



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

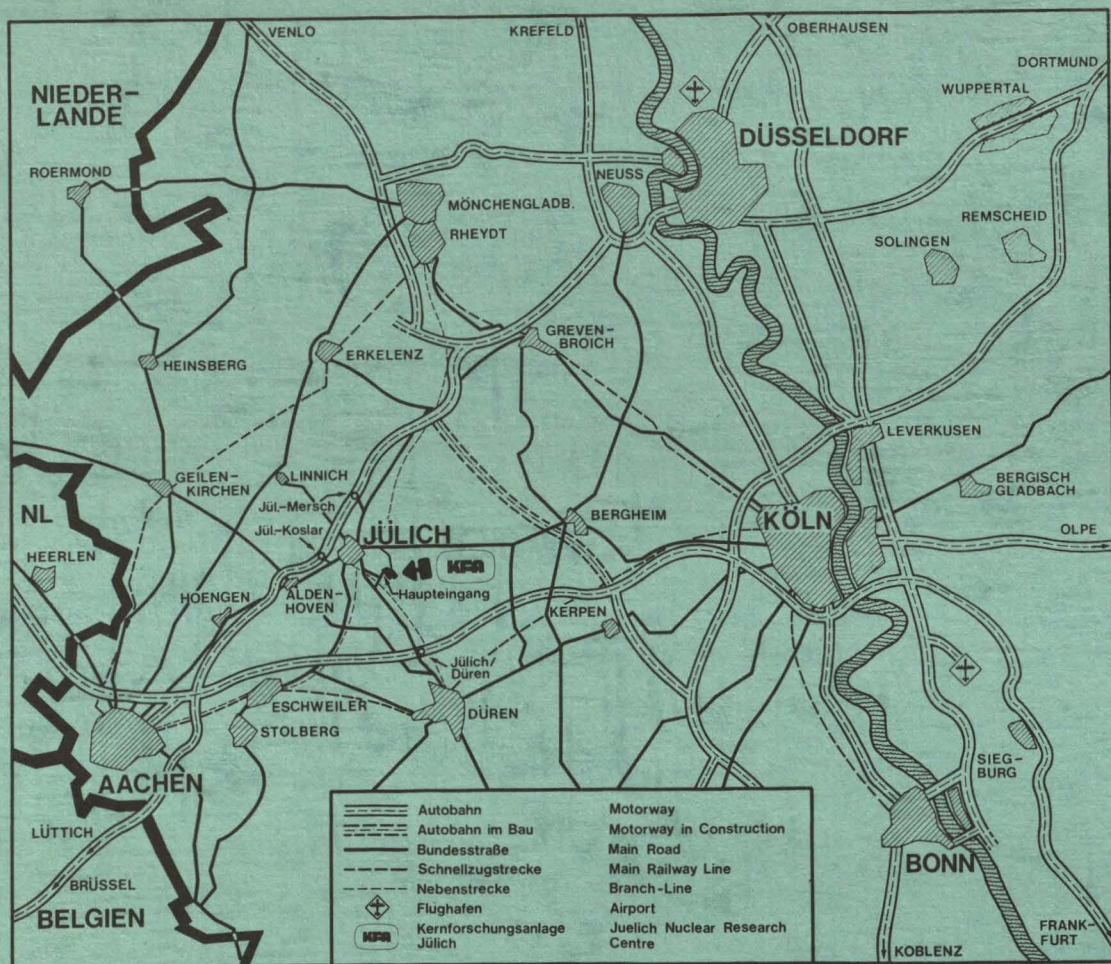
Institut für Neurobiologie

**Calcium-Transport durch die Membran
von Paramecium caudatum (Protozoa)
 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Flußmessungen mit Hilfe
der Durchströmungsmethode**

von

B. Martinac

Jül - 1661
Juni 1980
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich - Nr. 1661

Institut für Neurobiologie Jül - 1661

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 02461/611 · Telex: 833556 kfa d

**Calcium-Transport durch die Membran
von Paramecium caudatum (Protozoa)
 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Flußmessungen mit Hilfe
der Durchströmungsmethode**

von

B. Martinac

D 82 (Diss. T. H. Aachen)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Summary	IV
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	5
2.1 Material	5
2.1.1 Zellkultur, Präparation von Zellsuspensionen und Bestimmung des Proteingehalts	5
2.1.2 Lösungen	7
2.2 Methoden	7
2.2.1 Prinzip der Messungen der elektrisch stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme und -Abgabe mit Hilfe der Durchströmungsmethode	7
2.2.2 Beschreibung der Versuchsanordnung	9
2.2.3 Bestimmung der Radioaktivität	12
2.2.4 Auswertungsverfahren	12
2.2.5 Registrierung des lokomotorischen Verhaltens von Paramecium	13
2.2.6 Bestimmung der Netto- Ca^{2+} -Aufnahme	16
3 Ergebnisse	17
3.1 Durchströmungsmethode	17
3.1.1 Temperaturabhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme	17
3.1.2 Reizspannungsabhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme	20
3.1.3 Abhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme von der Dauer der Reizperiode	23
3.1.4 Abhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme vom Abstand der Reizperioden	25
3.1.5 Halbwertszeit der Relaxation in Abhängigkeit von Temperatur und Reizspannung	27
3.1.6 Ca^{2+} -Netto-Aufnahme	30
3.1.7 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe	30
3.1.7.1 Abhängigkeit der Ca^{2+} -Abgabe von der Temperatur	31

II

3.1.7.2	Abhängigkeit der Ca^{2+} -Abgabe von der Reizspannung	32
3.1.8	Wirkung des erhöhten Verhältnisses $\frac{[\text{K}^+]_o}{[\text{Ca}^{2+}]_o}^{1/2}$ auf die Ca^{2+} -Aufnahme	33
3.2	Registrierung des Bewegungsverhaltens im Dunkelfeld	35
3.2.1	Charakteristische Schwimmspuren	35
3.2.2	Bewegungsverhalten während elektrischer Reizung und Einfluß der Temperatur	37
3.2.3	Einfluß der Reizspannung auf das Bewegungsverhalten	39
3.2.4	Wirkung des erhöhten Verhältnisses $\frac{[\text{K}^+]_o}{[\text{Ca}^{2+}]_o}^{1/2}$ auf das lokomotorische Verhalten	41
4.	Diskussion	44
4.1	Interpretation des lokomotorischen Verhaltens (Dunkelfeld-Registrierungen)	44
4.2	Interpretation der Ergebnisse der Ca^{2+} -Flußmessungen	49
4.3	Quantitative Betrachtungen	58
4.4	Schlußfolgerungen	64
5	Ausblick	65
6	Zusammenfassung	66
7	Anhang	69
7.1	Berechnung der auftretenden Zentrifugalkraft beim Waschen der Zellen	69
7.2	Bestimmung des Proteingehaltes der Zellen nach Lowry	70
7.3	Bindungskonkurrenz zwischen Ca^{2+} und K^+ an der Oberfläche verschiedener Materialien	70
7.4	Stromdichte und Widerstand der Versuchskammer	72
7.5	Effektiver Spannungsabfall über der Membran von Paramecium	74

III

7.6	Anzahl der Ca^{2+} -Bindungsstellen an der Zellmembran von <i>Paramecium caudatum</i>	79
7.7	Kritische Grenzkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ krit. im intraciliären Raum für die Auslösung der Cilienschlagumkehr	80
7.8	Ca^{2+} -Diffusion zwischen Cilium und Zellkörper	81
7.9	Na^+ -Pumprate bei menschlichen Erythrozyten	82
8	Literatur-Verzeichnis	83

Summary

Methods :

1. Calcium transport across the membrane of *Paramecium caudatum* was studied by measuring calcium uptake and release by means of flow-through-technique, which was developed especially for this purpose. The method allows continuous flow of the cells suspension with radioactive and inactive solution, respectively, combined with simultaneous electrical stimulation of the cells by means of extracellular electrodes.
2. The results obtained were compared to and interpreted according to behavioral patterns of *Paramecium*, which were registered by the time exposure dark-field macrophotographic technique under the same experimental conditions.

Results :

1. Ca^{2+} uptake and release occurred as a result of electrical stimulation. Uptake decreased with increasing number of successive stimulation periods.
2. Ca^{2+} uptake and release were largest at 15 °C, except the first response of the uptake which has its maximum at 10 °C.
3. Maximum uptake was obtained at stimulus amplitude of 20 V/cm, while maximum release was measured at 36 V/cm.
4. Ca^{2+} uptake was enhanced by increasing stimulus duration until 30 s, whereafter saturation was found. Further prolongation of stimulus amplitude caused the uptake to diminish.
5. Increasing the ratio $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2}$ by increasing $[\text{K}^+]_o$ at constant $[\text{Ca}^{2+}]_o$ in the extracellular medium caused calcium uptake to change into release after repeated stimulation of the cells.
6. After flow-through-experiments were carried out the net amount of calcium taken up by the cells was measured, which was between 20 and 100 % of the total uptake during an experiment depending

on the applied temperature and stimulus amplitude.

7. At temperatures $\leq 15^{\circ}\text{C}$ cells swam backward perpendicular to the electric field (stimulus strength $\geq 10\text{ V/cm}$). At 25°C cells showed forward spiralling movement which was partly perpendicular and partly parallel to the electric field. The same phenomenon was observed at higher $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2}$ ratios (10 and 20) at 15°C .
8. The rate of backward swimming showed a time-dependent decrease at low temperatures ($\leq 15^{\circ}\text{C}$). The decrease of swimming rate was faster at increased stimulus amplitude.

Interpretation :

1. For the first time evidence was brought for stimulus-evoked Ca^{2+} influx at temperatures $> 0^{\circ}\text{C}$. This result confirms the Ca^{2+} influx hypothesis.
2. A permanent Ca^{2+} exchange due to leakage and concomitant active extrusion across the plasma membrane of Paramecium can be derived from the experiments.
3. Active Ca^{2+} extrusion together with inactivation of Ca^{2+} channels and Ca^{2+} diffusion from the ciliary space into the cell body is responsible for regulation of intraciliary Ca^{2+} concentration.
4. The dependence of Ca^{2+} transport on stimulus amplitude is assumed to result partly from increasing calcium permeability and partly from rapid inactivation and/or from an electrically activated Ca^{2+} pump.
5. The Ca^{2+} pump rate was found to be about ten times the magnitude of the Na^+ pump rate in human red cells.

1 Einleitung

Paramecium caudatum (Pantoffeltierchen) ein 200-250 μm langer ellipsoidförmiger Einzeller, ist ein typischer Vertreter der Ciliaten (Abb. 1). Die Ciliaten sind die am höchsten differenzierten Protozen, die eine Reihe von organartigen Zelldifferenzierungen (Organelle) enthalten. Ein trichterförmiger Zellmund (Cytostom) z.B. ermöglicht den Paramecien die Nahrungsaufnahme, zwei alternierend pulsierende kontraktile Vakuolen sorgen für die Konstanthaltung des osmotischen Drucks und als Bewegungsorganelle dienen die Cilien, die 10 μm lange und ca. 0,25 μm dicke zylindrische Fortsätze darstellen. Sie ermöglichen es den Organismen, zu schwimmen und Nahrungspartikel einzustrudeln. Die Zelloberfläche eines Parameciums ist mit $1 - 2 \cdot 10^4$ Cilien besetzt. Sie sind, wie die gesamte Zelle, von einer Elementarmembran (Plasmamembran) umgeben, die einerseits das Cytoplasma vom Außenmedium abgrenzt und andererseits zur Erhaltung der Form der Zelle dient.

Dank der Rezeptoreigenschaften seiner Plasmamembran, reagiert Paramecium auf verschiedene äußere Reize (z.B. mechanische, elektrische, chemische). Dieser Einzeller ist ein gut untersuchtes, aber auch weiterhin ideales Objekt für das Studium der Eigenschaften der Membran bei Erregung. Die Erregung seiner Zellmembran gleicht im Prinzip der Membranerregung von Nerven- und Muskelzellen der Metazoa (Eckert, 1972; Eckert and Brehm, 1979). Im Gegensatz zur Nerven-erregung wird der erregende Einwärtsstrom von Ca^{2+} getragen. Alle anderen wichtigen Eigenschaften der Nervenmembran wie Ruhe und Aktionspotential, sowie Refraktärität sind auch für die Plasmamembran von Paramecium charakteristisch. Unter normalen Bedingungen hat das Aktionspotential die Form einer graduierten Antwort. Die Abfolge Reiz-Erregung-Reaktion, die sich an den Cilien und der Zellmembran ereignet, kann anhand der bisherigen Ergebnisse folgendermaßen beschrieben werden :

Während einer elektrischen Depolarisation erhöht sich Membranleitfähigkeit für Ca^{2+} , deren elektrochemischer Konzentrationsgradient vom Außenmedium in das Zellinnere gerichtet ist.

Der darauffolgende Ca^{2+} -Einstrom führt zur weiteren Membrandepolarisation in einem regenerativen Prozeß (Naitoh and Eckert, 1969; Naitoh, Eckert and Friedman, 1972). Das extrazelluläre Ca^{2+} strömt in die Zelle durch die spannungsabhängigen Kanäle in der ciliären Membran (Eckert, Naitoh and Machemer, 1976; Dunlap, 1977; Ogura and Takahashi, 1976). Die Erhöhung der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration von ihrem Ruhewert ($5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ oder weniger; Hildebrand and Dryl, 1976) auf den Wert von $\text{ca. } 10^{-5} \text{ M}$ (Eckert, 1972) verursacht eine vorübergehende Richtungsänderung des effektiven Cilienschlages (Naitoh and Kaneko, 1972; Machemer, 1974). Obwohl weitgehend unbekannt, beruht der molekulare Mechanismus der Reiz-Erregung-Transduktion möglicherweise auf der unmittelbaren Wirkung des intraciliären Ca^{2+} auf den Gleitmechanismus des tubulären Systems im Cilium (sliding-microtubule hypothesis, Satir, 1968). Die Reaktionen des Einzellers äußern sich dabei in der Änderung seines lokomotorischen Verhaltens.

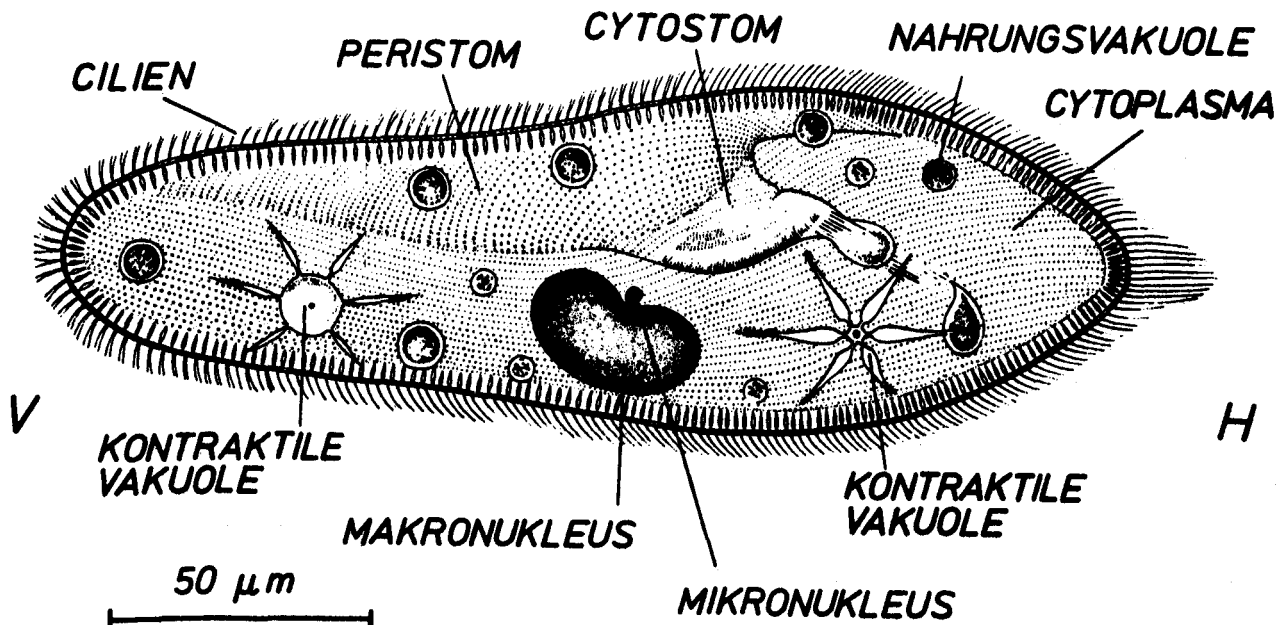


Abb. 1 Organisationsschema von *Paramecium caudatum*.

V = Vorderende, H = Hinterende. (Aus Grell, K.G. (1968) : Protozoologie. 2. Aufl., Springer-Verl., Berlin, Heidelberg, New York. Nach Kükenenthal und Matthes).

Normalerweise bewegt sich *Paramecium* mit Hilfe des Ruderschlags seiner Cilien in einer linksgewundenen Spirale bei gleichzeitiger Rotation um seine Körperlängsachse, wobei der

effektive Cilienschlag nach rechts hinten gerichtet ist. Die verschiedenen äußeren Reize können Änderungen in Schlagrichtung und -frequenz des Cilienschlages bewirken. Die charakteristische motorische Antwort auf eine mechanische Reizung des Vorderendes (z.B. Aufprall auf ein Hindernis) ist die phobische Reaktion, die sog. "avoiding reaction" (Jennings, 1906). Sie ist gekennzeichnet durch kurzzeitiges Rückwärtsschwimmen, das infolge der Cilienschlagumkehr entsteht.

Der späte K^+ -Ausstrom, der auf den Ca^{2+} -Einstrom folgt, führt zusammen mit der Verminderung der Ca^{2+} -Membranleitfähigkeit zur Membranrepolarisation (s. Review: Eckert and Brehm, 1979). Aus der zeitabhängigen Renormalisierung des Cilienschlages muß auf eine Abnahme der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration auf den Ruhewert geschlossen werden. Hierfür wird in erster Linie aktiver Ca^{2+} -Auswärtstransport verantwortlich gemacht (Hildebrand, 1978).

Browning und Nelson (1976) haben versucht, einen erregungsbedingten Ca^{2+} -Einstrom an *Paramecium aurelia* mit Hilfe des radioaktiven Isotops $^{45}Ca^{2+}$ direkt nachzuweisen. Dieser Versuch war nur teilweise erfolgreich, denn ihnen ist gelungen, einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom infolge einer Membrandepolarisation durch K^+ bzw. durch Anlegen eines elektrischen Feldes alternierender Polarität bei 0 °C nicht aber bei 23 °C zu messen. Den Ca^{2+} -Ausstrom konnten sie bei 23 °C messen. Bei 0 °C wurde kein Ca^{2+} -Ausstrom festgestellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen erregungsbedingten Ca^{2+} -Einstrom an *P. caudatum* nachzuweisen und nach Möglichkeit gleichzeitig Aussagen über den aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransport zu machen. Die angewandte Durchströmungsmethode, die zum Zwecke direkter Messungen von Ca^{2+} -Flüssen durch die Plasmamembran entwickelt wurde, erlaubt die kontinuierliche Durchströmung einer Paramecien-Suspension und gleichzeitige extrazelluläre elektrische Reizung, die eine Cilienschlagumkehr auslöst. Als Indikator für Ca^{2+} wurde das Radioisotop $^{45}Ca^{2+}$ verwandt.

Mit der Durchströmungsmethode gelang es, eine Ca^{2+} -Aufnahme wie auch eine Ca^{2+} -Abgabe der Organismen in Abhängigkeit von Temperatur und Reizspannung nachzuweisen. Da das Bewegungsverhalten

von Paramecium ein sehr präziser Indikator für die intraciliäre Ca^{2+} -Konzentration ist (s. z.B. Hildebrand, Habilitationsschrift, 1978), werden photographische Registrierungen der Bewegung von Paramecium im Vergleich zu den Flußmessungen herangezogen.

Die im folgenden beschriebenen Ergebnisse tragen zu drei Teilaspekten der Erregbarkeit der Protozoen-Membran bei :

1. eine weitergehende (vergl. Browning and Nelson, 1976) Verifikation der Ca^{2+} -Einstrom-Hypothese (Eckert, 1972) und die damit zusammenhängende Abschätzung der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration, welche die Cilienschlagumkehr auslöst,
2. die Bedeutung der Membraninaktivierung und des aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransportes für die Regulation der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration,
3. die Spannungsabhängigkeit des aktiven Ca^{2+} -Transportsystems (vgl. Hook and Hildebrand, 1979).

Für die Anregung zu dieser Arbeit danke ich Herrn Priv. Dozent Dr. E. Hildebrand; ebenso für seine Hilfe und die stete Diskussionsbereitschaft. Herrn Dr. K. Hartung bin ich zu Dank verpflichtet für die Einführung in die Isotopentechnik und Interpretation der experimentellen Daten und Herrn Dr. H.G. Smith, jr. für seine sehr hilfreichen Hinweise bei der Entwicklung der Methode. Frau A. Müller-Holtkamp möchte ich für ihre Hilfe bei meinen ersten Schritten im Umgang mit Paramecium, sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Neurobiologie für ihre Hilfsbereitschaft danken. Insbesondere danke ich Herrn Erkens und Herrn Backbier für ihre Hilfe beim Aufbau der Apparatur. Herrn Prof. Dr. H. Stieve danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Neurobiologie durchführen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur, Präparation von Zellsuspensionen und Bestimmung des Proteingehaltes.

Die Kultur von Paramecium caudatum, die aus dem Nencki Institut in Warschau stammt, wurde in einer Nährlösung aus abgekochtem Heu bei Zimmertemperatur gezüchtet. Die Zellen wurden jeweils etwa 2 Wochen nach der Inokulation mit einer Bakterienlösung für die Experimente genommen.

Nach 2- bis 3-Minuten langem Zentrifugieren bei ca. 170 g (s. Abschn. 7.1) wurde das "Zellpellet" in einen Enghalskolben (Meßkolben) mit einer Waschlösung überführt (10^{-4} bzw. 10^{-5} M CaCl_2 , 1 mM Tris/HCl, pH=7.2). Einige Zeit später sammeln sich die Zellen im Hals des Meßkolbens mit der Waschlösung aufgrund der negativen Geotaxis. Dadurch wird die Trennung zwischen den intakten und den durch das Zentrifugieren möglicherweise geschädigten Zellen gewährleistet. Die Waschprozedur wurde solange wiederholt, bis die 400- bis 500-fache Verdünnung der ursprünglichen Nährlösung durch die Waschlösung erreicht wurde. Die Zellsuspensionen, die man auf diese Weise gewonnen hatte, wurden für einen Versuchstag verwendet.

Um die für die Flußmessungen notwendigen Zelldichten zwischen 10^4 und $4 \cdot 10^4$ Zellen/ml zu erhalten, wurden die Zellsuspensionen auf die in Abb. 2 dargestellte Weise verdichtet. Vor jeder Verdichtung wurde der pH-Wert der Suspension nachgemessen und falls notwendig nachgestellt. Für die Messungen der Ca^{2+} -Aufnahme wurden jeweils 2 ml einer nicht radioaktiv markierten Zellsuspension verwendet. Vor jedem Versuch zur $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe wurden die Paramecien in der radioaktiven Waschlösung über Nacht inkubiert, nachdem die Lösung durch Zugabe von $^{45}\text{CaCl}_2$ radioaktiv markiert wurde (vgl. Abschnitt 2.1.2). Am nächsten Tage wurden 2 ml dieser Suspension für die Experimente gebraucht.

Die Bestimmung der Zelldichten erfolgte durch direktes Zählen der Zellen in einer Zählkammer (Planktonzählkammer, Fa. Zeiss) mit Hilfe eines umgekehrten Mikroskops (Standard UPL, Fa. Zeiss)

Zu diesem Zweck wurden jeweils 0,5 ml der dichten Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und auf das Volumen der Kammer (5 ml) mit Waschlösung aufgefüllt. Nach Zugabe eines Tropfens einer 8%-igen Formollösung starben die Zellen und setzten sich auf den Boden der Zählkammer ab. Danach wurde nur ein Teil des Kammerbodens von 100 mm² Fläche mit Hilfe eines Zähllokulars (Zeiss) ausgezählt. Aus bekannter Gesamtfläche des Kammerbodens (ca. 490 mm²) wurde dann die Gesamtzahl der Zellen in der Zählkammer berechnet. Pro Versuch wurde je eine Zellprobe bestimmt.

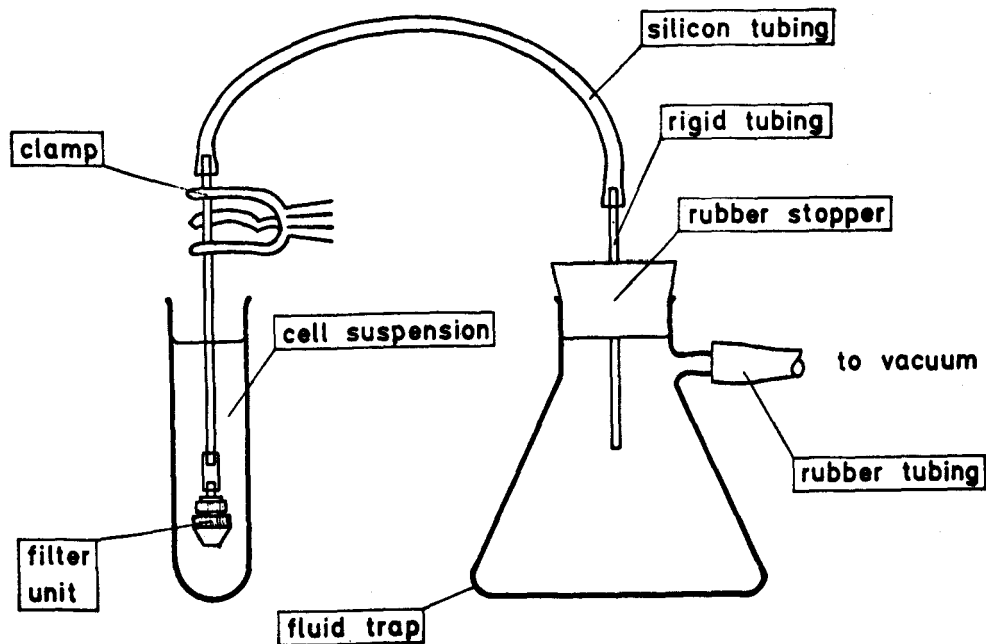


Abb. 2 Anordnung zur Verdichtung der Protozoensuspensionen. Die Filtereinheit setzt sich zusammen aus einem Sweenex-Filterhalter (Millipore) und einem Nuclepore-Filter.

Der Proteingehalt von *P. caudatum* wurde mit Hilfe des Protein-Tests nach Lowry (Lowry et al., 1951) mit dem Rinderserumalbumin als Standard bestimmt. Er beträgt zwischen 50 und 60 µg Protein pro tausend Zellen (s. Abschnitt 7.2). Dieser Wert wird gebraucht bei der Berechnung der Anzahl der Ca²⁺-Bindungsstellen an der Plasmamembran von *Paramecium* (s. Abschnitt 7.2).

2.1.2 Lösungen

Konzentrierte Stammlösungen von CaCl_2 , Tris (tris (hydroxymethyl) aminomethane)) und KCl wurden aus Chemikalien von analytischem Reinheitsgrad (Merck) und aqua bidest. hergestellt. Die Verunreinigung von KCl und Tris durch Ca^{2+} beträgt weniger als 10^{-5} .

Die Herstellung von Waschlösungen (0.1 mM und 0.01 mM CaCl_2 , 1 mM Tris/HCl, pH=7.2) erfolgte durch Mischung entsprechender Volumina der CaCl_2 - und Tris-Stammlösungen und Auffüllen mit destilliertem Wasser auf das Endvolumen. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit 1 N HCl-Lösung auf den Endwert von 7.2 mit Hilfe eines digitalen pH-Meters (Orion 601) mit einer pH-Laborelektrode (Ingold) eingestellt. Für die Versuche zum Antagonismus zwischen K^+ und Ca^{2+} wurde jeweils entsprechendes Volumen der KCl-Lösung zur Waschlösung und Zellsuspension beigemischt.

Die Lösungen für die Flußmessungen der Ca^{2+} -Aufnahme wurden durch Zugabe kleiner Mengen des Radioisotops $^{45}\text{Ca}^{2+}$ radioaktiv markiert. Die spezifische Aktivität der Lösungen betrug zwischen 10^3 und $3 \cdot 10^3$ cpm/nM Ca^{2+} . Sie wurde durch Flüssigkeitsszintillation mit Hilfe eines Szintillationszählers ("Betaszint" BF 5000, Berthold) bestimmt. Als Szintillationsflüssigkeit wurde Insta-Gel von "Packard-Instruments Company, INC." verwendet. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wurde als CaCl_2 in wäßriger Lösung mit einer Aktivität von ca. 2 mCi/ml von "The Radiochemical Centre Ltd. Amersham" bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Prinzip der Messungen der elektrisch stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme und -Abgabe mit Hilfe der Durchströmungsmethode.

Der kontinuierliche Fluß einer radioaktiv markierten bzw. nicht markierten CaCl_2 -Lösung durch ein Versuchsgefäß, das 2 ml einer dichten Zellsuspension enthält (s. Abschnitt 2.1.1), kombiniert mit zeitlich festgelegter elektrischer Reizung der Zellen erlaubt die Messungen der Ca^{2+} -Aufnahme bzw. -Abgabe. Diese beruhen auf dem Unterschied zwischen den spezifischen Radioaktivitäten in der Durchströmungslösung und intrazellulären Flüssigkeit und werden als Änderungen der Radioaktivität des extrazellulären

Mediums registriert. D.h. solange kein stationärer Zustand der Radioaktivität zwischen in- und extrazellulärem Medium erreicht ist, können meßbare Effekte registriert werden.

Das Volumen der Versuchskammer einschließlich der abführenden Schläuche zusammen mit der Durchflußgeschwindigkeit und Sammel- frequenz bestimmt die Zeitauflösung für die Registrierung von Ca^{2+} -Aufnahme und -Abgabe. Die Halbwertszeit der Mischung zwischen der radioaktiv markierten und nicht markierten Lösung im Flußsystem betrug (3.3 ± 0.8) min (s. Abschnitt 3.1.5).

Um laminare Strömung in der Versuchskammer zu verhindern und eine gute Vermischung der nachfließenden Lösung mit der Zellsuspension zu gewährleisten, wurde die Suspension mit Hilfe eines kleinen Magneten während des Versuchsablaufs leicht gerührt.

Zur Kontrolle wurden Versuche ohne Zellen mit und ohne elektrische Reizung durchgeführt. Ein kleiner Effekt der elektrischen Reizung, der als vorübergehende Störung in der Abgabekinetik erscheint (s. Abschnitt 2.2.4), konnte bei den Kontrollversuchen zur Ca^{2+} -Abgabe registriert werden. Vermutlich wirkt die Versuchskammer als Massenspektograph für die beiden Calcium-Isotope ($^{40}\text{Ca}^{2+}$ und $^{45}\text{Ca}^{2+}$). Bei den Kontrollversuchen zur Ca^{2+} -Aufnahme konnte kein solcher Effekt festgestellt werden, da bei dieser Art von Messungen die Schwankungen in der Radioaktivität zwischen den einzelnen Fraktionen infolge hoher spezifischer Aktivität relativ groß sind, so daß keine meßbare Isotopentrennung registriert wurde.

