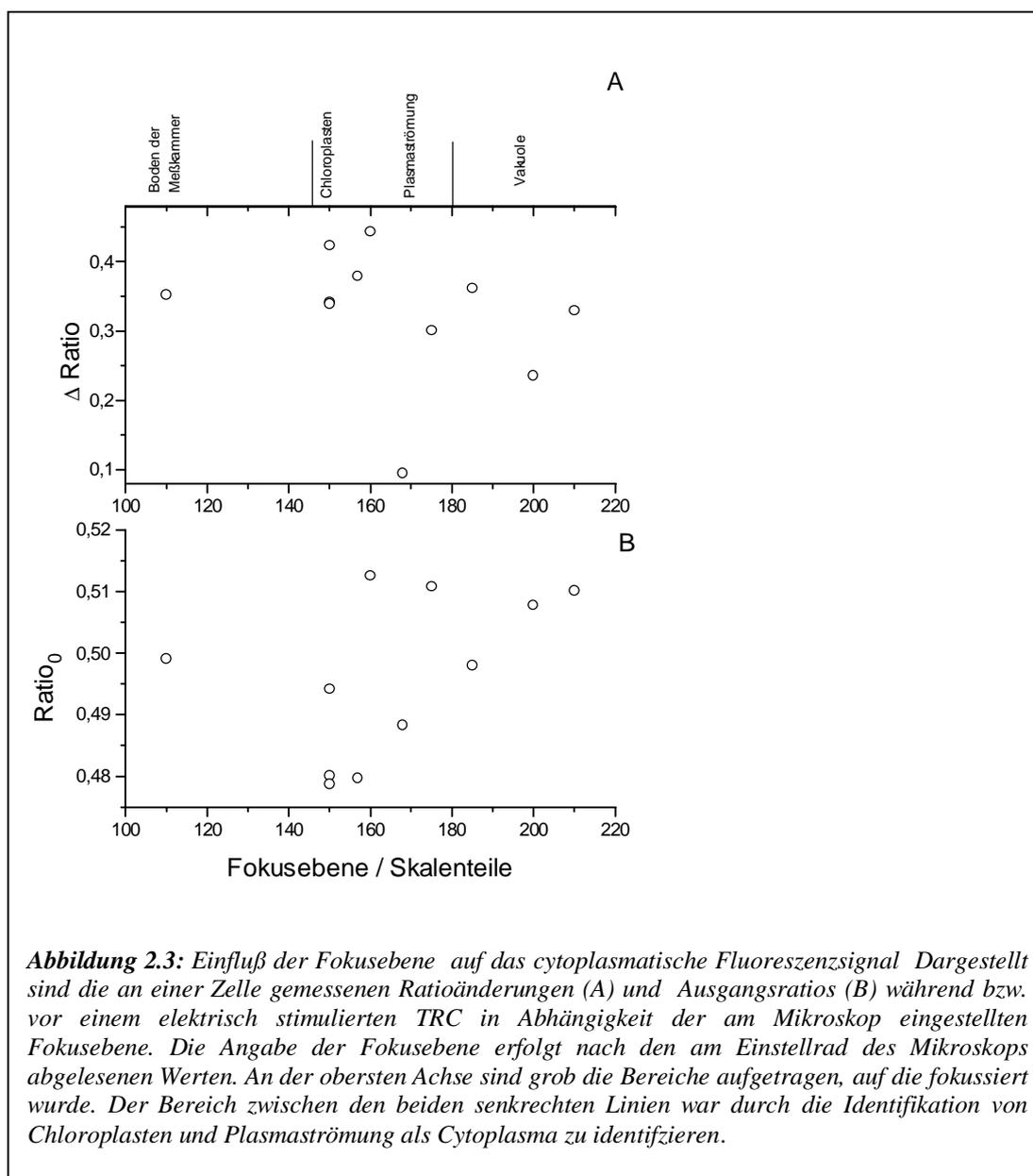
Der erste diente zur Erregung der Zellen, der zweite zur Steuerung des optischen Systems und zur Aufnahme aller Daten.

### **2.7.1 Optischer Aufbau**

Das Zentrum des optischen Aufbaus bildete ein Invertmikroskop (Axiovert 100, Carl-Zeiss, Jena), welches auf einem schwingungsgedämpften Tisch innerhalb eines Faradayschen Käfigs stand. Auf den Objektisch des Mikroskops war die Meßkammer montiert. Das Mikroskop war mit zwei Objektiven bestückt (Fluar 40 x/ 1.3 Öl Immersion und Achrostatigmat 10 x/ 0,22). Bei den Messungen kam in der Regel das Fluar Objektiv zum Einsatz. In Fällen, in denen Messungen mit dem Achrostatigmat Objektiv vorgenommen wurden, wird dies im Ergebnisteil gesondert angemerkt. Die Mikroskoplampe wurde mit einer 12V Autobatterie betrieben. Das monochromatische Anregungslicht für die Ratio-Messungen lieferte eine Xenon-Lampe (T.I.L.L photonics, München), die schnell zwischen den beiden verwendeten Wellenlängen (340 und 380 nm) hin- und herschaltete. Das Fluoreszenzsignal, das je nach Intensität des Signals in einem Meßfenster von 20 - 2000  $\mu\text{m}^2$  aufgenommen wurde, wurde mit dem Objektiv gebündelt und durch einen dichroiden Spiegel (390 nm) geleitet, bevor es in einem Photomultiplier (Seefelder Meßtechnik, Seefeld) detektiert wurde. Ein Bandpaßfilter ((510 $\pm$ 30)nm, Schott, Mainz) im Lichtweg diente dem Abschneiden der Autofluoreszenz der Chloroplasten.

### 2.7.2 Optisches Auflösungsvermögen

Die Möglichkeit, Versuche mit relativ hoher zeitlicher Auflösung zu beobachten (siehe Abschnitt 2.9.3) wurde mit einer sehr geringen räumlichen Auflösung erkauft. Das Fluoreszenzsignal im Meßfenster wird durch den Photomultiplier integriert, eine Unterscheidung der Fluoreszenz nach Herkunft innerhalb des Meßbereiches ist nicht möglich. Auch der Vergleich von Signalen zwischen verschiedenen Meßorten an einer Zelle während einer Messung ist nicht möglich, da die Lage des Meßfensters während einer Meßreihe nicht kontrolliert zwischen zwei oder mehreren Orten hin- und her verschoben werden kann. Bezogen auf das Meßobjekt sind sämtliche Messungen also lokal, bezogen auf das Meßfenster hingegen global.



Denn die Herkunft des Signals kann nur durch Verkleinerung des Meßfensters genauer bestimmt werden – dies geht bei endlicher Fluoreszenzstärke zu Lasten des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (*SNR*).

Und selbst dann wird nicht nur das Signal aus der fokussierten Ebene, sondern das Signal über das Volumen innerhalb des Meßobjektes, welches das Meßfenster als Querschnitt hat, gemessen. In einem Vorversuch untersuchte ich daher, welchen Einfluß die Lage der Fokusebene auf das Meßsignal hat. Abb. 2.3 zeigt, daß innerhalb des Cytoplasmas die Lage der Fokusebene keinen bestimmenden Einfluß auf die Intensität und Form des Fluoreszenzsignals hat. Verschiedene Aufnahmen mit der gleichen Fokusebene unterscheiden sich zum Teil stärker voneinander als Signale, die mit unterschiedlichen Fokusebenen aufgenommen wurden. Der Einfluß der Fokusebene kann somit bei der Auswertung der Aufnahmen vernachlässigt werden.

### 2.7.3 Elektronischer Aufbau

Zur Steuerung der Anregungswellenlänge sowie zur Aufnahme des Ausgangssignals des Photomultipliers und der Membranspannung diente eine Einheit aus Patch-Clamp-Verstärker (EPC 9, Heka electronic, Lamprecht) und PowerPC (PowerPC Macintosh 8200/100, Apple, Cupertino, CA, USA) mit PULSE und X-chart software (Heka electronic). Der EPC-9 wurde aufgrund seiner Auslegung zur integrierten Nutzung bei elektrophysiologischen und fluoreszenzoptischen Versuchen gegebenenfalls für die gleichzeitige Messung der Membranspannung im *Current-Clamp-Mode* eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde dann eine Einstichelektrode auf den Eingang des Vorverstärkers montiert.

Die Pulsprotokolle zur Erregung der Zelle wurden auf zwei verschiedene Weisen erstellt.

Zur Erzeugung von Einzelpulsen und schnellen Folgen (Abstand der Pulse 20 ms bis 4 s) von bis zu 6 Pulsen (Mehrfachpulse) diente ein PC (Intel 80486, CPU mit 50 MHz, 8 MB RAM), der mit einer PCI-Karte (Lab PC+, National Instruments, Austin, Texas, USA) zur Datenaufnahme (DAQ = *Dataacquisitionboard*) bestückt war.

Die Pulsprotokolle wurden dann mit der Software WCP (Strathclyde Electrophysiology Software, Strathclyde, UK) erstellt und über das DAQ mit einem auf die Software zugeschnittenen Interface (Strathclyde, UK) auf die Elektroden übertragen.

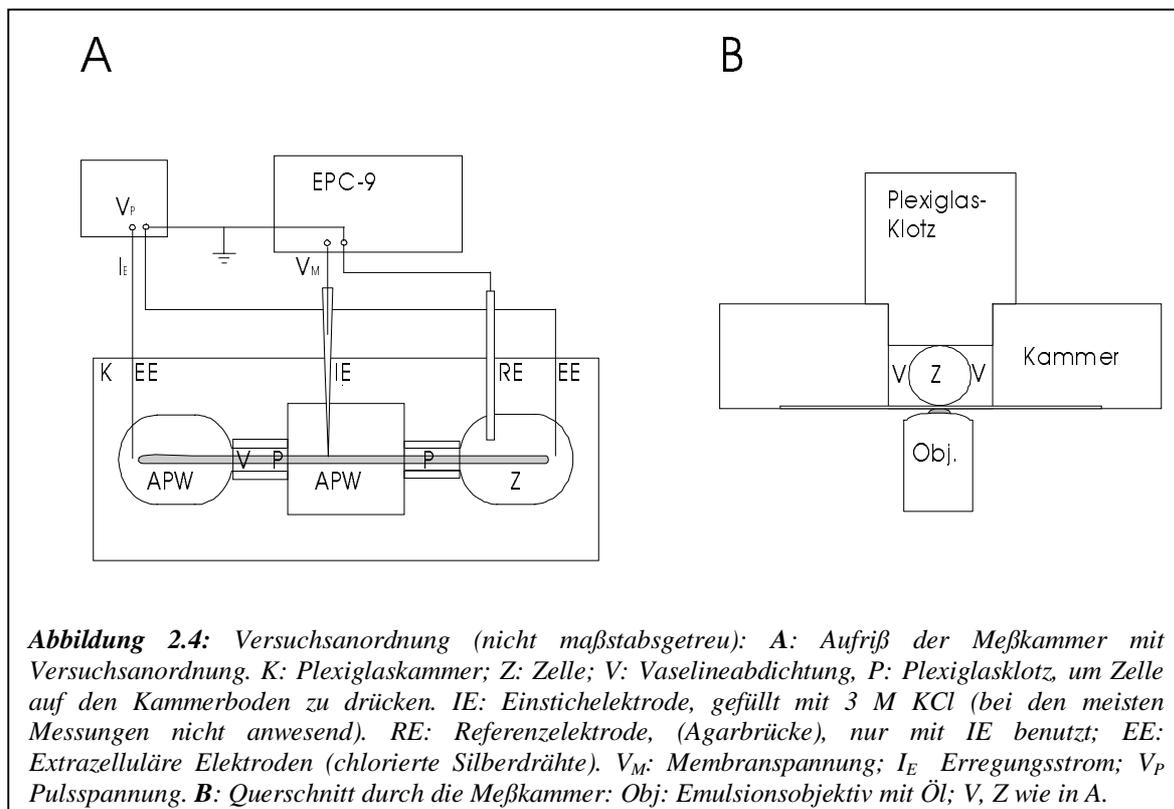
Serienpulse erzeugte ein digitaler Funktionsgenerator (Model 39, Wavetek Corporation, San Diego, California, USA).

Die Spannungspulse wurden über zwei chlorierte Silberdrähte (EE in Abb. 2.4 A), die an den beiden Enden der Zelle postiert waren, an die Zelle angelegt.

### 2.7.4 Meßkammer

Die verwendete Meßkammer ist in Abb. 2.4 dargestellt. Sie besteht aus einer 4 mm dicken Plexiglasplatte, in die zwei Aussparungen geschnitten sind: Die erste, 0.2 mm tiefe befindet sich an der Unterseite der Platte. In diese wurde das als Boden dienende Quarz-Deckgläschen (50 x 20 mm) mit Zwei-Komponenten-Epoxydharzkleber (Uhu, plus endfest 300, Uhu, Bühl) bündig eingeklebt.

Die zweite Aussparung dient als die eigentliche Kammer und erstreckt sich über die gesamte Dicke der Plexiglasplatte. Sie hat zwei Engstellen, in die Plexiglasblöcke (P in Abb. 2.4 A) geklemmt werden können (siehe Abb.2.4 B), um die auf dem Glasboden liegende Zelle fest



gegen diesen zu drücken. Das ist nötig, um mit dem Emulsionsobjektiv arbeiten zu können. Durch die Verwendung von Plexiglas für die Blöcke wird sichergestellt, daß die von oben erfolgende Beleuchtung der Zelle durch die Mikroskoplampe nicht behindert wird.

Außerdem dient eine Vaselinebrücke (V in Abb. 2.4) in einer der beiden Engstellen dazu, die Badlösungen in den drei Erweiterungen der Kammer elektrisch voneinander zu isolieren.

Die beiden Erweiterungen an den Enden der Kammer dienen zur Aufnahme der Erregungs- bzw. Erdelektrode. Die mittlere Erweiterung bietet genügend Platz zum Manövrieren mit einer Einstichelektrode (IE in Abb. 2.4 A) für Spannungsmessungen.

Die Engstellen, durch welche die Erweiterungen verbunden sind, sind deutlich breiter als eine *Charazelle*, um auch leicht gekrümmte Zellen aufnehmen zu können.

## **2.8 Synchrone Messungen von $[Ca^{2+}]$ und Membranspannung**

Bei der parallelen Messung von Membranspannung und  $[Ca^{2+}]$  bedingte der Versuchsaufbau unterschiedliche Orte der Messung beider Parameter. Das zur Messung der Fluoreszenz benutzte Fluar Objektiv des Invertmikroskops konnte nur auf den untersten Teil der Zelle fokussiert werden, wohingegen der Einstich mit der Mikroelektrode von oben erfolgen mußte. Aus diesem Grund waren genauere Messungen der zeitlichen Kopplung von  $[Ca^{2+}]$  und Membranpotential nicht möglich.

Die beschriebene Meßkonfiguration führte zudem dazu, daß der Einstich in die Membran mit der Mikroelektrode blind erfolgen mußte, was die Erfolgsquote erheblich minderte. Problematisch war, daß die Meßreihen sich zum Teil über Stunden erstreckten und das Seal der Membran um die Einstichstelle herum sich meist bereits in erheblich kürzerer Zeit soweit verschlechterte, daß nur noch die Spannungsspitze der AP aufgenommen werden konnte. Daher war ein häufiges erneutes Einstechen in die Membran nötig, jeweils mit dem Risiko, die mühsam mit Farbstoff befüllte Zelle zu zerstören.

Deshalb wurde auf die anfangs angestrebte synchrone Messung von  $[Ca^{2+}]$  und  $V_m$  weitgehend verzichtet. An der Aussagekraft der in dieser Arbeit im Folgenden geschilderten Messungen ändert dieses jedoch nichts, da die Kopplung der *TRC* und AP als gesichert angenommen werden darf.

## **2.9 Datenaufnahme und Verarbeitung**

Sämtliche Daten wurden über den EPC-9 und den PowerPC mit der Pulse Software aufgezeichnet. Um das Zustandekommen der im Ergebnisteil gezeigten Zeitreihen zu verstehen, ist es nötig, die Datenerfassung durch das Pulse Programm etwas näher zu betrachten. Die im Programm und im Folgenden zur Beschreibung der Datenstruktur verwendeten Begriffe sind *kursiv* geschrieben.

### 2.9.1 Datenstruktur

Während schneller Messungen kann das Pulse Programm lediglich die Information aus zwei Eingangskanälen verarbeiten. Um die Software Pulse zu ratiometrischen Messungen mit Fura benutzen zu können, ist das zusätzliche Software Modul „Fura-Erweiterung“ (HEKA) nötig. Bei Verwendung dieser Software liegt am Eingang IN 1 des EPC-9 standardmäßig das Ausgangssignal des Photomultipliers und zwar für beide, ggf. sogar drei Anregungswellenlängen. Die Trennung der Signale muß also durch die Software erfolgen.

Damit dies möglich ist, müssen die aufgenommenen Daten klar gegliedert sein.

Um einen Meßwert für das Ratio zu erhalten, wird für jede Anregungswellenlänge eine vom Benutzer festgelegte Anzahl von Datenpunkten, *Points*, aufgenommen. Die Aufnahme­frequenz für die *Points* beträgt bis zu mehreren kHz. Die größte von mir verwendete Aufnahme­frequenz für die *Points* betrug 10 kHz. Ob der Aufbau noch größere Frequenzen zuläßt, wurde nicht überprüft, da die erzielten 10 kHz für die angestrebten Aufnahmen mehr als ausreichend waren. Die so entstandene Zeitreihe des Photomultiplierausgangssignals bildet eine *Epoche* und repräsentiert genau einen Ratiowert. Im Anschluß an die Aufnahme einer *Epoche* kann entweder sofort die nächste *Epoche* begonnen oder die Datenaufnahme unterbrochen werden. Denn während der Dauer einer *Epoche* beansprucht die Datenaufnahme sämtliche Systemressourcen. Die Daten können in dieser Zeit nicht weiterverarbeitet, auf die Festplatte geschrieben oder etwa an das Programm X-Chart, welches die Meßwerte graphisch darstellt, weitergegeben werden.

Ein *Sweep* umfaßt eine oder mehrere *Epochen*. Nach Ende der letzten *Epoche* eines *Sweeps* berechnet das Programm Pulse für jede *Epoche* aus den aufgenommenen *Points* für jede Anregungswellenlänge den dazugehörigen Mittelwert und aus den beiden Mittelwerten für die Ratiomessungen das Ratio. Die Fluoreszenzmittelwerte und das Ratio können nun an X-Chart weitergegeben werden. Anschließend beginnt der nächste *Sweep* mit einer neuen *Epoche*.

Die vom Benutzer gestartete Meßreihe schließlich besteht aus einem oder mehreren *Sweeps*.

Die Daten, die während einer Meßreihe über den zweiten Eingang, standardmäßig IN 0, einlaufen, können als *second trace* gespeichert werden. Sie können aber nicht weiterverarbeitet oder an X-Chart übermittelt werden. Das bedeutet, daß die genaue zeitliche Korrelation der auf beiden Kanälen aufgezeichneten Daten während der Versuchsdurchführung nicht zu erkennen ist. Um wenigstens den Verlauf des *second trace* - wenn auch nicht synchron - während des Versuchs verfolgen zu können, wurden das an IN 0 anliegende Signal gleichzeitig über das PC-Interface mit Hilfe der WCP-Software auf dem PC aufgenommen, dargestellt und gespeichert.

Eine synchrone Betrachtung beider Spuren war nur nach aufwendiger Datentransformation möglich. Zunächst mußten die Daten in das ASCII-Format exportiert werden. Dabei werden die Daten epochen- und sweepweise untereinander in eine Datei geschrieben. Die so entstehenden ASCII-Dateien sind sehr sperrig (u. U. mehrere MB), weil sie alle *points* und alle Mittelwerte enthalten. Sie haben eine Struktur, die eine weitere Bearbeitung mit den üblichen Kalkulationsprogrammen nicht ohne weiteres zuläßt, weil innerhalb der einzelnen Spalten sowohl Rohdaten als auch Mittelwerte als auch Text untereinander stehen.

### 2.9.2 Synchronisation der beiden Datenspuren

Also war es notwendig, die Daten für eine weitere Verarbeitung zu sortieren. Zu diesem Zweck diente ein selbst geschriebenes C/C++ Programm (Watcom C++). Dieses liest die ASCII-Dateien ein und findet erstens aus den Daten die Anfangszeiten der einzelnen *Epochen* und je *Epoche* die Mittelwerte für die beiden Ratiowellenlängen sowie das Ratio und schreibt diese in eine Ausgabedatei. Zweitens findet das Programm alle Meßzeitpunkte und *Points* des *second trace*. Bei bis zu mehreren 100 Datenpunkten pro *Sweep* und bis zu 1000 *Sweeps* pro Messung sind das mehrere 10.000 Punkte. Weil die handelsüblichen Kalkulationsprogramme eine Zeilenbeschränkung haben (Microcal Origin 3.5 z.B. 30.000 Zeilen) implementierte ich eine Filterfunktion, deren ganzzahliger Filterfaktor  $m$  das Programm so wählt, daß die gefilterten Daten nicht mehr als 30.000 Zeilen umfassen. Die so erhaltenen Daten werden in einer zweiten Ausgabedatei abgelegt. Ein Datenpunkt der gefilterten Daten entspricht dabei dem arithmetischen Mittel aus  $m$  Rohdatenpunkten.

Da die zeitliche Auflösung der zweiten Spur, die nämlich der Aufnahme Frequenz für die *Points* entspricht, sehr viel höher ist als die zeitliche Auflösung der gemittelten Fluoreszenz- bzw. Ratioidaten, führt diese einfache arithmetische Filterung bei den hier verwendeten Filterwerten nicht zur Vergrößerung des Fehlers bei der Synchronisation der beiden Spuren. Die maximale Information in Bezug auf die Datensynchronisation ist, daß ein Ereignis auf der zweiten Spur während einer bestimmten *Epoche* stattgefunden hat oder nicht. Diese geht erst verloren, wenn der Filterfaktor sich der halben Zahl der *Points* in der *Epoche* annähert. Das war bei den hier vorgenommenen Messungen bei weitem nicht der Fall. Bei einer Epochenlänge von 115 *Points* war der maximal vorkommende Filterfaktor 5, bei der Epochenlänge 50 *Points* war er 2.

Auf der zweiten Spur wurde entweder die vom Pulsprotokoll zur Erregung der Zelle gelieferte Spannung oder die vom EPC-9 gemessene Membranspannung aufgezeichnet. Im letzteren Fall entsprechen die ausgegebenen Werte der gemessenen Membranspannung plus dem

Offset. (Im Current-Clamp Modus bietet der EPC-9 keine Möglichkeit zur Offset Kompensation.)

Die Synchronisation beider Spuren erfolgt schließlich, indem beide Spuren gegenüber der gleichen Zeitachse aufgetragen werden.

Eine verbesserte Version des Programms ist darüber hinaus fähig, beim Sortieren der Daten den Startzeitpunkt des ersten Pulses zu ermitteln und die Zeitachse entsprechend zu verschieben. Außerdem ist diese Version in der Lage, sowohl in den Ratioidaten als auch in den daraus mit Hilfe der vorgegebenen Kalibrierung berechneten Calciumkonzentrationen den Beginn und das Ende eines *TRC* in den Daten zu ermitteln und dieses sofort mit der Summe von zwei Exponentialfunktionen (siehe dazu Gl. 3.1 im Ergebnisteil) zu fitten, was eine wesentliche Hilfe bei der Auswertung darstellt.

### 2.9.3 Aufnahmefrequenz

Die Datenverarbeitung nach Ende eines *Sweeps* erfordert Zeit, Zeit in der keine neuen Daten aufgenommen werden können. Vom Programm aus wird nun aber lediglich sichergestellt, daß die vom Benutzer dem Programm vorgegebene Sweepperiode so lang ist, wie die Datenaufnahme für einen Sweep dauert. Sie kann vom Benutzer kürzer gewählt werden als die Summe von Aufnahme und Verarbeitungszeit. Dies führt aber dazu, daß die schließlich in den Daten wiedergegebene Meßzeit nicht der tatsächlichen Zeit entspricht, weil die gespeicherte Zeitachse die zur Verarbeitung der Daten benötigte Zeit unterschlägt. Wenn die Summe der Datenaufnahmezeit plus der Verarbeitungszeit die eingestellte Periodendauer überschreitet, wird vom Programm dennoch die eingestellte Periodendauer angesetzt (Persönliche Mitteilung, Herr Letz von der Firma HEKA). Die gespeicherte Zeit für den Beginn des *n*-ten *Sweeps* ist dann *n*-mal die eingestellte Periodendauer. Die Sweepperiodendauer muß also so gewählt werden, daß während dieses Zeitraums noch genügend Zeit zur Datenverarbeitung bleibt.

Ist dies nicht der Fall, kann es zu erheblichen Verschiebungen zwischen Echtzeit und Meßzeit kommen. Sämtliche in den Abbildungen im Ergebnisteil auftretenden Diskrepanzen zwischen angegebenen und gezeigten Zeiten für Pulsdauern und -abständen beruhen auf diesem Effekt. Diese Verschiebung läßt sich anschließend nur noch korrigieren, wenn z.B. auf der zweiten Spur Ereignisse bekannter Dauer aufgenommen wurden. Wegen der komplexen Datenstruktur ist aber auch diese Möglichkeit eher theoretisch.

Die nächste Schwierigkeit ergibt sich aus der Abschätzung der Zeit, wie lange der Rechner zur Datenverarbeitung braucht. Die Dauer dieses Zeitraums hängt nämlich nicht nur von der

näherungsweise konstanten Prozessorleistung ab, sondern auch von der Größe des freien Haupt- und Festspeichers (persönliche Mitteilung, Herr Letz, Fa. HEKA). Sie wird also während einer Messung zwangsläufig länger und sollte daher eher zu lang als zu kurz gewählt werden. Um eine Meßfrequenz von beispielsweise 5 Hz zu realisieren (das entspricht einer Sweepdauer von 200 ms), darf die reine Meßzeit pro *Sweep* lediglich 42 ms betragen. 158 ms mußten bei Einsatz des zur Verfügung stehenden Rechners für das Schreiben der Daten auf die Festplatte freigehalten werden (vgl. auch Tabelle 2.1). Um die Meßfrequenz zu erhöhen, muß man in jedem Fall die Dauer der *Epochen* und damit die Zahl der *Punkte pro Epoche* vermindern. Damit vergrößert sich im Gegenzug das Rauschen.

Um dem entgegenzuwirken, hat man noch die Möglichkeit, die Zahl der *Epochen* pro *Sweep* zu erhöhen. Man spart dann die Datenverarbeitungszeit zwischen den *Epochen* ein. Damit lassen sich kurzzeitig sehr hohe Meßfrequenzen erreichen, aber die Datenverarbeitungsdauer wird entsprechend länger, so daß sich in der Zeitreihe Abschnitte mit sehr hoher Zeitauflösung mit längeren Abschnitte ohne jegliche Daten ablösen. Nach 400 ms Meßzeit werden dann beispielsweise 600 ms zum Schreiben der Daten auf die Festplatte benötigt (vgl. Tabelle 2.1). Da bei endlichem Arbeitsspeicher die *Sweeps* nicht beliebig lang werden können, bekommt man, wenn man mehrere aufeinanderfolgende Ereignisse aufnehmen will, schnell ein Synchronisationsproblem derart, daß beim zweiten Ereignis das System möglicherweise gerade nicht zur Datenaufnahme bereit ist.

Daher habe ich fast ausschließlich mit *Sweeps*, die genau eine *Epoche* umfassen, gemessen. Die Meßfrequenz betrug dann entweder 10 oder 5 Hz, wobei das langsamere Protokoll immer dann verwendet wurde, wenn wegen eines zu schlechten *SNR* der Einsatz des schnellen nicht mehr sinnvoll war. Sämtliche von mir verwendeten Aufnahmeprotokolle sind in Tabelle 2.1 zusammengefaßt.

**Tabelle 2.1** Übersicht über die verwendeten Protokolle zur Datenaufnahme. Die in der vierten Zeile genannte Aufnahmefrequenz von 50 Hz bezieht sich auf die ersten 400 ms des *Sweeps*, in denen Daten aufgenommen werden. In den darauffolgenden 600 ms werden keine Daten aufgenommen. Die Aufnahmefrequenz ist dann 0.

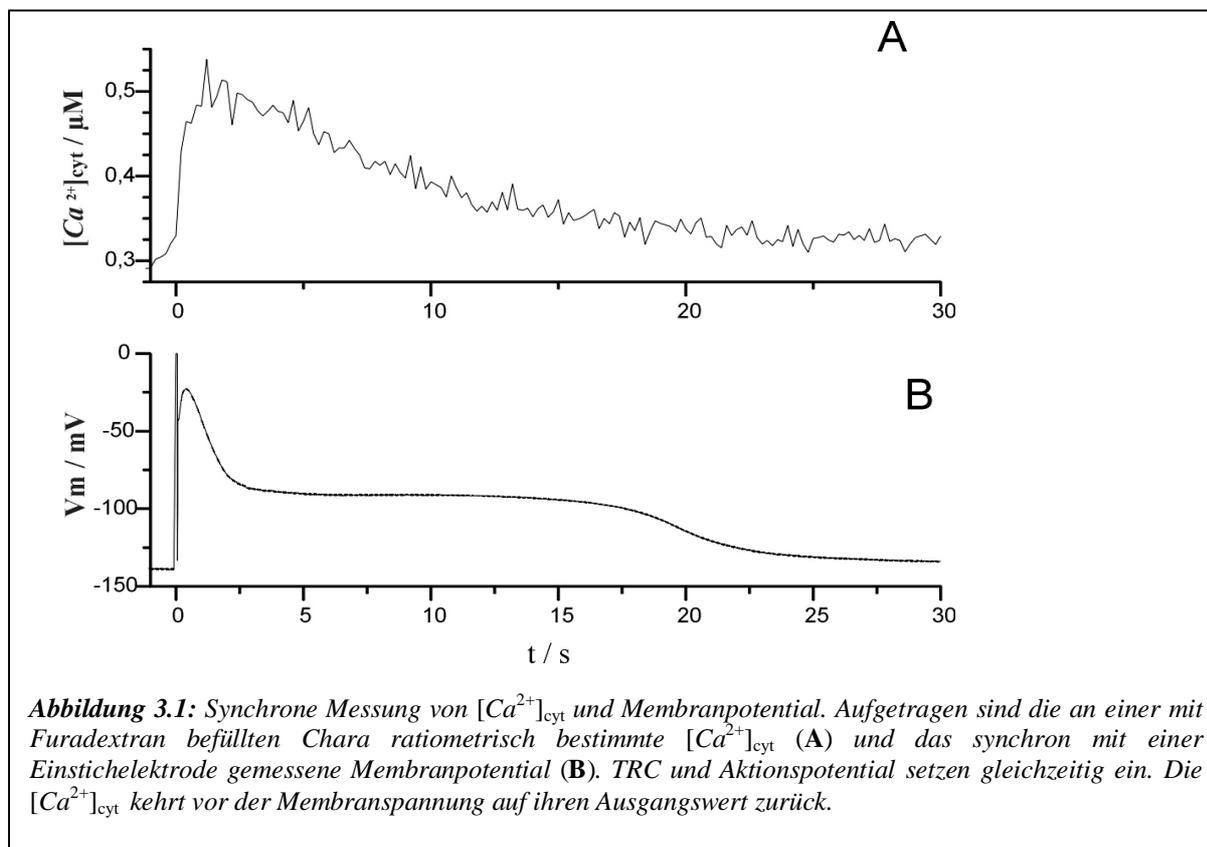
Meßfrequenz / Hz	Sweeperiode / ms	Meßzeit pro Sweep / ms	Epochendauer / ms	<i>Epochen</i> pro Sweep	<i>Points</i> pro Sweep
5	200	42	100	1	115
10	100	24	20	1	50
50	1000	400	20	20	6100

Der Text des Ergebnisteils bezieht sich, wenn nicht anders angegeben, stets auf Messungen die mit 5 oder 10 Hz aufgenommen wurden. Bei der Abbildung einzelner Ergebnisse ist die Aufnahme­frequenz explizit angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Synchrone Messungen von $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ und Membranspannung

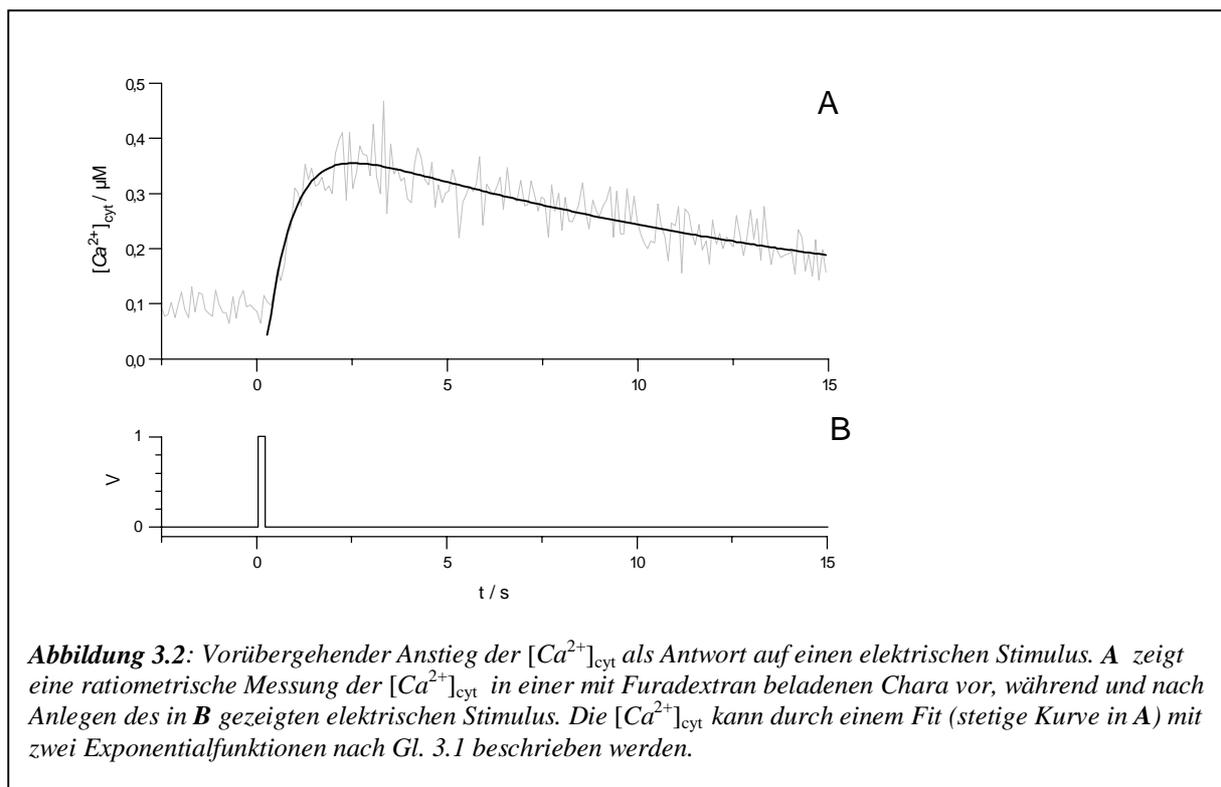
Abb. 3.1 zeigt eine parallele Messung von Membranspannung und  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  vor und während eines elektrisch stimulierten APs in einer *Chara* Internodialzelle. Die Meßergebnisse bestätigen in allen Fällen die seit langem bekannte enge zeitliche Kopplung zwischen beiden Signalen (Abb. 3.1). Der Versuchsaufbau bedingt jedoch unterschiedliche Orte der Messung beider Parameter. Zwar lagen die Abstände zwischen beiden Orten jeweils nur im



Millimeterbereich, aber da die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der AP in *Chara*  $15 \pm 9 \text{ mm s}^{-1}$  (Tabata und Sibaoka 1987), bei einer Aufnahme­frequenz von 10 Hz also ungefähr 1,5 mm pro Meßpunkt, beträgt, sind genauere Aussagen darüber, welches von beiden Signalen zuerst einsetzt, aus den vorliegenden Messungen nicht zu ermitteln.

### 3.2 Charakterisierung des $Ca^{2+}_{\text{cyt}}$ -Signals

Abbildung 3.2 zeigt eine Aufnahme der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  in einer *Chara* Internodialzelle vor und während elektrischer Erregung. Der Ruhewert der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  war in den Zellen typisch ungefähr  $(0,1 \pm 0,05)$  nM. (12 Zellen, 224 Meßreihen). Eine Stimulierung der Zelle durch einen kurzen Strompuls (hier 100 ms) rief eine vorübergehende Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  hervor. Diese erreichte innerhalb von 3 s einen maximalen Wert von ca. 1  $\mu$ M. Die Kinetiken und Amplituden dieser elektrisch stimulierten TRC ähneln sehr denjenigen Änderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ , die schon vorher bei der elektrischen Erregung von *Chara* beobachtet wurden (z.B.



Plieth et al.,1998). Die hier vorliegenden Messungen sind jedoch mit einer um den Faktor 10 höheren Aufnahmefrequenz durchgeführt worden. Daher lassen die Daten in Abb. 3.2 genauere Aussagen über die Kinetik der TRC zu.

#### 3.2.1 Kinetik des Calciumsignals

Um die Änderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  während der Erregung zu quantifizieren, wurden die Zeitreihen gefittet. Da das System in erster Näherung als linear angesehen wird, dienten als Fitfunktion dabei die Summen von Exponential-Funktionen n-ter Ordnung der Form

$$[Ca^{2+}] = A_0 + \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t_0}{\tau_i}} \quad (3.1)$$

mit dem Ruhewert  $A_0$ , den Amplituden  $A_i$  und den Zeitkonstanten  $\tau_i$ .  $t_0$  ist der Anfangszeitpunkt des betrachteten Intervalls.

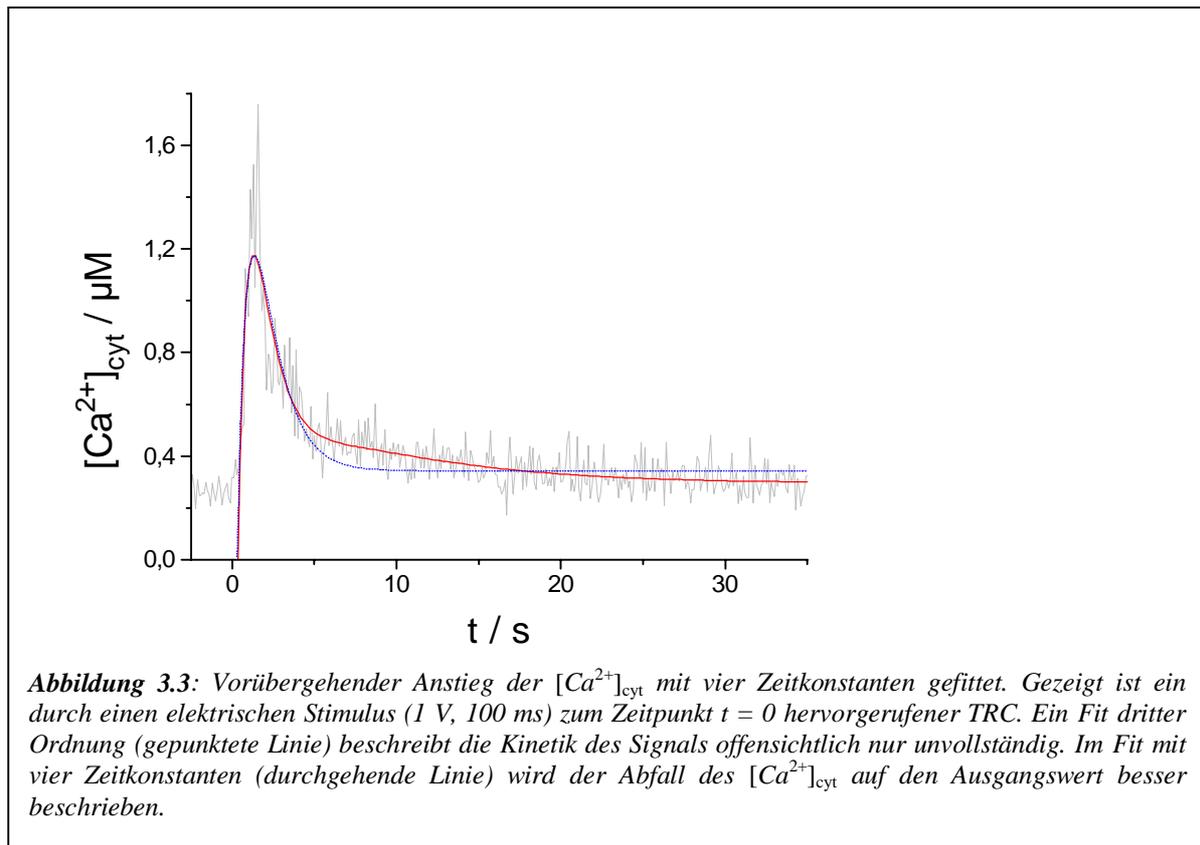
Bei dieser *ad hoc* Beschreibung wird vorausgesetzt, daß sich hinter der aufgezeichneten Änderung im Rauschen die Reizantwort eines linearen Systems verbirgt, welches sich durch lineare Differentialgleichungen beschreiben läßt. Lösungen von linearen Differentialgleichungen mit konstanten Koeffizienten haben die Form von Gl. 3.1, weshalb diese als geeignete Fitfunktion angenommen wird. Die Zahl der zum Fit nötigen Zeitkonstanten gibt dabei die Zahl der im Signal beobachtbaren Prozesse an – diese kann jedoch niedriger sein, als die Zahl der tatsächlich ablaufenden Prozesse. Ziel ist es, anhand der mathematischen Beschreibung des Signals die beobachtbaren Prozesse zu identifizieren.

