



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

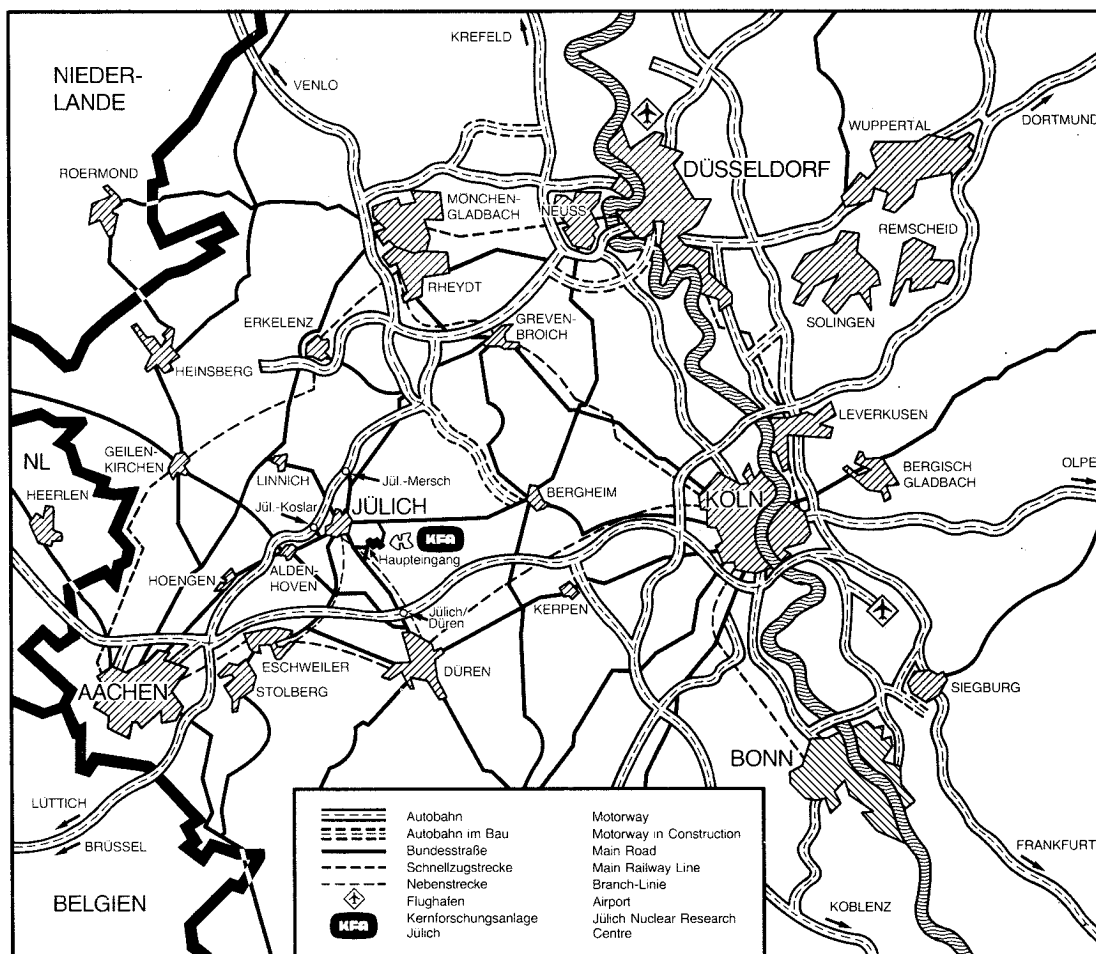
Institut für Neurobiologie

**Der spannungsabhängige Einwärtsstrom
von Paramecium caudatum
(Ciliata, Protozoa) und seine kompetitive
Hemmung durch zweiwertige Kationen.
Experimente mit der voltage clamp-Methode.**

von

F. Wehner

Jül - 1879
November 1983
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 1879

Institut für Neurobiologie Jül – 1879

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 024 61/610 · Telex: 833 556-0 kf d

**Der spannungsabhängige Einwärtsstrom
von Paramecium caudatum
(Ciliata, Protozoa) und seine kompetitive
Hemmung durch zweiwertige Kationen.
Experimente mit der voltage clamp-Methode.**

von

F. Wehner

D 82 (Diss. T. H. Aachen)

Inhaltsverzeichnis:

Summary	IV
1 Einleitung	Seite 1
2 Material und Methoden	9
2.1 Versuchsobjekt	9
2.1.1 Zellkulturen	9
2.1.2 Reinigung der Zellsuspension	9
2.1.3 die verwendeten Zellen	9
2.2 Versuchsapparatur	10
2.2.1 mechanischer Aufbau	11
2.2.2 Versuchskammer	14
2.2.3 Optik	15
2.2.4 Flußsystem und Lösungswechsel	15
2.2.5 Temperaturmessung und -regelung	17
2.2.6 Elektroden	18
2.2.6.1 indifferente Elektrode	18
2.2.6.2 Mikroelektroden; Verrechnung von Spitzenpotentialen; Konzentration von Na^+ und K^+ in den Zellen	18
2.2.7 elektrophysiologische Meßanordnung	20
2.2.7.1 Prinzipschaltbild der 'voltage clamp'	20
2.2.7.2 Programm-Einheit	22
2.2.7.3 Schwingschutz	24
2.2.8 Anzeige und Aufzeichnung	24
2.2.9 Ablaufsteuerung	24
2.3 Spannungsausregelung	25
2.3.1 theoretische Aspekte	25
2.3.2 Spannungsausregelung am Dummy	27
2.3.3 Spannungsausregelung in der Zelle	28
2.3.3.1 kapazitive Kopplung außerhalb der Lösung	29
2.3.3.2 Kopplung in der Badlösung	31
2.3.3.3 das 'coaten' von Glaselektroden	33
2.4 Lösungen	33
2.5 Versuchsdurchführung	36
2.5.1 das Anstechen der Zellen	36
2.5.2 Reizprogramm	36
2.5.3 Versuchsablauf	37
2.6 Auswertung	37

II

3	Ergebnisse	39
3.1	Strommessungen in Standardlösung (Ca^{++})	39
3.1.1	Inaktivierung des Ca^{++} -Systems durch Vorpulse	39
3.1.2	Messungen an der Defektmutante CNR	45
3.1.3	Versuche mit Skorpion-Toxinen	48
3.2	Membranströme nach Substitution von Ca^{++} im Außenmedium	50
3.2.1	Sr^{++}	51
3.2.2	Ba^{++}	56
3.2.3	Mg^{++}	60
3.2.4	Co^{++}	62
3.2.5	Mn^{++}	64
3.2.6	Ni^{++}	65
3.3	Membranströme nach Addition zweiwertiger Ionen zur Standardlösung	66
3.3.1	Co^{++}	68
3.3.2	Mn^{++}	69
3.3.3	Ni^{++}	72
3.4	Bindungskonstanten	73
3.4.1	Abhängigkeit des Einwärtsstroms von der Ca^{++} - Konzentration im Außenmedium	73
3.4.2	die Bindungskonstante für Mg^{++}	76
3.4.3	Co^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Mg^{++} und Ca^{++} : Vergleich ihrer Konkurrenz am spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanal	77
3.5	Hemmung des Ca^{++} -Einwärtsstroms durch Co^{++} und Mn^{++} : Vergleich der Ergebnisse aus Substitutions- und Additionsversuchen	78
4	Diskussion	79
4.1	Trennung von Einwärts- und Auswärtsströmen bei Erregung	79
4.2	Membranströme in Standardlösung	81
4.2.1	Ca^{++} -Strom	81
4.2.2	Inaktivierung des Ca^{++} -Systems	82
4.2.3	'Auswärtskomponente'	84
4.3	Ca^{++} -, Sr^{++} - und Ba^{++} -Ströme im Vergleich	85
4.4	kompetitive Hemmung des Ca^{++} -Stroms durch Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} und Ni^{++}	88
4.5	Beziehungen zwischen Ca^{++} - und K^{+} -Strom, Ruhe-	

III

	potential und -widerstand in verschiedenen	
	Lösungen	96
5	Zusammenfassung	98
6	Literatur	101

Summary:Methods:

- 1) The voltage-dependent inward current in *Paramecium caudatum* was studied under voltage clamp-conditions in the presence of Ca^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} , Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , and Ni^{++} .
- 2) In contrast to the conventional technique the cells were impaled from above while they were observed from below. In this way straight electrodes could be used that are easier to prepare than bent electrodes conventionally used.
- 3) The time required to set up a certain membrane potential could be reduced to 300 μs by coating the electrode-tips and by shielding the sensor-electrode.
- 4) By depolarizing prepulses that inactivate the Ca^{++} -channel and by a subtraction-procedure the Ca^{++} - and K^{+} -currents during excitation could be separated (double pulse-technique).
- 5) In 'substitution-experiments' Ca^{++} in the outer medium was exchanged by the tested cation. In 'addition-experiments' the Ca^{++} -concentration was kept constant while the tested cation was added.

Results:

- 1) By means of the double pulse-technique it was possible to show the pure Ca^{++} -currents up to a depolarization of $\Delta V = 100 \text{ mV}$. At voltages higher than $\Delta V = 35 \text{ mV}$ the amplitude of the Ca^{++} -currents declined when the membrane potential further approached the theoretical Ca^{++} -equilibrium-potential ($E_{\text{Ca}} = 123 \text{ mV}$ at $\Delta V = 155 \text{ mV}$). This decay is not linear and does not obey the 'constant field'-equation. Up to $\Delta V = 100 \text{ mV}$ the Ca^{++} -currents show no tendency to reverse sign.
- 2) After subtraction of the K^{+} -currents there remained an 'outward-component' at depolarizations between 60 and 100 mV in Ca^{++} -solution.
- 3) The separation of Ca^{++} - and K^{+} -currents by the aid of the Ca^{++} -channel mutant CNR and by addition of scorpion-toxins was not successful.

- 4) After the exchange of Ca^{++} by Sr^{++} or Ba^{++} distinct inward currents appeared. The voltage-dependency was quite the same as in Ca^{++} -solution; the amplitude of the Ba^{++} -currents was slightly higher than the amplitude of the Ca^{++} - and Sr^{++} -currents. Activation and inactivation of the currents was slower in Sr^{++} -solution and by far slower in Ba^{++} -solution than in Ca^{++} -solution. In Ba^{++} -solution distinct 'tail-currents' appeared upon repolarisation. These currents were taken as a measure of the voltage-dependence of the Ca^{++} -channel.
- 5) After exchange of Ca^{++} by Mg^{++} no inward-currents occurred. After partial substitution of Ca^{++} by Co^{++} or Mn^{++} the Ca^{++} -current was reduced. The results indicate an inhibition of the Ca^{++} -current.
- 6) This inhibition was analysed quantitatively in addition-experiments. The results show that Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , and Ni^{++} inhibit the Ca^{++} -current in a competitive manner. The relative binding constants were found to be

$$K_{\text{Ni}} : K_{\text{Co}} : K_{\text{Ca}} : K_{\text{Mn}} : K_{\text{Mg}} = \\ 1 : 3 : 4,5 : 5 : 8$$

The absolute value for K_{Ca} is most probably between 40 and 130 μM .

- 7) A quantitative comparison on the basis of the absolute binding constants shows that the results from the substitution-experiments are in good accordance with those of the addition-experiments.
- 8) Beside the inhibition of the Ca^{++} -current some of the tested cations showed an influence on the K^{+} -conductance during excitation, as well as on resting potential and resting resistance of the membrane. In almost all cases a reduced K^{+} -conductance appeared together with an increased resting resistance and a shift of the resting potential in the positive direction. There seems to be no relation to the Ca^{++} -current.

Discussion:

- 1) The separation of Ca^{++} - and K^{+} -currents upon membrane depolarization is possible only when all measurements are taken

VI

from the same cell. Up to depolarizations between 90 and 100 mV the double pulse-technique is practicable for the specification of the Ca^{++} -currents. At these membrane-voltages the ratio I_K/I_{Ca} already lies between 15 and 20.

- 2) The maximum Ca^{++} -inward-current and the maximum inactivation of the Ca^{++} -channel appeared at different voltages. It is concluded that (in addition to an increase in internal Ca^{++} -concentration) a complete activation of the Ca^{++} -conductance is necessary for complete inactivation.
- 3) The occurring 'outward component' may be due to a modification of the K^+ -conductance by Ca^{++} that enters the cell during excitation.
- 4) The experiments in Sr^{++} - and Ba^{++} -solution indicate that the gating mechanism of the voltage-dependent Ca^{++} -channel is ion-dependent (cf. Saimi & Kung, 1982).
- 5) Probably besides a 'screening effect' the binding of divalent cations to negative binding sites on the membrane causes the changes of Ca^{++} - and K^+ -currents during excitation and the changes in resting potential and resting conductance.
- 6) The inhibition of the Ca^{++} -current on the one hand and the changes in resting potential, resting conductance, and K^+ -conductance during excitation on the other hand are largely independent of each other. Thus, there seem to be at least two different sites of the cell surface that can be distinguished by their affinity for divalent cations.

1 Einleitung

Paramecium (Ciliata, Protozoa) bewegt sich mit Hilfe seiner Cilien, deren effektiver Schlag (power stroke) normalerweise nach rechts hinten gerichtet ist. Für die unerregte Zelle resultiert hieraus ein Vorwärtsschwimmen in einer linksgewundenen Spirale bei gleichzeitiger Rotation um die Körperlängsachse. Trifft ein Individuum bei seiner Vorwärtsbewegung auf ein Hindernis, so wird infolge dieses Reizes die Richtung, in der der Ruderschlag der Cilien erfolgt, vorübergehend umgekehrt. Die Zelle schwimmt einige Körperlängen rückwärts und findet dann nach Kegelschwingungen um das Hinterende und nach Vorwärtsschwimmen in stetig größer werdenden Kreisen zur ursprünglichen Fortbewegung in einer neuen Richtung zurück. Mit Hilfe dieser 'avoiding reaction' (Jennings, 1904) sind die Zellen in der Lage, Hindernissen auszuweichen oder ungünstige Bereiche wie starke Salz- oder Säurekonzentrationen zu meiden.

Der spannungsabhängige Ca^{++} -Kanal stellt bei dieser stereotypen Reaktion ein wichtiges Bindeglied in der Rezeptor-Effektor-Beziehung dar. Wird ein Paramecium an seinem Vorderende mechanisch gereizt, so entsteht zunächst ein Ca^{++} -Rezeptorstrom (Ogura & Machemer, 1980), der die Membran lokal depolarisiert (Eckert, Naitoh & Friedman, 1972). Dieses Rezeptorpotential breitet sich elektrotonisch (passiv) über die gesamte Zellmembran aus (Eckert & Naitoh, 1970). Bei genügender Amplitude öffnen sich spannungsabhängig Ca^{++} -Kanäle, die sich in der Cilienmembran befinden (Ogura & Takahashi, 1976; Dunlap, 1977; Ogura & Machemer, 1979). Der folgende Ca^{++} -Einwärtsstrom bewirkt zusammen mit einem verzögert aktivierten K^+ -Auswärtsstrom ein graduiertes Aktionspotential (Naitoh & Eckert, 1968a; Naitoh, Eckert & Friedman, 1972). Das Aktionspotential breitet sich mit einer Geschwindigkeit von etwa $100 \mu\text{m}/\text{ms}$ über die gesamte Zellmembran aus (Eckert & Naitoh, 1970).

Im Ruhezustand beträgt die freie Ca^{++} -Konzentration im Innern der Cilien $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (Hildebrand & Dryl, im Druck). Die Außenkonzentration liegt in der Regel im Bereich von wenigen mmol/l . Bei Erregung strömt Ca^{++} entsprechend seines elektrochemischen

Gradienten in die Zelle ein. Es läßt sich abschätzen, daß die Ca^{++} -Konzentration in den Cilien infolge eines Aktionspotentials auf ca. 10^{-5} M ansteigt (Eckert, 1972). Bei Konzentrationen größer als 10^{-6} M erfolgt die beschriebene Umkehr des Cilien-schlags (Naitoh & Kaneko, 1972). Der Mechanismus dieser Ca^{++} -abhängigen Umkehr ist noch nicht geklärt.

Für die Repolarisation der Membran wird neben dem K^{+} -Auswärtsstrom eine Verminderung der Ca^{++} -Leitfähigkeit verantwortlich gemacht (Eckert & Brehm, 1979).

Die zeitabhängige Renormalisierung der Fortbewegung im Anschluß an eine Erregung läßt auf eine Herabsetzung der Ca^{++} -Konzentration im Innern der Zelle schließen, die sehr wahrscheinlich durch einen aktiven Transport erfolgt (Browning & Nelson, 1976; Hildebrand, 1978; Martinac & Hildebrand, 1981).

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Einwärtsstrom durch den spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanal in Gegenwart verschiedener zweiwertiger Kationen zu untersuchen. Hierfür stellt die voltage-clamp-Methode das direkteste Verfahren dar.

Paramecium caudatum ist für voltage-clamp-Untersuchungen gut geeignet (vgl. Hagiwara & Byerly, 1981). Die Zellen sind ausreichend groß (Länge ca. 200 μm , Durchmesser ca. 40 μm) und im Cytoplasma isopotential (Eckert & Naitoh, 1970; Satow & Kung, 1979). Die Längskonstante eines Ciliums beträgt sehr wahrscheinlich ein Vielfaches seiner Länge (Dunlap, 1977; Brehm, Eckert & Tillotson, 1980), sodaß über alle Bereiche der Zellmembran - einschließlich der Cilienmembran - stets dasselbe Potential liegt. Es ist weiterhin möglich, das Membranpotential zu verändern, bevor spannungsabhängige Änderungen der Leitfähigkeit auftreten (vgl. Kapitel 2.3).

Bei Depolarisationen größer als 10 mV tritt ein Ca^{++} -Einwärtsstrom auf, der je nach Temperatur, Ionenzusammensetzung und -konzentration des Außenmediums sein Maximum in 2 bis 5 ms erreicht. Die Dauer des Ca^{++} -Stroms beträgt 5 bis 10 ms. Der maximale Einwärtsstrom ist bei Depolarisationen um 30 bis 35 mV zu beobachten und beträgt zwischen 5 und 20 nA (Naitoh & Eckert, 1974; Oertel, Schein & Kung, 1977; Naitoh, 1979; Eckert & Brehm, 1979;

Satow & Kung, 1979). Die Abnahme des Stroms während einer Depolarisation beruht sehr wahrscheinlich auf einer Inaktivierung des Ca^{++} -Systems. Im Gegensatz zu Na^{+} -Systemen (Hodgkin & Huxley, 1952c; Meves, 1978) ist diese Inaktivierung nicht spannungsabhängig, sondern erfolgt auf Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration im Zellinneren (Brehm & Eckert, 1978a; b; Eckert & Brehm, 1979; Eckert & Tillotson, 1980).

Bei Depolarisationen um 20 bis 30 mV tritt zusätzlich ein K^{+} -Auswärtsstrom auf, der im Gegensatz zum Ca^{++} -Strom nicht inaktiviert (Naitoh & Eckert, 1974; Oertel, Schein & Kung, 1977; Brehm & Eckert, 1978b; Satow & Kung, 1979). Der Auswärtsstrom wird bei höheren Spannungen schnell größer und zeigt von Depolarisationen um 40 bis 45 mV an aufwärts eine lineare Abhängigkeit von der Membranspannung. In den Versuchen wurden Werte zwischen 1 und 2 μS als 'slope conductance' bei maximaler Aktivierung gemessen. Im oberen Spannungsbereich führt eine Erhöhung der Depolarisation um 10 mV somit zu einem um 10 bis 20 nA vergrößerten Auswärtsstrom.

Der frühe Einwärtsstrom, den man zu Beginn einer Depolarisation mißt, kehrt seine Richtung bei Spannungen um, die weit unterhalb des Gleichgewichtspotentials für Ca^{++} liegen (Abschnitt 3.1.1). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre, daß sich beide Ströme mit steigender Spannung zunehmend überlagern, und der K^{+} -Strom so den Ca^{++} -Strom verdeckt. Tatsächlich scheint der K^{+} -Strom bei höheren Spannungen schneller aktiviert zu werden (vgl. Eckert & Brehm, 1979).

Bisher wurden für Paramecium im wesentlichen zwei Verfahren beschrieben, nach denen die Trennung beider Ströme versucht wurde. Das eine besteht in der Subtraktion der Ströme einer Defektmutante, der eine spannungsabhängige Ca^{++} -Leitfähigkeit fehlt, von den Membranströmen des Wildtyps (Oertel, Schein & Kung, 1977; Satow, 1982); im anderen Verfahren wurde die K^{+} -Leitfähigkeit durch Injektion eines Cs^{+} -TEA-Gemisches in die Zelle reduziert (Brehm & Eckert, 1978b). Die Zugabe von TEA ins Außenmedium ist weniger effektiv (Eckert & Brehm, 1979). Das erste Verfahren fand nur für kleinere Depolarisationen Anwendung (Oertel, Schein & Kung: $\Delta V = +20\text{mV}$; Satow: $\Delta V = +40\text{mV}$). Mit dem zweiten wurde bis zu $\Delta V = +60\text{mV}$ gemessen: Bis zu Depolarisationen um 40 mV tritt

unter diesen Bedingungen kein K^+ -Strom auf. Oberhalb dieser Spannung ist der K^+ -Strom stark reduziert. Dies führt zur Messung eines deutlich höheren Ca^{++} -Stroms.

Die Bestimmung des reinen Ca^{++} -Stroms bei höheren Spannungen ist bei allen bisher untersuchten Ca^{++} -Systemen schwierig (siehe Hagiwara & Byerly, 1981). Die Ca^{++} -Konzentrationen im Zellinneren sind in der Regel etwa um den Faktor 10^5 kleiner als im Außenmedium und das Gleichgewichtspotential für Ca^{++} liegt somit bei Werten weit oberhalb +100 mV. In diesem Bereich treten sehr große K^+ -Ströme auf, während damit zu rechnen ist, daß die Ca^{++} -Ströme - nach Erreichen der maximalen Leitfähigkeit - in Richtung auf E_{Ca} stetig kleiner werden.

Die Trennung der Ca^{++} - und K^+ -Anteile am Membranstrom sollte im Prinzip auf folgende Weise möglich sein: Man mißt vor und nach einer experimentellen Herabsetzung entweder des Ca^{++} - oder des K^+ -Stroms und verrechnet dann beide Messungen miteinander. Für dieses Verfahren müssen jedoch folgende Voraussetzungen erfüllt sein (vgl. Hodgkin & Huxley, 1952a):

- a) Bei der Manipulation muß eine der beiden zu trennenden Komponenten unbeeinflusst bleiben.
- b) Die Veränderung der anderen Komponente kann durch Multiplikation mit einer Konstanten K beschrieben werden, d.h. das Zeitverhalten dieser Komponente ändert sich nicht. Im Idealfall wäre $K = 0$.
- c) Es muß einen Zeitpunkt geben, zu dem die unbehandelte Komponente gleich Null und die manipulierte ungleich Null ist.

Die bisher untersuchten Verfahren zur Herabsetzung des K^+ - oder des Ca^{++} -Stroms erfüllen diese Voraussetzungen nicht (Hagiwara & Byerly, 1981): Auch in Systemen, in denen kein Ca^{++} -abhängiger K^+ -Strom auftritt, beeinflussen die untersuchten anorganischen und organischen Ca^{++} -Blocker gleichzeitig den K^+ -Strom. Andererseits gibt es zwar eine Reihe von Verfahren, die den K^+ -Strom herabsetzen und dabei ohne Einfluß auf den Ca^{++} -Strom sind; alle verändern aber die Kinetik des K^+ -Stroms. Die vollständige Eliminierung des K^+ -Stroms scheint nicht möglich zu sein.

Nach Meinung von Hagiwara und Byerly (1981) ist E_{Ca} mit elektro-

physiologischen Methoden nicht bestimmbar. Das schließt ebenfalls die Möglichkeit aus, Permeabilitätsverhältnisse für Ionen zu berechnen, für die der Ca^{++} -Kanal durchlässig ist (vgl. Hille, 1971; 1972; 1973; Dwyer, Adams & Hille, 1980; Adams, Dwyer & Hille, 1980).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einwärtsstrom in Gegenwart von Ca^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} , Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} und Ni^{++} untersucht. Für die Ströme permeierender Ionen wurde versucht, den Meßbereich auf möglichst hohe Spannungen auszudehnen. Hierzu wurden auch Versuche mit Toxinen durchgeführt, die die Leitfähigkeit des spannungsabhängigen Ca^{++} - oder K^+ -Kanals herabsetzen sollten. Messungen des reinen K^+ -Stroms wurden zum einen an Defektmutanten durchgeführt, denen eine spannungsabhängige Ca^{++} -Leitfähigkeit fehlt, zum andern am Wildtyp nach Inaktivierung des Ca^{++} -Kanals durch eine vorangehende Depolarisation.

In einer Reihe von Versuchen wurde Ca^{++} im Außenmedium durch das zu untersuchende Kation ersetzt (Substitutionsversuche). Die Gesamtkonzentration zweiwertiger Ionen bleibt dabei konstant, um Verschiebungen des Ruhepotentials gering zu halten. Für die Untersuchung der Permeabilität eines Ions ist eine möglichst weitgehende Substitution von Ca^{++} wünschenswert. In den Versuchen mit Sr^{++} , Ba^{++} und Mg^{++} gelang ein Austausch bis auf 1 %. Im Fall von Co^{++} und Mn^{++} betrug die restliche Ca^{++} -Konzentration 10 bzw. 50 %. Substitutionsversuche mit Ni^{++} gelangen wegen der Toxizität dieses Ions nicht.

Die Ergebnisse aus den Substitutionsversuchen lassen auf eine Hemmung des Ca^{++} -Stroms durch verschiedene Ionen schließen. Diese Hemmung wurde in einer Versuchsreihe quantitativ untersucht, in der die Ca^{++} -Konzentration konstant blieb, während das zu testende Ion in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben wurde (Additionsversuche). Die maximale Konzentration betrug hierbei 0,5 mM, um das Ruhepotential möglichst wenig zu verändern. Gemessen wurde jeweils der Einfluß des Ions auf den maximalen Ca^{++} -Strom. Bei den Depolarisationen, bei denen dieser Strom auftritt, ist der K^+ -Strom oft noch nicht aktiviert oder so klein, daß er leicht subtrahiert werden kann.

Nach Substitution von Ca^{++} durch Sr^{++} oder Ba^{++} lassen sich an *Paramecium caudatum* (Brehm & Eckert, 1978a; b; Saimi & Kung, 1982) und an *Stylonychia* (DePeyer & Deitmer, 1980) in voltage-clamp-Versuchen deutliche Einwärtsströme messen. Die Aktivierung erfolgt dabei in Sr^{++} - und in Ba^{++} -Lösung deutlich später als in Gegenwart von Ca^{++} , sie setzt jedoch in allen Lösungen bei etwa der gleichen Depolarisation ein. Die Amplituden der Sr^{++} - und Ba^{++} -Ströme sind im Vergleich zu den Ca^{++} -Strömen leicht erhöht (Saimi & Kung, 1982). Während der Einwärtsstrom in Ca^{++} -Lösung nach maximal 10 ms vorüber ist, hält der Strom in Sr^{++} -Lösung etwa 4 mal so lange an. In Ba^{++} -Lösung bleibt die Amplitude des Einwärtsstroms auch bis zum Ende längerer Depolarisationen weitgehend konstant. Als Ursache für dieses unterschiedliche Zeitverhalten wurde oft ein Ca^{++} -abhängiger K^+ -Strom diskutiert, der von Sr^{++} schlechter und von Ba^{++} nicht aktiviert wird (Eckert, Naitoh & Machemer, 1976; Brehm, Dunlap & Eckert, 1978; Satow, 1978). Inzwischen gibt es jedoch Hinweise dafür, daß der Ca^{++} -Kanal durch die drei Ionen unterschiedlich inaktiviert wird (Brehm & Eckert, 1978a; b; Eckert & Brehm, 1979; Brehm, Eckert & Tillotson, 1980; Saimi & Kung, 1982).

Zugabe von Sr^{++} oder Ba^{++} zur Ca^{++} -Lösung verwandelt das vorher gradierte Aktionspotential in eine Alles-oder-Nichts-Antwort (Kinosita, Dryl & Naitoh, 1964; Naitoh & Eckert, 1968b; Naitoh, Eckert & Friedman, 1972).

Die erregungsbedingte Aufnahme von Ba^{++} konnte mit Hilfe des Radioisotops $^{133}\text{Ba}^{++}$ direkt nachgewiesen werden (Ling & Kung, 1980).

Nach Substitution von Ca^{++} durch Mg^{++} trat in voltage-clamp-Versuchen kein Einwärtsstrom auf (Oertel, Schein & Kung, 1977; DePeyer & Deitmer, 1980 an *Stylonychia*). Das gleiche gilt für Messungen an *Stylonychia* nach Substitution von Ca^{++} durch Mn^{++} (DePeyer & Deitmer, 1980).

Das Aktionspotential von *Paramecium caudatum* wurde in Gegenwart verschiedener zweiwertiger Kationen untersucht (Naitoh & Eckert, 1968a; b; Naitoh, Eckert & Friedman, 1972; Eckert, Naitoh & Friedman, 1972). Der Einfluß von Mg^{++} , Co^{++} und Mn^{++} auf das Ca^{++} -(Ba^{++} -) Aktionspotential scheint jedoch gering zu sein,

zumal diese Ionen zum Teil in großem Überschuß zur Ca^{++} -(Ba^{++} -) Lösung gegeben wurden. Daraus wird geschlossen, daß Mg^{++} , Co^{++} und Mn^{++} den spannungsabhängigen Ca^{++} -Strom nicht oder nur sehr wenig hemmen (Brehm, Dunlap & Eckert, 1978; Eckert & Brehm, 1979; Brehm, Eckert & Tillotson, 1980). Der spannungsabhängige Ca^{++} -Kanal von Paramecium würde sich in dieser Hinsicht deutlich von entsprechenden Ca^{++} -Kanälen anderer Objekte unterscheiden (vgl. Hagiwara & Byerly, 1981). Andererseits beschreiben Browning & Nelson (1976) eine starke Herabsetzung der erregungsbedingten Ca^{++} -Aufnahme durch Mg^{++} , Co^{++} und Mn^{++} .

Ni^{++} im Außenmedium hemmt bereits in sehr kleinen Konzentrationen den Cilienschlag von Paramecium (Gelei, 1935; Kuźnicki, 1963). Andrivon (1968; 1970a; b) schließt aus seinen Ergebnissen, daß Ni^{++} hierzu in die Zellen eindringen muß; dabei ist über den Weg des Kations nichts bekannt. Eine Möglichkeit wäre der Einstrom durch den spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanal bei spontanen Depolarisationen der Zellmembran.

Direkten Bezug zu den eigenen Untersuchungen hat eine zwischenzeitlich veröffentlichte Arbeit von Saimi und Kung (1982), die sich mit der Wirkung von Sr^{++} und Ba^{++} befaßt.

Herrn Prof. Dr. E. Hildebrand danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, seine Hilfe und stete Diskussionsbereitschaft. Für eine Reihe sehr nützlicher Hinweise bei der Planung der Versuche möchte ich Herrn Prof. Dr. G.L. Fain (Los Angeles) danken. Herrn Prof. Dr. Y. Naitoh (Ibaraki) danke ich für die Bereitstellung seiner CNR-Mutanten und seine Anregungen bei der Diskussion der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern der Elektronik- und der Mechanik-Werkstatt des Instituts, den Herren R. Backbier, H. Erkens, E. Giesen, D. Grammig und T. Offermanns für ihre Hilfe beim Aufbau der Apparatur.

Sehr dankbar bin ich Herrn J. Klomfaß für zahlreiche methodische Anregungen. Herrn J. Heinen danke ich für die Erstellung der Computerprogramme und Herrn W. Brunner (ZCH, KFA-Jülich) für die Durchführung der Atomabsorptions-Spektroskopie.

Herrn Prof. Dr. A. Maelicke (Dortmund) danke ich für die Bereitstellung der Skorpion-Toxine.

Herrn H. Overath möchte ich für die Kultivierung des Versuchsmaterials danken. Herrn S. Peters (IBT, KFA-Jülich) danke ich für zahlreiche Ratschläge in fototechnischen Fragen und Frau M. Bruns für eine Reihe praktischer Hinweise. Meiner Frau M. Wehner danke ich für ihre Hilfe bei der Anfertigung des Manuskripts.

Vielen anderen Mitgliedern des Instituts möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft danken.

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 Versuchsobjekt

2.1.1 Zellkulturen

Zellkulturen von *Paramecium caudatum* aus dem Nencki-Institut in Warschau wurden bei Zimmertemperatur in Heuabkochungen herangezogen. Für die Versuche fanden zwei bis drei Wochen alte Kulturen Verwendung.

2.1.2 Reinigung der Zellsuspension

Nach einer kurzen Zentrifugation (bei 170 g; Laborzentrifuge UJ1, Heraeus Christ GmbH) wird das Zellpellet in Standardlösung überführt (CaCl_2 1 mM; KCl 1 mM; Tris 1 mM; pH = 7,2 bis 7,4). Infolge ihres negativ geotaktischen Verhaltens findet man die Paramecien nach kurzer Zeit fast ausschließlich im oberen Bereich der Lösung. Mit diesem zusammen können die Zellen leicht abgenommen werden. Mehrmalige Anwendung des Verfahrens erlaubt eine starke Verdünnung der ursprünglichen, nicht definierten Kulturlösung.

Alle Versuche wurden bei 15°C durchgeführt. Da die Zellen sehr empfindlich auf plötzliche Temperaturänderungen reagieren, wurden die gereinigten Suspensionen vor Versuchsbeginn 3 bis 4 Stunden in einem Kühlraum vortemperiert.

2.1.3 die verwendeten Zellen

Die durchschnittliche Länge der Zellen, die für die Versuche verwendet wurden, betrug 200 μm ($\pm 15 \mu\text{m}$). Es wurde nur an solchen Zellen gemessen, die in der Standardlösung eine Membranwiderstand von mindestens 50 M Ω besaßen. Sank der Widerstand während eines Versuchs um mehr als 25 % des Anfangswerts, so wurde die Messung nicht ausgewertet. Versuche mit Zellen, die gequollen und deren pulsierenden Vakuolen vergrößert waren, wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. (Dieser Verschlechterung des Gesamtzustands geht jedoch meist eine Herabsetzung des Mem-

branwiderstands 'voraus.)

2.2 Versuchsanordnung

Das übliche Verfahren bei intrazellulären Messungen an Paramecium

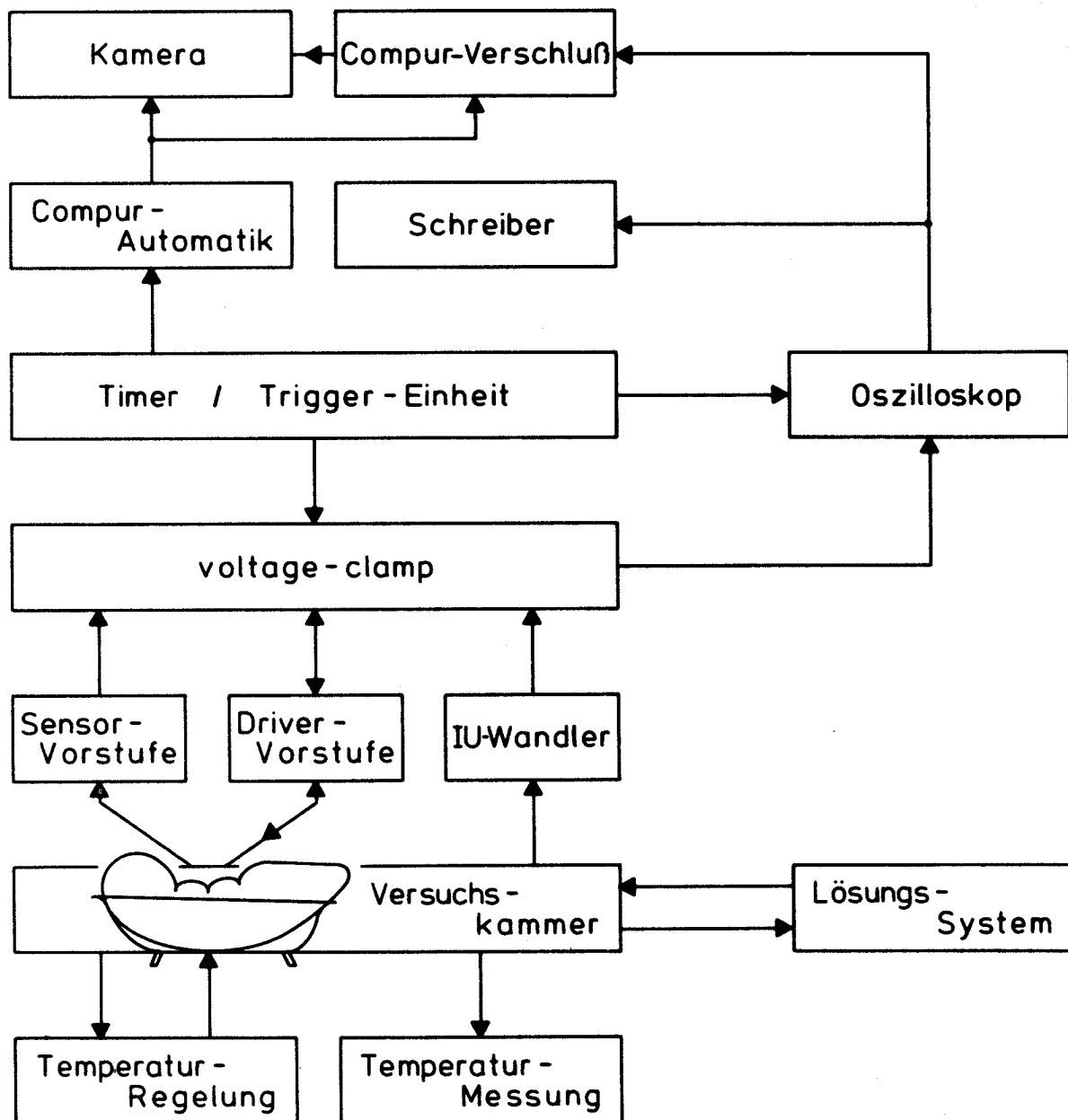


Abb. 1: Blockschaltbild der Apparatur. Nicht eingezeichnet ist das Mikroskop zur optischen Kontrolle des Präparats.

besteht seit langem darin, die Zellen zunächst in einem kleinen Tropfen auf die Unterseite eines beschwerten Deckglases zu bringen und dann von unten mit hakenartig gebogenen Glas-Mikroelektroden anzustechen. Die Kontrolle des Vorgangs durch ein Mikroskop erfolgt von oben (siehe Naitoh & Eckert, 1968a; 1972).

Der Aufwand bei der Herstellung der gebogenen Mikroelektroden ist nicht unerheblich. Beim Aufbau der im folgenden beschriebenen Apparatur wurde deshalb ein verändertes Verfahren zugrunde gelegt. Hiernach wird mit geraden Elektroden von oben angestochen; die Beobachtung des Präparats erfolgt von unten durch ein umgekehrtes Mikroskop.

Bedingt durch den veränderten Aufbau traten zunächst regelungstechnische Schwierigkeiten auf (vgl. Kapitel 2.3), die jedoch im weiteren Verlauf beseitigt werden konnten.

Die Apparatur wurde in Zusammenarbeit mit der Elektronik- und der Mechanik-Werkstatt des Instituts aufgebaut. Abb. 1 zeigt die Gesamtapparatur im Blockschaltbild.