Ein Versuch, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bzw. -Abgabe als Folge chemischer Reizung der Zellen mit erhöhter K^+ -Konzentration zu messen, war erfolglos. Der Grund dafür liegt in der Bindungskonkurrenz zwischen K^+ und Ca^{2+} an der Oberfläche sämtlicher verwendeter Materialien (s. Abschnitt 7.3), so daß kein signifikanter Effekt in den Versuchen mit Zellen gemessen werden konnte. Die Methode der elektrischen Reizung zeigt sich wegen ihrer Unabhängigkeit vom Kationenaustausch auf den Oberflächen der verschiedenen Teile des Flußsystems als besonders vorteilhaft für diese Art von Messungen.

2.2.2 Beschreibung der Versuchsanordnung

Die Versuchsanordnung ist schematisch in Abb. 3a dargestellt.

Radioaktiv markierte bzw. nicht markierte Lösung wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (LKB 2120 Varioperpex peristaltic pump) vom Vorratsgefäß durch die Versuchskammer zum Fraktions-sammler (LKB 2112 RediRac) befördert. Die einzelnen Teile des Flußsystems sind mit Silikonschläuchen miteinander verbunden. Die Fraktionen wurden mit konstanter Rate von 10 Tropfen (0.67 ml) pro Minute gesammelt.

Die Versuchskammer (Abb.3b) ist ein rechteckiges Gefäß aus Plexiglas mit den inneren Abmessungen 20 x 10 x 10 mm. Die gegenüberliegenden Seiten (20 x 10 mm) sind mit Platinfolie belegt, so daß die zwei Elektroden einen Kondensator mit dem Abstand von 10 mm bilden. Die kreisförmige Vertiefung im Boden des Gefäßes hält einen kleinen Rührmagnet, der dem rotierenden Magnetfeld eines Magnetrührers folgend in der Vertiefung rotiert. Die Nuclepore-Filter ($d=13\text{mm}$, Porengröße = $5\text{ }\mu\text{m}$), die das Entkommen der Organismen aus dem Versuchsgefäß verhindern sollen, sind in Ein- und Ausflußöffnung des Gefäßes mit Hilfe von Dichtungsringen und "Sweenex"-Filterhalter (Millipore) befestigt.

Das Blockdiagramm in Abb. 3a stellt die gesamte Versuchsanordnung dar. Die elektrische Reizung wurde mit Hilfe eines Puls-generators (Tektronix Inc. Beaverton, Oregon) gewährleistet und erfolgte durch Anlegen eines gepulsten elektrischen Feldes alternierender Polarität, das einen Strom wechselnder Polarität erzeugt. Die Stromdichte in den Lösungen mit relativ kleiner Chloridkonzentration ist klein, so daß keine Chlorentwicklung infolge Elektrolyse auf der Oberfläche der Elektroden beobachtet wurde, obwohl Elektrolyse in geringem Maße nicht vollkommen auszuschließen ist (s. Abschnitt 7.4). Die Pulsamplitude kann mit Hilfe eines nachgeschalteten Spannungsverstärkers 10-fach verstärkt werden. Pulsform und -Amplitude werden auf dem Oszillographenschirm registriert. Die Pulsbreite von 10 ms und die Frequenz des alternierenden elektrischen Feldes von 10 Hz waren feste Parameter während aller in der Arbeit beschriebenen Versuche (Browning and Nelson, 1976).

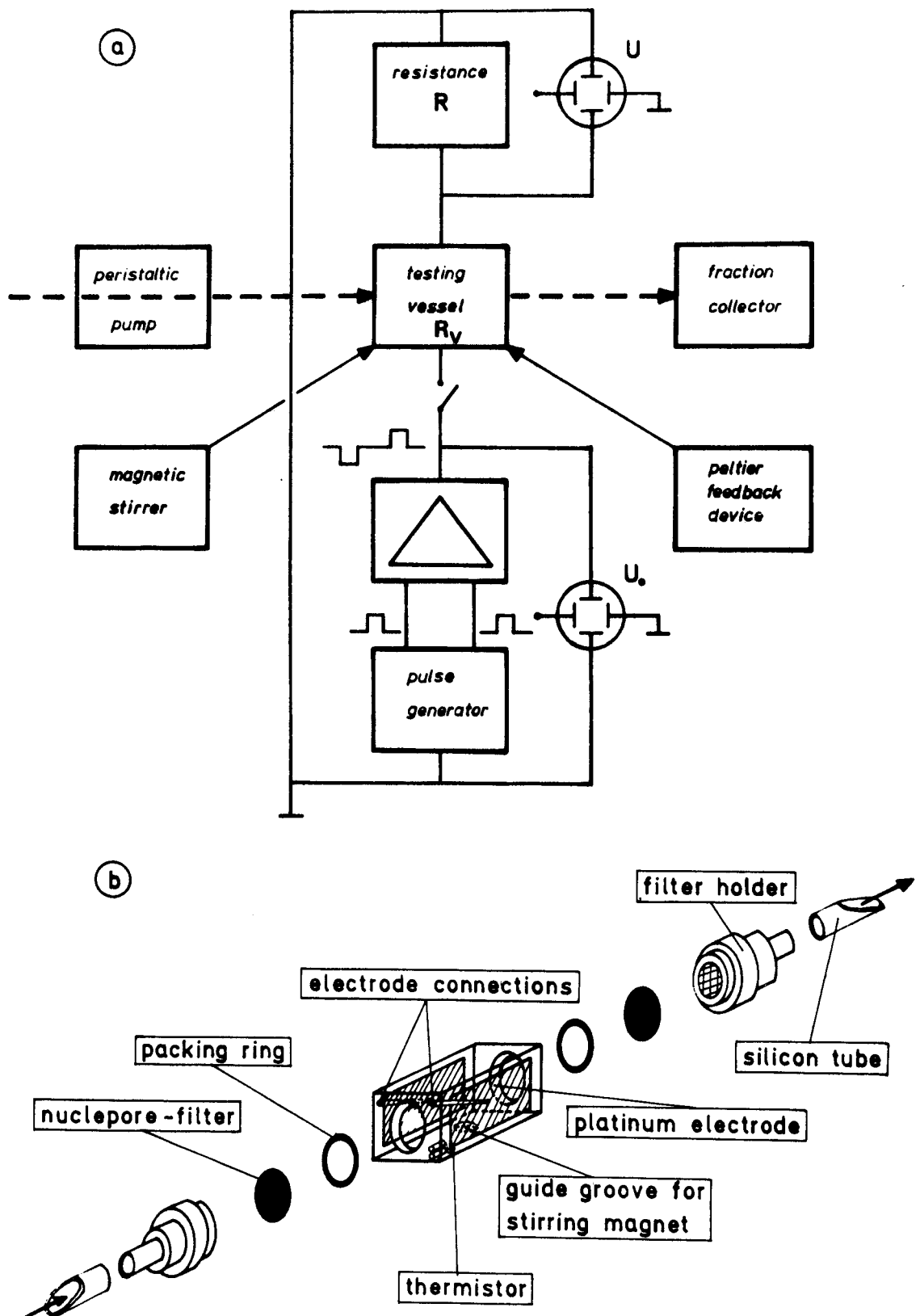


Abb. 3 a) Schema der Versuchsanordnung. b) Versuchskammer.
Elektrodenabstand = 10 mm, Volumen der Versuchskammer
= 2 ml.

Da die Versuchskammer in Serie mit einem kleinen Widerstand ($R \ll R_V$) einen Spannungsteiler bildet, ist es möglich, durch die Messung des Spannungsabfalls am Widerstand R mit einem zweiten Oszillographen, den aktuellen Widerstand der Versuchskammer R_V und die dazugehörige Stromdichte i_V zu bestimmen :

$$\frac{U}{U_0} = \frac{R}{R_V + R}$$

Wenn $U \ll U_0$, dann gilt :

$$R_V = R \frac{U_0}{U} \quad (1)$$

R_V = elektrischer Widerstand der Versuchskammer ($k\Omega$)

R = 12Ω

U_0 = Pulsamplitude (V)

U = Spannungsabfall an R (mV)

Nach Ohmschem Gesetz und mit der Gl. (1) folgt :

$$i_V = \frac{1}{S} \frac{U_0}{R_V} = \frac{1}{S} \frac{U}{R} \quad (2)$$

i_V = elektrische Stromdichte (mA/cm^2)

S = Oberfläche einer Platinelektrode (2 cm^2)

Die Stromdichte i_V kann als Kontrollparameter für die Schwankungen in der ionalen Konzentration der Versuchslösung gebraucht werden (s. Abschnitt 7.4).

Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Peltier-Regelgerätes (Peltier KFA-ZEL) reguliert. Die Genauigkeit der Temperatureinstellung zwischen 0 und 30°C betrug $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Die Temperatur wurde mit einem NTC-Widerstand im Boden der Kammer gemessen, der gegen einen Eichthermistor geeicht wurde. Die Temperaturangabe gilt immer für den ganzen Versuch seit Beginn der Durchströmung mit radioaktiv markierter bzw. nicht markierter Lösung.

2.2.3 Bestimmung der Radioaktivität

Das Standardvolumen der radioaktiven Lösung einzelner Fraktionen (0,67 ml = 10 Tropfen) wurde durchweg mit 5 ml Insta-Gel vermischt. Um die Quantenausbeute der Lumineszenzphotonen, die durch β -Strahlen von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ erzeugt werden, zu erhöhen, wurden die Proben vor jedem Zählvorgang ca. 40 min im Szintillationszähler gekühlt (Betriebstemperatur = 10 °C). Danach wurde jede Probe entweder 4 oder 10 min mit einer Genauigkeit zwischen 0,5 % und 0,2 % gezählt. Die gemessenen Zählraten wurden direkt in cpm ausgedrückt.

2.2.4 Auswertungsverfahren

Die Meßdaten wurden mit Hilfe von in BASIC-Computersprache verfaßten Rechen- und Zeichenprogrammen auf einer PDP 11/40-Rechenmaschine (Digital Equipment International Ltd., Galway) ausgewertet.

Um die durch die Zellen aufgenommene Ca^{2+} -Menge berechnen zu können, müssen die Meßwerte zuerst linearisiert werden. Die Linearisierung wurde aufgrund der plausiblen Annahme durchgeführt, daß der Zeitverlauf des Radioaktivitätsanstiegs durch die Summe steigender Exponentialfunktionen beschrieben werden kann (Jacquez, 1972). Eine solche Exponentialfunktion hat folgende Gestalt :

$$y = y_{\max} [1 - \exp(t/\tau)] \quad (3)$$

y = aktuelle Radioaktivität der einzelnen Fraktion

$y_{\max}$ = maximale Radioaktivität während eines Versuchs

τ = Zeitkonstante (min)

t = Zeit (min)

Die Kurvenanpassung wurde durchgeführt, indem die Logarithmen einzelner Meßpunkte nach der Methode der kleinsten Quadrate (Fehlerquadratmethode) behandelt wurden. Antilogarithmen, die danach berechnet wurden und die bestimmten Meßpunktgruppen entsprachen, wurden über die im Experiment gewonnene Meßkurve mit Hilfe eines an die Rechenmaschine angeschlossenen Kurvenschreibers aufgetragen. Die beste Kurvenpassung wurde nach

Augenmaß bestimmt und als Basislinie für die Aufzeichnung der linearisierten Daten gebraucht.

Beispiel eines Versuchs zur Messung der Ca^{2+} -Aufnahme ist in Abbildung 4a dargestellt. Die schnelle Kinetik des Radioaktivitätsanstiegs ist durch die steile punktierte Kurve repräsentiert. Sie wurde für die Meßpunktgruppe im Zeitintervall zwischen 2. und 8. Minute des Versuchsablaufs berechnet. Die Halbwertszeit des Kurvenanstiegs beträgt 3,5 min und entspricht der Zeit, die für die Mischung zwischen der nachfließenden radioaktiven Lösung und der nichtradioaktiven Zellsuspension im Flußsystem charakteristisch ist. Die langsam ansteigende Exponentialfunktion beschreibt sowohl die Bindung von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ an die Oberfläche verschiedener Teile des Flußsystems (Versuchskammer, Schlauchsystem), als auch den $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch zwischen den Zellen und dem Medium im ungereizten Zustand der Zellen. Diese Kurve wurde berechnet für die Punktgruppe im Zeitintervall zwischen 20. und 40. Minute des Versuchsablaufs. Für die linearisierten Werte, die in Abb. 4b veranschaulicht sind, stellt sie die Basislinie dar.

Im Falle der Messungen zur Ca^{2+} -Abgabe wurde zu jedem Versuch mit einer Paramecien-Suspension eine Kontrolle unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Paramecien durchgeführt. Die gemittelten Werte wurden so ausgewertet, indem sie aus drei entsprechenden Versuchen voneinander abgezogen wurden. Die Differenz repräsentiert die durch Paramecien infolge der Reizung abgegebene $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Menge. Ein charakteristischer Versuch zur $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe (Abb. 5) soll dieses Verfahren veranschaulichen.

2.2.5 Registrierung des lokomotorischen Verhaltens von Paramecium

Die Bewegungen von Paramecium wurden mit der Dunkelfeld-Methode photographisch bei Langzeitbelichtung registriert (Ferguson, 1957; Dryl, 1958). Zu diesem Zweck wurde eine mit Platinelektroden versehene Glaskammer (20 x 20 x 1 mm) benutzt. Die elektrische Reizung erfolgte mit derselben Anordnung, die bei den Flußmessungen gebraucht wurde (s. Abschnitt 2.2.2). Die Temperaturregelung wurde mit der Genauigkeit von $\pm 0,1^\circ\text{C}$ durch das

Peltier-Regelgerät gewährleistet. Die Belichtungszeit betrug 6 s.

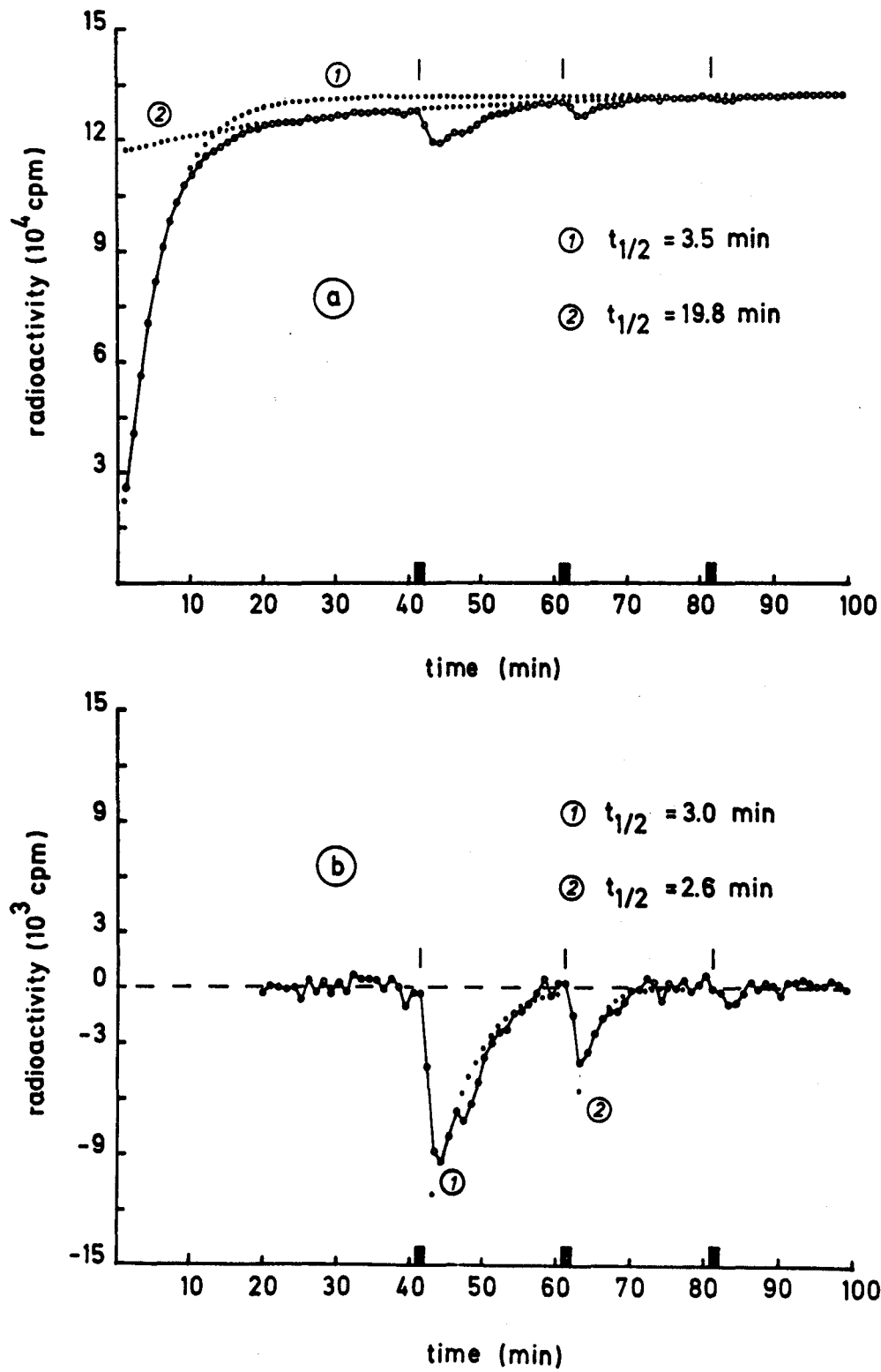


Abb. 4

Abb. 4 a) Versuch zur Ca^{2+} -Aufnahme (80 000 Zellen, Temperatur = 25 °C). Punktierte Kurven, berechnet nach der Fehlerquadratmethode, beschreiben schnelle und langsame Kinetik im Flußsystem.

b) Revidierte Darstellung, gewonnen nach Subtraktion der oberen Kurve von der punktierten Kurve für langsame Kinetik. Reizantworten unter der Basislinie repräsentieren die Radioaktivitätsabnahme im Medium nach erfolgter Reizung (Pulsamplitude = 20 V, entspr. 20 V/cm ; Reizdauer = 1 min).

Abszisse : Zeit nach Beginn der Durchströmung mit radioaktiver Lösung,

Ordinate : Radioaktivität in der durchströmenden Lösung.

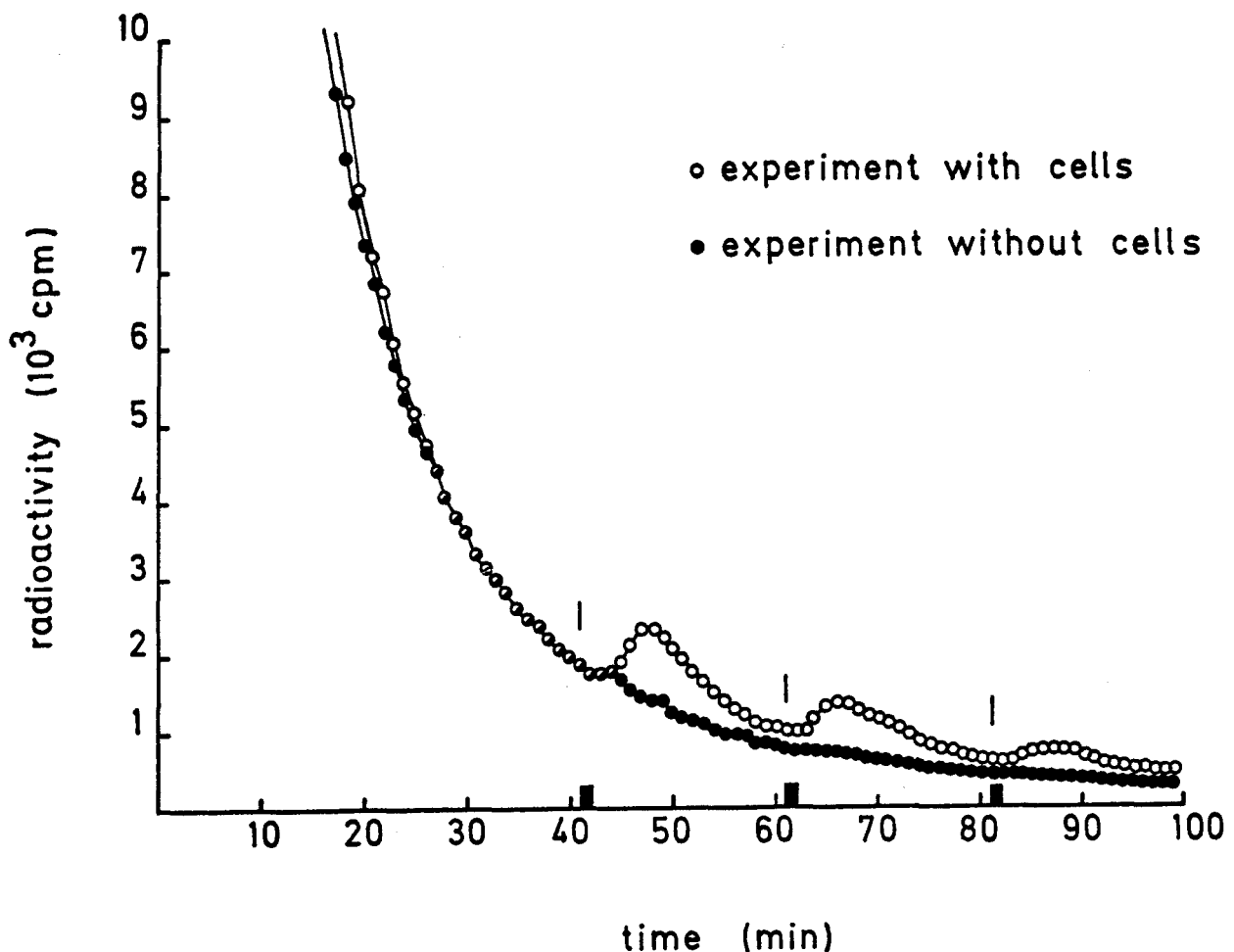


Abb. 5 Versuch zur $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe. Temperatur = 5 °C, Pulsamplitude = 20 V, entspr. 20 V/cm ; Reizdauer = 1 min. Koordinatenbezeichnung wie in Abb. 4 .

2.2.6 Bestimmung der Netto - Ca^{2+} -Aufnahme

Die Ca^{2+} -Netto-Aufnahme, die nach Durchführung der Flußexperimente in den Paramecien verblieben ist, wurde folgendermaßen bestimmt :

Die Zellen wurden nach den Versuchen auf dem Nuclepore-Filter gesammelt und nach dem Trocknen im Trockenschrank mit der Szintillationsflüssigkeit vermischt. Danach wurde die Radioaktivität der Proben im Szintillationszähler bestimmt. In getrennten Versuchen wurde die Radioaktivität der Filter auf dieselbe Weise bestimmt. Nach der Subtraktion der beiden Werte voneinander, wurde die Ca^{2+} -Netto-Aufnahme berechnet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Tab. 2 (s. Abschnitt 3.1.6) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Durchströmungsmethode

3.1.1 Temperaturabhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme

Die reizbedingte Ca^{2+} -Aufnahme in Abhängigkeit von der Temperatur wurde zwischen 5 und 25 °C in Schritten von 5 °C gemessen. Bei jeder Temperatur wurden je drei Versuche durchgeführt. Die einzelnen Experimente sind in Abb. 6 dargestellt. Unterhalb 5 °C wurden keine Versuche durchgeführt. Kontrollversuche bei 0 °C haben gezeigt, daß die Zellen diese extremen Bedingungen nicht überleben. Innerhalb von 90 min sterben sie ab, ohne daß sie elektrischer Reizung ausgesetzt waren.

Die erste elektrische Reizung (Pulsamplitude = 20 V, Reizdauer = 1 min) wurde während aller durchgeführten Versuche in der 41. Minute gegeben, nachdem ein quasistationärer Zustand im Flußsystem erreicht wurde. Ergebnis der Reizung ist eine Radioaktivitätsabnahme im extrazellulären Medium, die innerhalb einer Zeit von ca. 4 min nach Reizbeginn ihr Maximum erreicht. Ein langsames Abklingen der Reizantwort erfolgt in den folgenden Minuten. Die zweite und dritte Reizperiode wurden jeweils in einem Abstand von 20 min hintereinander ausgeführt. Die Maxima der Reizantworten und folglich die Menge des aufgenommenen Ca^{2+} werden kleiner als nach dem ersten Reiz. Die Halbwertszeiten des Relaxationsvorganges werden von Reizantwort zu Reizantwort im Mittel kürzer (siehe Abschnitt 3.1.5).

Bei allen Temperaturen ist die erste Reizantwort deutlich zu erkennen. Die zweite und dritte Antwort werden mit steigender Temperatur besser erkennbar. Bei 15 °C sind alle drei Antworten am deutlichsten ausgeprägt. Oberhalb 15 °C werden die Reizantworten kleiner. Die dritte Antwort verschwindet bei 25 °C vollkommen.

Die gemittelten Ergebnisse aus allen Versuchen zur Ca^{2+} -Aufnahme sind in Abb. 7 dargestellt. Die erste Antwort hat das Maximum bei 10 °C. Maxima der zweiten und der dritten Antwort liegen bei 15 °C. In Abb. 8 ist die Abhängigkeit der Summe aller drei

Reizantworten als Maß für die totale Ca^{2+} -Aufnahme während aller drei Reizperioden von der Temperatur veranschaulicht. Die maximale Ca^{2+} -Aufnahme wird unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei 15 °C erreicht.

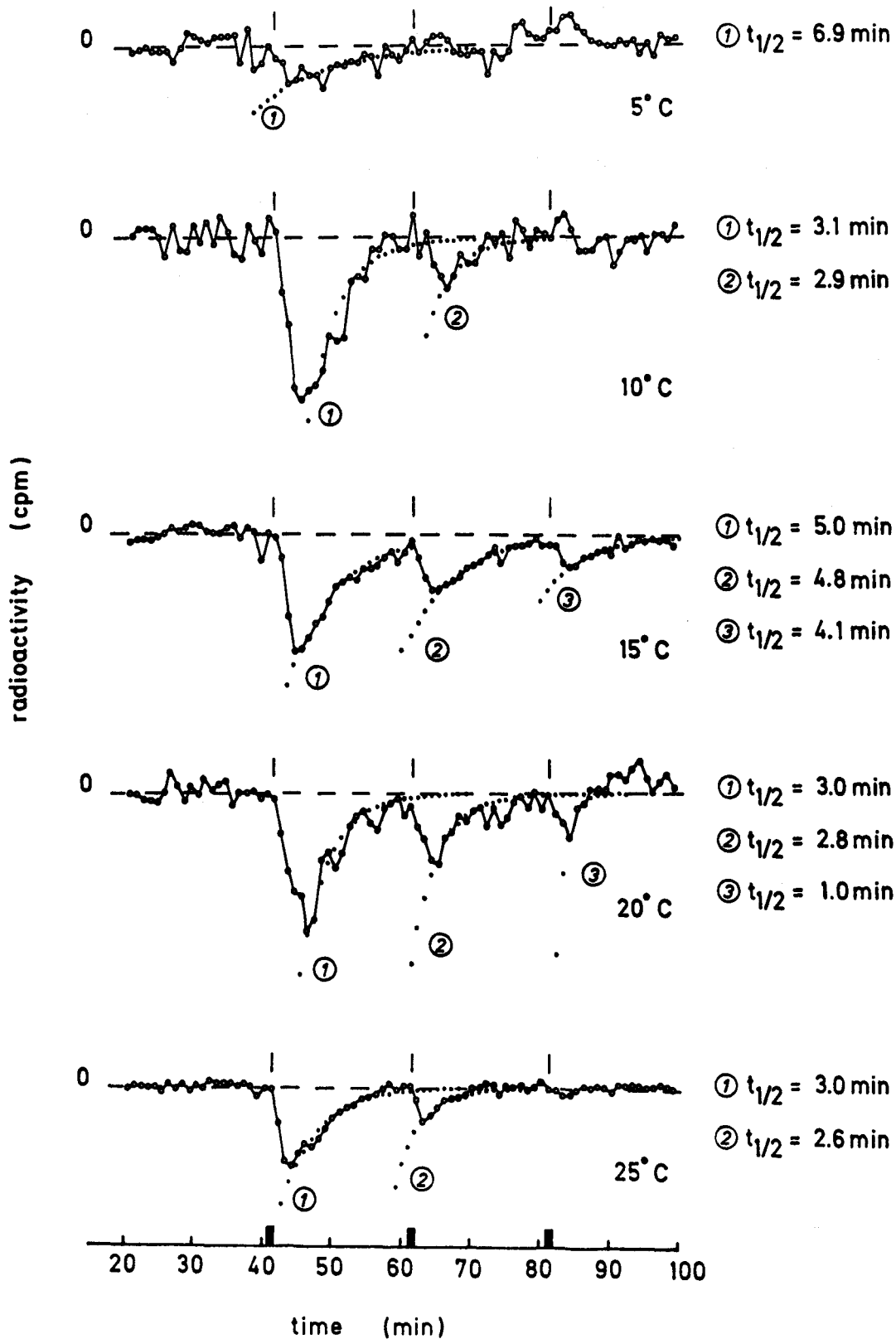


Abb. 6

Abb. 6 Versuche zur Ca^{2+} -Aufnahme bei verschiedenen Temperaturen. Alle Meßwerte sind auf die spezifische Aktivität von $2 \cdot 10^3$ cpm/nM Ca^{2+} und 38 000 Zellen normiert. Spannung = 20 V, Reizdauer = 1 min. Koordinatenbezeichnung wie in Abb. 4 .