Die im Folgenden angegebenen maximalen Änderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  während eines *TRC*  $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  wurden als Differenz des Maximums und des Ruhewertes  $A_0$  der nach Gl. 3.1 erstellten Fitkurven berechnet.

Wie an einem Beispiel in Abb. 3.2 A gezeigt, war eine Fitfunktion zweiter Ordnung (zwei Zeitkonstanten) für eine *ad hoc* Beschreibung der *TRC* in dieser und den meisten anderen Zellen (19 von 34) angemessen. Bei 8 Zellen traten jedoch *TRC* auf, für die ein Fit dritter Ordnung notwendig war. Abb. 3.3 zeigt ein Beispiel für einen *TRC*, in dem sogar ein Fit dritter Ordnung den Verlauf der *TRC* nur unzureichend beschreibt. Ein Buckel in der abfallenden Flanke wird durch den Fit nicht beschrieben. Ein befriedigendes Ergebnis lieferte in diesem Fall erst ein Fit vierter Ordnung, in dem jeweils zwei Zeitkonstanten einen Anstieg bzw. einen Abfall der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  beschreiben.

Die Frage ist, ob diese zusätzlichen Zeitkonstanten „echt“ sind, das heißt zu Prozessen gehören, die nur gelegentlich die Stärke erreichen, daß sie im Experiment sichtbar werden, oder ob es Artefakte sind. Eine naheliegende Quelle für Artefakte ist die Annahme der Linearität. Nichtlinearitäten würden die Exponentialfunktionen verbiegen und im Fit wären zusätzliche Exponentialfunktionen nötig, um diese Abweichungen zu berücksichtigen. Die häufigste Nichtlinearität ist ein amplitudenabhängiger Skalierungsfaktor. Der würde jedoch nicht zu neuen Buckeln wie in der Antwort in Abb. 3.3 führen. Deshalb wird angenommen, daß hinter den zusätzlichen Zeitkonstanten echte Prozesse stecken.

Tabelle 3.1 zeigt die Mittelwerte und Streuungen der Zeitkonstanten und Amplitudenfaktoren für die Fits mit 2, 3 und 4 Zeitkonstanten.



**Tabelle 3.1:** Mittelwerte und Streuung (Standardabweichung der Einzelmessung) der Zeitkonstanten und Amplitudenfaktoren in Fits der TCR nach Gl. 3.1.

	Fit 2. Ordnung	Fit 3. Ordnung	Fit 4. Ordnung
Zahl der Fits	298	105	17
$A_1 / \mu\text{M}$	$-0,85 \pm 1,05$	$-2,37 \pm 1,36$	$-0,72 \pm 0,72$
$A_2 / \mu\text{M}$	$0,85 \pm 0,81$	$1,84 \pm 1,23$	$0,86 \pm 0,74$
$A_3 / \mu\text{M}$	-	$0,45 \pm 0,69$	$-0,81 \pm 0,47$
$A_4 / \mu\text{M}$	-	-	$0,62 \pm 0,42$
$\tau_1 / \text{s}$	$0,86 \pm 1,47$	$0,68 \pm 0,21$	$0,78 \pm 0,64$
$\tau_2 / \text{s}$	$6,93 \pm 8,54$	$2,10 \pm 1,31$	$3,39 \pm 1,87$
$\tau_3 / \text{s}$	-	$12,63 \pm 8,17$	$9,95 \pm 6,17$
$\tau_4 / \text{s}$	-	-	$43,8 \pm 59,9$

Wie Tabelle 3.1 zeigt, ist die Zeitkonstante  $\tau_1$  offenbar allen Fits gemeinsam. Weiter sind die Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  für die Fits dritter und vierter Ordnung gleich. Die zweite Zeitkonstante im Fit zweiter Ordnung liegt ziemlich genau zwischen den Werten von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  für den Fit dritter Ordnung. Wahrscheinlich laufen immer beide Prozesse ab, können aber meistens nicht aufgelöst werden, so daß dann eine Zeitkonstante ausreicht, um beide Prozesse zu beschreiben. Im Fit vierter Ordnung kommt hingegen ein Prozeß hinzu, der sich in den Fits niedrigerer Ordnung nicht bemerkbar macht, denn die übrigen drei Zeitkonstanten sind die gleichen wie im Fit dritter Ordnung.

Im Hinblick auf die Konstruktion eines Modells im 4. Kapitel soll überprüft werden, ob die Antworten des Fits mit zwei Zeitkonstanten als Antwort eines Systems mit zwei in Serie geschalteten Reaktionen betrachtet werden können.

Die Übertragungsfunktion  $H(p)$  und damit auch die Impulsantwort eines System mit zwei Reaktionen in Serie ist

$$H(p) = \frac{H_0}{\left(p + \frac{1}{\tau_1}\right) \left(p + \frac{1}{\tau_2}\right)} \quad (3.2)$$

mit der für den konkreten Fall noch zu bestimmenden Konstanten  $H_0$  und der komplexen Variablen  $p$ . Wenn aus Gl. 3.2 die Summendarstellung wie in Gl. 3.1 durch Laplace-Rücktransformation gewonnen werden soll, muß das Produkt über eine Partialbruchzerlegung in eine Summe verwandelt werden:

$$H(p) = \frac{A_1}{\left(p + \frac{1}{\tau_1}\right)} + \frac{A_2}{\left(p + \frac{1}{\tau_2}\right)}. \quad (3.3)$$

Wenn Gleichung 3.1 und Gleichung 3.2 äquivalent sein sollen, muß  $A_1 = -A_2$  gelten, damit der  $p$ -Term im Zähler verschwindet, wenn Gl. 3.3 auf den Hauptnenner gebracht wird.

Tabelle 3.1 zeigt, daß die Bedingung erfüllt ist, denn  $A_1$  und  $A_2$  in Gl. 3.3 sind aufgrund der Korrespondenz zwischen der Laplacetransformierten der einzelnen Summanden der Exponentialfunktion und des entsprechenden Summanden in der Übertragungsfunktion gleich den  $A_1$  und  $A_2$  in Gl. 3.1:

$$L\{A_i \exp(-t/\tau_i)\} = \frac{A_i}{\left(p + \frac{1}{\tau_i}\right)} \quad (3.4)$$

Daß im vorliegenden Fall die Bedingung  $A_1 = -A_2$  für ein Serienmodell erfüllt ist, erkennt man natürlich nicht erst aus der Betrachtung der Koeffizienten in Tabelle 3.1, sondern bereits

daran, daß die Antwort zum Zeitpunkt  $t_0$  bei  $A_0$  beginnt (Abb. 3.2). Der gegenüber dem Einsetzen des Pulses verspätete Anstieg ( $t_0 > 0$ ) ist eine Folge davon, daß das  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Signal sich nur mit endlicher Geschwindigkeit von der Kathode aus zum Meßfenster bewegt (siehe dazu Abschnitt 3.2.4) und der Bedingung, daß erst ein Zwischenspeicher aufgeladen werden muß, bevor der Ausgang sich ändert (siehe dazu Abschnitt 3.5.3 und Kapitel 4). Insofern ist obige Untersuchung für die Fits 2. Ordnung recht trivial. Die Frage ist nun, ob im Falle höherer Ordnung Serien- oder Parallelreaktionen vorliegen.

Der Vollständigkeit halber wird hier noch der Wert der Konstanten  $H_0$  für den Fall des Fits mit zwei Zeitkonstanten angegeben:

$$H_0 = \frac{A_1}{\tau_2} + \frac{A_2}{\tau_1}$$

Für den Fit vierter Ordnung erkennt man in Tabelle 3.1, daß offenbar  $A_2 = -A_3$  ist. Dagegen sind die Beträge (hier mit der Standardabweichung des Mittelwerts angegeben) von  $A_1$  und  $A_4$  mit  $(-0,72 \pm 0,17) \mu\text{M}$  bzw.  $(0,62 \pm 0,10) \mu\text{M}$  durchaus verschieden. Wegen der relativ kleinen Anzahl von Fits (17), über die für den Fit vierter Ordnung bei gleichzeitiger großer Streuung der Einzelwerte (vgl. Tabelle 3.1) gemittelt wurde, und der daraus resultierenden Unsicherheit der Mittelwerte kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß  $A_1 = -A_4$  ist.

Um zu untersuchen, ob die vier Zeitkonstanten Prozesse beschreiben, die alle vier in Serie stattfinden oder die parallel ablaufen, ist wieder die Untersuchung der Übertragungsfunktion  $H(p)$  nötig. Analog zu Gl. 3.2 ist die Übertragungsfunktion eines Systems mit vier Reaktionen in Serie

$$H(p) = \frac{H_0}{\left(p + \frac{1}{\tau_1}\right) \left(p + \frac{1}{\tau_2}\right) \left(p + \frac{1}{\tau_3}\right) \left(p + \frac{1}{\tau_4}\right)}. \quad (3.5)$$

Wieder muß das Produkt über eine Partialbruchzerlegung in eine Summe verwandelt werden, um daraus durch Laplace-Rücktransformation die Summendarstellung wie in Gl. 3.1 zu gewinnen:

$$H(p) = \frac{A_1}{\left(p + \frac{1}{\tau_1}\right)} + \frac{A_2}{\left(p + \frac{1}{\tau_2}\right)} + \frac{A_3}{\left(p + \frac{1}{\tau_3}\right)} + \frac{A_4}{\left(p + \frac{1}{\tau_4}\right)}. \quad (3.6)$$

Bringt man Gl. 3.6 auf ihren Hauptnenner, so erscheinen im Zähler Terme mit  $p^3$ ,  $p^2$  und  $p$ . Die Koeffizienten dieser Terme müssen verschwinden, wenn 3.5 und 3.6 äquivalent sein sollen. Im Einzelnen (berechnet mit den Werten aus Tabelle 3.1):

Der Koeffizient für  $p^3$  ist  $A_1 + A_2 + A_3 + A_4 = 0,05 \mu\text{M}$ ,

der Koeffizient für  $p^2$  ist

$$A_1 \left( \frac{1}{\tau_2} + \frac{1}{\tau_3} + \frac{1}{\tau_4} \right) + A_2 \left( \frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_3} + \frac{1}{\tau_4} \right) + A_3 \left( \frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} + \frac{1}{\tau_4} \right) + A_4 \left( \frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} + \frac{1}{\tau_3} \right) = 0,65 \mu\text{M} / \text{s} ,$$

und der Koeffizient für  $p$  schließlich ist

$$\frac{A_1}{\tau_2 \tau_3} + \frac{A_1}{\tau_2 \tau_4} + \frac{A_1}{\tau_3 \tau_4} + \frac{A_2}{\tau_1 \tau_3} + \frac{A_2}{\tau_1 \tau_4} + \frac{A_2}{\tau_3 \tau_4} + \frac{A_3}{\tau_1 \tau_2} + \frac{A_3}{\tau_1 \tau_4} + \frac{A_3}{\tau_2 \tau_4} + \frac{A_4}{\tau_1 \tau_2} + \frac{A_4}{\tau_1 \tau_3} + \frac{A_4}{\tau_2 \tau_3} =$$

0,1  $\mu\text{M} / \text{s}$ .

Da der Koeffizient von  $p^2$  signifikant von 0 verschieden ist, können die Gln. 3.5 und 3.6 nicht äquivalent sein. Die vier Prozesse laufen also nicht alle in Serie, sondern zumindest teilweise parallel ab.

Mit  $A_1 = -A_4$  und  $A_2 = -A_3$  ist Gl. 3.6 äquivalent zur Übertragungsfunktion

$$H(p) = \frac{H_{01}}{\left( p + \frac{1}{\tau_1} \right) \left( p + \frac{1}{\tau_4} \right)} + \frac{H_{02}}{\left( p + \frac{1}{\tau_2} \right) \left( p + \frac{1}{\tau_3} \right)} \quad (3.7)$$

mit den Konstanten  $H_{01} = \frac{A_1}{\tau_4} + \frac{A_4}{\tau_1}$  und  $H_{02} = \frac{A_2}{\tau_3} + \frac{A_3}{\tau_2}$ .

Auch bei den mit einem Fit dritter Ordnung angenäherten Zeitreihen liegen parallele Prozesse vor, denn die Übertragungsfunktion für serielle Prozesse

$$H(p) = \frac{H_0}{\left( p + \frac{1}{\tau_1} \right) \left( p + \frac{1}{\tau_2} \right) \left( p + \frac{1}{\tau_3} \right)} \quad (3.8)$$

ist nicht äquivalent zur Partialbruchzerlegung

$$H(p) = \frac{A_1}{\left( p + \frac{1}{\tau_1} \right)} + \frac{A_2}{\left( p + \frac{1}{\tau_2} \right)} + \frac{A_3}{\left( p + \frac{1}{\tau_3} \right)}. \quad (3.9)$$

Bringt man nämlich Gl. 3.9 auf ihren Hauptnenner, so erhält man wieder  $p$ - und  $p^2$ -Terme, deren Koeffizienten bei Äquivalenz der Gln. 3.8 und 3.9 verschwinden müssen.

Der Koeffizient des  $p$ -Terms

$$\frac{A_1}{\tau_2} + \frac{A_1}{\tau_3} + \frac{A_2}{\tau_1} + \frac{A_2}{\tau_3} + \frac{A_3}{\tau_1} + \frac{A_3}{\tau_2} = 2,1 \text{ ist jedoch signifikant von null verschieden.}$$

Statt dessen führt der Ansatz

$$H(p) = \frac{H_{01}}{\left(p + \frac{1}{\tau_1}\right)\left(p + \frac{1}{\tau_2}\right)} + \frac{H_{02}}{\left(p + \frac{1}{\tau_1}\right)\left(p + \frac{1}{\tau_3}\right)} \quad (3.10)$$

für die Übertragungsfunktion mit zwei parallelen Prozessen zum Erfolg, wobei die Zeitkonstante  $\tau_1$  beiden Prozessen gemeinsam ist.

Die Partialbruchzerlegung Gl. 3.9 kann nämlich mit  $A_1 = A_{12} + A_{13}$  nach

$$H(p) = \frac{A_{12}}{\left(p + \frac{1}{\tau_1}\right)} + \frac{A_2}{\left(p + \frac{1}{\tau_2}\right)} + \frac{A_{13}}{\left(p + \frac{1}{\tau_1}\right)} + \frac{A_3}{\left(p + \frac{1}{\tau_3}\right)} \quad (3.11)$$

umgeformt werden. Bringt man die beiden linken und die beiden rechten Terme auf der rechten Seite von Gl. 3.11 jeweils auf einen gemeinsamen Nenner, so erhält man wieder  $p$ -Terme, deren Koeffizienten  $A_{12} + A_2$  und  $A_{13} + A_3$  verschwinden müssen, damit die Gln. 3.10 und 3.11 äquivalent sind.

Da  $A_2$  und  $A_3$  beide positiv sind (Tabelle 3.1), müssen  $A_{12} = -A_2$  und  $A_{13} = -A_3$  beide negativ sein. Da  $A_{12}$  und  $A_{13}$  nicht näher bestimmt sind, genügt es wenn die Summe  $A_{12} + A_{13} + A_2 + A_3 = A_1 + A_2 + A_3$  verschwindet. Mit den Werten aus Tabelle 3.1 ergibt sich diese Summe zu  $-0,08 \mu\text{M}$ , was in Anbetracht der Standardabweichungen der Mittelwerte der drei Amplituden ( $A_1 = -2,37 \pm 0,13 \mu\text{M}$ ;  $A_2 = 1,84 \pm 0,12 \mu\text{M}$ ;  $A_3 = 0,45 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ) nicht signifikant von null verschieden ist.

Die obige Koeffizientenbetrachtung führt auf folgende Aussage über die Struktur der Antworten, die mit 4 Zeitkonstanten genähert werden mußten: Es liegen zwei Parallelwege vor, die mit je zwei Zeitkonstanten je einen *TRC* beschreiben.

Auch die Antworten, die mit drei Zeitkonstanten gefittet werden mußten, weisen offenbar zwei Parallelwege auf, wobei die Zeitkonstante, welche den Anstieg beschreibt, beiden Prozessen gemein ist.

Für die Interpretation von zwei Parallelwegen bei Antworten mit drei Zeitkonstanten spricht auch, daß an einer Zelle zwei Klassen von *TRC* gefunden wurden: Erstens relativ niedrige ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = (0,6 \pm 0,3) \mu\text{M}$ ), die sich sehr gut mit einem Fit zweiter Ordnung beschreiben lassen und zweitens *TRC* mit relativ großer Amplitude ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = (1,0 \pm 0,3) \mu\text{M}$ ), welche sich erst durch Fits dritter Ordnung angemessen beschreiben lassen.

Im zweiten Fall überlagern sich offenbar zwei Ereignisse, die synchron auftreten. Möglicherweise handelt es sich dabei um die Entleerung benachbarter Calciumspeicher, von denen in einigen Fällen nicht alle entleert werden.

Die Interpretation von zwei parallelen Ereignissen spiegelt sich auch in der Kinetik von  $Cl^-$ -Permeabilitätsänderungen im Verlauf eines APs wieder. Auch dabei sind deutlich zwei aufeinanderfolgende  $Cl^-$ -Peaks zu sehen (White et al. 1999). Wenn man annimmt, daß die Aktivierung der  $Cl^-$ -Kanäle die Folge des  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  Anstiegs ist, dann ist diese Beobachtung ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit der obigen Interpretation.

Offen bleibt, ob es sich in den beobachteten Fällen von TRC mit mehr als zwei Zeitkonstanten um Ausnahmen handelt oder ob sie bei den übrigen Messungen wegen eines zu schlechten SNR nicht aufgelöst werden konnten. Letzteres ist vermutlich bei den Messungen mit drei Zeitkonstanten der Fall, denn diese konnten regelmäßig bei Aufnahmen mit gutem SNR beobachtet werden. Hingegen scheint es sich wegen der sehr geringen Zahl von Beobachtungen bei den Aufnahmen mit vier Zeitkonstanten um einen Prozeß zu handeln, der nicht immer auftritt.

Bei der Interpretation der Zeitkonstanten ist weiter zu beachten, daß diese gegenüber dem farbstofffreien System verfälscht sein können, denn der Farbstoff ist ein exogener  $Ca^{2+}$ -Puffer, der mit den endogenen Puffern konkurriert (Takahashi et al., 1999). Je höher die Farbstoffkonzentration ist, desto langsamer erfolgt die scheinbare Rückkehr der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  auf den Ausgangswert (Neher und Augustine 1992), da der an den Farbstoff gebundene Teil des  $Ca^{2+}$  nicht wirklich frei ist, sondern an einen  $Ca^{2+}$ -Puffer mit hoher  $Ca^{2+}$ -Affinität gebunden ist. Zwar wird die Kapazität der endogenen Puffer als sehr hoch angenommen (Trewavas und Gilroy 1991). Neher und Augustine (1992) schätzen, daß 98-99% einer in das Cytoplasma gelangenden  $Ca^{2+}$  Menge sofort von den endogenen Puffern gebunden wird. Andererseits haben die endogenen Puffer sowohl von tierischen Zellen (Neher und Augustine 1992) als auch von pflanzliche Zellen (Trewavas und Gilroy 1991) offenbar eine geringe Affinität zu  $Ca^{2+}$ , da sie auch bei  $Ca^{2+}$ -Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und mehr nicht sättigen. Beim Einsatz mit hohen Konzentrationen können deshalb Farbstoffe mit hoher  $Ca^{2+}$ -Affinität so wie Fura 2 als  $Ca^{2+}$ -Chelatoren eingesetzt werden, um absolute  $Ca^{2+}$ -Flüsse zu untersuchen. Da die dabei erforderlichen Farbstoffkonzentration im mM Bereich (0,4 mM Fura 2 bei Augustine und Neher) liegen, hat der Farbstoff in den vorliegenden Experimenten wegen seiner vergleichsweise geringen Konzentration (maximal 2,5  $\mu\text{M}$ ) vermutlich keinen wesentlichen Einfluß auf die Puffereigenschaften des Cytoplasmas. Dennoch sollte man sich der Wirkung des Farbstoffes als exogener  $Ca^{2+}$ -Puffer bei der Interpretation der oben gefundenen Zeitkonstanten bewußt sein, da die Eigenschaften der endogenen Puffer in *Chara* noch unbekannt sind.

### 3.2.2 Abschätzung der minimal ausgeschütteten Calcium Menge

Die Tatsache, daß die Kapazität der endogenen  $Ca^{2+}$ -Puffer unbekannt ist vereitelt auch die Abschätzung der totalen ausgeschütteten  $Ca^{2+}$ -Menge. Möglich ist jedoch die Abschätzung einer unteren Grenze, also einer minimalen  $Ca^{2+}$ -Menge, die ausgeschüttet wird. Wenn durch Gl. 3.1 die Entleerung des Calciumspeichers beschrieben wird, ist im Fit 2. Ordnung mit  $A_1 = -A_2$  die Amplitude  $A_2$  ein Maß für  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  Änderung, die erreicht würde, wenn die Prozesse, welche wieder zur Abnahme der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  führen, nicht abliefen, wenn also  $\tau_2$  unendlich groß wäre.

Da das Fluoreszenzsignal über das Meßfenster gemittelt wird, entspricht das Produkt aus  $A_2$  und dem Volumen, aus dem das Meßsignal stammt, der absoluten Änderung der freien  $Ca^{2+}$ -Menge in diesem Volumen. - also auch der mindestens ausgeschütteten  $Ca^{2+}$ -Menge.

Für ein typisches Meßfenster von  $(1330 \pm 70) \mu\text{m}^2$  und einer angenommenen Dicke des Cytoplasmas von  $15 \mu\text{m}$  (Plieth 1995) ergibt sich so ein Meßvolumen von rund  $(20.000 \pm 3.500) \mu\text{m}^3 = (2 \pm 0,35) \cdot 10^{-12} \text{ l}$ , wenn man annimmt, daß der Fehler bei der Abschätzung der Plasmadicke  $2,5 \mu\text{m}$  beträgt.

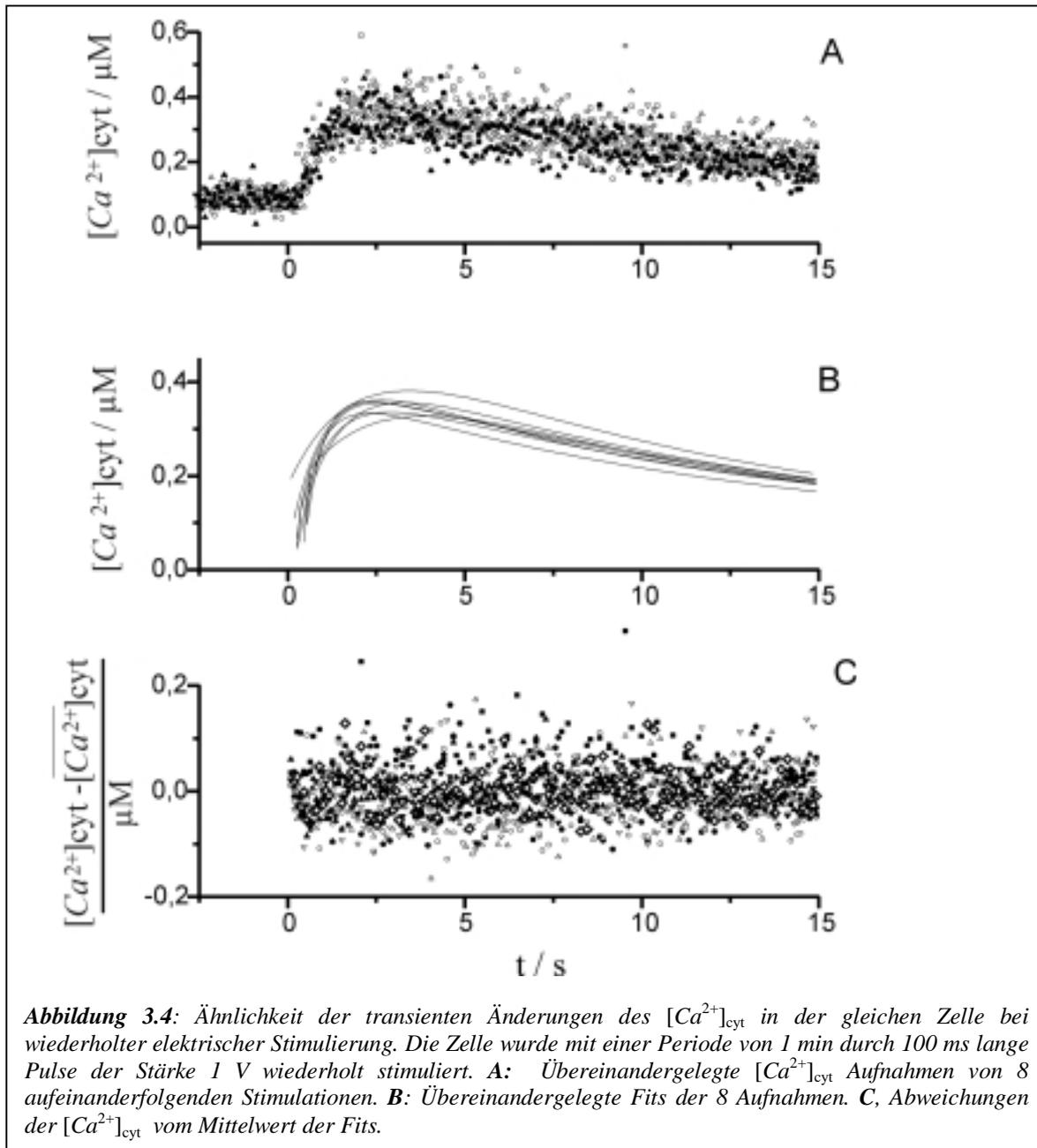
Mit der aus 298 Messungen gemittelten Amplitude  $A_2 = (0,85 \pm 0,05) \mu\text{M}$  ergibt sich das Produkt aus Volumen und  $A_2$  dann zu  $(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-17} \text{ g}$ , was einer Menge von ca.  $2,5 \cdot 10^5$   $Ca^{2+}$ -Ionen entspricht.

Da aber möglicherweise nur 1% einer in das Cytoplasma gelangenden  $Ca^{2+}$ -Menge frei bleibt und nicht sofort weggepuffert wird, gibt dieser Wert nur die  $Ca^{2+}$ -Menge an, die ausgeschüttet werden muß, um das gemessene Fluoreszenzsignal zu erzeugen, wenn der Farbstoff der dominierende  $Ca^{2+}$ -Puffer ist. Da das wahrscheinlich nicht der Fall ist, darf angenommen werden, daß ist die tatsächlich ausgeschüttete  $Ca^{2+}$ -Menge viel größer ist, möglicherweise um bis zu 2 Größenordnungen.

### 3.2.3 Reproduzierbarkeit der transienten $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ Änderung bei Membranerregung

Um die Variabilität der elektrisch ausgelösten TRC zu untersuchen, wurde eine *Chara* Zelle wiederholt in regelmäßigen Abständen (60 s) mit gleichstarken Pulsen (1V) stimuliert und die  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  an ein und demselben Meßort aufgenommen. In Abb. 3.4 sind die Zeitreihen von 8 aufeinander folgenden Experimenten mit Stimuli von jeweils gleicher Stärke und Dauer übereinander gelegt. Man erkennt, daß identische Stimuli an ein und derselben Zelle TRC mit sehr ähnlichen Kinetiken und Amplituden hervorrufen. In Abb. 3.4 C sind die Abweichungen der Einzelmessungen vom Mittelwert aller acht Fits aufgetragen. Diese Abweichungen sind offenkundig recht groß. Der Mittelwert der Abweichungen ist aber null und die Größe der

Abweichungen unabhängig von der Signalhöhe. Das heißt, daß die Abweichungen nur das Rauschen des Fluoreszenzsignals widerspiegeln.

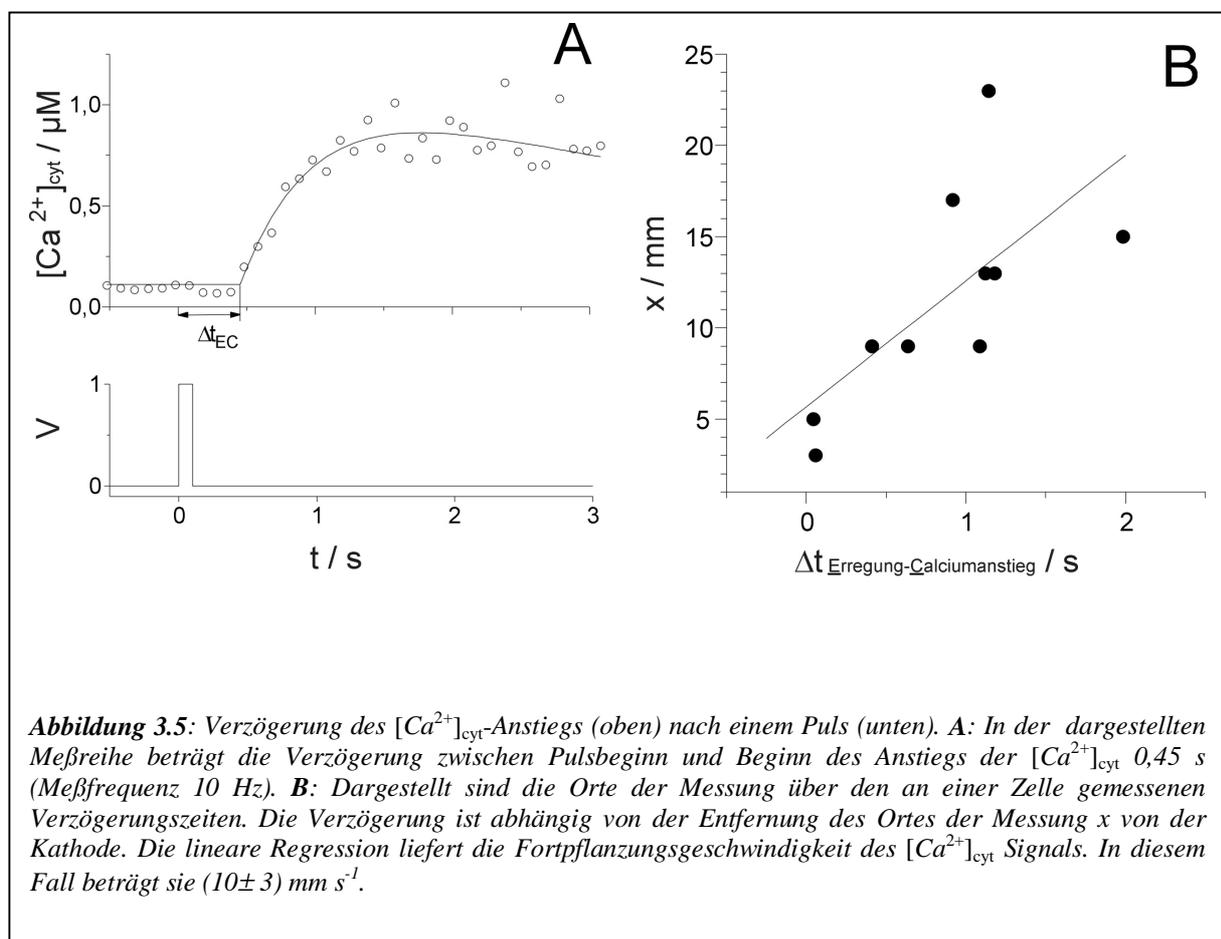


Dieses Ergebnis wurde in Experimenten mit fünf anderen Zellen bestätigt, wobei die Abstände zwischen den einzelnen Stimuli in den übrigen Fällen ebenfalls regelmäßig, jedoch bis zu 5 min lang waren.

### 3.2.4 Verzögerung der Calcium Antwort nach einem Stimulus

In den meisten Experimenten startete der *TRC* innerhalb von 300 ms nach Einsetzen des Pulses, d.h. bereits einer der ersten drei Meßpunkte nach Beginn des Stimulus zeigte eine erhöhte  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  (vgl. Abb. 3.1).

Vielfach konnte jedoch eine längere Verzögerung zwischen Beginn des Pulses und Beginn des *TRC* beobachtet werden, in Einzelfällen war die Verzögerung bis zu 2 s lang. Bei 73 *TRC*, die an 6 verschiedenen Zellen mit jeweils gleichstarken Pulsen (1 V, 100 ms) ausgelöst wurden, betrug sie im Mittel  $(0,38 \pm 0,39)$  s. In Abb. 3.5 A ist beispielhaft eine Messung



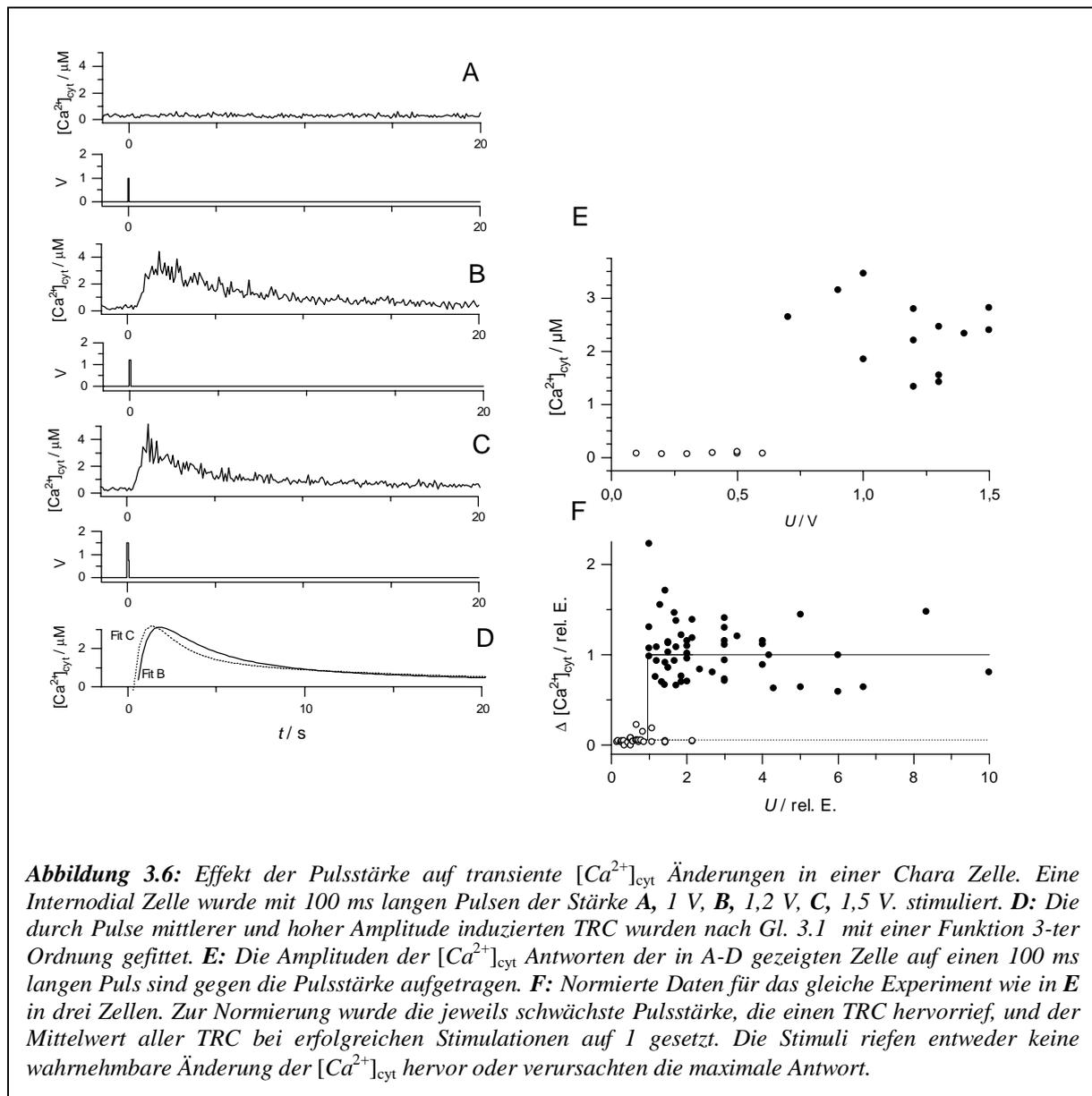
gezeigt, bei der diese Verzögerung 0,45 s betrug. Wie Abb. 3.5 B zeigt, ist die mittlere Dauer der Verzögerung mit der Entfernung des Ortes der Messung von der Kathode korreliert. Die aus 6 Zellen gemittelte Verzögerung ergibt sich zu  $0,1 \text{ s mm}^{-1}$ . Interpretiert man den Kehrwert als Geschwindigkeit, mit der sich das  $Ca^{2+}$ -Signal in der Zelle fortpflanzt, erhält man den Wert von  $(10 \pm 9) \text{ mm s}^{-1}$ . Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem von Tabata und

Sibaoka (1987) gefundenen Wert von  $(15 \pm 9) \text{ mm s}^{-1}$  für die Fortpflanzungsgeschwindigkeit des elektrischen Signals von Aktionspotentialen in *Chara*.

### 3.2.5 Die Stimulierung der TRC gehorcht einem Alles-oder-Nichts Prinzip

Um das Verhältnis von Stärke des Stimulus und der hervorgerufenen Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  zu bestimmen, untersuchte ich die Amplitude der TRC in Abhängigkeit von der Pulsstärke. Abb. 3.6 zeigt exemplarisch drei  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  Messungen, die einem elektrischen Stimulus (100 ms Pulsdauer) mit geringer (A), mittlerer (B) und großer (C) Stärke folgen.