2.2.1 mechanischer Aufbau

Der gesamte Aufbau (Abb. 2) befindet sich auf einer Stahlplatte mit den Abmessungen 60 cm • 100 cm • 2 cm. Über Schwingungsdämpfer ist diese Platte auf einer Stahlkonstruktion gelagert, die ihrerseits an der Betonwand des Meßraums befestigt ist. Mit Ausnahme der auf den Experimentator gerichteten Fläche, ist diese Anordnung allseitig von einem Faraday-Käfig umgeben. In der Mitte der Stahlplatte ist ein umgekehrtes Mikroskop befestigt (Standard UPL, Carl Zeiss, Oberkochen), auf dessen Tisch sich ein Peltier-Kühlblock befindet (vergleiche Abschnitt 2.2.5). In eine Aussparung dieses Kühlblocks ist die eigentliche Versuchskammer eingepaßt (Abb. 3). Die Beobachtung der Präparation erfolgt von unten durch eine Aussparung im Kühlblock und durch den Glasboden der Versuchskammer. Über die Feintriebe des Mikroskoptischs ist eine Bewegung des Kühlblocks und somit der Versuchskammer in x,y-Richtung möglich.

Bis in Höhe seines Tisches wird das Mikroskop allseitig von einem

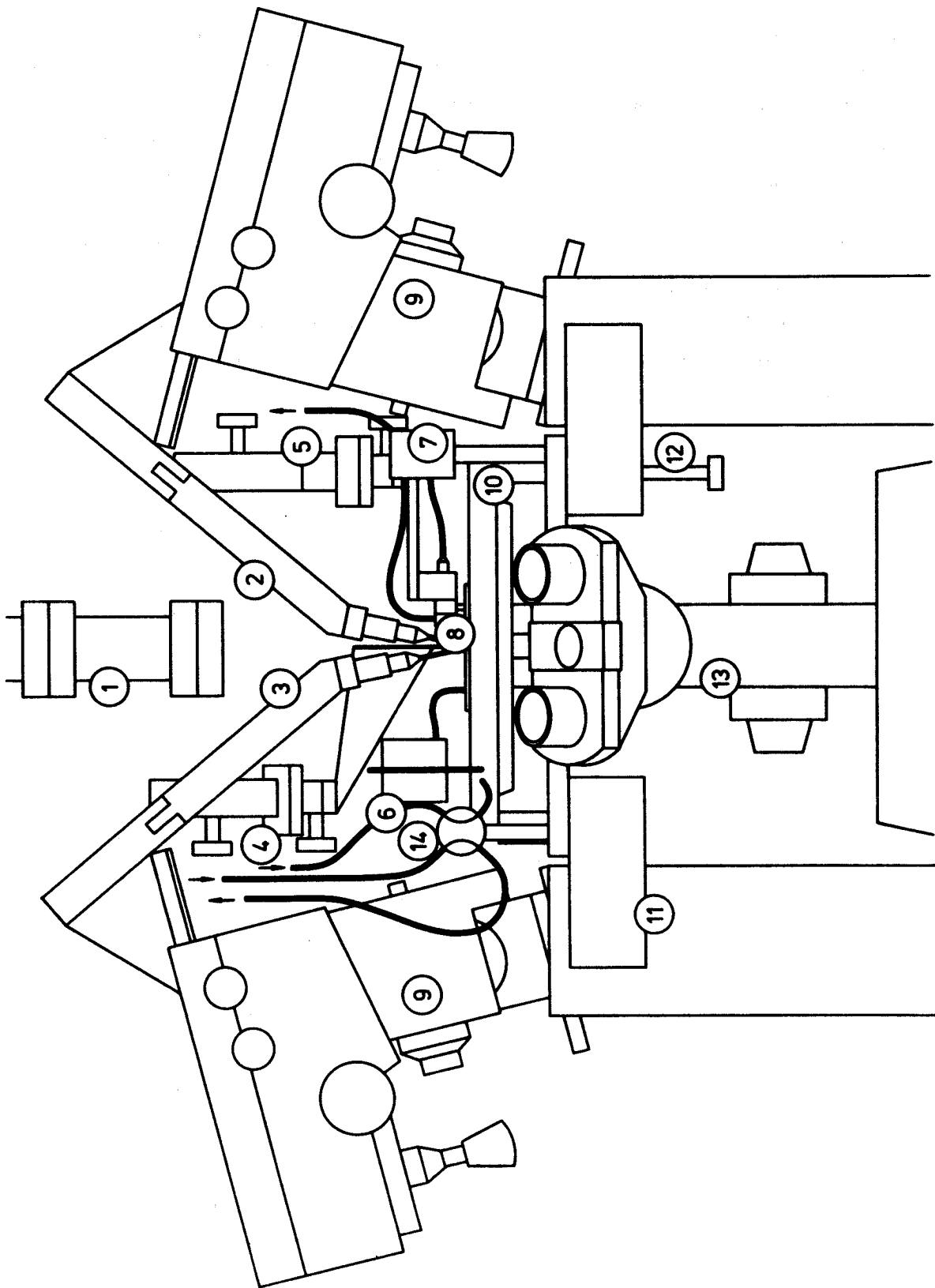


Abb. 2: Frontalansicht des Versuchsaufbaus; Erläuterungen S. 13

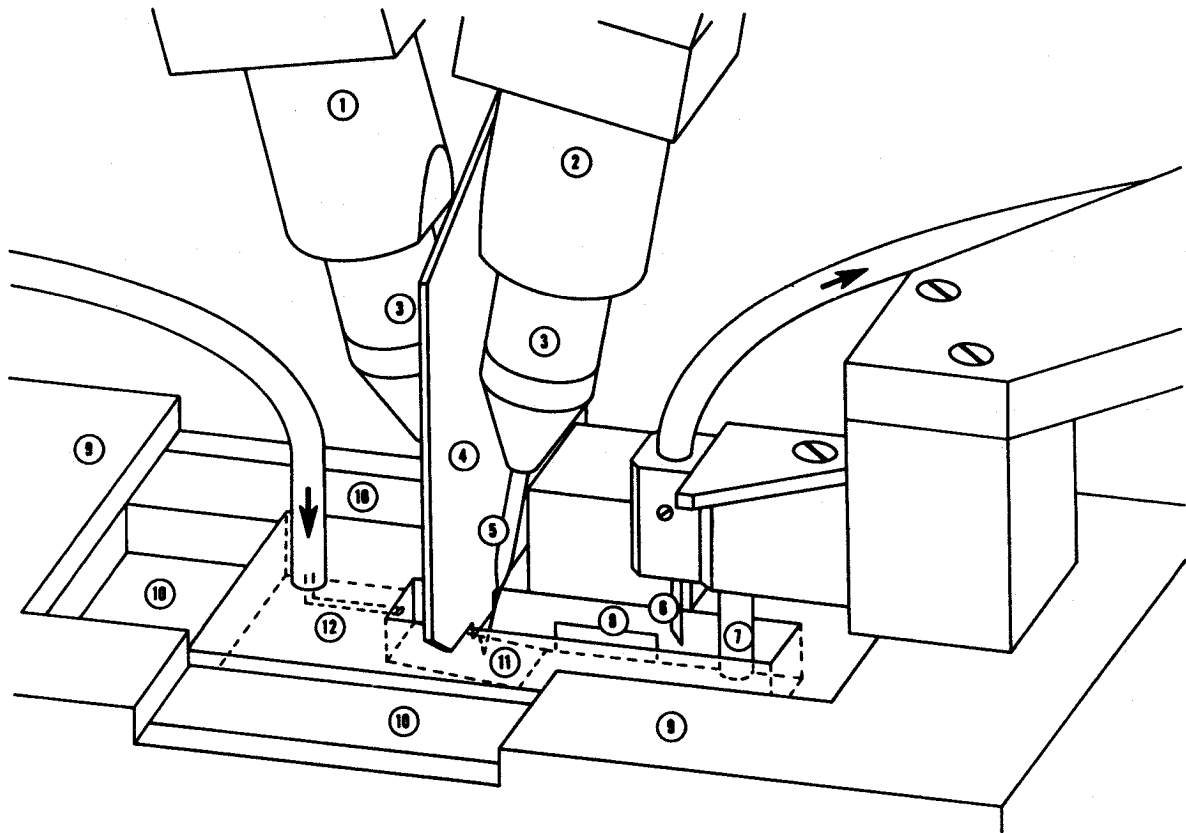


Abb. 3: Versuchskammer und umgebende Teile des Aufbaus;
 1) Sensor-Vorstufe; 2) Driver-Vorstufe; 3) Mikroelektroden-
 Halter; 4) 'Schild'; 5) Driver-Elektrode; 6) Absaugkanüle;
 7) indifferente Elektrode; 8) Temperatur-Meßfühler; 9) Styro-
 por-Isolation; 10) Peltier-Kühlblock; 11) Glasboden der Versuchs-
 kammer; 12) Plexiglasblock der Kammer mit dem Zulauf für die Ver-
 suchslösungen

Abb. 2: 1) Mikroskoplampe; 2) Driver-Vorstufe; 3) Sensor-Vorstufe;
 4) Mikromanipulator zur Bewegung des 'Schildes'; 5) Mikromanipu-
 lator für Absaugkanüle und indifferente Elektrode; 6) elektrische
 Entkopplung in der Lösungszuführung; 7) IU-Wandler; 8) Versuchs-
 kammer, Mikroelektroden, 'Schild', Absaugkanüle, Temperaturfüh-
 ler und indifferente Elektrode (vgl. Abb. 3); 9) Mikromanipula-
 toren zur Bewegung der Vorstufen und Mikroelektroden; 10) Peltier-
 Kühltisch; 11) Metallrahmen, der die Mikromanipulatoren trägt;
 12) Feintriebs des Kreuztischs; 13) inverses Mikroskop; 14) Steu-
 erventil für den Zulauf der Versuchslösungen

Metallrahmen umgeben. Dieser ist - wie das Mikroskop - direkt mit der Basisplatte verbunden und trägt die Mikromanipulatoren (520 R/L, Ernst Leitz, Wetzlar) zur Bewegung der beiden Vorstufen und Elektroden. Beide Mikromanipulatoren sind leicht nach außen geneigt, sodaß der Winkel zwischen den Elektroden 23° beträgt. Unter diesem Winkel erfolgt der Anstich mit beiden Elektroden bei gleichzeitiger Kontrolle durch das Mikroskop von unten.

Auf dem hinteren Teil des Rahmens befinden sich zwei weitere kleinere Mikromanipulatoren (Narishige, Japan). Durch den einen wird nach erfolgtem Anstich ein senkrechtes Edelstahlblech ('Schild'; vgl. Abschnitt 2.3.3.1) zwischen Sensor- und Driver-Elektrode geführt; mit dem anderen wird die gemeinsame Halterung von indifferenter Elektrode und Absaugkanüle bewegt (vgl. Abschnitte 2.2.4, 2.2.6.2).

2.2.2 Versuchskammer

Die Versuchskammer besteht aus einem Plexiglasblock, der in der Mitte eine fensterartige Aussparung besitzt (Abb. 3). Nach unten ist diese Aussparung durch eine dünne Glasscheibe (0,5 mm) verschlossen, die eine einwandfreie Beobachtung der Zellen während und nach dem Anstechen erlaubt. Dieser Boden der Versuchskammer steigt zur linken Seite leicht an. Bewegt man - nach dem Anstich mit beiden Elektroden - die Kammer mit Hilfe des Feintriebs am Kreutztisch in x-Richtung, so kann man den Abstand zwischen den Elektrodenspitzen und dem Kammerboden vergrößern oder verkleinern, je nachdem ob eine Zelle zu stark gegen den Kammerboden gepresst wird oder die Gefahr besteht, daß sie von den Elektroden gleitet. Die auftretenden Scherkräfte bleiben bei diesem Vorgang klein und die Zellen werden nicht geschädigt.

Der Zulauf der Versuchslösungen erfolgt durch eine Bohrung im Plexiglasblock der Kammer. Durch eine Kanüle, die mit einem Mikromanipulator von oben in das Bad geführt wird, kann Badlösung abgesaugt werden (vgl. Abschnitt 2.2.4). In eine Aussparung der Kammerwand ist ein Edelstahlblock eingelassen, der einen Temperaturfühler enthält (vgl. Abschnitt 2.2.5). Je nach Lage

des Präparats beträgt der Abstand zur Zelle etwa 2 bis 4 mm.

2.2.3 Optik

Die Beobachtung der Zelle während und nach dem Anstechen erfolgt von unten durch ein umgekehrtes Mikroskop mit Binokular (Standard UPL, Carl Zeiss, Oberkochen) bei 100facher Vergrößerung. Eins der beiden Okulare ist mit einer Strichplatte ausgerüstet, um die Abmessungen der Zellen bestimmen zu können.

Die Versuchskammer wird von oben durch eine Mikroskoplampe (Carl Zeiss, Oberkochen) beleuchtet (Abb. 2). Diese Lampe ist mit zwei Wärmeschutzfiltern versehen.

2.2.4 Flußsystem und Lösungswechsel

Die Apparatur ist mit einem Flußsystem ausgestattet, das eine kontinuierliche Durchströmung der Versuchskammer und einen Austausch der Badlösung erlaubt (Abb. 4A). Durch eine peristaltische Pumpe (Desaga PLG-Vielfach-Schlauchpumpe 132100, Heidelberg) wird eine Lösung 1 aus einem Vorratsgefäß zu einem Ventil transportiert. Steht dieses Ventil in Stellung A, so gelangt die Lösung in die Versuchskammer, nachdem sie zuvor mehrmals durch den Peltierblock geführt und so vortemperiert wurde. Dieselbe Lösung wird dann mit Hilfe einer Edelstahlkanüle aus dem Bad abgesaugt und durch die Pumpe in ein Sammelgefäß befördert. Die Kanüle ist gemeinsam mit der indifferenten Elektrode in einer Halterung angeordnet (Abb. 3). Durch einen Mikromanipulator werden beide von oben in das Bad geführt. Über die Höhe der Kanüle läßt sich der Stand der Lösung im Versuchsgefäß variieren. Durch die gemeinsame Halterung ist gewährleistet, daß die indifferente Elektrode hierbei nicht den Kontakt zur Lösung verliert. Eine ebenfalls von der Pumpe an das Ventil herangeführte Lösung 2 wird in Ventilstellung A direkt ins Sammelgefäß befördert.

Nach Umschalten des Ventils in Stellung B gelangt Lösung 2 in das Versuchsgefäß, während Lösung 1 in das Sammelgefäß geführt wird. Dadurch, daß das Ventil in der Nähe der Versuchskammer angeordnet ist, erfolgt der Austausch einer Lösung beschleunigt.

Abb. 4B beschreibt die Zeitabhängigkeit eines Lösungswechsels. Aufgetragen ist der verbliebene Anteil von Lösung 1 an der Bad-

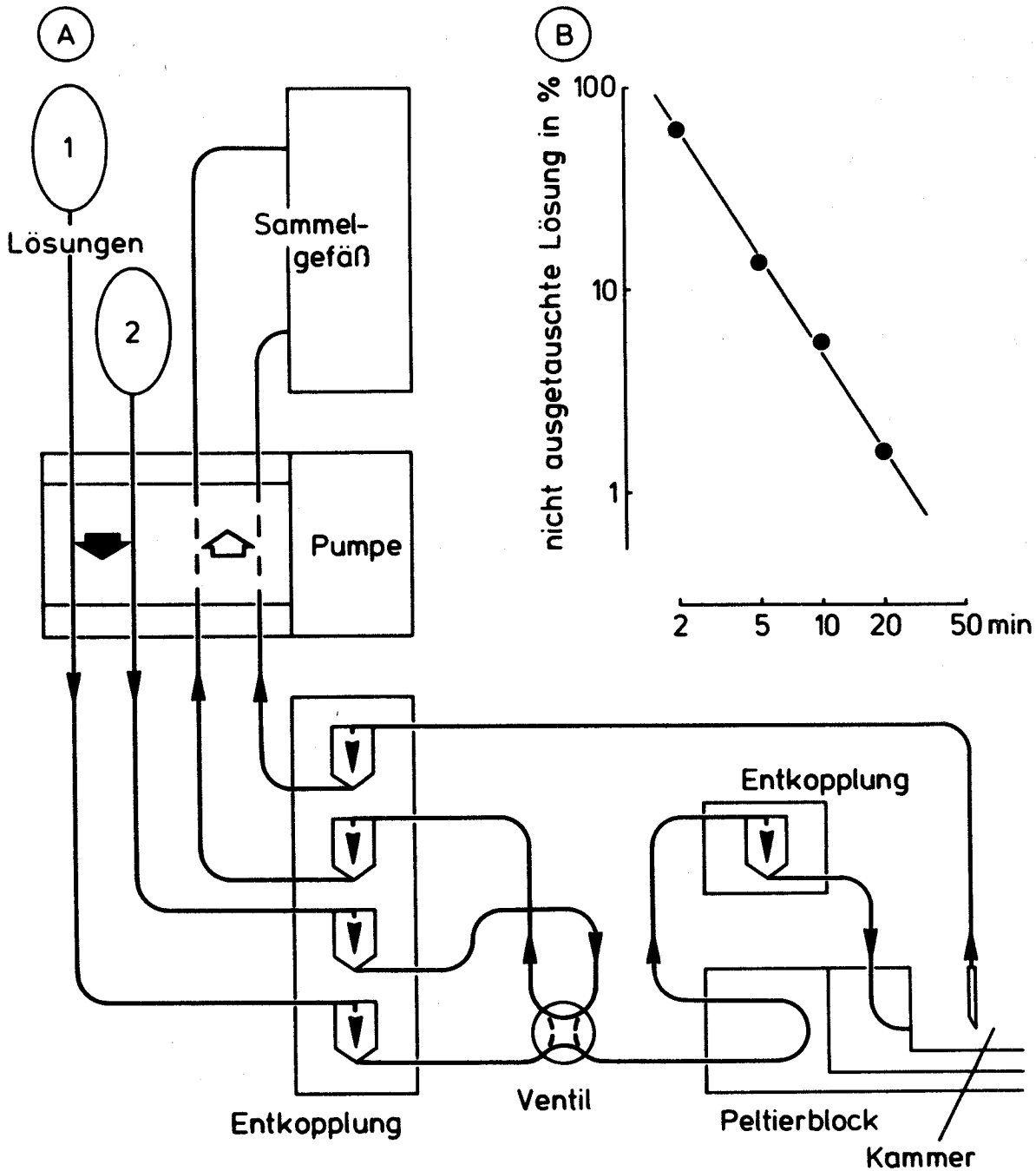


Abb. 4: Flußsystem (A) und Austauschkinetik bei einem Wechsel der Badlösung (B). Im Ventil entsprechen die durchgezogenen Linien der Stellung A, die gestrichelten der Stellung B (siehe Text).

lösung nach Umschalten des Ventils auf Stellung B bei $t=0$ als Funktion der Zeit. Die Zeitabhängigkeit wurde in Vorversuchen mehrmals über den Austausch einer gefärbten Lösung durch eine ungefärbte gemessen. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Lösung in der Versuchskammer entnommen und der verbliebene Anteil von Lösung 1 spektroskopisch bestimmt.

An den Grenzen des Faraday-Käfigs wird die Lösung in allen Leitungen durch geschlossene Tropfgefäße elektrisch entkoppelt (Abb. 4A). Hierdurch wird verhindert, daß Störungen - vor allem durch die Pumpe - über die Lösungen in die Nähe des Präparats weitergeleitet werden. Eine weitere Entkopplung befindet sich zwischen Peltierblock und Kammer. Diese Trennung ist notwendig, weil der Peltierblock zur besseren Abschirmung auf Masse liegt, die Lösung in der Versuchskammer jedoch auf 'virtual ground'.

In allen Versuchen wurde mit einer Einstellung an der Pumpe von 1 Skt. gearbeitet, was einer Förderleistung von 0,33 ml/min entspricht. Bei dieser Einstellung ist eine Lösung 1 innerhalb von 30 min bis auf 1 % durch eine Lösung 2 ersetzt (Abb. 4B).

Die Höhe der Absaugkanüle wurde konstant gehalten. Bei der gewählten Einstellung betrug das Volumen der Badlösung 0,4 ml.

Alle Leitungen des Flußsystems bestehen aus Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von 1 mm.

2.2.5 Temperaturmessung und -regelung

Die Temperatur des Kühlblocks wird durch ein Peltier-Regelgerät (KFA,ZEL) über zwei Peltier-Elemente konstant gehalten. Als Fühler dient ein geeichter NTC-Widerstand, der in den Kühlblock eingelassen ist.

Zusätzlich wird die Temperatur in der Nähe des Präparats gemessen (vgl. Abschnitt 2.2.2) und von einem separaten Meßgerät (KFA,INB) digital angezeigt. Der Fühler (AD 590 K, ANALOG DEVICES, München) befindet sich in einem kleinen Edelstahlblock, der in direktem Kontakt zur Badlösung steht (Abb. 3).

Alle Versuche wurden bei 15°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur zeigte sich in Messungen mit der Durchströmungsmethode die

maximale Ca^{++} -Aufnahme infolge elektrischer Reizung (Martinac & Hildebrand, 1981).

2.2.6 Elektroden

2.2.6.1 indifferente Elektrode

Als indifferente Elektrode dient eine Agar-KCl-Brücke (Agar 2 %ig, KCl 3 M). Mit ihrem unteren Teil taucht diese Brücke in die Badlösung, der obere Bereich steht mit einer Aussparung im Elektrodenhalter in Verbindung. Diese Aussparung enthält eine gesinterte Ag-AgCl-Elektrode und ist mit 3 M KCl gefüllt. Über eine kurze Zuleitung erfolgt die Verbindung zum IU-Wandler.

2.2.6.2 Mikroelektroden; Verrechnung von Spitzenpotentialen; Konzentration von Na^+ und K^+ in den Zellen

a) Mikroelektroden

Die Mikroelektroden werden auf einem Horizontalpuller (Industrial Science Associates, INC., NY, USA) aus Theta-Borosilikatglas-Kapillaren (Hildenberg, Malsfeld) mit einem Außendurchmesser von 1,6 mm gezogen. Der Steg in der Mitte der Glasröhrchen erhöht die Kapillarwirkung und macht hierdurch das Füllen mit Elektrolyten einfacher.

Die Driver-Elektroden werden mit 2 M Kaliumcitratlösung gefüllt (H. Machemer, pers. Mitteilung) die Sensor-Elektroden mit 1 M KCl-Lösung. Die Einstellungen am Puller wurden so gewählt, daß der Widerstand der Driver-Elektroden 20 bis 30 M Ω beträgt, der der Sensor-Elektroden 40 bis 60 M Ω (gemessen in Standardlösung).

Vor dem Füllen mit Salzlösung werden die Sensor-Elektroden mit einer Nagellackschicht ummantelt (vgl. Abschnitte 2.3.3.2 und 2.3.3.3). Die Zeit vom Auftragen des Nagellacks bis zur Anwendung der Elektroden im Versuch beträgt in der Regel 2,5 Stunden. Nach dieser Zeit ist der Lack vollständig ausgehärtet.

Die Mikroelektroden werden mit speziellen Haltern (WP-Instruments, INC., New Haven, Conn., USA), die einen Steckkontakt besitzen, von unten an den Vorstufen befestigt (Abb. 3).

b) Verrechnung von Spitzenpotentialen

Taucht man die Spitze einer Mikroelektrode in eine Lösung, so mißt man ein Potential, das vom Spitzendurchmesser, von der Spitzenform, der verwendeten Glassorte, der Ionenkonzentration und der Ionenzusammensetzung zu beiden Seiten der Spitze abhängt (Richter, 1979; Machemer & Grabowski, 1980). Bei den üblicherweise hohen Salzkonzentrationen in den Elektroden steigt die Höhe des Spitzenpotentials, je weniger konzentriert die Außenlösung ist. Bei den verwendeten Sensor-Elektroden, die mit 1 M KCl-Lösung gefüllt werden, treten in der Standardlösung Spitzenpotentiale im Bereich von -10 bis -15 mV auf. Dadurch, daß die Ionenkonzentration in der Zelle anders ist als im Bad, wird sich auch das Spitzenpotential der Elektrode beim Einstich in die Zelle verändern. In der Zelle wird also ein Membranpotential gemessen, das um diese Änderung verfälscht ist. Eine Korrektur ist nach folgendem Verfahren möglich (Machemer & Grabowski, 1980):

- 1) Das Spitzenpotential der Elektrode in der Versuchslösung (U_B) wird gemessen.
- 2) Nach dem Anstich erfolgt die Messung des unkorrigierten Membranpotentials (V_M').
- 3) Nachdem die Elektrode wieder aus der Zelle entfernt wurde, sollte sich das Spitzenpotential der Elektrode in der Versuchslösung nicht verändert haben ($U_B = U_B' ?$).
- 4) Das Spitzenpotential der Elektrode in der Zelle (U_S) wird dann indirekt bestimmt, indem die Elektrode in eine Simulationslösung getaucht wird. Diese Lösung ist so gewählt, daß sie der Ionenzusammensetzung in der Zelle entspricht (siehe unten).
- 5) Das tatsächliche Membranpotential errechnet sich dann wie folgt:

$$V_M = V_M' + U_B - U_S$$

c) Konzentration von K^+ und Na^+ in den Zellen

Vom Zentrallabor für chemische Analysen der KFA-Jülich wurde aus drei Zellsuspensionen bekannter Dichte die intrazelluläre Konzentration von K^+ und Na^+ durch Atomabsorptions-Spektroskopie bestimmt. Die Zellen befanden sich in Standardlösung:

$$\begin{array}{lll} [\text{K}^+]_i = 33,6 \text{ mM} & s = 1,7 \text{ mM} & n = 3 \\ [\text{Na}^+]_i = 10,6 \text{ mM} & s = 3,1 \text{ mM} & n = 3 \end{array}$$

(s = Standardabweichung)

Zur Korrektur der Spitzenpotentiale wird deshalb folgende Simulationslösung verwendet:

KCl : 35 mM NaCl : 10 mM

2.2.7 elektrophysiologische Meßanordnung

2.2.7.1 Prinzipschaltbild der 'voltage clamp'

In Abb. 5 ist die elektrophysiologische Meßanordnung einschließlich Zelle und Elektroden im Ersatzschaltbild dargestellt. Die 'voltage clamp' wurde vom Elektronik-Labor des Instituts entwickelt und gebaut (R. Backbier, D. Grammig). Das regelungstechnische Grundkonzept entstand mit Unterstützung des Zentrallabors für Elektronik (ZEL, Dr. W. Brocke) der KFA.

Die Messung des Widerstands der Sensor-Elektrode erfolgt über die kapazitive Ankopplung eines Testsignals: Am Eingang der Sensor-Vorstufe (Impedanzwandler) liegt ein Kondensator. An diesen Kondensator wird eine Sägezahnspannung angelegt, die einen Strom über Kondensator und Elektrodenwiderstand bewirkt. Da der Kondensator mit dem Elektrodenwiderstand ein Differenzierglied bildet, liegen am Eingang der Vorstufe Rechteckpulse an. Die Amplitude dieser Pulse ist dem Elektrodenwiderstand proportional (vgl. Machemer & Grabowski, 1980). Nach diesem Verfahren kann der Widerstand der Elektrode auch nach dem Anstechen einer Zelle gemessen werden. Gleichzeitig ist eine Kontrolle der Kapazitätskompensation möglich: Nur wenn die Streukapazität der Sensor-Elektrode ausreichend kompensiert ist, sind die Pulse rechteckig.

Auf den Impedanzwandler folgt der Differenzverstärker. Am nicht-invertierenden Eingang liegt die Membranspannung an (V_M), am invertierenden Eingang die Kommandospannung (V_K ; vgl. Abschnitt 2.2.7.2).

Nach einem variablen Tiefpaß als Filter folgen PID-Regler (IDS 15, Baur-Elektronik, Meerbusch) und Hochspannungsverstärker. Im

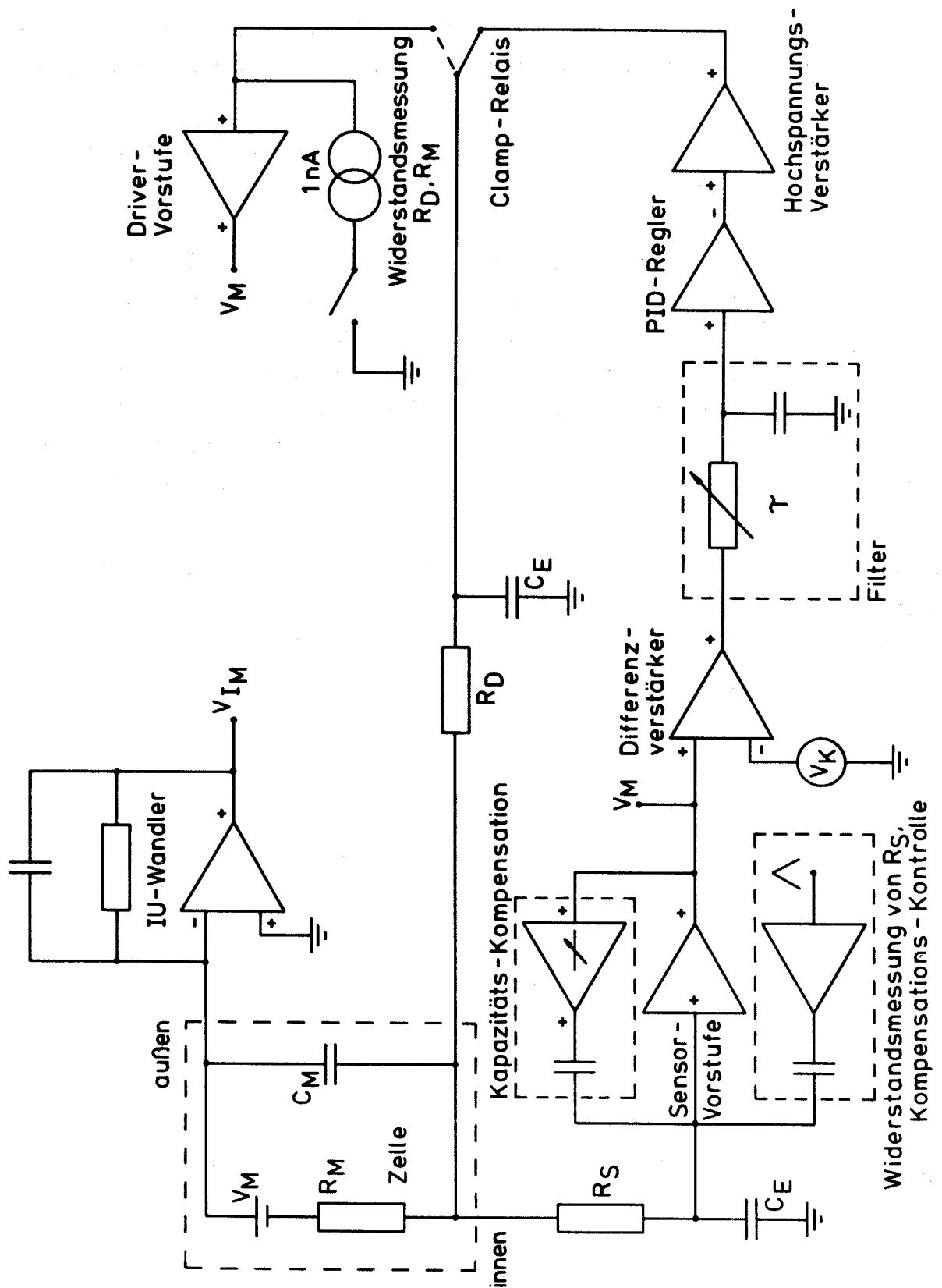


Abb. 5: Ersatzschaltbild von 'voltage clamp', Zelle und Mikroelektroden in der Meßanordnung. Erläuterungen auf S. 22.

Versuch lassen sich I- und D-Anteil des Reglers jedoch nicht verwenden. Beide Komponenten verschlechtern die Spannungsausreglung.

Bei offenem clamp-Relais (freie Membran), kann auch mit dem Driver das Membranpotential gemessen werden. In dieser Relaisstellung erfolgt auch die Widerstandsmessung von Driver-Elektrode (R_D) vor dem Anstich und Membran (R_M): Über eine Konstantstromquelle wird ein Strom von 1 nA durch die Driver-Elektrode geleitet. Der gemessene Spannungsabfall über der Elektrode ist ihrem Widerstand proportional. Nach dem Anstechen mit der Driver-Elektrode bewirkt die Strominjektion eine Verschiebung des Membranpotentials in negative Richtung. Der Grad dieser Hyperpolaration - mit dem Sensor gemessen - ist ein Maß für den Membranwiderstand.

Um das Versuchsbad auch bei schnellen und großen Änderungen des Membranstroms zuverlässig auf 'virtual ground' zu halten, wurde für den IU-Wandler ein breitbandiger Invertier-Verstärker verwendet (BB 3550, Burr-Brown, Filderstadt).

2.2.7.2 Programm-Einheit

Die Programm-Einheit der 'voltage-clamp' liefert die Kommandospannung V_K für den Differenzverstärker (Abb. 5).

Das Ruhepotential von Paramecium weist ständige Fluktuationen von ± 1 bis 4 mV auf. Es empfiehlt sich deshalb, die Zelle vor Beginn einer Meßserie auf das mittlere Ruhepotential zu klemmen und zwischen den Spannungspulsen auf diesem Potential zu belas-

Abb. 5: V_M , R_M , C_M : Membranspannung, -widerstand, -kapazität
 R_S : Widerstand der Sensor-Elektrode
 R_D : Widerstand der Driver-Elektrode
 C_E : Elektroden-Streukapazitäten
 V_K : Kommandospannung
 V_{I_M} : Spannung proportional zum Membranstrom

weitere Erläuterungen im Text

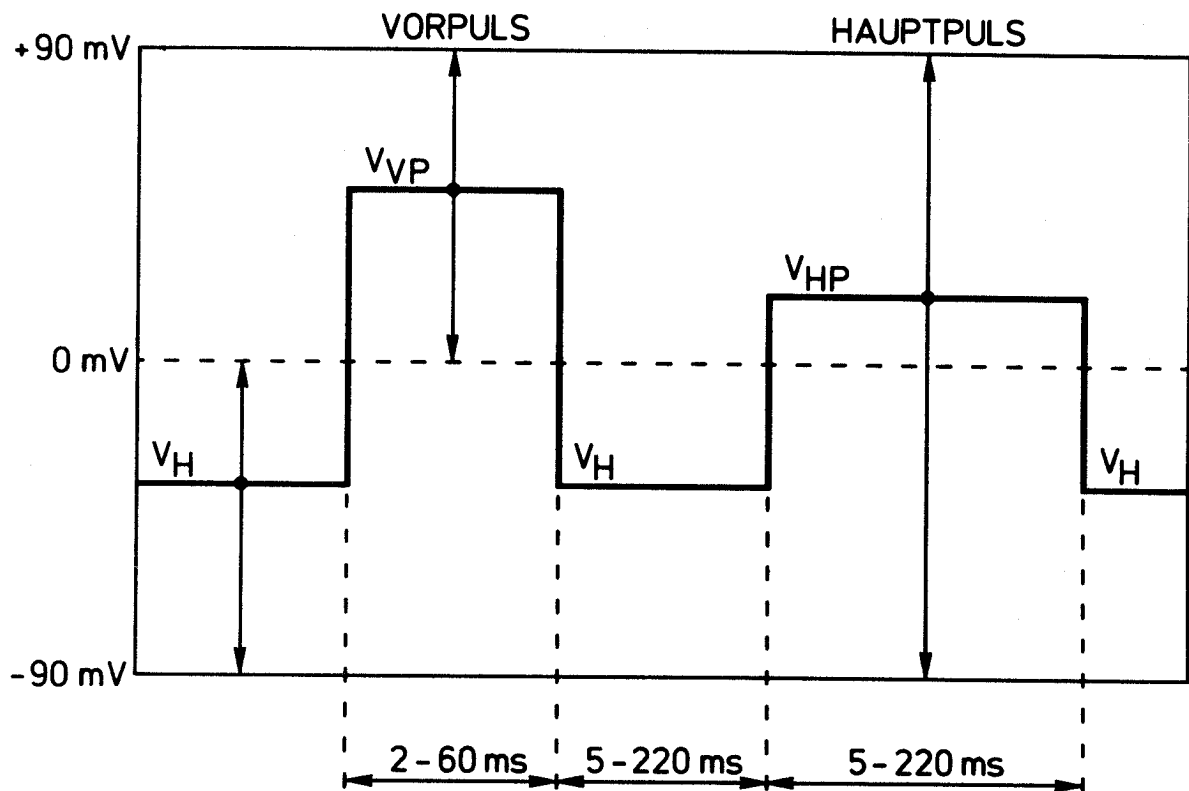


Abb. 6: Schema zu den Bereichen, in denen Haltepotential, Spannung im Vorpuls und Hauptpuls, sowie der Abstand zwischen Vor- und Hauptpuls variiert werden können. Erläuterungen im Text.

sen. Dieses Haltepotential (V_H in Abb. 6) läßt sich von 0 bis -90 mV wählen. Bei der Abschätzung des Ruhepotentials bleibt ein Fehler ohne nennenswerten Einfluß auf die Höhe des Ca^{++} -Stroms, solange er kleiner bleibt als 5 mV (Satow & Kung, 1979).

Vom Haltepotential aus erfolgen Änderungen der Kommandospannung in Form (nahezu) rechteckiger Spannungssprünge (Abb. 6). Die absolute Amplitude ist beim Hauptpuls von -90 bis +90 mV wählbar (V_{HP}) beim Vorpuls (vgl. Abschnitte 2.5.2 und 3.1.1) von 0 bis +90 mV (V_{VP}). Die Dauer dieser Spannungsänderungen kann in folgenden Bereichen variiert werden:

Vorpuls: 2 bis 60 ms Hauptpuls: 5 bis 220 ms

Der Pulsabstand ist zwischen 5 und 220 ms einstellbar.

Die Länge des Hauptpulses betrug in allen Versuchen 60 ms. In den Doppelpulsversuchen wurde mit einem Pulsabstand von 40 ms

oder 60 ms und mit Vorpulsen von 40 ms Dauer gearbeitet.

2.2.7.3 Schwingschutz

Eine optimale Spannungsausregelung ist nur bei kritischer Einstellung des Regelkreises gegeben (vgl. Abschnitt 2.3.1). Bei dieser Einstellung genügen kleinste Änderungen (z.B.) der Streukapazitäten oder des Membranwiderstands, um eine ungedämpfte Schwingung des Systems auszulösen. Hierdurch wird eine Zelle in kurzer Zeit zerstört.

Als sehr hilfreich erwies sich deshalb eine Schaltung (D.Grammig, T. Offermanns), die die Zelle dadurch schützt, daß sie im Fall einer Schwingung das clamp-Relais öffnet. Die Schaltung besteht im wesentlichen aus einem Frequenz/Spannungs-Wandler und einem Komparator, an dem eine variable Spannung anliegt. Über die Höhe dieser Spannung läßt sich die Frequenz einstellen, oberhalb der der Regelkreis unterbrochen werden soll. Eine ungedämpfte Schwingung hat eine sehr viel höhere Frequenz als die normalerweise gemessenen Membranvorgänge. Es läßt sich deshalb eine Einstellung finden, bei der die Schaltung eine Schwingung ausschließt, dabei aber nicht die Messung behindert.