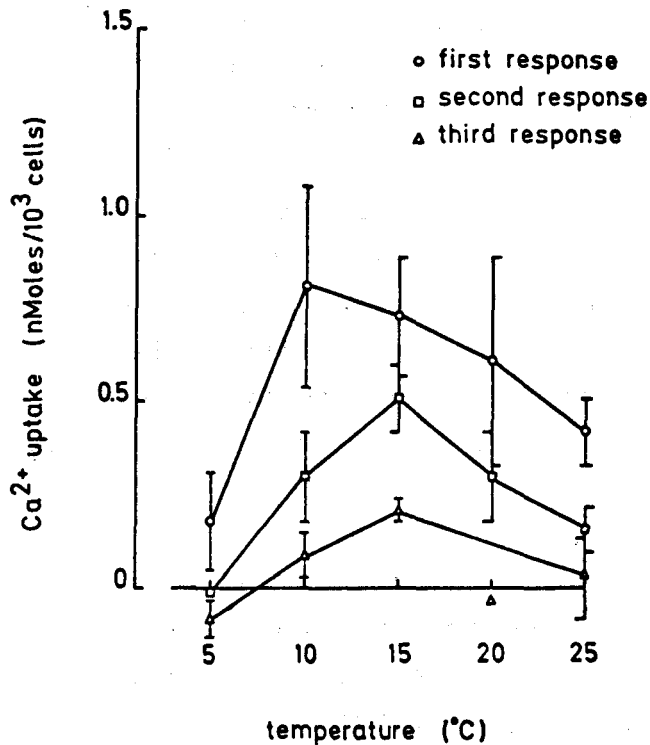
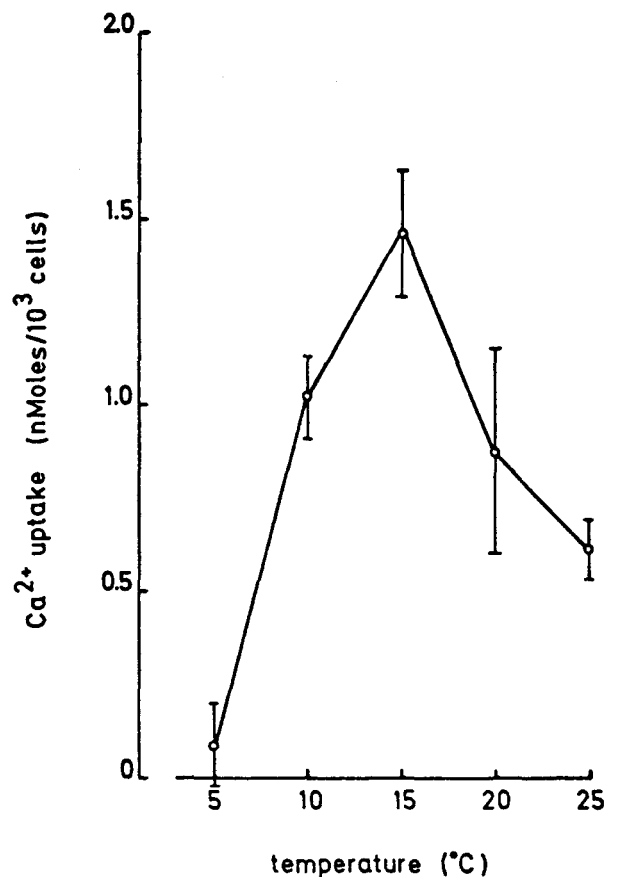


Abb. 7 Ca^{2+} -Aufnahme normiert auf 1 000 Zellen. Temperaturabhängigkeit der einzelnen Reizantworten. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ S.D. aus 3 Versuchen dar. Der Meßpunkt für die erste Reizantwort bei 15 °C repräsentiert den Mittelwert $\pm$ S.D. aus 12 Versuchen.

Abb. 8 Ca^{2+} -Aufnahme normiert auf 1 000 Zellen. Temperaturabhängigkeit der Summe aller drei Reizantworten (aus Abb. 7, gleiche Versuche).



3.1.2 Reizspannungsabhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme

In dieser Meßreihe wurde die Reizspannung zwischen 4 und 36 V in Schritten von 8 V variiert. Bei jeder Reizspannung wurden je 3 Versuche durchgeführt. Übrige Bedingungen wie in 3.1.1. Einzelne Reizperioden wurden in Zeitabständen von 20 min appliziert. Die Reizdauer betrug 1 min. Alle Versuche wurden bei 15 °C durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt.

Bei 4 V Reizspannung ist keine deutliche Reizantwort zu erkennen. Bei 12 V und besonders bei 20 V sind alle drei Antworten sehr deutlich ausgeprägt. Die zweite und dritte Reizantwort verschwinden bei 28 und 36 V fast vollkommen. Kontrollversuche oberhalb 36 V haben gezeigt, daß mehrfache Reizung unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu sichtbarer Verletzung der Zellen führt (s. dazu Abschnitt 7.5).

Die Größe einzelner Antworten und damit die Fläche unter den entsprechenden Kurven nehmen mit steigender Spannung zuerst zu. Oberhalb 20 V nehmen sie wieder ab. Parallel dazu werden die Halbwertzeiten der Erholungsphase der Kurven kürzer (s. Abschnitt 3.1.5).

Die Abhängigkeit der einzelnen Reizantworten von der Reizspannung ist in Abb. 10 dargestellt. Die Maxima aller drei Antworten treten bei einer Spannung von 20 V auf. Dementsprechend liegt das Maximum ihrer Summe auch bei 20 V (Abb.11).

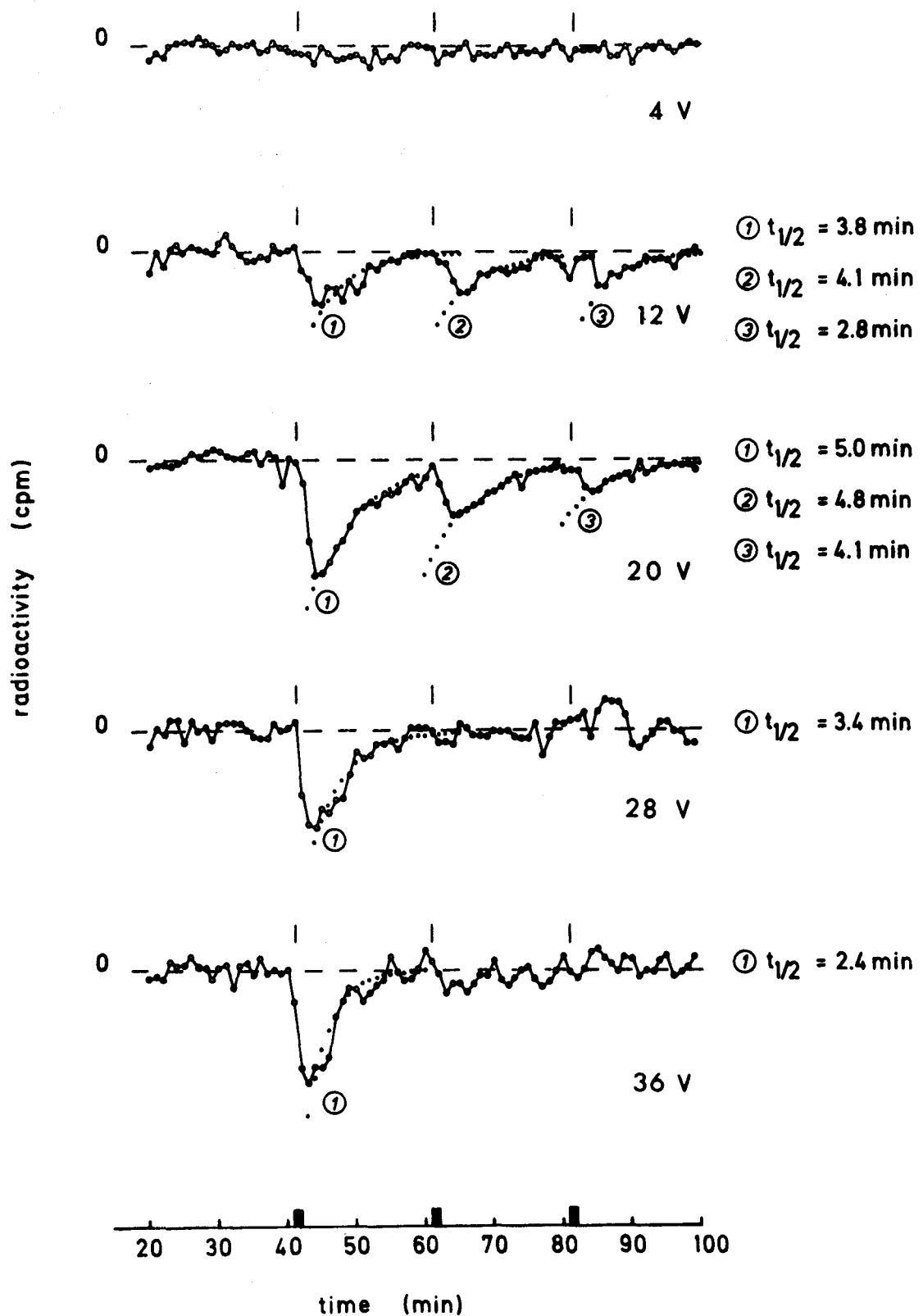


Abb. 9 Versuche zur Ca^{2+} -Aufnahme bei verschiedenen Reizspannungen. Normierung der Meßwerte wie in Abb. 6. Reizdauer = 1 min, Temperatur = 15 °C. Koordinatenbezeichnung wie in Abb. 4 . 20 V entspricht 20 V/cm.

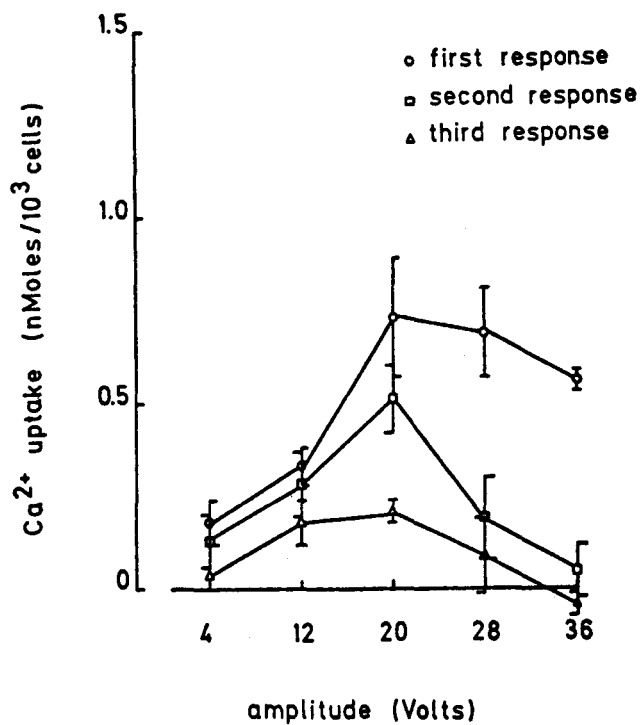


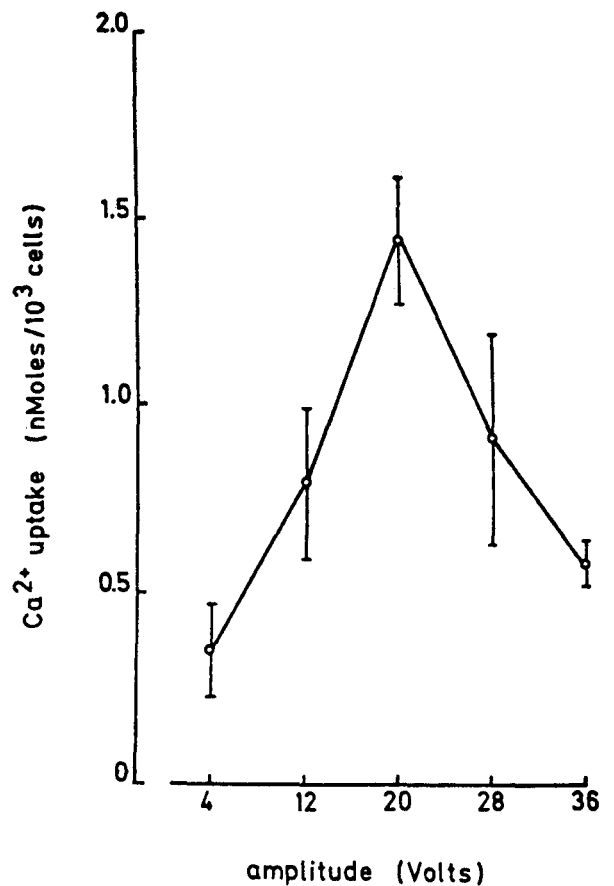
Abb. 10 Ca^{2+} -Aufnahme normiert auf 1 000 Zellen.

Abhängigkeit der einzelnen Reizantworten von der Reizspannung. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ S.D. aus drei Versuchen dar. Der Meßpunkt für die erste Reizantwort bei 20 V repräsentiert den Mittelwert $\pm$ S.D. aus zwölf Versuchen.

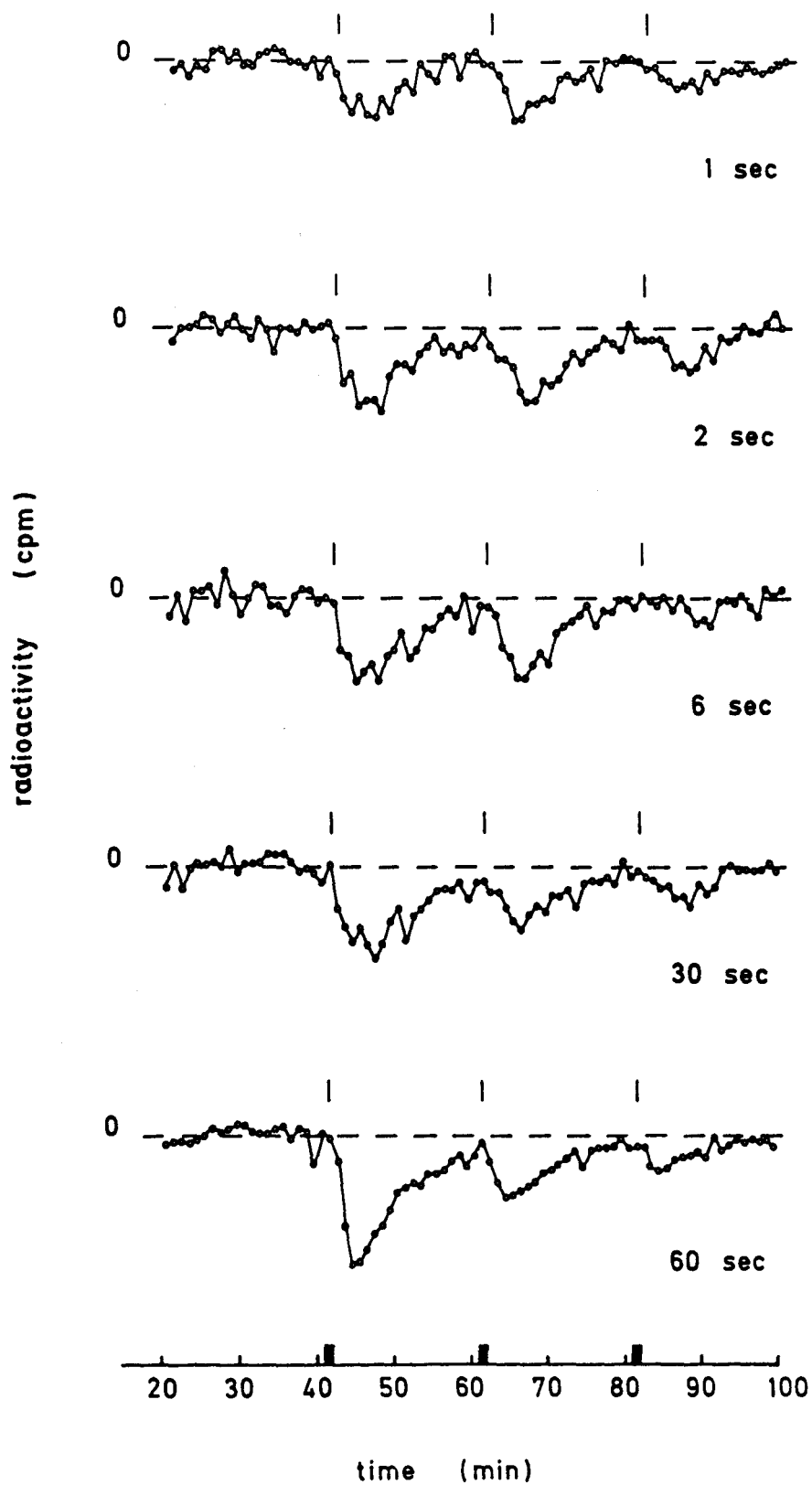
Abszisse : Reizspannung über den Elektroden der Versuchskammer.

Abb. 11 Ca^{2+} -Aufnahme normiert auf 1 000 Zellen.

Abhängigkeit der Summe der drei Reizantworten von der Reizspannung (aus Abb. 10, gleiche Versuche).



3.1.3 Abhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme von der Dauer der Reizperiode.



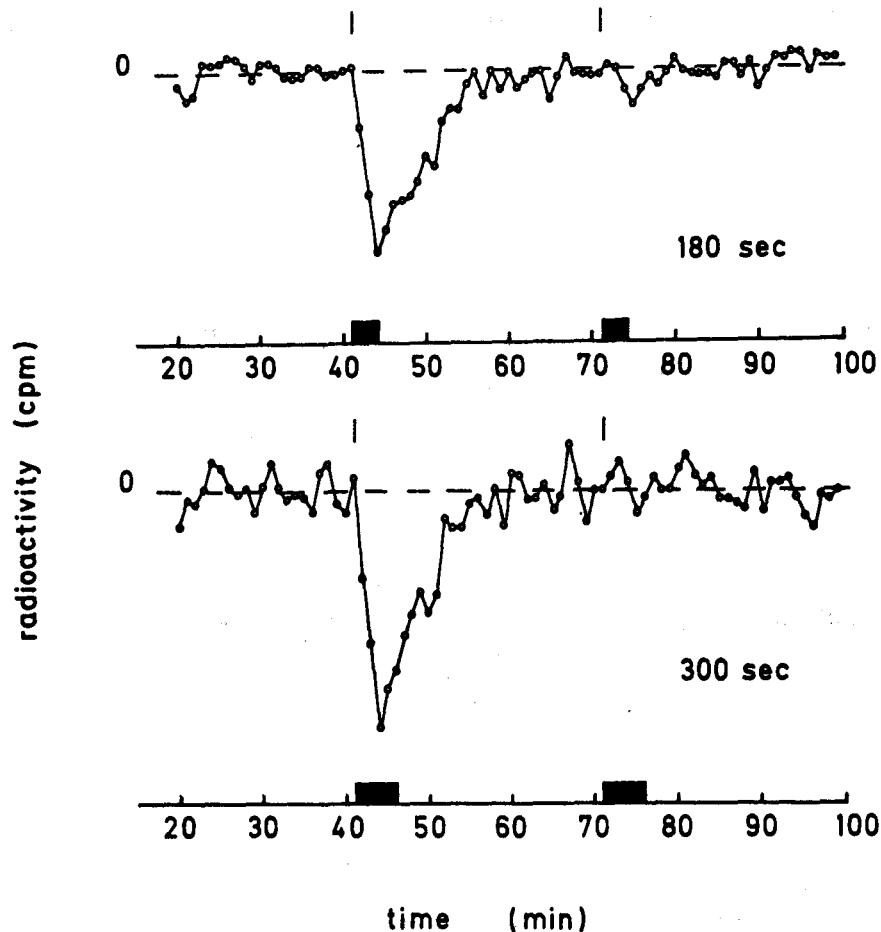


Abb. 12 Versuche zur Abhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme von der Dauer der Reizperiode. Normierung der Meßwerte wie in Abb. 6. Reizspannung = 20 V, Temperatur = 15 °C. Koordinatenbezeichnung wie in Abb. 4 .

Alle Versuche dieser Meßreihe wurden bei 15 °C durchgeführt. Zu jeder Reizdauer wurden je drei Versuche durchgeführt, ausgenommen bei den Reizdauern von 180 und 300 s, bei welchen je zwei Versuche durchgeführt wurden. Die Reizamplitude betrug durchweg 20 V. Während der Versuche in denen der Reiz zwischen 1 und 60 s dauerte, wurde in Zeitabständen von 20 min jeweils dreimal gereizt. In diesen Versuchen sind alle drei Reizantworten sehr gut erkennbar. Bei angewendeter Reizdauer von 180 und 300 s betrug der Reizabstand je 30 min. Die erste Reizantwort ist sehr deutlich ausgeprägt, die zweite hingegen ist schlecht zu erkennen. Die einzelnen Versuche sind in Abb. 12 dargestellt.

Die Ca^{2+} -Aufnahme während der ersten Reizantwort steigt zwischen 1 und 60 s Reizdauer (Abb. 13) bis zur Sättigung bei ca. 60 s Reizdauer an. Die zweite Reizantwort fällt mit zunehmender Dauer der Reizperiode ab. Die dritte Antwort bleibt etwa konstant.

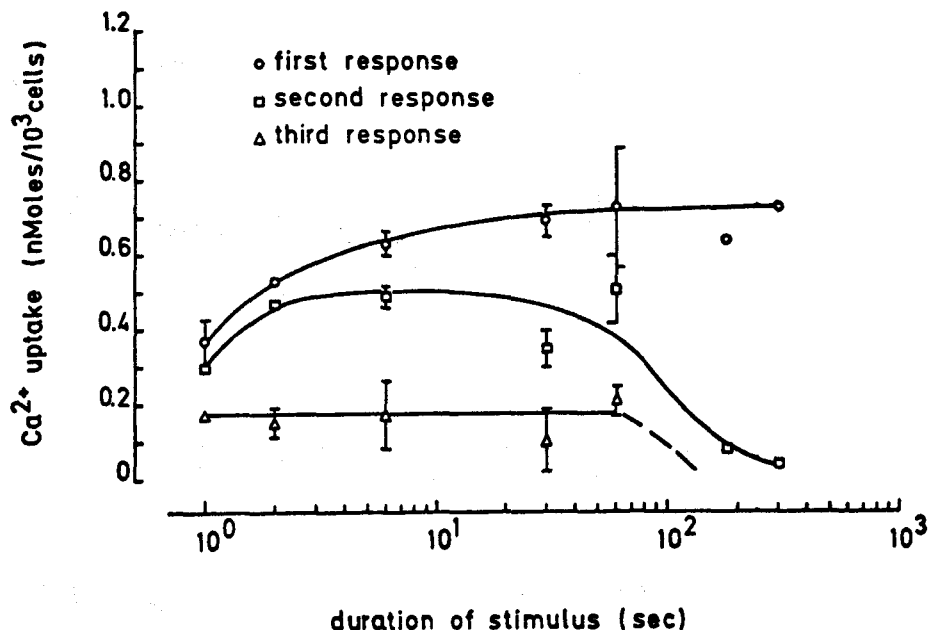


Abb. 13 Ca^{2+} -Aufnahme normiert auf 1 000 Zellen.
Abhängigkeit der einzelnen Reizantworten von der Dauer der Reizperiode. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ S.D. aus drei Versuchen dar. Die Meßpunkte bei 180 und 300 s sind die Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchen (Temperatur = 15 °C, Reizamplitude = 20 V entspr. 20V/cm)

3.1.4 Abhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme vom Abstand der Reizperioden

In dieser Meßreihe wurde das Größenverhältnis von der zweiten zur ersten Reizantwort in Abhängigkeit vom Reizabstand untersucht. Die Reizung erfolgte in Zeitintervallen von 20, 25, 30 und 40 min (s. Abb. 14). Die Reizamplitude betrug 20 V, die Dauer der Reizperiode durchweg 1 min. Zu jedem Zeitintervall wurden je drei Versuche durchgeführt. Alle Versuche wurden bei 15 °C durchgeführt.

Das Größenverhältnis zwischen den beiden Reizantworten (2. Antwort/ 1. Antwort) zeigt fallende Tendenz mit größer werdendem

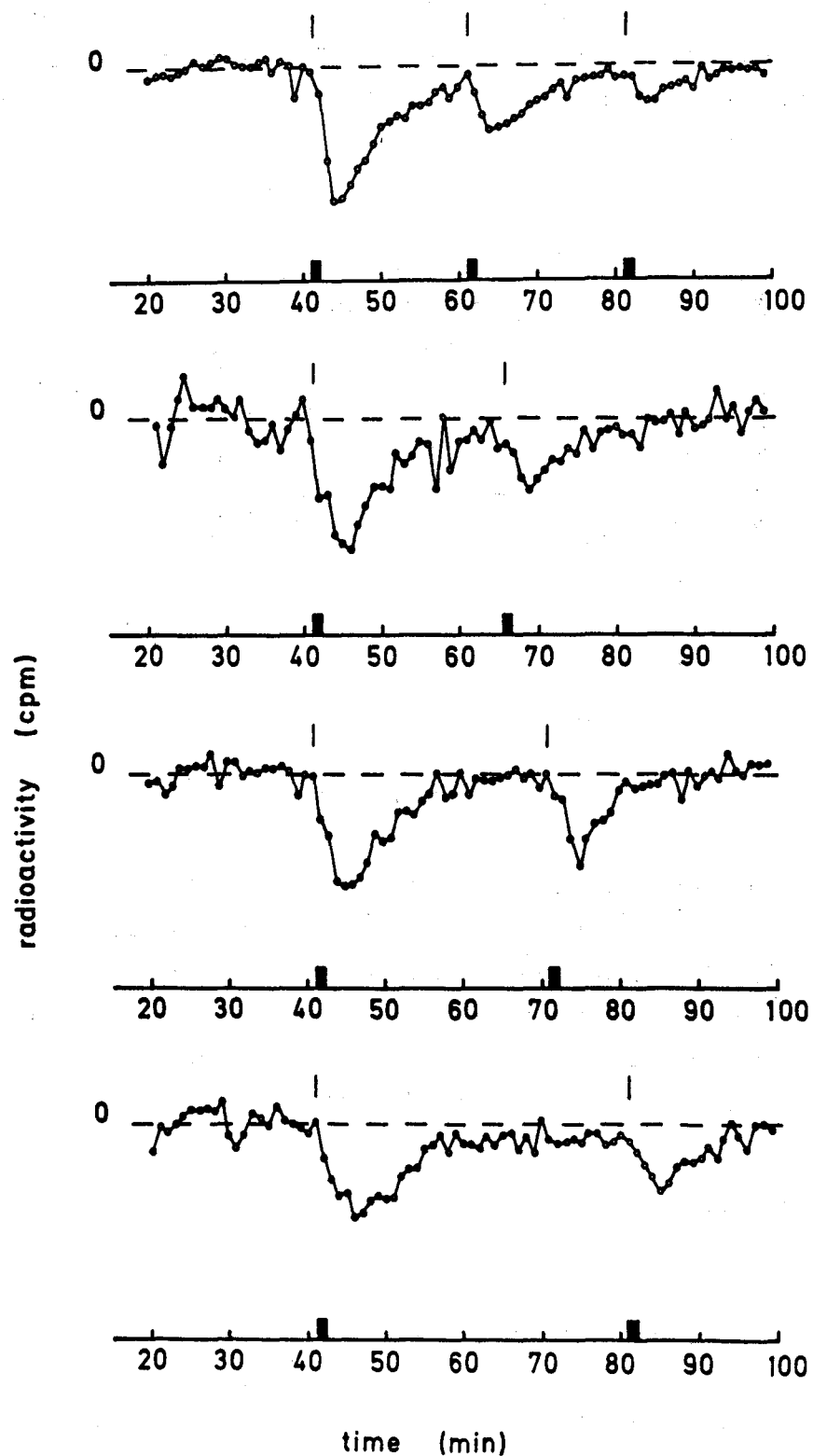


Abb. 14 Ca^{2+} -Aufnahme. Charakteristische Versuche zur Abhängigkeit vom Reizabstand. Normierung der Meßwerte wie in Abb. 6. Spannung = 20 V, Temperatur = 15 °C. Koordinatenbezeichnung wie in Abb. 4 .

Abstand der Reizperioden (s. Abb. 15). Im Falle eines unendlich großen Zeitabstandes zwischen den Antworten wird dieses Verhältnis vermutlich gegen Null gehen. D.h. die zweite Antwort wird Null.

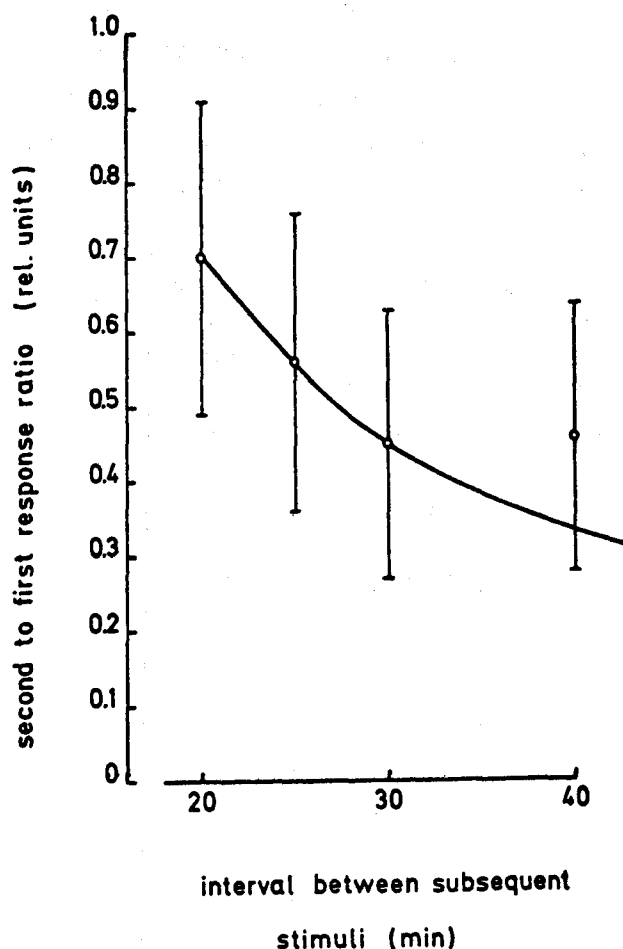


Abb. 15 Verhältnis von zweiter und erster Reizantwort in Abhängigkeit vom Abstand zwischen den Reizperioden. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ S.D. aus 3 Versuchen dar.

3.1.5 Halbwertzeit der Relaxation in Abhängigkeit von Temperatur und Reizspannung

Die Halbwertzeit der Relaxation ist eine charakteristische Zeit für die Dauer des Übergangs eines Nichtgleichgewichtszustandes in einen Gleichgewichtszustand. Im konkreten Fall kann sie als Maß für die Erholung des quasistationären Zustandes im Flußsystem nach erfolgter Reizung betrachtet werden.

Tabelle 1 enthält neben den Halbwertzeiten für das Abklingen der drei Reizantworten auch die Halbwertzeit der schnellen Kinetik (Mischungskinetik) im Flußsystem bei verschiedenen

Temperaturen ($t_{1/2}^*$) (s. Abschnitt 2.2.4). Sie zeigt keine signifikante Temperaturabhängigkeit. Ihr best gesicherter Wert, der aus zwölf Versuchen berechnet wurde, beträgt $(3,3 \pm 0,8)$ min.

Temperatur- und Spannungsabhängigkeit der Relaxationshalbwertzeit sind in Abb. 16 veranschaulicht. Sowohl die steigende Temperatur, als auch die Erhöhung der Reizspannung führen zur Verkürzung von $t_{1/2}$. Außerdem wird $t_{1/2}$ von Reizantwort zu Reizantwort bei einer festen Temperatur oder Spannung kürzer (Tab. 1).

temperature (°C)	half-time of exchange $t_{1/2}^*$ (min)	first resp. $t_{1/2}$ (min)	second resp. $t_{1/2}$ (min)	third resp. $t_{1/2}$ (min)
5	3.5 ± 0.4	5.7 ± 1.3	-	-
10	3.1 ± 0.2	4.9 ± 2.9	3.6 ± 2.7	-
15	3.3 ± 0.8	4.3 ± 1.1	3.7 ± 1.2	3.3 ± 1.1
20	2.8 ± 0.5	2.4 ± 0.4	1.9 ± 0.8	1.0
25	4.1 ± 0.7	2.7 ± 0.7	2.6 ± 1.0	-
amplitude (V)				
4	-	-	-	-
12	-	4.0 ± 0.2	3.8 ± 0.4	2.8 ± 0.3
20	-	4.3 ± 1.1	3.7 ± 1.2	3.3 ± 1.1
28	-	3.5 ± 0.3	-	-
36	-	2.2 ± 0.7	-	-

Tab. 1 Abhängigkeit der Reizantwortrelaxation von Temperatur und Spannung.