Aus den Daten geht hervor, daß kleine Pulse (ab jetzt unter-schwellige Pulse genannt) keine nachweisbare Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  hervorriefen, was auch durch eine Rauschanalyse (siehe

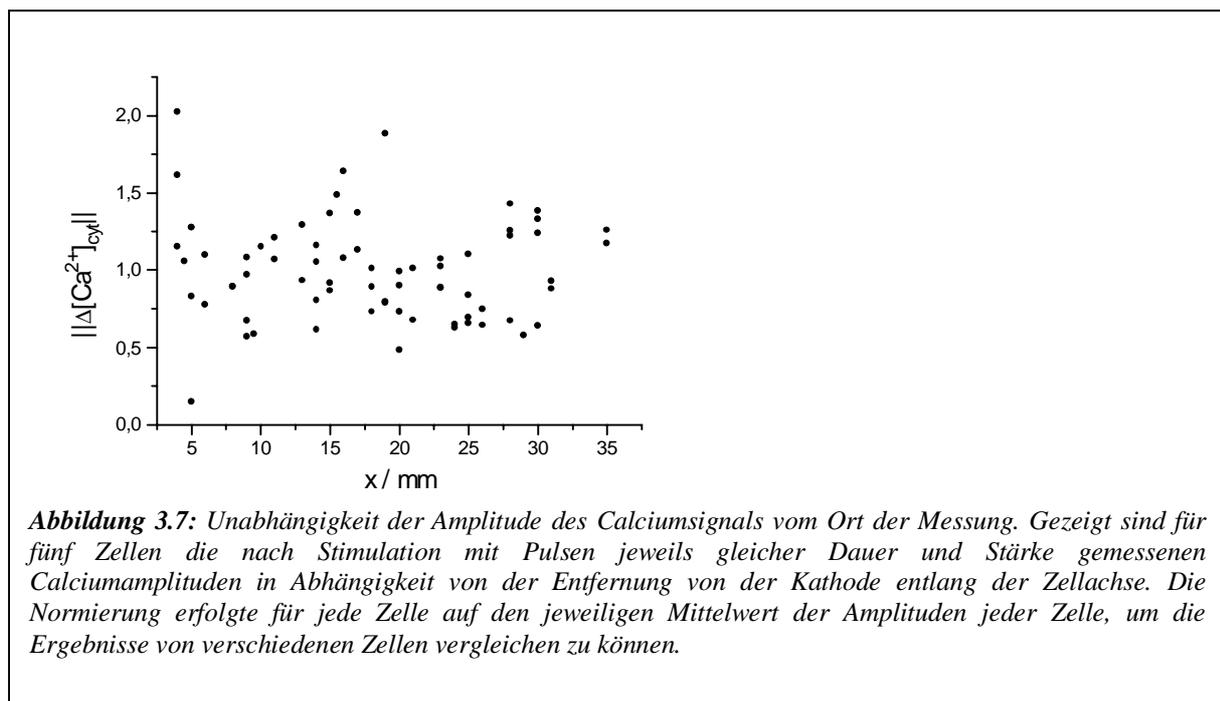


Abschnitt 3.5.1) bestätigt wurde. Eine Vergrößerung der Pulsamplitude (hier um den Faktor 1,2) verursachte einen typischen *TRC*. Eine noch weitere Vergrößerung der Amplitude (hier um einen Faktor 1,25) rief einen *TRC* mit ungefähr der gleichen Höhe wie nach dem mittelstarken Puls hervor.

In Abb. 3.6 E ist für eine Zelle die maximale Amplitude der *TRC* gegen die Pulsstärke aufgetragen. Die Abbildung zeigt, daß für die Pulsstärke ein enger Schwellenwert existiert. Von Pulsen unterhalb dieses Schwellenwerts bleibt die  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  unbeeinflusst, wie auch eine Rauschanalyse (siehe Abschnitt 3.5.1) bestätigt. Jenseits des Schwellenwertes erreicht die  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  stets einen etwa gleich hohen Maximalwert, eine weitere Erhöhung der Pulsamplitude führt im Mittel nicht zu einer entsprechenden Verstärkung des *TRC*. Alle untersuchten Zellen zeigten ein solches Schwellenverhalten. Für drei wurde es genau quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.6 F zusammengefaßt.

Besonders auffällig sind diejenigen Punkte, welche überschwelligen Pulsen, die keine *TRC* hervorriefen, zugeordnet sind. Diese zeigen, daß, wenn aus welchen Gründen auch immer ein überschwelliger Puls nicht den erwarteten *TRC* hervorruft, nicht nur eine schwächere, sondern eben gar keine Calciumantwort erfolgt.

Abb. 3.7 zeigt die maximalen Amplituden der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Änderungen, die durch Pulse gleicher Dauer und Stärke ausgelöst wurden, in Abhängigkeit vom Ort der Messung innerhalb der Zelle. Die Änderung des Meßortes fand dabei entlang der Zellachse statt, so daß jeweils in unterschiedlichem Abstand von der Kathode gemessen wurde. Um die Ergebnisse von

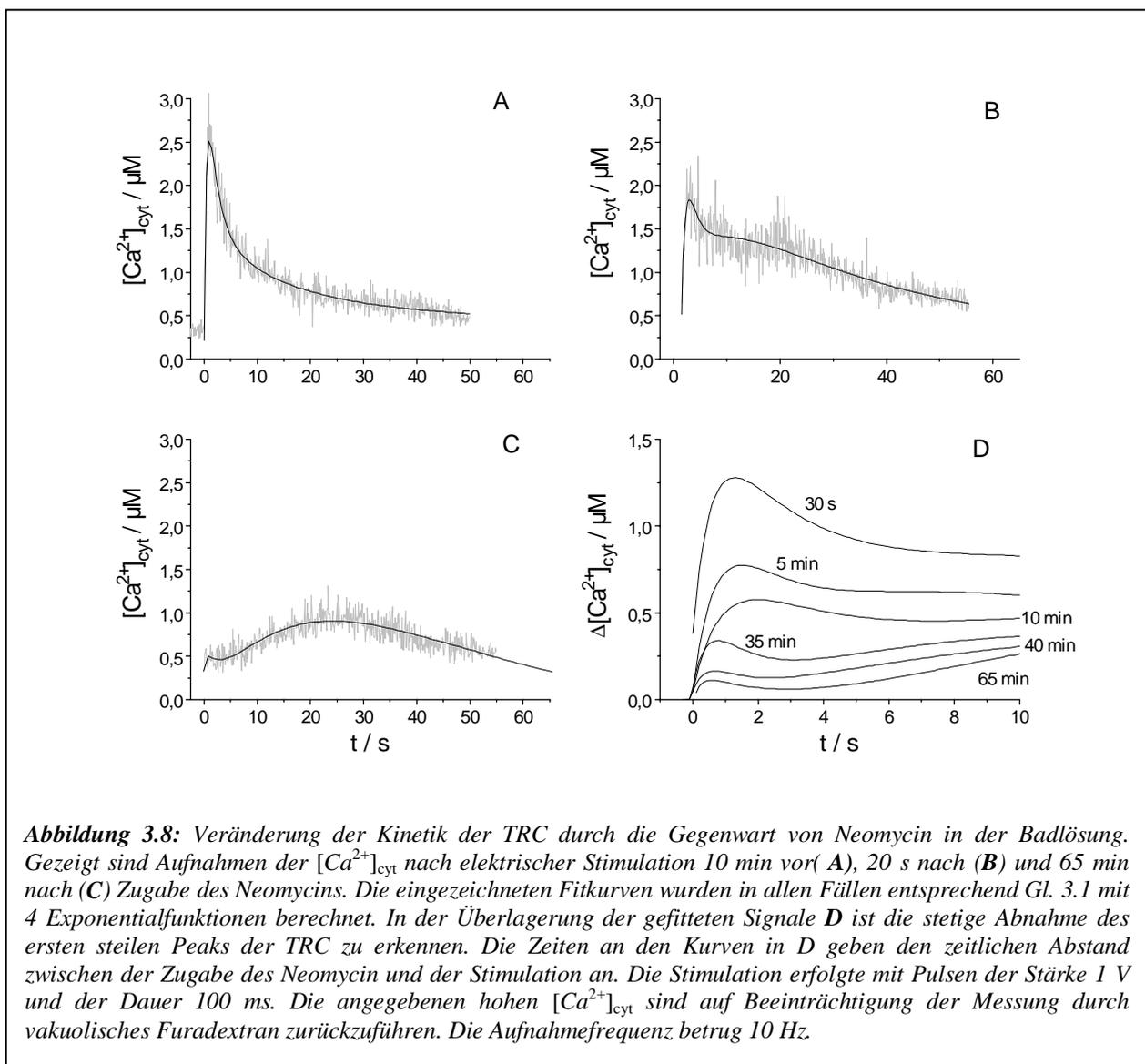


verschiedenen Zellen (mit unterschiedlichen mittleren  $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse zur Darstellung in Abb. 3.7 für jede Zelle auf den Mittelwert der in der jeweiligen Zelle gemessenen  $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  normiert.

Offenbar ist die maximale Änderung der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  überall in der Zelle gleich. Diese Ergebnisse zeigen, daß die TRC in der gesamten Zelle einem Alles-oder-Nichts Prinzip unterliegen.

### 3.2.6 Inhibition der TRC durch Neomycin

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die biochemischen Aspekte der zum TRC führenden Signalkette nur am Rande untersucht. In einem Versuch wurde jedoch die Inhibition der TRC unter dem Einfluß von Neomycin in der Badlösung beobachtet. Die Konzentration des Neomycins (eines Inhibitors für das Enzym Phospholipase C, Brown et al. 1992, Epstein et al. 1985) betrug dabei 200  $\mu\text{M}$ . Das Ergebnis ist in Abb. 3.8 gezeigt.



Die Abbildung zeigt drei Aufnahmen von *TRC*, die 10 min vor (A), 20 s nach (B) und 65 min nach (C) der Zugabe von Neomycin in die Badlösung durch identische Pulse stimuliert wurden. Man erkennt bereits kurz nach der Zugabe des Inhibitors eine deutliche Abnahme der Amplituden der *TRC*. Besonders der steile Peak verschwindet zunehmend, wie Abb. 3.8 D zeigt, während der hintere Teil der *TRC* relativ unverändert bleibt. Auch dieses Ergebnis spricht für zwei Ereignisse im Laufe eines *TRC*, von denen offenbar besonders das erste durch Neomycin inhibiert wird.

Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Voraussage von Biskup et al. (1999), daß Neomycin die *TRC* inhibiert. Andererseits führt der Einsatz des Neomycin nicht zu einer vollständigen Unterbindung der *TRC* sondern vor allem zu einer Veränderung des  $Ca^{2+}$  Signals. Wenn dieses Ergebnis durch weitere Messungen bestätigt würde, ließe sich daraus schließen, daß Neomycin in der Signalkette erst hinter dem Alles-oder-Nichts Schritt wirkt.

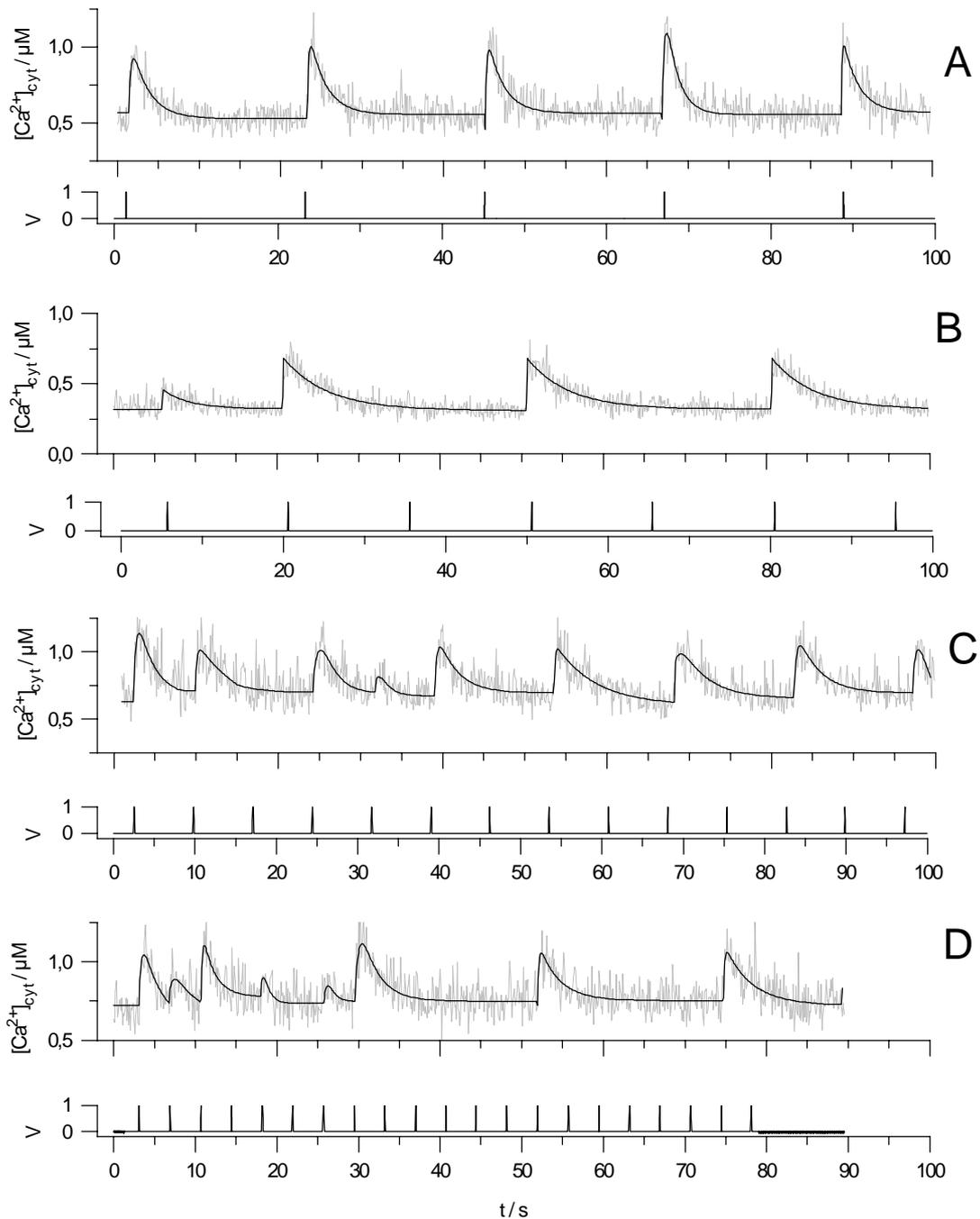
### **3.3 Änderungen der $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ während der Stimulation mit Serienpulsen hoher Frequenz**

Von der elektrischen Erregung von *Chara* ist bekannt, daß es nach erfolgreicher Stimulation eine 6 bis 60 s lange Refraktärzeit gibt, in der die Zelle nicht oder nur unvollständig aufs Neue zu erregen ist (Beilby und Coster, 1979). Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, wie dieses Verhalten mit den beobachtbaren Änderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  in Zusammenhang steht.

Erregt man eine Zelle in regelmäßigen, eine oder mehrere Minuten langen Abständen, so ist die Calciumantwort wie geschildert sehr regelmäßig (Abb. 3.9 A). Verkürzt man die Periode T der Pulswiederholung, so verliert die Calciumantwort ihre Regelmäßigkeit. Man kann zwei verschiedene Effekte beobachten, die sich vielfach überlagern (Abb. 3.9 B-D):

Es treten bei konstanter Periode *TRC* mit unterschiedlichen, z.T. sehr kleinen Amplituden auf.

Nicht mehr jeder Stimulus ruft einen *TRC* hervor. Statt dessen tritt vielfach eine sehr regelmäßige Periodenvervielfachung zwischen Stimulus und  $Ca^{2+}$ -Antwort auf. So löst bei den in den Abb. 3.9 B und C gezeigten Aufnahmen mit einer Pulsperiode von 20 s bzw. 10 s nahezu regelmäßig jeder zweite Stimulus ein *TRC* aus, am Ende der Zeitreihe in Abb 3.9 D jeder siebte bei einer Pulsperiode von 5 s. An einer anderen Zelle, bei der bei einer Pulsperiode von 60 s jeder Puls ein *TRC* auslöste, antwortete die  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  nach Halbierung der Pulsperiode nur mit doppelter Periode, also wieder 60 s. Bei einer Verkürzung der Pulsperiode auf 20 s löste nur noch jeder vierte Puls ein *TRC* aus.

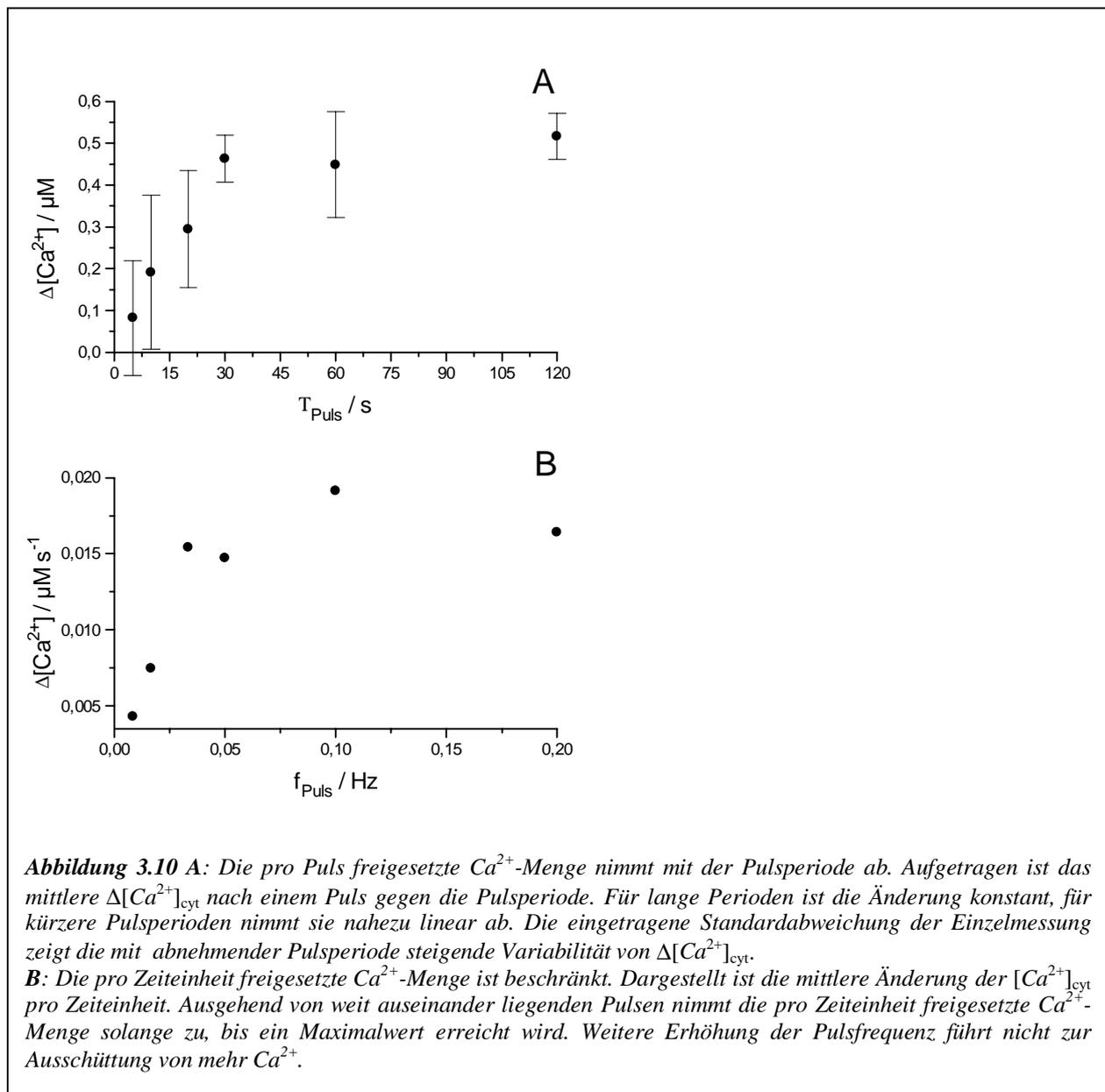


**Abbildung 3.9:** Messung der Calciumantwort auf Serienpulse mit abnehmender Pulsperiode. Dargestellt sind Teile von an einer Zelle gemessenen Zeitreihen mit einer Pulsperiode von 30 s (A) 20 s (B) 10 s (C) und 5 s (D). Mit zunehmender Pulsfrequenz verliert die Calciumantwort an Regelmäßigkeit. Nicht mehr jeder Puls ruft ein TRC hervor, und die auftretenden TRC haben nicht mehr alle die gleiche Höhe. An der gleichen Zelle erfolgte eine weitere Messung mit einer Pulsperiode von 60 s (nicht dargestellt). Bei dieser Pulsperiode antwortete die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  regelmäßig auf jeden Puls. Alle Messungen erfolgten mit einer Meßfrequenz von 10 Hz. Die Diskrepanz zwischen angegebenen und dargestellten Pulsperioden ergibt sich aus der Differenz von Meß- und Echtzeit (siehe im 2. Kapitel, Abschnitt 2.9.3). Die eingezeichnete Fitkurve entstand durch abschnittsweise Fitten mit Exponentialfunktionen zweiter Ordnung nach Gl. 3.1.

Derartige Periodenvervielfachungen erinnern an chaotisches Verhalten. Ob hier wirklich ein chaotisches System dahintersteckt, konnte aufgrund des extrem hohen Bedarfs an Messungen nicht weiter untersucht werden.

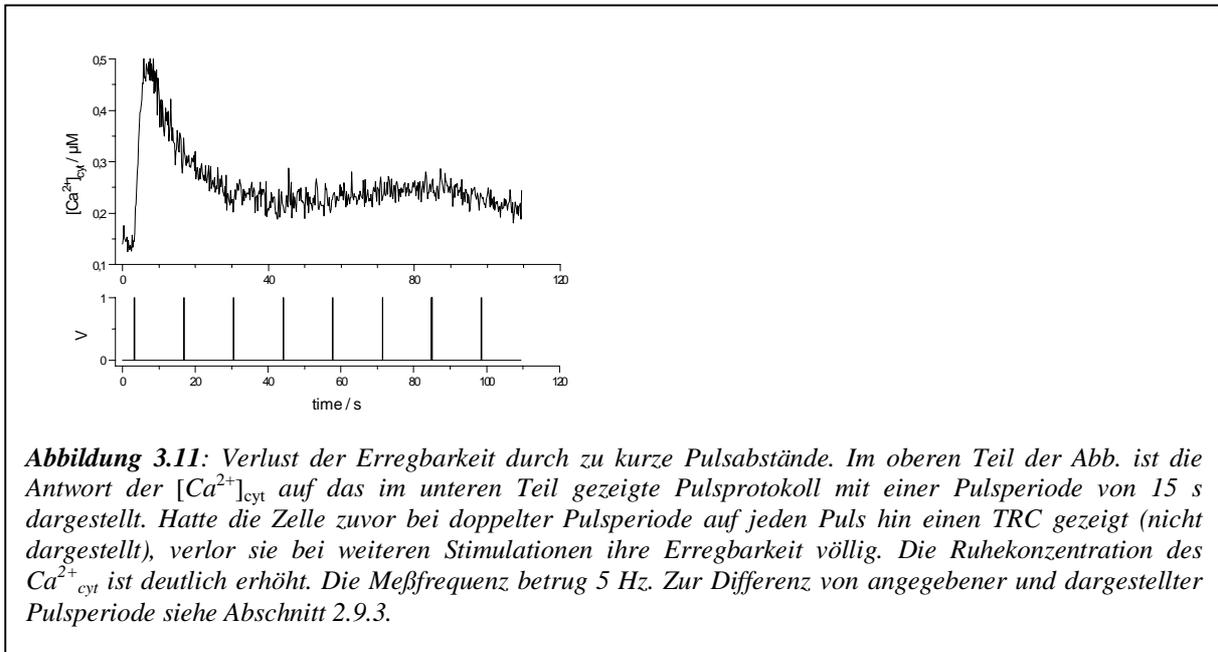
Gemeinsamer Grenzwert beider Effekte (geringere Amplitude und unregelmäßiges Auslösen) ist das vollständige Verschwinden der Calciumantwort. Die Zelle verliert dann für Minuten oder sogar Stunden ihre Erregbarkeit.

Die Ergebnisse einer genaueren Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  Amplituden einer Zelle in Abhängigkeit von  $T$  sind in Abb. 3.10 dargestellt. Jeder Punkt in den beiden Abbildungen repräsentiert den Mittelwert von 8 (Pulsperiode 60 s) bis 29 (Pulsperiode 10 s) Einzelmessungen, darunter auch Meßpunkte ohne Calciumantwort. Für Perioden  $T$  über 30 s Länge ist die mittlere  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  Amplitude relativ konstant, die Standardabweichung relativ klein. Für kürzere Perioden als 30 s nimmt der Mittelwert von  $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  nahezu linear ab,



hingegen nimmt die Standardabweichung erheblich zu (Abb. 3.10 A). Folgende Interpretation liegt nahe: Die Menge des zur Verfügung stehenden Calciums ist begrenzt, und je häufiger die Zelle stimuliert wird, desto weniger kann geliefert werden – die Menge des ausgeschütteten Calciums pro Puls sinkt mit der Periode, wenn die Speicher schneller entleert werden, als sie vollständig nachgefüllt werden können.

Noch deutlicher wird dies, wenn man wie in Abb. 3.10 B  $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  pro Zeiteinheit gegen den



Kehrwert der Periode, die Pulsfrequenz  $f_p$  aufträgt:

Für niedrigere Pulsfrequenzen steigt die pro Zeiteinheit freigesetzte Calciummenge mit steigender Pulsfrequenz (bei konstantem Volumen ist die Konzentrationsänderung auch ein Maß für die ausgeschüttete Menge) – die Ausschüttung erfolgt im zeitlichen Mittel langsamer als das Nachfüllen des Speichers. Jenseits von 0,05 Hz stagniert die pro Zeiteinheit freigesetzte Calciummenge. Bereitstellung und Ausschüttung befinden sich dann im Gleichgewicht.

Eine Versuchsreihe an einer zweiten Zelle ergab das gleiche Verhalten.

Nimmt man an, daß die Änderungen der  $Cl^-$ - und  $K^+$ -Permeabilitäten der Membran im Zuge eines APs durch den TRC verursacht werden, so ist die Ursache für den Verlust der Erregbarkeit auf einen Mangel an Calcium zurückzuführen: Erst wenn genügend  $Ca^{2+}$  bereitsteht, ist die Zelle wieder erregbar.

Daß sich das oben beschriebene Gleichgewicht nicht beliebig aufrechterhalten läßt, zeigten Versuche an zwei weiteren Zellen: Mit zunehmender Pulsfrequenz (und Versuchsdauer) nahm nicht nur das mittlere  $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  nach einem Puls, sondern darüber hinaus auch die pro

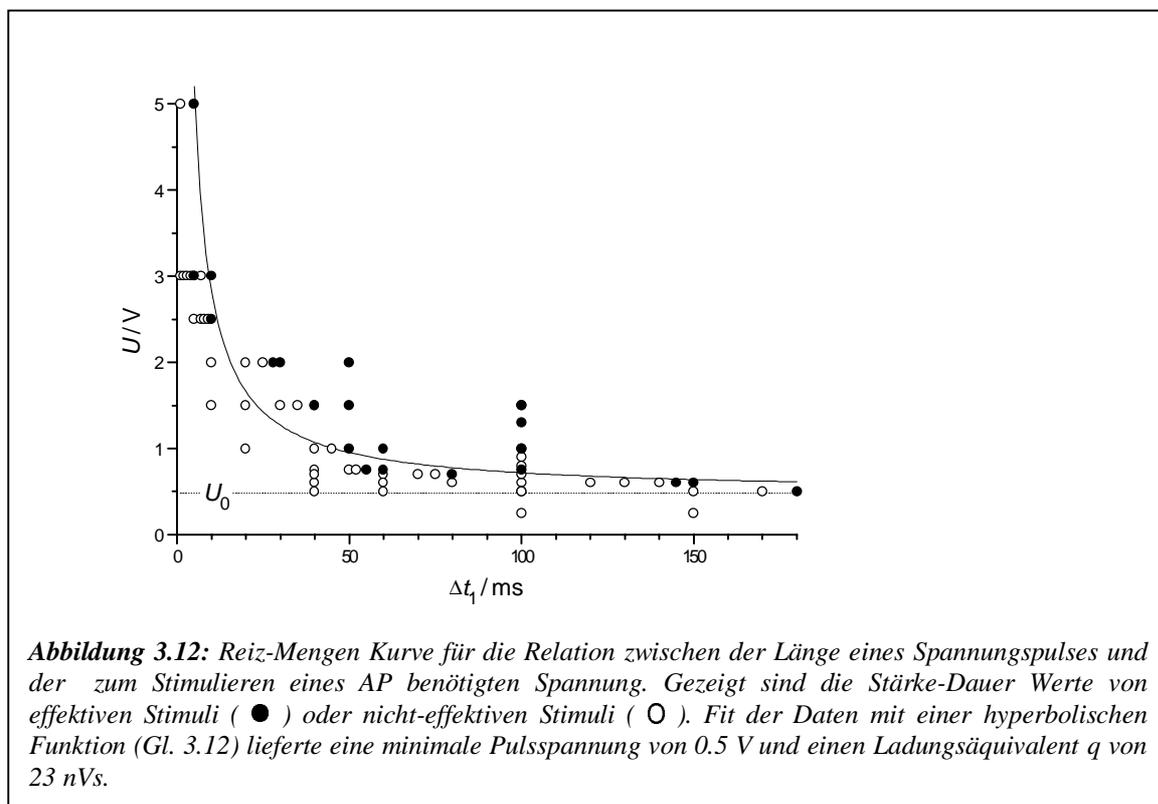
Zeiteinheit freigesetzte  $Ca^{2+}$ -Menge rapide ab. Schließlich wurde gar kein Calcium mehr freigesetzt, die Erregbarkeit der Zelle war verschwunden (Abb 3.11).

An allen Zellen, die mit Serienpulsen hoher Frequenz erregt wurden, konnte während des Versuchs eine Erhöhung des Ruhewertes der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  um bis zu 50% beobachtet werden. Für zwei Zellen, deren Fluoreszenzsignale rein cytosolisch waren und für die allein die Angabe von Absolutwerten also sinnvoll ist, ergibt sich ein Mittelwert von  $(86 \pm 7)$  nM als Ausgangskonzentration und  $(202 \pm 13)$  nM als Ruhekonzentration zu dem Zeitpunkt, als die Zelle nicht mehr erregbar war.

Der Anstieg des Ruhewertes von  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  durch Serienpulse entspricht Beobachtungen, die bei durch Koffein ausgelöste Serienpulsen an *Eremosphaera viridis* gemacht wurden (Bauer et al. 1997). Dort stieg der Ruhewerte der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  von 160 nM auf 250 nM.

### 3.4 Bei der Stimulation von TRC gilt ein Reiz-Menge-Gesetz

Um die Abhängigkeit zwischen Stimulus und Effekt noch genauer zu charakterisieren, wurde ferner neben der Pulsamplitude auch die Pulsdauer verändert. Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abb. 3.12 gezeigt. Für Pulse, die einen TRC hervorriefen (geschlossene Symbole), und Pulse, die zu keinem TRC führten (offene Symbole), ist die Pulsstärke gegen



die Pulsdauer  $\Delta t_1$  aufgetragen. Man erkennt, daß die Bereiche für auslösende bzw. nicht auslösende Pulse deutlich getrennt sind.

Die in der Abb. 3.12 gezeigte Grenzlinie zwischen diesen beiden Bereichen, die den Schwellenwert für den *TRC* darstellt, läßt sich sehr gut mit einer hyperbolischen Funktion beschreiben

$$U = U_0 + \frac{q}{\Delta t}. \quad (3.12)$$

Für die in Abb. 3.12 gezeigten Daten lieferte der Fit eine minimale Pulsspannung  $U_0$  von 0.5 V und einen Wert  $q$  von 23 nVs. Solange die  $Cl^-$ - und  $K^+$ -Kanäle der Zelle nicht im Zug eines AP geöffnet sind (d.h. vor Auslösen des APs), kann die Zellmembran als ohmscher Widerstand betrachtet werden. Die Spannung ruft also einen proportionalen Strom hervor, der eine zu  $q$  proportionale Ladung transportiert. Bei Pulsstärken unterhalb der Minimalspannung  $U_0$  führt selbst ein unendlich langer Puls nicht zu einem *TRC*. Für hohe Spannungen kommt es nur noch auf die transportierte Ladungsmenge an, ob ein *TRC* hervorgerufen wird. Je schneller die Ladung transportiert wird, desto kürzer kann der Puls sein.

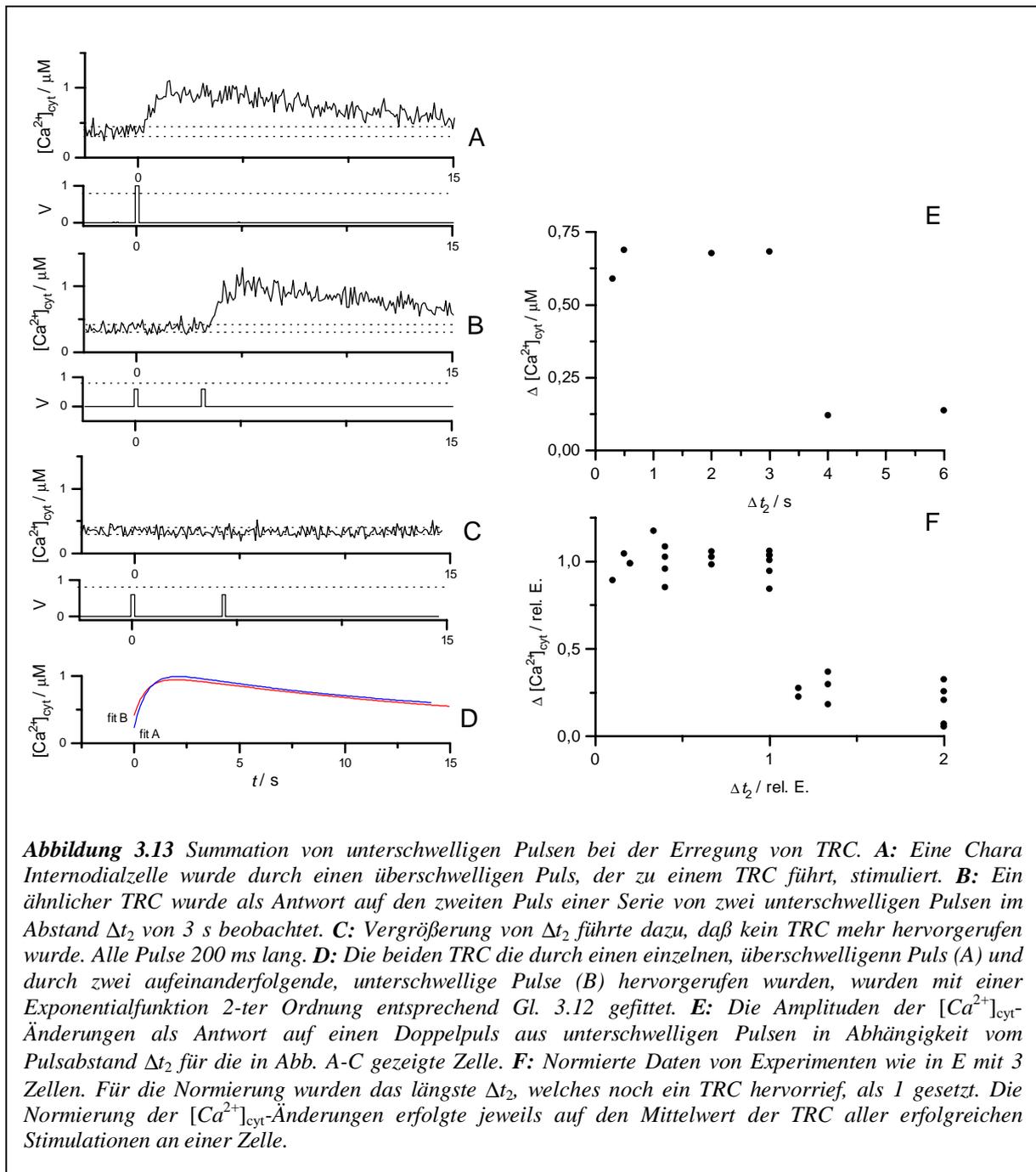
Dieses Reiz-Mengen Gesetz entspricht genau demjenigen, welches den Zusammenhang zwischen elektrischer Erregung der Zellmembran und Aktionspotential beschreibt. (Lühring und Tazawa 1985, Katz 1974)

### **3.5 Stimulation der Zelle mit aufeinanderfolgenden schwachen Pulsen**

In den folgenden Experimenten wurde die Frage untersucht, inwieweit einzelne elektrische Stimuli additiv auf die Auslösung von *TRC* wirken können.

#### **3.5.1 Stimulation mit zwei Pulsen**

Zu Beginn jedes Experiments wurde die Stärke und Dauer einzelner Stimuli so eingestellt, daß diese zwar nahe, jedoch noch unterhalb des Schwellenwertes waren. Abb. 3.13 zeigt repräsentative Aufnahmen von einem Experiment in einer *Chara* Zelle. Dargestellt sind die Antworten der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  auf einen einzelnen oder auf eine Serie von unterschwelligen Pulsen. Die Daten in Abb. 3.13 A und B zeigen, daß kein sichtbarer Effekt von unterschwelligen Pulsen auf die  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  festzustellen ist. Um die Möglichkeit kleiner Änderungen zu untersuchen, wurde das Rauschen im  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  Signal nach unterschwelligen Pulsen analysiert.



In Abb. 3.14 ist die Varianz des Mittelwerts der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  aus 8 Messungen für die Zeit vor, während und nach unterschwelligen Einzelpulsen dargestellt. Das Fehlen von jeglicher signifikanter Änderung in der Varianz (Rauschleistung) in zeitlicher Korrelation mit dem Puls zeigt, daß die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  von unterschwelligen Einzelpulsen nicht verändert wird.

Die Existenz einer Reiz-Mengen Kurve deutet daraufhin, daß sich die Effekte unterschwelliger Pulse addieren können. Dies bestätigt Abb. 3.13 B. Im vorliegenden Fall folgte auf den ersten unterschwelligen Puls nach 3 Sekunden ein zweiter mit gleicher Stärke und Dauer. In diesem Fall löste der zweite Puls einen TRC (Abb. 3.13 B) aus, und dieser TRC

entsprach in Form und Amplitude solchen *TRC*, die mit einzelnen, überschwelligen Pulsen an der gleichen Zelle aufgenommen worden waren. Offenbar können sich aufeinanderfolgende Stimulierungen mit unterschwelligen Pulsen tatsächlich zu einem überschwelligen Stimulus summieren.

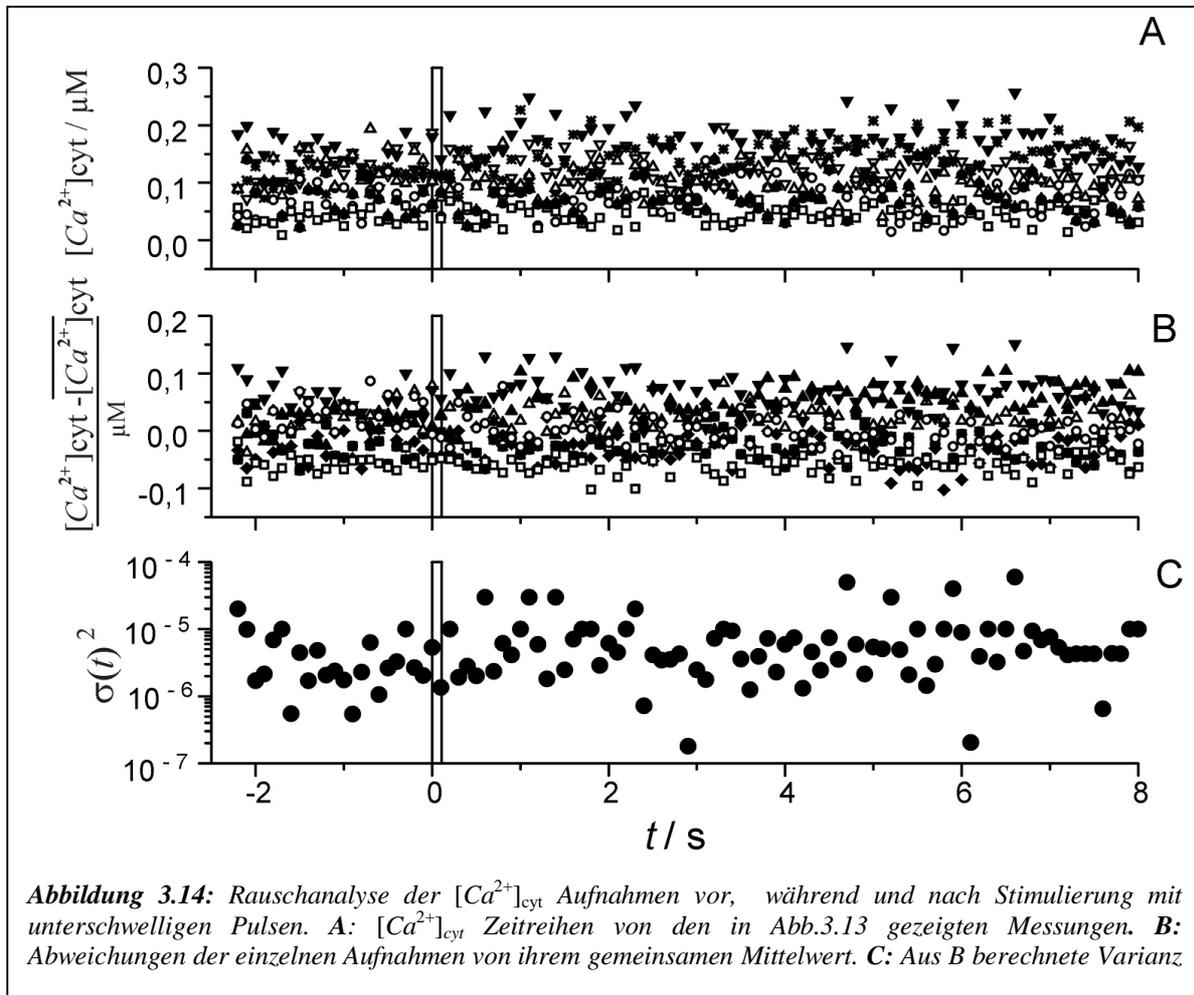


Abb. 3.13 C zeigt ferner, daß der additive Effekt von mehreren unterschwelligen Pulsen nur dann zu einem *TRC* führt, wenn das Intervall  $\Delta t_2$  zwischen beiden Pulsen nicht zu lang ist. In dem Beispiel in Abb. 3.13 C betrug der Abstand zwischen den Pulsen 4 s. Unter diesen Umständen blieb die  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  wieder völlig unbeeinflusst.