2.2.8 Anzeige und Aufzeichnung

Die Beobachtung und Aufzeichnung der Signale (V_M , V_{IM} ; vgl. Abb. 5) erfolgt mit Hilfe eines 4-Kanal-Speicher-Oszilloskops (Tektronix 5111, Beaverton, Oregon, USA). Der Bildschirm des Oszilloskops wird von einer automatischen Kamera (Recordine 164, Tönnies, Freiburg) mit elektronischem Verschuß (Prontor, Calmbach) über ein Spiegelsystem abfotografiert. Parallel hierzu erfolgt die Aufzeichnung durch einen Thermoschreiber (Helcoscriptor HE-17, Hellige, Freiburg).

2.2.9 Ablaufsteuerung

Die zentrale Timer/Triggereinheit (Eigenbau, INB) steuert zunächst die Compur-Automatik (Eigenbau, INB) an, die daraufhin den Kameraverschuß öffnet (Abb. 1). Danach erfolgt gleichzeitig die Triggierung von Oszilloskop und Programm-Einheit der

'voltage clamp'. Durch das Schließen des Fotoverschlusses wird der Filmtransport der Kamera ausgelöst ('winder'-Betrieb).

2.3 Spannungsausregelung

2.3.1 theoretische Aspekte

Zur Kontrolle des Membranpotentials ist die Erfüllung zweier Grundvoraussetzungen notwendig (Katz & Schwartz, 1974): Zum einen muß die Zelle als elektrische Einheit reagieren, d.h. über alle Teile der untersuchten Membran muß stets dasselbe Potential liegen. Eckert und Naitoh (1970) zeigten, daß bei der Messung von Aktionspotentialen an *P. caudatum* die Lage der Meßelektroden in der Zelle unerheblich und das Cytoplasma somit zu jeder Zeit (nahezu) isopotential ist. Der Spannungsabfall über die Länge einer Cilie ist ebenfalls vernachlässigbar (Dunlap, 1977; Brehm, Eckert & Tillotson, 1980; vgl. Hagiwara & Byerly, 1981). Die erste Voraussetzung ist also wahrscheinlich erfüllt.

Zum anderen muß für eine Untersuchung der Ionenströme, die auf einen Spannungssprung hin erfolgen, die Ausregelung auf das neue Membranpotential erfolgt sein, bevor diese Ströme einsetzen. Die als Folge einer Spannungsänderung auftretenden kapazitiven Ströme sollten zu diesem Zeitpunkt ebenfalls vorüber sein.

Nach Katz und Schwartz ist für eine optimale Spannungsausregelung ('critical damping') das Verhältnis zweier Zeitkonstanten im Regelkreis wichtig. Die erste ist die des Reglers (τ), die zweite ist die des Präparats (τ_L), die sich wie folgt zusammensetzt:

$$\frac{1}{\tau_L} = \frac{1}{\tau_S} + \frac{1}{\tau_i}$$

wobei

$$\tau_S = R_D \cdot C_M$$

$$\tau_i = R_M \cdot C_M$$

R_M ist der Membranwiderstand, C_M die Membrankapazität, R_D entspricht im Paramecien-Präparat dem Widerstand der Driver-Elektrode (Abb. 5). Alle Verstärker werden als ideal betrachtet; die Bandbreite des Reglers sei allein durch die einstellbare

Zeitkonstante τ bestimmt.

Um 'critical damping' zu erreichen, ist Voraussetzung, daß die Differenz zwischen τ und τ_L groß ist. Die absolute Größe beider Parameter ist zunächst ohne Bedeutung:

$$\tau_L \gg \tau; \frac{\tau_L}{\tau} = 48K$$

oder

$$\tau_L \ll \tau; \frac{\tau}{\tau_L} = 48K$$

wobei

$$\beta = \frac{\tau_i}{\tau_i + \tau_s}$$

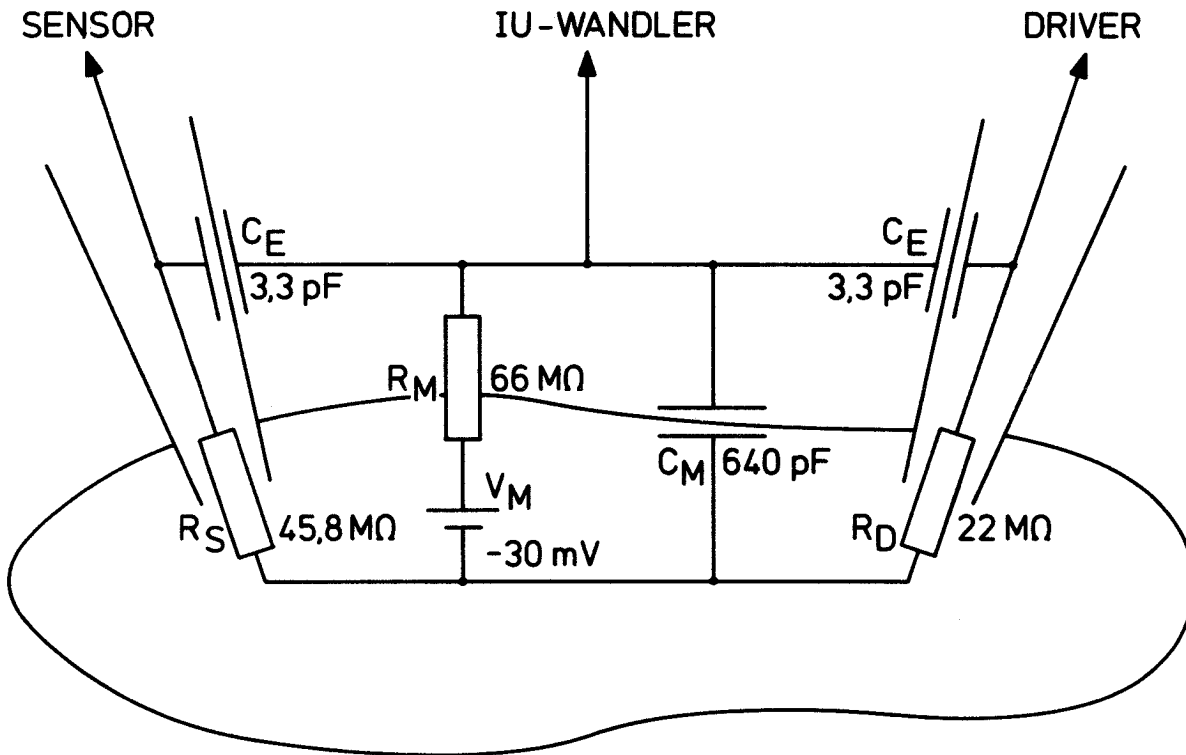


Abb. 7: Ersatzschaltbild eines Parameciums und der beiden Mikroelektroden ('Dummy' ohne spannungsabhängige Erhöhungen der Membranleitfähigkeit)

V_M, R_M, C_M : Membranpotential, -widerstand, -kapazität

R_S : Widerstand der Sensor-Elektrode

R_D : Widerstand der Driver-Elektrode

C_E : Streukapazitäten der Elektroden

K ist die 'open-loop-Verstärkung' des Reglers. Typische Werte eines Paramecien-Präparats (Abb. 7) sind:

$$\tau_L = 10,56 \text{ ms}$$

$$\beta = 0,75$$

Für die beiden möglichen Grenzfälle, die 'critical damping' erlauben, ergeben sich für verschiedene Regelverstärkungen K folgende Werte für τ :

K	τ (für $\tau \gg \tau_L$)	τ (für $\tau \ll \tau_L$)
200	6,3 s	17,6 μ s
500	15,8 s	7,0 μ s
1000	31,7 s	3,5 μ s
2000	63,4 s	1,8 μ s

Man kann weiterhin berechnen, nach welchen Zeiten bei einem Spannungssprung 90 % des Endwertes erreicht worden ist ($t_{90\%}$):

$$t_{90\%} = 7,78 \cdot \tau; \quad \tau_L \gg \tau$$

$$t_{90\%} = 7,78 \cdot \tau_L; \quad \tau \gg \tau_L$$

Für die obigen Verstärkungen bedeutet das:

K	$t_{90\%}$ (für $\tau \gg \tau_L$)	$t_{90\%}$ (für $\tau \ll \tau_L$)
200	82,2 ms	136,9 μ s
500		54,5 μ s
1000		27,2 μ s
2000		14,0 μ s

Am Paramecium treten spannungsabhängige Leitfähigkeitsänderungen im Bereich weniger Millisekunden nach Beginn einer Depolarisation auf (Eckert & Brehm, 1979). Deren Untersuchung ist also nur mit einer 'voltage-clamp' möglich, für die gilt:

$$\tau \ll \tau_L$$

2.3.2 Spannungsausregelung am Dummy

Man versucht normalerweise mit einer möglichst hohen Verstärkung K zu arbeiten, um auch während erregungsbedingter Ströme das Membranpotential möglichst konstant zu halten. In den Versuchen wurde deshalb bei konstantem τ die Verstärkung jeweils soweit er-

höht, bis eine optimale Spannungsausregelung erreicht war. Um τ möglichst niedrig zu halten, wurde ohne Filter gearbeitet; in diesem Fall wird die Zeitkonstante des Reglers nur durch die Zeitabhängigkeiten der Schaltung bestimmt (nicht ideale Verstärker). Hinzu kommt als verlangsamende Komponente die Zeitkonstante der Sensor-Elektrode, deren Kapazität nur im Idealfall zu Null kompensierbar ist. Die Verstärkung kann dann auf den maximal möglichen Wert erhöht werden.

Auf diese Weise lassen sich am Dummy Werte für $t_{90\%}$ bis hinab zu $200 \mu\text{s}$ erreichen (bei einem Spannungssprung von 80 mV). Vollständige Ausregelung der Membranspannung ist in diesem Fall nach ca. $250 \mu\text{s}$ erreichbar. Für die Untersuchung spannungsabhängiger Leitfähigkeitsänderungen bei *P. caudatum* wären diese Zeiten hinreichend klein.

2.3.3 Spannungsausregelung in der Zelle

In der Zelle traten jedoch Einschwingzeiten des Regelkreises von

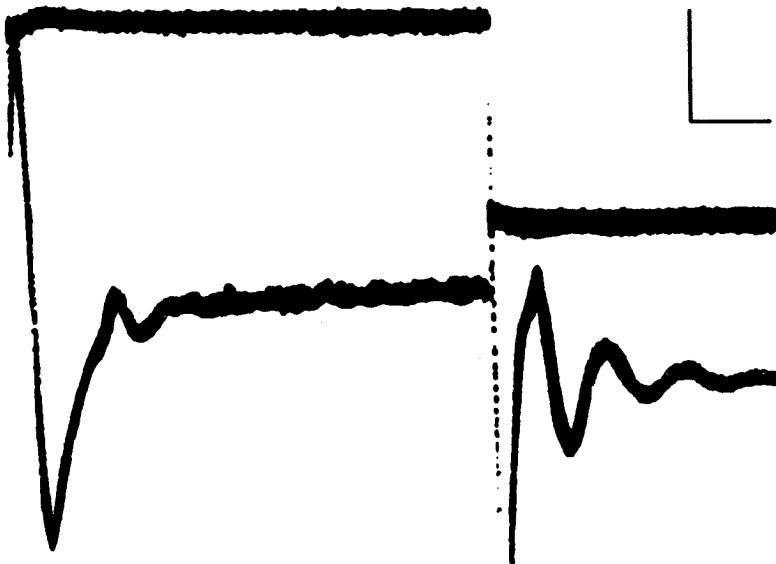


Abb. 8: Einschwingen des Regelkreises in einer Zelle (ohne 'Schild', Elektroden nicht ummantelt).

Kalibrierung: $20 \text{ mV}/10 \text{ nA}$; 10 ms

obere Spur : Membranspannung

untere Spur : Membranstrom

10 bis 20 ms auf (Abb. 8). Obwohl für den Bau des Dummy typische Werte gewählt wurden, stimmt dieser offenbar nicht mit einem Präparat überein. Variationen der Werte für R_D , R_S , sowie für die Streukapazitäten der Elektroden (normalerweise 1 pF/mm Eintauchtiefe) veränderten das Zeitverhalten des Regelkreises mit Dummy nicht wesentlich und scheiden somit für eine Erklärung aus.

Als Ursache für die beobachtete Diskrepanz wurden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen:

- 1) Bekanntlich zeigt Paramecium (im Gegensatz zum Dummy) spannungs- und zeitabhängige Änderungen der Membranleitfähigkeit und stellt somit ein System höherer Ordnung dar. Der Regler ist für Systeme 1. Ordnung geeignet, nicht aber für Systeme höherer Ordnung.
- 2) Es besteht eine Kopplung zwischen Driver und Sensor außerhalb der Zelle. Bei den hohen Spannungen, die am Driver auftreten können (maximal ± 100 V), und dem geringen Abstand zwischen den Elektroden, könnten diese hohen Feldstärken die Spannungsmessung durch den Sensor beeinflussen. Smith, Barker, Smith und Colburn (1980) beschreiben eine kapazitive Kopplung zwischen Driver und Sensor oberhalb der Badlösung. In der Lösung sollte eine solche Kopplung nicht möglich sein, da das Bad auf 'virtual ground' liegt.

2.3.3.1 kapazitive Kopplung außerhalb der Lösung

Eine deutliche Verkürzung der Ausregelungszeiten auf ca. 2 bis 4 ms wurde durch ein senkrecht angeordnetes Edelstahlblech erreicht, das mit Hilfe eines Mikromanipulators zwischen die Elektroden geführt wird (Abb. 3). Dieser Schild reicht bis kurz über die Badlösung herab und wird durch eine Schaltung ('driven shield') zu jeder Zeit auf dem gleichen Potential gehalten wie die Sensor-Elektrode. Zusätzlich zur Abschirmung gegen die Driver-Elektrode wird durch diese Schaltung erreicht, daß die neu entstandene Kapazität zwischen Sensor-Elektrode und Schild ohne Einfluß auf den Sensor bleibt.

Die Ausregelungszeiten in der Zelle mit dem Schild zwischen den Elektroden waren jedoch immer noch nicht ausreichend kurz. Die Annahme lag nah, daß die Kopplung zwischen beiden Elektroden durch den Schild nur teilweise beseitigt wird, zumal der Schild

den Bereich kurz über der Badlösung nicht erreicht, wo der Elektrodenabstand sehr klein ist.

Es wurde deshalb versucht, die Wirkung dieser vermuteten Restkapazität durch eine Schaltung zu kompensieren (R. Backbier).

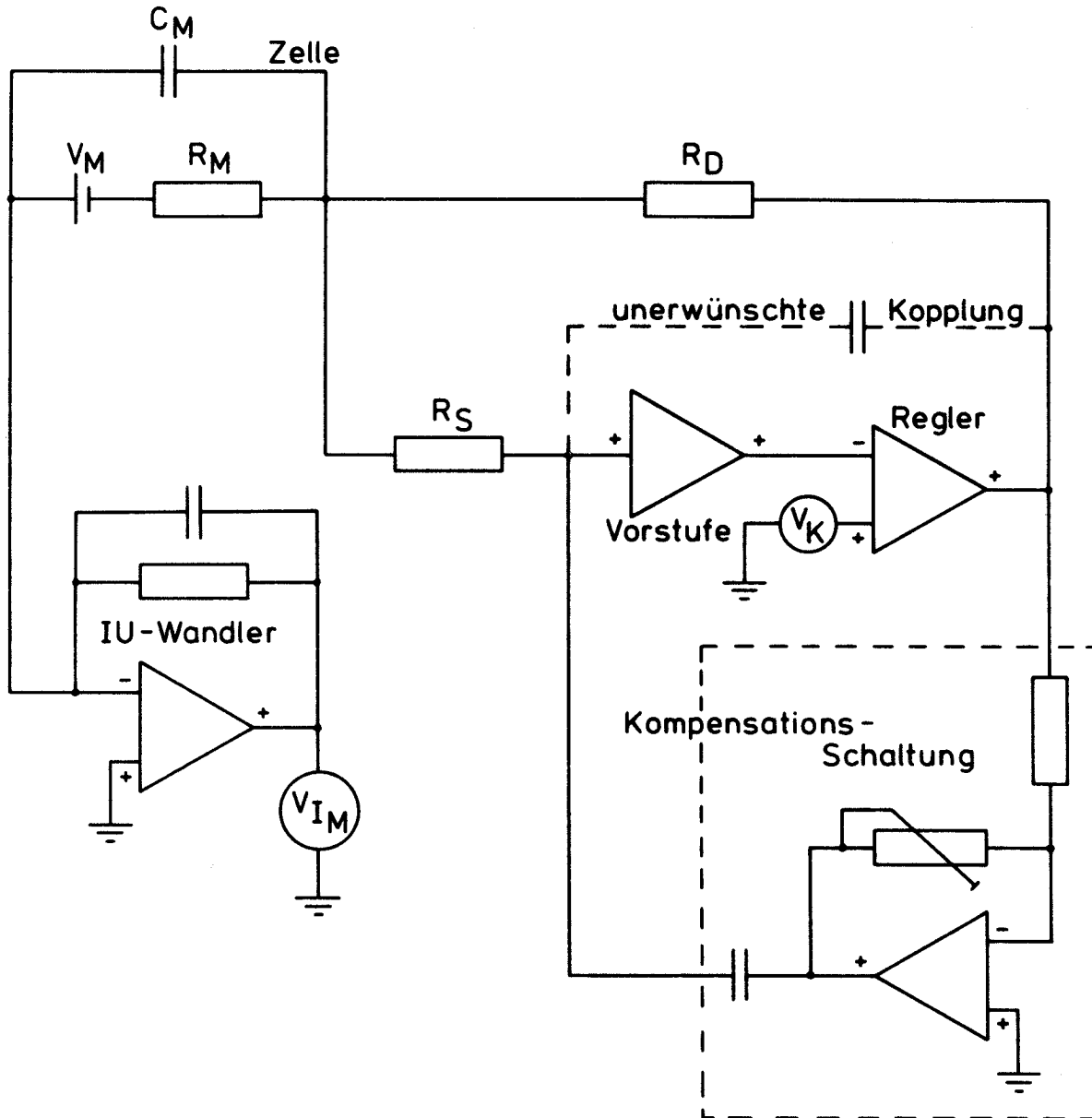


Abb. 9: Ersatzschaltbild zur kapazitiven Kopplung zwischen Sensor- und Driver-Elektrode (oberhalb der Lösung) und die Schaltung zur Kompensation dieser Kopplung. Alle Bezeichnungen wie in Abb. 5.

Abb. 9 zeigt im Prinzipschaltbild die kapazitive Kopplung zwischen den beiden Elektroden und die Schaltung zur Kompensation dieser Kopplung. Durch diese Schaltung wurde jedoch keine weitere Verbesserung erreicht. Die Kopplung zwischen den Elektroden oberhalb der Lösung scheint also durch den Schild in ausreichendem Maße verhindert zu werden. Als Ursache für den verbleibenden Faktor 10, um den die Ausregelungszeit in der Zelle langsamer war als die am Dummy, scheidet diese Kopplung sehr wahrscheinlich aus.

2.3.3.2 Kopplung in der Badlösung

Neben der Vermutung, daß der Regler für Systeme höherer Ordnung ungeeignet ist, verblieb die Möglichkeit einer unerwünschten Kopplung im Bad. Diese könnte sowohl ohmscher Natur sein (vgl. Hamill, Marty, Neher, Sakmann & Sigworth, 1981), als auch kapazitiv. Eine kapazitive Kopplung zwischen den Elektroden im Bad sollte zwar dadurch ausgeschlossen sein, daß das Bad auf 'virtual ground' liegt. Durch den Serienwiderstand der Lösung, der im Bereich von 10 bis 20 k Ω liegt, ist der Punkt zwischen den Mikroelektroden jedoch nicht immer exakt auf dem Potential der indifferenten Elektrode. Diese Unterschiede im Potential könnten eine kapazitive Kopplung ermöglichen.

Weiterhin könnte die Streukapazität der Sensor-Elektrode zu einer Verlangsamung des Systems führen. Die Wirkung dieser Kapazität wird zwar durch eine Schaltung weitgehend kompensiert (Abb. 5), bleibt aber unvollständig, da sich nach Cornwall und Thomas (1981) durch den Längswiderstand in der Elektroden spitze immer ein Teil der Elektrodenkapazität einer Kompensation entzieht (System höherer Ordnung, Abb. 10).

Die Kapazität einer Glasmikroelektrode läßt sich dadurch verringern, daß man durch Auftragen eines Stoffes mit möglichst niedriger Dielektrizitätskonstante den Außenradius der Elektrode nachträglich vergrößert:

$$C = \frac{2 \pi \epsilon \epsilon_0}{\ln \frac{r_2}{r_1}} \quad (\text{zyklindrische Näherung})$$

ϵ = Dielektrizitätskonstante eines nicht leitenden Stoffes

ϵ_0 = Influenzkonstante

r_1 = Innenradius einer Elektrode

r_2 = Außenradius einer Elektrode

Da es sich bei solchen Stoffen um Isolatoren handelt, wird gleichzeitig der Widerstand der Elektrodenwand erhöht.

Die Glaselektroden wurden deshalb nach dem Füllen mit Salzlösung für wenige Sekunden in flüssiges Dentalwachs getaucht und so mit einem dünnen Wachsfilm überzogen (Sachs & McGarrigle, 1980). Es empfiehlt sich, die Temperatur des Wachses so zu wählen, daß sie kurz oberhalb des Schmelzpunkts liegt. Die Oberflächenspannung des flüssigen Wachses ist hier am größten und die Elektroden bleiben im Abstand von 10 bis 20 μm zur Spitze unbedeckt. Weiterhin wird durch die höhere Viskosität eine dickere Wachsschicht gebildet als bei höheren Temperaturen.

Mit so behandelten Elektroden sind in der Zelle bei einem Spannungssprung Ausregelungszeiten bis herab auf ca. 500 μs erreichbar.

Ob die Kopplung in der Badlösung hauptsächlich ohmscher oder kapazitiver Natur war, läßt sich nicht definitiv sagen. Zwei Gründe machen jedoch eine ohmsche Kopplung wahrscheinlicher:

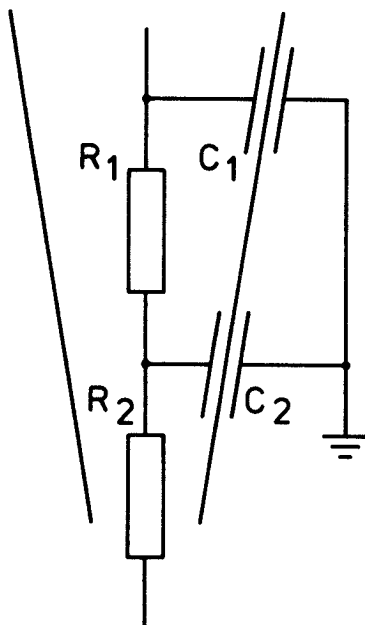


Abb. 10: Ersatzschaltbild einer Glas-mikroelektrode. R_E = Elektrodenwiderstand; C_E = Streukapazität. Durch den hohen Längswiderstand der Elektrode (R_1) kann ein Teil der Streukapazität (C_2) elektronisch nicht kompensiert werden (System höherer Ordnung).

$$R_E = R_1 + R_2$$

$$C_E = C_1 + C_2$$

1) Der Teil der Streukapazität, der sich durch einen hohen Längswiderstand einer Kompensation entzieht, ist auf die äußerste Elektrodenspitze beschränkt und somit im Vergleich zur Gesamtkapazität der Elektrode sehr klein.

2) Eine Verringerung des Abstands zwischen indifferenter Elektrode und Präparat um den Faktor 5 bleibt ohne Einfluß auf die Spannungsausregelung. Der Längswiderstand der Lösung scheint also vernachlässigbar klein zu sein. Ohne diesen ist eine kapazitive Kopplung zwischen den Mikroelektroden innerhalb des Bades jedoch nicht denkbar.

2.3.3.3 das 'coaten' von Glaselektroden

Neben der Methode von Sachs und McGarrigle wurde eine Reihe anderer Verfahren untersucht. Allen gemeinsam ist, daß der Isolator mit einem feinen Pinsel oder Glasstab unter einem binokularen Mikroskop aufgetragen wird. Die Elektroden werden erst nach dem 'coaten' mit Salzlösung gefüllt.

- 1) Wachse in CCl_4 (Cornwall & Thomas, 1981) erwiesen sich wegen langer Trocknungszeiten als ungeeignet.
- 2) 'Stabilit-Express' (Henkel, Düsseldorf). Mit Hilfe dieses Klebers als Elektrodenmantel wurde eine geringfügig schnellere Spannungsausregelung erreicht als mit Dentalwachs. Das schnelle Abbinden des Klebstoffs macht diese Technik jedoch sehr aufwendig. Das gleiche gilt für
- 3) 'UHU-Plus-Sofortfest' (Lingner & Fischer, Bühl).
- 4) Als ideale Kombination erwies sich Nagellack (Margret Astor 'Ultradiamant', Farbnummern 54 und 88) in Verbindung mit dem zugehörigen Verdünner. Die Viskosität läßt sich sehr genau einstellen; die Trockenzeiten sind relativ kurz. Mit wenig Übung lassen sich Elektroden bis auf 30 bis 40 μm Spitzenabstand coaten. Verwendet man so behandelte Elektroden, so lassen sich in der Zelle Ausregelungszeiten von weniger als 300 μs erreichen (Abb. 11).

2.4 Lösungen

Alle verwendeten Substanzen (Merck, Darmstadt) mit Ausnahme des

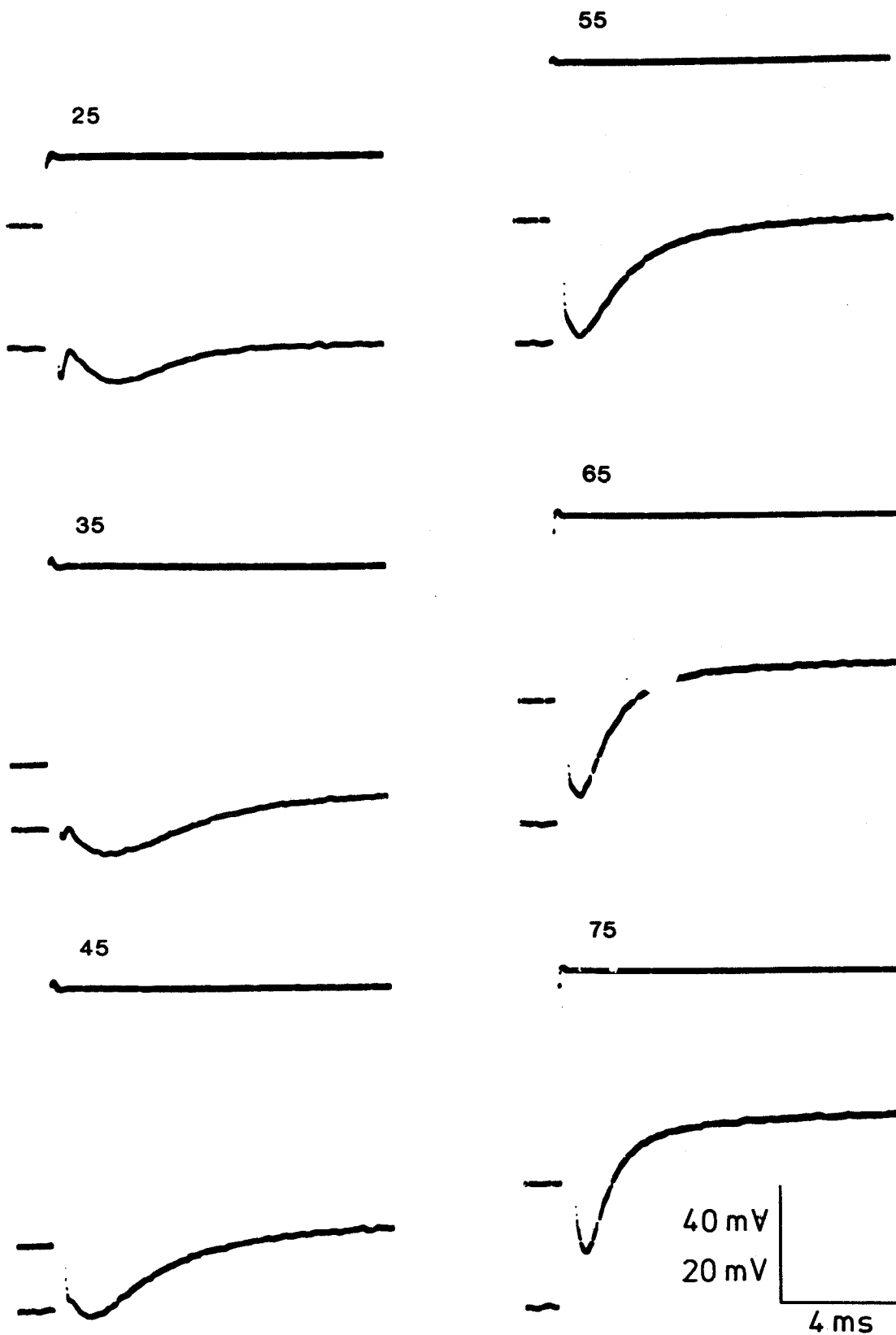


Abb. 11: Erläuterungen auf S. 35

SrCl_2 (reinst; Ca^{++} : 0,1 %; Ba^{++} : 0,01 %) sind von analytischem Reinheitsgrad. Durch Kombination entsprechender Mengen aus Stammlösungen werden Standardlösung und Testlösungen angesetzt. Der pH-Wert der Lösungen wird mit 1 normaler HCl auf 7,2 bis 7,4 eingestellt. Alle verwendeten Testlösungen und die Standardlösung enthalten Tris und KCl (jeweils 1 mM). Die Lösungen unterscheiden sich nur durch die zweiwertigen Ionen, die sie enthalten, bzw. durch deren Konzentration. (Wird in Versuchen die Gesamtkonzentration an zweiwertigen Ionen verändert, so ändert sich allerdings auch die Konzentration an Cl^- -Ionen.)

In den 'Substitutionsversuchen' (vgl. Kapitel 3.2) wird das Ca^{++} in der Badlösung bis auf einen bestimmten Rest durch ein anderes zweiwertiges Ion ersetzt (Sr^{++} , Ba^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++}). Die Gesamtkonzentration an zweiwertigen Ionen bleibt konstant 1 mM.

Anders ist es in den 'Additionsversuchen' (vgl. Kapitel 3.3). Hier wird die Standardlösung im Bad durch eine Testlösung ersetzt, die neben Ca^{++} (1 mM) ein anderes zweiwertiges Ion enthält (Mn^{++} , Co^{++} , Ni^{++}). Die Konzentration dieses zweiten Ions beträgt maximal 500 μM .

In einer anderen Versuchsreihe (Abschnitt 3.4.1) wurde die Standardlösung durch Testlösungen ersetzt, deren Ca^{++} -Konzentrationen 0,33, 0,5 oder 2 mM betrugen.

Bei der Untersuchung der Skorpion-Toxine (Abschnitt 3.1.3) erfolgte deren Zugabe mit Hilfe einer Mikroliter-Pipette direkt in die Badlösung. Die hierbei auftretende Verdünnung der Standardlösung um den Faktor 0,83 wurde vernachlässigt. Die Toxine be-

Abb. 11: Spannungsausregelung in der Zelle (Schild zwischen den Elektroden, Sensorelektrode mit Nagellack gecoatet).

obere Spur : Membranspannung

untere Spur: Membranstrom

Die Zahlen geben die Amplitude des jeweiligen Spannungssprungs in mV an. Die Empfindlichkeit der Stromspuren ist in allen Registrierungen gleich, die der Spannungsspuren ist bei den Depolarisationen um 35 und 45 mV um den Faktor 2 höher als bei den anderen.

fanden sich in wäßriger Lösung (entsalzte Pufferlösung; Maelicke, pers. Mitteilung).

2.5 Versuchsdurchführung

2.5.1 das Anstechen der Zellen

Wenige Zellen werden in einem kleinen Tropfen Standardlösung auf den Glasboden der Versuchskammer gegeben. Man wartet, bis der Tropfen soweit evaporiert ist, daß die Paramecien durch die Oberflächenspannung leicht gegen den Kammerboden gedrückt werden. Durch das Anstechen mit der ersten Elektrode wird die Zelle fixiert und die Versuchskammer sofort geflutet. Es ist danach möglich, mit weiteren Elektroden anzustechen (vgl. Naitoh & Eckert, 1972).

In den Versuchen wird nicht mit einer speziellen Halteelektrode fixiert, sondern direkt mit der Driver-Elektrode. Nach dem Fluten der Kammer wird dann mit der Sensor-Elektrode angestochen, nachdem das Spitzenpotential dieser Elektrode in der Badlösung elektronisch zu Null abgeglichen wurde.

Nach Messung des Membranwiderstands an der freien Membran (vgl. Abschnitt 2.2.7.1) kann mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden.

2.5.2 Reizprogramm

Während der Messungen für eine Strom/Spannungs-Beziehung bleibt die Zelle auf das Ruhepotential geklemmt. Von diesem Haltepotential aus erfolgen die Sprünge auf die an der Programmeinheit vorgewählten Spannungen (Abschnitt 2.2.7.2). Der Abstand zwischen diesen Pulsen beträgt in allen Versuchen 15 s. In einem Teil der Versuche in Standardlösung wurde der Ca^{++} -Kanal durch einen Vorpuls inaktiviert, um während des Hauptpulses den reinen K^{+} -Auswärtsstrom zu messen (vgl. Abschnitt 3.1.1). Bei der folgenden Depolarisation wird der Vorpuls weggelassen und man mißt bei gleicher Amplitude des Hauptpulses den Summenstrom ($I_{\text{Ca}} + I_{\text{K}}$). Durch Subtraktion läßt sich dann der reine Ca^{++} -Einwärtsstrom

selbst in einem Spannungsbereich darstellen, in dem der K^+ -Strom bereits ein Vielfaches des Ca^{++} -Stroms beträgt. Die Zeit zwischen beiden Messungen beträgt auch hier 15 s.

2.5.3 Versuchsablauf

In den Substitutions-, Additions- und Toxin-Versuchen wurden zunächst die Messungen für eine Strom/Spannungs-Charakteristik in Standardlösung durchgeführt (Vorperiode), ebenso in den Experimenten zur veränderten Ca^{++} -Konzentration im Außenmedium. Nach dem Lösungswechsel erfolgt in der Hauptperiode eine entsprechende Serie in der jeweiligen Testlösung. Wenn möglich wird in einer Nachperiode zur Kontrolle erneut in Standardlösung gemessen.

In den Doppelpulsversuchen und in den Experimenten mit der Mutante CNR wurde nur jeweils eine Meßreihe in Standardlösung durchgeführt.

2.6 Auswertung

In allen Serien wurde aus der Strom/Spannungs-Charakteristik der maximale Ca^{++} -Einwärtsstrom ermittelt ($I_{Ca_{max}}$). Da der K^+ -Auswärtsstrom im entsprechenden Spannungsbereich (Depolarisationen zwischen 30 und 35 mV) noch klein ist und dort auch sehr viel langsamer aktiviert wird als der Ca^{++} -Strom, erübrigt sich das Subtraktionsverfahren (vgl. Abschnitt 2.5.2) in den meisten Versuchen.

In den Additions- oder Substitutionsversuchen mit Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} und Ni^{++} tritt der maximale Ca^{++} -Strom in Standardlösung wie in Testlösung bei der gleichen absoluten Membranspannung auf, obwohl das Ruhepotential durch einen Teil dieser Kationen in positive Richtung verschoben wird.

Bei Depolarisationen größer als 35 mV ist die Beziehung zwischen K^+ -Strom (gegen Ende des 60 ms dauernden Pulses) und Membranspannung linear. Verändert sich die Steigung dieser Geraden (= 'slope conductance'), so ist dies ein indirektes Maß für eine veränderte K^+ -Leitfähigkeit (g_K = 'chord conductance'). Auch nach Verschiebungen des Ruhepotentials (s.o.) erfolgt die Aktivierung

der K^+ -Leitfähigkeit in etwa bei der gleichen absoluten Membranspannung (ΔV_m maximal 3 bis 4 mV). Unter dieser Voraussetzung und wegen der linearen Beziehung zwischen K^+ -Strom und Depolarisation bei höheren Spannungen ist eine Veränderung der 'slope conductance' (bei höheren Depolarisationen) gleich einer Veränderung der K^+ -Leitfähigkeit. Δg_K wurde deshalb der Einfachheit halber jeweils über Veränderungen der 'slope conductance' bestimmt. Diese Bestimmung erfolgte in fast allen Versuchen.

Im Subtraktionsverfahren lassen sich die als Folge einer Depolarisation auftretenden Ca^{++} - und K^+ -Ströme voneinander trennen (vgl. Abschnitt 2.5.2). Die Subtraktionen werden mit Hilfe eines Basic-Programms (J. Heinen) an einem Rechner durchgeführt (9845 B, Hewlett-Packard). Hierfür müssen die zu verrechnenden Registrierungen zunächst digitalisiert werden. Ein Schreiber (9872 A, HP) liefert schließlich die Differenzkurve, die die Zeitabhängigkeit des reinen Ca^{++} - (oder Sr^{++} -) Stroms bei einer bestimmten Depolarisation zeigt.

Unter der Voraussetzung, daß sich die K^+ -Ströme zweier Zellen bei gleicher Depolarisation nur in ihrer Amplitude, nicht aber in ihrer Aktivierungskinetik unterscheiden, lassen sich auch Registrierungen aus unterschiedlichen Versuchen miteinander verrechnen (vgl. Sr^{++}). Hierbei erfolgt zunächst eine Normierung, bei der sich der Normierungsfaktor aus dem Amplitudenverhältnis der K^+ -Ströme beider Zellen am Ende der Depolarisation ergibt.

In allen Versuchen wurden die Ca^{++} -Ströme um die Leckströme und die K^+ -Leitfähigkeiten um die Ruheleitfähigkeiten korrigiert.

3 Ergebnisse

3.1 Strommessungen in Standardlösung (Ca^{++})

Wie in der Einleitung dargestellt, kann die Bestimmung der Ca^{++} -Komponente in den gemessenen Summenströmen im Prinzip auf zwei Wegen erfolgen: Zum einen kann man versuchen, den K^+ -Strom durch geeignete Substanzen zu hemmen, um dann direkt den reinen Ca^{++} -Strom zu messen. Aus diesem Grund wurde die Wirkung eines Skorpion-Toxins aus dem Gift von *Centruroides noxius* (Hoffmann) untersucht, das am Squid-Axon die Leitfähigkeit der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle stark reduziert (Carbone, Wanke, Prestipino, Possani & Maelicke, 1982).

Ein indirektes Verfahren besteht darin, den reinen K^+ -Strom zu bestimmen. Dieser wird dann vom zuvor gemessenen Summenstrom subtrahiert und man erhält als Differenz den reinen Ca^{++} -Strom. Zur Bestimmung des K^+ -Stroms wurden verschiedene Verfahren getestet:

- 1) Vor der eigentlichen Messung wird ein kurzer Puls gegeben, der eine Inaktivierung des Ca^{++} -, nicht aber des K^+ -Systems bewirkt (Brehm & Eckert, 1978b; Naitoh, 1979)
- 2) Messungen an einer Mutante von *P. caudatum* (CNR), der eine spannungsabhängige Ca^{++} -Leitfähigkeit fehlt (Takahashi & Naitoh, 1978).
- 3) Herabsetzung der Ca^{++} -Leitfähigkeit durch ein weiteres Toxin von *C. noxius* (Maelicke, pers. Mitteilung).