Spannungsangaben entsprechend Feldstärken in V/cm.

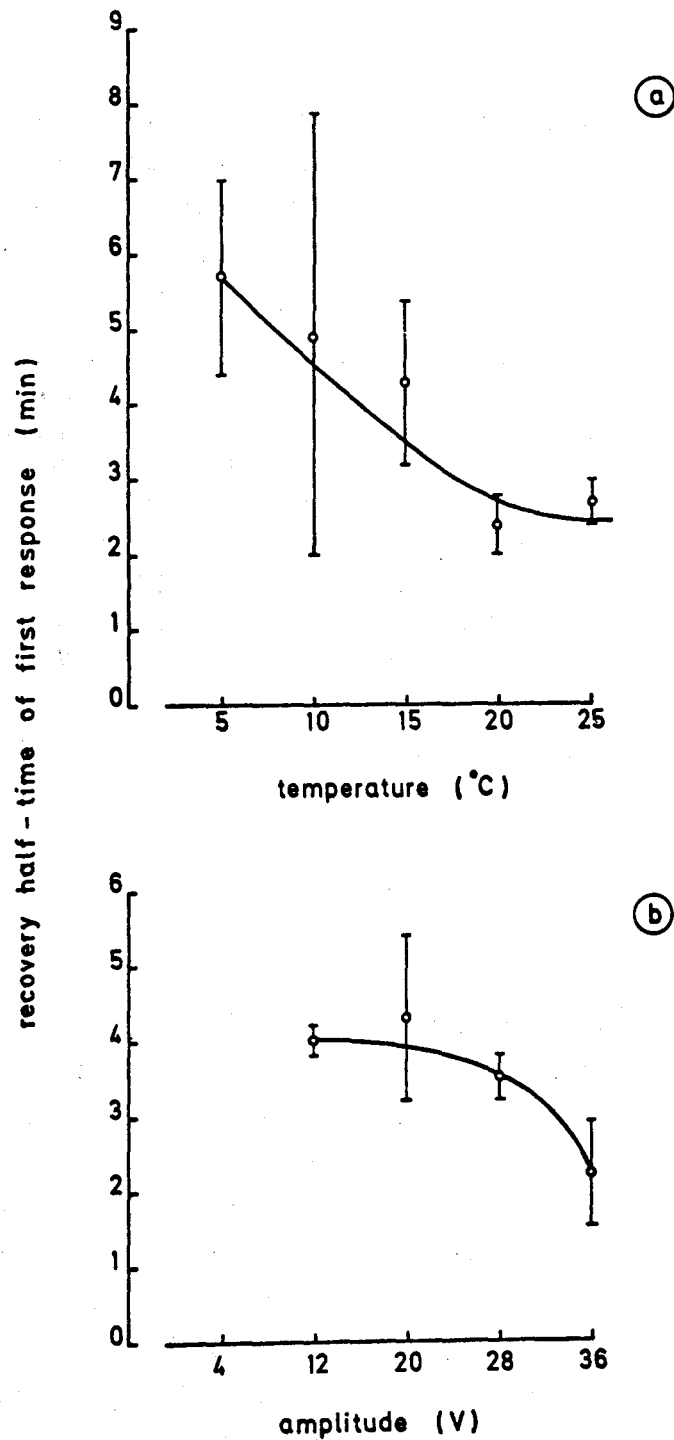


Abb. 16 Halbwertszeit der Relaxation der ersten Reizantwort in Abhängigkeit von: a) Temperatur (Spannung = 20 V) und b) Spannung (Temperatur = 15 °C). Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ S.D. aus 3 Versuchen dar. Reizdauer = 1 min .

3.1.6 Ca^{2+} -Netto-Aufnahme

Im Anschluß an Flußexperimente zur Ca^{2+} -Aufnahme wurde die Ca^{2+} -Netto-Aufnahme, die in den Paramecien nach Durchführung der Flußexperimente verblieben ist, zur Kontrolle in den entsprechenden Versuchen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen befinden sich in der Tabelle 2.

temperature (°C)	Ca residue (pM/10 ³ cells)	amplitude (V)	Ca residue (pM/10 ³ cells)
5	126 ± 62	4	238 ± 101
10	415 ± 168	12	315 ± 144
15	331 ± 77	20	331 ± 77
20	331 ± 105	28	258 ± 45
25	254 ± 67	36	337 ± 77

Tab. 2 Ca^{2+} -Netto-Aufnahme in den Zellen nach Durchführung der Flußexperimente.

3.1.7 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe

Die Versuche zur $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe sollen die Ca^{2+} -Aufnahmeversuche ergänzen. Beide Meßreihen wurden unter den gleichen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Der einzige Unterschied ergibt sich aus dem Ablauf der Versuche und besteht darin, daß während der Messungen der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe radioaktiv markierte Zellsuspension mit nichtradioaktiver Waschlösung durchströmt wurde, d.h. umgekehrt als im Falle von Messungen der Ca^{2+} -Aufnahme (s. Abschnitt 2.1.1). Daraus folgt, daß eine reizabhängige Erhöhung der Radioaktivität in der Durchströmungslösung einer Abgabe von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aus der Zellsuspension entspricht.

3.1.7.1 Abhängigkeit der Ca^{2+} -Abgabe von der Temperatur

Die Temperaturabhängigkeit in Abb. 17 ähnelt prinzipiell den Meßdaten für die Ca^{2+} -Aufnahme (s. Abschnitt 3.1.1). Obwohl an den Mittelwerten ein Einfluß der Temperatur zu erkennen ist, hat der Behrens-Fisher-Test (Campbell, 1971) gezeigt, daß zwischen ihnen kein statistisch signifikanter Unterschied besteht.

Die relativ großen Fehler ergeben sich aus dem generellen Problem bei diesen Versuchen, das darin besteht, daß die Rate der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe häufig nicht oder nur annähernd konstant war.

Die Maxima der drei Reizantworten liegen bei 15 °C. Damit liegt das Maximum ihrer Summe auch bei 15 °C (Abb. 18).

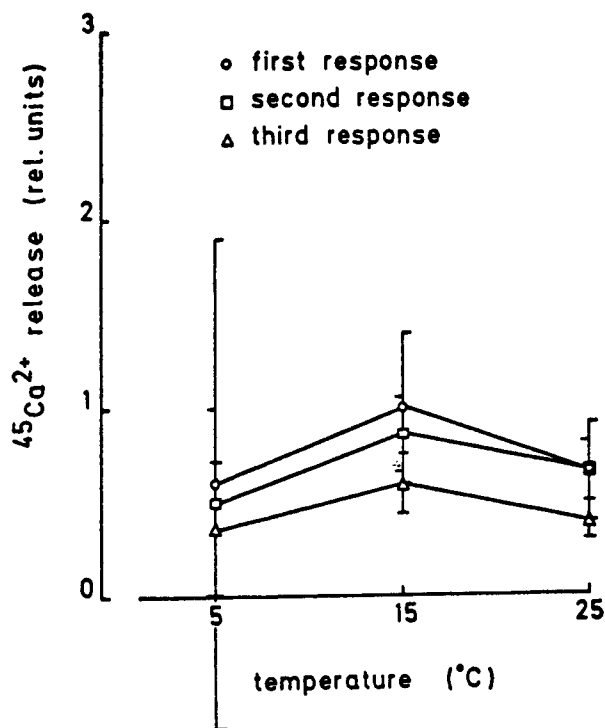


Abb. 17 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe.

Abhängigkeit der einzelnen Reizantworten von der Temperatur. Mittelwert $\pm$ S.D. aus 3 Versuchen. Spannung = 20 V, Reizdauer = 1 mi. Ordinate : relative Einheiten bezogen auf die Summe der Radioaktivitäten einzelner Fraktionen während eines Versuches.

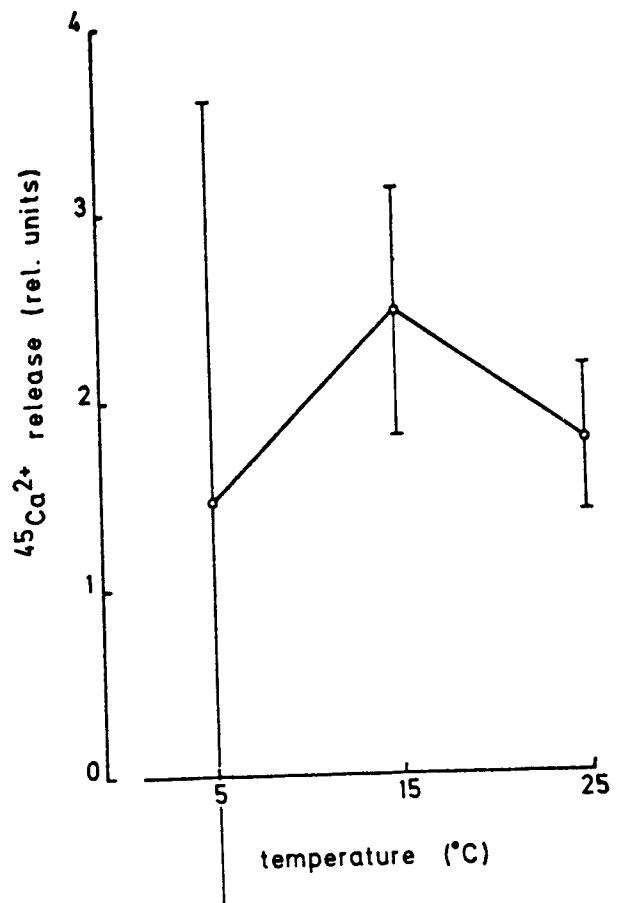


Abb. 18 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe.

Abhängigkeit der Summe der drei Reizantworten von der Versuchstemperatur (aus Abb. 17, gleiche Versuche). Ordinate : siehe Abb. 17.

20 V entspricht 20 V/cm.

3.1.7.2 Abhängigkeit der Ca^{2+} -Abgabe von der Reizspannung

Eine steigende Tendenz der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe mit wachsender Reizspannung ist deutlich erkennbar (Abb. 20), obwohl der Behrens-Fisher-Test nur für wenige Meßpunkte statistische Signifikanz zeigt. Einzelne Reizantworten zeigen zwischen 20 und 36 V von einander abweichende Tendenzen (Abb. 19). Dies ist eine Folge davon, daß bei hoher 1. Antwort für die 2. und 3. weniger $^{45}\text{Ca}^{2+}$ übrig bleibt.

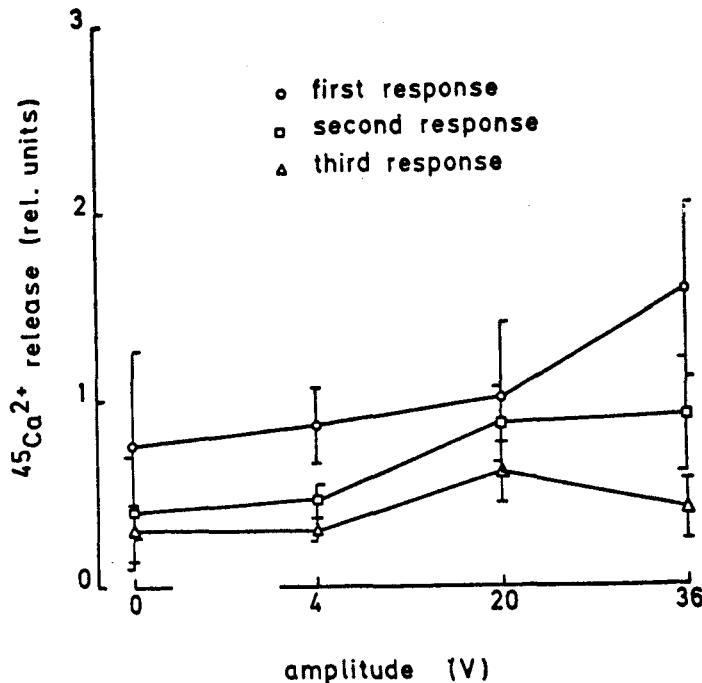
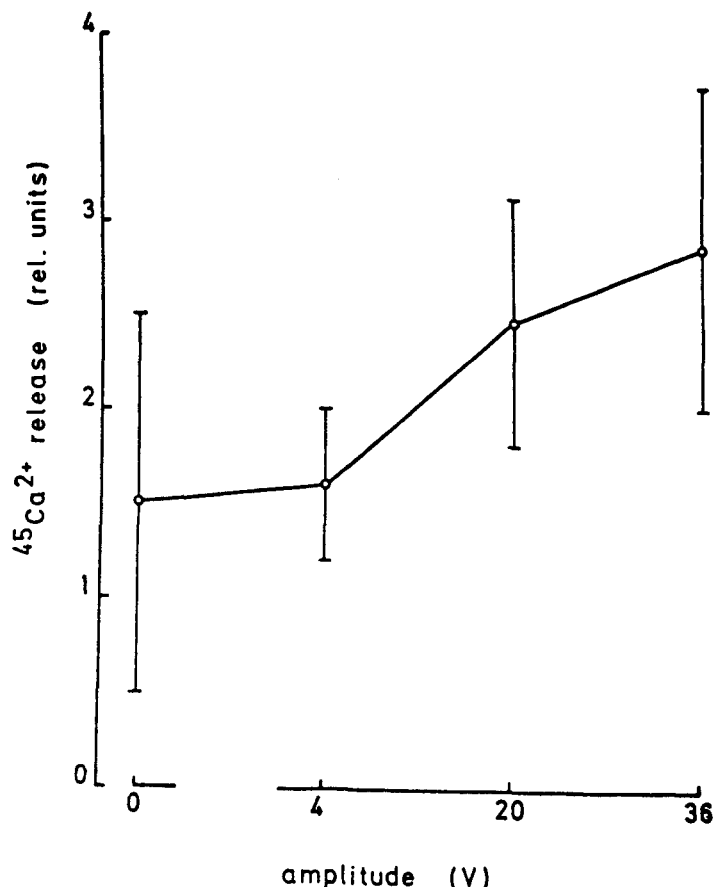


Abb. 19 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe. Abhängigkeit der einzelnen Reizantworten von der Reizspannung. Mittelwert $\pm$ S.D. aus drei Versuchen. Reizdauer = 1 min, Temperatur = 15 °C. Ordinate : s. Abb. 17.

Abb. 20 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe. Abhängigkeit der Summe der drei Reizantworten von der Reizspannung (aus Abb. 19, gleiche Versuche). Ordinate : s. Abb. 17.



3.1.8 Wirkung des erhöhten Verhältnisses $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ auf die Ca^{2+} -Aufnahme

Zugabe von K^+ in die Versuchslösung bewirkt eine Desensitivierung der Zellen, d.h. eine verminderte Empfindlichkeit gegen äußere Reize (z.B. mechanische, elektrische oder chemische). Eine Erhöhung der äußeren K^+ -Konzentration ($[K^+]_o$) bei konstanter äußerer Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_o$) in der Durchströmungslösung entspricht einer Erhöhung des Verhältnisses $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$. Da bei einem veränderten Verhältnis von Kalium zu Calcium in extrazellulärer Lösung ein veränderter Ca^{2+} -Einstrom zu erwarten ist (Hildebrand, 1978), wurde diese Versuchsreihe zur Ergänzung der übrigen Flußmessungen durchgeführt. Zwei Versuche (Abb. 21) sollen die Wirkung von K^+ auf die Ca^{2+} -Aufnahme veranschaulichen.

Die Versuche dieser Serie wurden folgendermaßen durchgeführt : Vor jedem Versuch wurden die Zellen in der entsprechenden nicht-radioaktiven Lösung inkubiert. Da bei höheren ionalen Konzentrationen die Chlorentwicklung an den Platinelektroden infolge Elektrolyse auftritt, wurde die $CaCl_2$ -Konzentration um eine Größenordnung herabgesetzt. Somit haben die gebrauchten Lösungen folgende Zusammensetzung gehabt : 0,01 mM $CaCl_2$, 1 mM Tris/HCl, 1 mM bzw. 2 mM KCl, pH=7,2. Während der durchgeführten Versuche wurden Spannung und Reizdauer (Abb. 21a) bzw. nur Reizdauer (Abb. 21b) variiert. Die Temperatur betrug 15 °C.

Bei einem Verhältnis $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2} = 10$ (Abb. 21a) ist eine $^{45}Ca^{2+}$ -Aufnahme ab 6 V Reizspannung deutlich zu erkennen.

Erhöhung der Reizstärke erhöht die Antworten nicht signifikant. Nach der Reizung in der 141. Minute geht die $^{45}Ca^{2+}$ -Aufnahme in leichte Abgabe über. Dieser Effekt wird verstärkt nach Verlängerung der Reizdauer (5 min), so daß die $^{45}Ca^{2+}$ -Abgabe deutlich überwiegt.

Die Erhöhung des Verhältnisses $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ von 10 auf 20 (Abb. 21b) bewirkt, daß alle Reizantworten durch $^{45}Ca^{2+}$ -Abgabe charakterisiert sind. In den ersten 100 Minuten werden die Reizantworten von Reiz zu Reiz größer. Die 15 min lange Reizung in

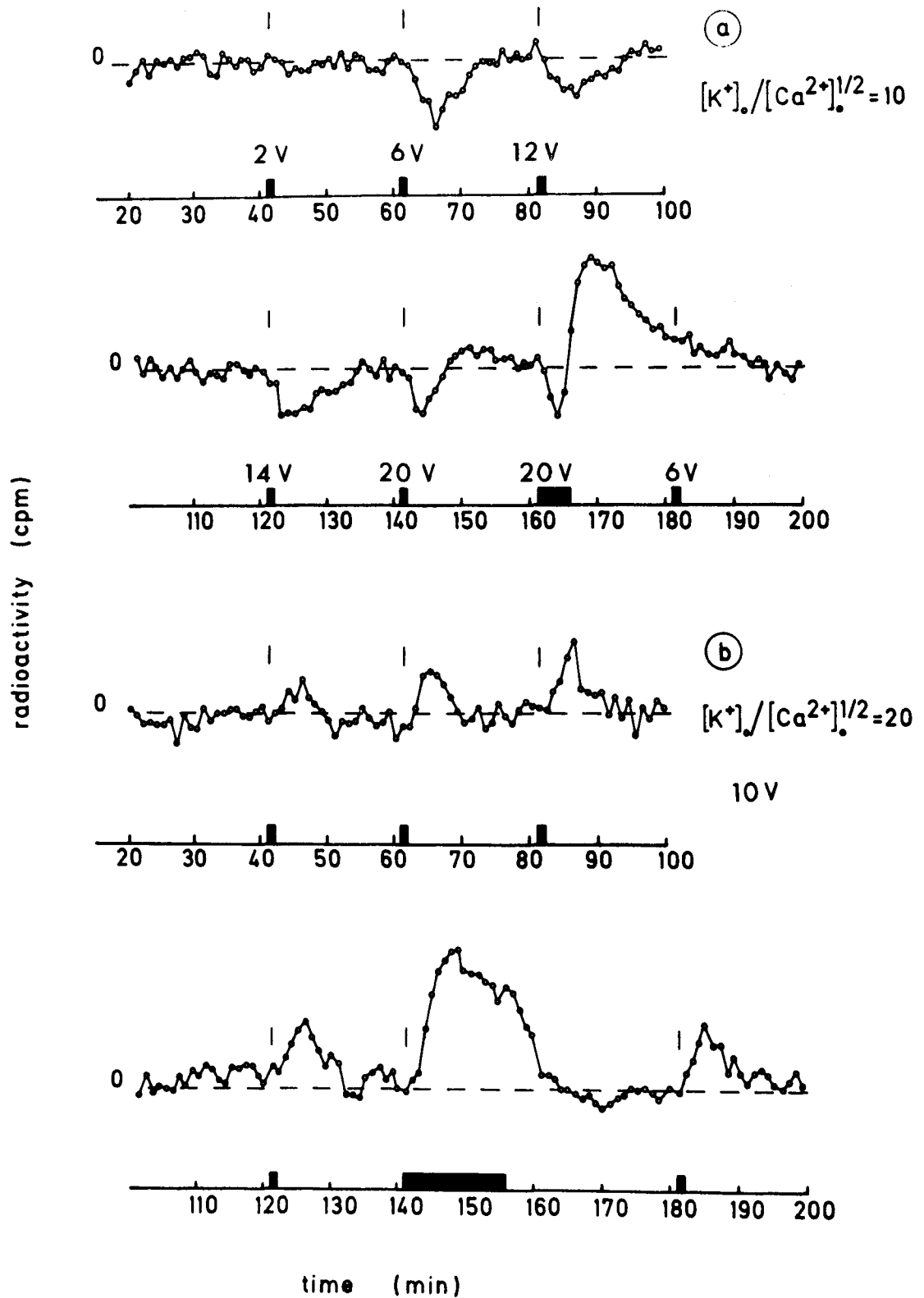


Abb. 21 Abhängigkeit des $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transportes vom Verhältnis $[K^+]_o/[Ca^{2+}]_o^{1/2}$. 10 V entspr. 10 V/cm. Zusammensetzung der Lösungen : 0,01 mM CaCl_2 , 1 mM Tris/HCl, pH=7,2, a) 1 mM KCl, b) 2 mM KCl, Temperatur = 15 °C. Koordinatenbezeichnung wie in Abb. 4.

der 141. Minute hat relativ eine große $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe zur Folge. Auf einen 1 Minute langen Kontrollreiz in der 181. Minute folgt eine gleich große Antwort wie nach der Reizung in der 121. Minute vor dem langen Reiz.

Eine statistisch abgesicherte quantitative Analyse konnte bei diesen Versuchen nicht durchgeführt werden, denn die notwendige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war nicht gewährleistet. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der relativ niedrigen Ca^{2+} -Konzentration (10^{-5} M/l) der Waschlösung. Aus der Literatur ist bekannt, daß bei den Ca^{2+} -Konzentrationen im extrazellulären Medium ($[\text{Ca}^{2+}]_o < 10^{-5}$ M/l) (Eckert and Brehm, 1979) die elektrophysiologischen Versuche schwer durchführbar sind, da neben dem Ruhepotential und der Ca^{2+} -Leitfähigkeit (g_{Ca}) auch die Stabilität der Plasmamembran z.B. von extrazellulärem Calcium abhängt.

3.2 Registrierung des Bewegungsverhaltens im Dunkelfeld

3.2.1 Charakteristische Schwimmspuren

Die wichtigsten Formen des lokomotorischen Verhaltens von *Paramecium caudatum* sind in Abb. 22 dargestellt. Sie entsprechen denjenigen Schwimmformen, die im Laufe der phobischen Reaktion ("avoiding reaction") oder nach der mit monovalenten Kationen hervorgerufenen Cilienschlagumkehr auftreten (Parducz, 1959). Man unterscheidet : normales Schwimmen (schnelle spiralförmige Vorwärtsbewegungen), langsames spiralförmiges Vorwärtsschwimmen, Rotation (Trudeln in einer Ebene um das Hinterende des Körpers oder um die Querachse), Drehung (kreisförmiges Schaukeln des Körpervorderendes), "ciliary reversal" (verschieden schnelles spiralförmiges Rückwärtsschwimmen infolge der Cilienschlagumkehr), sich periodisch wiederholendes "reversal" (verschieden lang anhaltende Cilienschlagumkehr). Jeder dieser Schwimmformen entspricht eine bestimmte intraciliäre Konzentration an freiem Calcium $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Hildebrand, 1978). Mit anderen Worten : die Ursache der verschiedenartigen Phänomene im lokomotorischen Verhalten von *Paramecium* sind verschieden hohe Niveaus von $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

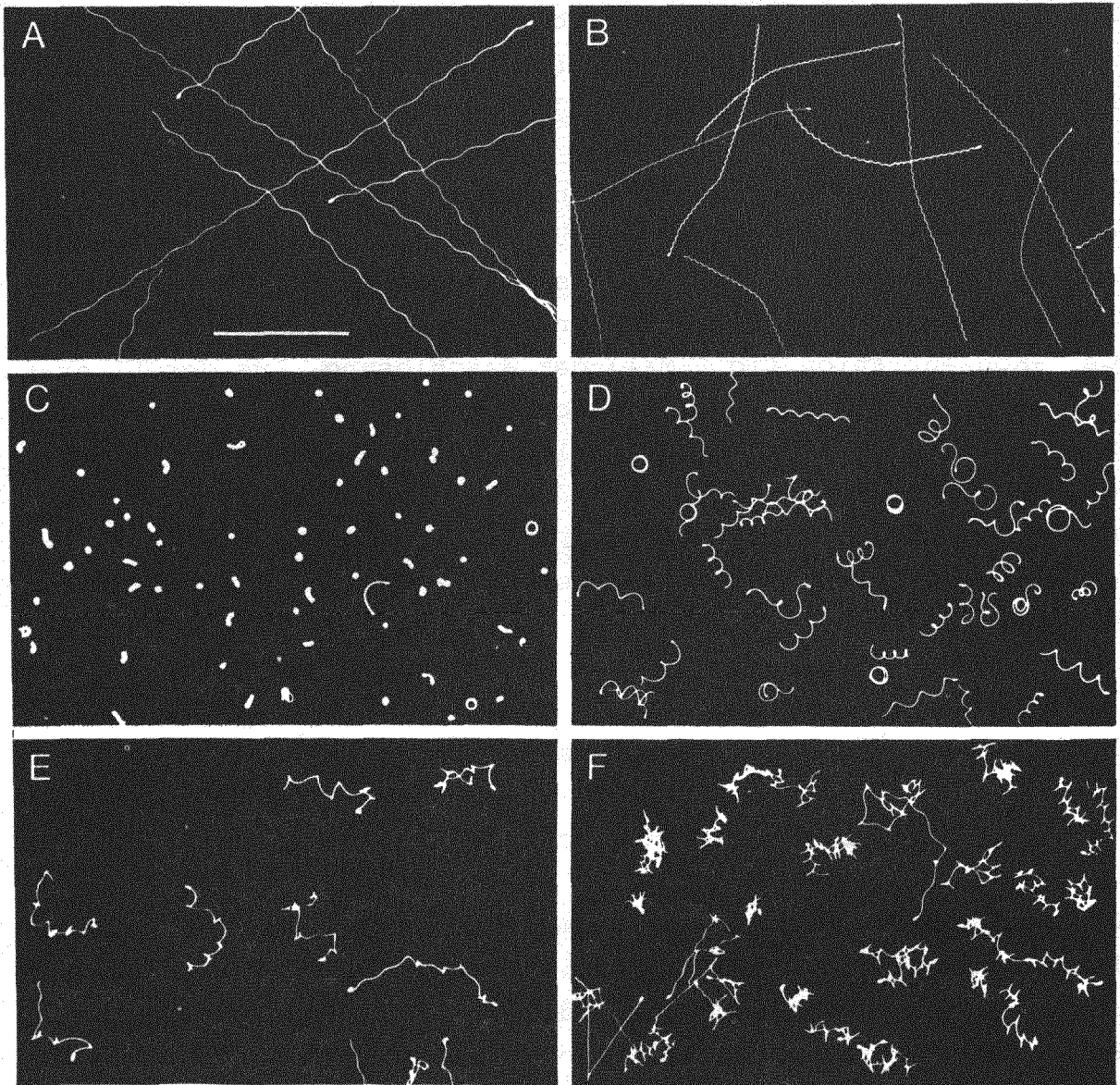


Abb. 22 Charakteristische Schwimmpuren von *Paramecium caudatum*, die intraciliäre Konzentration des freien Calciums $[Ca^{2+}]_i$ widerspiegeln (nach Hildebrand und Dryl, unveröff. Erg.).

A. Normales Vorwärtsschwimmen

$$[Ca^{2+}]_i \approx 10^{-7,3} \text{ M}$$

B. Rückwärtsschwimmen ("continuous ciliary reversal")

$$[Ca^{2+}]_i \approx 10^{-6} \text{ M}$$

C. Rotation

$$[Ca^{2+}]_i \approx 10^{-6,8} \text{ M}$$

D. Langsame spiralförmige Bewegung

$$10^{-7,3} < [Ca^{2+}]_i < 10^{-6,8} \text{ M}$$

E. Wiederholung schwacher Cilien-schlagumkehr

F. Wiederholung starker Cilien-schlagumkehr

} periodische Änderung von $[Ca^{2+}]_i$

3.2.2 Bewegungsverhalten während elektrischer Reizung und Einfluß der Temperatur

Das lokomotorische Verhalten von *P. caudatum* bei drei verschiedenen Temperaturen (5, 15 und 25 °C) während einer Minute langer elektrischer Reizung ist in Abb. 23 dargestellt. Das Reizprogramm war dabei dasselbe, wie bei den Flußmessungen (Pulsbreite = 10 ms, Frequenz = 10 Hz). Die Reizstärke betrug 20 V.

Am Anfang jeder Aufnahmereihe befindet sich je eine Kontrollaufnahme des lokomotorischen Verhaltens bei entsprechender Temperatur (Abb. 23a). Die danach folgenden Aufnahmen zeigen verschiedene Verhaltensphasen während der elektrischen Reizung. Sie wurden in bestimmten Zeitabständen hintereinander aufgenommen; während des Einschaltvorganges (b), 20 und 40 s nach dem Beginn der Reizung (c und d) und während des Ausschaltvorganges (e). Die Richtung des elektrischen Feldes ist durch den Doppelpfeil angegeben.

Die jeweilige Länge der Schwimmspuren gibt ein Maß für die Schwimgeschwindigkeit bei den drei Temperaturen. Diese Geschwindigkeitsunterschiede bleiben auch während der Reizung bestehen. Bei 5 und 15 °C schwimmen die Zellen sofort nach Reizbeginn rückwärts (auch erkennbar an der feinwelligen Bewegung) und senkrecht zu den Feldlinien. Während der Reizung wird die Geschwindigkeit geringer. Nach dem Ausschalten des Reizes schwimmen die Zellen wieder vorwärts in alle Richtungen. Bei 25 °C tritt keine Richtungsänderung auf; die Zellen schwimmen nach Einschalten des elektrischen Feldes verlangsamt und in stärker spiralisierten Bahn vorwärts. Diesmal schwimmen sie entweder spiralförmig senkrecht zum Feld oder vorwärts parallel zu den Feldlinien. Nachdem der Reiz ausgeschaltet wird, schwimmen die Zellen für kurze Zeit schneller vorwärts in alle Richtungen. Danach normalisiert sich ihr Verhalten, so daß wieder der normale Zustand wie auf der Kontrollaufnahme zurückkehrt.