In Abb.3.13 E ist der Effekt der Doppelpulse für eine Zelle zusammengefaßt: Aufgetragen sind die Amplituden der *TRC* in Abhängigkeit von  $\Delta t_2$ .

Offensichtlich muß bei der untersuchten Zelle  $\Delta t_2$  kürzer als 4 s sein, damit sich die beiden unterschwelligen Pulse wirksam addieren.

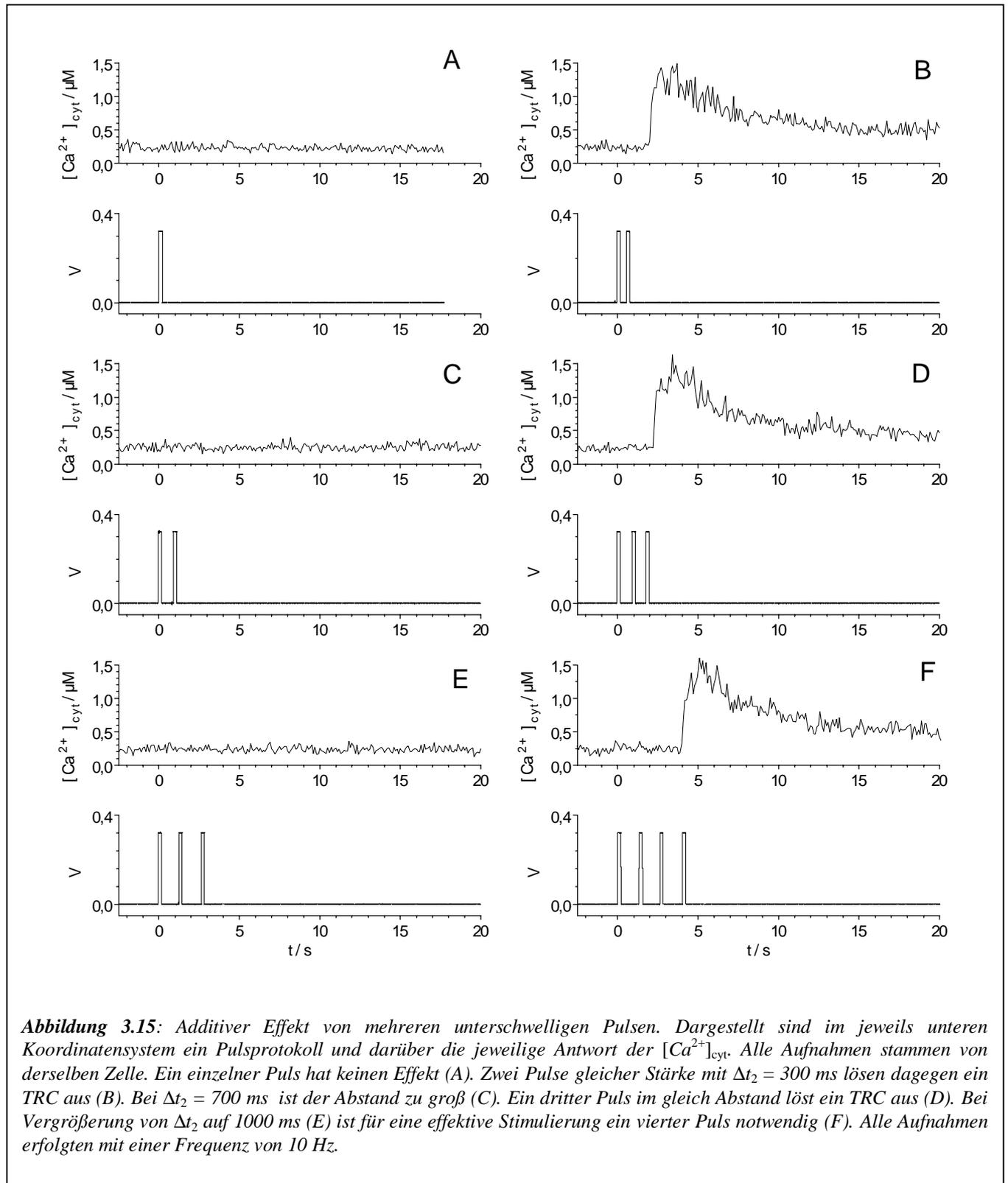
Dieses Muster zur Stimulation eines *TRC* durch unterschwellige Pulse wurde durch Versuche an vier anderen Zellen bestätigt. Die gemessenen  $\Delta t_{2\text{max}}$  waren mit bis zu 3 sec (Mittelwert

( $1,35 \pm 0,88$ ) s ( $n=5$ )) eine Größenordnung größer, als die in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Verzögerungen des *TRC* nach Einsetzen eines einzelnen überschwelligen Pulses von ( $0,39 \pm 0,27$ ) s ( $n = 20$ ) bei Messung mit dem gleichen Abstand zur Kathode. Die Ergebnisse für sämtliche dieser Zellen sind in Abb. 3.13 F zusammengefaßt. Aufgetragen sind die normierten Amplituden der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Änderung über die auf  $\Delta t_{2\text{max}}$  normierten Pulsabstände  $\Delta t_2$ . Die gemessenen maximalen Pulsabstände waren 0,75 s, 1 s, 1,5 s und 3 s. Die Normierung von  $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  erfolgte auf den Mittelwert der Änderungen bei erfolgreicher Stimulation. Das Ergebnis der Pulsaddition war unabhängig davon, ob zu Beginn des Experiments ein langer oder ein kurzer Pulsabstand stand. Deswegen ist es unwahrscheinlich, daß eine endogene Abnahme der Erregbarkeit der Zelle die Erklärung für diese Ergebnis darstellt.

### 3.5.2 Stimulation mit mehr als zwei unterschwelligen Pulsen

Wie Abb. 3.15 zeigt, ist es auf gleiche Weise wie in den Doppelpuls-Experimenten auch möglich, drei und mehr unterschwellige Pulse zu einem effektiven Puls zu addieren: Ist der Abstand  $\Delta t_2$  zwischen den beiden Pulsen gerade größer als der Abstand  $\Delta t_{22\text{max}}$ , bei dem im Doppelpuls-Experiment gerade noch ein *TRC* ausgelöst wird, so kann man durch einen weiteren Puls, der in gleichem Abstand  $\Delta t_2$  auf den zweiten folgt wiederum einen *TRC* auslösen. Die zweite Ziffer im Index von  $\Delta t_{22\text{max}}$  steht dabei für die Zahl der benutzten Pulse. Ob es eine maximale Pulszahl gibt, bei welcher die Pulsaddition noch funktioniert, wurde nicht genauer untersucht, weil mit zunehmender Pulszahl das System immer labiler wurde: Während  $i$  Pulse mit einem  $\Delta t_2 > \Delta t_{2i\text{max}}$  nicht zu einer erfolgreichen Stimulation führen, setzt bei  $i + 1$  Pulsen im gleichen Abstand der Puls bereits nach dem  $i$ -ten Puls ein. Erneute Stimulation mit  $i$  Pulsen führte dann in der Regel ebenfalls zu einem *TRC*. Die  $\Delta t_{2i\text{max}}$  verschoben sich also während der Dauer der Versuchsreihe. Dieses erschwerte die Suche nach dem maximal möglichen Pulsabstand erheblich, weil das Eintreten dieses Effektes vielfach erst nach der in Abschnitt 2.9.2 beschriebenen Synchronisation beider Datenspuren (Pulsprotokoll und Fluoreszenzsignal) erkannt wurde. Während einer Messung war es wegen der kurzen Pulsabstände praktisch nicht möglich, zu erkennen, ob das *TRC* nach dem  $i+1$ -ten oder bereits nach dem  $i$ -ten Puls startete, weil beide Signale nicht an der gleichen Zeitachse verglichen werden konnten.

Durch weitere Ausdehnung von  $\Delta t_2$  findet man  $\Delta t_{23\text{max}} > \Delta t_{22\text{max}}$ . Auf gleiche Weise findet man für den  $i$ -ten Puls vom  $i-1$ -ten Puls ausgehend ein  $\Delta t_{2i\text{max}} > \Delta t_{2(i-1)\text{max}}$ . Dieser Effekt konnte an drei Zellen für bis zu fünf Pulsen beobachtet werden.

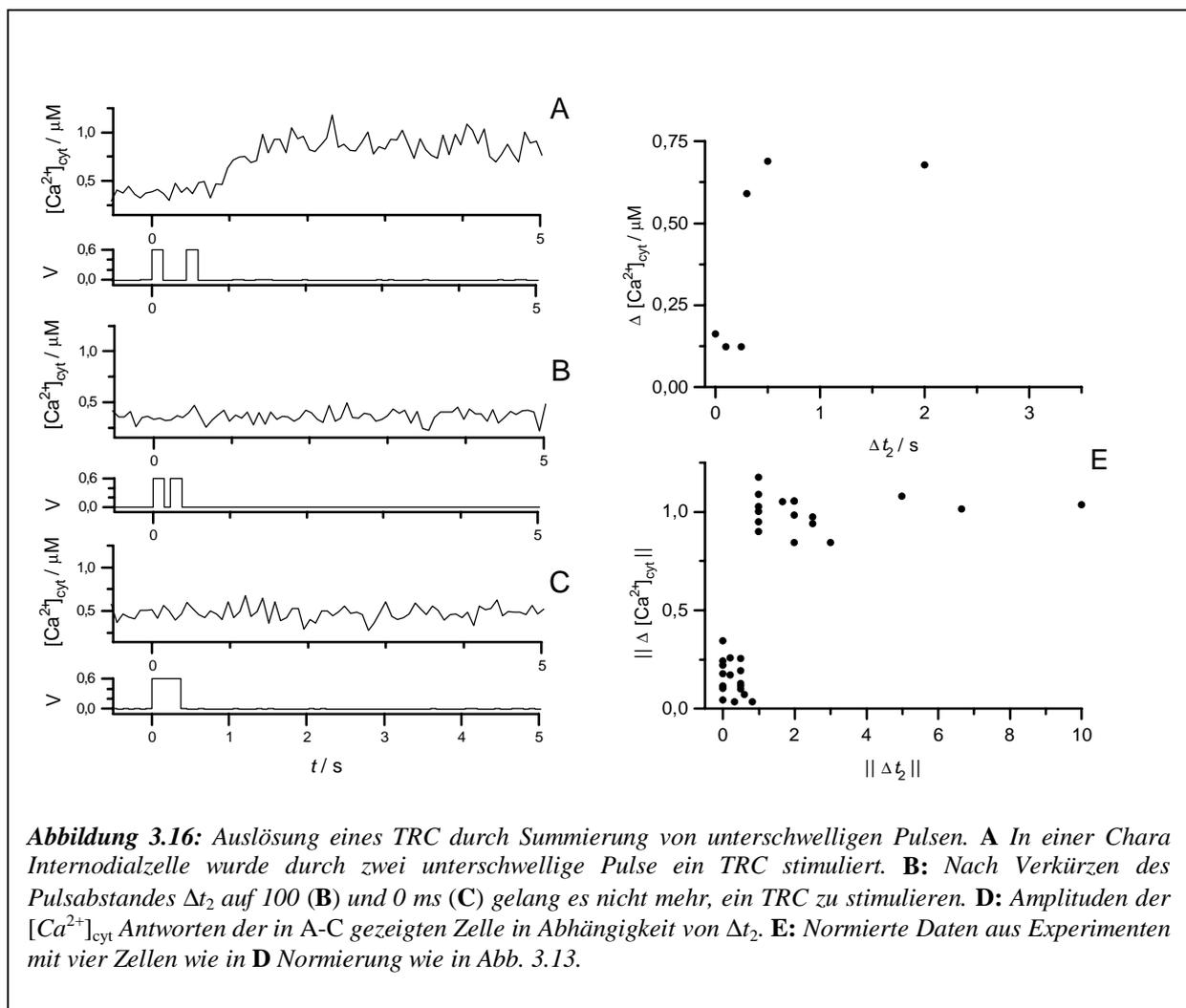


### 3.5.3 Für schwache Pulse gibt es einen minimalen Pulsabstand

Bei der Addition schwacher, unterschwelliger Pulse gibt es nicht nur einen maximalen Pulsabstand  $\Delta t_{2\max}$ , der nicht überschritten werden darf, sondern auch einen Mindestabstand  $\Delta t_{2\min}$ , den die beiden Pulse mindestens haben müssen, damit eine effektive Stimulierung der Zelle erfolgt. Ein solcher Fall ist in Abb. 3.16 gezeigt. Wieder wurden zwei unterschwellige Pulse gleicher Stärke und Dauer, welche jeder für sich keinen TRC auslösten, im Abstand  $\Delta t_2$  angelegt. Bei einem  $\Delta t_2$  von 300 ms lösten sie zusammen einen TRC aus (Abb. 3.16 A). Nach und nach wurde  $\Delta t_2$  verkürzt. In Abb. 3.16 B und C ist zu sehen, daß aus der Verkürzung von  $\Delta t_2$  ein Verlust des additiven Effekts der unterschwelligen Pulse resultiert.

In Abb. 3.16 D ist dieser Effekt für Versuche an einer Zelle zusammengefaßt.

Aufgetragen sind wieder die Amplituden der TRC gegen  $\Delta t_2$ . Offensichtlich muß  $\Delta t_2$ , um einen additiven Effekt der unterschwelligen Pulse zu erzielen, länger als 200 ms sein.



Das gleiche Muster zur Stimulierung eines *TRC* durch unter-schwellige Pulse wurde in 4 anderen Zellen beobachtet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.15 E zusammengefaßt. Die minimalen Pulsabstände, die noch zu einer effektiven Stimulierung führten, waren 50 ms, 100 ms sowie zweimal 300 ms. Das Ergebnis war unabhängig davon, ob der Versuch mit einem langen oder einem kurzen  $\Delta t_2$  startete. Letzteres macht eine Abnahme der Erregbarkeit der Zelle im Laufe des Versuchs als Ursache für den Effekt unwahrscheinlich.

#### 3.5.4 Variation des zweiten Pulses im Doppelpuls-Experiment

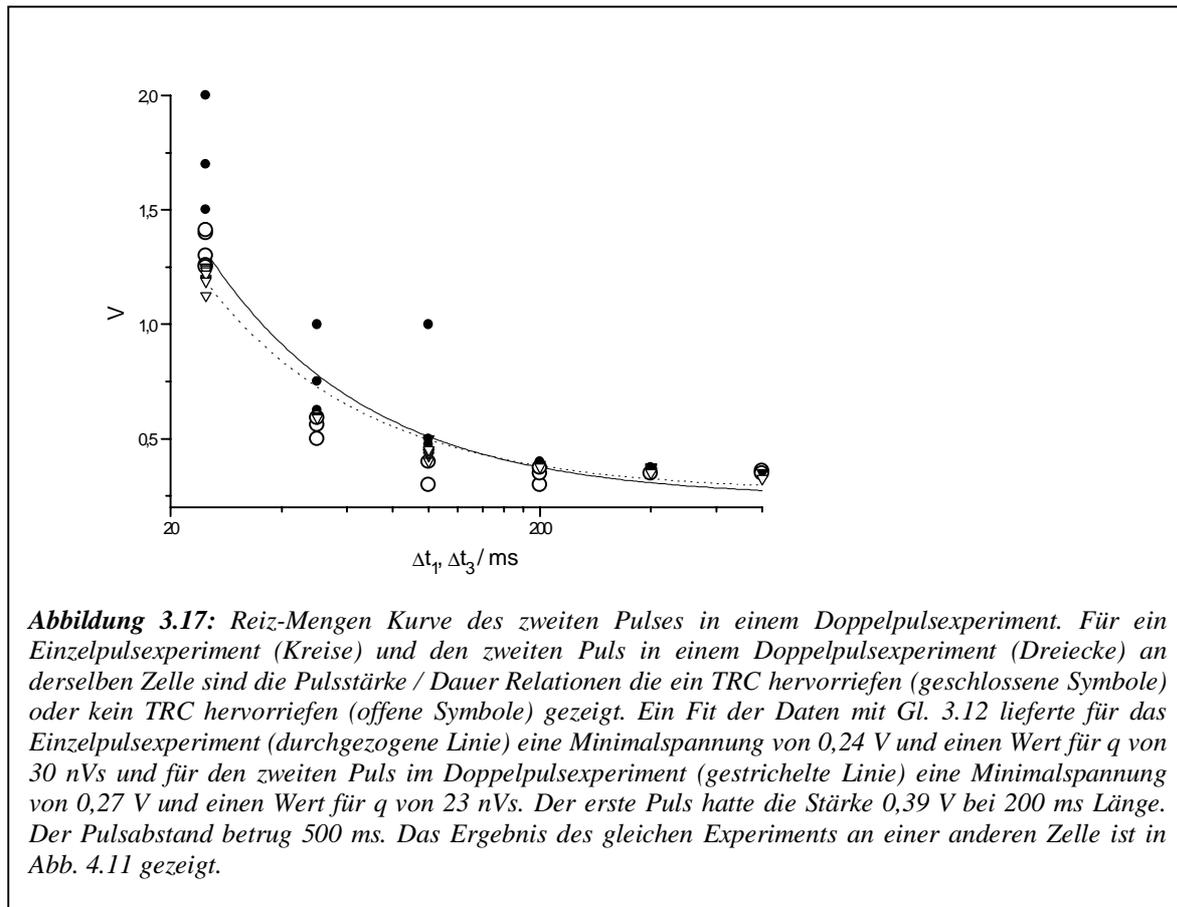
Eine Zelle wurde mit einem Doppelpuls stimuliert, in welchem Dauer und Stärke des zweiten Pulses variiert wurde, während die Parameter des ersten Pulses ebenso wie  $\Delta t_2$  konstant gehalten wurden. Zum Vergleich wurde für dieselbe Zellen Reiz-Mengen Relationen für Einzelpulse aufgenommen, wobei die Zelle mit Einzelpulsen variabler Länge und Dauer erregt wurde. Die Ergebnisse von solch einem Experiment werden in Abb. 3.17 gezeigt.

In dieser sind sowohl die Daten aus den Einzelpulsexperimenten (runde Symbole) als auch die Daten aus der Stimulation mit einem variablen zweiten Puls eingetragen. Der Fit beider Datensätze mit Gl. 3.12 liefert sehr ähnliche Werte für  $U_0$ .

Der  $q$  Wert aus der Doppelpuls-Stimulation war niedriger als der entsprechende Wert aus der Einzelpuls-Stimulation.

Daß die beiden Fitkurven sich schneiden, entspricht nicht den Meßwerten. Die erforderliche Spannung  $U_1$  für einen Einzelpuls war für alle Pulsdauern mindestens 5 % größer (für 800 ms), als die erforderliche Spannung  $U_2$  für den zweiten von zwei aufeinanderfolgenden Pulsen. Am deutlichsten war der Effekt für kurze Pulse. Bei einer Pulsdauer von 25 ms mußte der Einzelpuls um 15 % stärker sein als der zweite von zwei Pulsen.

Für die Überschneidung der beiden Fitkurven gibt es zwei mögliche Ursachen: Diejenige Spannung, mit welcher bei der jeweiligen Pulslänge genau die Schwelle zum Auslösen eines *TRC* erreicht wird, wurde durch die Messungen nur auf ca. 25 mV genau eingegrenzt. Möglicherweise ist das nicht genau genug, so daß der Fit dieser Daten ein falsches Bild vermittelt. Eine genauere Bestimmung der Schwelle ist zwar wünschenswert, aber nicht unkritisch, weil die Zellen nur eine begrenzte Zahl von Messungen zulassen. Nach einiger Zeit nimmt die Erregbarkeit der Zellen rapide ab.



Eine andere Ursache für die Überschneidung der beiden Fits in Abb. 3.17 könnte sein, daß die Reiz-Mengen Relation zum Auslösen eines TRC nicht exakt dem in Gl. 3.12 definierten Reiz-Mengen Gesetz genügt. Auch dann kann der hyperbolische Fit die Daten nicht exakt beschreiben.

An den in Tabelle 3.2 zusammengefaßten Fitdaten von drei Zelle läßt sich feststellen, daß die durch den zweiten Puls zu transportierende Ladungsmenge stets geringer ist, als diejenige in einem Einzelpuls. In allen drei Fällen war die Menge um mindestens 11% verringert. Der gegenüber dem Wert für den Einzelpuls um 73% verringerte Wert für die Minimalspannung  $U_0$  im dritten Experiment korrespondierte mit einer ungewöhnlichen, stetig steigenden Erregbarkeit der Zelle.

**Tabelle 3.2:** Fitdaten (Gl. 3.12) von Einzel- oder Doppelpulsversuchen zum Reiz-Mengen Gesetz. Die Daten wurden wie in der Legende von Abb. 3.17 beschrieben gewonnen. In den ersten beiden Spalten stehen die Fitparameter, die aus den Daten mit Einzelpulsversuchen gewonnen wurden. Die beiden nächsten Spalten geben die entsprechenden Werte für die Stimulation mit Doppelpulsen. Der erste Puls hatte in allen drei Fällen eine Stärke von 0,4 V und eine Dauer von 200 ms, der Abstand zwischen erstem und zweitem Puls betrug in allen Fällen 500 ms.

Versuch vom	Einzelner Puls		Zweiter Puls	
	$U_0/V$	$q/nVs$	$U_0/V$	$q/nVs$
12.11.2000	0,22	34,8	0,21	30,9
29.11.2000	0,24	27	0,27	22,8
07.12.2000	0,42	33,6	0,11	26,2

Bei der Stimulation mit Doppelpulsen muß also für eine erfolgreiche Stimulation der Zelle mit dem zweiten Puls weniger Ladung transportiert werden als bei der Stimulation der Zelle mit einem Einzelpuls. Darüber hinaus gilt auch für den zweiten Puls das durch Gl. 3.12 gegebene Reiz-Mengen Gesetz. Beide Erkenntnisse sind nicht besonders überraschend, dienen jedoch als Test für das im nächsten Kapitel präsentierte Modell.

Insgesamt erlauben die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse den Schluß, daß zwei (oder mehrere) unterschwellige Pulse einen additiven Effekt auf die Stimulation eines *TRC* haben, wobei für jeden Puls ein Reiz-Mengen Gesetz gilt. Die Summation ist jedoch nur dann möglich, wenn der Abstand zwischen den Pulsen  $\Delta t_2$  nicht zu lang oder zu kurz ist, und wenn jeder der Pulse die Minimalspannung  $U_0$  überschreitet.

## 4 Modellierung

Im Folgenden soll ein möglichst einfaches kinetisches Modell entwickelt werden, welches die beobachteten Effekte, insbesondere den minimalen Pulsabstand  $\Delta t_{2\min}$ , zusammenfassend beschreibt. Anhand der dabei gewonnenen Erkenntnisse soll anschließend diskutiert werden, welche Elemente eine Signaltransduktionskette in der Zelle haben muß, um die beobachteten Effekte hervorzurufen. Hierbei beschränkt sich die Modellierung auf das Grundphänomen mit zwei Zeitkonstanten (Abb. 3.2).

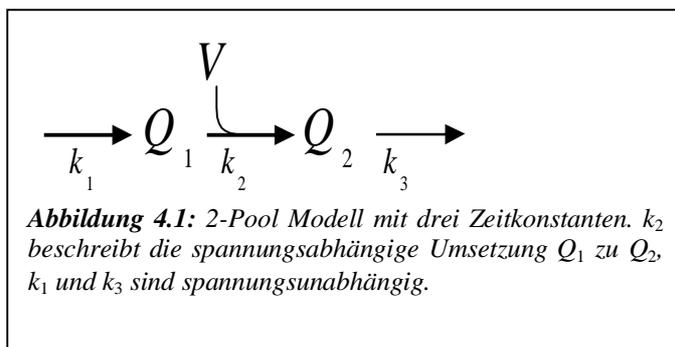
### 4.1 Begründung des Modells

Die Beobachtung, daß eine Stimulation der Zelle durch das Aneinanderreihen von unerschwelligen Pulsen möglich ist, zeigt, daß die Zelle die ersten, zunächst folgenlosen Pulse „im Gedächtnis“ behalten muß.

Das Gedächtnis sei im Modell durch eine Substanz  $Q_2$  dargestellt, welche durch einen Puls mit der Rate  $k_2$  produziert werde. Der Befund, daß die Stimulation der Zellen dem Reiz-Mengen Gesetz gehorcht, führt zu der Annahme, daß  $Q_2$  spannungsabhängig aus dem Ausgangsstoff  $Q_1$  mit der Rate  $k_2$  gebildet wird und zwar so lange, wie der Puls andauert. Der Mechanismus, welcher der Spannungsabhängigkeit zu Grunde liegt, mag komplexer sein, kann mangels Datenbasis jedoch nicht genauer aufgeschlüsselt werden.

Da auch  $Q_1$  aus einem Reservoir endlicher Größe stammt, soll es mit der Rate  $k_1$  nachgebildet werden.

Die Beobachtung, daß das  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  auf elektrische Stimulation nach dem Alles-oder-Nichts



Prinzip reagiert, legt die Existenz eines Schwellenwertes für  $Q_2$  nahe, oberhalb dessen  $Ca^{2+}$  ausgeschüttet wird. Der Ausschüttungsvorgang selbst soll nicht modelliert werden.

Die Existenz des maximalen Pulsabstandes  $\Delta t_{2\max}$  im Doppelpulsexperiment zeigt, daß die Zelle den ersten unterschwelligen Puls nach einer gewissen Zeit „vergißt“.  $Q_2$  werde daher mit der Rate  $k_3$  abgebaut. Abb. 4.1 faßt diese Überlegungen zusammen.

## 4.2 Formulierung des Modells

Mathematisch wird das Modell durch zwei gekoppelte Differentialgleichungen charakterisiert:

$$\frac{\partial[Q_1]_t}{\partial t} = k_1([Q_1]_0 - [Q_1]_t) - k_2[Q_1]_t \quad (4.1)$$

$$\frac{\partial[Q_2]_t}{\partial t} = k_2[Q_1]_t - k_3[Q_2]_t \quad (4.2)$$

Der Term  $k_1([Q_1]_0 - [Q_1]_t)$  in Gl. 4.1 ist gleichbedeutend mit der Annahme, daß ein Regelkreis  $[Q_1]$  kontrolliert. Jegliche Abweichung vom Sollwert  $[Q_1]_0$  (wie bei seiner Umwandlung zu  $Q_2$ ) führt zur Wiederherstellung des Sollwertes. Der detaillierte Mechanismus, der dafür benutzt wird, mag kompliziert sein. Ein Minimalschema für solch einen Regelkreis findet sich bei Hansen (1990). Die Reaktion dort diente zur Regelung von Substratkonzentrationen in einem Zellkompartiment durch den Nettotransmembrantransport. Dieselben Gleichungen gelten für Regelkreise durch chemische Reaktionen. Entscheidend ist, daß für den Regelkreis Energie z.B. in Form von ATP benötigt wird.

Die Spannungsabhängigkeit von  $k_2$  wird durch

$$k_2(U) = \frac{c_2(U - U_0)}{q} \quad \text{für } U > U_0 \quad (4.3 \text{ a})$$

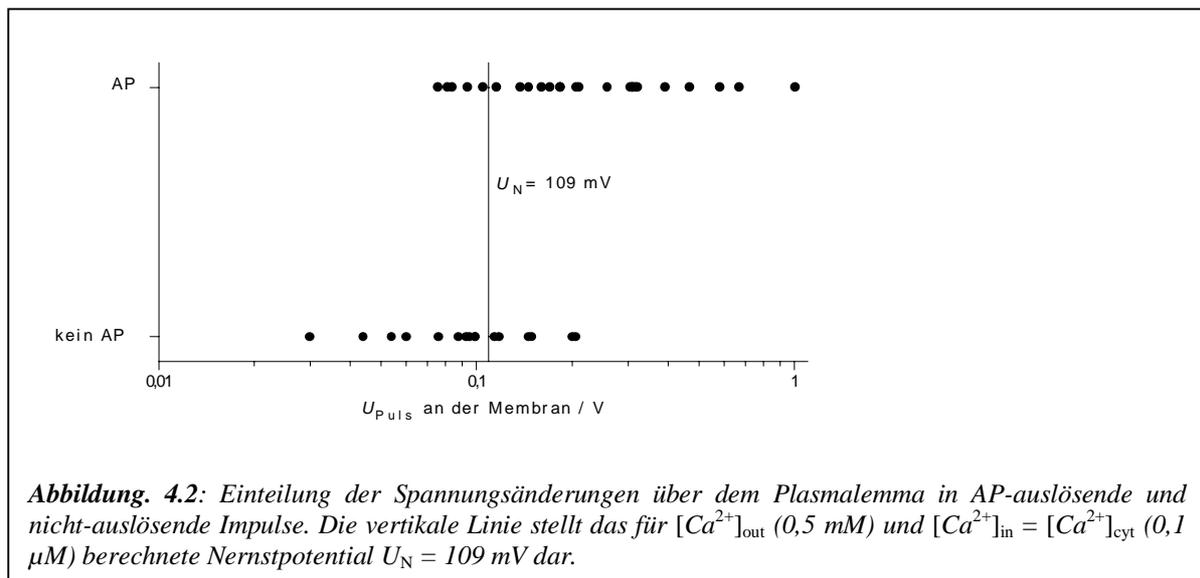
mit den charakteristischen Parametern Ladungsäquivalent  $q$  und Minimalspannung  $U_0$  aus dem Reiz-Mengen Gesetz (Gl. 3.12) und

$$k_2 = 0 \quad \text{für } U < U_0 \quad (4.3 \text{ b})$$

realisiert. Diese *ad hoc* Annahme zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit wird in Abschnitt 4.3 diskutiert. Die Eichkonstante  $c_2$  ist dimensionslos, weil  $q$  die Dimension Vs von  $U / k_2$  hat. Daß ein Schwellenwert wie  $U_0$  in Gl. 4.3 eingeführt wird, ist für chemische Reaktionen unüblich, weil es nicht in einfacher Weise dem Massenwirkungsgesetz entspricht.

Da hier aber die Membranspannung auftritt, ist ein solcher Mechanismus nicht ungewöhnlich: Der Fluß über eine Membran ist in erster Näherung immer proportional  $U - U_N$ , wobei  $U_N$  die Nernstspannung für die transportierte Substanz ist.

Der Verdacht, daß in diesem Fall die Umkehrspannung für Calciumtransport über das Plasmalemma involviert ist, ergibt sich aus Messungen, bei denen zusätzlich zu  $U_0$  (Abfall im Bad der *Chara*) die wirkliche Spannung über dem Plasmalemma mit einer Einstichelektrode gemessen wurde. In Abb. 4.2 ist als Grenzlinie das für die vorliegenden  $Ca^{2+}$  Konzentrationen (innen  $0,1 \mu M Ca^{2+}$ , außen  $0,5 mM Ca^{2+}$ ) berechnete Nernstpotential für  $Ca^{2+}$  eingezeichnet. Diese Linie teilt die Ereignisse, die zu einer Auslösung und zu einer Nichtauslösung des APs führen so ein, daß die Anzahl der Reize im falschen Bereich (aufgrund statistischer Streuung) symmetrisch zu diesem Umkehrpotential liegen.



Aus dem durch Abb. 4.2 nahegelegten  $Ca^{2+}$ -Einstrom könnte ein lokaler Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  in der Nähe des Plasmalemma resultieren, welcher mit der hier benutzten globalen Nachweismethode unentdeckt blieb. Weiter ist bekannt, daß in Pflanzenzellen  $Ca^{2+}$  sensitive Enzyme anwesend sind (z.B. Phospholipase C, Kopka et. al. 1998). Ein solches Enzym könnte durch von außen eintretendes  $Ca^{2+}$  aktiviert werden und die Umsetzung von  $Q_1$  nach  $Q_2$  katalysieren. Dies ist im Einklang mit der bekannten starke Abhängigkeit der Membranerregung von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  (Williamson und Ashley 1982).

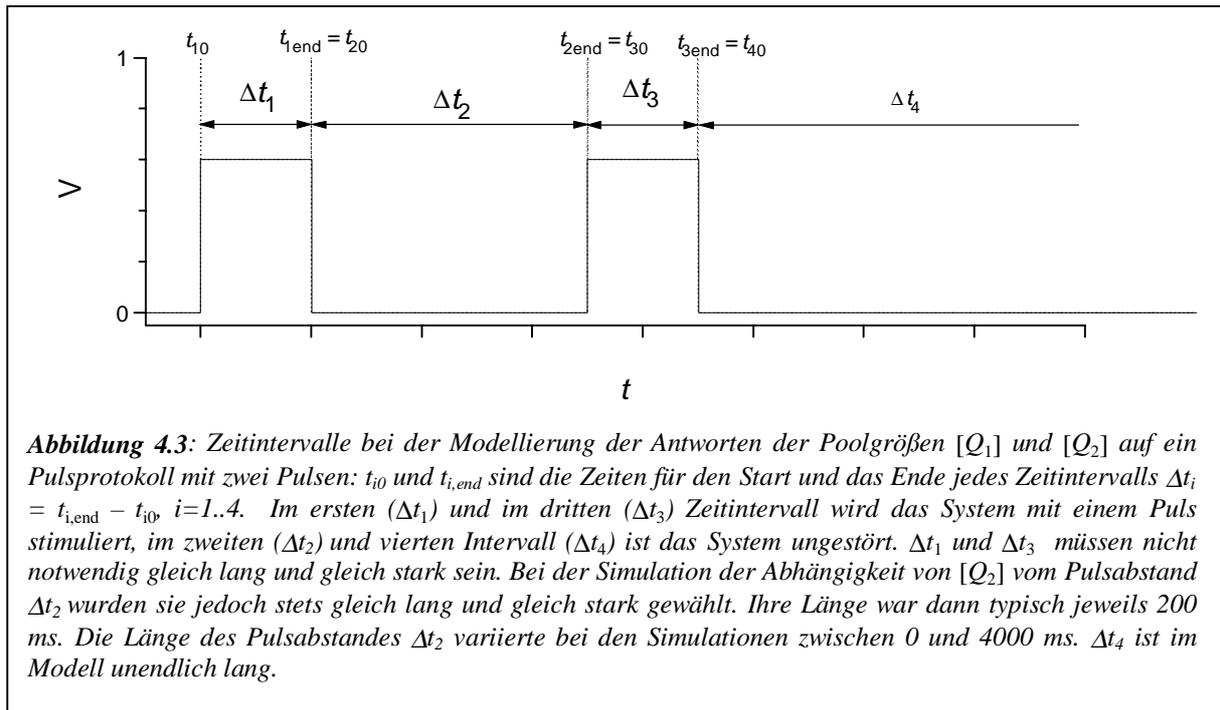
Die beiden Differentialgleichungen 4.1 und 4.2 werden, unabhängig von der Art der Spannungsabhängigkeit von  $k_2$ , gelöst durch

$$[Q_1]_t = a_{i0} + a_{i1} \cdot e^{-(k_1 + k_2)(t-t_{i0})} \quad (4.4)$$

und

$$[Q_2]_t = b_{i0} + b_{i1} e^{-(k_1 + k_2)(t-t_{i0})} + b_{i2} e^{-k_3(t-t_{i0})} \quad (4.5)$$

für vier Zeitintervalle  $\Delta t_i = t_{i,\text{end}} - t_{i0}$ .  $t_{i0}$  und  $t_{i,\text{end}}$  sind die Zeiten für den Start und das Ende jedes Zeitintervalls  $i$  ( $i = 1 \dots 4$ ) wie in Abb. 4.3 gezeigt. Während des ersten und dritten Intervalls wird die Zelle mit einem Puls stimuliert, während des zweiten und vierten Intervalls



ist das System ungestört.

Die Koeffizienten  $a_{ij}$  und  $b_{ij}$  in den Gln. 4.4 und 4.5 repräsentieren die Randbedingungen für jedes Intervall. Ihre Berechnung findet sich im Anhang A. An dieser Stelle sollen sie lediglich angegeben werden:

$$a_{i0} = \frac{k_1}{k_1 + k_2} [Q_1]_0 \quad (4.6)$$

$$a_{i1} = [Q_1]_{i0} - a_{i0}, \quad (4.7)$$

worin  $[Q_1]_{i0}$  der Wert von  $[Q_1]$  zu Beginn des  $i$ -ten Intervall ist,

$$b_{i0} = \frac{k_1 k_2}{k_3 (k_1 + k_2)} [Q_1]_{i0}, \quad (4.8)$$

$$b_{i1} = \frac{a_i k_2}{k_3 - k_1 - k_2}, \quad (4.9)$$

und

$$b_{i2} = [Q_2]_{i0} - b_{i0} - b_{i1}, \quad (4.10)$$

worin  $[Q_2]_{i0}$  der Wert von  $[Q_2]$  zu Beginn des  $i$ -ten Intervall ist.

Zum Zeitpunkt des Starts des ersten Pulses bei  $t_{10}$  ist  $[Q_1]_{10} = 1$  und  $[Q_2]_{10} = 0$ . Die Startwerte für die weiteren Intervalle sind rekursiv gegeben durch

$$[X]_{i0} = [X](t_{i-1,\text{end}}) \quad X = Q_1, Q_2 \quad (4.11)$$

Zwischen den Pulsen und nach dem letzten Puls sind  $k_2$  und damit  $b_{i0}$  und  $b_{i2}$  ( $i = 2, 4$ ) null, und  $[Q_2]$  wird nur noch durch den zweiten rechten Term von Gl. 4.5 bestimmt.

Wenn  $[Q_2]_t$  (Gl. 4.5) zum Zeitpunkt  $t_t$  steigend den Schwellenwert  $[Q_2]_{\text{thres}}$  erreicht, wird aus für  $Q_2$  sensiblen Speichern  $Ca^{2+}$  ausgeschüttet:

$$[Ca^{2+}]_{\text{cyt}} = [Ca^{2+}]_0 + A_2 \left( e^{-\frac{t-t_t}{\tau_2}} - e^{-\frac{t-t_t}{\tau_1}} \right) \text{ für } t > t_t, \text{ wenn } [Q_2](t_t) = [Q_2]_{\text{thres}} \text{ und } \frac{d[Q_2](t_t)}{dt} > 0 \quad (4.12)$$

Gl. 4.12 beschreibt den im 3. Kapitel beschriebenen und in Abb. 3.2 gezeigten zeitlichen Verlauf der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  entsprechend einem Fit 2. Ordnung nach Gl. 3.1 mit den Parametern  $A_1 = -A_2$  sowie den Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  entsprechend den Fitergebnissen in Tabelle 3.1.  $[Ca^{2+}]_0$  gibt den Ruhewert der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  vor Auslösen des *TRC*. Das Nachfüllen des  $Ca^{2+}$  Speichers und eine mögliche Rückkopplung der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  auf den Entleerungsvorgang des Speichers werden im Modell nicht berücksichtigt.

Der entscheidende Punkt im Modell ist nach Gl. 4.12 das Erreichen des Schwellenwertes  $[Q_2]_{\text{thres}}$ . Allein davon hängt ab, ob ein *TRC* ausgelöst wird oder nicht. Wenn es ausgelöst wird, sieht es immer gleich aus.