3.1.1 Inaktivierung des Ca^{++} -Systems durch Vorpulse

Abb. 12 zeigt auf der linken Seite die Membranströme, die als Folge von schnellen Veränderungen des Membranpotentials um +3 bis +105 mV auftreten. Mit zunehmender Depolarisation beobachtet man zunächst einen Ca^{++} -Strom, der etwa bei $\Delta V = 35$ mV sein Maximum erreicht. Bereits bei Depolarisationen um 25 mV tritt zusätzlich ein K^+ -Strom auf, der bei höheren Spannungen schnell größer wird. Beide Ströme überlagern sich und machen so eine Interpretation der Membranvorgänge bei stärkeren Depolarisationen schwierig (Eckert & Brehm, 1979).

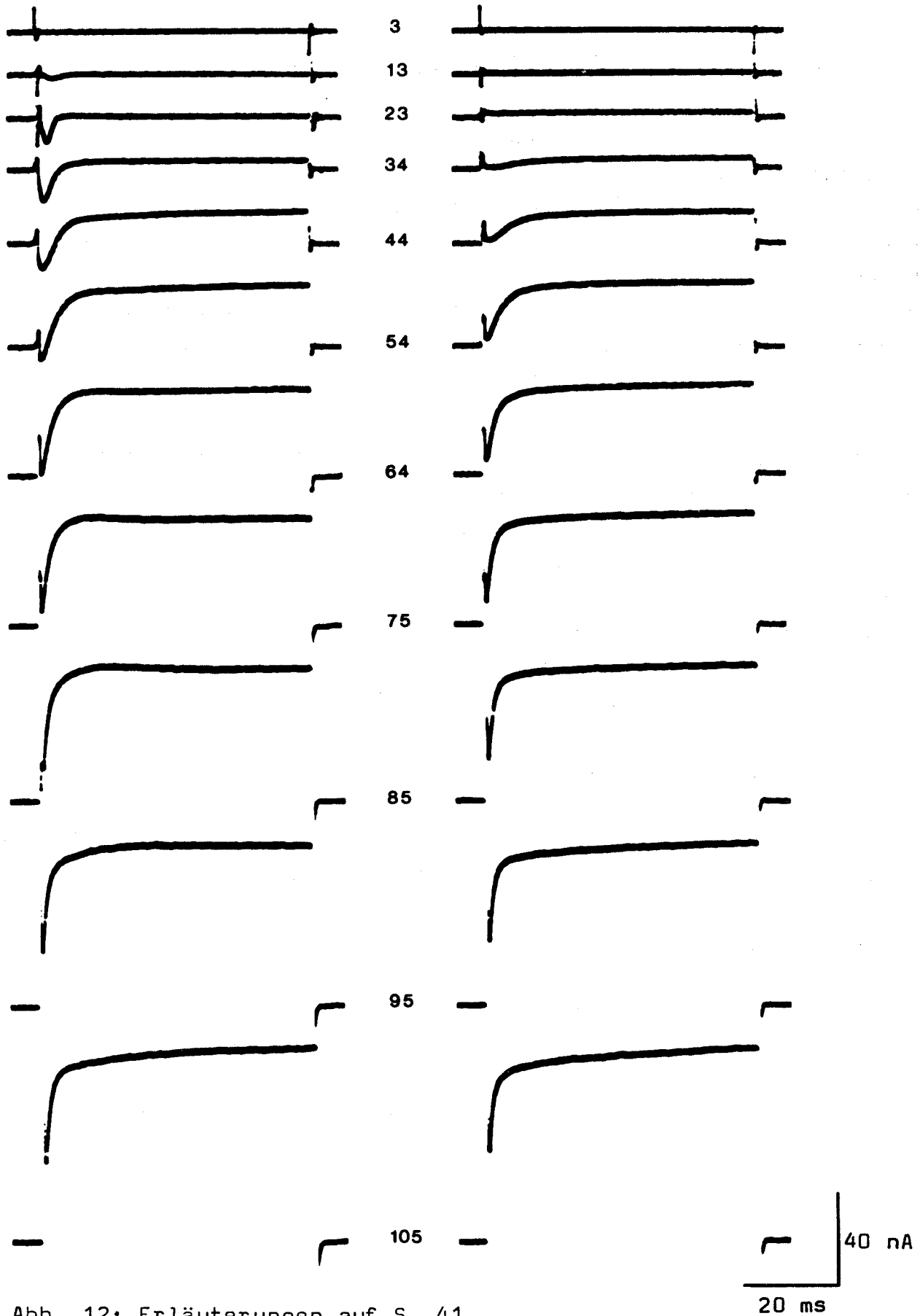


Abb. 12: Erläuterungen auf S. 41

Abb. 12: Membranströme als Folge von schnellen Änderungen des Membranpotentials. Die Zahlen geben die Amplitude der jeweiligen Spannungssprünge in mV an. In B treten keine meßbaren Einwärtsströme auf. Das Ca^{++} -System wurde jeweils durch einen Vorpuls inaktiviert.

Abb. 12 B zeigt die Membranströme bei denselben Depolarisationen wie in Abb. 12 A, jedoch nach Inaktivierung des Ca^{++} -Systems durch einen Vorpuls von 40 ms Dauer und einer Amplitude von 50 mV relativ zum Ruhepotential. Der Abstand zwischen Vor- und Hauptpuls betrug 40 ms. Wie Brehm und Eckert (1978a) zeigten, läßt sich der Ca^{++} -Strom im Hauptpuls durch solche Vorpulse bis auf 5 % des Vergleichswertes reduzieren. Setzt man voraus, daß die Inaktivierung des Ca^{++} -Systems unabhängig von der Höhe der Depolarisation im Hauptpuls ist, so stellen die Registrierungen in Abb. 12 B mit einem kleinen Fehler die reinen K^{+} -Ströme dar. Tatsächlich treten in Serie B keine meßbaren Einwärtsströme auf.

Die Endamplituden der K^{+} -Ströme in beiden Serien sind identisch. Der K^{+} -Strom scheint also durch die Vorpulse nicht beeinflusst zu werden.

Beide Serien wurden an derselben Zelle gemessen. Die Zeit zwischen einer Messung mit und ohne Vorpuls betrug bei jeder Spannung 15 s.

Im Subtraktionsverfahren (vgl. Abschnitt 2.6) wurden von den Summenströmen in Abb. 12 A die K^{+} -Ströme (Abb. 12 B) abgezogen. Die Differenz zwischen den Registrierungen beider Serien ist in Abb. 13 dargestellt. Bis zu Depolarisationen von 105 mV relativ zum Ruhepotential treten Ca^{++} -Ströme auf.

Bei Depolarisationen von 60 bis 100 mV zeigt sich in allen Versuchen eine Auswärtskomponente, die ihr Maximum im Bereich zwischen 70 und 80 mV hat. Mit zunehmender Depolarisation erscheint dieser Auswärtsstrom später.

In Versuchen an CNR-Mutanten (Abschnitt 3.1.2) wurde dieses Phänomen nie beobachtet. Hier war bei der Verrechnung von Serien mit und ohne Vorpuls die Differenz bei allen Spannungen stets gleich Null.

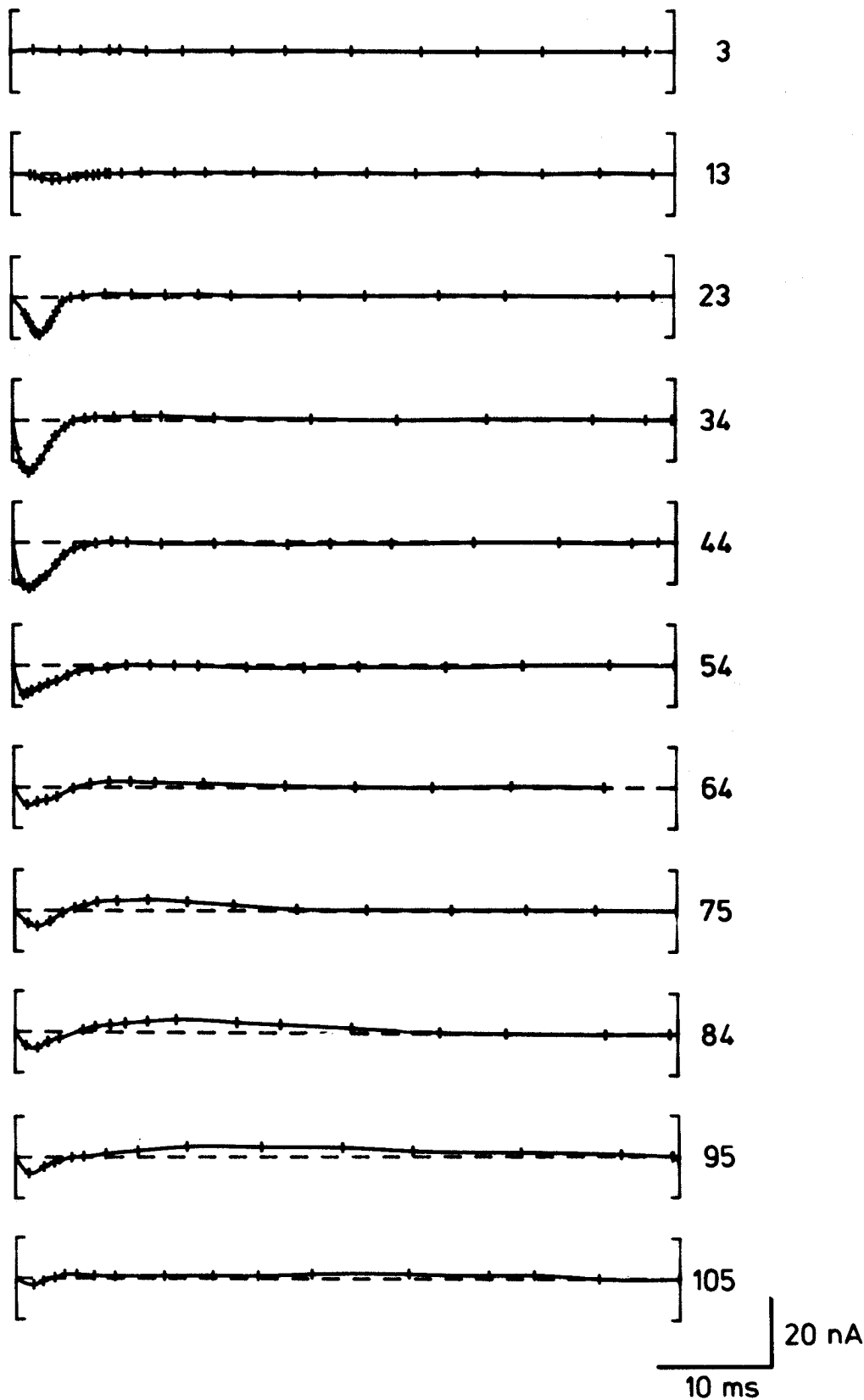


Abb. 13: Differenz der Membranströme aus Abb. 12 (A - B). Die Zahlen geben die Amplituden der Spannungssprünge in mV an.

In Abb. 14 ist die Abhängigkeit des späten K^+ -Stroms, des frühen Stroms und des errechneten Ca^{++} -Stroms von der Höhe der Depola-

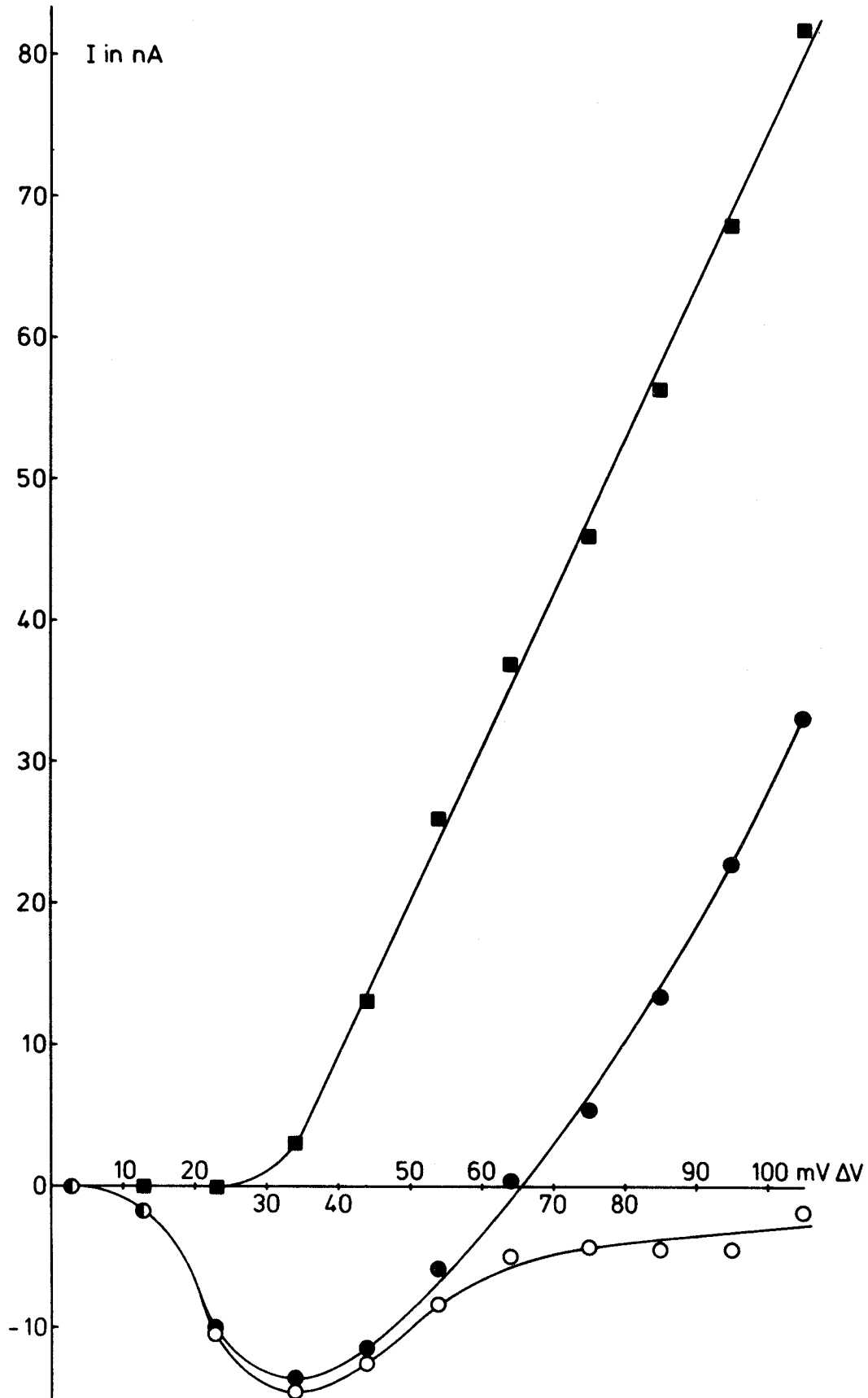


Abb. 14: später K^+ -Strom (■) und früher Strom (●) aus Abb. 12 und der errechnete Ca^{++} -Strom aus Abb. 13 (○) in Abhängigkeit von der Höhe der Depolarisation. Kurvenanpassung von Hand.

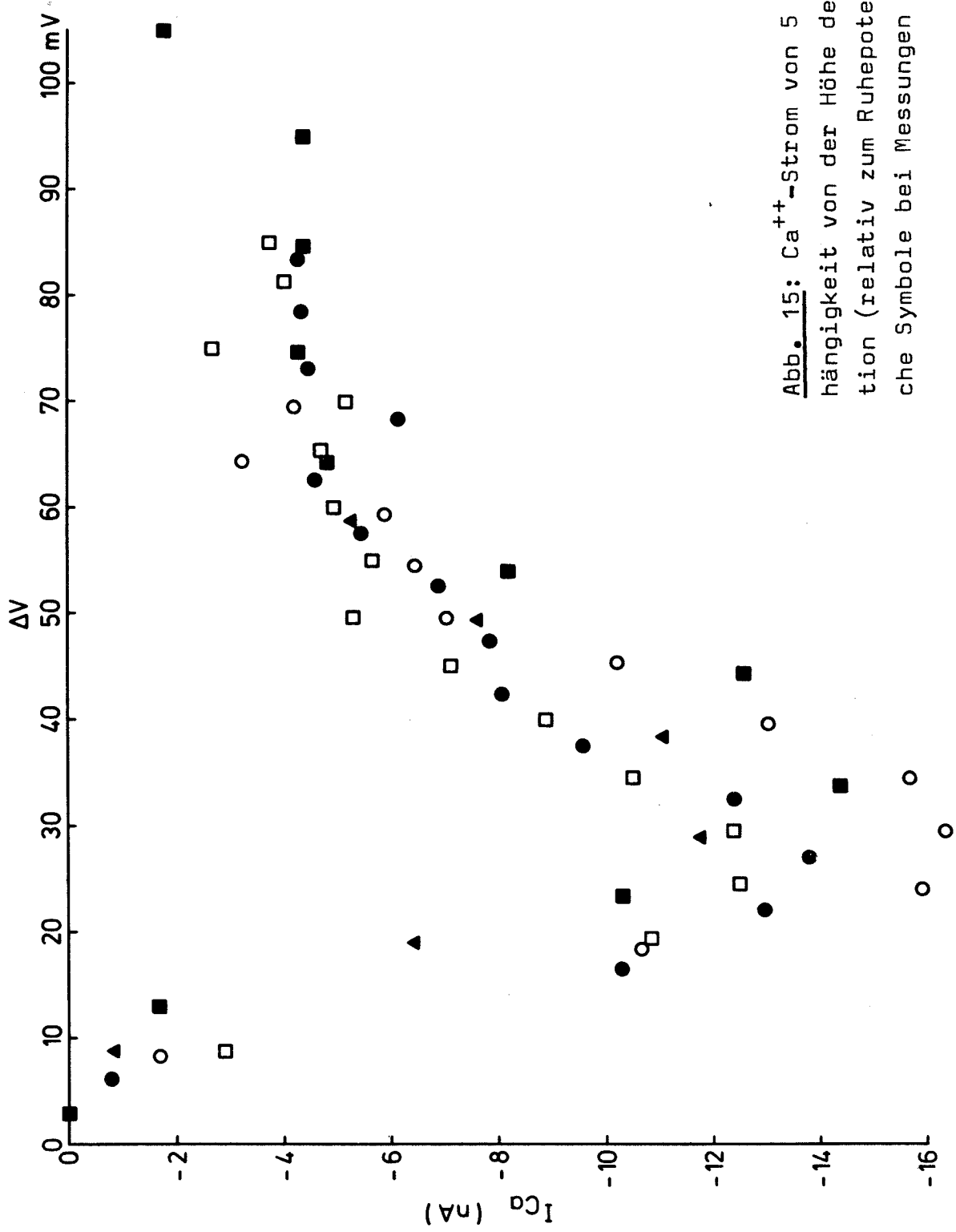


Abb. 15: Ca^{++} -Strom von 5 Zellen in Abhängigkeit von der Höhe der Depolarisation (relativ zum Ruhepotential). Gleiche Symbole bei Messungen an derselben Zelle.

risation dargestellt. Während der frühe Strom bereits bei +65 mV seine Richtung umkehrt, ändert der Ca^{++} -Strom im gesamten Meßbereich sein Vorzeichen nicht.

Im Bereich von +35 mV ist der K^+ -Strom noch klein und wird auch deutlich langsamer aktiviert als der Ca^{++} -Strom (Abb. 12). Sein Einfluß auf die Amplitude des maximalen Ca^{++} -Stroms ist deshalb gering; Ca^{++} -Strom und früher Strom sind bis zu dieser Spannung (fast) identisch.

Mit steigender Depolarisation wird das Subtraktionsverfahren ungenauer. Der K^+ -Strom wird stetig größer und seine Aktivierung erfolgt schneller, während sich der Ca^{++} -Strom verkleinert. Relativ geringe Veränderungen bei den K^+ -Strömen können so zu deutlichen Streuungen bei der Bestimmung der Ca^{++} -Ströme führen. Weiterhin führen Depolarisationen größer als 90 bis 100 mV leicht zur Zerstörung der Zellen.

Bei einer Ca^{++} -Konzentration von 1 mM im Außenmedium und $5 \cdot 10^{-8}$ M in der Zelle (Hildebrand & Dryl, im Druck) liegt das theoretische Gleichgewichtspotential für Ca^{++} bei +123 mV. Bei einem mittleren Ruhepotential von -32 mV müßte man eine Zelle also um 155 mV depolarisieren, um das Gleichgewichtspotential zu erreichen. Der Bereich zuverlässiger Messungen endet jedoch ca. 50 bis 70 mV unterhalb dieser Spannung. Abb. 15 zeigt die Spannungsabhängigkeit der Ca^{++} -Ströme von 5 Zellen im Vergleich. Im Gegensatz zu den frühen Strömen zeigen die Ca^{++} -Ströme keine Tendenz, innerhalb des Meßbereichs ihre Richtung umzukehren.

3.1.2 Messungen an der Defektmutante CNR

In Abb. 16 ist eine Meßreihe an einer CNR-Mutante dargestellt. Meßbare Einwärtsströme treten nicht auf; die K^+ -Ströme sind in der Regel kleiner als beim Wildtyp. Letzteres erklärt sich dadurch, daß die Zellen des Wildtyps im Mittel größer sind als die Mutanten (Länge der CNR-Zellen : $160 \mu\text{m} \pm 10 \%$; Länge der Wildtyp-Zellen : im Mittel $200 \mu\text{m}$; vgl. Abschnitt 2.1.3). Über die Normierung mit dem Computer-Programm (vgl. Abschnitt 2.6) ist eine Subtraktion jedoch auch dann durchführbar, wenn sich die Stromamplituden zweier Zellen bei gleicher Depolarisation von-

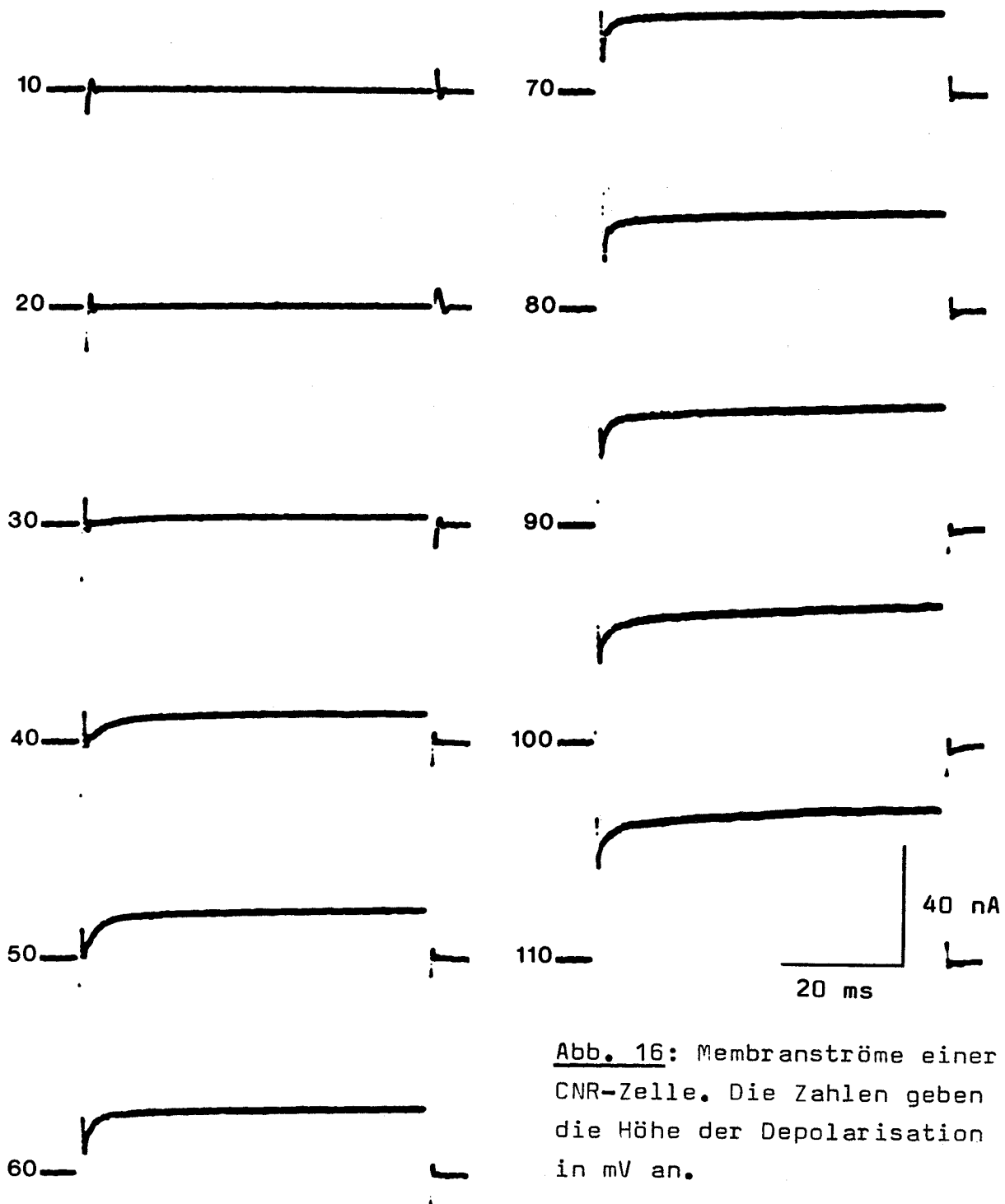


Abb. 16: Membranströme einer CNR-Zelle. Die Zahlen geben die Höhe der Depolarisation in mV an.

einander unterscheiden.

Abb. 17 zeigt das Ergebnis einer solchen Subtraktion. Subtrahiert wurden die Ströme einer Mutante (Abb. 16) von denen einer Wildtyp-Zelle (Abb. 12A). Einen direkten Vergleich dieses Verfahrens mit dem in Abschnitt 3.1.1 dargestellten ermöglicht Abb. 18. Bis

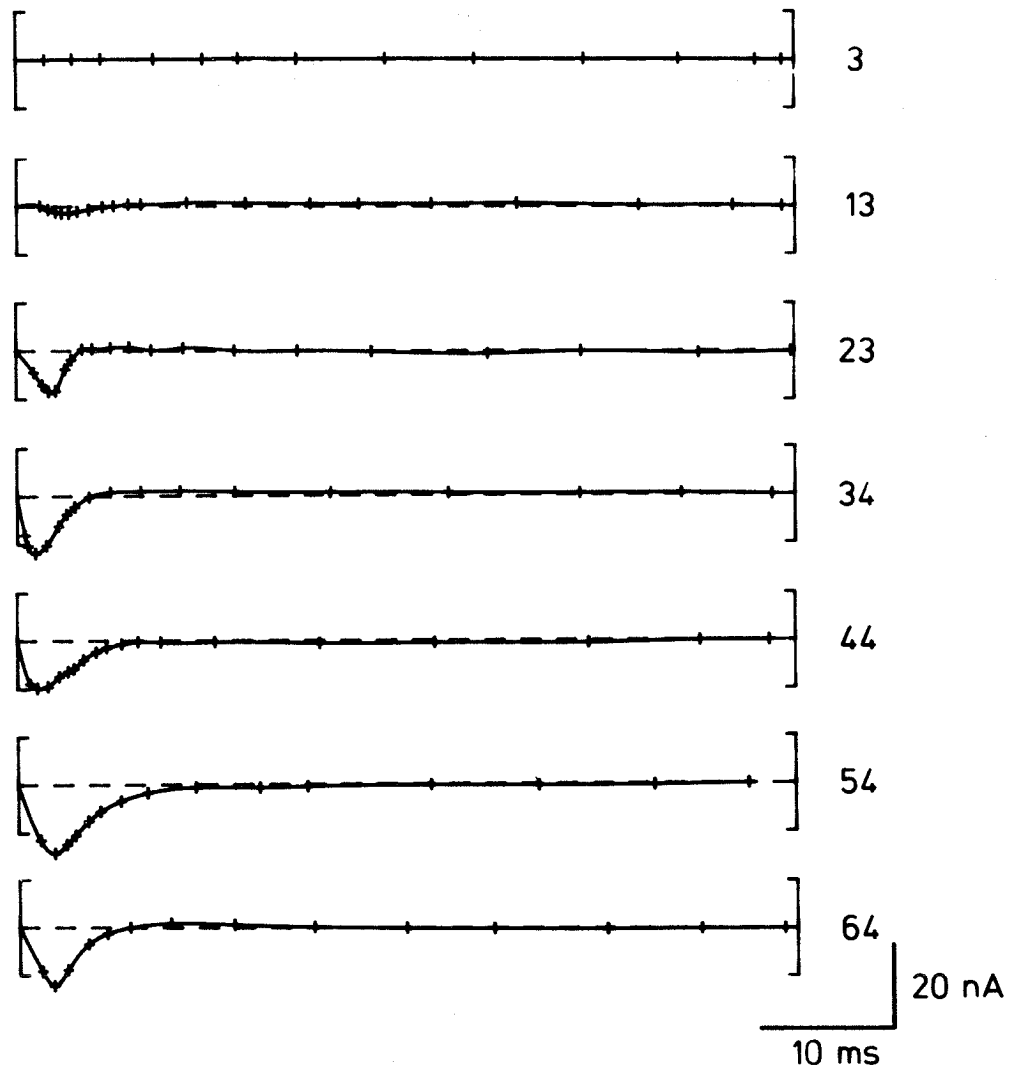


Abb. 17: Einwärtsströme nach Subtraktion der K^+ -Ströme einer CNR-Zelle (Abb. 16) von den Summenströmen einer Wildtyp-Zelle (Abb. 12A). Die Zahlen geben die Depolarisation der Wildtyp-Zelle in mV an. Subtrahiert wurden die CNR-Ströme, die als Folge einer Depolarisation um 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 mV auftraten.

zu einer Depolarisation von 44 mV liefern beide Methoden ähnliche Ergebnisse. Oberhalb dieses Bereichs streuen die Einzelwerte, die durch Subtraktion der CNR-Membranströme ermittelt wurden, deutlich stärker als die aus den Vorpulsversuchen. Das Doppelpulsverfahren, bei dem Ströme derselben Zelle in die Berechnung eingehen, liefert offenbar genauere Ergebnisse.

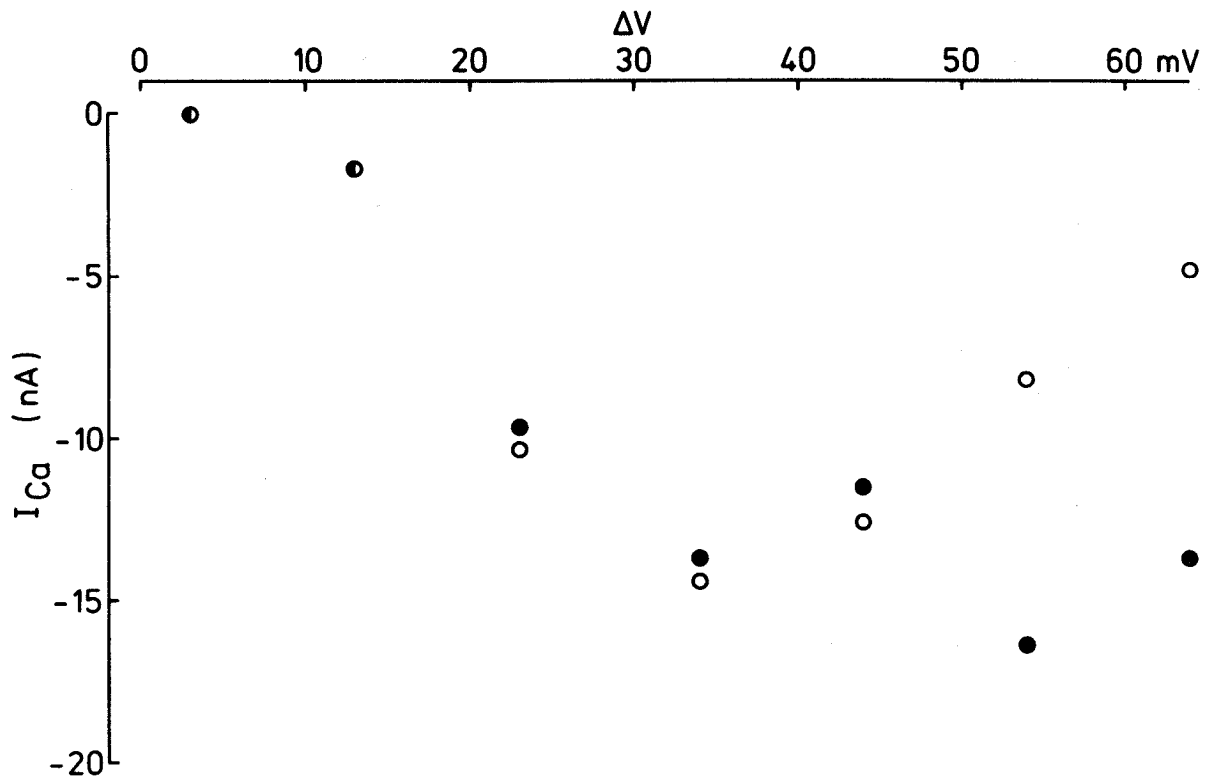


Abb. 18: Vergleich der Ergebnisse aus beiden Subtraktionsverfahren. Von den Summenströmen einer Zelle (Abb. 12A) wurden einmal die K^+ -Ströme subtrahiert, die in einer Vorpulsreihe (Abb. 12B) an derselben Zelle gemessen wurden (O; vgl. Abb. 14), zum anderen die K^+ -Ströme einer CNR-Zelle (●; Abb. 16).

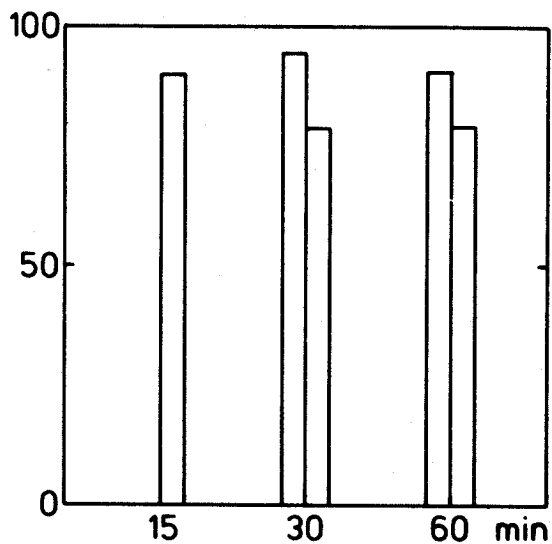
3.1.3 Versuche mit Skorpion-Toxinen

Bei der Bestimmung des Ca^{++} -Stroms mit Hilfe der Doppelpuls-
methode führt das ungünstige Verhältnis zwischen Ca^{++} - und K^+ -
Strömen bei höheren Depolarisationen zu einer starken Streuung
der Ergebnisse. Durch eine spezifische Hemmung der K^+ -Ströme
sollte sich diese Streuung verringern. Eventuell ließe sich dann
auch der Meßbereich zu höheren Depolarisationen erweitern.

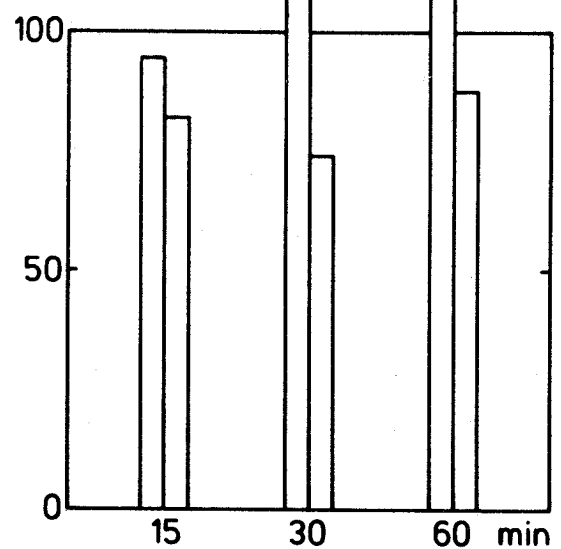
Der Einfluß des Toxins II-11 (vgl. Abschnitt 3.1.1) auf die K^+ -
Leitfähigkeit ist jedoch gering. Bei einer Konzentration von
 10^{-6} M, die am Squid-Axon die späten Auswärtsströme um 75 % re-
duziert (Carbone, Wanke, Prestipino, Possani & Maelicke, 1982),
zeigt sich bei Paramecium kaum eine Wirkung (Abb. 19 A).

(A)

$I_{Ca \text{ max}}$ in %

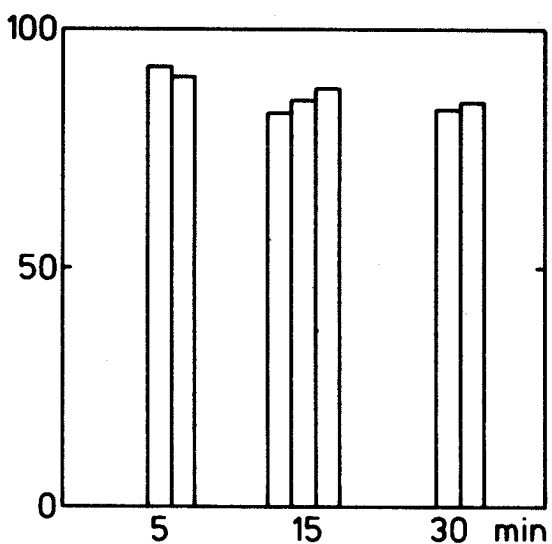


g_K in %



(B)

$I_{Ca \text{ max}}$ in %



g_K in %

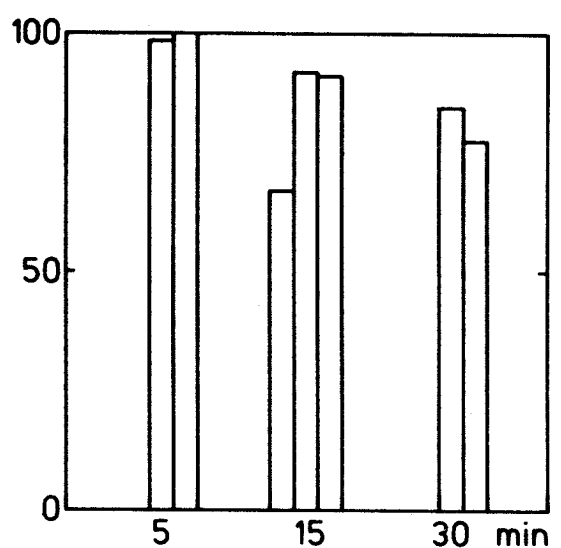


Abb. 19: Wirkung der Skorpion-Toxine II-11 (K^+) und II-9 (Ca^{++} ?) auf den maximalen Ca^{++} -Strom und die K^+ -Leitfähigkeit zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe. Es wurde auf die Werte der Vorperiode in Standardlösung = 100 % normiert.

A: Fraktion II-11: 10^{-6} M

B: Fraktion II-9: 10^{-6} M

Messungen bei höheren Konzentrationen wurden aus folgenden Gründen nicht durchgeführt. Zum einen ist die Gewinnung des Toxins extrem aufwendig (Maelicke, pers. Mitteilung). Zum anderen scheint es nicht spezifisch zu wirken; bei der untersuchten Konzentration ist die Höhe des maximalen Ca^{++} -Stroms in etwa gleichem Maße reduziert wie die K^+ -Leitfähigkeit (Abb. 19A).

Ähnliche Ergebnisse lieferten die Versuche mit der Fraktion II-9. Von diesem Toxin wird vermutet, daß es spezifisch Ca^{++} -Kanäle blockiert (Maelicke, pers. Mitteilung). Die Messung reiner K^+ -Ströme nach Vergiftung der Ca^{++} -Kanäle wäre für das Subtraktionsverfahren interessant (vgl. Abschnitt 3.1.1). Bei einer Konzentration des Toxins von 10^{-6} M wird der maximale Ca^{++} -Strom jedoch nur um ca. 15 % reduziert. Auch dieses Toxin wirkt nicht spezifisch: Die K^+ -Leitfähigkeit wird etwa um den gleichen Prozentsatz reduziert wie der Ca^{++} -Strom.