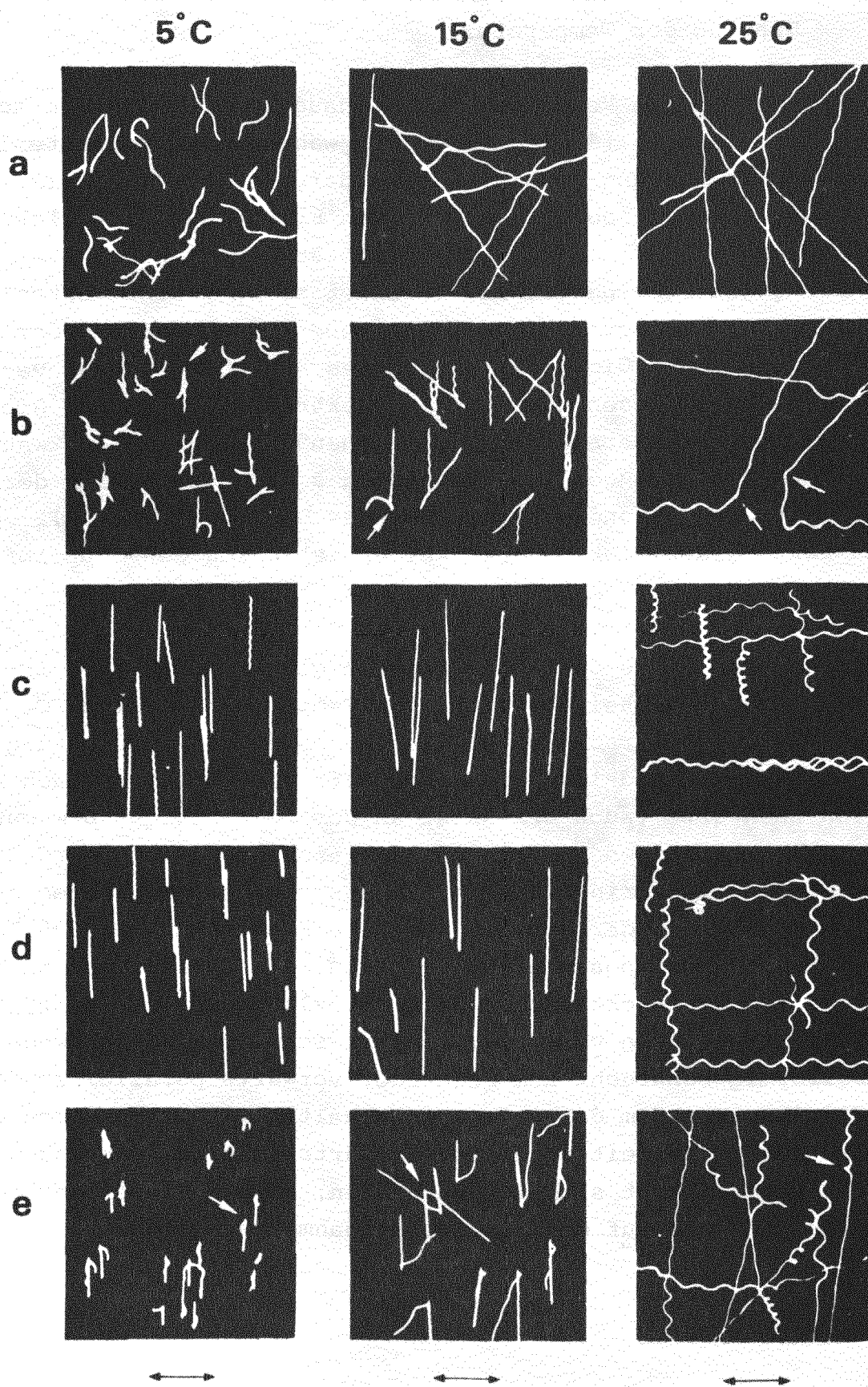


Abb. 23

Abb. 23 Lokomotorisches Verhalten von *Paramecium caudatum* bei verschiedenen Temperaturen, vor, während und nach elektrischer Reizung.

Reizprogramm : Pulsbreite = 10 ms, Frequenz = 10 Hz.

Doppelpfeil zeigt die Richtung des elektrischen Feldes an. Reizspannung = 20 V entspricht 10 V/cm, Reizdauer = 1 min, Belichtungszeit = 6 s .

- a) Vorwärtsschwimmen (Kontrollaufnahme ohne elektrische Reizung)
 - b) Während des Einschaltvorganges (Pfeil) 3 s nach dem Belichtungsbeginn
 - c) 20 s nach dem Beginn der Reizung
 - d) 40 s nach dem Beginn der Reizung
 - e) Während des Ausschaltvorganges (Pfeil) 3 s nach dem Belichtungsbeginn.
-

3.2.3 Einfluß der Reizspannung auf das Bewegungsverhalten

Die Abhängigkeit des lokomotorischen Verhaltens von *P. caudatum* von der Reizspannung ist in Abb. 24 dargestellt. Die Temperatur betrug 15 °C. Für die Aufnahmefolgen gilt dasselbe, wie im Abschnitt 3.2.2. beschrieben wurde.

Neben dem sich wiederholenden "reversal" treten bei der Reizung mit 4 V langsame spiralförmige Bewegung bevorzugt senkrecht zu den Feldlinien und Rotation auf. Reizstärken von 20 und 36 V haben dagegen ein qualitativ gleiches Erscheinungsbild des lokomotorischen Verhaltens zur Folge. Die Zellen schwimmen ausschließlich rückwärts und senkrecht zum elektrischen Feld. Der Unterschied besteht in der Schwimgeschwindigkeit. Während der Reizung mit 36 V werden die Spuren in derselben Zeitspanne wesentlich langsamer, als das bei 20 V der Fall ist.

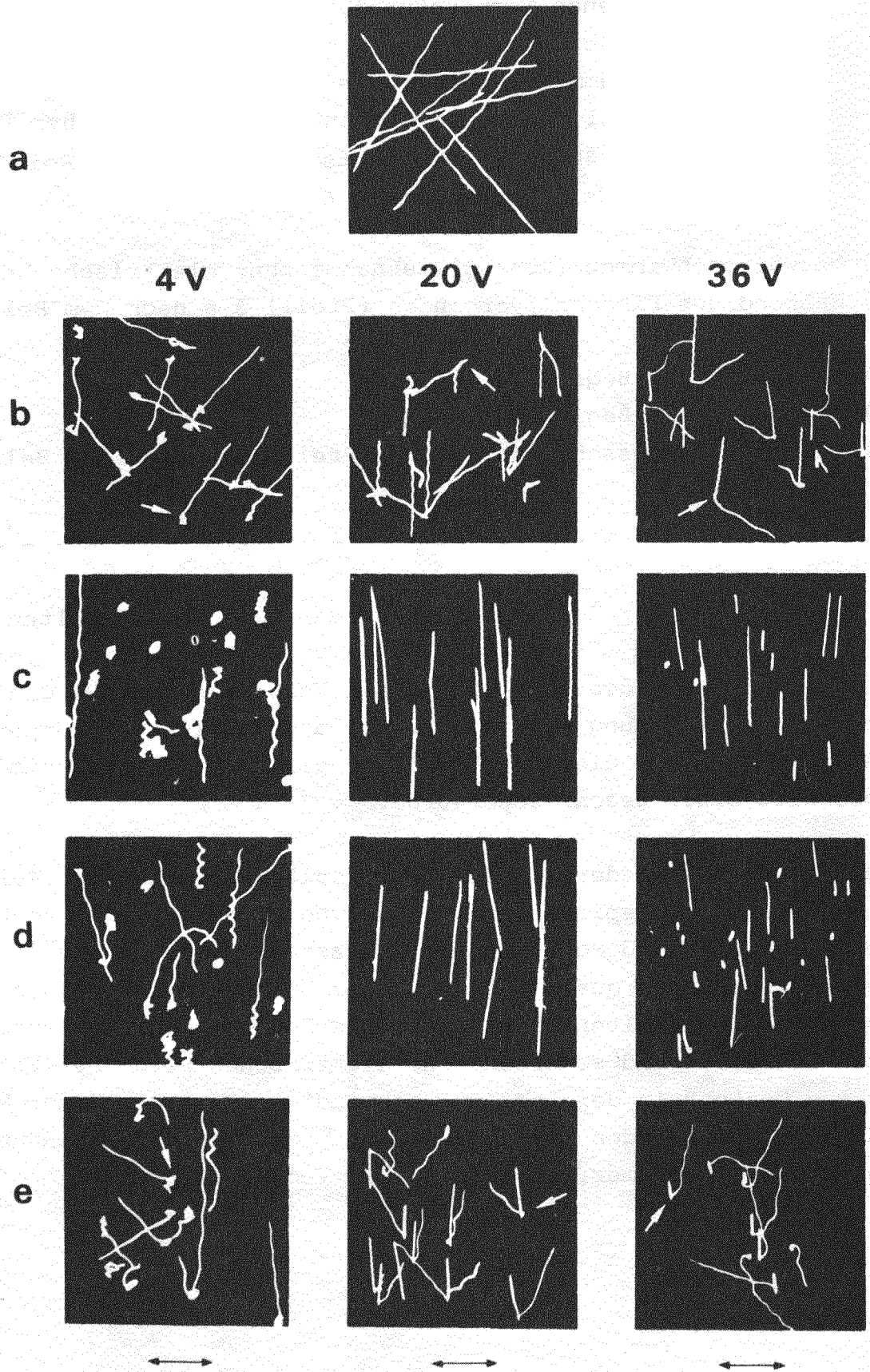


Abb. 24

Abb. 24 Lokomotorisches Verhalten von *Paramecium caudatum* bei verschiedenen Reizspannungen (20V entspr. 10 V/cm). Temperatur = 15 °C.
Sonstige Erklärungen zu den Bildern wie in Abb. 23.

3.2.4 Wirkung des erhöhten Verhältnisses $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ auf das lokomotorische Verhalten

Die Wirkung verschiedener Verhältnisse $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ auf das lokomotorische Verhalten von *P. caudatum* ist in Abb. 25 und 26 dargestellt. Die Versuche wurden bei 15 °C und Verhältnissen $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2} = 1,4; 5,0; 10$ und 20 durchgeführt. Die Pulsamplitude war durchweg 20 V, außer bei dem Versuch aus der Abb. 26 (3. Spalte), wo sie 36 V betrug. Die sonstigen Erklärungen zu den einzelnen Aufnahmen gleichen denen in Abschnitt 3.2.2.

Bei kleineren K^+ -Konzentrationen ($[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2} = 1,4$ und 5,0) unterscheiden sich die Schwimmspuren nicht wesentlich von denen, die unter den gleichen Bedingungen bei Kalium in Spuren von $< 10^{-5} M/l$ aufgenommen wurden (vgl. Abb. 23 und 24).

Die Zellen schwimmen während elektrischer Reizung rückwärts und senkrecht zum elektrischen Feld. Die Verlangsamung der Geschwindigkeit während anhaltender Reizung ist ausgeprägter bei höherer K^+ -Konzentration (Abb.25). Das Erscheinungsbild ändert sich mit Erhöhung der K^+ -Konzentration ($[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2} = 10$ und 20). Die Zellen schwimmen überwiegend spiralförmig senkrecht zum elektrischen Feld und vereinzelt vorwärts hauptsächlich parallel zu den Feldlinien. Die Erhöhung der Reizstärke von 20 auf 36 V (Abb. 26, 2. und 3. Spalte) bewirkt eine Verlängerung der Schwimmspuren, also eine Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit. Die Form der Schwimmspuren bleibt dabei relativ unbeeinflusst.

Abb. 25 Lokomotorisches Verhalten von *Paramecium caudatum* bei verschiedenen Verhältnissen von $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ in dem umgebenden Medium. Temperatur = 15 °C, Reizspannung = 20 V $\hat{=}$ 10 V/cm. Sonstige Erklärungen zu den Bildern wie in Abb. 23.
Zahlen über den Spalten geben das Verhältnis $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ an.

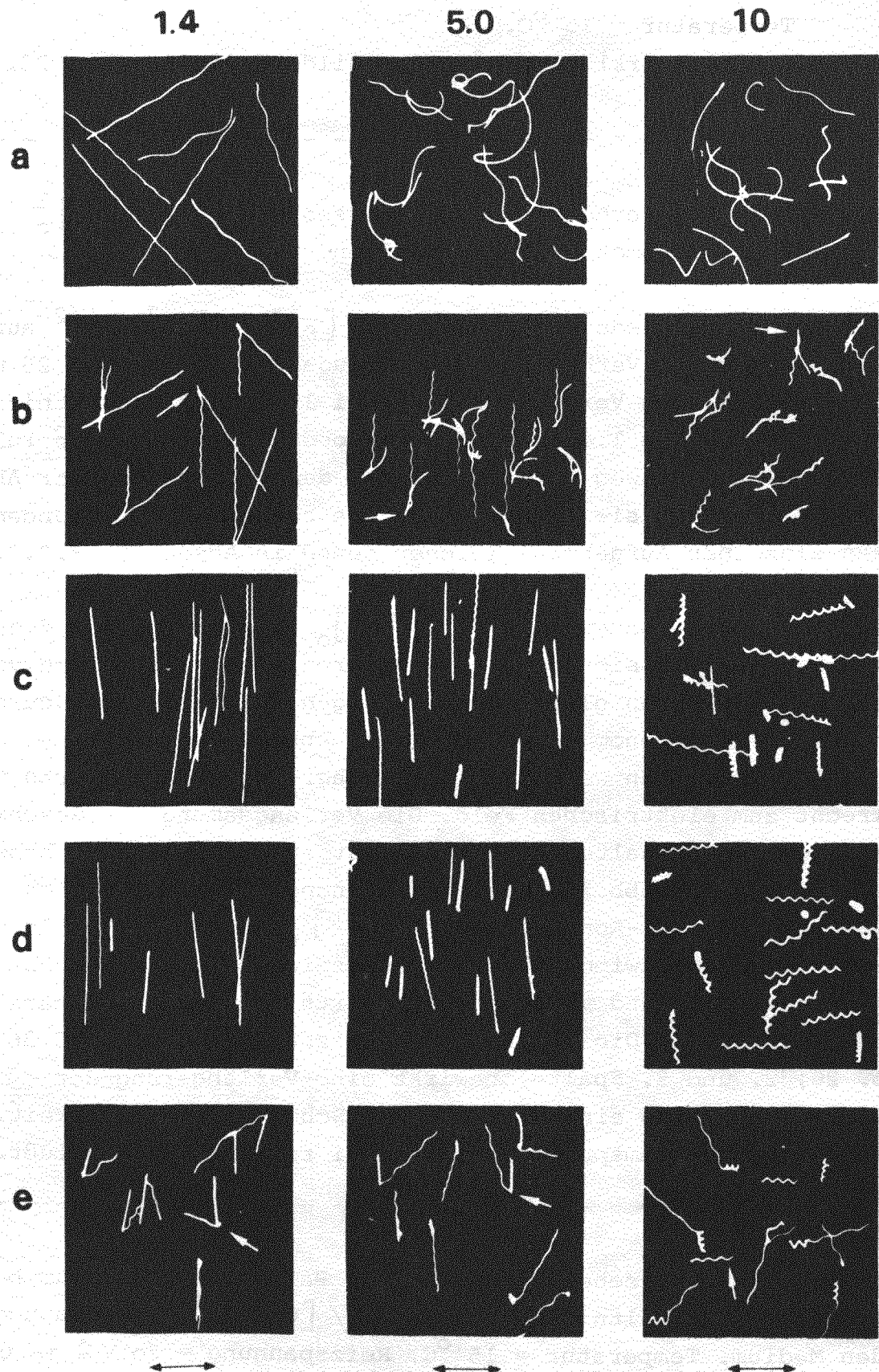


Abb. 25

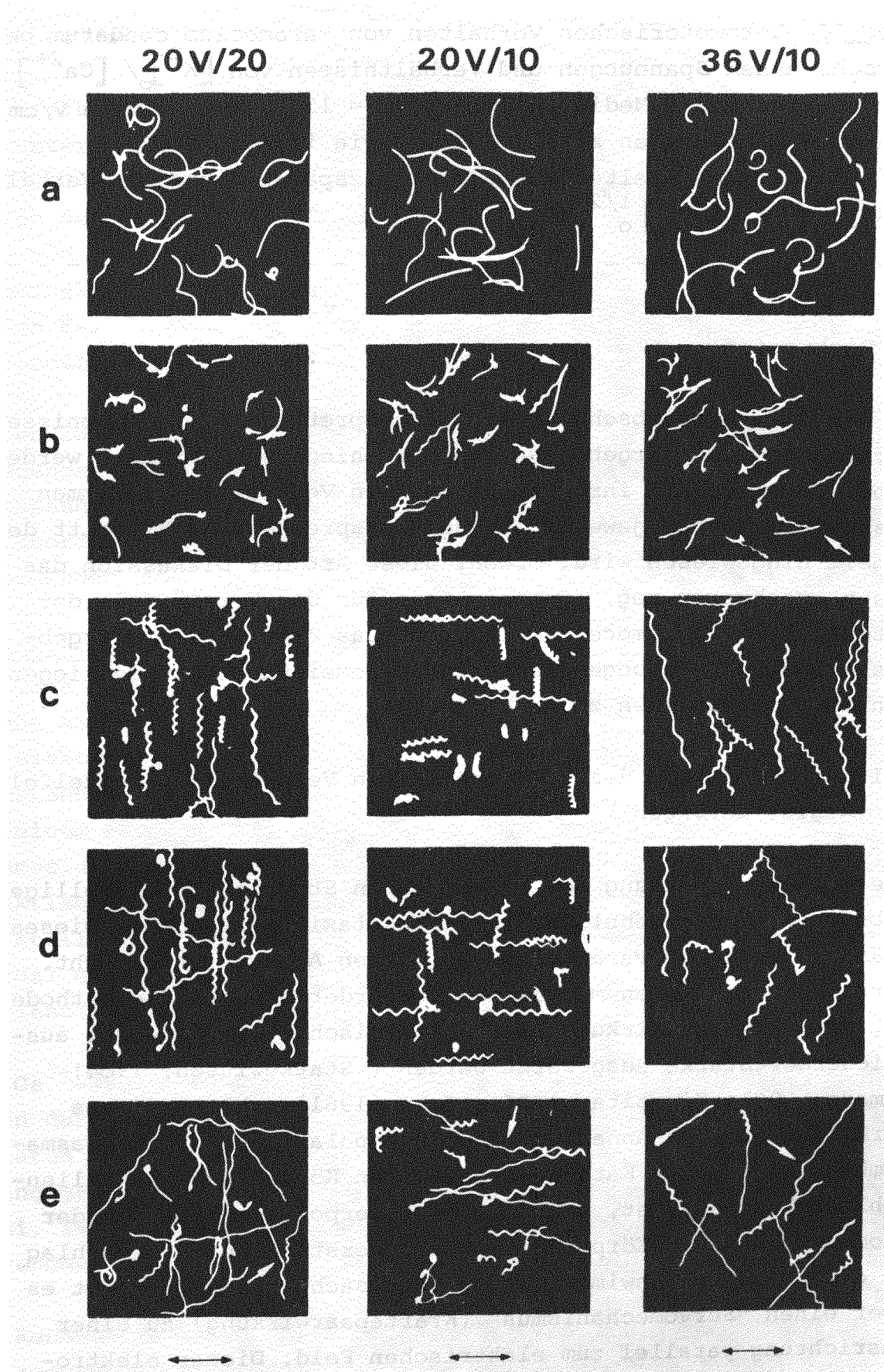


Abb. 26

Abb. 26 Lokomotorisches Verhalten von *Paramecium caudatum* bei verschiedenen Spannungen und Verhältnissen von $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ in dem umgebenden Medium. Temperatur = 15 °C (20 V $\hat{=}$ 10 V/cm). Sonstige Erklärungen zu den Bildern wie in Abb. 23. Zahlen über den Spalten geben die Reizspannung und das Verhältnis $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ an.

4. Diskussion

In dem folgenden Abschnitt wird Interpretation der Ergebnisse vorgenommen. Die Ergebnisse der verschiedenen Meßreihen werden dabei entsprechend ihrer funktionellen Verknüpfung zusammen diskutiert, wobei jeweils auf den entsprechenden Abschnitt der Arbeit hingewiesen wird. Obwohl diese Art der Diskussion das Lesen erschweren mag, erscheint sie für das Verständnis der untersuchten Phänomene unerlässlich. Das Ziel ist, die Ergebnisse und Beobachtungen durch ihnen gemeinsam zugrunde liegende Funktionsmechanismen zu erklären.

4.1 Interpretation des lokomotorischen Verhaltens (Dunkelfeld-Registrierungen)

Die richtende Wirkung des elektrischen Stromes auf einzellige Lebewesen wird gewöhnlich als Galvanotaxis bezeichnet. Dieses Phänomen wurde an *Paramecium* von vielen Autoren untersucht. *Paramecien* schwimmen mit dem Körpervorderende auf die Kathode zu, wenn sie der Wirkung eines elektrischen Gleichfeldes ausreichender Stärke ausgesetzt werden (Statkewitsch, 1904; Kamada, 1931; Kinosita, 1936). Jahn (1961) erklärt dieses Verhalten mit der Annahme, daß die Depolarisation der Plasmamembran an dem der Kathode zugewandten Körperende die Cilien-schlagumkehr auslöst, während die Hyperpolarisation des der Anode zugewandten Körperendes einen verstärkten Cilienschlag in der normalen Schwimmrichtung verursacht. Dadurch kommt es über einen "Servomechanismus" (Kräftepaarwirkung) zu einer Ausrichtung parallel zum elektrischen Feld. Dieser elektro-tonischen Theorie der Galvanotaxis der Wirkung des elektrischen Gleichstromes auf Protozoen liegen die gleichen Prinzipien

zugrunde wie der elektrischen Erregbarkeit von Nerven und Muskeln.

Das elektrotaktische Verhalten von Paramecium im Wechselfeld ist unter dem Begriff der Oszillotaxis beschrieben (Hausmann, 1927). Die Quer- bzw. Parallelstellung von Paramecium zu den Linien des elektrischen Wechselfeldes wurde schon vor langer Zeit von verschiedenen Autoren beobachtet (Statkewitsch, 1904; Scheminzky, 1924; Hausmann, 1927). Das Phänomen der Querstellung zu den Feldlinien wurde von Statkewitsch (1904) "transversaler Galvanotropismus" genannt.

In den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Experimenten ist das Bewegungsverhalten von Paramecium in Abhängigkeit von Temperatur, Reizspannung und erhöhtem Verhältnis $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ dargestellt. Die Zuordnung bestimmter intraciliärer Konzentrationen zum entsprechenden Bewegungsverhalten ist in Abb. 22 wiedergegeben.

Abhängigkeit von der Temperatur :

Die Organismen schwimmen unter den beschriebenen Bedingungen (siehe Abschnitt 3.2.2) rückwärts und senkrecht zur Richtung des elektrischen Feldes bei Temperaturen $\leq 15^\circ C$. Die angewandte Reizspannung von 20 V entspricht in der verwendeten Versuchskammer einem effektiven Spannungsabfall über der Plasmamembran von Paramecium von ca. 30 mV. Da die Paramecien infolge ihres "galvanotaktischen" Verhaltens auf die Kathode zuschwimmen, stellt ihre Querstellung im alternierenden Feld bei höherer Wechselfrequenz (10 Hz) ein resultierendes Verhalten als Folge einer ständigen Umorientierung dar.

Die Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung in den Cilien wird hervorgerufen durch einen Ca^{2+} -Einwärtsstrom vom Außenmedium in den ciliären Raum. Dieser Einwärtsstrom fließt durch die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle in der ciliären Membran (Ogura and Takahashi, 1976; Dunlap, 1977), die infolge der Wirkung des alternierenden elektrischen Feldes aktiviert werden.

Die Renormalisierung des Cilienschlages, auf die anhand der Verlangsamung der Schwimmgeschwindigkeit (gekennzeichnet durch Verkürzung der Schwimmspuren) geschlossen werden kann, läßt sich auf den Dunkelfeld-Aufnahmen gut verfolgen (Abb. 23; 1. und 2.

Spalte). Sie wird einerseits auf die Membraninaktivierung zurückgeführt, die damit für die Adaptation der Organismen auf die durch elektrische Reizung veränderte Umweltbedingungen sorgt. Andererseits muß aus der zeitabhängigen Renormalisierung des Cilienschlages auf eine Abnahme der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration geschlossen werden, wofür in erster Linie aktiver Ca^{2+} -Auswärtstransport verantwortlich gemacht wird (Hildebrand, 1978).

Da man annehmen kann, daß der aktive Ca^{2+} -Auswärtstransport bei Temperaturen $\leq 15^\circ\text{C}$ reduziert wird, schwimmen die Organismen bei diesen Temperaturen während der elektrischen Reizung ausschließlich rückwärts (siehe Abb. 23). D.h. der aktive Ca^{2+} -Auswärtstransport reicht nicht alleine aus, um die intraciliäre Ca^{2+} -Konzentration auf ihren Ruhewert zu senken, und damit die Renormalisierung des Cilienschlages zu bewirken. Bei Temperaturen $\leq 15^\circ\text{C}$ sorgt deshalb wahrscheinlich vorwiegend die Membraninaktivierung für die Renormalisierung des Cilienschlages über die Drosselung des erregungsbedingten Ca^{2+} -Einstroms. Diese Aussage wird unterstützt durch die Tatsache, daß die Zellen bei 5°C viel schneller "adaptieren", als bei 15°C (erkennbar an der Länge der Schwimmspuren; Abb. 23). Da wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen geringerer Ca^{2+} -Akkumulierung in den Cilien und geringerer Inaktivierung besteht, sind die Schwimmspuren bei 15°C , im Vergleich zu denen bei 5°C , infolge eines erhöhten Ca^{2+} -Auswärtstransportes länger, d.h. die Zellen "adaptieren" langsamer bei höheren Temperaturen.

Bei Temperaturen $> 15^\circ\text{C}$ schwimmen die Zellen entweder stark spiralisierend senkrecht und schwach spiralisierend parallel zum elektrischen Feld oder vorwärts parallel zu den Feldlinien (s.Abb. 23 ; 3. Spalte). Die Wirkung der Temperatur auf das lokomotorische Verhalten der Organismen kann auf Grund des erhöhten Ca^{2+} -Auswärtstransportes verstanden werden. Die bei Temperaturen $> 15^\circ\text{C}$ stärker arbeitende Ca^{2+} -Pumpe verhindert eine für die Schlagrichtung ausreichende Erhöhung der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration, so daß nur eine unvollständige Cilienschlagumkehr (Richtungsverstellung gegenüber normal; Machemer, 1974) erkennbar an Spiralbahnen der Zellen oder gar keine Veränderung der Schlagrichtung (Normales Vorwärtsschwimmen) zu beobachten ist (siehe dazu Abb. 22).

Für die Betrachtung der parallelen Schwimmausrichtung der Paramecien im elektrischen Feld ist es wichtig, die Geometrie dieses Einzellers vor Augen zu haben. Er hat annähernd die Form eines gestreckten Ellipsoids mit der Längsachse von 200 - 250 μm und der Querachse von 60 - 70 μm .

Die Stellung der Zellen parallel zu den Linien des elektrischen Feldes kann auf der Basis des in Abschnitt 7.5 vorgeschlagenen Modells verstanden werden. Bei dieser Schwimmausrichtung ist der effektive Spannungsabfall über der Plasmamembran eines Parameciums um ca. $1/3$ kleiner als bei der Querstellung zum elektrischen Feld (Querachse/Längsachse $\approx 1/3$). Dies hat vermutlich zur Folge, daß weniger spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der ciliären Membran aktiviert werden als bei der Querstellung der Organismen zu den Feldlinien, so daß bei der Parallelstellung auf einen verminderten Ca^{2+} -Einstrom geschlossen werden kann. Bei der Parallelstellung verläuft ein Minimum an Stromlinien durch die Zelle, so daß diese Stellung die Lage des kleinsten äußeren Zwanges für den Organismus darstellt. Damit stellt sie die stabilste Schwimmlage unter den gegebenen Bedingungen dar. Wenn die intraciliäre Ca^{2+} -Konzentration nicht viel höher als ihr Ruhewert (ca. $5 \cdot 10^{-8}$ M/l ; Hildebrand and Dryl, 1976) ist, wird sie im elektrischen Wechselfeld wahrscheinlich sofort eingenommen, wie z.B. bei Temperaturen $> 15^\circ\text{C}$ (s. Abb. 23; 3. Spalte).

Zum Modell, das in Abschnitt 7.5 vorgeschlagen wird, kann noch folgendes bemerkt werden :

Hausmann (1927) hat eine direkte Proportionalität zwischen Größe der Protozoen und äußerer Spannung in Bezug auf sowohl die erste erkennbare Reaktion (unspezifische Wirkung des elektrischen Feldes auf Protozoen; Scheminzky, 1924) als auch auf die Tötung bei 3 von 4 untersuchten Protozoen festgestellt. Das bedeutet, daß die Wirkung der extrazellulären elektrischen Reizung bei gleichbleibender Reizspannung bei größeren Protozoen stärker ausgeprägt ist, als bei kleineren. Dieser Befund unterstützt direkt das in Abschnitt 7.5 beschriebene Modell.

Abhängigkeit von der Reizspannung :

Bei kleineren Reizspannungen (Abb. 24; 1. Spalte) werden vor-

wiegend spiralförmige Bewegung, Rotation sowie wiederholte Umkehrreaktion registriert (vergl. dazu Abb. 22). Erst bei höheren Reizspannungen (≥ 20 V entspricht 10 V/cm; Abb. 24; 2. und 3. Spalte) tritt Rückwärtsschwimmen auf, woraus man auf Cilien-schlagumkehr schließen kann. D.h. bei Reizspannungen ≥ 20 V wächst der Ca^{2+} -Einwärtsstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der ciliären Membran so weit an, daß die Erhöhung der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration ausreicht, um die Umkehr des effektiven Cilienschlages auszulösen. Die Ursache für die Vergrößerung des Ca^{2+} -Einwärtsstromes kann ausschließlich ein Anwachsen der Membranleitfähigkeit für Ca^{2+} (g_{Ca}), d.h. zunehmende Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle in der Cilienmembran mit steigender Reizspannung sein.

Die Verkürzung der Rückwärtsschwimmspuren geschieht schneller bei 36 V als bei 20 V (Abb. 24; 2. und 3. Spalte).

Dies deutet auf eine zeitabhängige Abnahme der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration, die offensichtlich bei höheren Spannungen schneller stattfindet. Sie beruht wahrscheinlich einerseits auf der schnellen Inaktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle in der ciliären Membran bei höheren Spannungen. Andererseits muß auch die Möglichkeit einer spannungsaktivierbaren (elektrogenen) Ca^{2+} -Pumpe berücksichtigt werden (vergl. Hook and Hildebrand, 1979). Die Möglichkeit wird im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Flußmessungen in Abschnitt 4.2 diskutiert.

Abhängigkeit vom erhöhten Verhältnis $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2}$:

Eine Erhöhung des Verhältnisses $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2}$ im extrazellulären Medium infolge einer Erhöhung der äußeren K^+ -Konzentration bewirkt eine Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle (Erhöhung von g_{Ca}) und damit einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom, der wiederum über eine Langzeitinaktivierung der Plasmamembran eine Veränderung des passiven Ca^{2+} -Einstroms zur Folge hat (Hildebrand, 1978).