Um die maximale Poolgröße von  $Q_2$  bei festen Ratenkonstanten in Abhängigkeit von  $\Delta t_2$   $[Q_2]_{\text{max}}(\Delta t_2)$  zu bestimmen, ist es nötig, zunächst den Zeitpunkt  $t_{\text{max}2}$  zu berechnen, bei dem

$[Q_2]$  während des zweiten Pulses den maximalen Wert erreicht. Dazu muß das Maximum der Ableitung von Gl. 4.5 für das Intervall  $\Delta t_3$  nach der Zeit gefunden werden.

Die im Anhang B gezeigte Rechnung liefert:

$$t_{\max 2}(\Delta t_2) = t_{10} + \Delta t_1 + \Delta t_2 + \frac{1}{k_3 - k_1 - k_2} \ln \left[ \frac{k_3 \cdot (b_{30} - [Q_2]_{31} + b_{32}(\Delta t_2))}{(k_1 + k_2) \cdot b_{31}(\Delta t_2)} \right] \quad (4.13 \text{ a})$$

wenn das Argument des Logarithmus größer null ist. Sonst gibt es keine reelle Lösung, was bedeutet, daß  $Q_2$  den Maximalwert am Ende des Pulses erreicht:

$$t_{\max 2} = t_{10} + \Delta t_1 + \Delta t_2 + \Delta t_3 = t_{40}. \quad (4.13 \text{ b})$$

$b_{31}(\Delta t_2)$  in Gl. 4.13 a ergibt sich aus Gl. 4.9 durch Einsetzen von Gl. 4.7 zu

$$b_{31}(\Delta t_2) = \frac{([Q_1]_{30} - a_{30})k_2}{k_3 - k_1 - k_2} \quad (4.14)$$

Darin sind alle Parameter bis auf den Startwert  $[Q_1]_{30}$  für das dritte Intervall konstant.  $a_{30}$  ist durch Gl. 4.6 für  $i = 3$  gegeben.  $[Q_1]_{30}$  berechnet sich wegen  $[Q_1]_{30} = [Q_1]_{2\text{end}}$  nach Gl. 4.4 für das zweite Intervall. Einsetzen von Gl. 4.4 in Gl. 4.14 ergibt

$$b_{31}(\Delta t_2) = \frac{(a_{20} + a_{21}e^{-(k_1+k_2)\Delta t_2} - a_{30})k_2}{k_3 - k_1 - k_2} \quad (4.15)$$

$a_{20}$  und  $a_{21}$  können wiederum aus den Gln. 4.6 und 4.7 für das zweite Intervall berechnet werden. Sie sind aber nicht von  $\Delta t_2$  abhängig und werden hier daher nicht weiter aufgelöst.

$b_{32}$  in Gl. 4.13 erhält man durch Einsetzen von Gl. 4.15 und Gl. 4.5 für  $i = 2$  in Gl. 4.10:

$$b_{32}(\Delta t_2) = b_{20} + b_{21}e^{-(k_1+k_2)\Delta t_2} + b_{22}e^{-k_3\Delta t_2} - b_{30} - \frac{(a_{20} + a_{21}e^{-(k_1+k_2)\Delta t_2} - a_{30})k_2}{k_3 - k_1 - k_2} \quad (4.16)$$

Die Werte der Koeffizienten  $a_{20}$ ,  $a_{30}$ ,  $b_{20}$ ,  $b_{21}$ ,  $b_{22}$  und  $b_{30}$  können wieder durch die Gln. 4.6 - 4.12 für das jeweilige  $i$  berechnet werden. Damit ergibt sich die maximale Poolgröße von  $Q_2$  während des zweiten Pulses entsprechend Gl. 4.5 zu:

$$[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2) = b_{30} + b_{31}(\Delta t_2) \cdot e^{-(k_1+k_2)(t_{\max 2}-t_{30})} + b_{32}(\Delta t_2) \cdot e^{-k_3(t_{\max 2}-t_{30})} \quad (4.17)$$

Die Koeffizienten  $b_{31}(\Delta t_2)$ ,  $b_{32}(\Delta t_2)$  und  $t_{\max 2}$  müssen für jedes  $\Delta t_2$  aus den Gln. 4.13, 4.15 und 4.16 berechnet werden. Gleichung 4.17 beschreibt die maximale Poolgröße von  $Q_2$  in

Abhängigkeit vom Pulsabstand  $\Delta t_2$  und stellt somit den Schlüssel zur Modellierung der beobachteten Doppelpulsexperimente dar.

Für diese Modellierung muß noch die entsprechende Gleichung für einen Einzelpuls gefunden werden. Denn auch beim Einzelimpuls kann sich aufgrund der Erschöpfung von  $Q_1$  ein Maximum von  $Q_2$  ergeben. Dazu muß die Nullstelle der Ableitung von Gl. 4.5 für das Intervall  $\Delta t_1$  gefunden werden. Die im Anhang B gezeigte Rechnung liefert

$$t_{\max 1} = t_{10} + \frac{1}{k_3 - k_1 - k_2} \ln \left[ \frac{k_3 - k_1}{k_2} \right], \quad (4.18 \text{ a})$$

wenn das Argument des Logarithmus größer null ist. Da  $k_1$ ,  $k_2$  und  $k_3$  alle größer als null sind, ist das nur der Fall, wenn  $k_3 > k_1$  ist. Wenn das Argument des Logarithmus nicht größer als null ist, gibt es keine reelle Lösung, was bedeutet, daß  $Q_2$  den Maximalwert am Ende des Pulses erreicht:

$$t_{\max 1} = t_{20}. \quad (4.18 \text{ b})$$

Analog zu Gl. 4.17 findet man damit

$$[Q_2]_{\max 1} = b_{10} + b_{11} e^{-(k_1+k_2)(t_{\max 1}-t_{10})} + b_{12} e^{-k_3(t_{\max 1}-t_{10})} \quad (4.19)$$

für die maximale  $[Q_2]$ , die durch den ersten Puls erzeugt wird. Die Koeffizienten  $b_{10}$ ,  $b_{11}$  und  $b_{12}$  in Gl. 4.19 berechnen sich aus den Gl. 4.6 - 4.12 für  $i = 1$  mit den Startwerten  $[Q_1]_{10} = 1$  und  $[Q_2]_{10} = 0$ .

Um für einen gegebenen Schwellenwert  $[Q_2]_{\text{thres}}$  die Reiz-Mengen Kurve für einen Einzelpuls auf der Ebene des *second messenger* zu berechnen, wäre es nötig, die Gl.

$$[Q_2]_{\text{thres}} = b_{10} + b_{11} e^{-(k_1+k_2(U))(t_{\max 1}-t_{10})} + b_{12} e^{-k_3(t_{\max 1}-t_{10})}. \quad (4.20)$$

entweder nach der erforderlichen Pulslänge  $t_{\max 1}$  oder  $k_2$  aufzulösen. Obige Gleichung geht direkt aus Gl. 4.19 hervor. Der Unterschied zu Gl. 4.19 besteht darin, daß es in Gl. 4.20 darum geht, die Spannungsabhängigkeit von  $k_2$  so zu bestimmen, daß für beliebige Pulsängen  $\Delta t_1$  der Schwellenwert  $[Q_2]_{\text{thres}}$  erreicht wird. Könnte Gl. 4.20 nach  $t_{\max 1}$  oder  $k_2$  aufgelöst werden, wäre es möglich, für jede Pulsstärke die erforderliche Pulsdauer (bzw. umgekehrt) anzugeben, die nötig ist, um den Schwellenwert zu erreichen.

Da aber  $t_{\max 1}$  in den Exponenten beider Exponentialfunktionen und  $k_2$  sowohl in einem Exponenten als auch sämtlichen Koeffizienten  $b_{1j}$  steht, ist es nicht möglich, die Gleichung algebraisch nach einem der beiden Parameter aufzulösen.

Entsprechendes gilt für Gl. 4.17. Die zu lösende Gleichung für die Reiz-Mengen Kurve des zweiten Pulses in einem Doppelpuls lautet:

$$[Q_2]_{thres} = b_{30} + b_{31} e^{-(k_1+k_2(U))(t_{\max 2}-t_{30})} + b_{32} e^{-k_3(t_{\max 2}-t_{20})}. \quad (4.21)$$

In beiden Fällen ist die Lösung nur numerisch möglich. (Siehe dazu Abschnitt 4.6)

### 4.3 Diskussion des Ansatzes für die Spannungsabhängigkeit

Gl. 5.5 beschreibt den Zeitverlauf der  $[Q_2]$ . Diese Kenntnis soll benutzt werden, um zu überprüfen, ob der *ad hoc* Ansatz für  $k_2$  (Gl. 4.3) gerechtfertigt ist.

Mit  $b_{12} = [Q_2]_{10} - b_{10} - b_{11}$  (Gl. 4.9) läßt sich Gl. 4.5 für das erste Intervall (Abb. 4.3) als

$$[Q_2]_t = b_{10} + b_{12} e^{-(k_1+k_2)(t-t_{10})} + ([Q_2]_{10} - b_{10} - b_{11}) e^{-k_3(t-t_{10})} \quad (4.22)$$

schreiben.

Wenn ein TCR ausgelöst wird, hat  $[Q_2]$  immer den gleichen Wert und wird deshalb konstant gesetzt.  $b_{10}$  ist von sich aus konstant. Ebenfalls wird der dritte Term, der mit  $k_3$  zerfällt als konstant angenommen. Diese Annahme ist dadurch begründet, daß die Doppelpulsexperimente eine recht lange Lebensdauer von  $Q_2$  zeigen, die auf jeden Fall beträchtlich länger ist, als die Länge von überschwelligem Einzelpulsen. Dann reduziert sich die Forderung nach konstantem  $[Q_2]$  auf die Forderung, daß der zweite Term konstant sein muß. Da  $b_{11}$  konstant ist, muß der Exponent des zweiten Terms konstant sein, also

$$const = (k_1 + k_2)(t_{\max 1}-t_0) = (k_1 + k_2)\Delta t_{1c} \quad (4.23)$$

Die Zeit  $t_{\max 1}$  (aus Gl. 4.18) kommt hier ins Spiel, weil das Maximum von  $[Q_2]$  nicht immer am Pulsende sein muß.  $\Delta t_{1c}$  ist dann die kritische Pulslänge, bei der ein Puls ausgelöst wird.

Mit dem Ansatz der Gleichung 4.3 wird daraus

$$const = \left( k_1 + \frac{c_2(U - U_0)}{q} \right) \Delta t_{1c}.$$

Wiederum daraus folgt

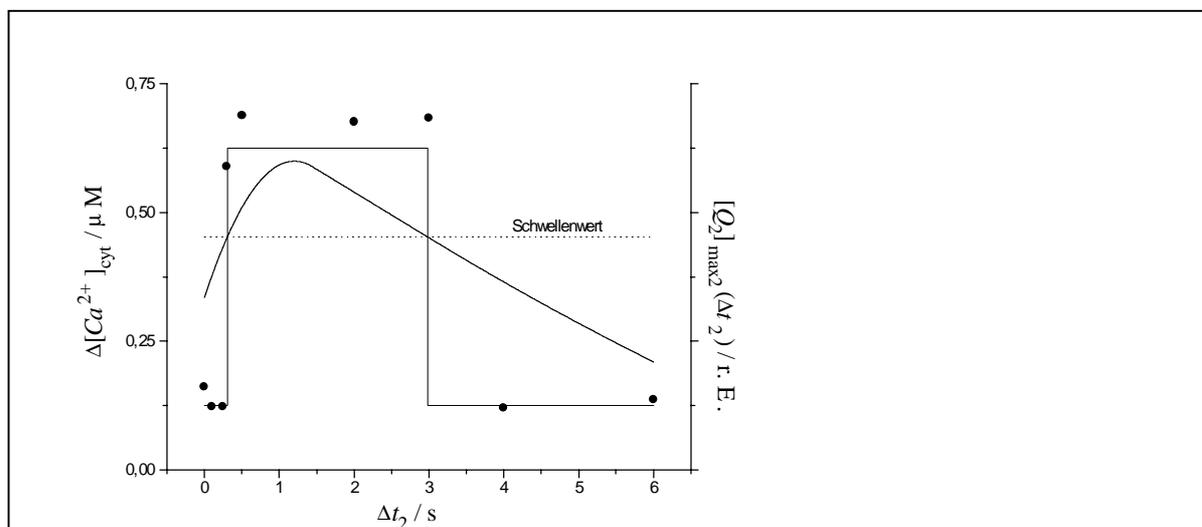
$$U = \frac{\text{const}}{c_2} \frac{q}{\Delta t_{1c}} + U_0 - \frac{k_1 q}{c_2} \quad (4.24)$$

Unter der Annahme, daß der Term mit  $k_3$  sehr langsam zerfällt, ergibt also der obige Ansatz (Gl. 4.3) für  $k_2$  die Reizmengen Hyperbel (Gl. 3.12). Allerdings wird die Rheobase durch  $k_1$  beeinflusst. Ob dieser Effekt tatsächlich eine Rolle spielt, läßt sich nur durch Messungen beantworten, die einen direkten Zugriff auf  $Q_1$  und  $Q_2$  gestatten.

#### 4.4 Ableitung eines Tests für das Modell

Ein Modell, welches die Pulsaddition in Abhängigkeit vom Pulsabstand befriedigend erklärt, muß einige in Abb. 4.4 zusammengefaßte Bedingungen erfüllen.

In der Abbildung sind einerseits im Doppelpulsversuch an einer Zelle gemessene  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  Amplituden (aus Abb. 3.13 F und 3.16 E im Ergebnisteil) in Abhängigkeit vom Abstand  $\Delta t_2$  der beiden langen unterschwelligen Pulse ( $p_1$  mit Stärke  $u_1$ , Dauer  $\Delta t_{11}$ ) aufgetragen (linke Abszisse), andererseits die relative Poolgröße von  $Q_2$  und ein Schwellenwert, den  $[Q_2]$



**Abbildung 4.4:** Bedingungen, die sich aus den Doppelpulsversuchen für die aus dem Modell gewonnene Funktion  $[Q_2]_{\text{max}2}$  ergeben. Die Punkte stellen die in Abhängigkeit vom Pulsabstand  $\Delta t_2$  zwischen zwei unterschwelligen Pulsen gemessenen maximalen Amplituden der TRC dar (linke Abszisse, vgl. Abb. 3.13 E und 3.16 D im 3. Kapitel). Die daraus interpolierte Stufenfunktion der maximalen Amplitude der  $Ca^{2+}$ -Antwort auf Doppelpulse im Abstand  $\Delta t_2$  trennt die Wertbereiche von  $\Delta t_2$  in denen  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2)$  (Gl. 4.17) oberhalb oder unterhalb eines an der rechten Abszisse aufgetragenen, durch die Versuchsergebnisse (Abb. 3.6 F 3.13 F 3.16 E im 3. Kapitel) gerechtfertigten Schwellenwertes (gestrichelt) verlaufen muß. Dieser Schwellenwert, dessen Höhe zunächst noch unbekannt ist, muß zum Auslösen eines TRC von der Poolgröße  $[Q_2]$  des Botenstoffes  $Q_2$  überschritten werden. Er stellt die Triggerschwelle für den Übergang zwischen der kontinuierlichen Funktion  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2)$ , welche die maximale Poolgröße des Botenstoffes  $Q_2$  nach einem Doppelpuls mit dem Pulsabstand  $\Delta t_2$  beschreibt, und der Alles-oder-Nichts  $Ca^{2+}$ -Antwort (Gl. 4.12) dar. Die ebenfalls an der rechten Abszisse aufgetragene durchgehende Kurve zeigt einen nach den Meßwerten erlaubten Verlauf von  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2)$  (Das ist nicht zwangsläufig der Verlauf, den  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2)$  nach dem Modell hat.): Für Pulsabstände  $\Delta t_2$ , die ein TRC auslösen, muß  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2)$  oberhalb des Schwellenwertes liegen, wenn nicht, muß  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2)$  darunter bleiben. Weil die durch Gl. 4.17 definierte Funktion für  $\Delta t_2 \geq 0$  stetig ist, muß sie dann ein Maximum im Intervall  $(\Delta t_{2\text{min}}, \Delta t_{2\text{max}})$  haben.

überschreiten muß, um ein *TRC* hervorzurufen (rechte Abszisse).

Die Existenz eines solchen Schwellenwertes wird durch die in Abb. 4.4 gezeigten Meßergebnisse gerechtfertigt. (Weitere Ergebnisse, welche die Annahme eines Schwellenwertes rechtfertigen, sind in den Abb. 3.6, 3.13, und 3.16 im Ergebnisteil) zu finden. Die in Abb. 4.4 gezeigten  $Ca^{2+}$ -Änderungen zeigen einen stufenartigen Verlauf: Pulsaddition ist nur möglich, wenn der Pulsabstand zwischen zwei schwachen Pulsen  $p_1$  (mit der Stärke  $u_1$  und der Dauer  $\Delta t_{11}$ ) weder zu lang ( $<\Delta t_{2\max}$ ) noch zu kurz ( $>\Delta t_{2\min}$ ) ist (Abb. 3.13 und 3.16).

Unterhalb des Pulsabstandes  $\Delta t_{2\min}$  gibt es praktisch keine, zwischen  $\Delta t_{2\min}$  und  $\Delta t_{2\max}$  die maximale und jenseits von  $\Delta t_{2\max}$  wiederum keine Calciumantwort.

Um eine solche diskrete, quasi digitale, Stufenfunktion (Calciumsignal) wie die in Abb. 4.2 mit einem kontinuierlichen, quasi analogen Signal (Pulsabstand  $\Delta t_2$ ) zu erzeugen, wird ein Schwellenwert (Triggerschwelle) benötigt, welcher in Abhängigkeit vom analogen Eingangssignal erreicht wird – oder eben nicht.

Der Zusammenhang zwischen kontinuierlichem Eingangssignal (Pulsabstand  $\Delta t_2$ ) und der erreichten maximalen  $[Q_2]$  wird durch die in Gl. 4.17 definierte Funktion  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2)$  gegeben. Diese liefert nämlich für zwei beliebige Pulse, im Abstand  $\Delta t_2$  die maximale, durch die beiden Pulse erzeugte  $[Q_2]$  in Abhängigkeit von  $\Delta t_2$ . Verändert man, wie bei den in Abb. 4.2 gezeigten Daten, im Experiment nur den Abstand zwischen den Pulsen, nicht aber Länge und Intensität der Pulse selbst, ist die Veränderung von  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2)$  nur von  $\Delta t_2$  abhängig und kann entsprechend aufgetragen werden. Der Verlauf von  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2)$  ist dann stetig.

Der Übergang zwischen dieser stetigen Funktion und der diskreten  $Ca^{2+}$ -Antwort erfolgt durch eine Triggerschwelle  $[Q_2]_{\text{thres}}$ : Erreicht  $[Q_2]_t$  steigend den Wert  $[Q_2]_{\text{thres}}$ , wird eine Calciumantwort entsprechend Gl. 4.12 ausgelöst.

Die Höhe dieser Triggerschwelle ist unbekannt, da für  $[Q_2]$  keine Meßergebnisse vorliegen. Sie muß aber für die Doppelpulse die gleiche Höhe haben, wie für überschwellige Einzelpulse. Bei diesen tritt die Calciumantwort ebenfalls als diskrete Stufenfunktion auf (Abb. 3.6 im Abschnitt 3.7.3).

Für jede Zelle, an der die Addition unterschwelliger Pulse beobachtet wurde, wurde deshalb auch mindestens ein überschwelliger Einzelpuls  $p_h$  mit einer Stärke  $u_h$  und Dauer  $\Delta t_{1,h}$  gesucht und gefunden, derart, daß gerade noch ein *TRC* ausgelöst wird, also  $[Q_2]_{\text{thres}}$  erreicht wird. Die maximale durch einen Einzelpuls erreichte  $[Q_2]$  wird durch die Funktion  $[Q_2]_{\max 1}(p_h)$  (Gl. 4.19) berechnet. Der überschwellige Einzelpuls  $p_h$  dient zusammen mit den Ergebnissen der

Doppelpulseexperimente zur Bestimmung der Werte, die  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  in Abb. 4.1 und der Schwellenwert  $[Q_2]_{\text{thres}}$  haben müssen, damit die Doppelpulsaddition im Modell funktioniert.

Um diese Werte zu bestimmen, kann man nun auf Basis der obigen Überlegungen und noch unabhängig von der Spannungsabhängigkeit von  $k_2$  Bedingungen formulieren, welche die Gleichungen 4.17 und 4.19 für einen gegebenen Datensatz ( $p_1$ ,  $p_h$ ,  $q$ ,  $U_0$ ,  $\Delta t_{2\text{min}}$  und  $\Delta t_{2\text{max}}$ ) erfüllen müssen. Durch die Ausrufungszeichen über den (Un)gleichheitszeichen werden die folgenden (Un)gleichungen als Forderung charakterisiert. Sie sind nicht *a priori* erfüllt.

**Bedingung 1.** Für einen gegebenen unterschwelligen Puls  $p_1$  muß die maximale  $Q_2$  Poolgröße  $[Q_2]_{\text{max}2}$ , die durch den zweiten Puls mit minimalem Abstand  $\Delta t_{2\text{min}}$  produziert wird, gleich der  $[Q_2]_{\text{max}2}$  sein, die durch einen zweiten Puls mit maximalem Abstand  $\Delta t_{2\text{max}}$  hervorgerufen wird.

Dies muß erfüllt sein, weil kürzere (als  $\Delta t_{2\text{min}}$ ) bzw. längere (als  $\Delta t_{2\text{max}}$ ) Pulsabstände kein *TRC* hervorrufen. Ein Paar gleich starker Pulse erreicht also mit dem Pulsabstand  $\Delta t_{2\text{min}}$  gerade eben bzw. mit dem Pulsabstand  $\Delta t_{2\text{max}}$  gerade noch den Schwellenwert  $[Q_2]_{\text{thres}}$ . Gl. 4.17 muß also für beide Pulsabstände die gleiche Lösung haben.

$$[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{max}}, p_1) - [Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}}, p_1) \stackrel{!}{=} [Q_2]_{\text{thres}} - [Q_2]_{\text{thres}} = 0 \quad (4.25 \text{ a})$$

**Bedingung 2.** Für  $\Delta t_2$ , die länger als  $\Delta t_{2\text{min}}$  aber kürzer als  $\Delta t_{2\text{max}}$  sind, muß  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2)$  höher als  $[Q_2]_{\text{thres}}$  sein, weil alle  $\Delta t_2 \in [\Delta t_{2\text{min}}, \Delta t_{2\text{max}}]$  ein *TRC* hervorrufen:

$$[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2, p_1) - [Q_2]_{\text{thres}} \stackrel{!}{>} 0 \quad \text{für alle } \Delta t_2 \in (\Delta t_{2\text{min}}, \Delta t_{2\text{max}}) \quad (4.25 \text{ b})$$

Weil  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2, p_1)$  eine stetige Funktion sein soll, folgt aus Gl. 4.25 a und b zusammen, daß  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2, p_1)$  mindestens ein lokales Maximum auf dem offenen Intervall  $(\Delta t_{2\text{min}}, \Delta t_{2\text{max}})$  haben muß.

**Bedingung 3.** Weil Experimente mit einem  $\Delta t_2$ , das kürzer als  $\Delta t_{2\text{min}}$  oder länger als  $\Delta t_{2\text{max}}$  ist, kein *TRC* auslösen, muß die  $[Q_2]_{\text{max}2}$ , welche bei diesen Experimenten hervorgerufen wird, niedriger als  $[Q_2]_{\text{thres}}$  sein:

$$[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2, p_1) - [Q_2]_{\text{thres}} \stackrel{!}{<} 0 \quad \text{wenn } \Delta t_2 < \Delta t_{2\text{min}} \text{ oder } \Delta t_2 > \Delta t_{2\text{max}} \quad (4.25 \text{ c})$$

**Bedingung 4.** Schließlich muß auch ein gerade eben überschwelliger Einzelpuls  $p_h$  eine Poolgröße  $[Q_2]_{\text{max}}$  hervorrufen, die gerade so hoch ist wie der Schwellenwert  $[Q_2]_{\text{thres}}$ .

$$[Q_2]_{\max 1}(p_h) - [Q_2]_{\text{thres}} = 0 \quad (4.25 \text{ d})$$

Diese letzte Bedingung ist der entscheidende Prüfstein für die Realisation der Spannungsabhängigkeit im Modell. Denn die beiden unterschwelligen Puls, die sich addieren, haben die gleiche Pulsstärke  $U$ , somit wird damit nur ein einziges  $k_2$ , das aus  $U$  berechnet wird (Gl. 4.3), für einen einzigen Spannungswert  $U$  getestet, woraus sich keinerlei Aussagen über die Art der Abhängigkeit von  $k_2$  von  $U$  machen lassen. Hierzu bedarf es mindestens eines weiteren Wertepaars mit einem anderen  $U$ .

Die stetige Kurve in Abb. 4.4 erfüllt durch ihren Verlauf offenbar die Bedingungen 1-3.

Gesucht sind nun also Werte von  $k_1$ ,  $k_3$  und  $c_2$  (definiert in Gl. 4.8) mit denen

1. die Funktion  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2, p_1)$  (Gl. 4.17) die Bedingungen 1-3 erfüllt,
2. die Funktion  $[Q_2]_{\max 1}(p_h)$  (4.19) die Bedingung 4 erfüllt und
3. die gewählte Form der Spannungsabhängigkeit von  $k_2$  (Gl. 4.3) befriedigt wird.

#### **4.5 Numerische Bestimmung der Ratenkonstanten durch ein Fitprogramm**

In diesem Abschnitt sollen mit Hilfe eines numerischen Algorithmus die Werte von  $k_1$ ,  $k_3$  (Abb. 4.1) und  $[Q_2]_{\text{thres}}$  sowie die Konstanten  $c_2$  in Gl. 4.3 bestimmt werden.  $k_2$  wird aus  $c_2$ ,  $q$ , und  $U$ ,  $U_0$  nach Gl. 4.3 berechnet, wobei die Parameter  $q$  und  $U_0$  aus den Meßwerten durch Fitten der Reiz-Mengen Kurve (Abb. 3.12) bestimmt werden und  $U$  durch das Experiment vorgegeben ist. Deshalb ist  $c_2$  der einzige freie Parameter bei der Bestimmung von  $k_2$  und wird daher als Fitparameter benutzt.

Als experimentelles Ausgangsmaterial dienen dabei folgende gemessene Größen:

1. Ein gerade überschwelliger Einzelpuls  $p_h$  mit Dauer  $\Delta t_{1h}$  und der Stärke  $u_h$ . Dieser liefert den Wert  $[Q_1]_{\max 1}(p_h)$ , der gleich dem Schwellenwert sein soll.
2. Ein Paar unterschwelliger Pulse  $p_1$  mit den identischen Dauern  $\Delta t_{11}$  und  $\Delta t_{31}$  und den identischen Intensitäten  $u_1$ , für welche der Verlauf  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2)$  in Abhängigkeit vom Pulsabstand  $\Delta t_2$  berechnet wird.
3. Die Rheobase  $U_0$  der Reiz-Mengen Kurve der Zelle

4. Das Integral  $q$  der Pulstärke  $U$  über die Reizdauer  $\Delta t$  in der Reiz-Mengen Kurve

5. Der Minimalabstand  $\Delta t_{2\min}$  für einen einen  $TRC$  auslösenden zweiten Puls

6. Der Maximalabstand  $\Delta t_{2\max}$  für einen einen  $TRC$  auslösenden zweiten Puls

In Anhang A wurde der Zeitverlauf für die Poolgrößen  $[Q_1](t)$  und  $[Q_2](t)$  in dem in Abb. 4.1 gezeigten Modell hergeleitet. Das Problem ist, daß der Zeitverlauf der Poolgrößen nicht ermittelt werden kann. Das Experiment liefert nur sehr wenig, nämlich die Zeitpunkte, wann eine  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung und damit ein AP ausgelöst wird. Der Fitalgorithmus kann sich also nicht auf die Approximation einer Funktion stützen.

Die Bedingungen (Gln. 4.25 a-d) seien hier noch einmal zusammengestellt (wobei  $p_1$  bzw.  $p_h$  die Zuordnung zum Doppel- oder Einzelpulsexperiment beschreibt):

1.  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\max}, p_1) - [Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\min}, p_1) \stackrel{!}{=} [Q_2]_{\text{thres}} - [Q_2]_{\text{thres}} = 0$
2.  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2, p_1) - [Q_2]_{\text{thres}} \stackrel{!}{>} 0$  für alle  $\Delta t_2 \in [\Delta t_{2\min}, \Delta t_{2\max}]$
3.  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2, p_1) - [Q_2]_{\text{thres}} \stackrel{!}{<} 0$  wenn  $\Delta t_2 < \Delta t_{2\min}$  oder  $\Delta t_2 > \Delta t_{2\max}$
4.  $[Q_2]_{\max 1}(p_h) - [Q_2]_{\text{thres}} \stackrel{!}{=} 0$

Die Funktion, welche die Bedingungen 1-3 erfüllen soll, ist definiert in Gl. 4.17:

$$[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2) = b_{30} - b_{31}(\Delta t_2) \cdot e^{-k_3 \cdot (t_{\max 2} - t_{30})} - b_{32}(\Delta t_2) \cdot e^{-(k_1 + k_2)(t_{\max 2} - t_{30})}$$

$b_{31}(\Delta t_2)$  und  $b_{32}(\Delta t_2)$  können mit Hilfe der Gleichungen 4.15 und 4.16 ersetzt werden. Das führt mit der Annahme von  $t_{\max 2}(\Delta t_2) = t_0 + \Delta t_1 + \Delta t_2 + \Delta t_3$  auf

$$[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2) = b_{30} \left( 1 - e^{-k_3 \cdot \Delta t_3} \right) + \frac{(a_{30} - 1)k_2}{k_3 - k_1 - k_2} \left( e^{-k_3 \cdot \Delta t_3} - e^{-(k_1 + k_2) \Delta t_3} \right) + \left( \frac{(1 - [Q_1]_{20})k_2}{k_3 - k_1 - k_2} \left( e^{-(k_1 + k_2) \Delta t_3} - e^{-k_3 \cdot \Delta t_3} \right) \right) e^{-k_1 \Delta t_2} + [Q_2]_{20} e^{-k_3 \cdot \Delta t_3} e^{-k_3 \cdot \Delta t_2}. \quad (4.26)$$

$a_{30}$  und  $b_{30}$  in Gl. 4.26 sind Konstanten. Ihr Wert ist gegeben durch die Gln. 4.6 und 4.8. Der Anfangswert von  $Q_1$  zu Beginn des zweiten Intervalls ist auch konstant, da nur  $\Delta t_2$  verändert wird. Er kann daher aus der Vorgeschichte von  $[Q_1]$  im Intervall  $\Delta t_1$  durch die Gln. 4.4, 4.6

und 4.7 ermittelt werden. Die Funktion  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2)$  ist nach Gl. 4.26 somit eine Exponentialfunktion zweiter Ordnung mit konstanten Koeffizienten. Sie kann daher maximal einen Extremwert haben.

Bedingung 4 (Gl. 4.25 d) fordert nun, daß ein einzelner überschwelliger Puls  $p_h$  genau den Schwellenwert  $[Q_2]_{\text{thres}}$  erreicht. Die durch Gl. 4.3 beschriebene Spannungsabhängigkeit von  $k_2(U)$  ist aber gerade so gewählt, daß für einen unterschwelligen Einzelpuls  $p_1$  der Länge  $2\Delta t_{11}$  gilt

$$[Q_2]_{\max 1}(2\Delta t_{11}, p_1) < [Q_2]_{\max 1}(p_h) = [Q_2]_{\text{thres}}. \quad (4.27)$$

Damit ist der erlaubte Verlauf der Funktion  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2, p_1)$  noch weiter eingeschränkt: Denn der Wert  $[Q_2]_{\max 1}(p_1, 2\Delta t_1)$ , welcher unter dem Schwellenwert bleiben muß, ist genau der Randwert von  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2, p_1)$  (Gl. 4.17) an der Stelle  $\Delta t_2 = 0$ . Und an den Stellen  $\Delta t_{2\min}$  und  $\Delta t_{2\max}$  soll  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2, p_1)$  aufgrund der Bedingung 1 (Gl. 25 a) den Wert  $[Q_2]_{\text{thres}}$  haben. Da sie nach Gl. 4.26 nur einen Extremwert haben kann, muß sie dann auf dem Intervall  $(\Delta t_{2\min}, \Delta t_{2\max})$  an jeder Stelle größer als  $[Q_2]_{\text{thres}}$  und auf dem Intervall  $(\Delta t_{2\max}, \infty)$  überall kleiner als  $[Q_2]_{\text{thres}}$  sein. Damit sind die Bedingungen 2 und 3 (Gln. 25 b und c) automatisch erfüllt.

Somit lassen sich die 4. Bedingungen für den Fitalgorithmus von  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2, p_1)$  und  $[Q_2]_{\max 1}(p_h)$  Gl. 4.23 auf folgende Forderung verkürzen:

$$[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\max}, p_1) \stackrel{!}{=} [Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\min}, p_1) \stackrel{!}{=} [Q_2]_{\max 1}(p_h) \quad (4.28)$$

### 4.5.1 Konstruktion einer Fehlerfunktion

Mit Gl. 4.28 führen die oben diskutierten Bedingungen auf die folgende Fehlerfunktion:

$$f_{err}(k_1, k_3, c_2) = \frac{1}{[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\min})} \left( \begin{aligned} & ([Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\max}) - [Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\min}))^2 \\ & + ([Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\max}) - [Q_2]_{\max 1}(p_h))^2 \\ & + ([Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\min}) - [Q_2]_{\max 1}(p_h))^2 \end{aligned} \right) \quad (4.29)$$

Der Faktor  $1/[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\min})$  führt eine Art relativen Fehler ein. Das ist notwendig, damit das Fitprogramm nicht durch Herunterskalieren der Pool-Konzentrationen die Fehlersumme minimalisiert.  $[Q_2]_{\max 2}$  wird mit Hilfe der im Anhang A ermittelten Funktion berechnet.

Die in Gl. 4.29 definierte Fehlerfunktion wurde in ein selbst geschriebenes C/C++ Programm (Watcom C++) implementiert, welches mit Hilfe des in den Gln. 4.1 – 4.21 definierten Modells aus einem gemessenen Datensatz ( $p_1$ ,  $p_h$ ,  $q$ ,  $U_0$ ,  $\Delta t_{2\min}$  und  $\Delta t_{2\max}$ ) Werte für die Fitparameter  $k_1$ ,  $k_3$  und  $c_2$  und damit auch für den Schwellenwert  $[Q_2]_{\text{thres}}$  bestimmte.

Dabei wurden durch entsprechende Gewichtung von negativen Werten von  $k_1$ ,  $k_3$ ,  $c_2$  negative Werte von  $[Q_2]_{\text{thres}}$  ausgeschlossen.

Die zur Ableitung der Gl. 4.26 gemachte Annahme, daß der Maximalwert von  $[Q_2]$  während des zweiten von zwei aufeinanderfolgenden unter-schwelligeren Pulsen immer am Ende des Pulses erreicht wird ( $t_{\max 2}(\Delta t_2) = t_0 + \Delta t_1 + \Delta t_2 + \Delta t_3$ ) fand in das Programm keinen Eingang, wurde aber durch die Fitergebnisse für die gemessenen Datensätze bestätigt.

Ergebnisse mit diesem Fitansatz werden hier nicht gezeigt, denn unterschiedliche Startwerte ergaben unterschiedliche Ergebnisse für die freien Parameter. Das zeigt, daß die Bedingungen der Gln. 4.25 a-d nicht für eine eindeutige Bestimmung ausreichen.

### 4.5.2 Verschärfung der Fit-Bedingungen

#### 4.5.2.1 Einfluß der Höhe des Schwellenwerts auf das Fitergebnis

Die Bedingungen der Gleichung 4.29 reichen nicht aus, um die Fitergebnisse eindeutig festzulegen. Möglicherweise spielt dabei die unbekannte Höhe des Schwellenwerts eine Rolle. Um diese Abhängigkeit zu untersuchen, wurde die Fitfunktion so modifiziert, daß der

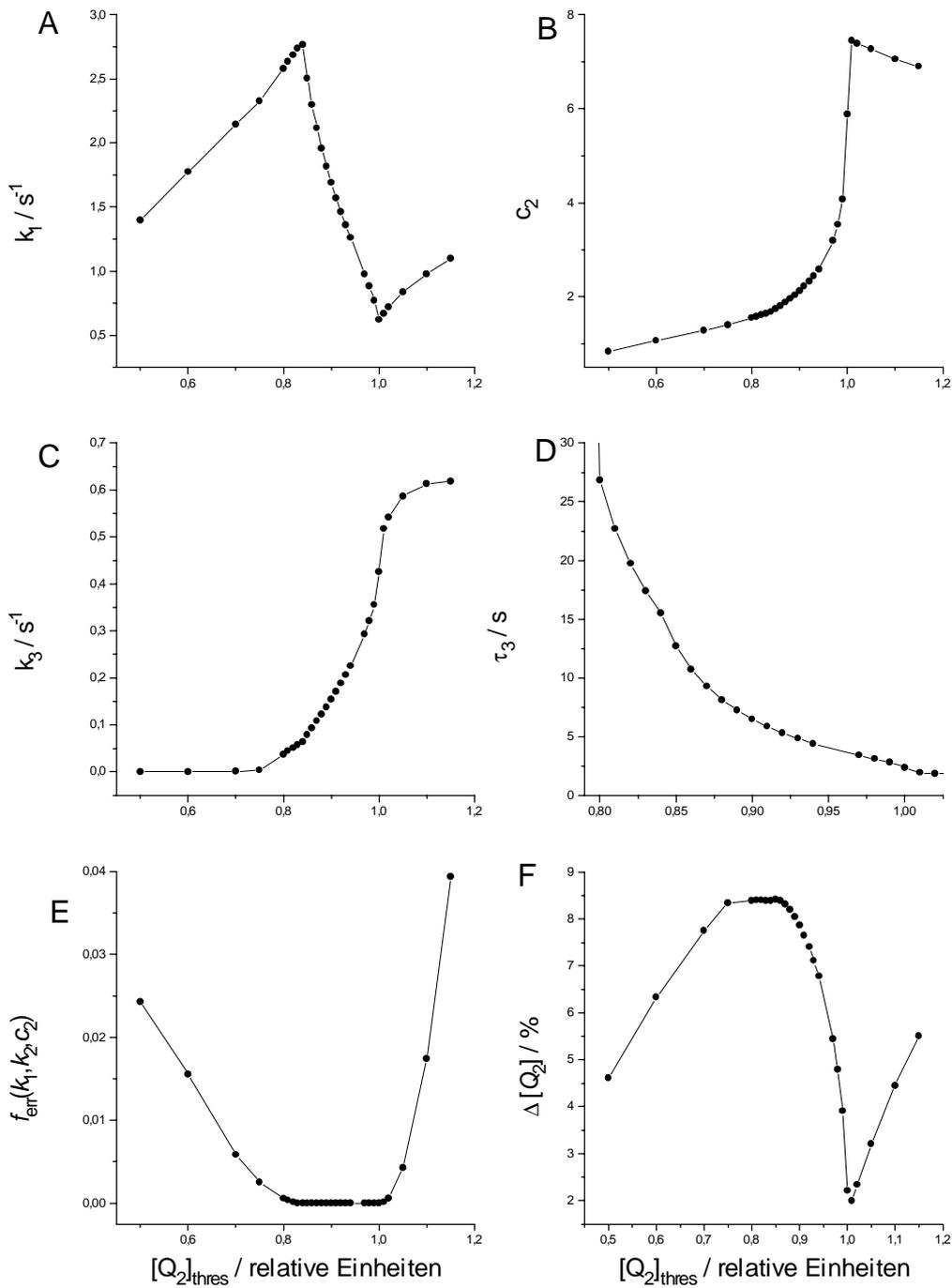
Wert von  $[Q_2]_{\text{thres}}$  vorgegeben werden konnte. Dies könnte man machen, indem  $[Q_2]_{\text{thres}}$  direkt in Gl. 4.29 eingesetzt wird. Bei vorgegebenen Werten von  $[Q_2]_{\text{thres}}$ , die nicht erreicht werden können, wird dann aber nicht berücksichtigt, daß die Streuung der Werte  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}}, p_1)$ ,  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}}, p_1)$  und  $[Q_2]_{\text{max}1}(p_h)$  minimiert werden soll. Flexibler, in dem Sinne, das die Freiheit besteht, daß  $[Q_2]_{\text{thres}}$  nicht genau angenommen werden muß, ist die unten benutzte Lösung, die Abweichung von  $[Q_2]_{\text{thres}}$  vom Sollwert in die Fehlersumme aufzunehmen.

$$\begin{aligned}
 f_{\text{err}2}(k_1, k_3, c_2) = & \\
 & ([Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{max}}) - [Q_2]_{\text{min}2}(\Delta t_{2\text{min}}))^2 \\
 & + ([Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{max}}) - [Q_2]_{\text{max}1}(p_h))^2 \\
 & + ([Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}}) - [Q_2]_{\text{max}1}(p_h))^2 \\
 & + [Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{max}}) - [Q_2]_{\text{thres}})^2 \\
 & + ([Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}}) - [Q_2]_{\text{thres}})^2 \\
 & + ([Q_2]_{\text{max}1}(p_h) - [Q_2]_{\text{thres}})^2 \tag{4.30}
 \end{aligned}$$

Da die Einführung der Abweichung vom Sollwert die Möglichkeit verhindert, daß das Fitprogramm durch Herunterskalieren „wegläuft“, kann auf die Einführung eines relativen Fehlers wie in Gl. 4.29 verzichtet werden.