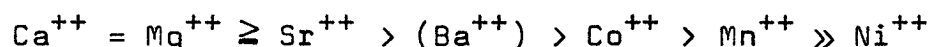
Versuche bei höheren Toxin-Konzentrationen sind nicht möglich, da die Zellen oberhalb 10^{-6} M sehr schnell zerstört werden.

Die Wirkung des Toxins II-9 auf die Amplitude des maximalen Ca^{++} -Stroms und auf die K^+ -Leitfähigkeit ist voll reversibel.

3.2 Membranströme nach Substitution von Ca^{++} im Außenmedium

Eine Verringerung der Ca^{++} -Konzentration im Außenmedium unter 10^{-5} M führt zu einer schnellen Zerstörung der Zellen. Die untere Grenze, bis zu der die Standardlösung ($[\text{Ca}^{++}]_0 = 10^{-3}$ M) durch eine Testlösung ohne Ca^{++} ausgetauscht werden kann, liegt somit bei 1 %.

Zusätzlich zur Abnahme der Ca^{++} -Konzentration werden die Zellen bei einem Lösungswechsel durch die steigende Konzentration des zu testenden zweiwertigen Ions belastet. Ordnet man die untersuchten Ionen entsprechend ihrer Verträglichkeit, so ergibt sich folgende Reihenfolge:



Ba^{++} ist in Klammern gesetzt, weil der Grad seiner Toxizität davon abhängt, wie die Zelle mit diesem Ion in Berührung kommt. Nur wenn das Membranpotential während des Lösungswechsels auf den

Ruhewert geklemmt bleibt, wird verhindert, daß die Zelle durch spontane Depolarisationen von mehreren Sekunden Dauer in kurzer Zeit zerstört wird (vgl. DePeyer & Deitmer, 1980).

Durch die Verträglichkeit der getesteten Ionen wird vorgegeben, bis zu welchem Grad Ca^{++} ausgetauscht werden kann. Nur im Fall von Mg^{++} , Sr^{++} und Ba^{++} war der Austausch bis auf 1 % möglich.

Das Membranpotential von *P. caudatum* hängt sehr von der äußeren Kationen-Konzentration ab (Kamada, 1934; Naitoh & Eckert, 1968a; Naitoh, Eckert & Friedman, 1972). Hierbei scheint die Abschirmung negativer Ladungen auf der Zelloberfläche eine entscheidende Rolle zu spielen (Hook & Hildebrand, 1979; 1980; Eckert & Brehm, 1979). Ein Vorteil des Substitutionsverfahrens besteht deshalb darin, daß die Konzentration an zweiwertigen Ionen im Außenmedium konstant bleibt. Hierdurch sollten sich größere Verschiebungen des Ruhepotentials vermeiden lassen, die eine Interpretation der Versuchsergebnisse sehr erschweren würden (vgl. Hagiwara, 1973).

Weiterhin ist es für die Untersuchung permeierender Ionen wünschenswert, wenn die äußere Ca^{++} -Konzentration möglichst weit herabgesetzt wird.

Ein Nachteil des Verfahrens zeigt sich bei der Untersuchung von Kationen, die den Einwärtsstrom zu hemmen scheinen: Es läßt sich schwer trennen, inwieweit die Herabsetzung des Ca^{++} -Stroms in einer Testlösung auf der Verminderung von Ladungsträgern oder auf einer Hemmung durch das Testion beruht. Vergleichsmessungen ohne Testion bei entsprechend erniedrigten Ca^{++} -Konzentrationen helfen nicht weiter. Das Membranpotential wäre - im Gegensatz zu den Substitutionsversuchen - stark in negative Richtung verschoben (Naitoh, 1974) und ein Vergleich der Ergebnisse schwierig.

3.2.1 Sr^{++}

Bei der Überführung der Zellen in die Sr^{++} -Lösung ändern sich Ruhepotential und Membranwiderstand kaum ($\Delta V_M = -1,2$ mV; Standardabweichung = $s = 5,3$ mV; $\Delta R_M = -9,5$ %; $s = 30$ %; $n = 3$). Eine Verschlechterung des Gesamtzustands tritt auch nach längerer Verweildauer ($>1/2$ h) nicht ein.

In Abb. 20 sind die Membranströme einer Zelle in Standardlösung und in Sr^{++} -Lösung gegenübergestellt. In der Höhe der Einwärtsströme unterscheiden sich beide Serien wenig. Die Endamplituden der Auswärtsströme stimmen ebenfalls gut überein. Die Aktivierung der Einwärtsströme scheint in Sr^{++} -Lösung etwas langsamer zu erfolgen als in Standardlösung (Saimi & Kung, 1982). Der auffälliger Unterschied besteht jedoch in der Dauer der Einwärtsströme. Bei Depolarisationen um 30 mV lassen sich die Zeitabhängigkeiten am besten miteinander vergleichen: Während der Einwärtsstrom in Ca^{++} -Lösung bereits nach 8 bis 10 ms vorüber ist, hält der in Sr^{++} -Lösung etwa um den Faktor 4 länger an (Eckert & Brehm, 1979).

Das Fehlen von 'tail currents' (vgl. Abschnitt 3.2.2) in der Sr^{++} -Lösung ist ein sicheres Zeichen dafür, daß am Ende des Spannungssprungs keine meßbare Leitfähigkeit des spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanals besteht. Dies ist Voraussetzung für die Anwendung des Subtraktionsverfahrens (s.u.).

Der direkte Vergleich von Einwärtsströmen ist bei höheren Depolarisationen nur nach Subtraktion der K^+ -Ströme derselben Zelle möglich. Eine Vorpulsserie könnte möglicherweise auch in Sr^{++} -Lösung die hierfür notwendigen Auswärtsströme liefern, obwohl der Ca^{++} -Kanal in dieser Lösung nicht in gleichem Maße inaktivierbar ist, wie in der Standardlösung (Brehm & Eckert, 1978b; Eckert & Brehm, 1979). Sicher ist die Messung reiner K^+ -Ströme aber in der Vorperiode von Sr^{++} -Versuchen (in Standardlösung) möglich. Da Versuche mit Vorpulsen jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden konnten, liegen entsprechende Ergebnisse nicht vor.

Die Verrechnung von Strömen, die an verschiedenen Zellen gemessen wurden, führt leicht zu fehlerhaften Ergebnissen (vgl. Abschnitt 3.1.2). Offenbar gibt es auch bei gleicher Depolarisation zellspezifisch Unterschiede in der Kinetik, mit der die Aktivierung der K^+ -Ströme erfolgt. Um einen Fehler möglichst gering zu halten, wurde deshalb folgendermaßen verfahren: Aus den Versuchen in Standardlösung, in denen Vorpulsserien gemessen wurden, wurde jeweils der Versuch ausgewählt, dessen Summenströme am besten mit denen aus der Vorperiode (in Standardlösung) eines

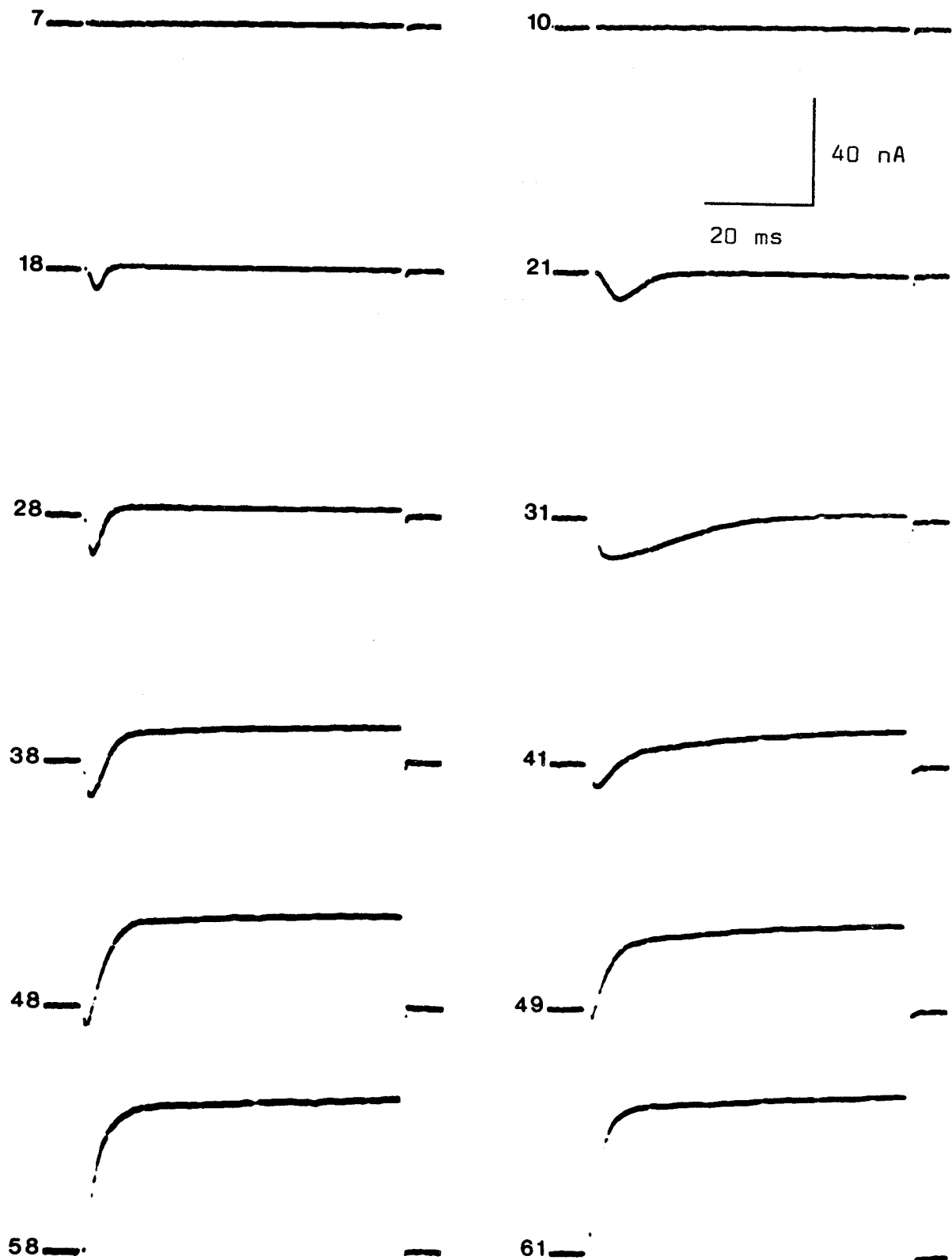


Abb. 20: Vergleich der Membranströme einer Zelle in Standardlösung (links) und Sr^{++} -Lösung (rechts). Die Zahlen geben die Höhe der Depolarisation in mV an.

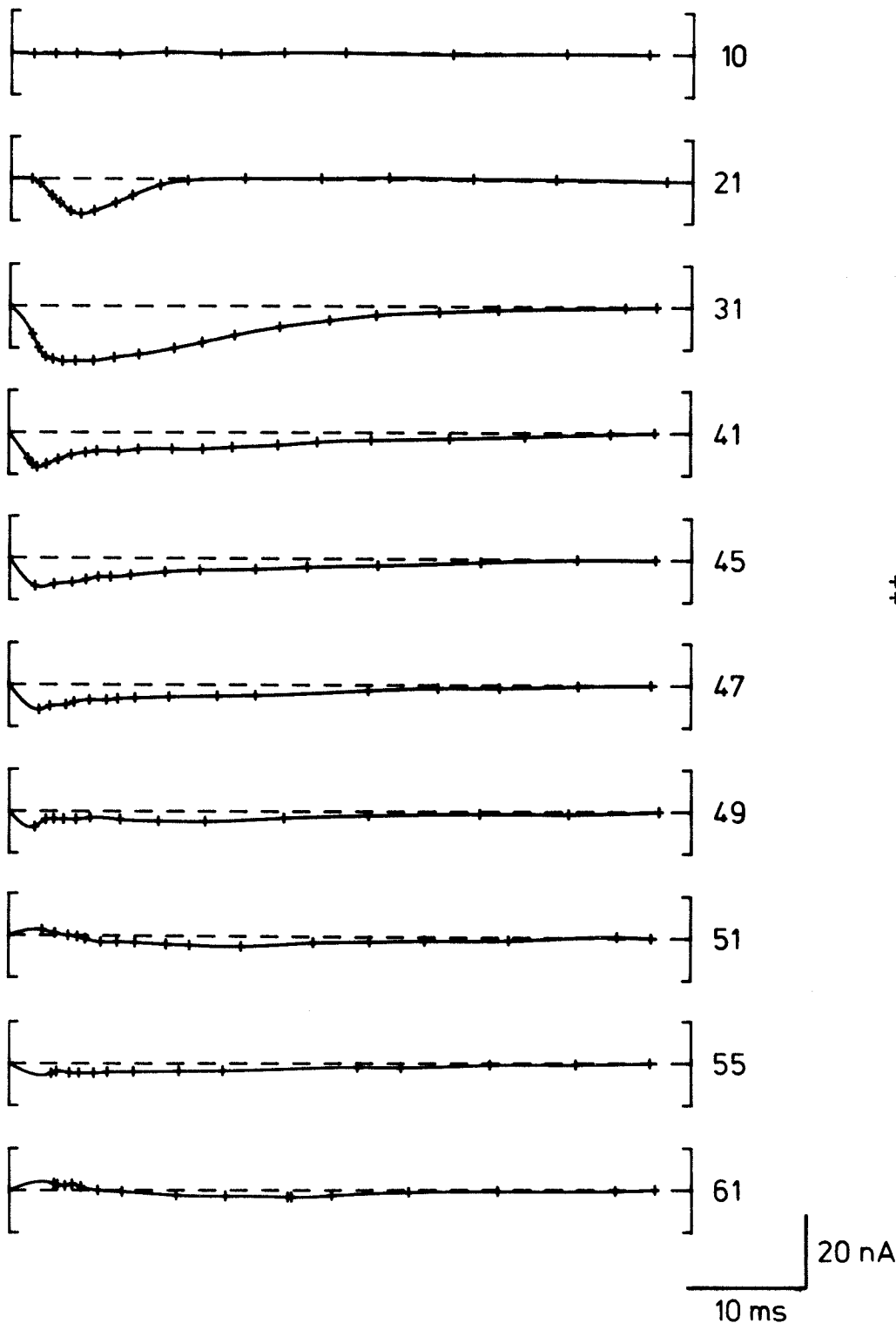


Abb. 21: Einwärtsströme in Sr^{++} -Lösung. Die Zahlen geben die Höhe der Depolarisation in mV an.

Sr^{++} -Versuches übereinstimmten. Für 2 der 3 durchgeführten Sr^{++} -Versuche fanden sich auf diese Weise (fast) deckungsgleiche Registrierungen. Von den Strömen der Vorperiode (Ca^{++}) und der Hauptperiode (Sr^{++}) wurde dann jeweils der Strom der Vorperiode des passenden Versuchs subtrahiert. Auf diese Weise wurden

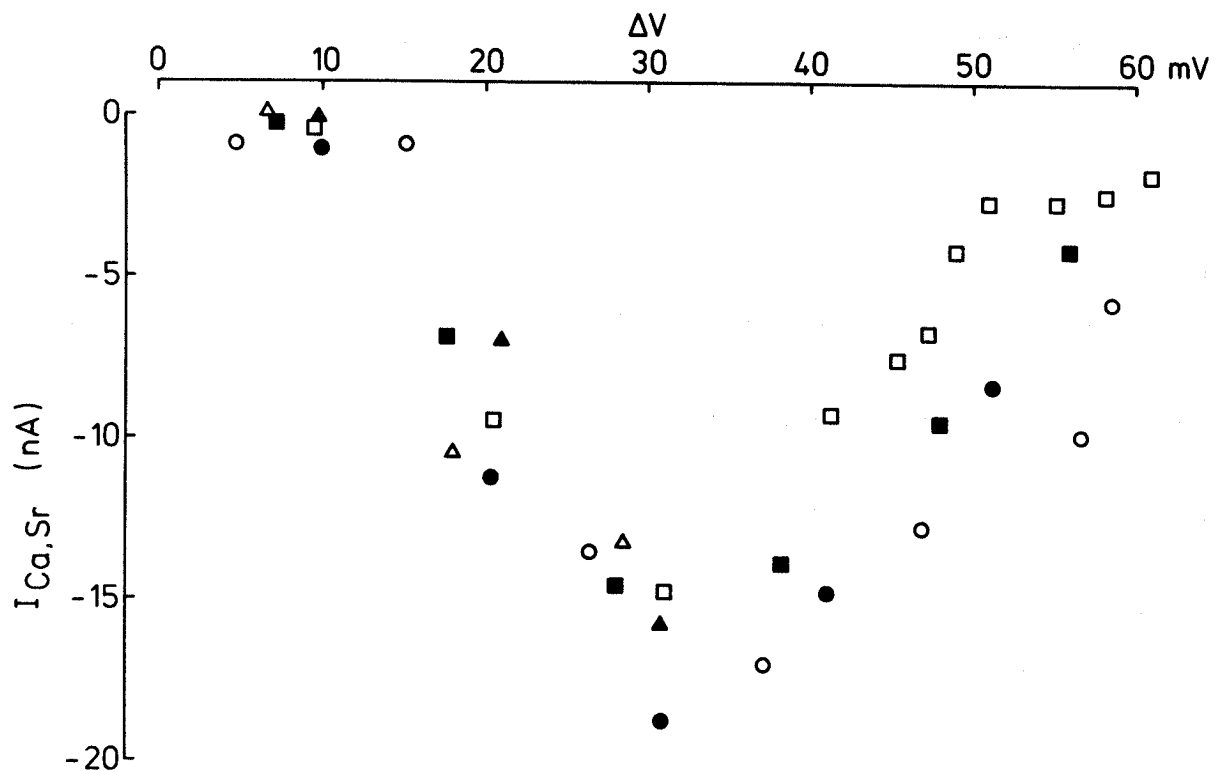


Abb. 22: Einwärtsströme in Ca^{++} -Lösung (ausgefüllte Symbole) und Sr^{++} -Lösung (offene Symbole) von drei Zellen im Vergleich.

die Einwärtsströme in Ca^{++} - und in Sr^{++} -Lösung errechnet.

In Abb. 21 sind die Ströme einer Meßreihe in Sr^{++} -Lösung dargestellt, die nach dem oben geschilderten Verfahren bestimmt wurden. Die Einwärtsströme halten fast bis zum Ende des 60 ms-dauernden Pulses an. In den ersten Millisekunden treten gelegentlich kleine Auswärtsströme auf, bei denen es sich jedoch sehr wahrscheinlich um Streuungs-Artefakte handelt (s.o.).

Während der frühe Strom in Sr^{++} -Lösung bei einer Depolarisation von 60 mV bereits seine Richtung umgekehrt hat, treten berechnete Sr^{++} -Ströme über den gesamten Meßbereich auf.

Abb. 22 zeigt die reinen Einwärtsströme in Ca^{++} - und in Sr^{++} -Lösung von drei Zellen im Vergleich. Obwohl die Werte der Sr^{++} -Serien im oberen Spannungsbereich stärker streuen als die der Ca^{++} -Serien, ergibt sich annähernd die gleiche Verteilung. Insbesondere in Bezug auf Amplitude und Lage der maximalen Einwärts-

ströme unterscheiden sich die entsprechenden Serien kaum (vgl. Saimi & Kung, 1982).

3.2.2 Ba^{++}

In den Versuchen mit Ba^{++} blieben die Paramecien beim Lösungswechsel zwischen Vor- und Hauptperiode auf das Ruhepotential geklemmt. Die spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanäle können sich so nicht öffnen. Auf diese Weise kann man verhindern, daß die Zellen durch spontane Depolarisationen zerstört werden, die sich in Gegenwart von Ba^{++} über mehrere Sekunden hinziehen können. Angaben über Ruhepotential und -widerstand in Ba^{++} -Lösung sind deshalb jedoch nicht möglich.

Die Membranströme einer Zelle in Ca^{++} - und in Ba^{++} -Lösung sind in Abb. 23 gegenübergestellt. Wie man an den Registrierungen in Standardlösung sieht, ist bei einer Depolarisation um 25 mV der Auswärtsstrom noch relativ klein. Unter der Annahme, daß sich daran in Ba^{++} -Lösung nichts ändert, lassen sich die Einwärtsströme in beiden Lösungen bei dieser Spannung direkt miteinander vergleichen. Man sieht, daß der Ba^{++} -Strom bis zum Ende des 60 ms dauernden Pulses anhält und seine Amplitude bis dahin kaum verringert (vgl. Eckert & Brehm, 1979).

Für eine deutliche Ba^{++} -Leitfähigkeit gegen Ende der Pulse sprechen auch die 'tail currents', die in allen Ba^{++} -Serien nach Repolarisation auf das Haltepotential auftreten. In Standardlösung werden weder Einwärts- noch Auswärts-'tail-currents' gemessen. Bei den einwärts gerichteten 'tail currents' in Ba^{++} -Lösung sollte es sich also um Ba^{++} -Ströme handeln. Die zeitliche Abnahme der 'tail currents' erfolgt exponentiell mit einer Zeitkonstanten zwischen 6 und 8 ms, die unabhängig von der Höhe der vorangegangenen Depolarisation ist. Da nach jedem Spannungspuls auf dasselbe Haltepotential repolarisiert wird, ist die treibende Kraft für die Ba^{++} -'tail currents' ($E_{Ba} - V_M$) konstant und unabhängig von der Spannungsamplitude des vorangegangenen Pulses. (Für eine konstante Ba^{++} -Konzentration im Innern der Zelle und somit einen konstanten Wert für E_{Ba} spricht die Tatsache, daß sich die Amplitude der Ba^{++} -Ströme im Verlauf einer Depolarisation

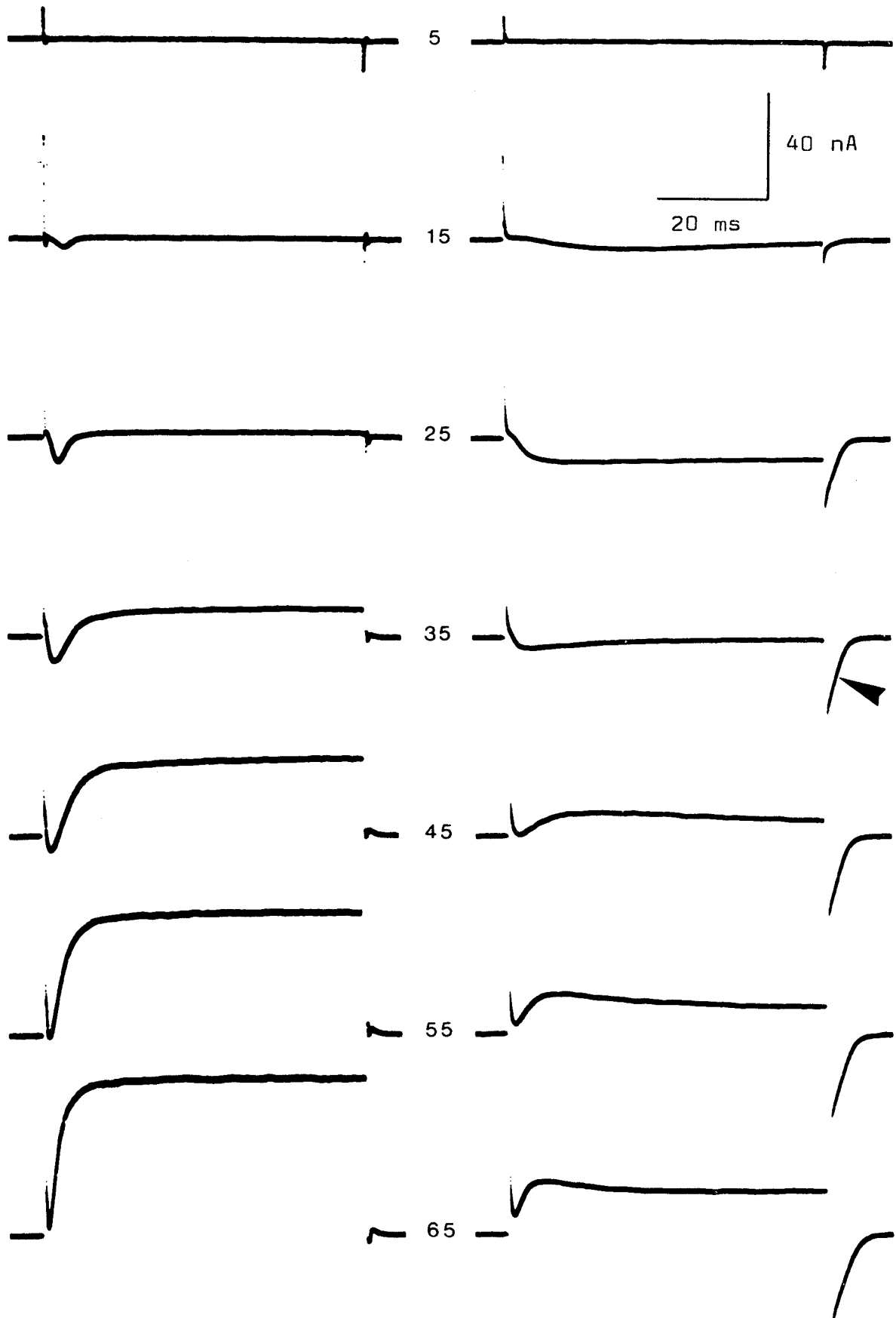


Abb. 23: Erläuterungen auf S. 58

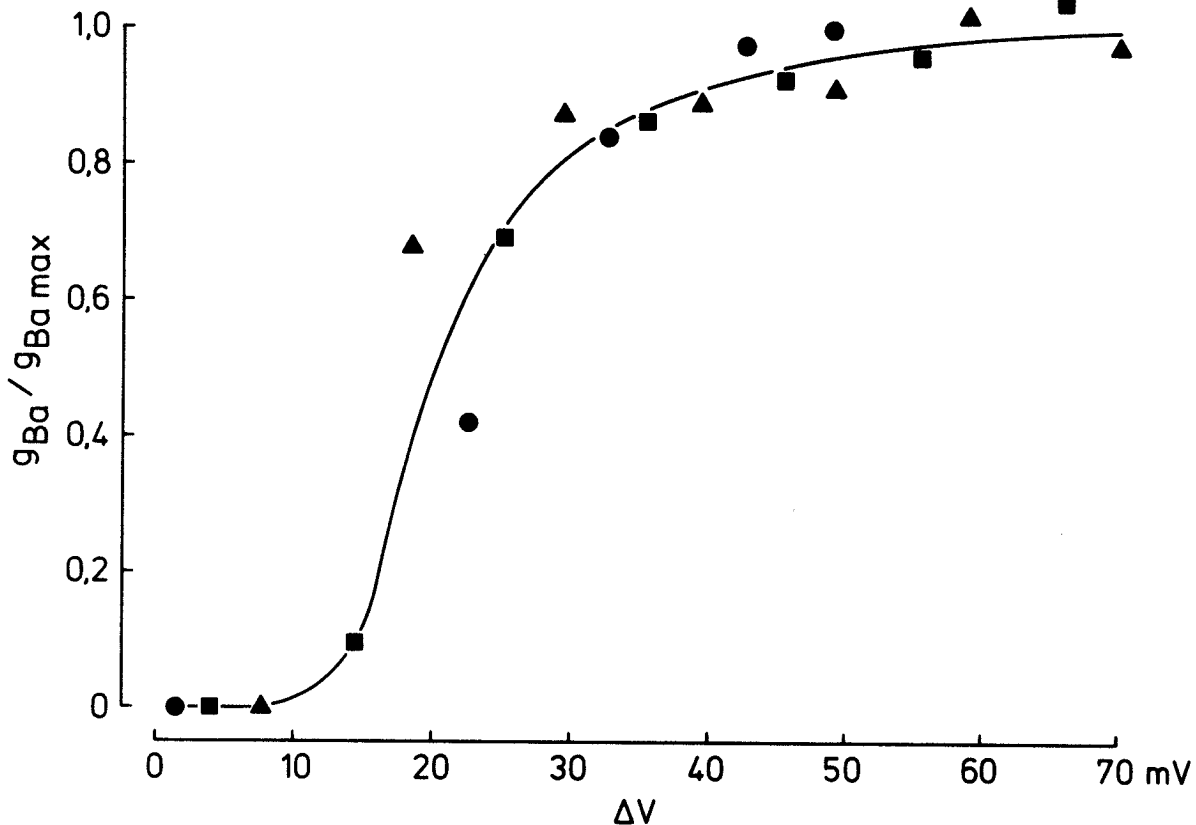


Abb. 24: Abhängigkeit der Ba^{++} -Leitfähigkeit (g_{Ba}) von der Höhe einer Depolarisation. Drei Versuche, gleiche Symbole bei Messungen an derselben Zelle. Normiert wurde auf die Werte zwischen 55 und 70 mV, bzw. auf den Wert bei 49 mV als $g_{Ba \max}$. Kurvenanpassung von Hand. Weitere Erläuterungen im Text.

nicht wesentlich verringert. Weiterhin führen wiederholte, gleiche Depolarisationen zu Ba^{++} -Einwärtsströmen konstanter Amplitude.) Die Höhe der Ba^{++} - 'tail currents' sollte also der Ba^{++} -Leitfähigkeit zu Ende des Spannungspulses direkt proportional

Abb. 23: Vergleich der Membranströme einer Zelle in Standardlösung (links) und in Ba^{++} -Lösung (rechts). Die Zahlen geben die Höhe der Depolarisationen in mV in beiden Serien an. Mit der Rückkehr auf das Ruhepotential nach Depolarisationen größer als 15 mV treten in der Ba^{++} -Lösung deutliche 'tail currents' (Pfeil) auf.

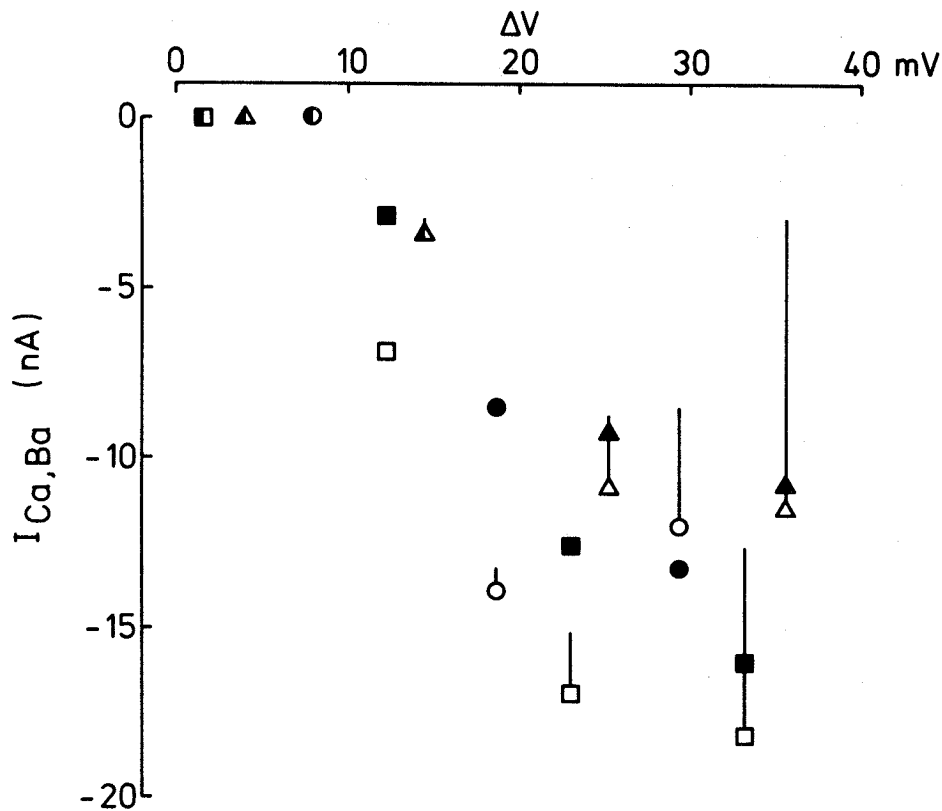


Abb. 25: Einwärtsströme in Ca^{++} -Lösung (ausgefüllte Symbole) und in Ba^{++} -Lösung (offene Symbole) von drei Zellen im Vergleich. Weitere Erläuterungen im Text.

sein ($I_{\text{Ba tail}} = g_{\text{Ba}} \cdot (E_{\text{Ba}} - V_M) = g_{\text{Ba}} \cdot c$). In Abb. 24 ist die Beziehung dieser Leitfähigkeit zur Höhe der Depolarisation während des vorangegangenen Pulses dargestellt. Die Amplitude der Ba^{++} -tail currents wurde 3 ms nach Ende der Pulse gemessen, um Einflüsse kapazitiver Ströme gering zu halten. Es wurde jeweils auf die Werte bei den höchsten Depolarisationen (=1) normiert. Bei Depolarisationen von 30 bis 35 mV, bei denen in Standardlösung der maximale Ca^{++} -Strom auftritt, beträgt die Ba^{++} -Leitfähigkeit 80 bis 90 % und nähert sich bei höheren Spannungen langsam dem maximalen Wert. Bei einer Depolarisation um 20 mV ist etwa 50 % der Ba^{++} -Leitfähigkeit aktiviert. In Standardlösung ist etwa bei dieser Spannung der halbmaximale Ca^{++} -Strom zu beobachten (Abb. 15).

Die Aktivierung der Einwärtsströme zu Beginn einer Depolarisation erfolgt in Ba^{++} -Lösung deutlich langsamer als in Ca^{++} -Lösung (Saimi & Kung, 1982).

Die Spannung, bei der der frühe Strom seine Richtung umkehrt, ist in Ba^{++} -Lösung im Mittel 15 mV negativer als in Standardlösung.

Dadurch, daß der Ba^{++} -Strom bis zum Ende des Pulses offenbar nicht (vollständig) inaktiviert ist, liegen keine Informationen über die Höhe des K^+ -Stroms zu diesem Zeitpunkt vor. Ein Subtraktionsverfahren ist deshalb nicht möglich. Mit den Amplituden der K^+ -Ströme aus der Vorperiode (Standardlösung) kann man aus folgendem Grund nicht arbeiten: Ba^{++} ist auch dann relativ toxisch für die Zellen, wenn das Membranpotential konstant gehalten wird, und bereits eine leichte Schädigung der Zelle setzt erfahrungsgemäß den K^+ -Strom erheblich herab. Die K^+ -Ströme der Hauptperiode sind also möglicherweise von denen der Vorperiode verschieden.

In Abb. 25 wird eine Abschätzung der Ba^{++} -Ströme versucht. Die ausgefüllten Symbole geben die Höhe des Ca^{++} -Stroms aus den Vorperioden an. Die offenen Symbole stellen die Amplitude des Ba^{++} -Stroms unter der Annahme dar, daß sich die K^+ -Ströme in Vor- und Hauptperiode nicht unterscheiden. Der tatsächliche Einwärtsstrom liegt mit Sicherheit zwischen diesen Werten und den entsprechenden Summenströmen, da der K^+ -Strom nicht kleiner als Null sein kann. Diese Spanne ist durch die senkrechten Balken gekennzeichnet. Man sieht, daß nur in dem Bereich sichere Aussagen möglich sind, in dem die Auswärtsströme viel kleiner sind als die Einwärtsströme, d.h. bis maximal +30 mV. Bis zu dieser Spannung sind die Ba^{++} -Ströme oft größer als die Ca^{++} -Ströme (Saimi & Kung, 1982). Dadurch, daß die Maxima der Ströme in Ba^{++} -Lösung jedoch zu einem viel späteren Zeitpunkt auftreten, als die in der Ca^{++} -Lösung, ist ein Vergleich der Ergebnisse und damit eine Interpretation schwierig.

3.2.3 Mg^{++}

Beim Übergang von Standardlösung auf Mg^{++} -Lösung ändern sich Ruhepotential und -widerstand im Mittel nicht ($\Delta V_m = -1$ mV;

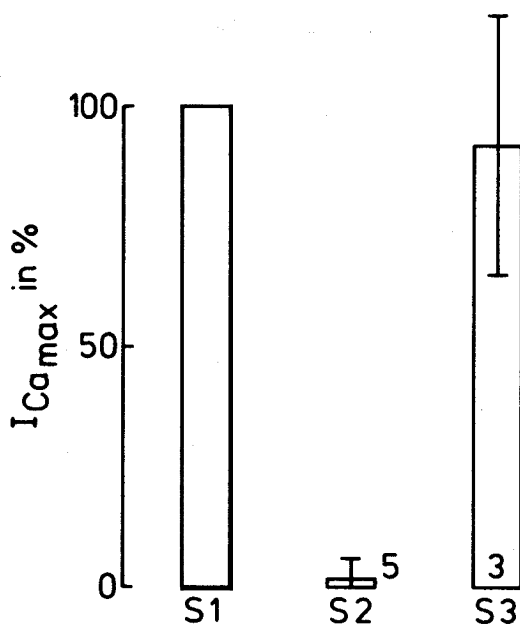


Abb. 26: Der maximale Einwärtsstrom in Standardlösung (S1 = Vorperiode, S3 = Nachperiode) und Mg^{++} -Lösung (S2 = Hauptperiode). Es wurde auf die Werte der Vorperiode (= 100 %) normiert. Die Zahlen an der Basis der Balken für S2 und S3 geben die Anzahl der Messungen an.

$s = 7$ mV; $\Delta R_M = + 0,5$ %; $s = 13$ %; $n = 6$). Die Mg^{++} -Lösung wird von den Zellen ebensogut vertragen wie die Standardlösung.

In den meisten Versuchen tritt in Mg^{++} -Lösung kein meßbarer Einwärtsstrom auf (vgl. Oertel, Schein & Kung, 1977). Im Mittel ist dieser Strom im Vergleich zur Vorperiode auf 1,5 % reduziert (Abb. 26). Dieser Effekt ist voll reversibel.

In den meisten Versuchen erfolgt die Aktivierung der K^+ -Ströme in Mg^{++} -Lösung bereits bei kleineren Depolarisationen als in Standardlösung. Auch die Amplitude der K^+ -Ströme ist in Mg^{++} -Lösung meist erhöht. Die Streuung der Ergebnisse aus verschiedenen Versuchen ist jedoch für eine gesicherte Aussage zu groß.

Abb. 27 zeigt, wie sich die Höhe des maximalen Einwärtsstroms mit dem Verhältnis von Mg^{++}/Ca^{++} im Außenmedium ändert. In diesem Einzelversuch wurde zunächst Ca^{++} durch Mg^{++} ersetzt und während des Austauschs zu verschiedenen Zeiten der maximale Einwärtsstrom bestimmt (ausgefüllte Kreise; normiert wurde auf den Wert der Vorperiode). Nachdem die Standardlösung bis auf 1,5 % ausgetauscht war ($[Mg^{++}]_o = 0,985$ mM), erfolgte ein erneuter Lösungswechsel von Mg^{++} -Lösung auf Standardlösung (offene Kreise).

In den ersten 5 Minuten nach Umschalten auf die neue Lösung sind zuverlässige Angaben zum Konzentrationsverhältnis wegen der

rasch erfolgenden Änderungen (Abb. 4B) nur bedingt möglich. Nach dieser Zeit ist eine Lösung jedoch bis auf etwa 15 % ausgetauscht. Für den mittleren Konzentrationsbereich liegen deshalb keine Werte vor.