D.h. bei einem veränderten Verhältnis $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2}$ ist ein veränderter Ca^{2+} -Einstrom zu erwarten. Somit beruht die Desensitivierung der Zellen, d.h. eine verminderte Empfindlichkeit gegen äußere Reize, durch Zugabe von K^+ in die Waschlösung auf einem Adaptionszustand der Organismen, der durch die Menge des während der Erregung ins Innere der Cilien eingeströmten Ca^{2+} bestimmt wird.

Auf den Dunkelfeldaufnahmen des lokomotorischen Verhaltens von Paramecium (Abb. 25 und 26) ist deutlich zu erkennen, daß mit wachsender äußerer K^+ -Konzentration, die einer Erhöhung des Verhältnisses $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ entspricht, die Empfindlichkeit gegen elektrische Reizung abnimmt. Dies macht sich bemerkbar durch abnehmende Tendenz zur Cilienschlagumkehr, d.h. zunehmendes Spiralisieren und Vorwärtsschwimmen der Organismen (s. dazu Abb. 22). Da Temperatur (15 °C) und Reizspannung (20 V) während der Versuche konstant waren, deutet dies auf einen verminderten reizbedingten passiven Ca^{2+} -Einstrom hin, der wiederum auf eine zunehmende Membraninaktivierung bei zunehmendem Verhältnis $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ zurückzuführen ist.

Die Schwimmgeschwindigkeit der Zellen (Spiralisieren und Vorwärtsschwimmen) ist größer bei 36 V verglichen mit 20 V. (längere Schwimmspuren; Abb. 26 ; 2. und 3. Spalte). Dies deutet auf eine geringere Inaktivierung der Plasmamembran bei höheren Spannungen bzw. eine verminderte intraciliäre Ca^{2+} -Konzentration unter diesen Bedingungen. Am einfachsten läßt sich dieses Phänomen mit der Annahme eines spannungsabhängigen aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransportes erklären. Mit anderen Worten : bei höheren Spannungen wird der spannungsabhängige Ca^{2+} -Auswärtstransport erhöht, der eine Verminderung der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration sowie eine geringere Membraninaktivierung hervorruft. Dies führt wiederum zur Renormalisierung des Cilienschlages, die an der schwächeren Spiralisierung bzw. am Vorwärtsschwimmen der Zellen erkennbar ist.

4.2 Interpretation der Ergebnisse der Ca^{2+} -Flußmessungen

Da im Vergleich zu der gemessenen Ca^{2+} -Aufnahme eine relativ kleine Menge Ca^{2+} an der Plasmamembran von Paramecium gebunden wird (siehe Abschnitt 4.3), geben die Ergebnisse der Flußmessungen zur reizbedingten Ca^{2+} -Aufnahme (Abschnitt 3.1.1 bis 3.1.5) insgesamt eine unmittelbare Bestätigung der Ca^{2+} -Einstrom-Hypothese (Eckert, 1972). Die Korrelation zwischen dem lokomotorischen Verhalten während elektrischer Reizung und der Ca^{2+} -Aufnahme durch die Organismen nach erfolgter Reizung ist offensichtlich.

Der vollständigen oder teilweisen Schlagumkehr, die durch elektrische Reizung hervorgerufen wird, entspricht eine Ca^{2+} -Aufnahme durch die Zellen (Abnahme an $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Radioaktivität in der umgebenden Flüssigkeit).

Fazit : Unter den in den Abschnitten 3.1.1 bis 3.1.5 beschriebenen Versuchsbedingungen kann ein erregungsbedingter Ca^{2+} -Einstrom registriert werden. Mit der angewandten Methode ist es erstmals gelungen, einen erregungsbedingten Ca^{2+} -Einstrom bei physiologischen Temperaturen nachzuweisen.

Dazu soll folgendes bemerkt werden :

Der Versuch, einen erregungsbedingten Ca^{2+} -Einstrom an *Paramecium aurelia* mit Hilfe des Radioisotops $^{45}\text{Ca}^{2+}$ direkt nachzuweisen, wurde zum ersten Mal von Browning und Nelson (1976) unternommen. Dieser Nachweis ist ihnen nur teilweise gelungen, denn sie haben einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom infolge einer Membrandepolarisation durch K^+ bzw. durch Anlegen eines elektrischen Feldes alternieren-der Polarität nur bei 0 °C, nicht aber bei 23 °C gemessen. Den Ca^{2+} -Ausstrom konnten sie bei 23 °C, nicht aber bei 0 °C feststellen.

Aus den Versuchen zur $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe (Abschnitt 3.1.7) geht hervor, daß unter den entsprechenden Versuchsbedingungen eine reizabhängige Erhöhung der Radioaktivität im extrazellulären Medium registriert wird. Sie entspricht einer $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe von den Zellen. Zusammen mit den Versuchen zur Ca^{2+} -Aufnahme zeigen diese Experimente, daß parallel zum erregungsbedingten Ca^{2+} -Einstrom möglicherweise ein Ca^{2+} -Auswärtstransport durch die Plasmamembran von *Paramecium* stattfindet. Die $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe von den Ca^{2+} -Bindungsstellen an der Plasmamembran ist dabei nicht vollkommen auszuschließen. Die Ca^{2+} -Bindung wird in Abschnitt 4.3 diskutiert.

Fazit : Die Ca^{2+} -Aufnahme und -Abgabe in Abhängigkeit von der Temperatur und der extrazellulär applizierten Reizspannung lassen sich erklären mit der Annahme eines passiven Ca^{2+} -Einstromes und eines gleichzeitigen aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransportes. In den Versuchen kommt es dadurch zu einem Austausch von unmarkiertem Ca^{2+} und radioaktiv markiertem Ca^{2+} in der Zelle zwischen intraciliärem und extrazellulärem Raum.

An dieser Stelle wird daran erinnert, daß ein Ca^{2+} -Einstrom nur meßbar ist, solange sich das System im Ungleichgewicht (im Hinblick auf $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Verhältnis) befindet (vgl. Abschnitt 2.2.1). Zum Problem des Ca^{2+} -Austausches an der Membran von Paramecium ist es notwendig, folgendes zu bemerken : im unerregten Zustand der Zelle erfolgt der $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch etwa kontinuierlich mit einer konstanten Rate. Während der Erregung wird er zusätzlich angeworfen, so daß die Austauschrate im Zusammenhang mit einer vermuteten Substratabhängigkeit des aktiven Ca^{2+} -Transportes ansteigt. Nach der Erregung erhält die Austauschrate wieder ihren "Ruhewert".

Für die weitere Diskussion wird hiermit ein Ca^{2+} -Austausch an der Membran von Paramecium postuliert. Die Abhängigkeit des aktiven Transports oder der Austauschrate via aktiven Transport von der Temperatur wird in einem späteren Zusammenhang diskutiert. Welche Faktoren bei der Regulierung der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration zusätzlich eine Rolle spielen können, soll nun erörtert werden.

Abhängigkeit des Ca^{2+} -Transportes von der Temperatur :

Die Temperaturabhängigkeit des Ca^{2+} -Transportes (Abb. 7, 8, 17, 18) kann unter der Annahme zwei regulatorischer Mechanismen erklärt werden. Beide Mechanismen sind darauf ausgerichtet, die intraciliäre Ca^{2+} -Konzentration in der Nähe ihres Ruhewertes (ca. $5 \cdot 10^{-8}$ M/l; Hildebrand and Dryl, 1976) zu halten.

Einer dieser Mechanismen reguliert den erregungsbedingten passiven Ca^{2+} -Einstrom. Er beruht auf der Inaktivierung der Plasmamembran von Paramecium, die eine oder sogar die einzige Ursache für die "Adaptation" der Organismen auf veränderte Umweltbedingungen ist. Eine Bestätigung für die Existenz eines solchen regulatorischen Mechanismus kann man den Versuchen entnehmen, die im Abschnitt 3.1.3 beschrieben sind. Dazu soll die Kurve der ersten Reizantwort in Abhängigkeit von der Dauer der Reizperiode betrachtet werden (Abb. 13).

Man erkennt den sättigenden Verlauf der Kurve mit Verlängerung der Reizdauer. Die Zeitskala, auf der der Sättigungsvorgang abläuft, umfaßt einige Minuten. Sie entspricht damit größten-

ordnungsmäßig der Dauer des CCR bei Erhöhung der äußeren K^+ -Konzentration (Hildebrand, 1978 a). Die fallende Tendenz der zweiten Reizantwort mit zunehmender Dauer der Reizperiode kann zum Teil aufgrund der Langzeitinaktivierung der Membranerregbarkeit nach anhaltenden Depolarisationen verstanden werden. Die Reaktivierungszeit, die für vollständige Wiederherstellung der Membranerregbarkeit notwendig ist, kann unter ähnlichen Bedingungen 2 - 3 Stunden betragen (Hildebrand, 1978 a). Die Möglichkeit eines frühen Erreichens des Gleichgewichtes zwischen markiertem und unmarkiertem Ca^{2+} im intraciliären und extrazellulären Raum unter diesen Reizbedingungen kann ausgeschlossen werden, da sonst die zweite und besonders die dritte Reizantwort während derselben Versuche nicht registrierbar wären. Ein anderer Aspekt der Abnahme der zweiten Reizantwort mit zunehmender Dauer der Reizperiode wird im Zusammenhang mit der Abhängigkeit des Ca^{2+} -Transportes von der Reizspannung diskutiert.

Der Anstieg des Ca^{2+} -Einstroms zwischen 5 und 15 °C (Abb. 10 und 11) kann aufgrund der Inaktivierung der Plasmamembran von Paramecium am einfachsten verstanden werden. Da man einen verminderten $^{45}Ca^{2+}/Ca^{2+}$ -Austausch an der Plasmamembran bei Temperaturen ≤ 15 °C infolge der verminderten Aktivität der Ca^{2+} -Pumpe bei diesen Temperaturen annehmen kann, befindet sich das System im Hinblick auf $^{45}Ca^{2+}/Ca^{2+}$ -Verhältnis zwischen dem intraciliären und extrazellulären Raum im Ungleichgewicht. Man würde anhand dessen erwarten, daß die reizbedingte Ca^{2+} -Aufnahme umso größer sein würde, je niedriger die Temperatur ist, bei der sie gemessen wird. Im Temp.-Bereich zwischen 5 und 15 °C wird aber im Gegenteil eine Zunahme der Ca^{2+} -Aufnahme mit steigender Temperatur registriert. Um dies zu erklären, muß ein Membranmechanismus angenommen werden, der den erregungsbedingten passiven Ca^{2+} -Einstrom reguliert. Einen solchen regulatorischen Mechanismus stellt die Membraninaktivierung dar.

Mit steigender Temperatur nimmt die Membraninaktivierung ab, wahrscheinlich infolge eines verstärkten aktiven Ca^{2+} -Auswärts-transportes. Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen geringerer Ca^{2+} -Akkumulierung im Inneren und geringerer Inaktivierung. Die $^{45}Ca^{2+}/Ca^{2+}$ -Austauschrate steigt dadurch wahrscheinlich soweit, daß eine Erhöhung der Ca^{2+} -Aufnahme zwischen 5 und 15 °C registriert wird.

Um diese Aussage bestätigen zu können, müssen nun die photographischen Registrierungen der Bewegung von Paramecium zur Hilfe genommen werden (vergl. Abschnitt 4.1).

Fazit : Bei Temperaturen $\leq 15^{\circ}\text{C}$ wird die intraciliäre Ca^{2+} -Konzentration hauptsächlich durch die Inaktivierung der Plasmamembran von Paramecium über die Drosselung des reizbedingten passiven Ca^{2+} -Einstroms reguliert.

An dieser Stelle wird folgendes zur Membraninaktivierung erwähnt : Die Membraninaktivierung bei Paramecium ist enggebunden an erregungsbedingten Ca^{2+} -Einstrom (Hildebrand and Dryl, 1976). Die elektrophysiologischen Versuche von Brehm und Eckert (1978) haben diesen Zusammenhang bestätigt. Als Ursache für Inaktivierung haben Hildebrand und Dryl (1976) die Bindung von Ca^{2+} an der Membrannnenseite postuliert. Eine zusätzliche Annahme im Hinblick auf die Langzeitinaktivierung der Plasmamembran von Paramecium ("Adaptation") stellt die von Hook (1979) postulierte reversible Porenprotein-"Denaturierung" dar. Diese Denaturierung im weitesten Sinne soll eine Verringerung der auf der Kurzzeitskala verfügbaren Ca^{2+} -Poren bedingen. D.h. die Ca^{2+} -Poren, die auf der Langzeitskala der verhaltensphysiologischen Vorgänge "denaturiert" sind, stehen für den reizbedingten Ca^{2+} -Einwärtsstrom nicht zur Verfügung.

Bei Temperaturen $> 15^{\circ}\text{C}$ nimmt die Bedeutung des aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransportes für die Regulierung der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration zu. Eine Folge des Anstiegs des aktiven Ca^{2+} -Transportes bei höheren Temperaturen ist vermutlich ein Anstieg der $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschrate mit zunehmender Temperatur sowohl während der Periode vor der elektrischen Reizung (40 min; siehe Abb. 4 a) als auch während der elektrischen Reizung. Mit anderen Worten : das $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschgleichgewicht wird im physiologischen Temperaturbereich bei höheren Temperaturen schneller erreicht, als bei niedrigeren. Dieses Faktum wird durch die Versuche belegt, die in den Abschnitten 3.1.4 und 3.1.5 beschrieben worden sind.

Im Abschnitt 3.1.4 wurde die Abhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme vom Abstand der Reizperioden untersucht. Es wurde festgestellt,

daß das Verhältnis von zweiter und erster Reizantwort mit größer werdendem Abstand zwischen den Reizperioden abnimmt (Abb. 15). Dies bedeutet, daß in der Zeit zwischen zwei Reizperioden eine Anreicherung an $^{45}\text{Ca}^{2+}$ durch den kontinuierlichen $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch in der Zelle stattfindet, so daß die spezifische Aktivität im Zellinneren immer mehr der spezifischen Aktivität in der Durchströmungslösung gleicht. Durch einen kontinuierlichen $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch können auch die Größenunterschiede zwischen den einzelnen Reizantworten während der Versuche, bei denen der Abstand zwischen den Reizperioden konstant bleibt (siehe z.B. Abb. 6), erklärt werden, obwohl dabei auch die Langzeitinaktivierung der Membranerregbarkeit eine gewisse Rolle spielen mag.

Die Relaxationshalbwertszeit, deren Abhängigkeit von der Temperatur in einem Teil des Abschnitts 3.1.5 beschrieben worden ist, wird kürzer von Reizantwort zu Reizantwort während eines Versuchs bei konstanter Temperatur. Dies kann man deutlich erkennen bei Temperaturen $> 15^\circ\text{C}$, wobei der aktive Ca^{2+} -Auswärtstransport stärker zum Ausdruck kommt. Diesen Befund, der in der Tabelle 1 dargestellt und in Abb. 16 a veranschaulicht ist, kann man ebenso durch einen kontinuierlichen $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch an der Plasmamembran von Paramecium am besten erklären.

Die fallende Tendenz der Temperaturabhängigkeitskurve der Ca^{2+} -Aufnahme (Abb. 7 und 8) sowie der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe (Abb. 17 und 18) bei Temperaturen $> 15^\circ\text{C}$ kann in diesem Zusammenhang folgendermaßen verstanden werden : der $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch steigt während der Periode vor der elektrischen Reizung (40 min ; Abb. 4 a) mit zunehmender Temperatur soweit an, daß der gemessene Ca^{2+} -Transport nach erfolgter Reizung bei höheren Temperaturen scheinbar abnimmt. Die meßbare Ca^{2+} -Aufnahme bzw. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe werden dadurch kleiner.

Ein anderer möglicher Grund für die Abnahme des Ca^{2+} -Transportes bei Temperaturen zwischen 15 und 25°C liegt wahrscheinlich in der Tatsache, daß mit zunehmender Temperatur die Zellen zunehmend parallel zu den Linien des elektrischen Feldes schwimmen (vergl. Abschn. 4.1). Nach dem Modell im Abschnitt 7.5 ist der effektive Spannungsabfall über der Membran von Paramecium bei der Parallelstellung der Zellen zum elektrischen Feld um $1/3$ kleiner, als bei der Querstellung. Die Folge davon ist eine Verminderung des passi-

ven Ca^{2+} -Einstroms, da weniger spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der ciliären Membran aktiviert werden. Einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom entspricht wegen der vermutlichen Substratabhängigkeit des aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransportes ein verminderter Ca^{2+} -Auswärtstrom.

Fazit : Ein erhöhter $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch über der Plasmamembran von Paramecium während der Periode vor der elektrischen Reizung als vermutlich auch ein verminderter Ca^{2+} -Einstrom bei Reizung infolge der zunehmenden Ausrichtung der Zellen parallel zu den Linien des elektrischen Feldes mit steigender Temperatur sind Ursache für die fallende Tendenz der Temperaturabhängigkeitskurve des Ca^{2+} -Transportes bei den Temperaturen $>15^\circ\text{C}$.

Abhängigkeit des Ca^{2+} -Transportes von der Reizspannung :

Die Abhängigkeit des Ca^{2+} -Transportes von der Reizspannung (s. Abschn. 3.1.2 und 3.1.6.2) kann folgendermaßen erklärt werden : die Zunahme des Ca^{2+} -Einstroms und damit der Ca^{2+} -Aufnahme mit wachsender Reizspannung bis 20 V (Abb. 10, 11, 19 und 20) ist wahrscheinlich das Ergebnis einer steigenden spannungsabhängigen Membranleitfähigkeit für Ca^{2+} (g_{Ca}) (Öffnung der spannungsabhängigen Kanäle in der Cilienmembran). Diese Interpretation kann auf zweifache Weise unterstützt werden.

Erstens bestätigen die Dunkelfeldaufnahmen des lokomotorischen Verhaltens in Abhängigkeit von der Reizspannung diese Aussagen.

(s. Abschnitt 4.1).

Zweitens zeigen die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen mit "voltage-clamp"-Methode (Eckert and Brehm, 1979), daß die Ca^{2+} -Leitfähigkeit (g_{Ca}) mit steigender Membrandepolarisation in Bezug auf das Ruhepotential bis ca. 30 mV proportional anwächst. Ab 30 mV Membrandepolarisation ändert sich g_{Ca} mit weitersteigender Spannung kaum noch (ca. 100 % der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle sind aktiviert). Die extrazelluläre Reizspannung von 20 V entspricht nach dem Modell im Abschnitt 7.5 einem effektiven Spannungsabfall über der Plasmamembran von ca. 50 mV. Die beiden Werte sind nicht sehr verschieden voneinander, wenn man bedenkt, daß bei der Aufstellung des Modells sowohl der Membranwiderstand als auch die Membrankapazität, also die Größen,

die mit einem Unsicherheitsfaktor behaftet sind, eine wichtige Rolle spielen. Deshalb kann angenommen werden, daß bei einer Reizspannung von 20 V der maximale passive Ca^{2+} -Einstrom unter den gegebenen Versuchsbedingungen auftritt.

Fazit : Die ansteigende Ca^{2+} -Aufnahme bei Reizspannungen bis 20 V beruht auf dem größer werdenden passiven Ca^{2+} -Einstrom. Dieser ist auf die Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in der Cilienmembran zurückzuführen.

Die Abnahme der Ca^{2+} -Aufnahme bei Reizspannungen > 20 V beruht wahrscheinlich einerseits auf der schnellen Inaktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle in der ciliären Membran. Den Hinweis darauf findet man auf den Dunkelfeldaufnahmen der Schwimmspuren (s. Abschnitt 4.1). Eine weitere Bestätigung dafür bietet die Spannungsabhängigkeit der Relaxationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) (Abb. 16 b). $t_{1/2}$ wird mit wachsender Reizspannung kürzer. Das bedeutet, daß der quasistationäre Zustand im Flußsystem bei höheren Spannungen nach erfolgter Reizung schneller hergestellt wird. Darüber hinaus verschwinden die zweite und die dritte Reizantwort bei Spannungen > 20 V fast vollkommen.

Andererseits muß auch die Möglichkeit einer spannungsaktivierbaren (elektrogenen) Ca^{2+} -Pumpe berücksichtigt werden (vgl. Hook and Hildebrand, 1979). Diese Vermutung findet ihre Bestätigung vor allem in den Versuchen zur Abhängigkeit der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe (Abb. 19 und 20) von der Reizspannung. Aus der steigenden Tendenz der Kurven mit wachsender Reizspannung kann geschlossen werden, daß der aktive Ca^{2+} -Transport - zumindest teilweise - elektrogen ist. Ein solcher spannungsgetriebener Ca^{2+} -Transport würde wie die schnelle Membraninaktivierung eine zeitabhängige Abnahme der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration bewirken. Wahrscheinlich wirken beide Mechanismen zusammen.

Aufgrund dieser Überlegung kann nun der Verlauf der zweiten und dritten Reizantwort (Ca^{2+} -Aufnahme) in Abhängigkeit von der Dauer der Reizperiode verstanden werden (Abb. 13) : in diesem Abschnitt (siehe Temperaturabhängigkeit) wurde schon erwähnt, daß der sättigende Verlauf der Kurve mit Verlängerung der Reizdauer wahrscheinlich eine Folge der Langzeitinaktivierung der Plasmamembran ist. Bei der zweiten Reizantwort ist ein solcher Verlauf bis zur Reizdauer von ca. 10 s zu verfolgen.

Danach nimmt die Ca^{2+} -Aufnahme ab. Es kann angenommen werden, daß der $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch während der ersten Reizantwort so weit fortgeschritten ist, daß, nachdem die Membran inaktiviert wurde, der passive Ca^{2+} -Einstrom auf ein Minimum reduziert wird. Die Wirkung des spannungsgetriebenen Ca^{2+} -Auswärtstransportes kommt dadurch stärker zum Ausdruck. Vermutlich wird bei der zweiten Reizantwort aus der Zelle ins Außenmedium mehr $^{45}\text{Ca}^{2+}$ hinaustransportiert, als während der ersten Reizantwort. Daraus resultiert wahrscheinlich die Abnahme der Ca^{2+} -Aufnahme während der zweiten Reizantwort.

Obwohl bei der dritten Reizantwort nach dieser Interpretation eine Abnahme der Ca^{2+} -Aufnahme eher zu erwarten wäre als bei der zweiten Reizantwort, beruht die Konstanz der dritten Reizantwort vermutlich auf einem Gleichgewicht zwischen dem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und dem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Auswärtstransport innerhalb der angewandten Dauer der Reizperiode.

Fazit : Bei Reizspannungen > 20 V wird die intraciliäre Ca^{2+} -Konzentration zunehmend durch die verstärkte Inaktivierung der Plasmamembran sowie den zum Teil elektrogenen Ca^{2+} -Auswärtstransport reguliert.

Abhängigkeit vom erhöhten Verhältnis $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2}$:

Bei einem Verhältnis $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2} = 10$ wird noch eine Netto- Ca^{2+} -Aufnahme gemessen (Abb. 21 a). Nach mehrfacher Reizung und besonders nach einer Verlängerung der Reizperiode wird eine Ca^{2+} -Abgabe registriert. Nach einer Erhöhung des Verhältnisses $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2}$ auf 20 wird nur noch die Ca^{2+} -Abgabe registriert (Abb. 21 b). Dieses Phänomen läßt sich mit der Annahme eines spannungsabhängigen Ca^{2+} -Auswärtstransportes am einfachsten erklären.

Da bei dem Verhältnis $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2} > 5$ im Equilibrierungsmedium (Durchströmungslösung) bereits ein stark adaptierter Zustand der Zellen vorliegt (Naitoh, 1968), kann auf eine starke Verminderung des Ca^{2+} -Einstroms während der Reizung geschlossen werden. In der Vorperiode (40 min ; Abb. 4 a) werden die Zellen umsomehr mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ beladen, je höher das Verhältnis $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2}$ ist. D.h. während der elektrischen Reizung tritt ein relativ kleiner Ca^{2+} -Einstrom auf, während die spannungsabhängige Ca^{2+} -Pumpe einen hohen Prozentsatz an $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aus der Zelle hinaustransportiert. Dadurch erhöht sich die

Radioaktivität in der Durchströmungslösung, die als $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe registriert wird.

Diese Aussage wird bestätigt durch die steigende Abgabe bei gleichbleibender Reizspannung während der ersten 100 Minuten des Versuchs in Abb. 21 b. Nach den ersten zwei Reizperioden in der 41. und 61. Minute scheint nämlich der $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch soweit fortgeschritten zu sein, daß die spezifische Radioaktivität in den Zellen und im Medium vermutlich im Gleichgewicht ist. Alle weiteren Reizungen von 1 min Dauer (81., 121. und 181. Minute) rufen etwa gleich große Reizantworten hervor. Die 15 min lange Reizung in der 141. Minute hat eine relativ große $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe zur Folge. Aufgrund eines spannungsabhängigen Ca^{2+} -Auswärtstransportes kann dieser Befund am einfachsten erklärt werden. Eine Unterstützung für diese Vermutung liefern wieder die Aufnahmen des Schwimmverhaltens (vergl. Abschnitt 4.1 ; entspr. Absatz).

Diese Versuche sind bezüglich der Membraninaktivierung mit den Versuchen zur Ca^{2+} -Aufnahme in Abhängigkeit von der Dauer der Reizperiode prinzipiell vergleichbar (Abb. 13). Während der Reizperioden >1 min scheint ein solcher Grad der Membraninaktivierung erreicht zu sein, daß die Wirkung des Ca^{2+} -Auswärtstransportes in Form einer Abnahme der Ca^{2+} -Aufnahme (2. Reizantwort) registriert wird.

Fazit : Die Versuche zur Abhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme vom erhöhten Verhältnis $[\text{K}^+]_o / [\text{Ca}^{2+}]_o^{1/2}$ erhöhen die Zuverlässigkeit der Annahme eines spannungsabhängigen Ca^{2+} -Auswärtstransportes an der Plasmamembran von *Paramecium*.

4.3 Quantitative Betrachtungen

Als Grundlage für die folgenden Betrachtungen wird das Ergebnis der ersten Reizantwort (Ca^{2+} -Aufnahme) bei 20 V Reizspannung und 15 °C genommen. Er beträgt ca. 700 pM/ 10^3 Zellen und stellt den maximalen gemessenen Wert aus den durchgeführten Versuchen dar. Zu folgenden Punkten sollen quantitative Überlegungen angestellt werden :

1. Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im intraciliären Raum nach einer Membrandepolarisation von 50 mV (der extrazelluläre Reiz mit der Amplitude von 20 V entspricht unter den gegebenen Versuchsbedingungen einem effektiven Spannungsabfall über der Plasmamembran von ca. 50 mV ; vergl. Abschnitt 7.5),
2. totale Membranbindungskapazität eines Parameciums für Calcium,
3. Ca^{2+} -Diffusion von den Cilien in den Zellkörper während der gesamten Dauer der Reizantwort,
4. die per Phagozytose aufgenommene Ca^{2+} -Menge während der Dauer eines Versuchs.

Die Ergebnisse dieser Überlegungen werden im Zusammenhang mit dem Ergebnis der ersten Reizantwort (Ca^{2+} -Aufnahme) von $700 \text{ pM}/10^3$ Zellen diskutiert.

1. Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im intraciliären Raum nach einer Membrandepolarisation von 50 mV :

Zur Berechnung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach einer Membrandepolarisation von 50 mV werden folgende Ergebnisse gebraucht :

- a) Damit die Kapazität der Membran eines Ciliums um 1 mV umgeladen wird, braucht man ca. $3 \cdot 10^{-22} \text{ M } \text{Ca}^{2+}$ (Eckert, 1972) (vergl. Abschnitt 7.7).
- b) Die mittlere Anzahl der Cilien wird mit ca. 15 000 Cilien pro Paramecium angegeben (Hook, 1979).
- c) Die relative Refraktärzeit der Membran von Paramecium beträgt 250 ms (Naitoh, Eckert and Friedman, 1972). Aufgrund dieses Wertes kann vereinfacht angenommen werden, daß jeder vierte der 1 200 Pulse (insgesamt also 300 Pulse) während der Reizung von 1 Minute Dauer (Frequenz = 10 Hz) die maximale regenerative Antwort bei der Hälfte der Cilien auslösen kann. Dies ist nämlich folgendermaßen zu verstehen :
Während der Reizung unter den beschriebenen Versuchsbedingungen schwimmen die Organismen senkrecht zum elektrischen Feld (siehe Abb. 23). Da es sich um ein Feld alternierender

Polarität handelt, wird jeweils die Hälfte der Cilien depolarisiert, die gerade der augenblicklichen Kathode zugewandt ist. Diese Hälfte ist während des Refraktärstadiums von 250 ms nicht voll erregbar. Für die andere Cilienhälfte gilt dasselbe. Da der Abstand der für eine Cilienhälfte depolarisierenden Pulse bei dem angewandten Reizprogramm (Frequenz = 10 Hz) 100 ms beträgt, heißt das, daß etwa jeder zweite Puls von 600 applizierten Pulsen pro Cilienhälfte eine maximale regenerative Antwort in einer Cilienhälfte auslösen kann.

Eine Zwischenrechnung ergibt folgendes Ergebnis für die Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung im intraciliären Raum nach einer Membrandepolarisation von 50 mV :

$$\begin{aligned} & 3 \cdot 10^{-22} \text{ (M Ca}^{2+} \text{ / Cilium } \cdot \text{ mV } \cdot \text{ Puls) } \cdot \frac{1,5 \cdot 10^4 \text{ (Cil./Zelle)}}{2} \\ & \cdot 50 \text{ mV } \cdot 300 \text{ Pulse } \cdot \left(\frac{10^3 \text{ Zellen}}{10^3 \text{ Zellen}} \right) * \\ & \approx \underline{\underline{34 \text{ pM Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}}} \end{aligned}$$

Dies entspricht dem theoretisch zu erwartenden Wert für den Ca^{2+} -Einwärtsstrom unter den beschriebenen Bedingungen.

* Klammerausdruck dient der Normierung auf 10^3 Zellen.

2. Totale Membranbindungskapazität eines Parameciums für Ca^{2+} :

Die totale Membranbindungskapazität eines Parameciums beträgt für Ca^{2+} ca. $4,2 \cdot 10^{-14} \text{ M Ca}^{2+}$ /Paramecium (Naitoh and Yasumasu, 1967)(vergl. Abschnitt 7.6). Daraus ergeben sich ca. 42 pM Ca^{2+} / 10^3 Zellen für das an der Außenseite der Membran von 1000 Zellen gebundenes Calcium.

3. Ca^{2+} -Diffusion von den Cilien in den Zellkörper :

Unter der Annahme einer kontinuierlichen unbehinderten Ca^{2+} -Diffusion von den Cilien in den Zellkörper während der Dauer der Reizperiode (1 min = 60 s), erhält man eine Menge an durch Diffusion von den Cilien in den Zellkörper transportierten Ca^{2+} von ca. 360 pM Ca^{2+} / 10^3 Zellen. Unter Verwendung des Wertes für den Ca^{2+} -Fluß zwischen den Cilien und dem Zellkörper pro

Paramecium von $6 \cdot 10^{-15} \text{ M Ca}^{2+}/\text{s}$ (s. Abschnitt 7.8), sieht die Rechnung folgendermaßen aus :

$$6 \cdot 10^{-15} (\text{M Ca}^{2+}/\text{Zelle} \cdot \text{s}) \cdot \left(\frac{10^3 \text{ Zellen}}{10^3 \text{ Zellen}} \right)^* \cdot 60 \text{ s} \\ = \underline{360 \text{ pM Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}}$$

Bei dieser Berechnung wurde die Ca^{2+} -Bindung im Zellinneren nicht berücksichtigt. Da die Diffusion durch diese Bindung eingeschränkt wird, ist der berechnete Wert von $360 \text{ pM Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}$, daher als ein Maximalwert zu betrachten.