Mit dieser modifizierten Fitfunktion wurden dann für einen Satz von Meßdaten ( $p_1 = (0,4 \text{ V}; 200 \text{ ms})$ ,  $p_h = (1 \text{ V}; 50 \text{ ms})$ ,  $q = 26.8 \text{ nVs}$ ,  $U_0 = 0.32$ ,  $\Delta t_{2\text{min}} = 500 \text{ ms}$  und  $\Delta t_{2\text{max}} = 1500 \text{ ms}$ ) und verschiedene, vorgegebene Schwellenwerte  $[Q_2]_{\text{thres}}$  die Parameter  $k_1$ ,  $c_2$  und  $k_3$  berechnet. Das Ergebnis ist in Abb. 4.5 dargestellt. In Abb. 4.5 A-D sind die berechneten Parameter  $k_1$  (A),  $c_2$  (B) und  $k_3$  (C) sowie der Kehrwert von  $k_3$ ,  $\tau_3$  (D), und in Abb. 4.5 E der Endwert der Fehlerfunktion  $f_{\text{err}2}(k_1, k_3, c_2)$  in Abhängigkeit vom vorgegebenen Schwellenwert aufgetragen.

In Abb. 4.5 E erkennt man, daß offenbar nur bei Schwellenwerten zwischen 0,82 und 1 (in Vielfachen von  $[Q_1]_0 = 1$ ) die Fitbedingungen optimal erfüllt werden können.



**Abbildung 4.5:** Abhängigkeit des Fitergebnisses vom Schwellenwert. Ausgehend vom Meßdatensatz ( $p_1 = (0,4 \text{ V}; 200 \text{ ms})$ ,  $p_h = (1 \text{ V}; 50 \text{ ms})$ ,  $q = 26.8 \text{ nVs}$ ,  $U_0 = 0,32$ ,  $\Delta t_{2\text{min}} = 500 \text{ ms}$  und  $\Delta t_{2\text{max}} = 1500 \text{ ms}$ ) wurden für vorgegebene Schwellenwerte die Ratenkonstanten  $k_1$  (A) und  $k_3$  (C) aus Abb.4.1, die Konstante  $c_2$  (B) aus Gl. 4.3 und der Kehrwert  $\tau_3$  (D) von  $k_3$  durch das Fitprogramm berechnet. In E ist für den jeweiligen Schwellenwert der Wert der Fehlerfunktion  $f_{\text{err}2}(k_1, k_3, c_2)$  (Gl. 4.28) nach der jeweils letzten Iteration aufgetragen. F zeigt die relative Abweichung zwischen dem Schwellenwert und dem mit den gefundenen Werten von  $k_1, k_3$  und  $c_2$  berechneten  $[Q_2]$  von einem gemessenen unterschwelligen Wert in Abhängigkeit von dem vorgegebenen Schwellenwert.

Offenbar sind aber gerade in diesem Bereich die Parameter  $k_1$  (Abb. 4.5 A),  $c_2$  (4.5 B) und  $k_3$  (4.4 C) extrem vom vorgegebenen Schwellenwert abhängig. Alle drei Parameter sind in diesem Bereich stark mit dem Schwellenwert korreliert und variieren um etwa eine Größenordnung, während der Schwellenwert lediglich um ca. 20 % verändert wird. Die Ursache für diese starke Abhängigkeit liegt in der komplexen Abhängigkeit der beiden zu fittenden Funktionen  $[Q_2]_{\max 1}$  und  $[Q_2]_{\max 2}$  von den Fitparametern und kann nicht einfach aufgelöst werden.

#### 4.5.2.2 Einführung einer weiteren Beschränkung der Freiheitsgrade

In obigen Fits geben verschiedene vorgegebene Werte für  $[Q_2]_{\text{thres}}$  sinnvolle Lösungen. Um ein Kriterium zu erhalten, welche der Lösungen nun diejenige ist, die den tatsächlichen Verhältnissen in der Zelle am nächsten kommt, habe ich eine Art Zuverlässigkeitsmaß eingeführt.

Für jeden der berechneten Schwellenwerte wird das Verhältnis zwischen der Höhe des Schwellenwertes und der Differenz zwischen dem Schwellenwert und der erreichten Konzentration  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2)$  nach einem sicheren unterschwelligen Puls berechnet. Als Vergleichssystem wird eine Reizung mit einem unterschwelligen Doppelpuls mit dem Pulsabstand 0 gewählt. In allen Experimenten mit minimalem Pulsabstand  $\Delta t_{2\min}$  war dieser Puls ein sicherer unterschwelliger Stimulus. Die Idee dahinter ist, daß ein Signaltransduktionssystem eine möglichst deutliches Signal erzeugen sollte, welches von der nächsten Stufe der Signalkaskade erkannt wird, um Fehlalarm zu vermeiden. Bei einem echten Schwellenwert ist es selbstverständlich ohne Bedeutung, wie deutlich er überschritten oder unterschritten wird – ein Schwellenwert ist ein Schwellenwert. Man darf jedoch davon ausgehen, daß ein Schwellenwert in Pflanzen nicht so exakt realisiert werden kann wie in einer elektronischen Triggerschaltung. Da Pflanzenzellen komplexe Systeme sind, können die Konzentrationen aller Substanzen ständig um kleine Beträge schwanken.

Und der Quotient

$$\Delta[Q_2]_{\text{thres}} = \frac{[Q_2]_{\max 2}(0) - [Q_2]_{\text{thres}}}{[Q_2]_{\text{thres}}} \quad (4.31)$$

stellt ein Maß dafür da, bei welcher Lage des Schwellenwertes  $[Q_2]_{\text{thres}}$  die Änderung von  $[Q_2]$  zwischen einem noch sicher unterschwelligen Ereignis und einem gerade überschwelligen Ereignis besonders deutlich sein muß und bei welchem sie graduell sein kann.

Um festzustellen, ob durch dieses Kriterium ein möglicher Schwellenwert eindeutig ausgezeichnet ist, wurde für die in den Abb. 4.5 A - C gezeigten Parameter  $\Delta[Q_2]_{\text{thres}}$  (aus Gl. 4.31) berechnet.

Wie Abb. 4.5 F zeigt, hat  $\Delta[Q_2]_{\text{thres}}$  bei  $[Q_2]_{\text{thres}} = 0.85$  (in Vielfachen von  $[Q_1]_0$ ) ein Maximum. Die erforderliche Änderung der  $[Q_2]$  zwischen dem sicher unterschwelligen Puls mit  $\Delta t_2 = 0$  und dem gerade überschwelligen Doppelpuls mit  $\Delta t_2 = \Delta t_{2\text{min}}$  beträgt für diesen Schwellenwert ca. 8 %. Danach fällt  $\Delta[Q_2]_{\text{thres}}$  auf Werte von 2 % bei einem Schwellenwert von 1. Für etwas kleinere Schwellenwerte ( $0,75 < \Delta[Q_2]_{\text{thres}} < 0,85$ ) ist der Unterschied nicht so deutlich. Noch kleinere Schwellenwerte sind uninteressant, weil es für diese keine sinnvolle Lösung des Fits gibt.

Durch die Gl. 4.31 wird somit ein eindeutiges Kriterium definiert. Damit das Fitprogramm die Parameter findet, für welche die Differenz zwischen einem unterschwelligen Signal und einem überschwelligen Signal am größten ist, wurde die Fitfunktion Gl. 4.29 um einen Summanden erweitert, welcher dafür sorgt, daß die Fehlersumme um so größer wird, je kleiner die relative Abweichung des unterschwelligen Werts vom Schwellenwert wird. Die Fitfunktion lautet dann:

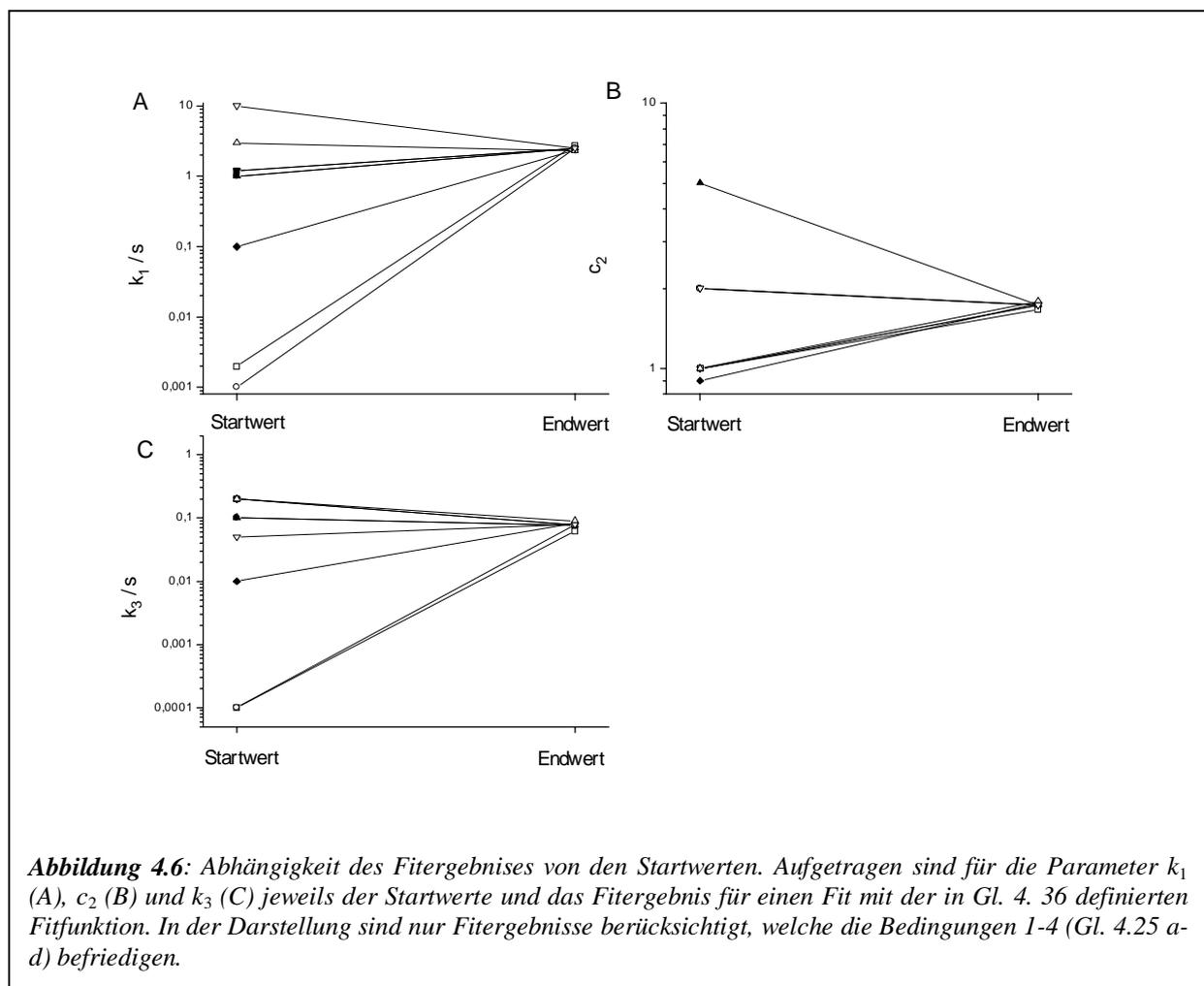
$$\begin{aligned}
 f_{err}(k1, k3, c2) = & \\
 \Delta t_{2\text{max}} \left( \right. & \left. \begin{aligned} & ([Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{max}}) - [Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}}))^2 \\ & + ([Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{max}}) - [Q_2]_{\text{max}1}(p_h))^2 \end{aligned} \right) & (4.32) \\
 + ([Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}}) - [Q_2]_{\text{max}1}(p_h))^2 & \\
 + \left[ [Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}}) / ([Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}}) - [Q_2]_{\text{max}2}(0)) \right]^2 &
 \end{aligned}$$

Der zusätzliche Gewichtungsfaktor  $\Delta t_{2\text{max}}$  in obiger Gl. für die Abweichungen  $([Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{max}}) - [Q_2]_{\text{min}2}(\Delta t_{2\text{min}}))^2$  und  $([Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{max}}) - [Q_2]_{\text{max}1}(p_h))^2$  erwies sich aus folgendem Grund als nötig: Das Bestreben, die relative Abweichung von  $[Q_2]_{\text{max}2}(0)$  und  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}})$  möglichst groß werden zu lassen, führt dazu, daß der Anstieg von  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2)$  auf dem Intervall  $[0, \Delta t_{2\text{min}}]$  durch den Fit möglichst steil festgelegt wird. Dadurch droht aber der Abfall von  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2)$  jenseits des Maximums von  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_2)$  zu flach zu werden, weil die Abweichung von  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{max}})$  gegenüber  $[Q_2]_{\text{max}1}(p_h)$  und  $[Q_2]_{\text{max}2}(\Delta t_{2\text{min}})$  gegenüber dem letzten Summanden in Gl. 4.32 klein wird. Der Fit soll aber gerade Lösungen finden, für die diese Werte identisch sind. Deshalb müssen Abweichungen zwischen diesen Werten besonders gewichtet werden, was mit dem Faktor  $\Delta t_{2\text{min}}$  erfolgt.

Die Forderung, die relative Abweichung zwischen einem unterschwelligen Puls und dem Schwellenwert zu maximieren, verhindert gleichzeitig, daß das Fitprogramm durch Herunterskalieren „wegläuft“. Auf den zusätzlichen relativen Fehler aus Gl. 4.29 kann daher wieder verzichtet werden.

#### 4.5.3 Abhängigkeit des Fitergebnisses von den Startwerten

Um das Konvergenzverhalten der Fitfunktion 4.32 zu studieren, testete ich die für einen jeweils festen Datensatz die Abhängigkeit des Fitergebnisses für verschiedene Startwerte. Damit der Fit konvergiert, muß der Startwert von  $c_2$  mindestens 0,9 betragen. Für die Fitparameter  $k_1$  und  $k_3$  gibt es hingegen keine klaren Kriterien. Die Startwerte der beiden Parameter müssen lediglich zueinander entweder die relative Größe haben, oder einer der beiden Werte muß von der Größenordnung sein, welche der Wert bei einem die Bedingungen 1 - 4 erfüllenden Fitergebnis hat.

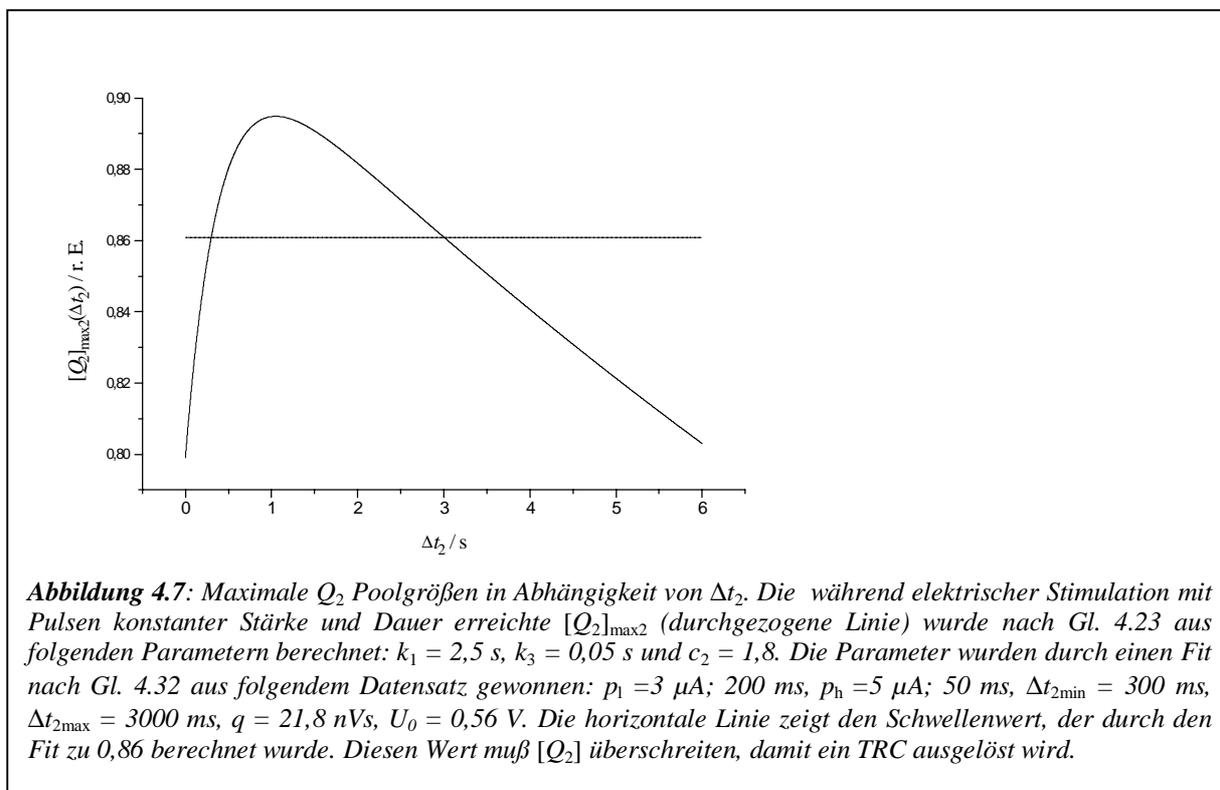


Wenn der Fit mit der Fehlerfunktion 4.32 zu einem Ergebnis konvergiert, welches die Bedingungen 1 - 4 erfüllt, findet er stets das gleiche Ergebnis (Abb. 4.6).

Das Fitergebnis ist also unabhängig von den Startwerten der Fitparameter, wenn die Startwerte einen konvergenten Fit zulassen.

#### 4.5.4 Ergebnisse der numerischen Berechnung der Ratenkonstanten

Mit der Fitgleichung 4.32 wurden schließlich für drei Zellen, an denen im Doppelpulsexperiment ein  $\Delta t_{2\min}$  auftrat die Ratenkonstanten  $k_1$  und  $k_3$  sowie die Eichkonstante  $c_2$  aus Gl. 4.3 berechnet. Es ist zu berücksichtigen, daß die wahren Werte von  $\Delta t_{2\min}$  und  $\Delta t_{2\max}$  nicht bekannt sind, weil die Intervalle zwischen im Experiment gewählten Abständen  $\Delta t_2$  von endlicher Länge sind. Deshalb wurde der Fit für jede Zelle mit vier unterschiedlichen Kombinationen von Werten für  $\Delta t_{2\max}$  und  $\Delta t_{2\min}$  durchgeführt. Dabei diente als  $\Delta t_{2\min}$  entweder der längste Pulsabstand  $\Delta t_2$ , der gerade eben noch keinen *TRC* hervorrief oder das kürzeste  $\Delta t_{2\max}$ , das gerade eben ein *TRC* hervorrief. Entsprechend diente als  $\Delta t_{2\max}$  entweder das längste  $\Delta t_2$ , das gerade noch ein *TRC* hervorrief, oder das kürzeste, das kein *TRC* mehr hervorrief. Diese vier Werte lassen vier sinnvolle Kombinationen zu. Die

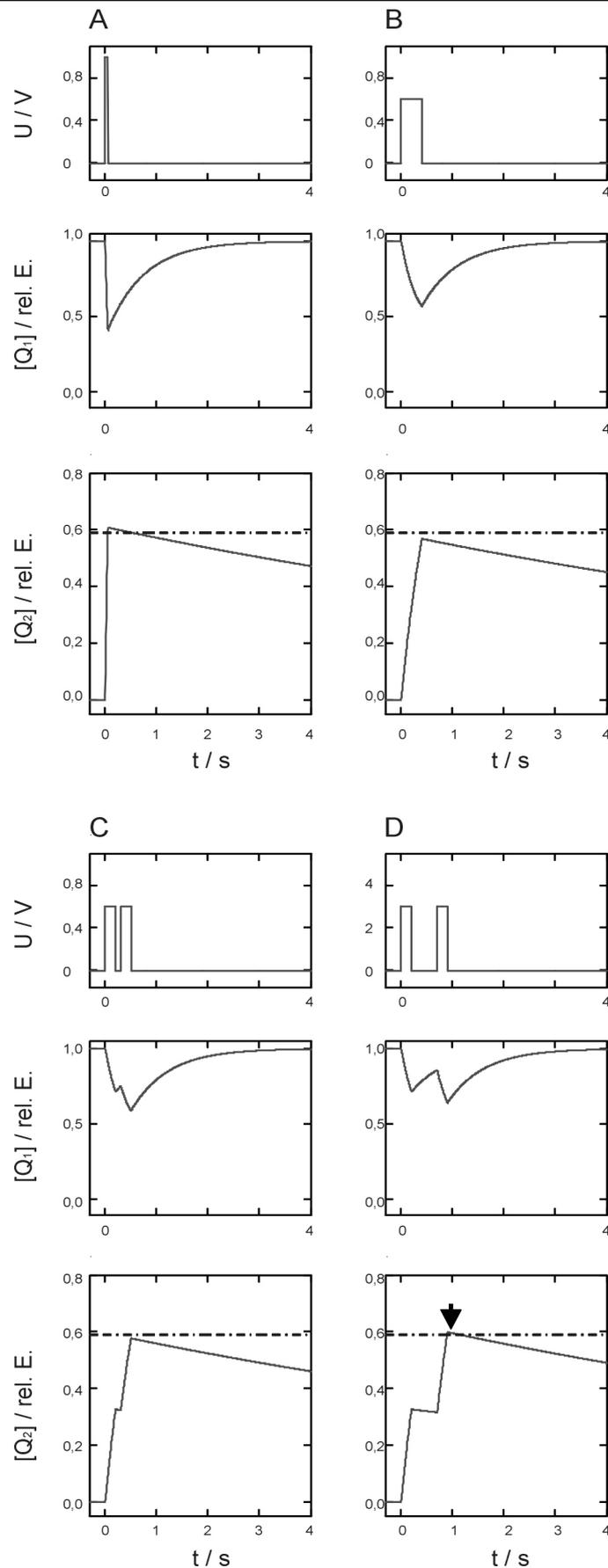


Datensätze und die aus den jeweiligen vier Fits gemittelten Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 angeführt.

In Abb. 4.7 ist  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_2)$  für einen Satz der so berechneten Parameter dargestellt. Die Funktion erfüllt die Bedingungen und stimmt gut mit den Daten überein.

**Tabelle 4.1:** Übersicht über gemessene Pulsdaten und daraus in einem gemeinsamen Fit (nach Gl. 4.32) der Einzel- und Doppelpulsexperimente bestimmten Zeitkonstanten. In den beiden oberen Zeilen sind die Versuchsbedingungen notiert. Die dritte Zeile gibt die experimentell bestimmten Werte für die Pulsabstände  $\Delta t_{2\min}$  bzw.  $\Delta t_{2\max}$  an, bei denen gerade eben oder gerade eben nicht ein TRC ausgelöst wurde. In der vierten und fünften Zeile stehen die mittels Fit nach Gl. 3.12 aus den Daten gewonnene Werte von  $q$  bzw.  $U_0$ . In den darauffolgenden sechs Zeilen sind die gefitteten Parameter bzw. die daraus berechneten Zeitkonstanten ( $k_2$ ) und die Lebensdauer ( $\tau_3$ ) von  $Q_2$  notiert. In der letzten Zeile steht der durch das Fitprogramm für eine maximale Differenz von  $[Q_2]_{\max 2}(0)$  und  $[Q_2]_{\max 2}(\Delta t_{2\min})$  berechnete Schwellenwert  $[Q_2]_{\text{thres}}$ .

Versuch vom	27.03.1999	22.08.1999	09.11.2000
Überschwelliger Einzelpuls ( $p_h$ ) (Abb. 4.8 A)	1 V; 50 ms	1 V; 20 ms	1 V; 50 ms
Unterschwellige Pulse ( $p_l$ ) (Abb. 4.8 B-D) mit Abstand $\Delta t_2$	0,6 V; 200 ms	0,5 V; 200 ms	0,4 V; 200 ms
$(\Delta t_{2\min}); (\Delta t_{2\max}) / \text{ms}$	(250/300);(3000/4000)	(50/100);(500/1000)	(250/500);(1500/1750)
$q / \text{nVs}$	21,8	10,3	32,7
$U_0 / \text{V}$	0,56	0,48	0,35
$k_1 / \text{s}^{-1}$	$2,45 \pm 0,19$	$3,27 \pm 0,06$	$2,45 \pm 0,48$
$k_3 / \text{s}^{-1}$	$0,051 \pm 0,005$	$0,24 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,02$
$c_2$	$1,83 \pm 0,03$	$1,82 \pm 0,11$	$1,96 \pm 0,07$
$k_2(p_h) / \text{s}^{-1}$	$36,5 \pm 0,63$	$97 \pm 2$	$36,4 \pm 2,3$
$k_2(p_l) / \text{s}^{-1}$	$3,04 \pm 0,05$	$3,24 \pm 0,05$	$3,03 \pm 0,19$
$\tau_3 / \text{s}$	$19,8 \pm 1,8$	$4,15 \pm 0,45$	$11,0 \pm 2,29$
$[Q_2]_{\text{thres}}$	$0,87 \pm 0,00$	$0,87 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,02$



**Abbildung 4.8:** Berechnung der Antworten des  $Q_1$ -Pool (Mitte), und der Konzentration von  $Q_2$  (Unten) auf die in der obersten Reihe gezeigten Einzel- und Doppelpulse. Der zur Freisetzung des  $Ca^{2+}$  zu überwindende Schwellenwert ist als gepunktete horizontale Linie dargestellt. Die eine effektive Stimulation in **A** und **D** (Pfeil) und keine ausreichende Stimulation in **B** und **C** zeigenden Zeitverläufe der Poolgrößen von  $Q_1$  und  $Q_2$  wurden in allen 4 Beispielen mit folgenden Parametern berechnet:  $k_1 = 1,4 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_3 = 0,064 \text{ s}^{-1}$ ,  $c_2 = 1$ ,  $q = 23,4 \text{ nVs}$ ,  $U_0 = 0,55 \text{ V}$ . Pulsstärken / Dauern der Pulse sind  $1 \text{ V} / 100 \text{ ms}$  in **A**,  $0,6 \text{ V} / 400 \text{ ms}$  in **B** und  $0,6 \text{ V} / 200 \text{ ms}$  in **C**, **D**. Pulsabstände sind  $100 \text{ ms}$  in **C** und  $500 \text{ ms}$  in **D**.

Die Abb. 4.8 A-D zeigen, daß das Modell geeignet ist, um die vorliegenden Daten im Kern zu beschreiben: Ein Paar unterschwelliger Pulse kann ein *TRC* hervorrufen, wenn  $\Delta t_2$  nicht zu lang ist. Die  $Q_2$  Konzentration hat während der Pause zwischen den Pulsen zwar abgenommen, aber der zweite Puls liefert genügend neues  $Q_2$ , um den Schwellenwert zu überschreiten.

Ein Paar von unterschwelligen Pulsen ist nicht in der Lage, ein *TRC* hervorzurufen, wenn der Abstand  $\Delta t_2$  zwischen den Pulsen zu kurz ist (Abb. 4.8 C). In diesem Fall hat die Stimulation keine Wirkung, weil die verfügbare Menge  $Q_1$  so gering ist, daß im zweiten Puls nicht in ausreichendem Maß  $Q_2$  produziert werden kann, um den Schwellenwert zu erreichen.

#### **4.6 Simulation der Reiz-Mengen Relationen für einen Einzelpuls und für den zweiten von zwei aufeinanderfolgenden unterschwelligen Pulsen**

Mit den im vorigen Abschnitt bestimmten Werten von  $k_1$ ,  $k_3$  und  $c_2$  können mit dem Modell in Abb. 4.1 nun wiederum die gemessenen Reiz-Mengen Kurven simuliert werden.

##### **4.6.1 Simulation der Reiz-Mengen Relation für einen Einzelpuls**

Zur Simulation der Reiz-Mengen Relation für einen Einzelpuls wird Gl. 4.20 benutzt. Die Gleichung liefert die maximale Poolgröße von  $[Q_2]$ , die durch einen Einzelpuls hervorgerufen wird:

$$[Q_2]_{\max 1} = b_{10} + b_{11} e^{-(k_1+k_2)(t_{\max 1}-t_{10})} + b_{12} e^{-k_3(t_{\max 1}-t_{10})} \quad (4.33)$$

Die Koeffizienten  $b_{10}$ ,  $b_{11}$ ,  $b_{12}$  sind für  $i=1$  durch die Gln. 4.8 - 4.10 gegeben.  $t_{\max 1}$  kann nach Gl. 4.18 berechnet werden. Die Ratenkonstanten  $k_1$  und  $k_3$  müssen für jeden Datensatz durch den Fit nach Gl. 4.32 bestimmt werden.  $k_2$  ist für jeden Datensatz mit der aus dem Datensatz gefitteten Eichkonstante  $c_2$  (Gl. 4.3):

$$k_2(U) = \frac{c_2(U - U_0)}{q} \quad (4.34)$$

definiert.  $U_0$  und  $q$  sind durch die gemessenen Daten festgelegt (Fit der Daten nach Gl. 3.12, Reiz-Mengen Kurve).

Damit für die Spannung  $U$  bei einer vorgegebenen Pulslänge  $\Delta t_1$  dieser Schwellenwert erreicht wird, muß nach Gl. 4.33 gelten:

$$[Q_2]_{thres} = b_{10} + b_{11} e^{-(k_1+k_2(U))(t_{max 1}-t_{10})} + b_{12} e^{-k_3(t_{max 1}-t_{10})} \quad (4.35)$$

Jetzt kann für ein beliebiges  $\Delta t_{1k}$  z.B. durch Intervallschachtelung ein  $u_{hk}$  so bestimmt werden, daß  $k_2(u_{hk})$  genau den Wert annimmt, für den Gl. 4.35 erfüllt wird.

Für n Pulslängen  $\Delta t_{1k} = 2^k$  ms mit  $k = 1 \dots n$  erhält man auf diese Art eine aus n Wertepaaren  $(\Delta t_{1k}, u_{hk})$  bestehende Reiz-Mengen Relation. Die Wahl der Pulslängen nach der Form  $2^k$  bietet sich an, weil erwartet wird, daß die simulierte Reiz-Mengen Relation wieder eine Hyperbel liefert. Drei solcher Wertepaare einer simulierten Reiz-Mengen Relation zeigt Abb. 4.9 A als simulierte Pulsprotokolle.

Durch Fit nach Gl. 3.12 (Reiz-Mengen Gesetz)

$$U = U_0 - \frac{\Delta t}{q} \quad (4.36)$$

können hieraus nun wieder die Parameter  $U_{01}$  und  $q_1$  (1 für ersten Puls) gewonnen werden.

Wenn die Spannungsabhängigkeit von  $k_2$  richtig modelliert ist, sollten die Werte nicht signifikant von denen verschieden sein, die man durch den direkten Fit der Daten erhalten hat.

#### 4.6.2 Simulation der Reiz-Mengen Relation für den zweiten von zwei unterschwelligen Pulsen

Auf die gleiche Weise wie für einen Einzelpuls kann die Reiz-Mengen Kurve für den zweiten von zwei Doppelpulsen berechnet werden: Ausgangspunkt ist die Gl. 4.21:

$$[Q_2]_{max 2}(\Delta t_2) = b_{30} + b_{31}(\Delta t_2) e^{-(k_1+k_2)(t_{max 2}-t_{30})} + b_{32}(\Delta t_2) e^{-k_3(t_{max 2}-t_{30})} \quad (4.37)$$

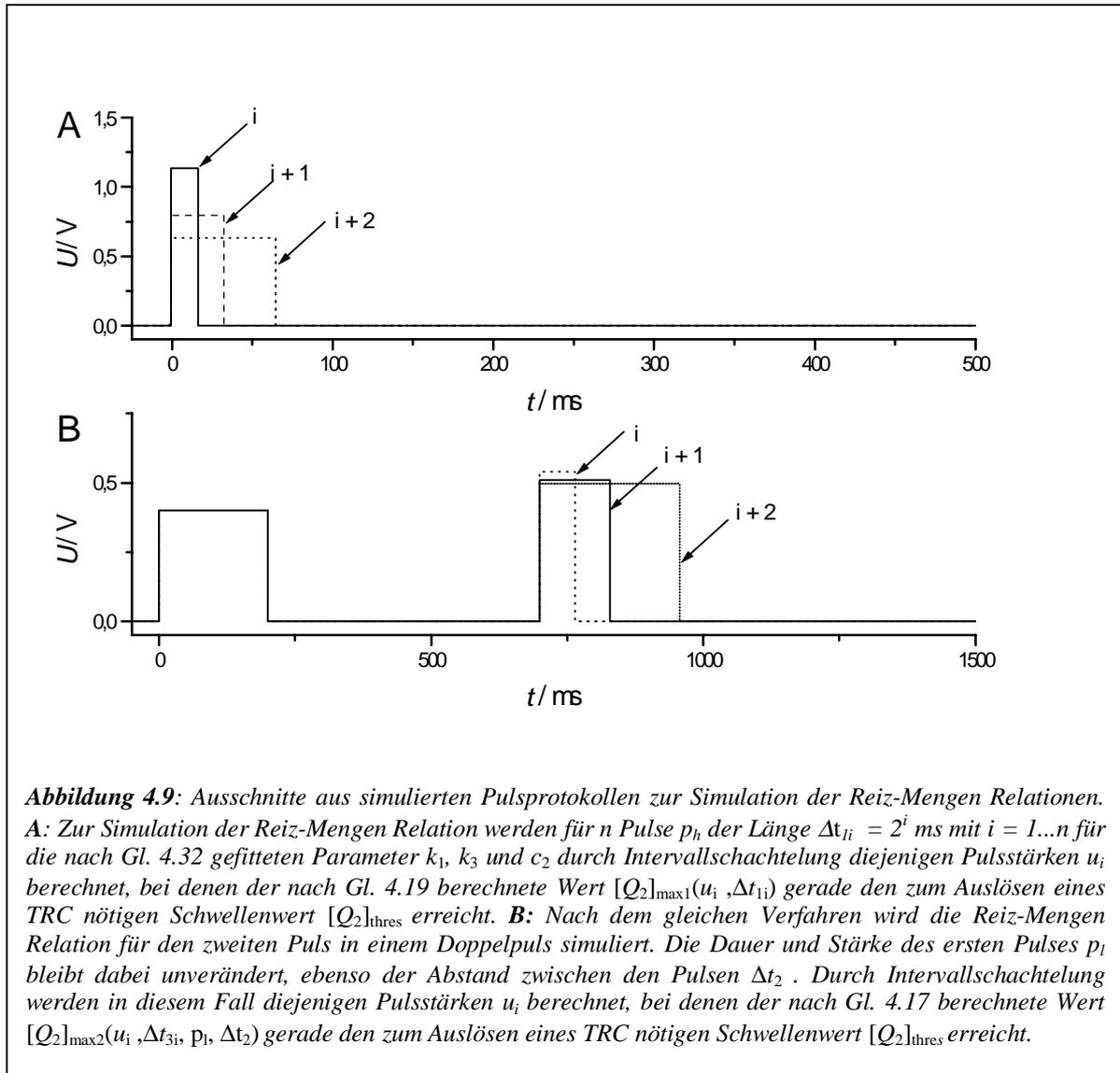
Die Koeffizienten  $b_{30}$ ,  $b_{31}$  und  $b_{32}$  sind durch die Gln. 4.15 und 4.16 gegeben.

Die Reiz-Mengen Kurve soll nun für ein festes  $\Delta t_2$  und einen festen ersten Puls der Dauer  $\Delta t_1$  und Intensität  $u_{11}$  für den zweiten Puls berechnet werden. Für eine beliebige Pulslänge  $\Delta t_3$  soll also die Pulsstärke  $U$  gefunden werden, derart daß

$$[Q_2]_{thres} = b_{30} + b_{31} e^{-(k_1+k_2(U))(t_{max 2}(k_2(U))-t_{30})} + b_{32} e^{-k_3(t_{max 2}(k_2(U))-t_{30})} \quad (4.38)$$

erfüllt ist.

$t_{\max 2}$  ist durch Gl. 4.13 für ein festes  $\Delta t_2$  gegeben.  $k_2$  in Gl. 4.38 hängt wieder nach Gl. 4.34 von  $U$  ab. Daher kann auch für den zweiten Puls zu jeder Pulslänge  $\Delta t_{3k}$  eine Pulsstärke  $u_{1k}$  gefunden werden, so daß  $k_2(u_{1k})$  genau den Wert hat, mit dem Gl. 4.37 erfüllt wird.

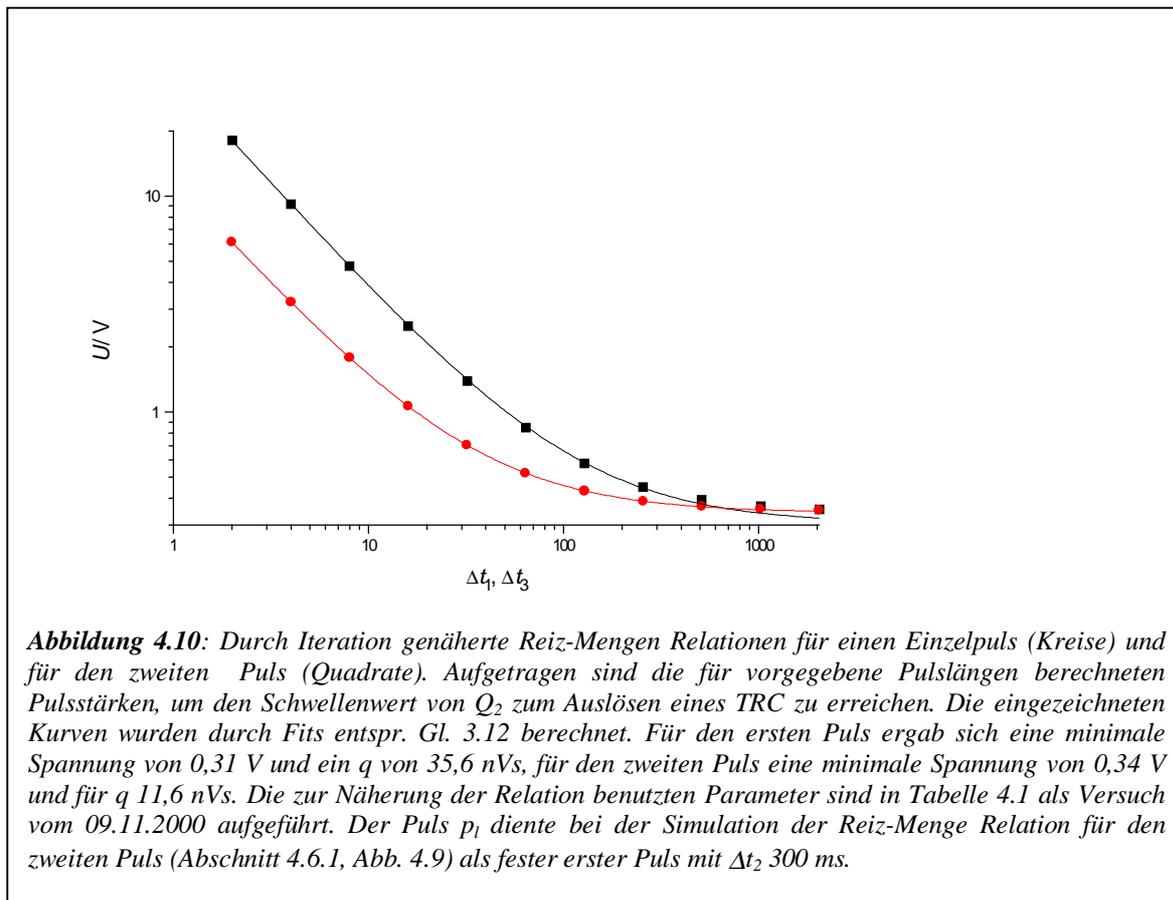


Wieder erhält man für  $n$  Pulslängen  $\Delta t_{3k} = 2^k$  ms mit  $k = 1 \dots n$  auf diese Art eine aus  $n$  Wertepaaren  $(\Delta t_{1k}, u_{1k})$  bestehende Reiz-Mengen Relation. Drei solcher Wertepaare einer simulierten Reiz-Mengen Relation zeigt Abb. 4.9 B als simulierte Pulsprotokolle. Durch Fit nach Gl. 4.36 (Reiz-Mengen Gesetz) können hieraus nun wieder die Parameter  $U_{02}$  (2 für den zweiten Puls) und  $q_2$  ermittelt werden.