3.2.4 Co^{++}

In den Versuchen mit Co^{++} wurde die Wirkung von zwei Testlösungen untersucht. Bei der einen ist die Hälfte des Ca^{++} durch Co^{++} ersetzt (Lösung A), bei der anderen 90 % (Lösung B). Das Ionenverhältnis in Lösung B stellt die obere Grenze dar, bis zu der Ca^{++} durch Co^{++} ersetzt werden kann, ohne daß die Zellen zerstört

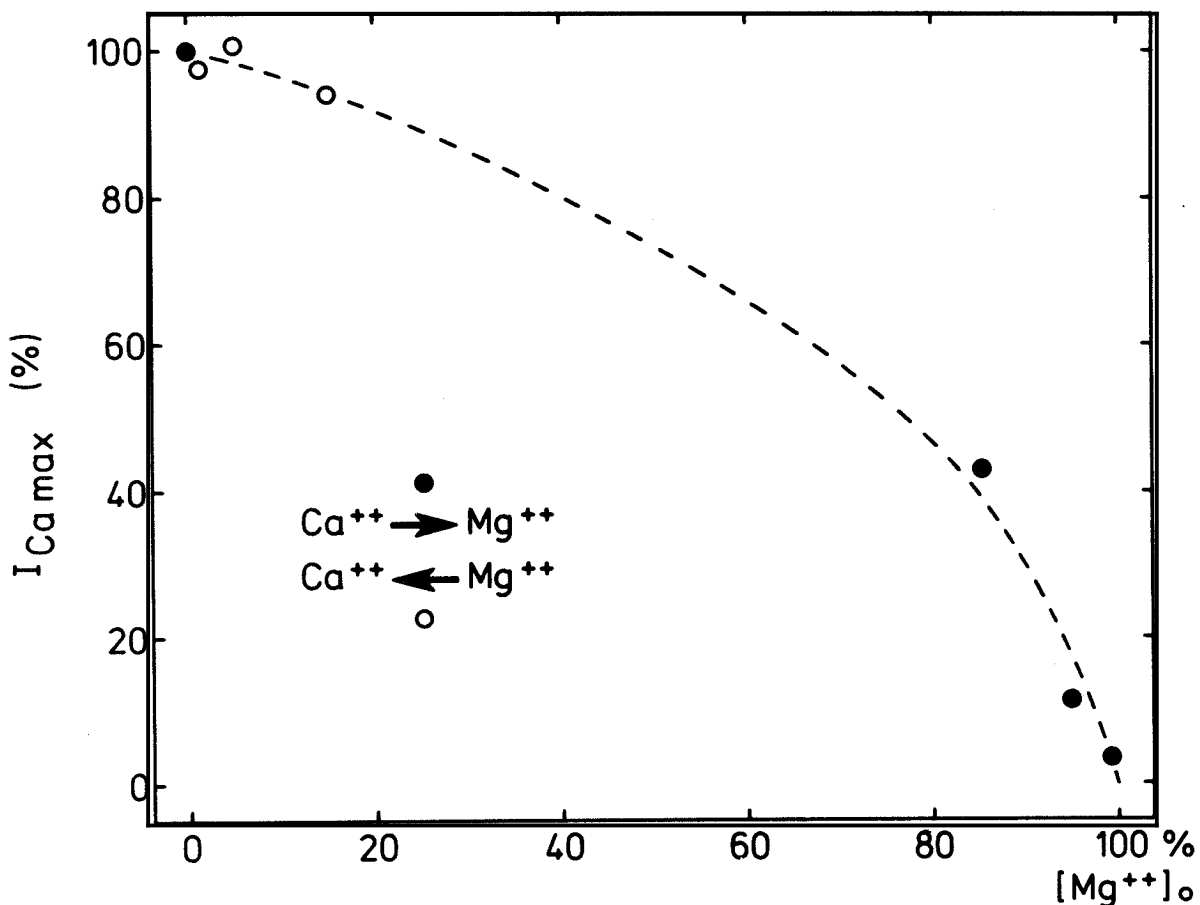


Abb. 27: Der maximale Einwärtsstrom in Abhängigkeit vom Verhältnis $[\text{Mg}^{++}]_0 / [\text{Ca}^{++}]_0$. Im gleichen Maß, wie sich die Konzentration von Mg^{++} erhöht, nimmt die Konzentration von Ca^{++} ab ($[\text{X}^{++}]_0 = \text{const.} = 1\text{mM}$).

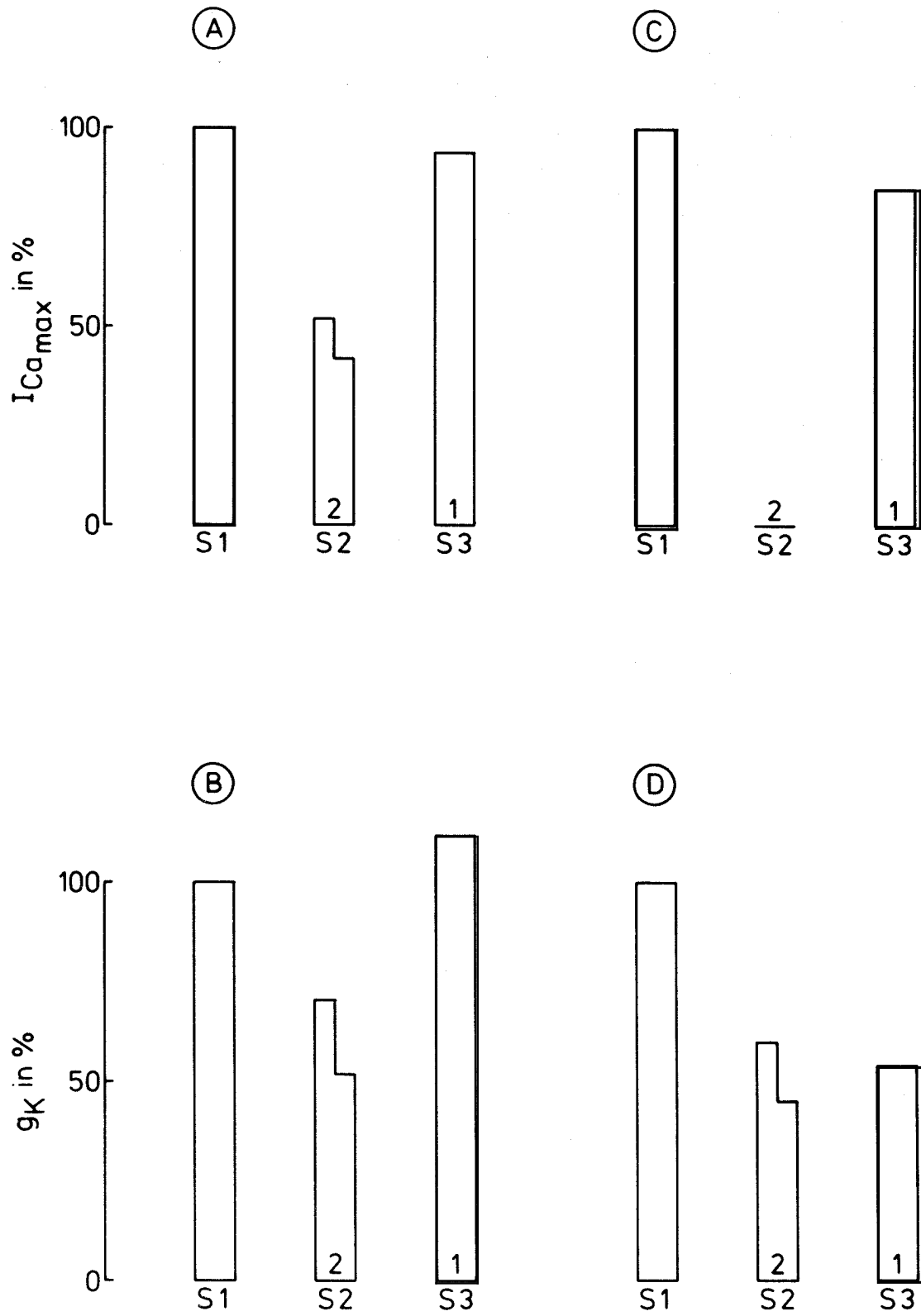


Abb. 28: Erläuterungen auf S. 64

Abb. 28: Die Wirkung von zwei Co^{++} - Ca^{++} -Lösungen auf den maximalen Einwärtsstrom (A und C) und die K^+ -Leitfähigkeit (B und D). Es wurde jeweils auf die Werte der Vorperiode (= 100 %) normiert. S1 und S3: Messungen in der Vor- und Nachperiode. S2: Hauptperiode (Testlösungen: $[\text{Ca}^{++}]_0$ und $[\text{Co}^{++}]_0$ jeweils 0,5 mM in A und B; $[\text{Ca}^{++}]_0 = 0,1$ mM und $[\text{Co}^{++}]_0 = 0,9$ mM in C und D). Die Zahlen an der Basis der Balken geben die Anzahl der Messungen an.

werden.

In Lösung A und B ist das Ruhepotential deutlich positiver als in Standardlösung (Lösung A: $\Delta V_M = +10$ mV in beiden Versuchen; Lösung B: $\Delta V_M = +9,5$ und $+12$ mV). Diese Verschiebung ist reversibel. Allerdings konnte zu beiden Testlösungen nur jeweils in einem Versuch eine Nachperiode (in Standardlösung) gemessen werden.

Der Membranwiderstand ist in Lösung A erhöht ($\Delta R_M = +33$ und $+58$ %). Dieser Effekt ist reversibel (Einzelversuch). Die Widerstandswerte in Lösung B weichen für eine gesicherte Aussage zu stark voneinander ab ($\Delta R_M = -31$ und $+6$ %).

In Lösung A ist der Einwärtsstrom im Vergleich zur Standardlösung um die Hälfte reduziert, in Lösung B tritt kein meßbarer Einwärtsstrom auf (Abb. 28).

Lösung A reduziert die K^+ -Leitfähigkeit im Mittel auf etwa 60 %, Lösung B auf ca. 50%.

Der Einfluß der Lösungen A und B auf den Einwärtsstrom ist (fast vollständig) reversibel. Das gleiche gilt für die Reduktion der K^+ -Leitfähigkeit in Lösung A. Die durch Lösung B herabgesetzte K^+ -Leitfähigkeit erholt sich in der Nachperiode jedoch nicht.

3.2.5 Mn^{++}

In Abb. 29 ist die Wirkung einer Ca^{++} - Mn^{++} -Lösung auf den maximalen Einwärtsstrom und die K^+ -Leitfähigkeit dargestellt. Die Konzentration beider Ionen in dieser Lösung betrug 0,5 mM. Der Einwärtsstrom ist auf etwas über 50 %, die K^+ -Leitfähigkeit auf ca. 70 % reduziert.

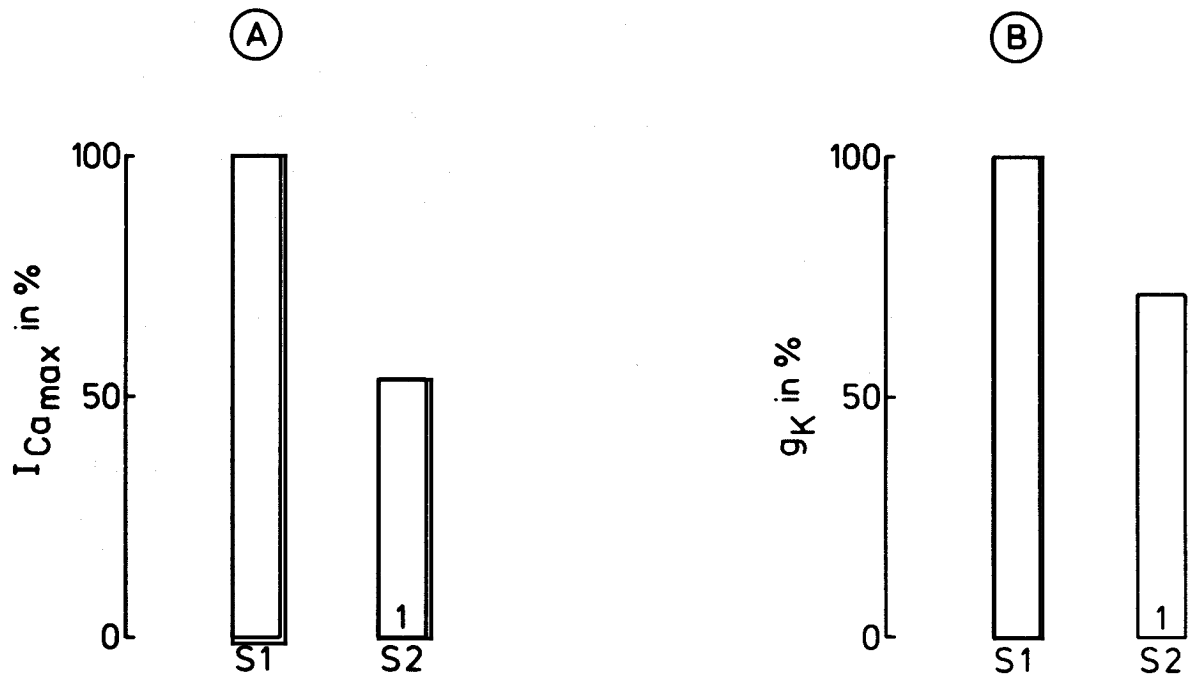


Abb. 29: Einzelversuch zur Wirkung einer Ca^{++} - Mn^{++} -Lösung (Konzentration beider Ionen = 0,5 mM) auf den maximalen Einwärtsstrom und die K^+ -Leitfähigkeit.

S1: Vorperiode in Standardlösung

S2: Hauptperiode in Ca^{++} - Mn^{++} -Lösung

Es wurde jeweils auf den Wert der Vorperiode (= 100 %) normiert.

Eine Substitution von Ca^{++} über das angegebene Verhältnis hinaus ist nicht möglich, ohne die Zellen in kürzester Zeit zu zerstören. Auch die verwendete Ca^{++} - Mn^{++} -Lösung führte bei fast allen Zellen zu einer schnellen Zerstörung. Zu Mn^{++} liegt deshalb auch nur ein einzelner Substitutionsversuch vor. Die Messung einer Nachperiode gelang in diesem Versuch nicht.

Wie in den Co^{++} -Versuchen verschob sich das Ruhepotential beim Übergang auf die Testlösung um 10 mV in positive Richtung. Der Ruhewiderstand war im Vergleich zur Vorperiode um 23 % erhöht.

3.2.6 Ni^{++}

Die Toxizität von Ni^{++} ist noch deutlich höher als die von Mn^{++} .

In den Additionsversuchen (vgl. Abschnitt 3.3.3) stellte sich später heraus, daß die obere Ni^{++} -Konzentration, die von den Paramecien in den Versuchen vertragen wird, bei $50 \mu\text{M}$ liegt. Selbst bei dieser geringen Konzentration müssen Lösungswechsel und die anschließenden Messungen schnell erfolgen, um einer Schädigung der Zellen zuvorzukommen.

Im Substitutionsverfahren wurde versucht, die Standardlösung durch eine Ca^{++} - Ni^{++} -Lösung zu ersetzen (Konzentration jeweils $0,5 \text{ mM}$). Die Zerstörung der Zellen war jedoch auch dadurch nicht zu verhindern, daß die Membran während des Lösungswechsels auf das Ruhepotential geklemmt blieb (vgl. Ba^{++} ; Abschnitt 3.2.2). Zur Wirkung von Ni^{++} liegen deshalb keine Versuche nach dem Substitutionsverfahren vor.

3.3 Membranströme nach Addition zweiwertiger Ionen zur Standardlösung

Bei der Mehrzahl der untersuchten Ionen zeigt sich im Substitutionsversuch eine deutliche Herabsetzung des Einwärtsstroms. In Versuchen mit verschiedenen Kationen ist dieser Strom bei gleichem Austausch von Ca^{++} unterschiedlich stark reduziert. Die Vermutung lag daher nahe, daß als Ursache hierfür - neben der Verringerung der treibenden Kraft - eine (unterschiedlich starke) Hemmung des Ca^{++} -Stroms in Frage kommt.

Um diese Hemmung zu untersuchen, wurde die Wirkung der betreffenden Ionen auf den Einwärtsstrom bei verschiedenen Konzentrationen getestet, während die Anzahl an Ladungsträgern konstant blieb ($[\text{Ca}^{++}]_0 = 1 \text{ mM}$). Die Konzentration der getesteten Ionen betrug maximal $0,5 \text{ mM}$. Hierdurch sollten Verschiebungen des Membranpotentials klein gehalten werden.

Bei quantitativen Untersuchungen zeigt sich, daß der Ca^{++} -Strom in vielen Systemen nicht linear mit der Anzahl an Ca^{++} -Ionen im Außenmedium steigt (Hagiwara & Byerly, 1981; Satow & Kung, 1979). Vielmehr sättigt dieser Strom bei steigender Ca^{++} -Konzentration mit einer Abhängigkeit, die sich am Balanus-Muskel durch einen Michaelis-Menten-Ausdruck beschreiben läßt (Hagiwara & Takahashi, 1967). Hierbei werden Ca^{++} -Pore und -Ionen wie ein Enzym-Substrat-

Komplex behandelt. Man hat die Vorstellung, daß Ca^{++} (und andere Ionen) vor dem Durchtritt durch die Pore zunächst an der Außenseite gebunden werden muß (siehe Hagiwara, 1975):

$$I_{\text{Ca}}' = I_{\text{Ca}}^{\text{max}} \cdot \frac{C}{C + K_{\text{Ca}}'}$$

C ist die Ca^{++} -Konzentration im Außenmedium und $I_{\text{Ca}}^{\text{max}}$ stellt den Grenzwert von I_{Ca}' bei hohen Ca^{++} -Konzentrationen dar. K_{Ca}' ist die Bindungskonstante für Ca^{++} an die Pore und entspricht der Ca^{++} -Konzentration, bei der gilt:

$$I_{\text{Ca}}' = 1/2 I_{\text{Ca}}^{\text{max}}$$

Geht man von einer kompetitiven Hemmung aus, so läßt sich der Einwärtsstrom in Gegenwart eines Inhibitors durch folgenden Ausdruck beschreiben (Hagiwara & Takahashi, 1967):

$$I_{\text{Ca}} = I_{\text{Ca}}^{\text{max}} \cdot \frac{C}{C + \left(1 + \frac{M}{K_M}\right) K_{\text{Ca}}'}$$

M entspricht der Konzentration des Inhibitors, K_M seiner Bindungskonstanten.

Bei gleicher Ca^{++} -Konzentration läßt sich für das Verhältnis der Ca^{++} -Ströme ohne und mit Inhibitor folgende Beziehung errechnen:

$$\frac{I_{\text{Ca}}'}{I_{\text{Ca}}} = 1 + \frac{M}{K_M'}$$

Hierbei ist

$$K_M' = K_M \cdot \left(1 + \frac{C}{K_{\text{Ca}}}\right)$$

(Hagiwara & Takahashi, 1967).

Aus praktischen Erwägungen wird im folgenden eine leicht veränderte Symbolik benutzt:

- $I_{Ca \max_o}$ = maximaler Einwärtsstrom aus der Strom-Spannungs-Kennlinie einer Zelle
 $I_{Ca \max}$ = maximaler Einwärtsstrom der gleichen Zelle in Gegenwart eines Inhibitors
 $[M^{++}]_o$ = Konzentration des Inhibitors
 K_M = Bindungskonstante des Inhibitors an den Ca^{++} -Kanal
 $[Ca^{++}]_o$ = Ca^{++} -Konzentration
 K_{Ca} = Bindungskonstante für Ca^{++} an den Kanal

Es gilt also:

$$\frac{I_{Ca \max_o}}{I_{Ca \max}} = 1 + \frac{[M^{++}]_o}{K_M'}$$

$$K_M' = K_M \left(1 + \frac{[Ca^{++}]_o}{K_{Ca}} \right)$$

Trägt man das Verhältnis $I_{Ca \max_o}/I_{Ca \max}$ gegen die Inhibitor-Konzentration auf, so sollte man also im Fall einer kompetitiven Hemmung eine Gerade erhalten. Bei der Inhibitor-Konzentration 0 ist $I_{Ca \max_o}/I_{Ca \max} = 1$. Die Steigung der Geraden entspricht dem Wert für K_M' . Diese Größe enthält neben der tatsächlichen Bindungskonstanten den Ausdruck $(1 + [Ca^{++}]_o/K_{Ca})$. Ohne Kenntnis von K_{Ca} ist die absolute Größe von K_M also nicht bestimmbar.

3.3.1 Co^{++}

Mit steigender $CoCl_2$ -Konzentration wird das Ruhepotential zunehmend positiver. Bei 0,5 mM beträgt die Verschiebung etwa 12,5 mV (10,5 und 14,5 mV).

Der Membranwiderstand bei dieser Konzentration ist im Mittel gegenüber der Vorperiode erhöht (+21 %; s = 40 %; n = 3). Diese Erhöhung ist jedoch nicht signifikant.

In Abb. 30 ist das Verhältnis $I_{Ca \max_o}/I_{Ca \max}$ in Abhängigkeit von der $CoCl_2$ -Konzentration dargestellt. Die Beziehung ist linear. Der Korrelationskoeffizient ist 0,87. Aus der Steigung der Re-

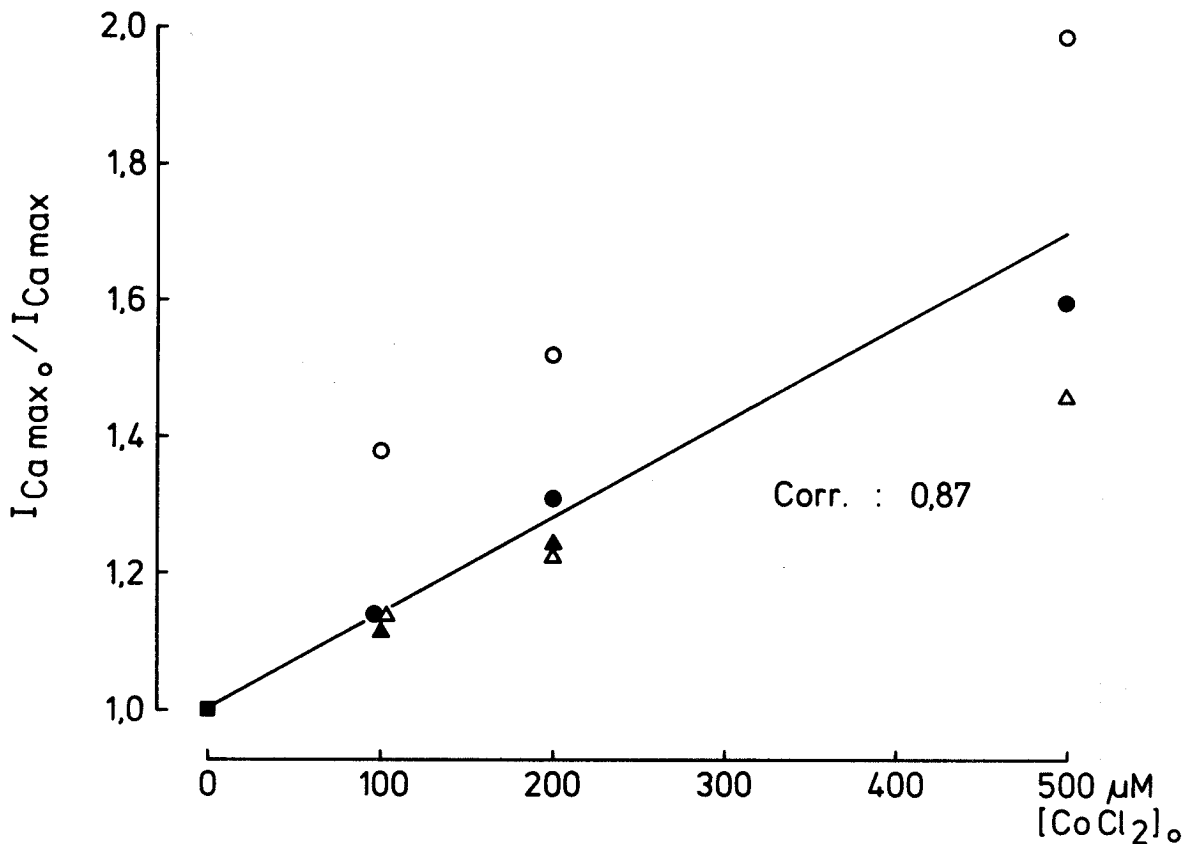


Abb. 30: Abhängigkeit des maximalen Ca^{++} -Einwärtsstroms von der $CoCl_2$ -Konzentration ($[Ca^{++}]_o = 1\text{ mM}$). Gleiche Symbole bei Messungen an derselben Zelle. Weitere Erläuterungen im Text.

gressionsgeraden läßt sich

$$K_{Co}' = 0,7\text{ mM}$$

bestimmen.

Zum Einfluß von Co^{++} auf die K^+ -Leitfähigkeit bei Erregung wird auf Abschnitt 3.2.4 verwiesen, ebenso zur Reversibilität seiner Wirkung auf Membranströme, Ruhewiderstand und -potential.

3.3.2 Mn^{++}

Abb. 31 zeigt den Einfluß von $MnCl_2$ auf den Ca^{++} -Einwärtsstrom. Die Werte streuen stärker als die aus den Co^{++} -Versuchen. Die

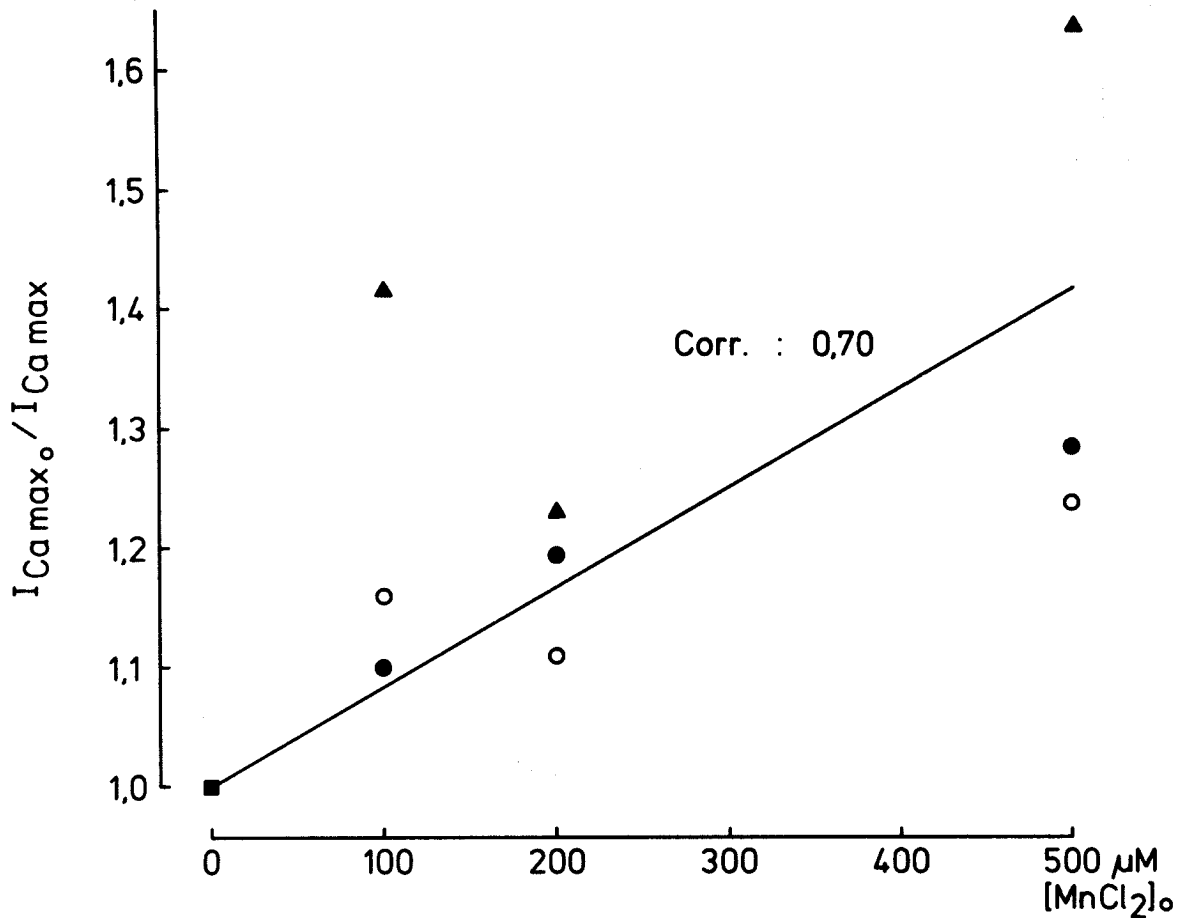


Abb. 31: Einfluß von MnCl_2 verschiedener Konzentration auf den maximalen Ca^{++} -Einwärtsstrom (gleiche Auftragung wie in Abb. 30; $[\text{Ca}^{++}]_o = 1 \text{ mM}$). Gleiche Symbole bei Messungen an derselben Zelle.

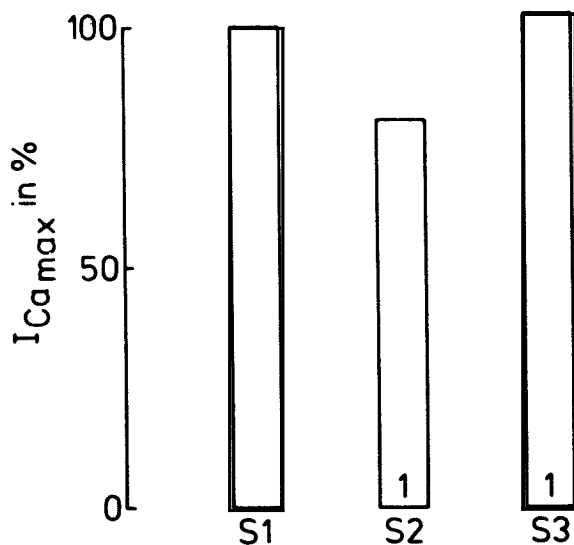


Abb. 32: Einzelversuch zur Reversibilität der Mn^{++} -Wirkung auf den maximalen Einwärtsstrom. In S1 und S3 Standardlösung, in S2 Standardlösung + MnCl_2 (0,5 mM). Es wurde auf den Wert der Vorperiode (= 100 %) normiert.

Ursache liegt vermutlich in der höheren allgemeinen Toxizität der Substanz (vgl. Abschnitt 3.2.5). Durch ihre relativ schwache Wirkung im Additionsversuch ist die Messung bei kleineren Konzentrationen jedoch nicht sinnvoll. Die Steigung der Regressionsgeraden (Korrelationskoeffizient = 0,70) ergibt

$$K_{Mn}' = 1,19$$

In Gegenwart von 0,5 mM $MnCl_2$ ist das Ruhepotential in positive Richtung verschoben ($\Delta V_M = +8,5$ und $+10$ mV). Der Membranwiderstand ist leicht erhöht ($\Delta R_M = +14$ und $+31$ %).

Die Herabsetzung des Ca^{++} -Einwärtsstroms durch 0,5 mM $MnCl_2$ ist voll reversibel (Abb. 32). Das gleiche gilt für die Verschiebung des Ruhepotentials (Einzelversuch).

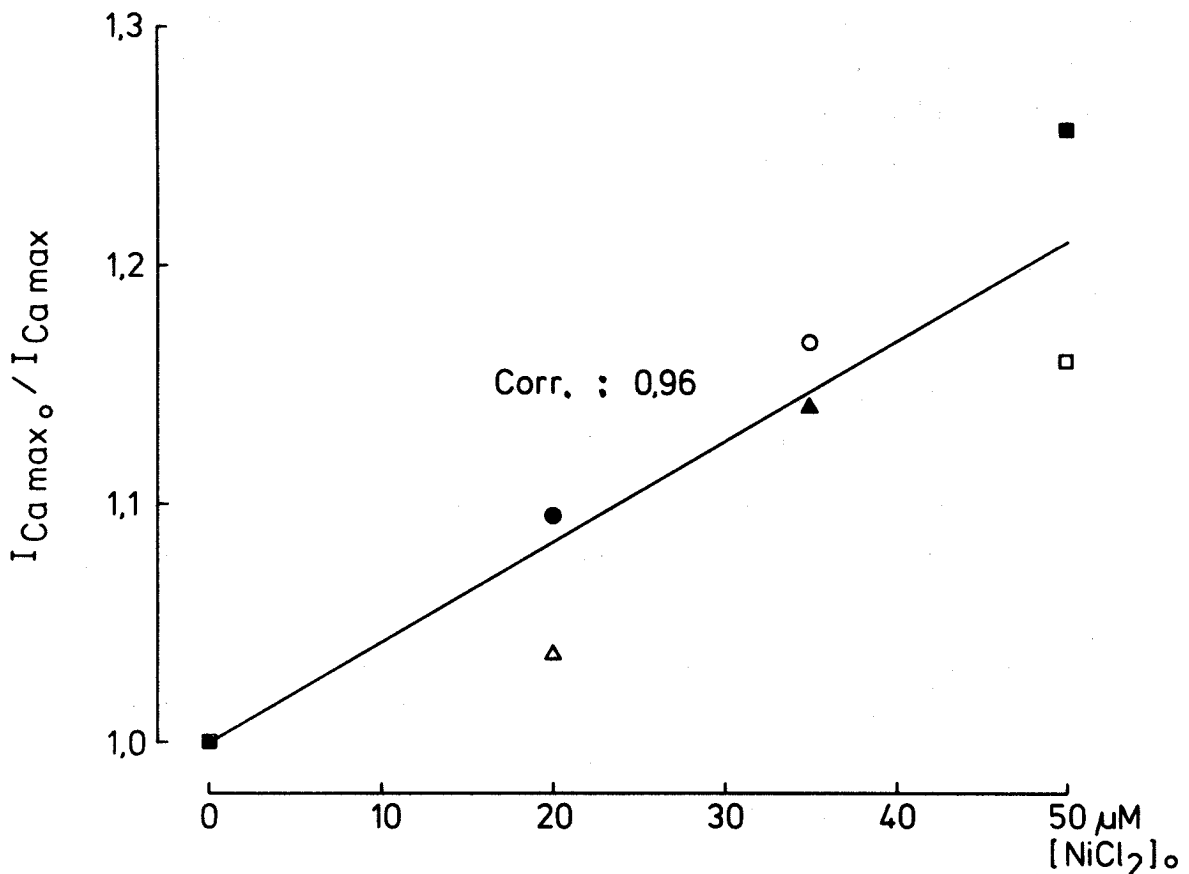


Abb. 33: Abhängigkeit des maximalen Ca^{++} -Einwärtsstroms von der $NiCl_2$ -Konzentration (gleiche Auftragung wie in Abb. 30 und 31; $[Ca^{++}]_o = 1$ mM). Alle Messungen erfolgten an verschiedenen Zellen.

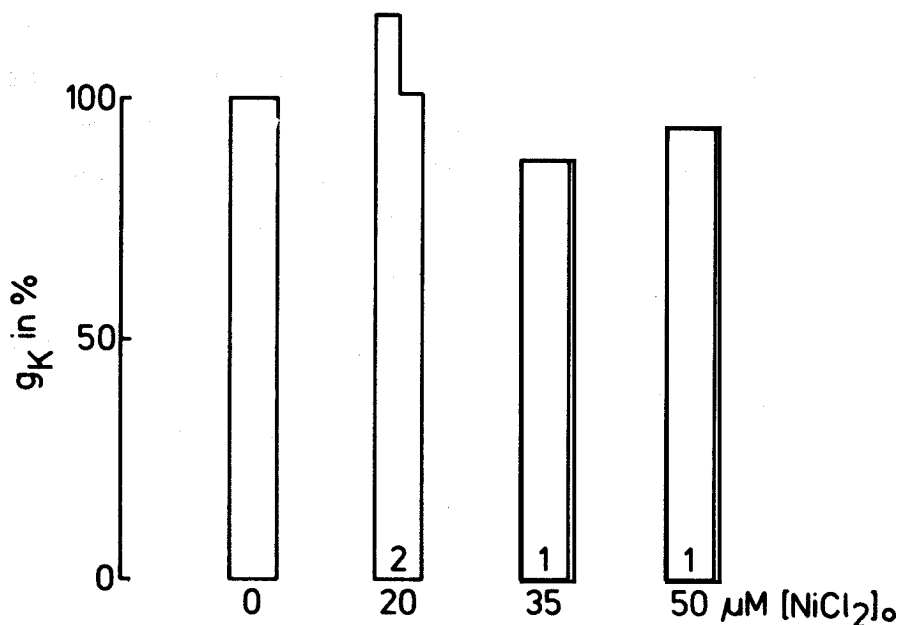


Abb. 34: Einfluß von NiCl_2 verschiedener Konzentrationen auf die K^+ -Leitfähigkeit. Es wurde auf den Wert der Vorperiode (= 100 %) normiert. Die Zahlen an der Basis der Balken geben die Anzahl der Messungen an.

3.3.3 Ni^{++}

Bis zur maximalen untersuchten Konzentration von $50 \mu\text{M}$ wird der Ruhewiderstand durch NiCl_2 nicht beeinflusst.

Mit steigender Konzentration tritt eine leichte Verschiebung des Ruhepotentials in positive Richtung auf ($20 \mu\text{M}$: 0 und $-1,5 \text{ mV}$; $35 \mu\text{M}$: $+2$ und $+2 \text{ mV}$; $50 \mu\text{M}$: $+6,5$ und $+3 \text{ mV}$).

Abb. 33 zeigt die Abhängigkeit des Einwärtsstroms von der äußeren NiCl_2 -Konzentration. Aus der Steigung der Regressionsgeraden (Korrelationskoeffizient = 0,96) ergibt sich der Wert

$$K_{\text{Ni}}' = 0,24 \text{ mM}$$

Im untersuchten Konzentrationsbereich zeigt NiCl_2 keinen deutlichen Einfluß auf die K^+ -Leitfähigkeit (Abb. 34).

Zur Reversibilität der Wirkung von NiCl_2 sind keine Angaben möglich. Selbst bei der kleinsten getesteten Konzentration ($20 \mu\text{M}$)

verschlechterte sich der Zustand der Zellen zusehends. Auch eine schnelle Rückführung in Standardlösung blieb ohne Erfolg: Die Messung einer Nachperiode gelang nicht.

3.4 Bindungskonstanten

Wie in den Abschnitten 3.3.1 bis 3.3.3 dargestellt, wurden für Co^{++} , Mn^{++} und Ni^{++} folgende K_M' -Werte bestimmt:

$$K_{\text{Co}}' = 0,7 \text{ mM}$$

$$K_{\text{Mn}}' = 1,19 \text{ mM}$$

$$K_{\text{Ni}}' = 0,24 \text{ mM}$$

Dadurch, daß der Faktor $(1 + [\text{Ca}^{++}]_o/K_{\text{Ca}})$ in allen Additionsversuchen identisch ist, ist das Verhältnis der K_M -Werte gleich dem der K_M' -Werte:

$$K_{\text{Ni}} : K_{\text{Co}} : K_{\text{Mn}} = 1 : 3 : 5$$

Die absoluten Werte sind nur bei Kenntnis der Bindungskonstanten für Ca^{++} berechenbar.