4. Die per Phagozytose aufgenommene Ca^{2+} -Menge :

Da Paramecium die Nahrung über Phagozytose aufnimmt, muß ihr Beitrag zur Ca^{2+} -Aufnahme während der Periode vor und während der elektrischen Reizung berücksichtigt und quantitativ abgeschätzt werden. Die Zeit für die Bildung einer Nahrungsvakuole beträgt zwischen 4 und 5 Minuten (Bozler, 1924 ; Mast, 1947). Das bedeutet, daß während der Dauer eines Versuchs (100 min) ca. 25 Nahrungsvakuolen/Paramecium gebildet werden. Die größten Vakuolen haben einen Durchmesser von ca. $60 \mu\text{m}$ (Frisch, 1937). Wenn eine kugelige Form der Vakuolen angenommen wird, beträgt das Volumen einer Vakuole ca. 10^{-7} ml . Die $2,5 \cdot 10^4$ Nahrungsvakuolen, die von 10^3 Zellen während der Dauer eines Versuchs gebildet werden, haben damit ein Gesamtvolumen von $2,5 \mu\text{l}$. Unter der Annahme, daß die Ca^{2+} -Konzentration in der Nahrungsvakuole der Ca^{2+} -Konzentration in der Durchströmungslösung (10^{-4} M/l) gleich ist, kann berechnet werden, daß ca. $250 \text{ pM Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}$ per Phagozytose in das Zellinnere eingeschleust werden. Dieser Wert stellt wegen der bei der Berechnung verwendeten Größe der Nahrungsvakuolen einen Maximalwert dar. Da eine Nahrungsvakuole im Zellinneren eines Parameciums ca. 3 Stunden verweilt (Grell, 1968), braucht eine Ca^{2+} -Abgabe per Exozytose während der Versuchszeit nicht berücksichtigt zu werden.

5. Netto- Ca^{2+} -Aufnahme :

Die im Anschluß an Flußexperimente bestimmte Ca^{2+} -Netto-Aufnahme, die in den Paramecien nach einem Flußexperiment verblieben ist, beträgt bei einer Temperatur von 15°C und einer Reizspannung von 20 V ca. $330 \text{ pM} / 10^3 \text{ Zellen}$ (vgl. Tab. 2 ; Abschnitt 3.1.6).

Aus den unter 1. bis 5. aufgeführten Berechnungen und Überlegungen kann folgendes geschlossen werden :

Die Menge an gebundenem Calcium (Punkt 2) ist vernachlässigbar klein im Vergleich mit dem gemessenen Wert von $700 \text{ pM} / 10^3 \text{ Zellen}$. Der theoretisch berechnete Wert für den Ca^{2+} -Einstrom (Punkt 1) zeigt, daß die Hypothese eines Ca^{2+} -Austausches über der Plasmamembran von Paramecium durch die vorliegenden Flußexperimente gut gestützt wird. Aus den Berechnungen unter Punkt 3 geht hervor, daß über Ca^{2+} -Diffusion ins Zellinnere ein relativ großer Teil des durch die Zellen aufgenommenen Calciums im Zellinneren gespeichert wird.

Da nach Subtraktion der an der Membran-Außenseite gebundenen Ca^{2+} -Menge ($40 \text{ pM} \text{ Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}$) von der Ca^{2+} -Netto-Aufnahme (ca. $330 \text{ pM} \text{ Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}$) eine durch die Zellen im Zellinneren gespeicherte Ca^{2+} -Menge von ca. $300 \text{ pM} \text{ Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}$ übrig bleibt, und die per Phagozytose aufgenommene Ca^{2+} -Menge auf $< 250 \text{ pM} \text{ Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}$ geschätzt wird, kann auf eine diffundierte Ca^{2+} -Menge von $> 50 \text{ pM} \text{ Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}$ geschlossen werden.

Der Vergleich der Werte von $700 \text{ pM} \text{ Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}$ (Ca^{2+} -Aufnahme) und $> 50 \text{ pM} \text{ Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}$ (Ca^{2+} -Diffusion von den Cilien in den Zellkörper) zeigt, daß ein beträchtlicher Teil des infolge der Erregung in die Cilien eingeströmten Calciums per aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransport aus den Cilien ins Außenmedium hinaustransportiert wird ($< 650 \text{ pM} \text{ Ca}^{2+} / 10^3 \text{ Zellen}$). Daraus kann eine mittlere Ca^{2+} -Pumprate während der "Dauer der Reizantwort" ($20 \text{ min} = 1200 \text{ s}$) an der ciliären Membran abgeschätzt werden. Zu dieser Abschätzung braucht man außerdem folgende Daten :

Die totale Membranoberfläche eines Parameciums beträgt ca.

$10,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ (Machemer and de Peyer , 1977). Die Membranoberfläche, die die Cilien bedeckt, beträgt etwa $2/3$ der totalen Membranfläche (Eckert and Naitoh, 1970) und ist damit gleich $7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$. Damit kann nun die Ca^{2+} -Pumprate berechnet werden :

$$P_{\text{Ca}} = \frac{6,5 \cdot 10^{-13} (\text{M Ca}^{2+}) \cdot 6 \cdot 10^{23} (\text{Ca}^{2+}/\text{M})}{7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot 1,2 \cdot 10^3 \text{ s}}$$

$$P_{\text{Ca}} = 4,6 \cdot 10^{11} \text{ Ca}^{2+} / \text{cm}^2 \cdot \text{s}$$

wobei

die über den aktiven Ca^{2+} -Transport transportierte Ca^{2+} -Menge
 $= 6,5 \cdot 10^{-13} \text{ M Ca}^{2+}/\text{Paramecium}$,

Loschmidt Zahl $= 6 \cdot 10^{23} \text{ l/M}$,

Oberfläche der Cilienmembran $= 7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$,

"Dauer der Reizantwort" $= 1,2 \cdot 10^3 \text{ s}$.

Es ist anzunehmen, daß die Ca^{2+} -Pumprate während der elektrischen Reizung (Dauer der Reizperiode = 1 min) höher ist, als die hier berechnete mittlere Pumprate.

Nach dieser Berechnung liegt die Ca^{2+} -Pumprate an der Cilienmembran von *Paramecium caudatum* ca. eine Größenordnung über der Na^+ -Pumprate bei menschlichen Erythrozyten (s. Abschn. 7.9).

Bezogen auf das Volumen eines Ciliums ($3 \cdot 10^{-16} \text{ l}$; Eckert, 1972) ergibt die gemessene Ca^{2+} -Aufnahme von ca. $700 \text{ pM Ca}^{2+} / 10^3$ Zellen eine Erhöhung der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration pro Puls (300 wirksame Pulse; vergl. Punkt 1 c) von ca. $5 \cdot 10^{-4} \text{ M/l}$. Dieser Wert ist unter Berücksichtigung des $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austausches infolge aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransportes in Wirklichkeit sicher um einige Faktoren kleiner als der berechnete Wert. Er stimmt in der Größenordnung sehr gut mit den experimentellen Werten überein, die an Triton-X-100-extrahierten ("membranfreien") Paramecien gewonnen wurden (Naitoh and Kaneko, 1972).

4.4 Schlußfolgerungen

Mit Hilfe der verwendeten Durchströmungsmethode ist es gelungen, einen erregungsbedingten Ca^{2+} -Einstrom nachzuweisen. Er wurde im Gegensatz zu den Befunden von Browning und Nelson (1976) auf einer breiten Temperaturskala (5 bis 25°C) gemessen, die physiologische Temperaturen einschließt. Damit liefern die Ergebnisse einen direkten Beweis für die Ca^{2+} -Einstrom-Hypothese (Eckert, 1972).

Die intraciliäre Ca^{2+} -Konzentration wird hauptsächlich durch Inaktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle (Ca^{2+} -Transportsystem) und den aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransport reguliert. Ca^{2+} -Diffusion, die zwischen den Cilien und dem Zellkörper stattfindet, spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Regulation der Ca^{2+} -Konzentration in den Cilien (vgl. Hook, 1979).

Die Abhängigkeit des aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransportes von der Reizspannung läßt auf einen wenigstens zum Teil elektrogenen Charakter schließen. Die nach den Ergebnissen der Flußmessungen berechnete mittlere Ca^{2+} -Pumprate an der Cilienmembran von Paramecium liegt ca. eine Größenordnung über der Na^{+} -Pumprate bei menschlichen Erythrozyten und beträgt ca. 10^{11} Ionen / $\text{cm}^2 \cdot \text{s}$.

5. Ausblick

Um die in der vorliegenden Arbeit dargestellten und diskutierten Ergebnisse vervollständigen und die vorgeschlagenen Modelle erweitern zu können, bedarf es weiterer Versuche, in denen der Inaktivierungsmechanismus sowie der aktive Ca^{2+} -Transport bei *Paramecium* gezielt weiter untersucht werden sollen. Die zur Zeit laufenden Experimente zur pharmakologischen Beeinflussung des Calcium-Transportes lassen sich gut mit den bisher gewonnenen Vorstellungen vereinbaren (Wehner, 1979/80; unveröff. Erg.). Da der erregende Ca^{2+} -Einwärtsstrom bei *Paramecium* durch einen Ba^{2+} -Einwärtsstrom ersetzt werden kann, und da Ba^{2+} eine Verlängerung des Aktionspotentials durch Verzögerung der Membranrepolarisation bewirkt (Eckert, Naitoh and Machemer, 1976), würden solche Versuche, bei denen der Einfluß von Ba^{2+} auf den Ca^{2+} -Transport untersucht würde, zum Verständnis des Inaktivierungsmechanismus beitragen. Experimente mit der *Paramecium*-Mutante CNR, die nicht rückwärts schwimmen kann infolge der fehlenden Fähigkeit ihrer Membran zur regenerativen Ca^{2+} -Antwort (Takahashi and Naitoh, 1978), könnten einen wichtigen Beitrag zur weiteren Analyse der Ca^{2+} -Transportsysteme von *Paramecium* leisten.

6 Zusammenfassung

Methoden :

1. In der vorliegenden Arbeit wurde der Ca^{2+} -Transport durch die Membran von *P. caudatum* mit Hilfe einer Durchströmungsmethode untersucht, die speziell für diese Untersuchungen entwickelt wurde. Die Methode erlaubt eine kontinuierliche Durchströmung einer Paramecien-Suspension mit radioaktiv markierter bzw. nicht markierter Lösung und eine gleichzeitige extrazelluläre elektrische Reizung der Zellen im Feld alternierender Polarität.
2. Die Ergebnisse, die mit der Methode erzielt wurden, wurden stets mit den unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Registrierungen des Bewegungsverhaltens von Paramecium verglichen und im Einklang mit dem Bewegungsverhalten interpretiert.

Ergebnisse :

1. Ca^{2+} -Aufnahme und -Abgabe wurden als Folge der extrazellulär applizierten Reizspannung gemessen. Die Ca^{2+} -Aufnahme pro Reizperiode nahm mit zunehmender Anzahl der hintereinanderfolgenden Reizperioden ab.
2. Ca^{2+} -Aufnahme und -Abgabe haben ihr Maximum bei 15 °C. Eine Ausnahme ist die erste Reizantwort der Ca^{2+} -Aufnahme, deren Maximum bei 10 °C liegt.
3. Die maximale Ca^{2+} -Aufnahme wurde bei einer Reizspannung von 20 V/cm registriert, während das Maximum der Ca^{2+} -Abgabe bei 36 V/cm gemessen wurde.
4. Die Ca^{2+} -Aufnahme nahm mit der Verlängerung der Reizperiode bis zur Dauer von 30 s zunächst zu, wonach sie in Sättigung ging. Bei weiterer Verlängerung der Reizdauer nahm sie ab.
5. Erhöhung der äußeren K^+ -Konzentration $[\text{K}^+]_o$, bei konstanter

$[Ca^{2+}]_o$ in der Durchströmungslösung und daraus folgendes Anwachsen des Verhältnisses $[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2}$ bewirkten, daß statt einer Ca^{2+} -Aufnahme nach wiederholter Reizung eine Ca^{2+} -Abgabe auftrat.

6. Nach Beendigung der Durchströmungsexperimente wurde in den Paramecien eine aufgenommene Menge Ca^{2+} gemessen, die je nach Temperatur und Reizspannung zwischen 20 und 100 % der Gesamtaufnahme während des Experiments betrug.
7. Bei Temperaturen $< 15^\circ C$ schwammen die Zellen rückwärts und senkrecht zu den Linien des elektrischen Feldes (Reizstärke $\geq 10 V / cm$). Bei $25^\circ C$ schwammen die Zellen vorwärts spiralisierend teils senkrecht und teils parallel zum elektrischen Feld. Dasselbe Phänomen wurde bei erhöhter K^+ -Konzentration ($[K^+]_o / [Ca^{2+}]_o^{1/2} = 10$, bzw. 20) und bei einer Temperatur von $15^\circ C$ registriert.
8. Die Geschwindigkeit des Rückwärtsschwimmens nahm bei niedrigen Temperaturen ($\leq 15^\circ C$) mit der Zeit ab. Diese Abnahme erfolgte schneller bei höheren Reizspannungen.

Interpretation :

1. Mit der Durchströmungsmethode ist es erstmals gelungen, einen erregungsbedingten Ca^{2+} -Einstrom bei Temperaturen $> 0^\circ C$ direkt nachzuweisen. Dieses Ergebnis bestätigt die Ca^{2+} -Einstrom-Hypothese (Eckert, 1972).
2. Die Ergebnisse lassen auf einen permanenten Ca^{2+} -Austausch über der Plasmamembran als Folge eines passiven Ca^{2+} -Einstroms und eines gleichzeitigen aktiven Ca^{2+} -Auswärtstransportes schließen.
3. An der Regulierung der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration sind hauptsächlich ein aktiver Ca^{2+} -Auswärtstransport und die Inaktivierung des Ca^{2+} -Einstrom-Systems beteiligt. Ca^{2+} -Diffusion aus den Cilien in den Zellkörper trägt zur Regulierung der Ca^{2+} -Konzentration in den Cilien bei. Calcium wird möglicherweise im Zellinneren gebunden.

4. Die Abhängigkeit des Ca^{2+} -Transportes von der Reizspannung kann teils aufgrund der wachsenden Ca^{2+} -Permeabilität, teils mit einer schnellen Inaktivierung und durch die Annahme einer spannungsabhängigen Ca^{2+} -Pumpe erklärt werden.
5. Die Berechnung der Ca^{2+} -Pumprate ergibt einen Wert, der ca. eine Größenordnung über der Na^{+} -Pumprate bei menschlichen Erythrozyten liegt.

7 Anhang

Eine Reihe methodischer Schwierigkeiten machten die getrennte Messung verschiedener Eigenschaften des Durchflußsystems vor allem der Versuchskammer nötig. Im folgenden sind die Ergebnisse und Konsequenzen dieser Messungen zusammengefaßt und erläutert.

Ein Modell zur Berechnung des effektiven Spannungsabfalls über die Membran von Paramecium während der extrazellulären elektrischen Reizung ist im Abschnitt 7.5 dieses Kapitels dargestellt. Die Auswirkungen dieses Modells auf die Interpretation der Meßergebnisse wurden in der Diskussion (s. Abschnitt 4.2) besprochen.

Außerdem werden die Berechnungen der Anzahl der Ca^{2+} -Bindungsstellen an der Membran von Paramecium, der kritischen Grenzkonzentration für die Auslösung der Cilienschlagumkehr sowie der Ca^{2+} -Diffusion zwischen den Cilien und dem Zellkörper mit Hilfe der aus der Literatur übernommenen Versuchsergebnisse durchgeführt.

7.1 Berechnung der auftretenden Zentrifugalkraft beim Waschen der Zellen

Um die Zellausbeute beim Waschen zu vergrößern und den Waschvorgang selbst zu beschleunigen, wurden die Zellen vor dem Waschvorgang von der überflüssigen Nährlösung durch Zentrifugieren abgetrennt. Dazu wurde eine kleine Laborzentrifuge (UJ 1, Heraeus Christ GmbH) benutzt.

Radius des Zentrifugenrotors $r = 15,5 \text{ cm}$. Zellsuspensionen wurden ständig bei ca. 10^3 U/min zentrifugiert. Mit der Gl. (4) ergibt sich daraus :

$$\begin{aligned} n \cdot m \cdot g &= m \cdot \omega^2 \cdot r & (4) \\ n &= \frac{\omega^2 \cdot r}{g} \\ n &= \frac{(16,67)^2 \cdot (6,28)^2 \cdot 15,5 \cdot 10^{-2}}{9,81} = 173 \end{aligned}$$

$$r = 15,5 \cdot 10^{-2} \text{ m}$$

$$\omega = 10^3 \text{ U/min} = 16,67 \cdot 2\pi \text{ s}^{-1} = 16,67 \cdot 6,28 \text{ s}^{-1}$$

$$g = 9,81 \text{ ms}^{-2}$$

$$n = \text{Anzahl von } g$$

Die Zentrifugalkraft betrug damit ca. 170 g.

7.2 Bestimmung des Proteingehalts der Zellen nach Lowry

Der Proteingehalt von *Paramecium caudatum* wurde bestimmt, um die Anzahl der Ca^{2+} -Bindungsstellen an der Zellmembran von *Paramecium* aufgrund einiger Ergebnisse von Naitoh und Yasumasu (1967) berechnen zu können (vergl. Abschnitt 7.6).

Zur Bestimmung des Proteingehalts mit Hilfe des Lowry-Tests für unlösliche Proteine (Lowry et al., 1951) wurde Rinderserumalbumin als Standard genommen. Die Eichkurve ist in Abb. 27 dargestellt. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert aus zwei Messungen gegen Nullprobe. Da die berechnete Meßkurve (gestrichelte Gerade) nicht durch den Nullpunkt geht, wurde die Eichkurve (volle Gerade) durch Parallelverschiebung der Meßkurve durch den Koordinatenursprung erhalten. Die Pfeile an der Ordinate zeigen die Extinktion an, die der entsprechenden Menge von Zellproteinen entspricht. Mit den drei gebrauchten Zellproben erhielt man einen Wert von $(56 \pm 4) \mu\text{g}/10^3$ Zellen. Direktes Wägen ergab einen Kontrollwert von $60 \mu\text{g}/10^3$ Zellen.

7.3 Bindungskonkurrenz zwischen Ca^{2+} und K^+ an der Oberfläche verschiedener Materialien

Die Bindungskonkurrenz zwischen Ca^{2+} und K^+ wurde auf der Oberfläche von zwölf verschiedenen Materialien untersucht. Fünf dieser Materialien (Nuclepore-Filter, Silikonschlauch , Glas, Plexiglas und Platin) wurden beim Aufbau des Durchflußsystems mit der Versuchskammer verwendet. Der Grund für diese Untersuchung ergab sich aus dem Versuch, Ca^{2+} -Aufnahme bzw. -Abgabe als Folge chemischer Reizung der Zellen mit erhöhter K^+ -Konzentration

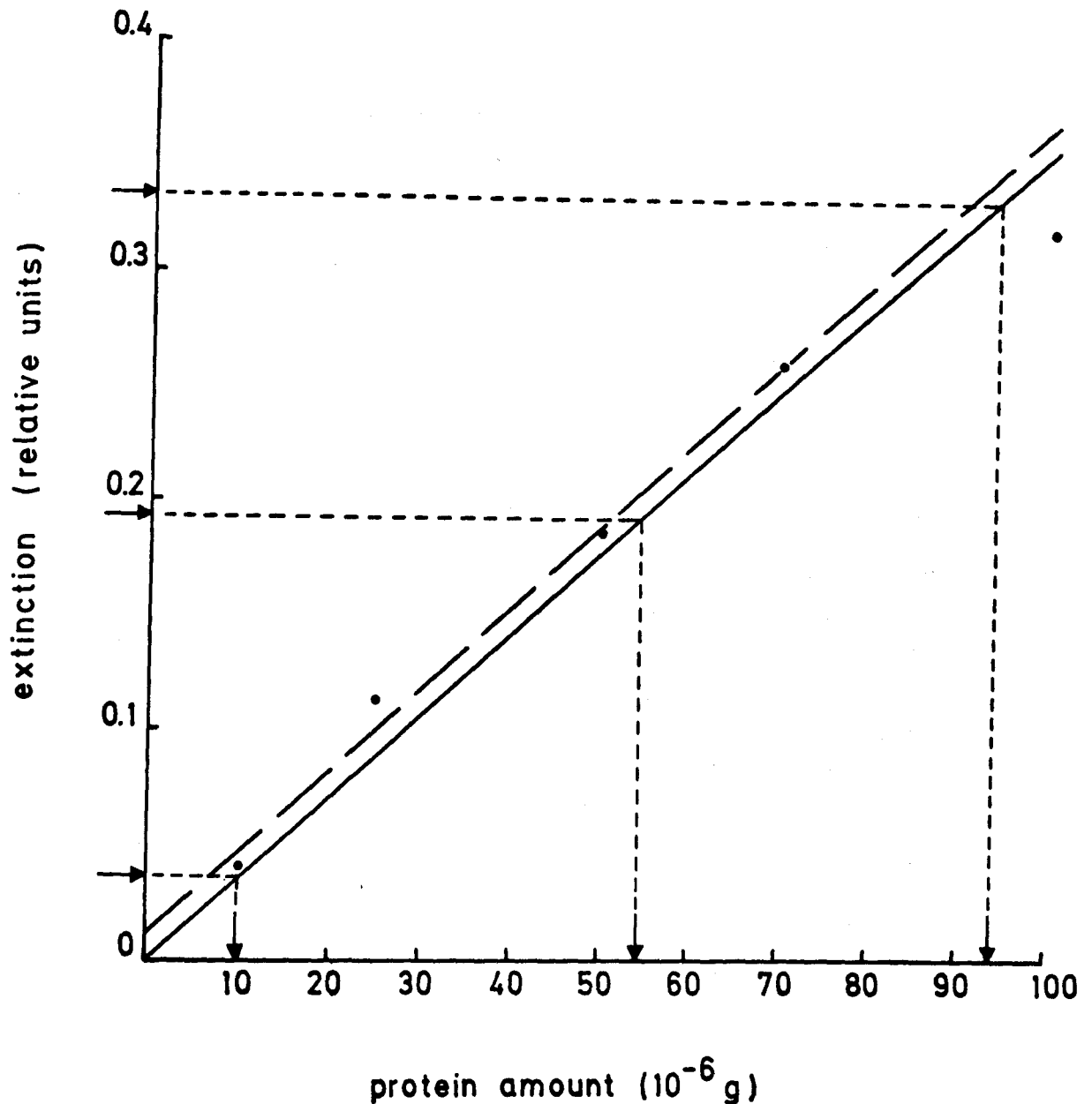


Abb. 27 Eichkurve zur Bestimmung des Proteingehalts von *Paramecium caudatum* nach Lowry (18 000 Zellen/ml).
Die einzelnen Meßpunkte stellen die Meßwerte für den Standard (Rinderserumalbumin) dar. Die gestrichelte Gerade wurde mit Hilfe der Fehlerquadratmethode aus diesen Meßwerten (ausgen. den Meßpunkt für 100 μ g Protein) berechnet. Die volle Gerade stellt die Eichkurve dar, nach der die Proteinmasse von *Paramecium* bestimmt wurde (s. Text).
Abszisse : Proteinmasse in μ g .
Ordinate : Extinktion bei der Lichtwellenlänge von 750 nm.

(10 mM/l) zu messen (vgl. Abschnitt 2.2.1).

Zur Bestimmung der Bindungskonkurrenz wurden je 5 Proben in 2 ml radioaktiv markierter Lösung bei Zimmertemperatur ca. 60 min inkubiert. Bei der anderen Gruppe von je 5 Proben wurden während der Inkubation zu jeder Probe 20 µl einer 1000 millimolaren KCl - Lösung zugegeben. Wegen besserer Vermischung wurden alle Proben einige Minuten mit Hilfe eines Heidolph-Schüttlers kräftig geschüttelt. Alle Proben, mit Ausnahme des Silikonschlauchs, hatten entweder die Form eines quadratischen oder runden Plättchens mit der Gesamtoberfläche von ca. 300 mm². Die Ergebnisse sind in Abb. 28 dargestellt.

Von den verwendeten Materialien haben Platin und Plexiglas bezüglich der untersuchten Bindungskonkurrenz sehr gute Eigenschaften. Im Vergleich zu Millipore-Filtern haben Nuclepore-Filter gute Eigenschaften. Obwohl sie in Bezug auf die Bindungskonkurrenz zwischen Ca²⁺ und K⁺ schlechte Eigenschaften besitzen, sind die Silikonschläuche für die Durchflußmethode in der bestehenden Form unentbehrlich. Glas könnte im Durchflußsystem durch Quarzglas ersetzt werden. Da aber die Methode der elektrischen Reizung vom Kationenaustausch auf den Oberflächen sämtlicher Teile des Flußsystems unabhängig ist und die verwendeten Materialien sich während der Arbeit als vorteilhaft erwiesen haben, wurden keine Veränderungen im Aufbau des Flußsystems vorgenommen.

7.4 Stromdichte und Widerstand der Versuchskammer

Der Widerstand der Versuchskammer und die dazugehörige Stromdichte wurden auf die in Abschnitt 2.2.2 beschriebene Weise bestimmt. Temperatur- und Spannungsabhängigkeit beider Größen sind in den Abb. 29 und 30 dargestellt.

Da sich die Leitfähigkeit von Lösungen um etwa 2 % je Grad ändert (Moelwyn-Hughes, 1970), ändert sich die Stromdichte in der Lösung und folglich auch der Versuchskammerwiderstand dementsprechend mit der Temperatur ($i_v = K \cdot E$). Die Spannungsabhängigkeit der Stromdichte zeigt eine Ohm'sche Charakteristik im gewählten Spannungsbereich (Abb. 29 b). Die explizite Darstellung der Spannungs-

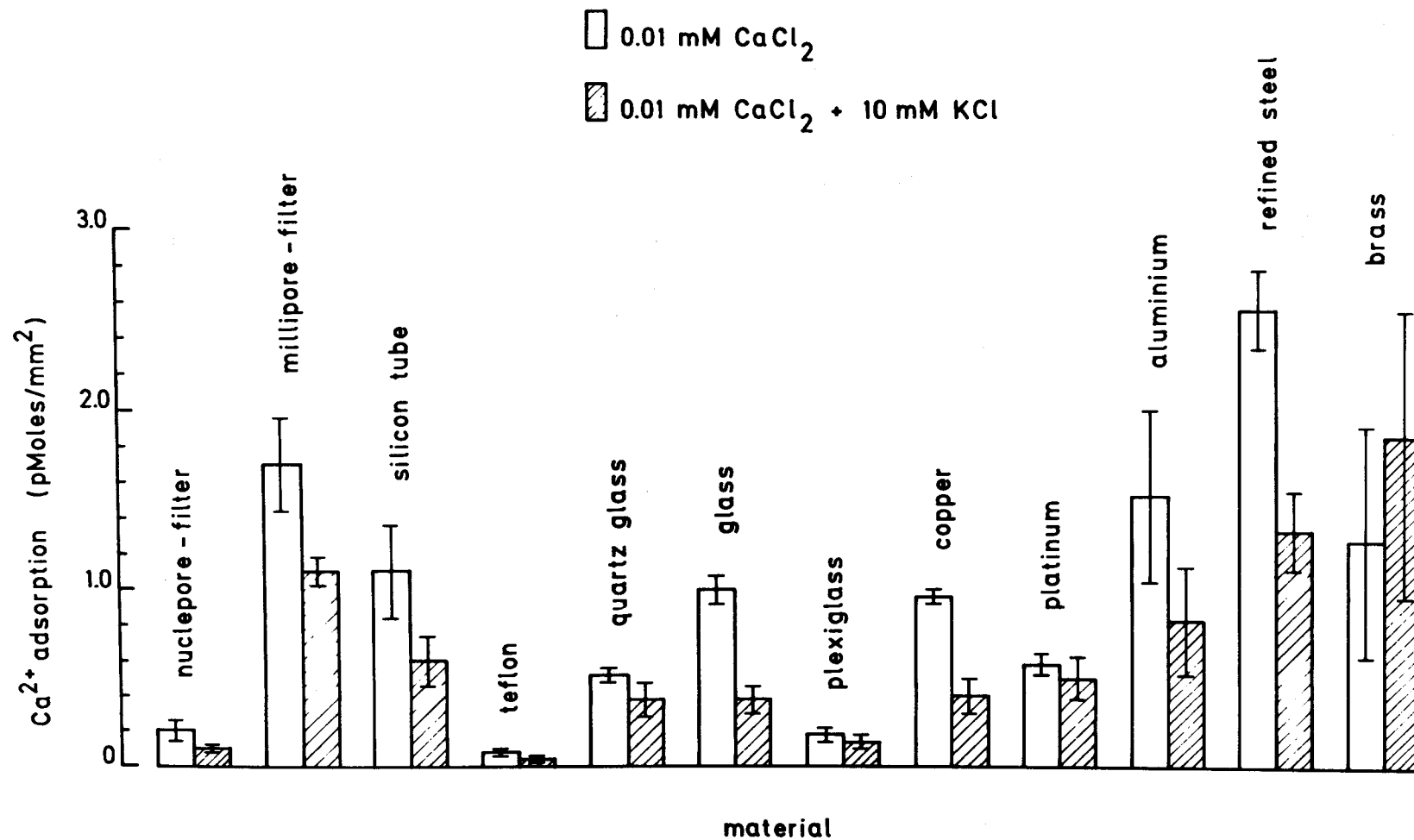


Abb. 28 Bindungskonkurrenz zwischen K^+ und Ca^{2+} auf der Oberfläche verschiedener Materialien. Mittelwert $\pm$ S.D. aus 5 Messungen.

abhängigkeit des Versuchskammerwiderstandes läßt aber kleine Abweichungen vom Ohm'schen Verhalten erkennen (Abb. 30 b). Da das für die Versuche verwandte elektrische Feld pulsartig appliziert wurde, sind kleine Konzentrationsänderungen in der Nähe der Elektroden infolge Elektrolyse nicht vollkommen auszuschließen.

Der mittlere Wert des Versuchskammerwiderstands bei 15 °C kann nach der Kurve (Abb. 30 b) mit ca. 1,8 k Ω angegeben werden. Der spezifische Widerstand der Elektrolytlösung beträgt damit ca. 3,6 k Ω cm ($\rho = R_v \frac{S}{l}$).