Wenn das Modell eine gute Beschreibung für die Abläufe in der Zelle liefert, sollten auch diese Werte nicht signifikant von denen verschieden sein, die durch den direkten Fit der Daten erhalten worden sind.

### 4.6.3 Ergebnisse der Simulation der Reiz-Mengen Relation

Der Datensatz in der rechten Spalten Tabelle 4.1 (Versuch vom 09.11.2000) diente dazu, nach Gl. 4.38 Reiz-Mengen Kurven zu berechnen. Die simulierten in Abb. 4.10 dargestellten Werte für die Pulsintensität/Dauer Relation genügen offenbar nicht genau dem durch Gl. 4.36 gegebenen Reiz-Mengen Gesetz. Für Pulslängen über 500 ms liegt die nach der Simulation zum Auslösen eines TRC erforderliche Pulsstärke oberhalb der aus dem Reiz-Mengen Gesetz berechneten Hyperbel.



Die Abweichung der simulierten Daten vom Reiz-Mengen Gesetz (3.12) ist auch die Ursache dafür, daß die sich die Reiz-Mengen Kurven für einen Einzelpuls und den zweiten Puls in einem Doppelpulssystem schneiden. Denn diese Überschneidung entspricht weder den gemessenen (Abb. 3.12, 3.17) noch den simulierten Daten (Abb. 4.10), sondern wird allein durch den Fit produziert.

Die mit Gl. 4.36 aus den simulierten Werten gewonnenen Parameter sind in Tabelle 4.2 für drei Zellen zusammengefaßt. An den Werten in der Tabelle erkennt man, daß näherungsweise

gilt:  $q_{01mes} = q_{01sim}$  und  $U_{01mes} = U_{01sim}$ . Das ist erfreulich, da  $U_{01mes}$  und  $q_{01mes}$  nach Gl. 4.34 direkt in die Modellierung der Spannungsabhängigkeit eingehen. Sie werden vom Simulationsprogramm richtig reproduziert. Offenbar ist das Modell in Abb. 4.1 mit der in Gl. 4.3 gewählten Spannungsabhängigkeit eine gute Beschreibung für die tatsächlichen Verhältnisse in der Zelle.

**Tabelle. 4.2:** Vergleich der durch das Simulationsprogramm gewonnenen mit den durch direkten Fit gewonnenen Parametern für die Spannungsabhängigkeit für drei Meßdatensätze. In den obersten vier Zeilen stehen die Startbedingungen für das Programm. Erklärung wie in Tabelle 4.1 Aus diesen Startbedingungen wurden durch Fit nach Gl.4.32 die Werte von  $k_1$ ,  $k_3$ ,  $c_2$  und  $[Q_2]_{thres}$  zur Simulation der Reiz-Mengen Relation (Abb. 4.10 ) gewonnen. Die Werte stehen in Tabelle 4.1. Ein einzelner Puls  $p_1$  diente gleichzeitig als erster fester Puls bei der Berechnung der Reiz-Mengen Relation für den zweiten Puls im Doppelpulsexperiment (Abb. 4.9 B). Der Abstand zwischen den beiden Pulsen bei der Simulation der Relation für den zweiten Puls betrug jeweils  $\Delta t_{2min}$ . In den darauffolgenden Spalten stehen für die Parameter  $q$  und  $U_0$  jeweils die aus dem direkten Fit der Meßergebnisse (Index mes) sowie aus dem Fit der simulierten Relationen (Index sim)gewonnenen Werte von  $q$  und  $U$  untereinander.

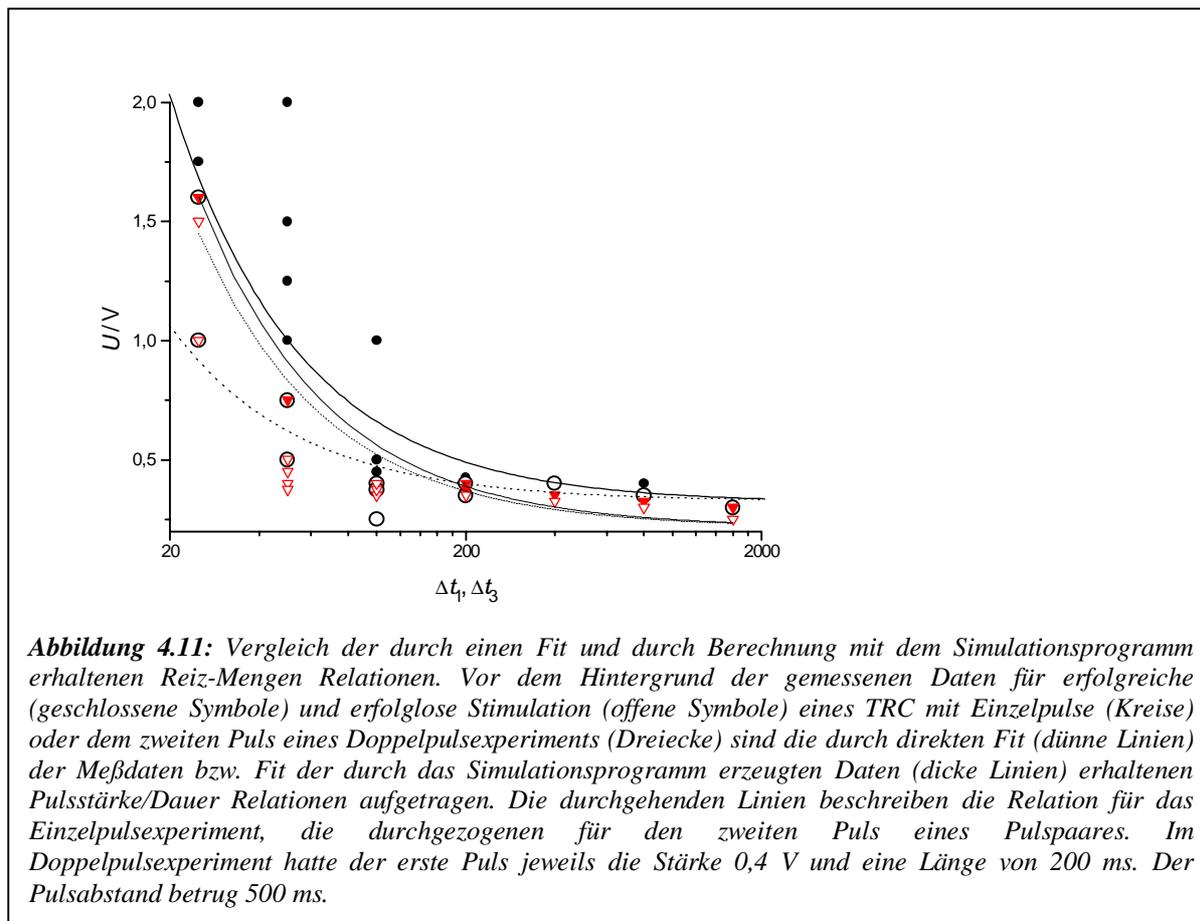
Versuch vom	27.03.1999	22.08.1999	09.11.2000
Überschwelliger Einzelpuls ( $p_h$ )	1 V, 50 ms	1 V, 20 ms	1 V 50 ms
Unterschwellige Pulse ( $p_1$ ) im Abstand	0,6 V, 200 ms	0,5 V, 200 ms	0,4 V, 200 ms
$\Delta t_{2min}; \Delta t_{2max} / ms$	300; 3000	100; 1000	500; 1500
$q_{1mes} / nVs$	21,8	10,3	34,7
$q_{1sim} / nVs$	23,9	10,6	35,5
$q_{2mes} / nVs$	-	-	30,1
$q_{2sim} / nVs$	-	-	11,5
$U_{01mes} / V$	0,56	0,48	0,21
$U_{01sim} / V$	0,53	0,47	0,31
$U_{02mes} / V$	-	-	0,21
$U_{02sim} / V$	-	-	0,34

Leider gelang es nur in einem einzigen Fall (rechte Spalte der Tabelle), an derselben Zelle sämtliche Effekte (Doppelpulsaddition, minimaler Pulsabstand im Doppelpulsexperiment,

Spannungsabhängigkeit des zweiten Pulses) zu messen, was darin begründet liegt, daß Charazellen in einem begrenzten Zeitraum nur eine endliche Zahl von Erregungen liefern.

Für diese Zelle sind in Abb. 4.11 die direkt an den Meßdaten gefitteten Reiz-Mengen Kurven sowie die aus den für diese Zelle simulierten Relationen gewonnenen Reiz-Mengen Kurven im Vergleich mit den gemessenen Daten dargestellt.

Offensichtlich sind in der Simulation die zum Erreichen des Schwellenwerts erforderlichen



Spannungen für den zweiten von zwei unterschwelligen Pulsen zu klein. Dadurch liefert der Fit der simulierten Reiz-Mengen Relation mit Gl. 4.36 einen zu kleinen Wert für  $q$  (vgl. Tabelle 4.2, rechte Spalte).

Die Abweichung der simulierten Reiz-Mengen Relation von der gemessenen zeigt, daß das Modell aus Abb. 4.1 mit den zur Simulation benutzten Werten von  $k_1$ ,  $k_2$  und  $c_2$  die Reizantwort der Zelle für lange Zeiten nicht ganz exakt wieder gibt. Die Ursache hierfür ist sicherlich die sehr kleine Datenbasis beim Fit nach Gl. 4.32, die zu viele Freiheitsgrade bei der Bestimmung der Ratenkonstanten  $k_1$ ,  $k_3$  und der Eichkonstanten  $c_2$  zuläßt.

Als Konsequenz aus diesem Ergebnis bietet sich für die zukünftige Weiterentwicklung des Fitalgorithmus an, die Datenbasis dadurch zu erweitern, daß mehrere Datensätze simultan in einem *Joint-Fit* einbezogen werden. Das bedeutet, daß das Fehlerkriterium für den Fit aus der Summe der Fehlerkriterien nach Gl. 4.32 für mehrere Datensätze mit verschiedenen Reizspannungen gebildet wird. Die so bestimmten Ratenkonstanten  $k_1$ ,  $k_3$  und die Eichkonstante  $c_2$  sollten dann für einen weiteren Bereich auf der Reiz-Mengen Relation gültig sein.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Simulation sowohl der Zeitverläufe von  $[Q_1]$  und  $[Q_2]$  in (Abb. 4.8) als auch der Reiz-Mengen Relationen, daß das hier vorgestellte Modell mit zwei Speichern in der Lage ist, die Pulsaddition, die Existenz eines minimalen Pulsabstandes und die Charakteristik der Spannungsabhängigkeit für den zweiten Puls in einem Doppelpuls in Übereinstimmung mit den Meßergebnissen zu beschreiben.

## 5 Diskussion

Seit langem ist bekannt, daß die elektrische Erregung in *Chara* mit einem transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  (*TRC*) einhergeht (Williamson und Ashley, 1982; Kikuyama und Tazawa, 1983). Dieser *TRC* führt zur Aktivierung der  $Cl^-$ - und  $K^+$ -Kanäle im Plasmalemma, welche wiederum das AP ausmacht. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten liefern nun Informationen über die verbindenden Mechanismen zwischen der elektrischen Stimulierung und der cytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung.

### 5.1 Das Calcium stammt aus internen Speichern

Der Schlüssel zum Verständnis der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung ist die Beobachtung, daß der Mechanismus der zum  $Ca^{2+}$ -Anstieg führt eine sehr steile Abhängigkeit von der Stärke des stimulierenden Pulses besitzt.

Über einen sehr engen Bereich der Pulsstärke variiert  $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  zwischen null und der maximalen Amplitude. Dieser Schwellenwert in der Abhängigkeit der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Änderung von der Pulsstärke zeigt deutlich, daß der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  durch die elektrische Stimulierung einem Alles-oder-Nichts Prinzip unterliegt.

Diese Beobachtung steht im Widerspruch zum Vorschlag von Kikuyama und Tazawa (1998), in welchem jene den *TRC* während der Erregung mit einem Einstrom von  $Ca^{2+}$  durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle im Plasmalemma begründen. Denn die stufenförmige Abhängigkeit der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  von der Stärke des Stimulus, also das Alles-oder-Nichts Verhalten der *TRC* steht im Gegensatz zu den Funktionsweisen sämtlicher bekannter spannungsabhängiger Kanäle (Hille, 1992). Diese zeigen alle eine zwar mitunter steile, jedoch immer kontinuierliche, exponentielle Spannungsabhängigkeit.

Ein  $Ca^{2+}$ -Influx durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran scheidet also zumindest als Hauptquelle des  $Ca^{2+}$  aus, das während eines *TRC* ins Cytoplasma freigesetzt wird.

Ein weiteres Argument gegen den Calciumeinstrom von außen ist die in dieser Arbeit gezeigte Beschränkung der innerhalb eines begrenzten Zeitraumes zur Verfügung stehenden Calciummenge bei schnell aufeinanderfolgenden Erregungen. Gegenüber der geringen Menge an freiem Calcium im Cytoplasma kann die Außenlösung als nahezu unendliches  $Ca^{2+}$ -Reservoir angesehen werden, so daß eine Ratenbeschränkung durch zu häufiges Öffnen der Kanäle nicht schon bei Pulsabständen von 30-20 s einsetzen sollte.

Wie im 4. Kapitel anhand eines Modells beschrieben, können die vorliegenden Daten mit der Existenz eines *second messengers*  $Q_2$ , der die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern steuert, besser erklärt werden. Diese Annahme steht in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, welche zeigen, daß das  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern freigesetzt wird (Beilby, 1984; Thiel et. al., 1993; Plieth et al., 1998; Thiel und Dityatev, 1998).

## 5.2 Der second messenger muß eine lange Lebensdauer haben

Die Doppelpuls-Experimente zeigen, daß die Stimulation durch den Puls eine längere Lebensdauer hat als der Puls selbst. Außerdem ist die von einem unterschwelligen Puls übermittelte Information additiv.

Eine Erklärung für diesen Befund liefert folgendes Szenario: Die Depolarisation der Membran verursacht die Produktion eines *second messengers* mit einer Lebensdauer von einigen Sekunden. Folgt innerhalb kürzerer Zeit als  $\Delta t_{2\max}$  ein zweiter Puls, akkumuliert sich die von beiden Pulsen produzierte Menge des *second messengers* derart, daß ein Schwellenwert für die Freisetzung des  $Ca^{2+}$  überschritten wird.

Nach dieser Vorstellung muß der *second messenger* eine mittlere Lebensdauer haben, die in der Größenordnung der beobachteten Pulsabstände liegt, also einige Sekunden.

Als Alternative zu einem *second messenger* als Speicher der durch den ersten Puls gelieferten Information kommt prinzipiell auch ein Protein in Frage, welches durch den ersten Puls seine Konformation vorübergehend in einen anderen Zustand ändert. Zum Zeitpunkt eines zweiten Pulses in ausreichend geringem Abstand wäre das Protein dann schon konformiert, und ein nächster Schritt könnte ausgelöst werden. Fälle, in denen der zweite Puls zu spät kommt, wären darauf zurückzuführen, daß das Protein bereits in seinen Ausgangszustand zurückgekehrt wäre.

Wie in Abschnitt 5.4 erklärt wird, ist es jedoch aus zeitlichen Gründen unwahrscheinlich, daß es sich im vorliegenden Fall um eine Informationsspeicherung durch ein Protein handelt.

## 5.3 Exogenes $Ca^{2+}$ ist nicht der second messenger

Als entscheidendes Argument für die exogene Herkunft des zusätzlichen  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  während der TRC galt lange Zeit, daß die elektrische Erregung von *Chara* nur in Anwesenheit von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  gelingt (Williamson und Ashley, 1982). In der Tat muß eine vollständige Beschreibung der gesuchten Signalkette auch diesen Effekt erklären.

Von tierischen Zellen ist der Mechanismus des *calcium induced calcium release (CIRC)* bekannt. Dieser läßt sich als Regelkreis betrachten (Berridge 1993), in dem der Einstrom extrazellulären  $Ca^{2+}$  in das Cytoplasma zu einer Aktivierung  $Ca^{2+}$ -sensitiver intrazellulärer Kanäle führt, durch die dann  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern in das Cytoplasma ausgeschüttet wird, bis der daraus resultierende Anstieg des  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  zu einer Inaktivierung der Kanäle führt.

Akzeptiert man jedoch die Erkenntnis, daß der gesuchte *second messenger* eine Lebensdauer von mehreren Sekunden haben muß, scheidet  $Ca^{2+}$  aber auch als der an dieser Stelle der Signalkette vermittelnde Botenstoff aus. Denn die Lebensdauer von  $Ca^{2+}$  im Cytoplasma ist um mindestens eine Größenordnung kleiner (Lipp und Niggli, 1996). Wegen der kurzen mittleren Lebensdauer von freiem  $Ca^{2+}$  im Cytoplasma müßte die Ausgangsamplitude eines solchen  $Ca^{2+}$  Signals zumindest in Messungen mit sehr gutem SNR so groß sein, daß sie auch mit der hier verwendeten Methode nachzuweisen wäre. Da eine solche Änderungen der  $[Ca^{2+}]$  nicht in einem einzigen der Doppelpulsexperimente mit unterschwelligen Pulsen nach dem ersten Puls beobachtet werden konnte, spricht nichts für von außen einströmendes  $Ca^{2+}$  in der Rolle des gesuchten langlebigen *second messengers*.

#### **5.4 Der second messenger ist endogenen Ursprungs**

Das entscheidende Argument gegen eine beliebige exogene Substanz als *second messenger* ist die Existenz eines Mindestabstandes  $\Delta t_{2\text{min}}$ , den zwei lange unterschwellige Pulse voneinander haben müssen, um ein TRC hervorzurufen. Das im vorhergehenden Kapitel beschriebene Modell zeigt, daß mit der Annahme der spannungsabhängigen Produktion eines endogenen *second messengers* die Existenz von  $\Delta t_{2\text{min}}$  erklärt werden kann.

Der Mindestpulsabstand für eine effektive Stimulierung der Zelle beruht danach auf folgendem Effekt: Die Produktion eines *second messengers*  $Q_2$  aus dem Vorrat  $Q_1$  verringert denselben. Wenn die Nachbildung von  $Q_1$  nicht zu schnell gegenüber dem Abbau von  $Q_2$  ist, kann der zweite Puls das System in einer Situation treffen, in welcher der  $Q_1$ -Pool soweit abgebaut ist, daß in Folge eines zweiten Pulses nicht genügend  $Q_2$  produziert werden kann, damit der Schwellenwert für die  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung überschritten wird.

Die Beobachtung, daß dieses Verhalten nur für sehr schwache Pulse gefunden wurde, kann damit erklärt werden, daß der minimale Pulsabstand mit steigender Pulsamplitude gegen null geht, wie folgende Überlegung verdeutlicht: Gegeben sei ein Paar schwacher Pulse mit den Pulslängen  $\Delta t_1$ , den Pulsstärken  $L$  und einem minimalen Pulsabstand  $\Delta t_{2\text{min}}(L)$  größer 0. Ein Puls der Länge  $2\Delta t_1$  ist also unterschwellig. Nach dem Reiz-Mengen Gesetz gibt es jedoch für

jede Pulslänge eine Pulsstärke, oberhalb derer der Puls überschwellig ist. Wird durch den Puls der Länge  $2\Delta t_1$  und Stärke  $H$  der Schwellenwert gerade erreicht, so ist für einen Doppelpuls mit gleicher Stärke und den Pulslängen  $\Delta t_1$  offensichtlich  $\Delta t_{2\min}(H) = 0$ . Das ist gleichzeitig der Grenzwert, den  $\Delta t_{2\min}$  bei Vergrößerung der Pulsstärke für alle unterschwelligen Doppelpulse annimmt. Für Pulse der Stärke  $S$  mit  $L < S < H$  ist dann  $\Delta t_{2\min}(L) > \Delta t_{2\min}(S) > \Delta t_{2\min}(H) = 0$

Bei einem exogenen *second messenger*, insbesondere  $Ca^{2+}$ , ist es hingegen nicht erklärbar, warum er unmittelbar nach dem ersten Puls zwar nicht, einige 10-100 ms Sekunden später jedoch wieder ausreichend zur Verfügung stehen sollte.

Ähnliches gilt für die in Abschnitt 5.2 angedeutete Möglichkeit, daß die Information durch die Konformationsänderung eines Proteins gespeichert wird. Einzelne Konformationsänderungen von Proteinen spielen sich auf viel kürzeren Zeitskalen ab als die Pulsaddition (Stryer 1984). Bei Kanalproteinen und Carrierproteinen z.B. beträgt die Änderungsrate bis zu mehrere kHz (Läuger 1980, 1985). Im vorliegenden Fall sollte die Konformationsänderung binnen der mehrere 100 ms langen Pulse abgeschlossen sein. Es gibt keinen einleuchtenden Grund, warum es dann durch einen weiteren Puls erst nach einer Pause von einigen weiteren 10-100 ms Dauer möglich sein sollte, die Signalkette fortzuführen.

### **5.5 Der second messenger ist möglicherweise Inositol-1,4,5-trisphosphat**

Von den Inositol-Phosphaten ist bekannt, daß sie eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung in Zellen spielen (Berridge 1989, 1993). Insbesondere vom Inositol-1,4,5-Trisphosphat ( $IP_3$ ) ist bekannt, daß es in tierischen Zellen  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern mobilisiert (Berridge 1987). Aber auch in Pflanzenzellen wurde  $IP_3$  ausgelöste  $Ca^{2+}$  Freisetzung (Franklin-Tong 1996, Schumaker and Sze, 1987, Drøbak und Ferguson, 1985) beobachtet. Von *Chara* weiß man, daß eine Erhöhung der cytoplasmatischen Konzentration von  $IP_3$  durch Ionophorese zu einer Erregung der Zellmembran führt. Da die Erregung eng an die  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  gekoppelt ist (siehe oben), muß die Erregung mit einem TRC einhergehen, welches auf die  $IP_3$ -stimulierte Entleerung von internen Speichern zurückgeführt werden kann (Thiel et al. 1990). In *Chara* gibt es folglich interne  $IP_3$  sensitive  $Ca^{2+}$ -Speicher, deren Entleerung ausreicht, um ein Aktionspotential der Plasmamembran auszulösen.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Bildung von  $IP_3$  in der Zelle durch das Enzym Phospholipase C aus dem membranständigen Protein Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $PIP_2$ ) katalysiert (Berridge 1993, Meyer und Stryer 1991).

Biskup et al. (1999) konnten zeigen, daß der Einsatz der Inhibitoren Neomycin (Franklin-Tong 1996, Schumacher and Sze, 1987, Drøbak und Ferguson, 1985) und des Aminosteroids 1-(6-[17 $\beta$ -3-Methoxyestra-1,3,5-(10)trien-17-yl]amino/hexyl)1H-pyrrol-2-5dion (U73122) (Epstein et al. 1985, Thompson et. al. 1991, Tatra et. al. 1994, Zheng et. al. 1995) der Phospholipase C die Erregung der Membran nach Stimulation mit Strompulsen unterdrückt, und zwar um so stärker, desto länger der Inhibitor auf die Zelle einwirkt. Zur Erklärung dieses Befundes diente ein Modell Biskups (1998), in welchem die Änderung der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit des Inhibitors simuliert wurde, woran wiederum die Leitfähigkeit der Membran gekoppelt war. Das Modell konnte die gemessenen Ströme sehr gut voraussagen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten deuten darauf hin, daß Neomycin in der Tat inhibierend auf die TRC wirkt, eine genaue Untersuchung der Wirkung von Neomycin auf die  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  steht jedoch noch aus. Zusammen mit dem zu Beginn des Abschnitts erwähnten Befund erlaubt das die These, daß die Depolarisation der Membran durch einen elektrischen Stimulus zur Produktion des *second messengers* IP<sub>3</sub> führt, welcher wiederum  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern freisetzt.

IP<sub>3</sub> ist also ein aussichtsreicher Kandidat für den *second messenger*, der die elektrische Stimulation und die Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  verbindet.

Darüber hinaus ist bekannt, daß nach einer Erhöhung von IP<sub>3</sub> im Cytoplasma der Botenstoff zu dem inaktiven Inositol-1,4-bisphosphat (IP<sub>2</sub>) abgebaut wird (Berridge, 1987). Als Zeitkonstante für den Abbau von IP<sub>3</sub> wurden in tierischen Zellen Werte zwischen 1,25 s (Fink et al. 1999) und 17 s (Wang et al., 1995) berechnet. Die in dieser Arbeit berechneten Zeitkonstanten für den Abbau des *second messengers* Q<sub>2</sub> bewegen sich mit 4 – 20 s (vgl. Tabelle 4.1) im gleichen Bereich.

Deshalb darf nun vermutet werden, daß die Depolarisation der Membran durch einen noch unbekanntem Mechanismus zu einer schnellen Produktion von IP<sub>3</sub> aus dem PIP<sub>2</sub>-Vorrat führt.

Wenn der IP<sub>3</sub>-Spiegel unter dem kritischen Schwellenwert bleibt, wird kein  $Ca^{2+}$  aus den internen Speichern freigesetzt. Oberhalb des kritischen Wertes verursacht IP<sub>3</sub> eine vollständige Mobilisierung des  $Ca^{2+}$  aus den internen Speichern. Diese Interpretation der IP<sub>3</sub> Wirkung ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen an tierischen Zellen. Von diesen ist bekannt, daß IP<sub>3</sub> in ihnen zu einer Alles-oder-Nichts Calcium-Freisetzung aus internen Speichern führt (z.B. Parker und Ivorra, 1990).

Wegen der langen Lebensdauer des IP<sub>3</sub> darf angenommen werden, daß jede weitere Mobilisierung von IP<sub>3</sub> während dieser Abklingzeit zu dem IP<sub>3</sub>, welches von der ersten Stimulation verblieben ist, hinzu addiert wird. Durch die Summation der cytoplasmatischen Konzentrationen von IP<sub>3</sub> kann der Schwellenwert überschritten werden.

Die vorliegenden Experimenten zeigen, daß Doppelpulse nur dann ein effektiver Trigger sind, wenn der Abstand zwischen den Pulsen nicht länger als ungefähr 3 s ist. Diese Zeit ist innerhalb der Lebensdauer von  $IP_3$  und stützt die Erkenntnis, daß  $IP_3$  als der in Frage stehende *second messenger* dienen kann.

### 5.6 Die Rolle des extrazellulären $Ca^{2+}$

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten belegen, daß extrazelluläres  $Ca^{2+}$  nicht für die globale Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  im Zuge einer Erregung der Zelle in Frage kommt.

Wie bereits oben erwähnt, ist jedoch seit langem bekannt, daß *Charazellen* nur in Anwesenheit von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  erregt werden können (Williamson and Ashley 1982, Thiel et al. 1993). Von der Phospholipase C, (PLC) welche die Bildung von  $IP_3$  zu katalysieren vermag, weiß man wiederum, daß sie erstens in Pflanzen vorkommt und es zweitens eine Isoform gibt, die im Bereich von wenigen hundert nanomolar  $Ca^{2+}$ -sensitiv ist (Kopka et al. 1998). Weiter kann die Spannungsabhängigkeit der Erregung durch ein Reiz-Mengen Gesetz mit einer zum Auslösen eines *TRC* erforderlichen Minimalspannung  $U_0$  beschrieben werden. Diese Spannung ist aber (über der Membran gemessen) die theoretisch berechnete Nernst-Spannung für  $Ca^{2+}$ , wie in dieser Arbeit belegt werden konnte. Damit ist ein spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Einstrom sehr wahrscheinlich.

Bringt man die drei geschilderten Befunde mit der Frage zusammen, wie die hier postulierte spannungsabhängige Bildung des  $IP_3$  zustande kommt, eröffnet sich folgendes Szenario:  $Ca^{2+}$  tritt spannungsabhängig in die Zelle ein. Daß überhaupt  $Ca^{2+}$  in die Zelle gelangt, wird erst bei einer Spannung oberhalb des Umkehrpotentials von  $Ca^{2+}$  möglich. Oberhalb dieser Spannung ist die eintretende  $Ca^{2+}$ -Menge für einen gewissen Spannungsbereich quasi linear. Daraus resultiert ein lokaler Anstieg des  $Ca^{2+}$  in der Nähe des Plasmalemmas, welcher von der hier benutzten globalen Nachweismethode unentdeckt bleibt.

Das eintretende  $Ca^{2+}$  aktiviert eine  $Ca^{2+}$ -sensitive PLC, welche wiederum das membranständige  $PIP_2$  in  $IP_3$  umsetzt. Die Aktivierung der PLC und die daraus resultierende Produktion von  $IP_3$  erfolgt in diesem Szenario proportional zur einströmenden Calciummenge.

### 5.7 Interne Speicher und Refraktärzeit

Setzt man interne Speicher als  $Ca^{2+}$ -Quelle für die *TRC*, bietet sich folgende Erklärung für die bei hochfrequenter Stimulierung beobachteten *TRC* mit kleineren Amplituden an: Die internen Speicher sind nur von endlicher Größe. Wird ein maximal gefüllter Speicher entleert,

erreicht der daraus resultierende *TRC* die maximale Amplitude. Bevor das nächste Maximum mit gleicher Amplitude hervorgerufen werden kann, muß der Speicher zunächst wieder aufgefüllt werden. Erfolgt die erneute erfolgreiche Stimulation früher, so hat der resultierende *TRC* einfach deshalb eine geringere Amplitude, weil weniger  $Ca^{2+}$  zur Verfügung steht.

Vielfach wird bei hochfrequenter Stimulation mit überschwelligen Pulsen jedoch gar nicht bei jedem Puls ein *TRC* stimuliert, sondern regelmäßig bei jedem n-ten ein *TRC* maximaler Amplitude erzeugt. Aber auch in dem Fall ist die mittlere pro Puls freigesetzte  $Ca^{2+}$ -Menge beschränkt.

Über die Ursache für die dabei offenbar auftretende Refraktärzeit kann hier nur spekuliert werden. Das Auftreten von *TRC* mit niedriger Amplitude deutet aber daraufhin, daß nicht der Füllstand der Speicher dafür entscheidend ist, ob  $Ca^{2+}$  ausgeschüttet wird oder nicht. Andererseits vermutet man bei tierischen Zellen, daß die  $IP_3$  Sensitivität der Calciumspeicher von der im Speicher befindlichen  $Ca^{2+}$ -Menge abhängig ist (Missiaen et. al. 1991, 1992a, b, Tregear et. al. 1991).

Die vorliegenden Messungen sind globaler Natur, so daß durchaus vorstellbar ist, daß *TRC* mit minimaler Amplitude Folge der vollständigen Entleerung einiger weniger Speicher sind, wohingegen *TRC* maximaler Amplitude auf eine konzertierte Entleerung aller Speicher zurückgehen mögen. Auskunft hierüber kann nur eine räumlich hochaufgelöste Messung geben.

Wie dem auch sei, die beobachteten Refraktärzeiten (10-60 s) entsprechen denjenigen für die Depolarisation im Zuge eines AP (Beilby 1979).

Von der  $Cl^-$ -Leitfähigkeit der Plasmamembran von *Chara* weiß man wiederum, daß sie von der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  abhängig sind (Kataev et. al. 1984, Shina und Tazawa 1987, 1988, Okijara et al. 1991, Mimura und Shimmen, 1994).

Setzt man nun die an *Eremosphaera viridis* (Bauer et. al. 1997) gewonnene Erkenntnis, daß die *TRC* den Permeabilitätsänderungen der Membrankanäle voraussehen, für *Chara* ebenfalls voraus, so hat man wegen der engen Kopplung zwischen der Permeabilität und der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  in der Refraktärzeit der *TRC* die Ursache für die Refraktärzeit der Depolarisation.

## 6 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß bei der Modellpflanze *Chara* nicht nur das Aktionspotential sondern auch die für die Aktivierung der *Cl* Kanäle notwendige Änderung der freien cytoplasmatischen  $Ca^{2+}$  Konzentration ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) einem Alles-oder-Nichts Prinzip unterliegt. Eine Stimulation mit schwachen Pulsen hat keinen wahrnehmbaren Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . Stärkere Pulse haben immer *TRC* maximaler Amplitude zur Folge. *TRC* mit einer geringeren als der maximalen Amplitude treten nur bei hochfrequenter Erregung der Zelle auf, was auf eine Beschränkung der bereitgestellten Calciummenge schließen läßt.

Beides zusammen unterstützt die These, daß das  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern ausgeschüttet wird. Offen bleibt noch die Natur der Speicher. Vor dem Hintergrund, daß in tierischen Zellen das Sakroplasmatische Reticulum als interner Speicher dient (Berridge 1993), ist aussichtsreichster Kandidat hierfür in Pflanzenzellen das nahe der Plasmamembran gelegene (cortikale) endoplasmatische Reticulum, welches aus pflanzenphysiologischer Sicht am geeignetsten erscheint (Moore et al. 1986). Hierüber wird früher oder später der Fortschritt in der Entwicklung der fluoreszenzoptischen Methoden Auskunft geben. Auch über die Mechanismen, die zur Pufferung des ausgeschütteten  $Ca^{2+}$  und letztlich der Wiederbefüllung der postulierten internen Speicher dienen, ist noch wenig bekannt.

Ein weiteres wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist die Erkenntnis, daß ein *TRC* ebenfalls durch zwei oder mehrere aufeinanderfolgende identische unterschwellige Pulse mit geeignetem Abstand ausgelöst werden kann. Dabei gibt es für jede Pulsstärke und jede Pulszahl einen bis zu mehreren Sekunden langen maximalen Abstand. Für zwei aufeinanderfolgende Pulse konnte auch die Existenz eines minimalen Abstand von einigen 100 ms Dauer, den zwei sehr schwache Pulse mindestens haben müssen, um ein *TRC* auszulösen, nachgewiesen werden.

Durch Variation des zweiten Pulses von einem Paar unterschwelliger Pulse konnte gezeigt werden, daß für die Reizmengen-Relation für den zweiten Puls ein ebensolches Reiz-Mengen Gesetz wie für den ersten Puls gilt, wobei im zweiten Puls im Vergleich zum Einzelpuls niedrigere Reizmengen nötig sind, um die Reizschwelle zu überschreiten.

Die Abhängigkeit der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung von solchen Einzel- und Doppelpulsen kann durch ein Modell simuliert werden, in dem ein *second messenger* spannungsabhängig produziert wird. Die mit Hilfe des Modells bestimmte Ratenkonstante für die Produktion des *second messenger* aus seinem Ausgangsstoff liefert eine Gesamtratenkonstante über komplexe biochemische Prozesse.

Der spannungsabhängig produzierte *second messenger* setzt in dem Model  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern nach dem Alles-oder-Nichts Prinzip frei, wenn die cytoplasmatische Konzentration des *second messenger* einen Schwellenwert überschritten hat. Die Auslösung von  $Ca^{2+}$ -Freisetzungen durch einzelne überschwellige und zwei oder mehrere unterschwellige Pulsen in geeigneten Abständen, kann auf Basis der relativen Geschwindigkeiten von Produktion und Zerfall des *second messengers* sowie der Verfügbarkeit des Ausgangsstoffes für den *second messenger* erklärt werden.

Akzeptiert man, daß es sich bei dem *second messenger* um Inositol-1,4,5,-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) handelt, liefern die vorliegenden Daten die wesentlichen Ratenkonstanten des IP<sub>3</sub>-Metabolismus. Endgültige Auskunft über die Beteiligung von IP<sub>3</sub> an den geschilderten Prozessen kann jedoch nur eine *in vivo* Messung der cytoplasmatischen IP<sub>3</sub> Konzentration im Verlauf der Erregung der Zelle liefern.

Auch der direkte Nachweis, daß die in dieser Arbeit als Zwischenglied bei der spannungsabhängigen Produktion des IP<sub>3</sub> postulierte  $Ca^{2+}$ -sensitive Phospholipase C in *Chara* vorhanden ist, steht noch aus. Hierüber und ebenso darüber, ob diese Lipase tatsächlich im 100 nm Bereich für  $Ca^{2+}$  empfindlich ist, können nur molekularbiologische und biochemische Untersuchungen Aufschluß geben.

## 7 Zusammenfassung

Elektrisch ausgelöste Aktionspotentiale in der Riesenalge *Chara* sind mit einem vorübergehenden Anstieg der Konzentration des freien cytoplasmatischen  $Ca^{2+}$  (*TRC* = *Transient Rise of Calcium*) verbunden. Die vorliegenden microfluorimetrischen Messungen der freien cytoplasmatischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) während der Erregung der Membran zeigen, daß Stimulation mit schwachen Pulsen keinen wahrnehmbaren Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  hat. Wenn die Stärke des Pulses einen Schwellenwert überschreitet, ruft dieser einen *TRC* maximaler Höhe hervor. Dieses Ergebnis legt einen Alles-oder-Nichts Mechanismus zur Freisetzung von  $Ca^{2+}$  nahe. *TRC* mit einer geringeren als der maximalen Amplitude treten nur bei hochfrequenter Erregung der Zelle auf, was auf eine Beschränkung der bereitgestellten Calciummenge schließen läßt.

Ein *TRC* kann ebenfalls durch zwei aufeinanderfolgende identische unterschwellige Pulse mit geeignetem Abstand ausgelöst werden. Der Abstand darf nicht geringer als wenige 100 ms und nicht länger als einige Sekunden sein. Variiert man bei festem ersten Puls Dauer und Stärke des zweiten von einem solchen Paar unterschwelliger Pulse, so läßt sich für den zweiten Puls eine Reiz-Mengen Relation mit gleicher Charakteristik wie für einen Einzelpuls nachweisen.

Diese Abhängigkeit der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung von solchen Einzel- und Doppelpulsen kann durch ein Modell mit zwei Speichern in Serie simuliert werden, in dem ein *second messenger* spannungsabhängig produziert wird. Dieser *second messenger* setzt  $Ca^{2+}$  aus internen Speichern nach dem Alles-oder-Nichts Prinzip frei, wenn die cytoplasmatische Konzentration des *second messengers* einen Schwellenwert überschritten hat. Die Auslösung von  $Ca^{2+}$ -Freisetzungen durch einzelne überschwellige und zwei oder mehrere unterschwellige Pulse in geeigneten Abständen kann auf Basis der relativen Geschwindigkeiten von Produktion und Zerfall des *second messengers* sowie der Verfügbarkeit des Ausgangsstoffes für den *second messenger* erklärt werden.

Es gelang auf der Basis des Modells die gemessenen Daten zu fitten, wobei die Ratenkonstante für die Produktion des Ausgangsstoffes, die Zeitkonstante für den Abbau des *second messengers* und die Eichkonstante der Spannungsabhängigkeit bestimmt werden konnten. Die Fitfunktion ist ungewöhnlich, weil kein Kurvenverlauf angenähert wird, sondern Aussagen über Reizabstände, welche zu einer Systemantwort führen, bewertet werden.