3.4.1 Abhängigkeit des Einwärtsstroms von der Ca^{++} -Konzentration im Außenmedium

Um die Bindungskonstante für Ca^{++} zu bestimmen, wurde in einer Versuchsserie die Abhängigkeit des maximalen Einwärtsstroms von der äußeren Ca^{++} -Konzentration untersucht. Die Ca^{++} -Konzentration wurde nur in einem engen Bereich von 0,33 bis 2 mM variiert. Hierdurch sollten Verschiebungen des Ruhepotentials möglichst klein gehalten werden. Diese lagen zwischen -6,5 und +4 mV im untersuchten Bereich (Abb. 36) und stimmen somit genau mit den Werten von Naitoh (1974) überein.

Bei Veränderungen der Ca^{++} -Konzentration verschieben sich die Strom-Spannungs-Kennlinien um (fast) den gleichen Betrag wie das Ruhepotential (Eckert & Brehm, 1979; Satow & Kung, 1979).

Die Bestimmung der Bindungskonstanten ist nur unter der Annahme sinnvoll, daß der Einfluß auf den maximalen Ca^{++} -Einwärtsstrom im untersuchten Konzentrationsbereich nicht, oder nur zu einem

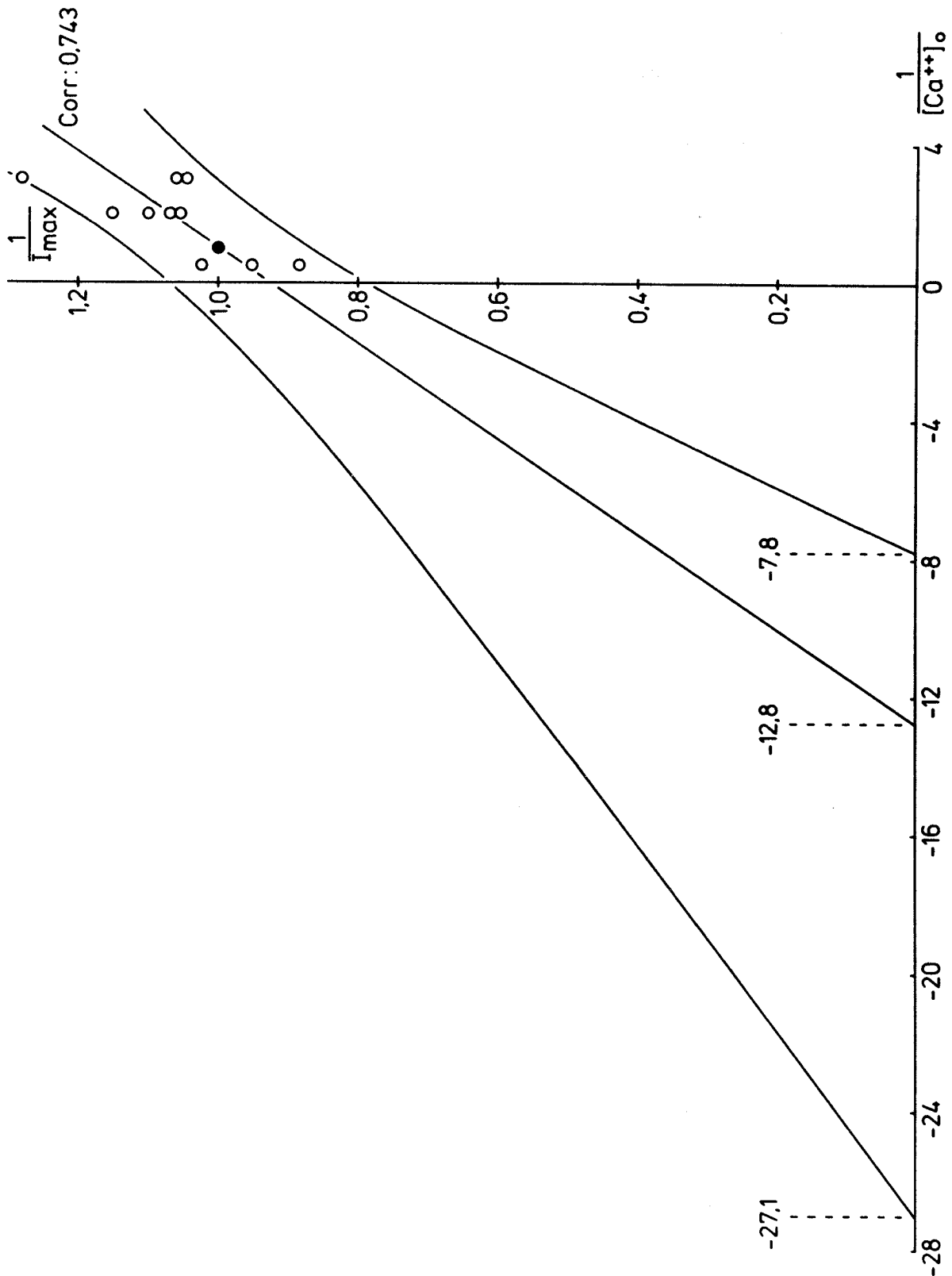


Abb. 35: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Abhängigkeit des maximalen Einwärtsstroms von der äußeren Ca^{++} -Konzentration. Erläuterungen im Text.

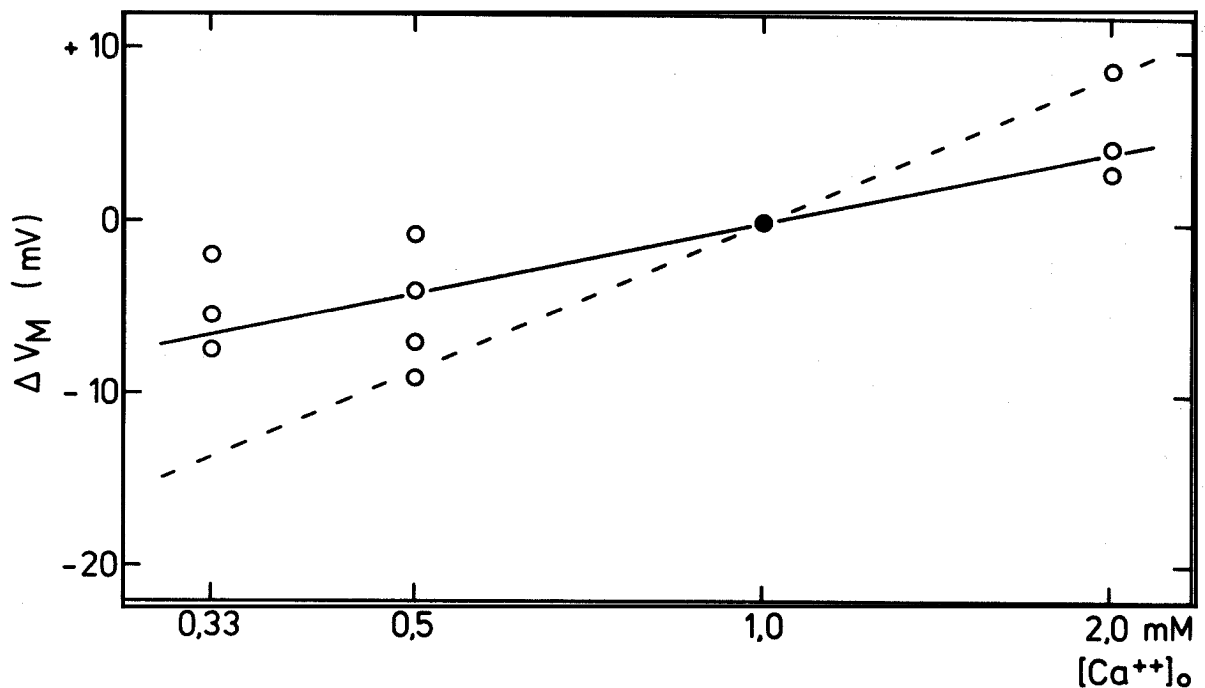


Abb. 36: Änderungen des Ruhepotentials in Abhängigkeit von der $CaCl_2$ -Konzentration. Normiert wurde auf die V_M -Werte in Standardlösung ($\Delta V_M = 0$). Die durchgezogene Linie ist die berechnete Regressionsgerade. Die unterbrochene Linie gibt an, wie sich im untersuchten Konzentrationsbereich das theoretische Gleichgewichtspotential für Ca^{++} (E_{Ca}) ändert. Auch hier wurde auf den Wert in Standardlösung normiert.

geringen Teil auf einer Abschirmung von Oberflächenladungen beruht (Hagiwara, 1973; siehe Abschnitt 4.4).

Entsprechend der Behandlung nach Michaelis-Menten wurden die Ergebnisse im Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt (Abb. 35). Aufgetragen ist der Kehrwert des maximalen Einwärtsstroms nach Normierung auf den Wert der Vorperiode (= 1) gegen den Kehrwert der Ca^{++} -Konzentration in mM. In dieser Darstellung läßt sich die Bindungskonstante durch Extrapolation auf die Y-Achse bestimmen. Die beiden Hyperbel-Äste umschließen den 95% Vertrauensbereich (Sachs, 1974). Mit dieser Wahrscheinlichkeit liegt die tatsächliche Bindungskonstante für Ca^{++} zwischen $128 \mu M$ (entspre-

chend $-7,8 \text{ mM}^{-1}$) und $37 \text{ } \mu\text{M}$ ($-27,1 \text{ mM}^{-1}$). Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Y-Achse ergibt den Wert $K_{\text{Ca}} = 78 \text{ } \mu\text{M}$.

3.4.2 die Bindungskonstante für Mg^{++}

Mit Mg^{++} wurden keine Additionsversuche durchgeführt. Die Bindungskonstante wurde deshalb näherungsweise aus zwei Substitutionsversuchen bestimmt, in denen Messungen bei kleinen Mg^{++} -Konzentrationen durchgeführt wurden, d.h. bei wenig veränderter Ca^{++} -Konzentration. Betrachtet wird der Bereich bis zu einer Mg^{++} -Konzentration von $145 \text{ } \mu\text{M}$ (vgl. Abb. 27). Die Abnahme der treibenden Kraft für den Ca^{++} -Einwärtsstrom um 1,6 % (bei einer auf $855 \text{ } \mu\text{M}$ herabgesetzten Ca^{++} -Konzentration) wird vernachlässigt.

In Abb. 37 ist der Einfluß von Mg^{++} auf den Ca^{++} -Einwärtsstrom dargestellt. Die Regressionsgerade ist unterbrochen gezeichnet, weil nur dann eine lineare Beziehung zwischen $I_{\text{Ca max}_0} / I_{\text{Ca max}}$

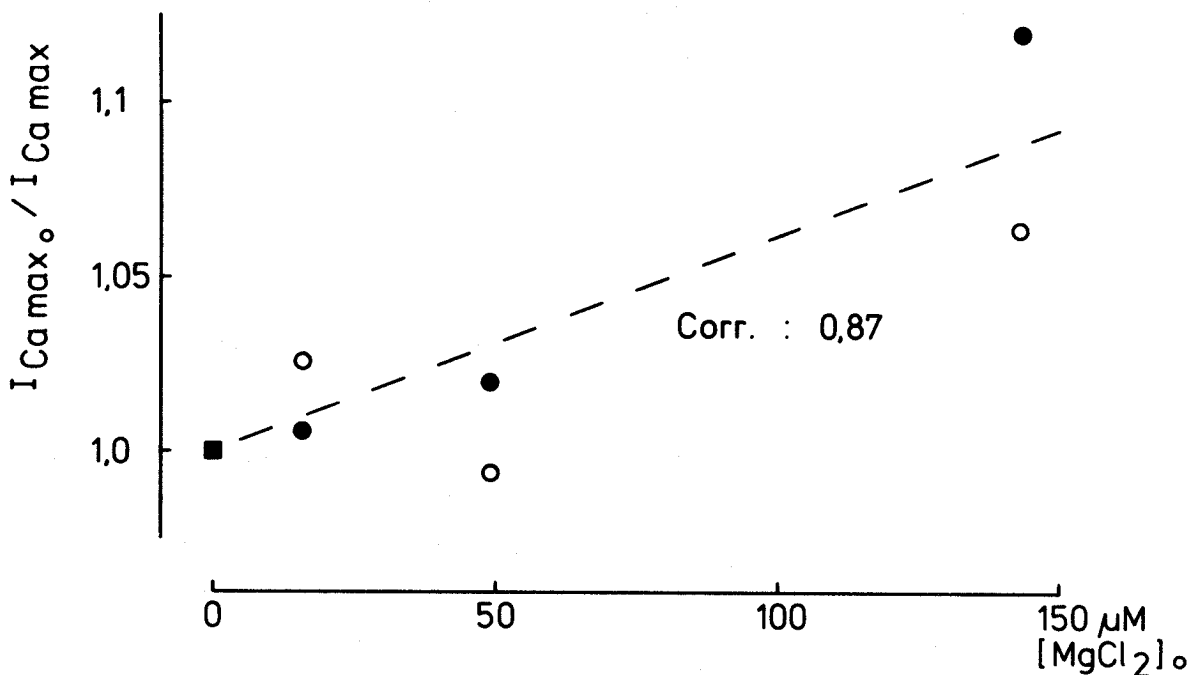


Abb. 37: Einfluß von Mg^{++} auf den maximalen Ca^{++} -Einwärtsstrom (2 Versuche; gleiche Auftragung wie in Abb. 30, 31 und 32). $[\text{Ca}^{++}]_0$ ist nicht konstant (siehe Text).

und $[Mg^{++}]_0$ besteht, wenn die Ca^{++} -Konzentration unverändert bleibt. Dies ist nur näherungsweise der Fall. Die Steigung der Geraden (Korrelationskoeffizient = 0,87) ergibt

$$K_{Mg}' = 1,61 \text{ mM}$$

Wegen der veränderten Ca^{++} -Konzentration kann dieser Wert nicht direkt in Bezug zu K_{Co}' , K_{Mn}' und K_{Ni}' gesetzt werden. Da in die Berechnung der absoluten Bindungskonstanten (s.u.) jedoch die Ca^{++} -Konzentration eingeht, ist der Vergleich mit den K_M -Werten der anderen Ionen möglich.

Die Bindungskonstante für Mg^{++} wurde mit einem Näherungsverfahren bestimmt. Zur Unterscheidung werden deshalb die folgenden Angaben zu Mg^{++} in Klammern gesetzt.

3.4.3 Co^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Mg^{++} und Ca^{++} : Vergleich ihrer Konkurrenz am spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanal

Um die absoluten Werte der Bindungskonstanten zu berechnen, werden die in Abschnitt 3.4.1 bestimmten Grenzwerte für K_{Ca} (sowie der mittlere Wert) herangezogen. Die Berechnung erfolgt nach der Gleichung

$$K_M = \frac{K_M'}{1 + [Ca^{++}]/K_{Ca}}$$

(Abschnitt 3.3).

Annahme	: $K_{Ca} = 36,9 \mu M$	$K_{Ca} = 78,1 \mu M$	$K_{Ca} = 128,2 \mu M$
daraus folgt:	$K_{Co} = 24,8 \mu M$ $K_{Mn} = 42,4 \mu M$ $K_{Ni} = 8,6 \mu M$ $(K_{Mg} = 66,6 \mu M)$	$K_{Co} = 50,7 \mu M$ $K_{Mn} = 86,2 \mu M$ $K_{Ni} = 17,4 \mu M$ $(K_{Mg} = 134,8 \mu M)$	$K_{Co} = 79,2 \mu M$ $K_{Mn} = 135,4 \mu M$ $K_{Ni} = 27,3 \mu M$ $(K_{Mg} = 210,0 \mu M)$

Obwohl sich die Grenzwerte für K_{Ca} und somit auch die absoluten K_M -Werte der anderen Ionen etwa um den Faktor 3,5 unterscheiden, wirkt sich dies auf die relativen Bindungskonstanten kaum aus. Normiert man auf $K_{Ni} = 1$, so liegt K_{Ca} zwischen 4,3 und 4,7. Die Beziehung zwischen K_{Ni} und K_{Co} , sowie K_{Ni} und K_{Mn} ist von K_{Ca} un-

abhängig (Abschnitt 3.4). Es ergibt sich folgendes Verhältnis:

$$\begin{array}{ccccccc} K_{\text{Ni}} & : & K_{\text{Co}} & : & K_{\text{Ca}} & : & K_{\text{Mn}} \quad (: \quad \text{Mg}) = \\ 1 & : & 3 & : & 4,5 & : & 5 \quad (: \quad 8) \end{array}$$

3.5 Hemmung des Ca^{++} -Einwärtsstroms durch Co^{++} und Mn^{++} : Vergleich der Ergebnisse aus Substitutions- und Additionsversuchen

Sind die Bindungskonstanten bekannt, so läßt sich die Herabsetzung des Einwärtsstroms durch hemmende Ionen auch für Substitutionsversuche berechnen. Die Ergebnisse aus einem Teil dieser Versuche werden im folgenden mit errechneten Werten verglichen. Die Berechnungen werden jeweils mit den minimalen und maximalen Werten für die Bindungskonstanten durchgeführt (Abschnitt 3.4.3).

Bei Co^{++} - und Ca^{++} -Konzentrationen von jeweils 0,5 mM wäre ein Rest-Einwärtsstrom von 42 bis 44 % zu erwarten. In den Substitutionsversuchen wurden die Werte 42 % und 52 % gemessen (Abb. 28).

Im Fall von Mn^{++} (0,5 mM; $[\text{Ca}^{++}] = 0,5 \text{ mM}$) errechnet sich eine Herabsetzung des Einwärtsstroms im Vergleich zur Vorperiode auf 55 bis 57 %. Gemessen wurden 53 %.

Durch die Substitution veränderte sich das Ruhepotential in beiden Fällen um etwa +10 mV. Da der maximale Einwärtsstrom in den Testlösungen jedoch bei der gleichen absoluten Membranspannung auftritt wie in Standardlösung (vgl. Abschnitt 2.6), ist diese Verschiebung des Ruhepotentials ohne Einfluß auf die treibende Kraft. Durch die Herabsetzung der Ca^{++} -Konzentration auf 0,5 mM wird die treibende Kraft jedoch um etwa 7 % herabgesetzt. Die gute Übereinstimmung von errechneten und gemessenen Werten spricht dafür, daß der Ca^{++} -Einwärtsstrom hierdurch vergleichsweise wenig beeinflusst wird.

Für die Co^{++} -Lösung B ($\text{Co}^{++} = 0,9 \text{ mM}$; $\text{Ca}^{++} = 0,1 \text{ mM}$) ist eine solche Näherung offenbar nicht mehr zulässig: Vernachlässigt man die Abnahme der treibenden Kraft um 23 % in dieser Lösung, so wäre ein Rest-Einwärtsstrom von 9 bis 13,5 % zu erwarten. In den Versuchen tritt jedoch kein meßbarer Einwärtsstrom auf.

4 Diskussion

4.1 Trennung von Einwärts- und Auswärtsströmen bei Erregung

Der Vorteil des Doppelpulsverfahrens bei der Trennung von Membranströmen besteht darin, daß alle Messungen an derselben Zelle erfolgen. Schwierigkeiten durch zellspezifische Unterschiede in der Kinetik der Ca^{++} - und K^+ -Ströme werden hierdurch ausgeschlossen. Weiterhin lassen sich in Standardlösung Summenstrom und K^+ -Strom im Abstand von nur wenigen Sekunden messen. Mögliche Veränderungen eines Präparats im Verlauf eines Versuchs bleiben so ohne Einfluß auf das Ergebnis der Subtraktion.

Die Trennung von Ca^{++} - und K^+ -Strömen nach dem Doppelpulsverfahren ist nur unter zwei Voraussetzungen zulässig. Zum einen darf der K^+ -Strom im Hauptpuls durch den Vorpuls nicht verändert werden. Zum anderen darf der Inaktivierungszustand des Ca^{++} -Systems nicht von der Höhe der Depolarisation im Hauptpuls abhängen.

Die Höhe des K^+ -Stroms am Ende einer Depolarisation wird durch Vorpulse nicht beeinflusst. In Versuchen mit der Mutante CNR zeigt sich weiterhin, daß auch die Kinetik der K^+ -Ströme durch einen Vorpuls nicht verändert wird: Bei allen Depolarisationen erhält man jeweils mit und ohne Vorpuls deckungsgleiche Registrierungen. Die erste Voraussetzung ist also erfüllt.

Eckert, Tillotson und Brehm (1981) stellten in Doppelpulsversuchen an *Aplysia*-Neuronen eine Abnahme der Inaktivierung mit steigender Depolarisation im Hauptpuls fest. In diesen Versuchen betrug der Abstand zwischen Vor- und Hauptpuls jedoch 400 ms und die Inaktivierung des Ca^{++} -Kanals war auch bei kleineren Depolarisationen (ΔV bis +40 mV) unvollständig. Länge und Amplitude des Vorpulses, sowie der Abstand zum Hauptpuls, wurde in den eigenen Versuchen so gewählt, daß eine möglichst vollständige Inaktivierung des Ca^{++} -Systems erfolgt. Bis zu einer Depolarisation von etwa 30 mV im Hauptpuls bleibt der Grad der Inaktivierung offenbar vollständig (siehe Abb. 12). In Messungen ohne Vorpuls tritt bei dieser Spannung der maximale Ca^{++} -Strom auf (Abb. 14). Eine Veränderung des Inaktivierungszustands bei Depolarisationen größer als 35 mV im Hauptpuls wäre möglich. Die tatsächlichen

Ca^{++} -Ströme wären dann größer als die Einwärtsströme, die mit dem Doppelpulsverfahren bestimmt wurden. Ein deutlicher Einwärtsstrom bei höheren Spannungen ist wegen der hohen Effektivität der Vorpulse bis zu Depolarisationen von 35 mV im Hauptpuls jedoch sehr unwahrscheinlich. In jedem Fall stellen die Einwärtsströme, die mit dem Doppelpulsverfahren bestimmt wurden, die untere Grenze der tatsächlich auftretenden Ca^{++} -Ströme dar.

Die Messung von Summenstrom und K^+ -Strom im Abstand von wenigen Sekunden ist wohl mit keinem anderen Verfahren zu erreichen. Die Methode ist auch bei Depolarisationen zwischen 80 und 90 mV noch recht genau, wenn man bedenkt, daß das Verhältnis $I_{\text{K}}/I_{\text{Ca}}$ bei diesen Spannungen bereits zwischen 15 und 25 liegt.

Wie die Auswertung der Sr^{++} -Versuche zeigte, ist die Verwendung von Membranströmen verschiedener Zellen für das Subtraktionsverfahren problematisch. Wenn man von den Summenströmen des Wildtyps die K^+ -Ströme der CNR-Mutanten subtrahiert, so kommt erschwerend hinzu, daß die K^+ -Leitfähigkeit der Mutanten in der Regel schneller aktiviert wird, als die des Wildtyps. Die Membranströme von CNR-Mutanten sind deshalb für die Berechnung schneller Ströme bei Depolarisationen größer als 40 bis 50 mV unbrauchbar.

Oertel, Schein und Kung (1977) und Satow (1982) verwendeten die Mutante "pawn", die der CNR-Mutante von *P. caudatum* entspricht, für die Berechnung des Ca^{++} -Stroms von *P. tetraurelia*, jedoch nur bis zu Depolarisationen von 20 bzw. 40 mV. Ansonsten sind Subtraktionsverfahren mit Strömen von Ca^{++} -Defektmutanten nur für die Untersuchung langsamer Membranprozesse beschrieben worden, die im Bereich von Sekunden ablaufen (Satow & Kung, 1980a; b; Satow, 1982).

Eine zuverlässige Trennung der erregungsbedingten Membranströme scheint somit bei höheren Depolarisationen nur mit Hilfe von Messungen an derselben Zelle möglich zu sein. Die selektive Blockierung der Ca^{++} - oder der K^+ -Kanäle durch Hemmstoffe wäre eine Möglichkeit der Trennung. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit den Fraktionen II-9 und II-11 aus dem Gift des Skorpions *Cetrurioidea noxius* durchgeführt. Die Wirkung beider Toxine auf den erregungsbedingten Ca^{++} - bzw. K^+ -Strom ist an *Paramecium*

jedoch schwach und unspezifisch.

Injektion eines Cs-TEA-Gemisches in die Zelle ist zur Zeit das wirksamste Verfahren zur Herabsetzung der K^+ -Leitfähigkeit am Paramecium (Eckert & Brehm, 1979). Mit dieser Technik läßt sich g_K auf etwa 25 % reduzieren, während der Ca^{++} -Strom unbeeinflußt bleibt (Brehm, Eckert & Tillotson, 1980). Die Kombination dieser Technik mit dem Doppelpulsverfahren könnte eine deutliche Erweiterung des Meßbereichs für I_{Ca} in Richtung auf das Ca^{++} -Gleichgewichtspotential ermöglichen.

4.2 Membranströme in Standardlösung

4.2.1 Ca^{++} -Strom

Wie ein Vergleich der Einwärtsströme zeigt, ist die Spannungsabhängigkeit, mit der der Ca^{++} -Kanal seine Leitfähigkeit ändert, in Ca^{++} - und in Ba^{++} -Lösung nahezu gleich (Abb. 25; vgl. Saimi & Kung, 1982; Satow, 1982). Unter dieser Voraussetzung lassen sich die Leitfähigkeiten des Ca^{++} -Kanals für Ba^{++} in direkten Bezug zu den Messungen in Standardlösung bringen. In Abb. 24 ist die relative Leitfähigkeit der Zellmembran für Ba^{++} in Abhängigkeit von der Höhe einer Depolarisation dargestellt.

Abb. 15 zeigt, daß bei Depolarisationen von etwa 20 mV der halbmaximale Ca^{++} -Strom auftritt. In guter Übereinstimmung hiermit steht das Ergebnis, daß die Ca^{++} -Kanäle bei dieser Spannung etwa zur Hälfte aktiviert sind (Abb. 24). Die Abnahme der treibenden Kraft ($= V_m - E_{Ca}$) um etwa 10 % bei dieser Depolarisation scheint sich nicht auf den Ca^{++} -Strom auszuwirken.

Bei Depolarisationen zwischen 30 und 35 mV tritt in Standardlösung der maximale Einwärtsstrom auf. Die Leitfähigkeit des Ca^{++} -Systems hat bei dieser Spannung 80 bis 90 % ihres maximalen Wertes erreicht; die treibende Kraft ist um etwa 17 % reduziert.

Der weitere Kurvenverlauf im Strom-Spannungs-Diagramm (Abb. 15) scheint im wesentlichen von der Abnahme der treibenden Kraft bestimmt zu werden. Von geringerer Wirkung ist offenbar, daß sich die Leitfähigkeit des Ca^{++} -Systems mit steigender Depolarisation langsam an den maximalen Wert annähert.

Um das theoretische Gleichgewichtspotential für Ca^{++} zu erreichen, müßte eine Zelle um 155 mV depolarisiert werden (siehe Abschnitt 3.1.1). Wie Abb. 15 zeigt, nimmt die Amplitude der Einwärtsströme oberhalb $\Delta V = 30$ mV mit zunehmender Depolarisation in Richtung auf E_{Ca} ab. Die Strom-Spannungs-Beziehung oberhalb 30 mV ist dabei nicht linear, d.h. sie läßt sich nicht durch den Ausdruck $I_{\text{Ca}} = g_{\text{Ca}} \cdot (V_m - E_{\text{Ca}})$ beschreiben. Die Streuung der Ergebnisse bei höheren Spannungen ist sicher zu klein, um die Abweichung von dieser linearen Beziehung zu erklären.

Eine Kurvenanpassung entsprechend der 'constant-field'-Gleichung (Hodgkin & Katz, 1949) ist ebenfalls nicht erfolgreich, da diese Funktion zu steil verläuft. Die Einbeziehung von Oberflächenpotentialen in die Gleichung (Meves & Vogel, 1973; Reuter & Scholz, 1977; DePeyer & Deitmer, 1980) führt zu keinem wesentlich verbesserten Ergebnis. Bei Depolarisationen oberhalb von 60 mV erfolgt die Abnahme der Ca^{++} -Ströme deutlich flacher als zwischen 35 und 60 mV. Abhängig von den eingesetzten Werten für Permeabilität und Oberflächenpotential wird entweder der Bereich zwischen 35 und 60 mV gut beschrieben (dann verläuft die Funktion im oberen Bereich zu steil), oder aber der Bereich oberhalb von 60 mV (dann ist die Funktion bei kleineren Spannungen zu flach). Die vollständige Anpassung einer Funktion an die Werte zwischen 35 und 105 mV ist also mit Hilfe der erweiterten 'constant-field'-Gleichung ebenfalls nicht möglich.

In verschiedenen Präparaten ist der Ca^{++} -Kanal für K^+ - und Cs^+ -Ionen permeabel (Reuter & Scholz, 1977; Fenwick, Marty & Neher, 1982; Lee & Tsien, 1982). Der Strom durch den Ca^{++} -Kanal kehrt hierdurch seine Richtung bei Spannungen um, die 50 bis 70 mV unterhalb des Gleichgewichtspotentials für Ca^{++} liegen. Da in den eigenen Versuchen bis zur oberen Grenze des Meßbereichs keine Tendenz zur Umkehr des Ca^{++} -Stroms (wesentlich unterhalb von E_{Ca}) zu erkennen ist, scheint der spannungsabhängige Ca^{++} -Kanal von Paramecium für K^+ -Ionen nicht permeabel zu sein.

4.2.2 Inaktivierung des Ca^{++} -Systems

Es ist auffällig, daß die maximale Inaktivierung des Ca^{++} -Systems durch Vorpulse erreicht wird, die die Membran um 50 bis 60 mV de-

polarisieren (Brehm & Eckert, 1978a; b; Brehm, Eckert & Tillotson, 1980), während der maximale Ca^{++} -Strom bei Depolarisationen zwischen 30 und 35 mV auftritt. Brehm, Eckert und Tillotson (1980) diskutieren in diesem Zusammenhang, daß der maximale Ca^{++} -Strom möglicherweise erst bei höheren Depolarisationen (50 bis 60 mV) auftritt und in diesem Bereich durch einen entgegengerichteten K^+ -Strom scheinbar reduziert wird. Eckert und Tillotson (1981) zeigten an Aplysia-Neuronen, daß der Grad der Inaktivierung dem eingeströmten Ca^{++} direkt proportional ist. Es läßt sich abschätzen, daß der tatsächliche Ca^{++} -Strom von Paramecium unter dieser Voraussetzung bei einer Depolarisation um 60 mV das 4-fache des Wertes betragen müßte, der mit Hilfe des Subtraktionsverfahrens für diese Spannung errechnet wurde. Die Inaktivierung des Ca^{++} -Systems müßte hierzu von 100 % bei $\Delta V = 35$ mV auf 25 % bei $\Delta V = 60$ mV abnehmen. Diese Möglichkeit erscheint nicht sehr wahrscheinlich.

Der maximale Ca^{++} -Strom tritt bei kleineren Depolarisationen auf als die maximale Inaktivierung (s.o.). Eine Erklärung für diesen Befund ist unter der Annahme möglich, daß die vollständige Inaktivierung des Ca^{++} -Systems nur dann erfolgen kann, wenn das System zuvor maximal aktiviert war. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß die Maxima von Leitfähigkeit (Abb. 24) und Inaktivierung (Brehm & Eckert, 1978a; b; Brehm, Eckert & Tillotson, 1980) bei der gleichen Depolarisation erreicht werden (ΔV etwa 60 mV). Hiernach wäre der Einstrom von Ca^{++} bei Erregung für die Inaktivierung ein notwendiges aber nicht hinreichendes Kriterium. Erst bei Depolarisationen größer als 60 mV, d.h. bei maximaler Leitfähigkeit des Ca^{++} -Systems, wäre die Inaktivierung ausschließlich vom Ca^{++} -Einwärtsstrom abhängig.

Im Subtraktionsverfahren wurde neben den maximalen Einwärtsströmen jeweils das Zeit-Integral der Ströme bestimmt, d.h. die Ladung, die während einer Depolarisation in die Zelle gelangt. Die Ergebnisse aus diesen Berechnungen streuen wesentlich stärker als die Maxima der Einwärtsströme, in Standardlösung zeigt sich jedoch eine ähnliche Abhängigkeit von der Membranspannung. Die Menge eingeströmter Ca^{++} -Ionen ist dabei als Folge von Depolarisationen um 35 bis 40 mV am größten und nimmt bei höheren Spannungen - wie die Maxima der Ca^{++} -Ströme - schnell ab. Die Mög-

lichkeit, daß die maximale Inaktivierung bei Depolarisationen um 60 mV auftritt, weil bei dieser Spannung die Menge eingeströmter Ca^{++} -Ionen am größten ist, kann deshalb ausgeschlossen werden.

4.2.3 'Auswärtskomponente'

In allen Versuchen, die mit Zellen des Wildtyps in Standardlösung durchgeführt wurden, ist auch nach Subtraktion des K^+ -Stroms bei Depolarisationen von 60 bis 100 mV eine Auswärtskomponente im Strom sichtbar (Abb. 13), die ihr Maximum zwischen 70 und 80 mV hat. Dieses Phänomen tritt in Doppelpulsversuchen mit CNR-Mutanten nicht auf. Eine Veränderung des spannungsabhängigen K^+ -Stroms durch Vorpulse ist deshalb als Ursache auszuschließen.

Der Vergleich mit den CNR-Versuchen macht es sehr wahrscheinlich, daß die Auswärtskomponente - direkt oder indirekt - auf dem Ca^{++} -Strom des Wildtyps beruht. Die Möglichkeit, daß es sich um Subtraktionsartefakte handelt, die bei höheren Spannungen im Hauptpuls durch abnehmende Inaktivierung des Ca^{++} -Systems entstehen, scheidet aus: Es ist zwar nicht sicher auszuschließen, daß die Berechnung auf diese Weise Werte liefert, die kleiner sind als die tatsächlichen Einwärtsströme; Auswärtsströme können hierdurch jedoch sicher nicht auftreten.

Satow und Kung (1980a; b) berichten von einem Ca^{++} -abhängigen K^+ -Strom ($I_{\text{K}(\text{Ca})}$), der bei langen Depolarisationen von mehreren Sekunden auftritt. Dieser K^+ -Strom wurde berechnet, indem von den Auswärtsströmen des Wildtyps die Auswärtsströme einer CNR-Mutante (pw A₅₀₀) subtrahiert wurden. In den eigenen Versuchen sind die Amplituden der Auswärtsströme am Ende gleicher Depolarisationen ($t = 60$ ms) bei allen Spannungen nahezu identisch und unabhängig davon, ob es sich um Registrierungen mit oder ohne Vorpuls handelt (Abb. 12). Der in den Versuchen beobachtete Auswärtsstrom ist also eine vergleichsweise schnelle Komponente, die sicher keinen Bezug zu dem langsamen $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ hat, der von Satow und Kung beschrieben wird.

Obwohl der beobachtete Auswärtsstrom sehr wahrscheinlich Ca^{++} -abhängig ist, tritt er erst bei deutlich höheren Depolarisationen auf als der höchste Ca^{++} -Strom. Die Möglichkeit, daß er be-

reits bei kleineren Spannungen aktiviert und dort vom Ca^{++} -Einwärtstrom verdeckt wird, erscheint nicht wahrscheinlich, weil beide Ströme zu verschiedenen Zeiten auftreten. Die Aktivierung der Auswärtskomponente scheint also sowohl vom Ca^{++} -Einwärtstrom als auch von der Depolarisation abhängig zu sein.

Meech und Standen (1975) beschreiben die Ca^{++} -abhängige Komponente im K^+ -Strom von Helix-Neuronen und folgern, daß die Annahme eines separaten K^+ -Kanals, der durch Ca^{++} -Ionen aktiviert wird, zur Erklärung ihrer Ergebnisse nicht notwendig ist. Ebenso gut wäre eine Modifizierung der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle durch Ca^{++} denkbar, die die K^+ -Leitfähigkeit erhöht.

Die Injektion von Ca^{++} in ein Paramecium setzt den Membranwiderstand herab, während die Injektion von EGTA den entgegengesetzten Effekt hat (Satow, 1978; Brehm, Dunlap & Eckert, 1978). Wenn diese Herabsetzung des Membranwiderstands durch Ca^{++} schnell genug erfolgt, so wäre dies eine mögliche Erklärung für den beobachteten Auswärtstrom. Das Ansteigen der Amplitude bis zu Depolarisationen von 60 bis 80 mV wäre durch die Spannungsabhängigkeit der Auswärtskomponente erklärbar, die Abnahme bei höheren Spannungen durch ihre Ca^{++} -Abhängigkeit.

4.3 Ca^{++} -, Sr^{++} - und Ba^{++} -Ströme im Vergleich

Im folgenden wird im wesentlichen ein Vergleich der eigenen Ergebnisse aus den Sr^{++} - und Ba^{++} -Versuchen mit der zwischenzeitlich veröffentlichten Arbeit von Saimi und Kung (1982) vorgenommen. In dieser Arbeit wird die Aktivierung der Einwärtströme, die Inaktivierung während einer Depolarisation, sowie die 'Deaktivierung' (Saimi & Kung) nach Repolarisation in Ca^{++} -, Sr^{++} - und Ba^{++} -Lösung mit der Spannungsklemme untersucht. Die Untersuchung der Deaktivierung erfolgt hierbei durch Messung von 'tail-currents' nach Spannungspulsen von 2 ms Länge. Die Versuche wurden an *P. caudatum* durchgeführt ($T = 20^{\circ}\text{C}$). Die Konzentration von Ca^{++} , Sr^{++} oder Ba^{++} im Außenmedium, sowie die K^+ -Konzentration beträgt 1 mM. Neben einem Puffer enthalten die Lösungen 5 mM TEACl, um die K^+ -Ströme herabzusetzen. Die Zellen werden vor den Spannungspulsen um 10 mV hyperpolarisiert. Hierdurch soll

die Inaktivierung der Ca^{++} -Kanäle verringert werden.

Die eigenen Ergebnisse stimmen in folgenden Punkten mit denen von Saimi und Kung überein:

- Die Aktivierung der Einwärtsströme erfolgt in Sr^{++} -Lösung etwas und in Ba^{++} -Lösung deutlich langsamer als in Ca^{++} -Lösung.
- Die Schwellen-Depolarisation für die Aktivierung der Ströme ist in den drei Lösungen gleich.
- Die Sr^{++} -Ströme halten etwa um den Faktor 4 länger an als die Ca^{++} -Ströme. In Ba^{++} -Lösung ist auch bei längeren Depolarisationen (in den eigenen Versuchen bis 60 ms) keine oder nur eine sehr geringe Inaktivierung der Einwärtsströme zu beobachten.

Es zeigen sich jedoch folgende Abweichungen in den Ergebnissen:

- Die Maxima der Sr^{++} - und Ba^{++} -Ströme treten in den Messungen von Saimi und Kung bei Depolarisationen auf, die 5 bis 10 mV unterhalb der Spannung liegen, die zum maximalen Ca^{++} -Strom führt. Eine solche Verschiebung der Maxima wird in den eigenen Versuchen beim Übergang von Ca^{++} - auf Sr^{++} -Lösung nicht beobachtet. (Für die Berechnung der Ba^{++} -Ströme konnte das Subtraktionsverfahren nicht angewendet werden (siehe Abschnitt 3.2.2). Eine sichere Aussage über die Lage des maximalen Ba^{++} -Stroms im Strom-Spannungs-Diagramm ist deshalb für die eigenen Versuche nicht möglich.)
- Bei den Messungen von Saimi und Kung sind die maximalen Einwärtsströme in Sr^{++} - und in Ba^{++} -Lösung um 60 % größer als in Ca^{++} -Lösung. Die eigenen Versuche zeigen keine Unterschiede in den Amplituden von Ca^{++} - und Sr^{++} -Strömen. In Ba^{++} -Lösung sind die Einwärtsströme im Vergleich zu Standardlösung bis zu einer Depolarisation von 20 mV meist deutlich erhöht. Zwischen 20 und 30 mV sind die Ba^{++} -Ströme jedoch nur maximal 5 bis 20 % größer als die Ca^{++} -Ströme.
- Die zeitliche Abnahme der Ba^{++} - 'tail-currents' erfolgt exponentiell. Während Saimi und Kung eine Zeitkonstante von 0,86 ms für diese Abnahme angeben, wurde aus den eigenen Versuchen ein Wert zwischen 7 und 8 ms bestimmt.
- In den Versuchen von Saimi und Kung kehrt der maximale Einwärtsstrom in Sr^{++} -Lösung bei einer Depolarisation von 50 mV seine Richtung um. In den eigenen Versuchen beträgt der Sr^{++} -Strom bei einer Depolarisation von 60 mV noch 25 % des Maximalwertes.