7.5 Effektiver Spannungsabfall über der Membran von Paramecium

Mit Hilfe eines Modells, das in Abb. 31 a veranschaulicht ist, kann der effektive Spannungsabfall über der Zellmembran von Paramecium grob abgeschätzt werden. Zwei ausgezeichnete Schwimmlagen in Bezug auf die Feldlinienrichtungen stellen die extremen Ausrichtungen der Zelle im alternierenden elektrischen Feld dar. Zusammen mit der Größe der Zelle bestimmen sie die Abmessungen der Lösungsschicht, in der sich die einzelne Zelle bewegt. Wenn der spezifische Widerstand der Lösung bekannt ist, kann der Widerstand der betreffenden Schicht folgendermaßen berechnet werden :

$$R_X = \rho_s \frac{l}{S_X} \quad (5)$$

$$S_{X1} = L \cdot b \quad (6)$$

$$S_{X2} = b^2 \quad (7)$$

ρ_s = spezifischer Widerstand der Elektrolytlösung bei 15 °C

l = Länge der Versuchskammer

L = Länge eines Parameciums (ca. 200 μ m)

b = Breite eines Parameciums (ca. 60 μ m)

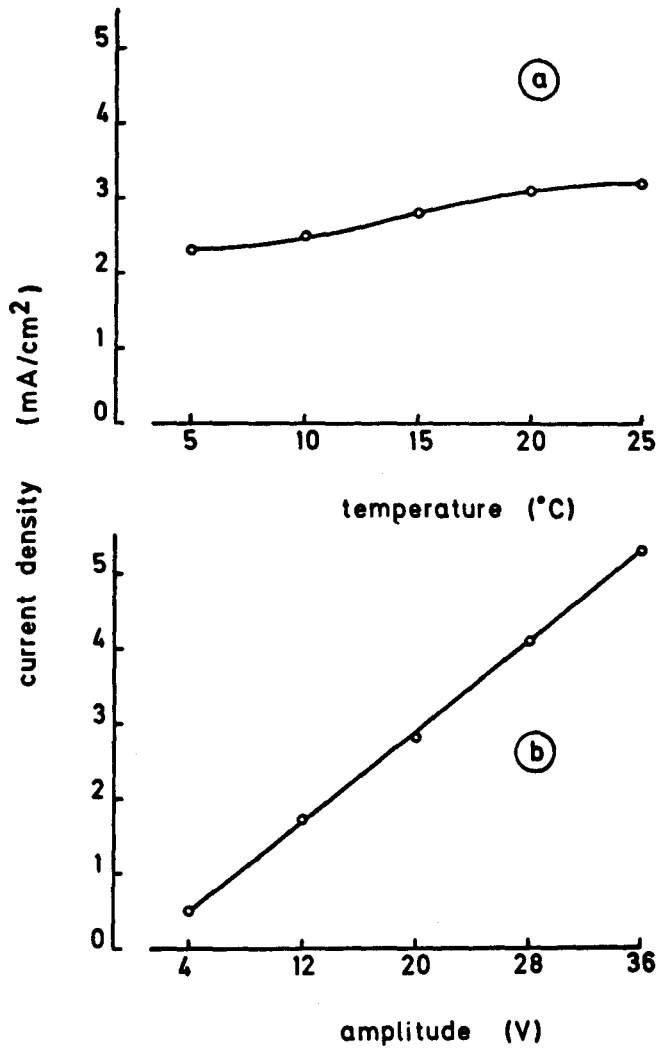
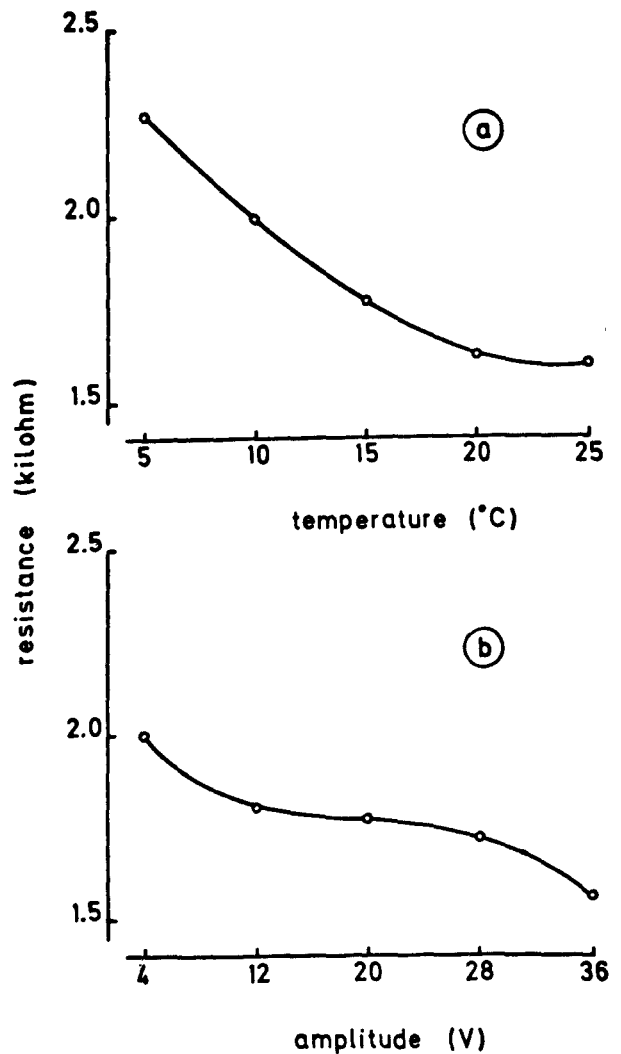


Abb. 29 Temperatur- und Spannungsabhängigkeit der Stromdichte in der Versuchskammer.

Zusammensetzung der Elektrolytlösung : 0,1 mM CaCl_2 , 1 mM Tris/HCl, pH = 7,2. Meßpunkte stellen Mittelwerte aus 3 Messungen dar.
a) Spannung = 20 V (entspr. 20 V / cm), b) Temperatur = 15 °C.

Abb. 30 Temperatur- und Spannungsabhängigkeit des Versuchskammerwiderstandes. Sonstige Angaben zu den Bildern wie in Abb. 29.



Nach dem Ersatzschaltbild (Abb. 31 b) folgt :

$$\frac{U_p}{U_o} = \frac{R_p}{R_p + R_X}$$

$$U_p = U_o \frac{R_p}{R_p + R_X} \quad (8)$$

U_p = Spannungsabfall an der Membran von Paramecium

U_p ist jedoch noch nicht der effektive Spannungsabfall an der Zellmembran, denn diese hat Eigenschaften eines Tiefpasses und ist charakterisiert durch die Zeitkonstante $\tau = R_p \cdot C_p$.

$R_p = 67 \text{ M}\Omega$ (Naitoh and Eckert, 1968). Da die spezifische Membrankapazität ca. $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Eckert, 1972) und die totale Membranoberfläche eines Parameciums $10,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ (Machemer and de Peyer, 1977) betragen, ergibt sich die Gesamtmembrankapazität zu $1,05 \text{ nF}$. Damit erhält man eine Membranzeitkonstante von ca. 70 ms . Der effektive Spannungsabfall an der Zellmembran U_p^* kann nun mit Hilfe der Gl. (9) berechnet werden :

$$U_p^* = U_p \cdot [1 - \exp (-t/\tau)] \quad (9)$$

t = Pulsdauer (10 ms)

τ = Membranzeitkonstante (70 ms)

Wenn die Werte für t und τ in die Gl. (9) eingesetzt werden, erhält man folgende Beziehung zwischen U_p^* und U_p :

$$U_p^* = 0,13 U_p \quad (10)$$

Fallunterscheidung :

1. Paramecium schwimmt senkrecht zu den Linien des elektrischen Feldes.

$$R_{X1} = \oint_S \frac{1}{S_{X1}}$$

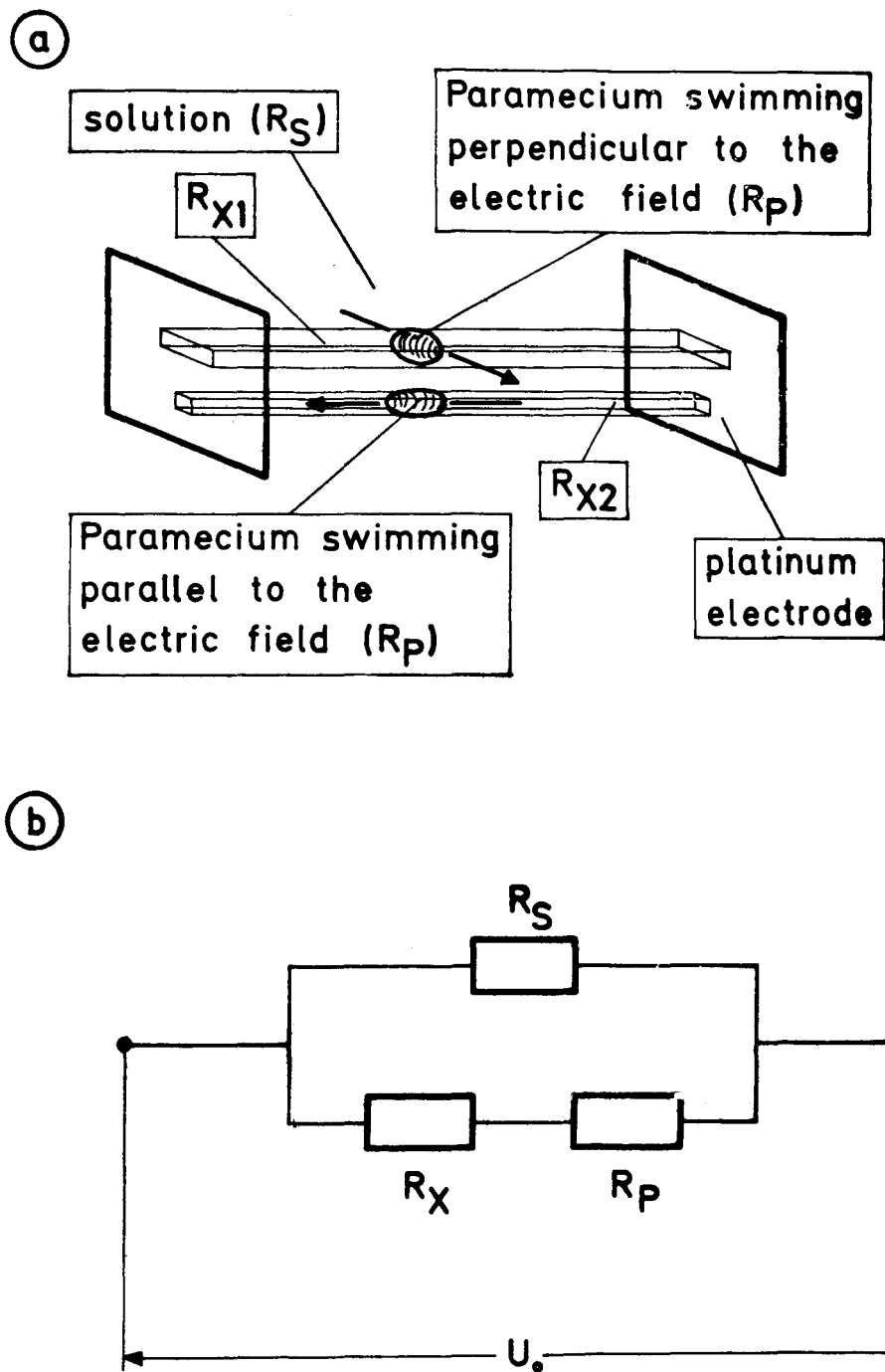


Abb. 31 a) Modell zur Berechnung des effektiven Spannungsabfalls an der Membran von Paramecium.
b) Ersatzschaltbild nach dem Modell in a). R_S = Widerstand der Lösung, R_p = Membranwiderstand, R_X = Widerstand der Lösungsschicht, U_0 = angelegte Spannung.

$$R_{X1} = 3 \cdot 10^9 \Omega$$

$$\begin{aligned} \ell_s &= 3,6 \cdot 10^3 \Omega \text{ cm} \\ l &= 1 \text{ cm} \end{aligned}$$

$$S_{X1} = 1,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ (Gl.6)}$$

Durch den Einsatz in die Gl. 8 erhält man :

$$U_P = U_0 \frac{6,7 \cdot 10^7}{6,7 \cdot 10^7 + 3 \cdot 10^9} = 0,02 U_0$$

Die Gl. 10 ergibt letztlich :

$$U_P^* = 0,13 U_P = 0,0026 U_0 \quad (11)$$

Beispiel : $U_0 = 20 \text{ V}$

$$\underline{U_P^* = 52 \text{ mV}}$$

2. Paramecium schwimmt parallel zu den Linien des elektrischen Feldes.

$$R_{X2} = \ell_s \frac{1}{S_{X2}}$$

$$S_{X2} = 3,6 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ (Gl.7)}$$

$$R_{X2} = 10^{10} \Omega$$

Die Gl. 10 und 8 führen zum folgenden Ausdruck :

$$U_P^* = 0,13 U_P = 0,13 \cdot 0,007 U_0 = 0,0009 U_0 \quad (12)$$

Beispiel : $U_0 = 20 \text{ V}$

$$\underline{U_P^* = 18 \text{ mV}}$$

Diese Werte geben die Spannung wieder, die an der Plasmamembran von Paramecium die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle aktiviert und damit den erregungsbedingten Ca^{2+} -Einstrom verursacht. In der Diskussion wird die Auswirkung der unterschiedlichen Spannungsabfälle über der Plasmamembran infolge verschiedener Ausrichtungen der Zelle im elektrischen Feld in Bezug auf den Ca^{2+} -Transport durch die Membran erörtert (vgl. Abschnitt 4.2).

7.6. Anzahl der Ca^{2+} - Bindungsstellen an der Zellmembran von Paramecium caudatum

Nach den Ergebnissen von Naitoh und Yasumasu (1967) beträgt die totale Ca^{2+} -Bindungskapazität (PCa_2^1) von 1 mg Paramecium-Trockengewicht ca. $7,5 \cdot 10^{-10} \text{ M Ca}^{2+}$. Dieser Wert kann mit Hilfe der Abb. 32 berechnet werden. In der Abbildung ist das Ergebnis der Untersuchung der antagonistischen Wirkung verschiedener Kationen bezüglich der Ca^{2+} -Bindung auf der Außenseite der Membran von lebendem Paramecium dargestellt. Auf der Abszisse sind verschiedene Verhältnisse zwischen den monovalenten bzw. bivalenten Kationen und Ca^{2+} aufgetragen. Auf der Ordinate befinden sich die reziproken Werte für die durch 1 mg Paramecium-Trockengewicht gebundene Menge $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in $(\text{cpm})^{-1}$. Der Schnittpunkt aller dargestellten Geraden mit der Ordinate ergibt den reziproken Wert der totalen Ca^{2+} -Bindungskapazität ($(\text{PCa}_2^1)^{-1}$) auf der Membran von 1 mg Paramecien. Aus der Ca^{2+} -Konzentration des Mediums (1 mM/1) mit der bekannten spezifischen Radioaktivität ($10 \mu\text{Ci/ml}$) kann die totale Bindungskapazität folgendermaßen berechnet werden :

Spezifische Aktivität der Lösung = $10 \mu\text{Ci/ml} = 2,22 \cdot 10^7 \text{ cpm/ml}$
 Calcium-Konzentration = 1 mM/1 CaCl_2
 Daraus ergibt sich : $2,22 \cdot 10^7 \text{ cpm}/\mu\text{M Ca}^{2+}$.

(PCa_2^1) ergibt sich aus der Abb. 32 zu :

$$\frac{1}{\text{PCa}_2^1} = 6 \cdot 10^{-5} / \text{cpm} \quad \text{oder} \quad \text{PCa}_2^1 = 1,67 \cdot 10^4 \text{ cpm}$$

Damit erhält man nach der Umrechnung :

$$\text{PCa}_2^1 = \frac{1,67 \cdot 10^4}{2,22 \cdot 10^7} \cdot 10^{-6} = 7,5 \cdot 10^{-10} \text{ M Ca}^{2+} / \text{mg Trockengew.}$$

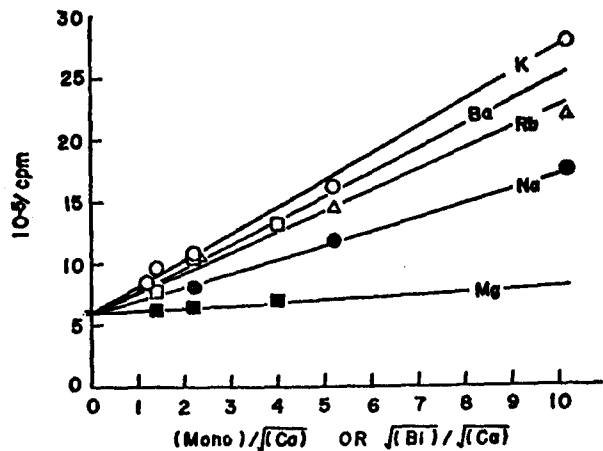


Abb. 32 Effects of various coexisting ions in the equilibrium medium (O, K⁺; Δ, Rb⁺; ●, Na⁺; □, Ba⁺⁺; ■, Mg⁺⁺) on the binding of ⁴⁵Ca⁺⁺ by live *P. caudatum*. Abscissa represents the ratio, [monovalent ion]/√[Ca⁺⁺] or √[bivalent ion]/√[Ca⁺⁺]. Ordinate represents the reciprocal value of the counts per minute from the ⁴⁵Ca⁺⁺ bound by 1 mg dry weight of *Paramecium*. See text for discussion.

(nach Naitoh and Yasumasu, 1967).

Da das Trockengewicht von 10³ Zellen ca. 56 μg beträgt (entspricht ca. 18 000 Zellen/mg Trockengewicht) (vergl. Abschnitt 7.2), ergeben sich daraus :

$$\frac{7,5 \cdot 10^{-10} \text{ M Ca}^{2+}/\text{mg}}{18 \text{ 000 Zellen/mg}} = \underline{4,2 \cdot 10^{-14} \text{ M Ca}^{2+}/\text{Paramecium}}$$

oder nach Multiplikation mit der Loschmidt'schen Zahl (6 · 10²³ Ca²⁺/M) 2,5 · 10¹⁰ Ca²⁺/Paramecium.

Dieser Wert stellt die Anzahl der Ca²⁺-Bindungsplätze auf der Außenseite der Plasmamembran von einem Paramecium dar.

7.7. Kritische Grenzkonzentration [Ca²⁺]_i krit. im intraciliären Raum für die Auslösung der Cilienschlagumkehr

Unter der Annahme, daß ausschließlich die ciliäre Membran, die etwa 2/3 (Eckert and Naitoh, 1970) der gesamten Membranoberfläche von Paramecium ausmacht, via Ca²⁺-Einstrom zur regenerativen Ca²⁺-Antwort beiträgt, hat Eckert (1972) die minimale dazu notwendige Anzahl der Ca²⁺ berechnet.

Wenn die spezifische Membrankapazität 10⁻⁶ F/cm² beträgt, dann ist die Kapazität der Membran eines Ciliums gleich 6 · 10⁻¹⁴ F.

Damit diese Kapazität um 1 mV umgeladen wird, braucht man $6 \cdot 10^{-17} \text{ C}$ ($Q = C \cdot U$) oder $3 \cdot 10^{-22} \text{ M Ca}^{2+}$. Bezogen auf das Volumen eines Ciliums ($3 \cdot 10^{-16} \text{ l}$; Eckert, 1972) entspricht diese Ca^{2+} -Menge einer Erhöhung der intraciliären Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-6} M/l . Diese Konzentration reicht aus, um Cilienschlagumkehr auszulösen (Naitoh and Kaneko, 1972).

Bei dieser Berechnung wurde weder Ca^{2+} -Diffusion zwischen Cilium und Zellkörper, noch der Kurzschlußstrom durch den K^+ -Ausstrom berücksichtigt. Die entsprechende Korrektur würde zu höheren Werten der intraciliären Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung führen. Eckerts Berechnung stellt also den minimalen Wert dar.

7.8 Ca^{2+} -Diffusion zwischen Cilium und Zellkörper

Für den Fall einer räumlich isotropen und isothermen Diffusion gilt bei Beschränkung auf eine Raumrichtung:

$$j = -D \frac{dc}{dx} \quad (\text{1. Ficksches Gesetz})$$

Die Dimensionen werden folgendermaßen gewählt:

$$\begin{aligned} j &= \text{Ionenflußdichte} \quad (\text{Ionen/cm}^2 \cdot \text{s}) \\ c &= \text{Konzentration} \quad (\text{Ionen/cm}^3) \\ D &= \text{Diffusionskoeffizient} \quad (\text{cm}^2/\text{s}) \end{aligned}$$

Im konkreten Fall der Ca^{2+} -Diffusion zwischen Cilium und Zellkörper kann die Diffusionsgleichung in nichtdifferentieller Form geschrieben werden:

$$j = -D_{\text{Ca}} \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cilium}} - [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zellkörper}}}{\Delta x}$$

(Weitere Angaben s. Hook, 1979).

$$\Delta x = l_c/2 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ cm} \quad (l_c = \text{Länge eines Ciliums})$$

Für kleine Zeiten, d.h. am Anfang einer Reizung gilt:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zellkörper}} \ll [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cilium}}$$

Der tabellarische Wert für den Ca^{2+} -Diffusionskoeffizient beträgt $D_{\text{Ca}} = 1,3 \cdot 10^{-5} \text{ (cm}^2/\text{s)}$.

Für eine Membrandepolarisation von 50 mV braucht man $3 \cdot 10^{-22} \text{ M}(\text{Ca}^{2+}/\text{mV}) \cdot 50 \text{ mV} = 150 \cdot 10^{-22} \text{ M Ca}^{2+} = 1,5 \cdot 10^{-20} \text{ M Ca}^{2+}$ pro Cilium (vergl. Abschnitt 7.7). Bezogen auf das Volumen eines Ciliums ($3 \cdot 10^{-16} \text{ l}$; Eckert, 1972) ergibt das eine intraciliäre Ca^{2+} -Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{ M/l} = 5 \cdot 10^{-8} \text{ M/cm}^3$. Daraus ergibt sich eine Ionenflußdichte, die durch Diffusion zwischen Cilium und Zellkörper infolge einer einmaligen Membrandepolarisation von 50 mV hervorgerufen wird, von :

$$\begin{aligned} |j| &= D_{\text{Ca}} \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cilium}}}{\Delta x} \\ &= 1,3 \cdot 10^{-5} \text{ (cm}^2/\text{s)} \frac{5 \cdot 10^{-8} \text{ M/cm}^3}{5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}} \\ |j| &= 1,3 \cdot 10^{-9} \text{ M/cm}^2 \cdot \text{s.} \end{aligned}$$

Da die Gesamtquerschnittsfläche von 15 000 Cilien ca. $4,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2$ beträgt, ergibt sich damit durch die Diffusion zwischen den Cilien und dem Zellkörper ein Ionenfluß pro Paramecium von ca. $6 \cdot 10^{-15} \text{ M/s}$. Da keine Ca^{2+} -Bindung im Inneren der Zelle angenommen wurde, ist der geschätzte Wert ein Maximalwert.

7.9 Na^+ -Pumprate bei menschlichen Erythrozyten.

Cavieres (1977) hat an menschlichen Erythrozyten in Gegenwart von 10 mM/l K^+ im Außenmedium einen Na^+ -Auswärtstransport von ca. $1,8 \text{ mM/l} \cdot \text{Erythrozyt} \cdot \text{Stunde}$ gemessen. Da Volumen eines menschlichen Erythrozyten zwischen 82 und $92 \mu^3$ beträgt (Kaboth und Begemann, 1971), entspricht das einer Na^+ -Pumprate pro Erythrozyt von ca. $4,4 \cdot 10^{-20} \text{ M Na}^+/\text{Erythrozyt} \cdot \text{s}$. Die Membranoberfläche eines Erythrozyten beträgt ca. $120 \mu^2$ (Durchmesser = $7,5 \mu$ und Dicke = $2,0 \mu$; Kaboth und Begemann, 1971). Daraus ergibt sich eine Na^+ -Pumprate bezogen auf 1 cm^2 der Membranoberfläche von ca. $3,6 \cdot 10^{-14} \text{ M Na}^+/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$ oder nach der Multiplikation mit der Loschmidt'schen Zahl ($6 \cdot 10^{23} \text{ l/M}$) von ca. $2 \cdot 10^{10} \text{ Na}^+/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$.

8 Literatur-Verzeichnis

- Bozler, E. (1924): Über die Morphologie der Ernährungsorganellen und die Physiologie der Nahrungsaufnahme von *Paramecium caudatum*. *Ehrb. Arch. f. Protistenk.* 49, 163-215
- Brehm, P. and Eckert, R. (1978): Calcium entry leads to Inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 202, 1203-1206
- Browning, J.L. and Nelson, D.L. (1976): Biochemical studies of the excitable membrane of *Paramecium aurelia*. I. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fluxes across resting and excited membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 448, 338-351
- Campbell, R.C. (1971): Statistische Methoden für Biologie und Medizin. Georg Thieme Verl., Stuttgart
- Cavieres, J.D. (1977): The sodium pump in human red cells. In: *Membrane transport in red cells*, Academic Press, London, New York, San Francisco
- Dryl, S. (1958): Photographic registration of movement of Protozoa. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol.* 6, 429-430
- Dunlap, K. (1977): Localisation of calcium channels in *Paramecium caudatum*. *J. Physiol. (Lond.)* 271, 119-133
- Eckert, R. (1972): Bioelectric control of ciliary activity. *Science* 176, 473-481

- Eckert, R. and Brehm, P. (1979): Ionic mechanisms of excitation in Paramecium. *Ann. Rev. Biophysics and Bioengineering* 8, 353
- Eckert, R. and Naitoh, Y. (1970): Passive electrical properties of Paramecium and problems of ciliary coordination. *J. gen. Physiol.* 55, 467-483
- Eckert, R., Naitoh, Y. and Machemer, H. (1976): Calcium in the bioelectric and motor functions of Paramecium. In: *Calcium in biological systems* (C.J. Duncan, ed.), 233-255, Cambridge Univ. Press, Cambridge, London, New York, Melbourne
- Ferguson, M.L. (1957): Photographic technique for quantitative studies of Paramecium and other motile cells. *Physiol. Zool.* 30, 208-215
- Frisch, J.A. (1937): The rate of pulsation and the function of the contractile vacuole in *Paramecium multimicronucleatum*. *Arch. f. Protistenk.* 90, 123-161
- Grell, K.G. (1968): *Protozoologie*, 2. Aufl., Springer-Verl., Berlin, Heidelberg, New York
- Hausmann, G. (1927): Über die Bewegungen einiger ciliater Protozoen in Wechselstrom. *Biol. Generalis* 3, 463-474
- Hildebrand, E. (1975): Significance of the competition between calcium and other cations for the conductivity control in sensory membranes. *Verl. Dtsch. Zool. Ges.* 1974, 24-28

- Hildebrand, E. (1978): Die Funktion von Calcium bei der Erregung der Cilienmembran von Protozoen. Habilitationsschrift, Math.-Naturwiss. Fakultät der RWTH Aachen
- Hildebrand, E. (1978a): Ciliary reversal in Paramecium: Temperature dependence of K^+ -induced excitability decrease and of recovery. J. comp. Physiol. 127, 39-44
- Hildebrand, E. and Dryl, S. (1976): Membrane controlled ciliary reversal in Paramecium. Calcium influx or release from cellular binding sites? Bioelectrochem. Bioenerg. 3, 543
- Hook, C. (1979): Membranerregbarkeit und Bewegungsverhalten von Paramecium caudatum. Eine Modellanalyse. Dissertation an der Math.Naturwiss. Fakultät der RWTH Aachen
- Hook, C. and Hildebrand, E. (1979): Excitation of Paramecium. A model analysis: J. Math. Biol. 8, 197-214
- Jacquez, J.A. (1972): Compartmental analysis in biology and medicine. Elsevier Amsterdam
- Jahn, T.L. (1961): The mechanism of ciliary movement. I. Ciliary reversal and activation by electric current; the Ludloff phenomenon in terms of core and volume conductors. J. Protozool. 8, 369-380
- Jennings, H.S. (1906): Behaviour of the lower organisms. Columbia Univ. Press, New York

- Kaboth, W. and Begemann, H. (1971): Blut. In: Physiologie des Menschen, Bd. 5. Urban und Schwarzenberg
- Kamada, T. (1931): Polar effect of electric current on the ciliary movements of Paramecium. J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo, sect. IV, 2, 285-288
- Kinosita, H. (1936): a. Time-intensity relation of the cathodal galvanic effect in Paramecium. b. Electric extitation and electric polarization in Paramecium. J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo, sect. IV, 4, 155-163
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. J. comp. Biol. Chem. 193, 265
- Machemer, H. (1974): Frequency and directional responses of cilia to membrane potential changes in Paramecium. J. comp. Physiol. 92, 293-316
- Machemer, H. and de Peyer, J. (1977): Swimming sensory cells: Electrical membrane parameters, receptor properties and motor control in ciliated Protozoa. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1977, 86-110, Gustav Fischer Verl., Stuttgart
- Mast, S.O. (1947): The food-vacuole in Paramecium. Biol. Bull. 92, 31-72
- Moelwyn-Hughes, E.A. (1970): Physikalische Chemie, Georg Thieme Verl., Stuttgart

- Naitoh, Y. (1968): Ionic control of the reversal response of cilia in *Paramecium caudatum*. A calcium Hypothesis. J. gen. Physiol. 51, 85-103
- Naitoh, Y. and Eckert, R. (1968): Electrical properties of *Paramecium caudatum*: Modification by bound and free cations. Z. vergl. Physiol. 61, 427-452
- Naitoh, Y. and Eckert, R. (1969): Ionic mechanisms controlling behavioural responses of *Paramecium* to mechanical stimulation. Science 164, 963-965
- Naitoh, Y. and Kaneko, H. (1972): Reactivated Triton-extracted models of *Paramecium*: Modification of ciliary movement by calcium ions. Science 176, 523-524
- Naitoh, Y. and Yasumasu, I. (1967): Binding of Ca ions by *Paramecium caudatum*. J. gen. Physiol. 50, 1303-1310
- Naitoh, Y., Eckert, R. and Friedman, K. (1972): A regenerative calcium response in *Paramecium*. J. exp. Biol. 56, 667-681
- Ogura, A. and Takahashi, K. (1976): Artificial deciliation causes loss of calcium-dependent response in *Paramecium*. Nature 264, 170-172
- Párducz, B. (1959): Reizphysiologische Untersuchungen an Ciliaten VIII. Ablauf der Fluchtreaktion bei allseitiger und anhaltender Reizung. Ann. hist.-nat. Mus. nat. Hung. 51, 227-246

- Satir, P. (1968): Studies an cilia III. J. cell. Biol. 39, 77-94
- Scheminzky, F. (1924): Versuche über Elektrotaxis und Elektronarkose.
Pflügers Arch. 202. Bd., Heft 1/2
- Statkewitsch, P. (1904): Galvanotropismus und Galvanotaxis. Erste
Mitteilung. Z. f. allg. Physiol. 4. Bd., 2. und 3. Heft,
296-352
- Takahashi, M. and Naitoh, Y. (1978): Behavioural mutants of Para-
mecium caudatum with defective membrane electrogenesis.
Nature 271, 656-659