Geht man davon aus, daß es sich bei dem *second messenger* um Inositol 1,4,5,-triphosphat ( $IP_3$ ) handelt, worauf in den hier präsentierten Daten die Unterdrückung des *TRC* durch

Neomycin, einen Inhibitor der Phospholipase C, hindeutet, so liefern die vorliegenden Daten die wesentlichen Ratenkonstanten des IP<sub>3</sub>-Stoffwechsels.

## Literaturverzeichnis

- Bauer, C.S., C. Plieth, U.-P. Hansen, B.Sattelmacher, W. Simonis, G. Schönknecht.** 1997. Peptitive  $Ca^{2+}$  spikes in a unicellular green alga. *FEBS Letters* **405**:390-393.
- Beilby, M.J.** 1984. Calcium and plant action potentials. *Plant Cell Environ.* **7**:415-421.
- Beilby, M.J.** 1979. The Action Potential in *Chara corallina* III. The Hodgkin-Huxley Parameters for the Plasmalemma. *Aust. J. Plant. Physiol.* **6**:337-53.
- Bernasconi, C.F.** 1976. Relaxation kinetics. Academic Press, New York.
- Berridge, M.J.** 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**:315-325.
- Berridge, M.J.** 1987. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* **56**:159-193.
- Berridge, M.J. and R.F. Irvine.** 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**:197-205.
- Biskup, B.** 1998. Charakterisierung der transienten Chloridkanalaktivität beim Aktionspotential von *Chara corallina*. Diplomarbeit. Universität Göttingen, Göttingen.
- Biskup, B., D. Gradmann, und G. Thiel.** 1999. Calcium release from  $IP_3$ -sensitive stores initiates action potential in *Chara*. *FEBS Letters* **453**:72-76.
- Brearley, C. A., P.N. Parmar und D.E. Hanke** 1997. Metabolic evidence for  $PtdIns(4,5)P_2$ -directed phospholipase C in permeabilized plant protoplasts. *Biochem. J.* **324**:123-131.
- Brown, E. M., R. Butters, C. Katz, O. Kifer und E.-H. Fuleihan.** 1982. A comparison of the effects of concanavalin-A and tetradecanoylphorbol acetate on the modulation of parathyroid function by extracellular calcium and neomycin in dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinol.*, **130**(6):3143-3151.
- Chen, Q. Y. und W.F. Boss.** 1991. Neomycin inhibits the phosphatidylinositol monophosphate and phosphatidylinositol biphosphate stimulation of plasmamembrane ATPase activity. *Plant Physiol.*, **96**:340-343.
- Clarkson, D.T.** 1986. Future development of calcium studies: evidence in the support of concepts. In: Trewavas, A.J. (Ed.). Molecular and cellular aspects of calcium in plant development. NATO ASI Series, Series A: Life Science **104**:443-447 Plenum Press, New York.

- Cole, K. S. und H. J. Curtis.** 1938 Electric impedance of nitella during activity. *J. Gen. Physiol.* **22**: 37-64,
- Cole K. S und H. J. Curtis** 1939 Electric impedance of nitella during activity. *J. Gen. Physiol.* **22**: 649-670
- Drøbak, B.K.** 1991. Plant Signal perception and transduction: the role of the phosphoinositide system. In: *Essays in biochemistry*, Bd. 26, London.
- Drøbak, B.K.** 1992. The Plant phosphoinositide system. *Biochem J.* **288**:697-712.
- Drøbak, B.K. und I. B. Ferguson.** 1985. Release of  $Ca^{2+}$  from plant hypocotyl microsomes by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**:1241-1246.
- Drøbak, B.K., I. B. Ferguson, Dawson A.P. Dawson und R.F Irvine.** 1988. Inositol containing lipids in suspension cultured plant cells. *Plant Physiol.* **87**:217-222.
- Drøbak, B.K., P.C.A. Watkins, J.A. Chattaway, K. Roberts und A.P. Dawson.** 1991 Metabolism of inositol(1,4,5)trisphosphate by a soluble enzyme fraction from pea (*Pisum sativum*) roots. *Plant. Physiol.* **95**:412-417.
- Epstein, P. A., M Prentki und M. F. Attie.** 1985. Modulation of intracellular  $Ca^{2+}$  in the papthyroid cell. Release of  $ca^{2+}$  from non-mitochondrial pools by inositol trisphosphate. *FEBS Lett.*, **188**:141-144
- Etter , E.F., M.A. Kuhn und F.S. Fay.** 1994. Detection of changes in near-membrane  $Ca^{2+}$  concentration using a novel membrane-associated  $Ca^{2+}$  indicator. *J. Biol. Chem.* **269**(1):10141-10149.
- Essen, L.O., O. Perisic, R. Cheung, M. Katan und R.L. Williams.** 1996. Crystal structure of a mammalin phosphoinositide specific phospholipase C $\delta$ . *Nature* **380**:595-602.
- Felle, H.** 1989  $Ca^{2+}$ -selective microelectrodes and their application to plant cells an tissues. *Plant Physiol.* **91**:1239-1242.
- Fink, C.C., B. Slepchenko, und L.M. Loew.** 1999. Determination of time-dependent inositol-1,4,5-trisphosphate concentrations during calcium release in smooth muscle cell. *Biophys. J.* **77**:617-628.
- Franklin-Tong, V. E., B.K. Drøbak, A.C. Allan, P.A.C: Watkins and A. J. Trewavas.** 1996.Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving Calcium wave during fertilization iof sea urchin eggs. *Science* **261** (5119):348-352.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, und R.Y Tsien.** 1985. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Bio. Chem.* **260**:3440-3450.
- Hansen, U.-P.** 1990. Implications of control theory for homeostasis and phosphorylation of transport molecules. *Bot. Acta.* **103**:15-23.

- Haugland R. P.** 1996. Molecular Probes – Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Molecular Probes Inc. , Eugene, OR, USA.
- Hayama T., T. Shimmen, und M. Tazawa.** 1978. Participation of  $Ca^{2+}$  in cessation of cytoplasmic streaming upon membrane excitation in *Characeae* internodal cells. *Protoplasma* **102**:1-9.
- Hille, B.** 1992. Ionic channel of excitable membranes. Sinauer Associated Inc., Sunderland, MA, USA.
- Irvine, R.F, A.J. Letcher, D.J. Lander, B.K. Drøbak A.P. Dawson A. and Musgrave.** 1989. Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate and phosphatidylinositol(4)phosphate in plant tissues. *Plant Physiol.* **89**:888-92.
- Joseph, S.K., T. Etsch und W.D. Bonner.** 1989. Hydrolysis of inositol phosphates by plant cell extracts. *Biochem J.* **264**:851-856.
- Katz, B.** 1974. Nerven, Muskel und Synapsen. 2 Auflage. Thieme, Stuttgart.
- Kikuyama, M., und M. Tazawa.** 1983. Transient increase of intracellular  $Ca^{2+}$  during excitation of tonoplast-free *Chara* cells. *Protoplasma* **117**:62-67.
- Kikuyama, M., und M. Tazawa.** 1998. Temporal relationship between action potential and  $Ca^{2+}$  transient in characean cells. *Plant Cell Physiol.* **39**:1359-1366.
- Kopka, J., Pical, C., Gray, J.E., und Müller-Röber, B.** 1998. Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol.* **116**:239-250.
- Läuger, P.** 1980. Kinetic Properties of ion carriers and channels. *J. Membrane Biol.* **57**:163-178.
- Läuger, P.** 1985. Ionic Channels with conformational substates. *Biophys. J.* **47**:581-591.
- Lipp, P., und E. Niggli.** 1996. A hierarchical concept of cellular and subcellular  $Ca^{2+}$ -Signalling. *Prog. Biophys. molec. Biol.* **65**:265-296.
- Lühring, H. und M. Tazawa.** 1985. Cytoplasmatic  $Ca^{2+}$  has No Effect on the Excitability of *Chara* Plasmalemma. *Plant Cell Physiology.* **26**(4):769-744.
- McMurray, W.C. und R.F. Irvine.** 1988. Phosphatidylinositol-phosphate kinases in plant plasma membranes. *Biochem. J.* **249**:877-881
- Merrit, J. E., R. Jacob, und T.J. Hallam.** 1989. Use of manganese to discriminate between calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human neurophils. *J. Bio. Chem.* **264**:377-382.
- Meyer, T. und L. Stryer.** 1991. Calcium Spiking. *Annu. Rev. Biophys Biophys Chem.* **20**: 153-74.

- Missiaen, L. H. DeSmedt, G. Droogmans, R. Casteels.** 1992a,  $Ca^{2+}$  release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal  $Ca^{2+}$  in permeabilized cells. *Nature* **357**:599-602.
- Missiaen, L. C. W. Taylor, M. J. Berridge.** 1992b. Luminal  $Ca^{2+}$  promoting spontaneous  $Ca^{2+}$  release from inositol trisphosphate-sensitive stores in rat hepatocytes. *J. Physiol (Lond)*, **455**:623-640.
- Missiaen, L. C. W. Taylor, M. J. Berridge.** 1991. Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature* **352**:241-244.
- Moore, A. L., M. O. Proudlove and K. E. O. Ackerman.** 1986. The Role of Intracellular Organelles in the Regulation of Cytosolic Calcium Levels. In: Trewavas, A.J. (Ed.). Molecular and cellular aspects of calcium in plant development. NATO ASI Series, Series A: Life Science **104**:277-284. Plenum Press, New York.
- Neher, E. und G. J. Augustine.** 1992. Calcium Gradients and Buffers in Bovine Chromaffin Cells. *J. Physiol.* **450**:273-301.
- Nedler, J.A., R. Mead.** 1965. A simplex method for function minimization. *Computer Journal* **7**:308.
- Okihara, Y. und M. K. Kiyosawa** 1988. Ion composition of the *Chara* internode. *Plant and Cell Physiol.* **29**: 21-25.
- Osterhout, W. J. V.** 1931. Physiological studies of single plant cells. *Biol. Rev.* **6**: 369-411.
- Parker, I., und I. Ivorra.** 1990. Localized all-or-non calcium liberation by inositol trisphosphate. *Science* **250**:977-979.
- Plieth, C. und U.-P. Hansen.** Light dependence of protoplasmic streaming in *Nitella flexilis* L. as measured by means of Laser velocimetry. *Planta* **188**:332-339.
- Plieth, C.** 1996. Bestimmung von Ionenkonzentrationen und ihrer Änderungen in grünen pflanzlichen Zellen und Geweben mit Hilfe der bildverarbeitenden ratiometrischen Fluoreszenz-Mikroskopie und der Laser-Doppler-Anemometrie. Dissertation Universität Kiel. Kiel
- Plieth, C., B. Sattelmacher, U.-P. Hansen, und G. Thiel.** 1998. The action potential in *Chara*:  $Ca^{2+}$  release from internal stores visualized by  $Mn^{2+}$  induced quenching of fura dextran. *Plant J.* **13**:167-175.
- Press, W., B.P. Flannery, S.A. Teukolsky, und W.T. Vetterling.** 1989. Numerical Recipes in Pascal. The Art of Scientific Computing. Cambridge University Press, Cambridge, New York.

- Schumaker, K. and H. Sze.** 1987. Inositol 1,4,5-trisphosphat releases  $Ca^{2+}$  from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *J. Biol. Chem.*, **262**:3944-3946.
- Shimmen, T. und M. Tazawa** 1983. Control of cytoplasmic streaming by ATP,  $Mg^{2+}$  and cytochalasin B in permeabilized *Characean* cell. *Protoplasma* **115**:18-24.
- Stryer, L.** 1994. Biochemie. Heidelberg Berlin Oxford. Spektrum, Akademischer Verlag.
- Takahashi, A., P. Camacho, J.D. Lechleiter und B. Herman.** 1999. Measurement of Intracellular Calcium. *Physiological Reviews.* **79**(4):1089-1125.
- Tabata T. und T. Sibaoka.** 1987. Conduction Velocity and Blockage of Action Potential in Chara Internodal Cells. *Plant Cell Physiology.* **28**(7): 1187-1194.
- Tatrai, A., S. K. Lee und P. H. Stern.** 1994. U-73122, a phospholipase C agonist, inhibits effects of endothelin-1 and parathyroid hormone on signal transduction in UMR-106 osteoblastic cells. *Biochim, Biophys. Acta.* **1224**:575-582.
- Tazawa, M. und U. Kishimoto.** 1968. Cessation of cytoplasmic streaming of *Chara* internodes during action potential. *Plant and Cell Phys.* **9**:361-378.
- Tazawa, M., T. Shimmen, und T. Mimura.** 1987. Membrane control in the Characeae. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**:95-117.
- Thiel, G., E.A.C. MacRobbie, und D.E. Hanke.** 1990. Raising the intracellular level of inositol 1,4,5-trisphosphate changes plasma membrane ion transport in characean algae. *EMBO Journal.* **9**:1737-1741.
- Thiel, G. und A. Dityatev.** 1998. Transient activity of excitatory  $Cl^-$  channels in *Chara*: evidence for quantal release of a gating factor. *J. Mem. Bio.* **163**:183-191.
- Thiel, G., Homann, U., Gradmann, D.** 1993. Microscopic elements of electric excitation in *Chara*, transient activity of  $Cl^-$  channels in the plasma membrane. *J. Mem. Bio.* **134**:53-66.
- Thiel, G., U. Homann, und C. Plieth.** 1997. Ion channel activity during the action potential in *Chara*: A new insight with new techniques. *J. Exp. Bot.* **48**: 609-622.
- Thompson, A. K., S. P. Mostafapour, L. C. Dendlinger, J. E. Bleasdale und S. K. Fisher.** 1991 The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositol hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, **266**:23856-23862.
- Tominaga, Y. und M. Tazawa.** 1981. Reversible Inhibition of Cytoplasmic Streaming by Intracellular  $Ca^{2+}$  in Tonoplast-free Cells of *Chara australis*. *Protoplasma* **109**:103-111.

- Tregear, R. T., A. P. Dawson, R. F. Irvine.** 1991. Quantal release of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores by  $InsP_3$ : tests of the concept control of  $Ca^{2+}$  release by intraluminal  $Ca^{2+}$ . *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **243**:263-268.
- Trewavas, A. und S. Gilroy.** 1991. Signal transduction in plant cells. *Trends in Genetics* **7**:356-361.
- White, P.J., B. Biskup, J.T.M. Elzenga, U. Homann, G. Thiel, F. Wissing, F. J. M. Maathuis.** (1999) Advanced patch-clamp techniques and single channel analysis. *J. Exp. Bot.* **50**:1037-1054.
- Williamson, R.E.** 1975. Cytoplasmic streaming in *Chara*: a cell model activated by ATP and inhibited by cytochalasin B. *J. Cell. S.* **17**:655-668.
- Williamson, R.E., und C.C. Ashley.** 1982. Free  $Ca^{2+}$  and cytoplasmic streaming in alga *Chara*. *Nature* **296**:647-651.
- Wang, S.S.-H., A.A. Alousi, und S.H. Thompson.** 1995. The life time of Inositol 1,4,5-trisphosphate in single Cells. *J. Gen. Physiol.* **105**:149-171.
- Wayne, R. und M.P. Staves** 1991. The density of the cell sap and endoplasm of *Nitellopsis* and *Chara*. *Plant and Cell Physiology* **23**: 1137-1144.
- Weise, R.** Schaltdynamik des dominierenden Kaliumkanals im Tonoplast von *Chara corallina*: Analyse Natrium-induzierter Zwischenleitfähigkeiten. Dissertation Universität Göttingen, Göttingen.
- Zeng, L., W.-Y. Paik, M. Ceresnjaj, T. Balla, Tomić, K. C. Catt, und S. S. Stojilkovic.** 1995. Effects of the phospholipase C inhibitor U73122, on signalling and secretion in pituitary gonadotrophs. *Endocrinol.*, **136**(3):1079-1081.

## Anhang A

Lösung der Differentialgleichungen (4.1) und (4.2)

Die Gleichungen lauten:

$$\frac{\partial[Q_1]_t}{\partial t} = k_1([Q_1]_0 - [Q_1]_t) - k_2[Q_1]_t \quad (\text{A.1})$$

$$\frac{\partial[Q_2]_t}{\partial t} = k_2[Q_1]_t - k_3[Q_2]_t \quad (\text{A.2})$$

Dabei handelt es sich um ein System von zwei linearen Differentialgleichungen mit konstanten Koeffizienten. Bei der Lösung der DGL ist zu beachten, daß  $[Q_1]_0$  kein Anfangswert ist, sondern der *Set-Point* des Systems, also der Sollwert, auf den  $[Q_1]$  geregelt werden soll. Sein Wert wird gleich 1 gesetzt.

Lineare Differentialgleichungen werden mit einem Exponential-Ansatz gelöst.

Die erste Gleichung (A.1) ist erster Ordnung und enthält deshalb eine Exponential-Funktion, die zweite (A.2) ist auch erster Ordnung, aber das „Eingangssignal“  $[Q_1](t)$  kann eine andere Zeitkonstante haben als den Eigenwert  $\lambda_1$  der ersten (A.1)

$$[Q_1](t) = a_0 + a_1 e^{-\lambda_1 t} [Q_1] \quad (\text{A.3})$$

$$[Q_2](t) = b_0 + b_1 e^{-\lambda_1 t} + b_2 e^{-\lambda_2 t} \quad (\text{A.4})$$

Gl. A.3 eingesetzt in Gl. A.1 ergibt:

$$-\lambda_1 a_1 e^{-\lambda_1 t} = k_1[Q_1]_0 - (k_1 + k_2) a_0 - (k_1 + k_2) a_1 e^{-\lambda_1 t} \quad (\text{A.5})$$

Der Koeffizientenvergleich für die verschiedenen Exponentialfunktionen in Gl. A.5 führt auf die Bestimmung von  $a_0$  und  $\lambda_1$ :

$$a_0 = \frac{k_1}{k_1 + k_2} [Q_1]_0 \quad (\text{A.6})$$

$$\lambda_1 = k_1 + k_2 \quad (\text{A.7})$$

$a_1$  läßt sich noch nicht bestimmen, da bisher noch nichts über die Größe der Störung (Eingangssignal) ausgesagt ist.

Gl. A.4 eingesetzt in Gl. A.2 ergibt:

$$-\lambda_1 b_1 e^{-\lambda_1 t} - \lambda_2 b_2 e^{-\lambda_2 t} = k_2 a_0 + k_2 a_1 e^{-\lambda_1 t} - k_3 b_0 - k_3 b_1 e^{-\lambda_1 t} - k_3 b_2 e^{-\lambda_2 t}$$

Der Koeffizientenvergleich führt auf

$$\lambda_2 = k_3 \quad (\text{A.8})$$

$$b_0 = a_0 \frac{k_2}{k_3} = \frac{k_1 k_2}{(k_1 + k_2) k_3} [Q_1]_0 \quad (\text{A.9})$$

$$b_1 = \frac{a_1 k_2}{k_3 - \lambda_1} = \frac{a_1 k_2}{k_3 - k_1 - k_2} \quad (\text{A.10})$$

$b_2$  ist ohne weitere Annahmen ebenso wie  $a_1$  nicht bestimmbar.

### Die Bestimmung von $a_1$ und $b_2$ :

In den obigen Überlegungen ist noch kein Eingangssignal berücksichtigt. Bei einem elektrischen Vierpol ist das Eingangssignal einfach die am Eingang angelegte Spannung, und die läßt sich immer sehr einfach in das inhomogene Gleichungssystem einbauen. Der Term  $[Q_1]_0$  in Gl. A.1 sieht formal wie ein Eingangssignal aus, ist es aber nicht, denn durch die angelegte Spannung (Eingangssignal) wird  $[Q_1]_0$  nicht direkt moduliert.

Bei chemischen Netzwerken ist der Einbau des Eingangssignales etwas komplizierter. Meistens wird z.B. durch Temperatur, Licht, Spannung oder Druck eine Ratenkonstante geändert. Hier ist es  $k_2$ , die sich mit der Spannung ändert. Dadurch wird das System aber nicht-linear, denn in einem linearen System müssen die Koeffizienten (und das sind in erster Linie die Ratenkonstanten) zeitinvariant sein. Im Allgemeinen wird das System dann linearisiert, und als Eingangssignal funktioniert eine hypothetische Größe, die Führungsgröße. Sie ergibt sich aus der Differenz zwischen dem aktuellen Zustand und dem Wert, den das System annehmen würde, wenn die Ratenkonstante den momentanen Wert unendlich lange halten würde (Bernasconi, 1976).

Im System dieser Arbeit ist es einfacher. Die Spannung ändert  $k_2$  sprunghaft und bleibt während eines Intervalls konstant. Damit ist das System linear im Intervall konstanter Spannung, und die Nichtlinearitäten können durch Berücksichtigen der Anfangswerte an den Intervallgrenzen berücksichtigt werden.

Aufgrund dieser günstigen Gegebenheiten, lassen sich  $a_1$  und  $b_2$  berechnen.

$a_1$  erhält man aus der Anfangsbedingung, daß  $[Q_1](t)$  für  $t = 0$  den Wert  $[Q_1]_0$  haben soll.

$[Q_1](t)$  in Gleichung A.3 hat zwei ausgezeichnete Zustände:

Für  $t \rightarrow \infty$  (unabhängig von der Tatsache, daß  $U$  nicht unendlich lange mit festem Wert anliegt, muß die Gleichung doch den Fall  $t \rightarrow \infty$  richtig wiedergeben) ist die Exponentialfunktion in Gl. A.3 null und damit

$$a_0 = \frac{k_1}{k_1 + k_2} [Q_1]_0 \quad (\text{A.11})$$

Für  $t = 0$  ist die Exponentialfunktion = 1, also

$[Q_1](0) = a_0 + a_1$  und damit

$$a_1 = [Q_1](0) - \frac{k_1}{k_1 + k_2} [Q_1]_0 \quad (\text{A.12})$$

Damit sieht man, daß hier wieder der oben genannte Ansatz gilt, daß das Eingangssignal sich aus der Differenz zwischen aktuellem Zustand ( $[Q_1](0)$  mit  $k_2 = 0$ ) und angestrebtem Zustand ( $[Q_1]_\infty$  mit  $k_2 =$  entsprechend U) berechnet.

Die Kenntnis von  $a_1$  (Gl. A.12) ermöglicht die Berechnung von

$$b_1 = \frac{a_1 k_2}{k_3 - k_1 - k_2} = \left( [Q_1](0) - \frac{k_1}{k_1 + k_2} [Q_1]_0 \right) \frac{k_2}{k_3 - k_1 - k_2} \quad (\text{A.13})$$

Zur Berechnung von  $b_2$  führt folgende Überlegung:

Für  $t = 0$  ist

$$[Q_2](0) = b_0 + b_1 + b_2. \quad (\text{A.14})$$

Am Beginn des ersten Reizpulses ist  $[Q_2](0) = 0$ . Damit ist

$$b_2 = - (b_0 + b_1). \quad (\text{A.15})$$

Das ist einsichtig, denn einen „Buckel“ bekommt man nur mit zwei Exponentialfunktionen mit Koeffizienten verschiedener Vorzeichen. Dabei muß der Koeffizient für die „schnellere“ Zeitkonstante negativ sein, um einen Ausschlag ins Positive zu erhalten. Das ist automatisch erfüllt. Wenn  $k_3 = \lambda_2$  kleiner als  $k_1 + k_2 = \lambda_1$  ist, wird  $b_1$  (Gl. A.10) negativ, sonst  $b_2$ .

Bei späteren Intervallanfängen ist  $[Q_2](0)$  ungleich null, dann muß  $[Q_2](0)$  aus der Vorgeschichte ausgerechnet werden, was aber bei der Modellierung automatisch geschieht.

$$b_2 = [Q_2](0) - b_0 - b_1 \quad (\text{A16})$$

Für das  $i$ -te Intervall schreiben sich dann die Koeffizienten mit dem Setpoint  $[Q_1]_0 = 1$  wie in Tabelle A.1 zusammengefaßt.

**Table A.1:** Koeffizienten der Lösungen der DGL A.1 und A.2 für das  $i$ -te Intervall. Die Startwerte für das erste Intervall mit  $i = 1$  sind  $[Q_1]_{i0} = 1$  und  $[Q_2]_{i0} = 0$ . Die Startwerte  $[X]_{i0}$  mit  $X = Q_1, Q_2$  müssen für  $i > 1$  aus der Vorgeschichte berechnet werden, was beim Modellieren automatisch erfolgt.

$$a_{i0} = \frac{k_1}{k_1 + k_2} [Q_1]_0$$

$$a_{i1} = [Q_1]_{i0} - \frac{k_1}{k_1 + k_2} [Q_1]_0 = [Q_1]_{i0} - a_{i0}$$

$$b_{i0} = \frac{k_1 k_2}{(k_1 + k_2) k_3} [Q_1]_0$$

$$b_{i1} = \frac{a_{i1} k_2}{k_3 - k_1 - k_2}$$

$$b_{i2} = [Q_2]_{i0} - \frac{k_1 k_2}{(k_1 + k_2) k_3} [Q_1]_0 - b_{i1} = [Q_2]_{i0} - b_{i0} - b_{i1}$$

## Anhang B

Bestimmung der Extremwerte der in Gl. 4.5 definierten Funktion

$$[Q_2]_i(t) = b_{i0} + b_{i1}e^{-(k_1+k_2)(t-t_{i0})} + b_{i2}e^{-k_3(t-t_{i0})}. \quad (\text{B.1})$$

Obige Gl. beschreibt mit den im Anhang A berechneten Koeffizienten  $b_{ij}$  (Tabelle A.1) den Verlauf von  $[Q_2]$  während der vier Intervalle  $\Delta t_i$  mit  $i = 1 \dots 4$ .

Im zweiten und im vierten Intervall gilt  $k_2 = 0$  (kein Puls). Dann vereinfacht sich Gl. B.1 für  $i = 2, 4$  wegen

$$b_{i0} = \frac{k_1 k_2}{k_3 (k_1 + k_2)} = 0 \quad \text{für } k_2 = 0,$$

$$b_{i1} = \frac{a_{i1} k_2}{k_3 - k_1 - k_2} = 0 \quad \text{für } k_2 = 0$$

und

$$b_{i2} = [Q_2]_{i0} - b_{i0} - b_{i1} = [Q_2]_{i0} \quad \text{für } k_2 = 0,$$

auf

$$[Q_2]_i(t) = [Q_2]_{i0} e^{-k_3(t-t_{i0})} \quad (\text{B.2})$$

und ist mit  $k_3 > 0$  und  $[Q_2]_{i0} > 0$  monoton fallend.

Im Gegensatz dazu können  $[Q_2]_i(t)$   $i = 1, 3$  Extrema haben.

### Extrema in den Intervallen $\Delta t_1$ und $\Delta t_3$

Zunächst muß die Nullstelle der Ableitung nach der Zeit von Gl. B.1 bestimmt werden. Die Koeffizienten  $b_{ij}$ ,  $j = 1 \dots 3$  sind für die Dauer des Intervalls  $\Delta t_i$  konstant. Zwar hängen ihre Werte vom Endwert des vorherigen Intervalls (und damit von der Dauer des vorherigen Intervalls  $\Delta t_{i-1}$ ) ab, aber das muß bei der Ableitung nach der Zeit nicht berücksichtigt werden.

Die Ableitung lautet:

$$\frac{d([Q_2]_i)}{dt} = -k_3 b_{i1} e^{-(k_1+k_2)(t-t_{i0})} - (k_1 + k_2) b_{i2} e^{-k_3(t-t_{i0})} \quad (\text{B.3})$$

An der Stelle  $t_{\max}$  bei der  $[Q_2](t)$  ein Extremum hat, muß obige Ableitung gleich null sein:

$$\begin{aligned}
& \frac{d([Q_2]_i(t_{\max}))}{dt} = \\
& 0 = -(k_1 + k_2)b_{i1}e^{-(k_1+k_2)(t_{\max}-t_{i0})} - k_3b_{i2}e^{-k_3(t_{\max}-t_{i0})} \\
& \Leftrightarrow k_3b_{i2}e^{-k_3(t_{\max}-t_{i0})} = -(k_1 + k_2)b_{i1}e^{-(k_1+k_2)(t_{\max}-t_{i0})} \\
& \Leftrightarrow -\frac{k_3b_{i2}}{(k_1 + k_2)b_{i1}}e^{-k_3(t_{\max}-t_{i0})} = e^{-(k_1+k_2)(t_{\max}-t_{i0})}
\end{aligned} \tag{B.4}$$

Beidseitiges Logarithmieren liefert

$$\begin{aligned}
& \ln\left[-\frac{k_3b_{i2}}{(k_1 + k_2)b_{i1}}\right] - k_3(t_{\max} - t_{i0}) = -(k_1 + k_2)(t_{\max} - t_{i0}) = \\
& \Leftrightarrow \ln\left[-\frac{k_3b_{i2}}{(k_1 + k_2)b_{i1}}\right] = -(k_1 + k_2)(t_{\max} - t_{i0}) + k_3(t_{\max} - t_{i0}) = \\
& \Leftrightarrow \ln\left[-\frac{k_3b_{i2}}{(k_1 + k_2)b_{i1}}\right] = (k_3 - k_1 - k_2)(t_{\max} - t_{i0})
\end{aligned} \tag{B.5}$$

Aufgelöst nach  $t_{\max}$  ist das

$$t_{\max} = t_{i0} + \frac{1}{k_3 - k_1 - k_2} \ln\left[-\frac{k_3b_{i2}}{(k_1 + k_2)b_{i1}}\right] \tag{B.6}$$

Damit ist die Lage des Extremwertes von  $[Q_2]_i(t)$  im Intervall  $\Delta t_i$  bestimmt. Wenn das Argument des Logarithmus in Gl. B.6 nicht größer null ist, hat die Gleichung keine reelle Lösung, die Funktion  $[Q_2]_i(t)$  hat dann kein Extremum auf dem offenen Intervall  $(t_{i0}, t_{i,\text{end}} = t_{i+1,0})$ .

Nach den Überlegungen in Anhang A ist das Extremum im ersten Intervall immer ein Maximum: Um einen Extremwert zu bekommen benötigt man in Gl. B.1 zwei Exponentialfunktionen mit Koeffizienten verschiedener Vorzeichen. Um einen Ausschlag ins Positive zu erhalten, muß der Koeffizient für die „schnellere“ Zeitkonstante negativ sein. Das ist in Gl. B.1 für  $i = 1$  automatisch erfüllt. Wenn  $k_3$  kleiner als  $k_1 + k_2$  ist, wird  $b_{i1}$  negativ (Gl. A.10), sonst  $b_{i2}$  (Gl. A.15).

Eine ähnliche Überlegung liefert das gleiche Ergebnis für das dritte Intervall: Damit  $[Q_2](t)$  auf dem dritten Intervall ein Minimum haben kann, muß im Fall  $k_1 + k_2 > k_3$  der Koeffizient  $b_{32}$  der Exponentialfunktion mit der "langsamen" Zeitkonstante  $k_3$  negativ und der Koeffizient  $b_{31}$  der Exponentialfunktion mit der "schnellen" Zeitkonstante  $k_1 + k_2$  positiv sein.

Nach Tabelle A.1 ist  $b_{31}$  gegeben durch

$$b_{31} = \frac{a_{31}k_2}{k_3 - k_1 - k_2} \quad (\text{B.7})$$

Der Nenner obiger Gl. ist für  $k_1 + k_2 > k_3$  negativ. Damit der Quotient positiv wird, muß auch der Zähler negativ sein.  $k_2$  ist positiv, also muß  $a_{31}$  negativ sein.

$a_{31}$  berechnet sich nach Gl. A. 17 zu

$$a_{i1} = [Q_1]_{30} - \frac{k_1}{k_1 + k_2} [Q_1]_0 = [Q_1]_{30} - a_{30} \quad (\text{B.8})$$

Um zu entscheiden,  $a_{31}$  positiv oder negativ ist, muß die Vorgeschichte von  $[Q_1]_{30}$  berechnet werden. Zu Beginn des ersten Intervalls hat  $[Q_1]$  den Wert  $[Q_1]_0$ . Sein Grenzwert  $[Q_1]_\infty$  für unendliche Intervalldauer ist durch Gl. A.11 gegeben.

$$[Q_1]_\infty = \frac{k_1}{k_1 + k_2} [Q_1]_0 = a_{10} \quad (\text{B.9})$$

Für endliche Intervalle ist  $[Q_1]$  am Ende des ersten Intervalls ( $k_2 > 0$ ) größer als  $a_{10}$ , aber in jedem Fall kleiner als  $[Q_1]_0$ . Im zweiten Intervall ist  $k_2 = 0$  (kein Puls), und  $[Q_1](t)$  strebt gegen den *Setpoint*  $[Q_1]_0$ . Für den Wert von  $Q_1$  am Ende des zweiten Intervalls gilt also:

$$[Q_1]_{30} > a_{10} = a_{30},$$

wenn der zweite Puls im dritten Intervall die gleiche Spannung  $U$  wie der Puls im ersten Intervall hat. Denn dann hat  $k_2$  in beiden Intervallen den gleichen Wert. Im Fall der Modellierung der Doppelpulsexperimente wird genau dieser Fall betrachtet.

$a_{31}$  in Gl. B.8 ist also positiv, somit kann  $b_{31}$  in Gl. B.7 nicht negativ werden. Für den Fall  $k_1 + k_2 > k_3$  kann  $[Q_2](t)$  also kein Minimum haben.

Im Fall  $k_1 + k_2 < k_3$  muß umgekehrt  $b_{31}$  positiv sein, damit  $[Q_2](t)$  im dritten Intervall ein Minimum haben kann. Weil der Zähler auf der rechten Seite von Gl. B.7 in diesem Fall aber nicht negativ werden kann, muß wieder  $a_{31}$  negativ werden, was aber nicht möglich ist.

Der Extremwert an der durch Gl. B.6 berechneten Stelle  $t_{\max}$  kann demnach kein Minimum sein, sondern muß auch für das dritte Intervall ein Maximum sein.

### Berechnung von $t_{\max 1}$

Für  $i = 1$  lautet Gl. B.4

$$t_{\max 1} = t_{10} + \frac{1}{k_3 - k_1 - k_2} \ln \left[ - \frac{k_3 b_{12}}{(k_1 + k_2) b_{11}} \right] = t_{10} + \frac{1}{k_3 - k_1 - k_2} \ln [\arg]. \quad (\text{B.10})$$

Der Ausdruck  $\arg$  in Gl. B.10 steht für das Argument des Logarithmus in Gl. B.10, welches weiter vereinfacht werden kann. Berücksichtigt man beim Einsetzen der Koeffizienten  $b_{i0}$ ,  $b_{i1}$  und  $b_{i2}$  (mit  $i = 1$  aus Tabelle A.1), daß der Anfangswert von  $Q_2$  definiert ist durch  $[Q_2]_{10} = 0$  und der von  $[Q_1]$  durch  $[Q_1]_{10} = 1$  erhält man für das Argument

$$\arg = \frac{k_3 \left[ -\frac{k_1 k_2}{(k_1 + k_2) k_3} - \left( 1 - \frac{k_1}{k_1 + k_2} \right) \left( \frac{k_2}{k_3 - k_1 - k_2} \right) \right]}{-(k_1 + k_2) \cdot \left( 1 - \frac{k_1}{k_1 + k_2} \right) \left( \frac{k_2}{k_3 - k_1 - k_2} \right)} \quad (\text{B.11})$$

Bringt man die Ausdrücke in Zähler und Nenner des Hauptbruchs auf ihren jeweiligen Hauptnenner und kürzt im Nenner (des Hauptbruchs) so vereinfacht sich das Argument zu

$$\begin{aligned} \Leftrightarrow \arg &= \frac{k_3 \cdot \left( \frac{-k_1 k_2 (k_3 - k_1 - k_2) - k_2^2 k_3}{(k_3 - k_1 - k_2)(k_1 + k_2) k_3} \right)}{\frac{k_2^2}{-(k_3 - k_1 - k_2)}} \\ \Leftrightarrow \arg &= \frac{-k_1 k_2 (k_3 - k_1 - k_2) - k_2^2 k_3}{-k_2^2 (k_1 + k_2)} \\ \Leftrightarrow \arg &= \frac{k_1 k_2 k_3 - k_1^2 k_2 - k_1 k_2^2 + k_2^2 k_3}{-k_2^2 (k_1 + k_2)} \\ \Leftrightarrow \arg &= \frac{-k_2 (k_3 - k_1)(k_1 + k_2)}{-k_2^2 (k_1 + k_2)} \\ \Leftrightarrow \arg &= \frac{k_3 - k_1}{k_2}. \end{aligned} \quad (\text{B.12})$$

Damit schreibt sich  $t_{\max 1}$  als

$$t_{\max 1} = t_{10} + \frac{1}{k_3 - k_1 - k_2} \ln \left[ \frac{k_3 - k_1}{k_2} \right]. \quad (\text{B.13 a})$$

Ist das Argument des Logarithmus nicht positiv, so hat Gl. B.13 a keine reelle Lösung.  $[Q_2]_1$  erreicht dann ihr Maximum am Ende des ersten Intervall

$$t_{\max 1} = t_{10} + \Delta t_1 = t_{20}. \quad (\text{B.13 b})$$

Denn die Anschlußfunktion  $[Q_2]_2(t)$  ist nach Gl. B.2 auf jeden Fall monoton fallend. Die Gln. B.13 a und b sind identisch mit den Gln. 4.18 a und b.

### Berechnung von $t_{\max 2}$

Um nun den Zeitpunkt  $t_{\max 2}$  zu berechnen, bei dem  $[Q_2]$  während  $\Delta t_3$  ihr Maximum erreicht, muß in Gl. B.5 für  $i = 3$  der Koeffizient  $b_{32}$  aus Tabelle A.1 und die Zeit  $t_{30} = t_{10} + \Delta t_1 + \Delta t_2$  (Abb. 4.1) eingesetzt werden:

$$t_{\max 2}(\Delta t_2) = t_{10} + \Delta t_1 + \Delta t_2 + \frac{1}{k_3 - k_1 - k_2} \ln \left[ \frac{k_3 \cdot ([Q_2]_{30}(\Delta t_2) - b_{30} - b_{31}(\Delta t_2))}{-(k_1 + k_2) \cdot b_{31}(\Delta t_2)} \right] \quad (\text{B.14 a})$$

In Gl. B.14 a sind sämtliche Terme, die von  $\Delta t_2$  abhängen gekennzeichnet, weil mit dem vorliegenden Modell  $[Q_2]$  insbesondere in Abhängigkeit von  $\Delta t_2$  berechnet werden soll. Mit Gl. B.14 a kann  $t_{\max 2}$  aber auch in Abhängigkeit der anderen Intervallängen berechnet werden. Dabei ist immer die Abhängigkeit der Koeffizienten  $b_{3i}$  und des Startwerts  $[Q_2]_{30}$  von diesen Parametern zu beachten. Die Koeffizienten  $b_{31}(\Delta t_2)$  und  $b_{32}(\Delta t_2)$  sind explizit in den Gl. 4.15 und 4.16 angegeben.  $[Q_2]_{30}$  kann nach Gl. 4.5 aus der Vorgeschichte berechnet werden.

Wenn Gl. B.14 a keine reelle Lösung hat, erreicht  $[Q_2]$  ihr Maximum am Ende des Intervalls, da  $[Q_2](t)$  im vierten Intervall ( $k_2 = 0$ ) monoton fallend ist (Gl. B.2 für  $i = 4$ ):

$$t_{\max 2} = t_{10} + \Delta t_1 + \Delta t_2 + \Delta t_3 = t_{40} \quad (\text{B.14 b})$$

Die Gln. B.14 a und b sind identisch mit den Gln. 4.13 a und b.

## Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei

Herrn Prof. Dr. G. Thiel für die Möglichkeit, diese Arbeit zu erstellen, die engagierte persönliche Betreuung und unermüdliche Unterstützung,

Herrn Prof. Dr. U.-P. Hansen für seine Bereitschaft, mich als externen Doktoranden aufzunehmen und für wertvolle Diskussionen und Anregungen über die physikalischen Aspekte der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. D. Gradmann für die Hilfe beim Modellieren,

Ufo und Ulrike für zahlreiche Diskussionen, stetes Interesse und Anteilnahme,

Bernd für die erste Einführung,

Christoph für Tips zum Beladen der Zelle,

H. Bork für die Bereitstellung von Tee und anderen Verbrauchsmitteln,

K. Unger für seine großartigen Werkstücke,

der Deutschen Forschungsgemeinschaft

und, nicht zuletzt, Marion .