In den eigenen Versuchen sind die Amplituden der Einwärtsströme nach Übergang von Ca^{++} - zu Sr^{++} - (oder Ba^{++} -) Lösung nicht oder nur sehr wenig vergrößert. Dieser Unterschied zu den Messungen von Saimi und Kung erklärt sich sehr wahrscheinlich durch die Zusammensetzung der verwendeten Badlösungen. Hagiwara, Fukuda und Eaton (1974) verglichen die Ströme von Ca^{++} , Sr^{++} und Ba^{++} am Balanasmuskel. Die Höhe der Einwärtsströme in den entsprechenden Lösungen ist $I_{\text{Ba}} > I_{\text{Sr}} \approx I_{\text{Ca}}$. Nach Zugabe von Co^{++} ist das Verhältnis jedoch verändert: $I_{\text{Ca}} > I_{\text{Sr}} > I_{\text{Ba}}$. Eine Veränderung dieses Verhältnisses kann im Prinzip durch jedes Ion erfolgen, das in der Lage ist, an den Ca^{++} -Kanal zu binden (Hagiwara & Byerly, 1981). Es ist deshalb möglich, daß in Gegenwart von 5 mM TEA (Saimi & Kung) ein anderes Amplitudenverhältnis auftritt als ohne diese Substanz.

Das Auftreten des maximalen Einwärtsstroms bei kleineren Spannungen in Sr^{++} -Lösung beruht möglicherweise auf einem ähnlichen Mechanismus: Es ist denkbar, daß das Verhältnis der 'stabilizing action' von Ca^{++} und Sr^{++} in Gegenwart von TEA verändert ist.

DePeyer und Deitmer (1980) untersuchten die Einwärtsströme in Ca^{++} -, Sr^{++} - und Ba^{++} -Lösung an *Stylonychia*. In allen Lösungen tritt der maximale Einwärtsstrom bei derselben Depolarisation auf ($\Delta V = 35$ mV). Die Amplituden der Ca^{++} -, Sr^{++} - und Ba^{++} -Ströme sind bei dieser Spannung gleich. Die Lösungen, in denen die Messungen durchgeführt wurden, haben die gleiche Zusammensetzung und Konzentrationen wie die Lösungen der eigenen Versuche.

Der Unterschied zwischen den Zeitkonstanten der Ba^{++} - 'tail-currents' hat sehr wahrscheinlich zwei Ursachen:

Zum einen hängt die Zeitkonstante sehr von der Spannung ab, auf die die Membran repolarisiert wird. Saimi und Kung berichten, daß die Zeitkonstante der Ba^{++} - 'tail-currents' um den Faktor 2,5 kleiner wird, wenn nach dem Spannungssprung eine Repolarisation auf -50 statt auf -40 mV erfolgt. In den eigenen Versuchen sind die Zellen in der Zeit zwischen den Pulsen auf das Ruhepotential geklemmt (in Mittel -32 mV). Es ist zu erwarten, daß aus diesem Grund eine vergrößerte Zeitkonstante auftritt.

Zum anderen wurden die Versuche von Saimi und Kung bei etwa 20°C durchgeführt, die eigenen jedoch bei 15°C. Martinac und Hildebrand (1981) berichten von einem hohen Temperaturkoeffizienten für den gating-Mechanismus des Ca^{++} -Kanals. Der Temperaturunterschied von 5°C ist also wahrscheinlich für die höhere Zeitkonstante in den eigenen Versuchen mitverantwortlich.

Durch 5 mM TEA im Außenmedium läßt sich der K^+ -Strom bis auf 25 % reduzieren (Saimi & Kung, 1982). In den Versuchen von Saimi & Kung schneidet die Strom-Spannungs-Kennlinie in Sr^{++} - und in Ba^{++} -Lösung bei Depolarisationen von 50 mV die Spannungsachse. In den eigenen Sr^{++} -Versuchen treten jedoch (nach Subtraktion der K^+ -Ströme) bis zu Depolarisationen von 60 mV deutliche Einwärtsströme auf. Die Stromumkehr in den Messungen von Saimi und Kung beruht deshalb sehr wahrscheinlich auf einem Rest- K^+ -Strom.

Saimi und Kung schließen aus ihren Ergebnissen auf eine Ionenabhängigkeit des gating-Mechanismus am spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanal. Dabei wird eine Analogie zu einer Substrat- (oder Cofaktor-) Enzym-Beziehung diskutiert.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Ca^{++} , Sr^{++} und Ba^{++} bei ihrem erregungsbedingten Einstrom in die Zelle miteinander zu konkurrieren scheinen. So ist die Aufnahme von $^{133}\text{Ba}^{++}$ in Gegenwart von Ca^{++} herabgesetzt (Ling & Kung, 1980). Der Ca^{++} -Einstrom bei Erregung läßt sich durch Sr^{++} oder Ba^{++} hemmen (Browning & Nelson, 1976). Wird bei konstanter äußerer Ba^{++} -Konzentration die Ca^{++} -Konzentration erhöht, so verkürzt sich die Dauer eines Aktionspotentials. Andererseits wird ein Aktionspotential verlängert, wenn bei konstanter Ca^{++} -Konzentration die Konzentration von Ba^{++} erhöht wird. Für konstante Verhältnisse von $\text{Ba}^{++}/\text{Ca}^{++}$ bleibt die Dauer eines Aktionspotentials bei steigenden Konzentrationen unverändert (Naitoh & Eckert, 1968b). Hildebrand (1975) berichtet von einer Konkurrenz zwischen Ca^{++} und Ba^{++} bzw. Sr^{++} bei der Steuerung der Empfindlichkeit für UV-ausgelöste Bewegungsreaktionen von *Euplotes vannus*.

4.4 kompetitive Hemmung des Ca^{++} -Stroms durch Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} und Ni^{++}

Für den Fall einer kompetitiven Hemmung des Einwärtsstroms durch

Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} und Ni^{++} ist bei reziproker Auftragung des Ca^{++} -Stroms gegen die Konzentration dieser Ionen eine lineare Beziehung zu erwarten (vgl. Abschnitt 3.3). Die überwiegend hohen Korrelationskoeffizienten (0,7 für Mn^{++} ; 0,87 für Co^{++} und Mg^{++} ; 0,96 für Ni^{++}) bei linearer Regression machen es sehr wahrscheinlich, daß in der Tat eine kompetitive Hemmung vorliegt.

Durch Zugabe von Co^{++} oder Mn^{++} in den Additionsversuchen wird das Ruhepotential in positive Richtung verschoben. Unabhängig davon tritt der maximale Ca^{++} -Strom jedoch in allen Lösungen bei derselben absoluten Membranspannung auf. Eine Veränderung der treibenden Kraft als (teilweise) Ursache für den herabgesetzten Ca^{++} -Strom in Gegenwart dieser Ionen kann somit ausgeschlossen werden.

Satow und Kung (1979) untersuchten die Abhängigkeit des Ca^{++} -Stroms von der äußeren Ca^{++} -Konzentration zwischen 0,38 und 5,6 mM an *Paramecium tetraurelia*. Oberhalb von 0,91 mM trat keine weitere Erhöhung des Ca^{++} -Stroms auf. Die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung über mehr als 40 mV macht eine Interpretation jedoch schwierig. Es ist nicht bekannt, inwieweit der 'stabilizing effect' von Ca^{++} für diese Sättigung verantwortlich ist.

In den eigenen Versuchen wurde die Ca^{++} -Konzentration deshalb in einem engeren Bereich variiert (0,33 bis 2 mM). Auch unter diesen Bedingungen ist die Bestimmung einer Bindungskonstanten für Ca^{++} jedoch nur unter der Voraussetzung sinnvoll, daß die beobachtete Sättigung tatsächlich eine Eigenschaft der Ca^{++} -Pore darstellt und nicht - oder nur zu einem geringen Teil - auf der Abschirmung von Oberflächenladungen beruht. Es ist denkbar, daß sich die Ca^{++} -Konzentration an der Außenseite der Zellmembran nicht in gleichem Maße erhöht wie die Konzentration im Außenmedium, wenn Ca^{++} zunehmend negative Ladungen an der Membran abschirmt (Hagiwara, 1973). Inwieweit diese Abschirmung negativer Ladungen bei der Sättigung des Ca^{++} -Stroms eine Rolle spielt, ist schwer zu sagen. Die folgenden Gründe machen jedoch eine Bindung an die Membran als Ursache für die Sättigung wahrscheinlich:

- 1) Obwohl in den Substitutionsversuchen die Konzentration zweierwertiger Kationen konstant gehalten wird, verringert sich das Ruhepotential der Zellen in den Versuchen mit Co^{++} und Mn^{++} .

Sehr wahrscheinlich ist hierbei eine Veränderung des Oberflächenpotentials beteiligt (Hook & Hildebrand, 1979; 1980; Eckert & Brehm, 1979). Nach der 'Gouy-Chapman'-Gleichung, die die Abschirmung von Oberflächenladungen beschreibt, sollten beim 'screening effect' (McLaughlin, Szabo & Eisenman, 1971) keine Unterschiede zwischen verschiedenen zweiwertigen Kationen auftreten (Ohmori & Yoshii, 1977). Es findet also wahrscheinlich eine (im Vergleich zum Ca^{++} unterschiedliche) Bindung an die Membran statt.

- 2) Die untersuchten nicht-permeisierenden Kationen unterscheiden sich bei gleicher Konzentration in der Effektivität, mit der sie den Ca^{++} -Strom hemmen. Dies ist ebenfalls nur mit einer Bindung an die Membran zu erklären.
- 3) Wie die Additionsversuche zeigen, ist eine kompetitive Hemmung des Ca^{++} -Stroms durch die untersuchten Kationen sehr wahrscheinlich. Die Grundvoraussetzung für diese Art der Hemmung ist aber, daß ein sättigendes System vorliegt (Abschnitt 3.3).

Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Sättigung des Einwärtsstroms mit steigender Ca^{++} -Konzentration zum Teil auf einem 'screening effect' beruht. Dies würde bedeuten, daß die tatsächliche Bindungskonstante größer ist und möglicherweise noch unterhalb des Konfidenzbereichs von 95 % aus Abb. 35 liegt. Entsprechend würden sich auch die absoluten Werte der anderen Bindungskonstanten ändern.

Mit dem Wert für K_{Ca} ändert sich das Verhältnis zu den Konstanten der anderen Ionen jedoch nur wenig (Abschnitt 3.4.3). Selbst bei angenommenen Werten von 10 und 250 μM für die Ca^{++} -Bindungskonstante bleibt das Verhältnis $K_{\text{Ca}}/K_{\text{Ni}}$ weitgehend konstant (4,2 bzw. 5,2). K_{Ca} läßt sich also relativ zuverlässig in die Sequenz $K_{\text{Ni}} : K_{\text{Co}} : K_{\text{Mn}} : K_{\text{Mg}}$ einordnen. Das Verhältnis dieser Werte ist ohnehin konstant und unabhängig vom absoluten Wert der Ca^{++} -Bindungskonstante. Die Zuverlässigkeit der Angaben über die relativen Bindungskonstanten zeigt sich auch beim Vergleich der Ergebnisse aus Substitutions- und Additionsversuchen (Abschnitt 3.5): Die errechneten Werte stimmen gut mit den gemessenen überein. Auch in diesen Berechnungen wirkt sich vor allem das Verhältnis der Bindungskonstanten zueinander aus und nicht ihre ab-

solute Größe.

Die Werte für K_{Ca} (40 bis 130 μM) liegen etwa zwei Größenordnungen unterhalb von denen, die z.B. für den Ca^{++} -Kanal am Balanus-Muskel berechnet wurden ($K_{Ca} < 15$ mM, Hagiwara & Takahashi, 1967). Die niedrigen Salzkonzentrationen, denen ein Süßwasser-Ciliat in der Regel ausgesetzt ist, lassen jedoch eine vergleichsweise hohe Affinität erwarten, damit die Erregbarkeit sichergestellt ist. Die Ca^{++} -Konzentrationen im Außenmedium beider Objekte unterscheiden sich in ähnlicher Weise wie die Ca^{++} -Bindungskonstanten ($[Ca^{++}]_o$ am Balanus-Muskel = 20 mM, Hagiwara & Takahashi, 1967; $[Ca^{++}]_o = 1$ mM für Paramecium).

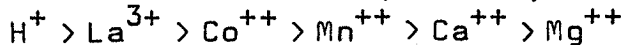
Wird die Ca^{++} -Konzentration im Außenmedium variiert, so verschieben sich Ruhepotential, der berechnete Wert für E_{Ca} und die Spannung, bei der der maximale Ca^{++} -Strom auftritt (V_{max}), jeweils in die gleiche Richtung (vgl. Abb. 36). Während sich die Verschiebungen von E_{Ca} und Ruhepotential im Betrag unterscheiden (Abb. 36), sind die von E_{Ca} und V_{max} in allen Lösungen exakt gleich. Bei der auftretenden Sättigung des Ca^{++} -Stroms ist eine Veränderung der treibenden Kraft ($V_{max} - E_{Ca}$) deshalb sicher nicht beteiligt.

Obwohl in den Additionsversuchen das Ruhepotential durch Co^{++} und Mn^{++} deutlich in positive Richtung verschoben wird, tritt der maximale Ca^{++} -Strom in allen Lösungen bei der gleichen absoluten Membranspannung auf. Das heißt, auch hier bleibt die treibende Kraft für den Einwärtsstrom konstant.

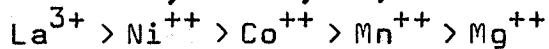
In der Literatur ist eine Reihe von (quantitativen) Untersuchungen beschrieben, die sich mit der Hemmung des Ca^{++} -Stroms durch zweiwertige Kationen, sowie La^{3+} und H^+ befassen. Dabei zeigen sich an den verschiedenen Objekten Unterschiede in der absoluten und relativen Affinität der Ca^{++} -Bindungsstellen für die untersuchten Ionen. In der Wirksamkeit, mit der verschiedene Kationen den Ca^{++} -Strom herabsetzen, ergibt sich für die untersuchten Ca^{++} -Kanäle folgendes Bild:

- a) Balanus-Muskel (Hagiwara & Takahashi, 1967):
 $La^{3+}, UO_2^{++} > Zn^{++}, Co^{++}, Fe^{++} > Mn^{++} > Ni^{++} > Ca^{++} > Mg^{++}$
- b) Muskeln von Insektenlarven (Fukuda & Kawa, 1977):
 $Co^{++} > Mn^{++} > Ni^{++}$

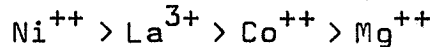
c) Tunicaten-Eizellen (Okamoto, Takahashi & Yoshii, 1976):



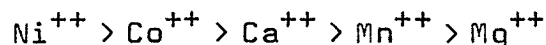
d) glatte Muskulatur von Säugetieren (VanBreemen, Farinas, Casteels, Gerba, Wuytack & Deth, 1973):



e) Schnecken-Neurone (Akaike, Lee & Brown, 1978):



Ein Vergleich der verschiedenen Präparate ist schwierig, weil nicht in allen Fällen die gleichen Ionen getestet wurden. Präparat c ist deshalb nicht von den anderen Präparaten zu unterscheiden. Die Präparate a und b stimmen ebenfalls miteinander überein. Sie unterscheiden sich von den Präparaten d und e in der relativen Effektivität von Co^{++} und Mn^{++} im Vergleich zu Ni^{++} . d und e unterscheiden sich in der Affinität zu Ni^{++} und La^{3+} . Bezogen auf die Sequenz



entspricht Paramecium den Präparaten d und e.

Die in den Substitutions- und Additionsversuchen gemessene Hemmung des Ca^{++} -Stroms durch Co^{++} , Mn^{++} und Mg^{++} steht teilweise im Widerspruch zu den Messungen von Naitoh, Eckert und Friedman (s.u.), in denen der Einfluß dieser Ionen auf das Aktionspotential von Paramecium untersucht wurde:

Aktionspotentiale lassen sich bei Paramecium z.B. durch mechanische Reizung des Vorderendes oder Injektion depolarisierender Ströme über Mikroelektroden auslösen. Naitoh und Eckert (1968a; b) arbeiteten mit konstanten Strömen kleiner Amplituden (bis $5 \cdot 10^{-10}$ A), die 50 bis 300 ms lang injiziert wurden, während Naitoh, Eckert und Friedman (1972) Aktionspotentiale durch kurze Pulse (1 bis 2 ms) wesentlich höherer Amplitude auslösten. Bei Aktionspotentialen infolge kleiner, anhaltender Ströme setzt Mg^{++} den aktiven Ca^{++} -Anteil an der Depolarisation herab; der Membranwiderstand wird erhöht (Naitoh & Eckert, 1968a). Ein durch gleiche Reizung ausgelöstes Ca^{++} - Ba^{++} -Aktionspotential zeigt nach Zugabe von Mg^{++} eine höhere Schwelle und einen verringerten 'overshoot'. Mn^{++} erhöht die Schwelle ebenfalls und bewirkt eine Verlängerung der Anstiegs- und Abfallphase des Ca^{++} - Ba^{++} -Aktions-

potentials (Naitoh & Eckert, 1968b).

Naitoh, Eckert und Friedman (1972) untersuchten die Wirkung verschiedener Ionen auf das Ca^{++} -Aktionspotential, das sie durch kurze Strompulse auslösten. In Gegenwart von Mg^{++} und Co^{++} ist der 'overshoot' erhöht. Durch beide Ionen wird das Ruhepotential noch stärker in positive Richtung verschoben. Die relative Amplitude des Aktionspotentials wird so insgesamt kleiner. Nach Zugabe von Mn^{++} bleibt die relative Größe unverändert, weil 'overshoot' und Ruhepotential parallel zu positiveren Spannungen verschoben werden.

Bei der Untersuchung von Aktionspotentialen infolge mechanischer Reizung wurde eine solche parallele Verschiebung durch Mn^{++} und Mg^{++} hervorgerufen (Eckert, Naitoh & Friedman, 1972). Bei der höchsten untersuchten Konzentration (8 mM) waren 'overshoot' und Ruhepotential in Gegenwart von Mn^{++} jedoch um 20 mV positiver als nach Zugabe von Mg^{++} .

Da Mg^{++} , Co^{++} und Mn^{++} zum Teil in großem Überschuß zur Ca^{++} -Lösung gegeben wurden, scheint der Einfluß dieser Ionen auf das Aktionspotential von Paramecium gering zu sein. Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wird deshalb geschlossen, daß Mg^{++} , Co^{++} und Mn^{++} den spannungsabhängigen Ca^{++} -Strom nicht oder nur sehr wenig hemmen (Brehm, Dunlap & Eckert, 1978; Eckert & Brehm, 1979; Brehm, Eckert & Tillotson, 1980). Bisher lagen keine 'voltage-clamp'-Messungen über die Wirkung dieser Ionen vor.

Es ist schwierig, die Ergebnisse aus den 'constant-current'-Versuchen mit den eigenen Messungen zu vergleichen. Versuche mit der 'voltage-clamp'-Technik stellen sicher das direktere Verfahren zur Messungen von Membranströmen dar, das auch mit weniger Fehlerquellen behaftet ist. So wirkt sich in 'constant-current'-Versuchen z.B. eine Erhöhung des Membranwiderstands direkt auf die Höhe einer Depolarisation aus:

Naitoh und Eckert (1968a; b) injizierten Ströme mit Amplituden bis 0,25 nA. Ein Strom dieser Stärke führt bei einem (angenommenen) Membranwiderstand von 60 bis 70 M Ω zu einer Depolarisation von 15 bzw. 17,5 mV. Durch solche Depolarisationen wird der Ca^{++} -Strom nur etwa zur Hälfte aktiviert. Eine Erhöhung des Membranwiderstands bei konstanter Stromstärke würde über eine vergrößer-

te passive Komponente im Aktionspotential zu einer vermehrten Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{++} -Kanäle führen. Auf diese Weise könnte eine gleichzeitige Herabsetzung der Ca^{++} -Leitfähigkeit durch ein hemmendes Ion ausgeglichen und verdeckt werden. In den eigenen Versuchen wird eine deutliche Erhöhung des Membranwiderstands durch Co^{++} und Mn^{++} gemessen. Naitoh und Eckert (1968a) berichten, daß der Membranwiderstand nach Zugabe von Mg^{++} ebenfalls erhöht ist.

Auf ähnliche Weise ließe sich auch für die Versuche von Naitoh, Eckert und Friedman (s.o.) erklären, daß Mg^{++} , Co^{++} und Mn^{++} scheinbar ohne Einfluß auf die Ca^{++} -Leitfähigkeit sind. Auch wenn kurze und hohe Strompulse für die Reizung verwendet werden, hat der tatsächliche Reizstrom durch die hohen Zeitkonstanten von Elektrode und Membran eine wesentlich kleinere Amplitude und hält länger an (Naitoh, Eckert & Friedman, 1972), so daß im Prinzip eine ähnliche Reizung erfolgt wie in den Versuchen von Naitoh und Eckert (1968a; b).

In den Versuchen von Eckert, Naitoh und Friedman (1972) wird eine quantitative Aussage durch die schlechte Reproduzierbarkeit der mechanischen Reizung erschwert. Weiterhin geht die Ionenabhängigkeit des Ca^{++} -Rezeptorstroms als zusätzliche Unbekannte in das System ein.

Die Hemmung des Ca^{++} -Stroms durch Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} und Ni^{++} in den eigenen Versuchen stimmt gut mit den Ergebnissen der Flußexperimente von Browning und Nelson (1976) überein. In diesen Untersuchungen mit dem Radioisotop $^{45}\text{Ca}^{++}$ ist der erregungsbedingte Ca^{++} -Einstrom in Gegenwart von Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} und Ni^{++} ebenfalls gehemmt. Hierbei unterscheidet sich Mg^{++} von den anderen Kationen durch seine geringere Effektivität. Bei *Stylonychia* ist nach Zugabe von Mn^{++} (1 mM) zur 'Standard- Ca^{++} -Lösung' (CaCl_2 , KCl, TRIS, jeweils 1 mM, pH 7,2 bis 7,4) die spannungsabhängige Ca^{++} -Leitfähigkeit herabgesetzt. Die Zugabe von Mg^{++} (1 mM) zeigt keinen signifikanten Effekt (DePeyer & Deitmer, 1980). Nach neueren Untersuchungen (Deitmer, 1983) besitzt *Stylonychia* zwei verschiedene spannungsabhängige Ca^{++} -Kanäle. Die Ca^{++} -Ströme durch beide Kanäle sind in Gegenwart von Co^{++} (unterschiedlich stark) herabgesetzt.

Der Cilienschlag von *Paramecium* wird durch Ni^{++} bereits in sehr kleinen Konzentrationen gehemmt. Dies ermöglicht eine nicht-letale Immobilisierung der Zellen (Gelei, 1935). Die Wirkung von Ni^{++} auf den Cilienschlag ist reversibel (Kuźnicki, 1963; Andrivon, 1968). Ruhepotential und Erregungsmechanismus sind nach einer kurzen Ni^{++} -Behandlung nicht beeinflusst (Naitoh, 1966).

Andrivon (1968; 1970a; b) schließt aus seinen Ergebnissen, daß Ni^{++} in die Zellen eindringen muß, um auf die Cilienbewegung zu wirken. Die Geschwindigkeit der Ni^{++} -Aufnahme hängt hierbei von der äußeren Konzentration dieses Ions ab: Im Lineweaver-Burk-Diagramm zeigt sich eine lineare Beziehung, d.h. die Aufnahme erfolgt mit einer Michaelis-Menten-Kinetik (Andrivon, 1970b; 1972). Ca^{++} und Mg^{++} hemmen die Aufnahme von Ni^{++} (Kuźnicki, 1963). Andrivon (1970b; 1972) beschreibt eine kompetitive Hemmung dieser Aufnahme durch Ca^{++} und Co^{++} und nimmt deshalb an, daß der Einstrom von Ca^{++} und Ni^{++} durch den gleichen Kanal erfolgt (1974).

Es wäre denkbar, daß Ni^{++} infolge spontaner Depolarisationen durch den spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanal in die Zelle gelangt. Die Hemmung des Ca^{++} -Kanals durch Ni^{++} schließt diese Möglichkeit nicht aus: Es läßt sich nicht unterscheiden, ob ein Kanal, der eine hohe Affinität für ein Ion besitzt, für dieses Ion wenig oder nicht permeabel ist (vgl. Hagiwara & Byerly, 1981).

In den eigenen Versuchen blieben die Zellen beim Austausch der Standardlösung durch die Ni^{++} -Lösungen zum Teil auf das Ruhepotential geklemmt. Die Immobilisierung der Cilien und die Zerstörung der Zellen durch Ni^{++} konnte hierdurch jedoch nicht verzögert werden (vgl. Ba^{++} : Abschnitt 3.2). Aus diesem Ergebnis läßt sich sicher nicht schließen, daß der spannungsabhängige Ca^{++} -Kanal für Ni^{++} impermeabel ist. Es zeigt aber, daß andere Mechanismen in der Membran vorliegen, die den Einstrom von Ni^{++} ermöglichen, und daß der Ni^{++} -Einstrom durch den spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanal im Vergleich zum Gesamteinstrom zumindest klein sein muß. Wegen der kompetitiven Hemmung der Ni^{++} -Aufnahme durch Ca^{++} und Co^{++} bleibt die Wahrscheinlichkeit groß, daß Ni^{++} durch Ca^{++} -spezifische Kanäle in die Zelle gelangt. Diese Kanäle sind jedoch sicher nicht spannungsabhängig.

4.5 Beziehungen zwischen Ca^{++} - und K^+ -Strom, Ruhepotential und -widerstand in verschiedenen Lösungen

Ein Teil der untersuchten Kationen hat neben der Wirkung auf den erregungsbedingten Ca^{++} -Strom und die erregungsbedingte K^+ -Leitfähigkeit einen Einfluß auf das Ruhepotential und den Ruhewiderstand der Zellen. Eine quantitative Analyse dieses Einflusses ist wegen der Streuung der Werte schwierig. Eine qualitative Betrachtung zeigt aber, daß eine Herabsetzung der erregungsbedingten K^+ -Leitfähigkeit in fast allen Fällen gleichzeitig mit einer Erhöhung des Ruhewiderstands und einer Verschiebung des Ruhepotentials in positive Richtung auftritt. Eine direkte Beziehung zum Ca^{++} -Strom wird nicht sichtbar.

Aufgrund der Lage des Ruhepotentials bezogen auf die theoretischen Werte für E_{Ca} und E_{K} läßt sich nach der Beziehung

$$V_M = E_{\text{Ca}} \frac{g_{\text{Ca}}}{g_{\text{Ca}} + g_{\text{K}}} + E_{\text{K}} \frac{g_{\text{K}}}{g_{\text{Ca}} + g_{\text{K}}}$$

ein Verhältnis $g_{\text{K}}/g_{\text{Ca}} = 2,7$ für die unerregte Zelle in Standardlösung berechnen. Die Ruheleitfähigkeit der Membran besteht also hauptsächlich aus einer Leitfähigkeit für K^+ (vgl. Naitoh & Eckert, 1968a; Eckert, Naitoh & Machemer, 1976; Satow & Kung, 1976). Dies erklärt, weshalb eine Erhöhung des Ruhewiderstands zusammen mit einer Verschiebung des Ruhepotentials in positive Richtung auftritt.

Die gute Übereinstimmung zwischen den spannungsabhängigen K^+ -Kanälen und den Ruhekanälen der Membran in der Ionenabhängigkeit beruht möglicherweise auf ihrer funktionellen Ähnlichkeit.

Es ist wahrscheinlich, daß neben dem 'screening effect' vor allem die Bindung zweiwertiger Kationen an die negativ geladene Oberfläche der Membran für die veränderten Ca^{++} - und K^+ -Ströme bei Erregung und die Veränderung des Membranpotentials und -widerstands der Zellen in Ruhe verantwortlich ist (Abschnitt 4.4). Hierbei ist nicht bekannt, inwieweit diese Effekte auf der Bindung an spezialisierte Bereiche der Zelloberfläche beruhen (vgl. Eckert & Brehm, 1979). Aus der Hemmung des Ca^{++} -Stroms kann z.B. nicht

notwendigerweise geschlossen werden, daß eine Bindung des hemmenden Ions direkt an den Kanal erfolgt. Ebenso gut wäre die Bindung an andere Strukturen und eine Herabsetzung der Leitfähigkeit auf indirektem Wege denkbar. Insbesondere die Ni^{++} -Versuche zeigen jedoch, daß die Hemmung des Ca^{++} -Stroms einerseits und die Veränderung des Ruhepotentials, des Ruhewiderstands und der erregungsbedingten K^+ -Leitfähigkeit andererseits weitgehend unabhängig voneinander erfolgen. Es existieren deshalb sehr wahrscheinlich zumindest zwei verschiedene funktionelle Komponenten der Zelloberfläche, die sich in ihrer Affinität für Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} und Ca^{++} unterscheiden.

5 Zusammenfassung

Methoden:

- 1) Der erregungsbedingte Einwärtsstrom von *Paramecium caudatum* wurde in Gegenwart von Ca^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} , Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} und Ni^{++} mit der voltage-clamp-Methode untersucht.
- 2) Im Gegensatz zum bisher üblichen Verfahren werden die Zellen von oben angestochen, während die Beobachtung dieses Vorgangs von unten erfolgt. Auf diese Weise können gerade Mikroelektroden verwendet werden, die einfacher herzustellen sind als die bisher benutzten hakenartigen Elektroden.
- 3) Mit Hilfe einer Ummantelung der Elektrodenspitzen und einer Abschirmung der Spannungselektrode konnte die Zeit, die für eine Veränderung des Membranpotentials benötigt wird, auf etwa 300 μs herabgesetzt werden.
- 4) Durch Depolarisationen, die das Ca^{++} -System vor der eigentlichen Messung inaktivieren, und ein anschließendes Subtraktionsverfahren gelang die Trennung der erregungsbedingten Ca^{++} - und K^+ -Ströme ('Doppelpulsverfahren').
- 5) In 'Substitutions'-Versuchen wurde das Ca^{++} im Außenmedium durch das jeweils untersuchte Kation ersetzt. In 'Additions'-Versuchen wurde die Ca^{++} -Konzentration konstant gehalten und das getestete Kation zugegeben.

Ergebnisse:

- 1) Mit Hilfe des Doppelpulsverfahrens konnten die reinen Ca^{++} -ströme bei Erregung bis zu einer Depolarisation von $\Delta V = 100 \text{ mV}$ dargestellt werden. Bei Spannungen oberhalb $\Delta V = 35 \text{ mV}$ nimmt die Höhe der Ca^{++} -Ströme im Strom-Spannungs-Diagramm in Richtung auf das theoretische Ca^{++} -Gleichgewichtspotential ($E_{\text{Ca}} = 123 \text{ mV}$ bei $\Delta V = 155 \text{ mV}$) ab. Diese Abnahme erfolgt nicht linear und läßt sich nicht durch die 'constant-field'-Gleichung beschreiben. Bis zu $\Delta V = 100 \text{ mV}$ zeigen die Ca^{++} -Ströme keine Tendenz, ihre Richtung umzukehren.
- 2) Bei Messungen in Ca^{++} -Lösung tritt bei Depolarisationen von 60 bis 100 mV auch nach Subtraktion des K^+ -Stroms eine Aus-

wärtskomponente im Strom auf.

- 3) Die Trennung der Ca^{++} - und K^+ -Ströme durch Vergleichsmessungen an einer Ca^{++} -Defektmutante und durch Zugabe von Skorpion-Toxinen war nicht möglich.
- 4) Nach Substitution von Ca^{++} durch Sr^{++} oder Ba^{++} treten deutliche Einwärtsströme auf. Die Verteilung im Strom-Spannungsdiagramm ist ähnlich wie in Ca^{++} -Lösung; die Amplitude der Ba^{++} -Ströme ist im Vergleich zu den Ca^{++} - und Sr^{++} -Strömen leicht erhöht. Aktivierung und Inaktivierung der Ströme erfolgen in Sr^{++} -Lösung etwas und in Ba^{++} -Lösung wesentlich langsamer als in Ca^{++} -Lösung. In Ba^{++} -Lösung treten bei der Repolarisation deutliche 'tail-currents' auf. Diese Ströme ermöglichen eine Aussage über die Spannungsabhängigkeit des Ca^{++} -kanals.
- 5) Nach Substitution des Ca^{++} durch Mg^{++} tritt kein Einwärtsstrom auf. Nach teilweiser Substitution durch Co^{++} oder Mn^{++} ist der Ca^{++} -Strom herabgesetzt. Die Ergebnisse lassen eine Hemmung des Ca^{++} -Stroms vermuten.
- 6) Diese Hemmung wurde in Additions-Versuchen quantitativ untersucht. Es zeigt sich, daß Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} und Ni^{++} den Ca^{++} -Strom kompetitiv hemmen. Hierbei ist das Verhältnis der Bindungskonstanten

$$K_{\text{Ni}} : K_{\text{Co}} : K_{\text{Ca}} : K_{\text{Mn}} : K_{\text{Mg}} = 1 : 3 : 4,5 : 5 : 8$$

Die absolute Bindungskonstante für Ca^{++} liegt sehr wahrscheinlich zwischen 40 und 130 μM .

- 7) In einem quantitativen Vergleich mit Hilfe der absoluten Bindungskonstanten zeigt sich, daß die Ergebnisse aus den Substitutions-Versuchen sehr gut mit denen der Additions-Versuche übereinstimmen.
- 8) Ein Teil der untersuchten Kationen hat neben der Wirkung auf den Ca^{++} -Strom einen Einfluß auf die erregungsbedingte K^+ -Leitfähigkeit, das Ruhepotential und den Ruhewiderstand. Eine Herabsetzung der K^+ -Leitfähigkeit bei Erregung tritt hierbei in fast allen Fällen gemeinsam mit einer Erhöhung des Ruhewiderstands und einer Verschiebung des Ruhepotentials in positive

Richtung auf. Eine direkte Beziehung zum Ca^{++} -Strom wird nicht sichtbar.

Diskussion:

- 1) Die Trennung der Ca^{++} - und K^+ -Ströme bei Erregung ist bei höheren Depolarisationen nur anhand von Messungen an derselben Zelle möglich. Es zeigt sich, daß das Doppelpulsverfahren für die Bestimmung des Ca^{++} -Stroms bis zu Depolarisationen zwischen 90 und 100 mV angewendet werden kann. Bei diesen Membranspannungen liegt das Verhältnis $I_{\text{K}}/I_{\text{Ca}}$ bereits zwischen 15 und 20.
- 2) Ein Vergleich der Depolarisationen, bei denen der maximale Ca^{++} -Strom bzw. die maximale Inaktivierung des Ca^{++} -Systems erfolgt, läßt darauf schließen, daß für eine vollständige Inaktivierung (neben einer Erhöhung der inneren Ca^{++} -Konzentration) zuvor eine vollständige Aktivierung der Ca^{++} -Leitfähigkeit erfolgt sein muß.
- 3) Die beobachtete 'Auswärtskomponente' beruht möglicherweise auf einer (leichten) Modifizierung der K^+ -Leitfähigkeit durch eingeströmtes Ca^{++} .
- 4) Aus den Sr^{++} - und Ba^{++} -Versuchen läßt sich auf eine Ionenabhängigkeit des 'gating'-Mechanismus am spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanal schließen (vgl. Saimi & Kung, 1982).
- 5) Es ist wahrscheinlich, daß neben einem 'screening-effect' vor allem die Bindung zweiwertiger Kationen an die Membran für die veränderten Ca^{++} - und K^+ -Ströme bei Erregung und die Veränderung von Ruhepotential und -widerstand verantwortlich ist.
- 6) Die Hemmung des Ca^{++} -Stroms einerseits und die Veränderung des Ruhepotentials, des Ruhewiderstands und der erregungsbedingten K^+ -Leitfähigkeit andererseits erfolgen weitgehend unabhängig voneinander. Es scheinen somit zumindest zwei verschiedene Komponenten der Zelloberfläche zu existieren, die sich in ihrer Affinität für zweiwertige Kationen unterscheiden.

6 Literatur

- Adams, D.J., Dwyer, T.M., and Hille, B. (1980): the permeability of endplate channels to monovalent and divalent metal cations. *J. gen. Physiol.* 75, 493-510
- Akaike, N., Lee, K.S., and Brown, A.M. (1978): The calcium current of *Helix* neuron. *J. gen. Physiol.* 71, 509-531
- Andrивon, C. (1968): L'inhibition des mouvements ciliaires chez *Paramecium caudatum* par les sels de Ni^{++} : sa levée par les complexants de cet ion. *Protistologica* IV, 517-523
- Andrивon, C. (1970a): Complément a l'étude de l'action des inhibiteurs du métabolisme sur la résistance aux sels de nickel chez *Paramecium caudatum* et chez quelques autres protozoaires ciliés. *Protistologica* VI, 199-206
- Andrивon, C. (1970b): Preuves de l'existence d'un transport actif de l'ion nickel à travers la membrane cellulaire de *Paramecium caudatum*. *Protistologica* VI, 445-455
- Andrивon, C. (1972): The stopping of ciliary movements by nickel salts in *Paramecium caudatum*: the antagonism of K^+ and Ca^{++} ions. *Acta Protozool.* XI, 373-386
- Andrивon, C. (1974): La perméabilité à l'ion nickel chez *Paramecium*: ses rapports avec le renversement ciliaire. *Protistologica* X, 175-183
- Brehm, P. and Eckert, R. (1978a): Ca-dependent inactivation of calcium conductance in *Paramecium*. *Neurosci. Abstr.* 4, 234
- Brehm, P. and Eckert, R. (1978b): Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 202, 1203-1206
- Brehm, P., Dunlap, K., and Eckert, R. (1978): Calcium-dependent repolarisation in *Paramecium*. *J. Physiol. (Lond.)* 274, 639-654
- Brehm, P., Eckert, R., and Tillotson, D. (1980): Calcium-mediated inactivation of calcium current in *Paramecium*. *J. Physiol. (Lond.)* 306, 193-203
- Browning, J.L. and Nelson, D.L. (1976): Biochemical studies of

the excitable membrane of *Paramecium aurelia*. I. $^{45}\text{Ca}^{++}$ -fluxes across resting and excited membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 448, 338-351

- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D., and Maelicke, A. (1982): Selective blockage of voltage-dependent potassium channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296, 90-91
- Cornwall, M.C. and Thomas, M.V. (1981): Glass microelectrode tip capacitance: Its measurement and a method for its reduction. *J. Neurosci. Meth.* 3, 225-232
- Deitmer, J.W. (1983): Activation and inactivation of two voltage-dependent Ca channels. *Biophys. J.* 41, 293
- DePeyer, J.E. and Deitmer, J.W. (1980): Divalent cations as charge carriers during two functionally different membrane currents in the ciliate *Stylonychia*. *J. exp. Biol.* 88, 73-89
- Dunlap, K. (1977): Localization of calcium channels in *Paramecium caudatum*. *J. Physiol. (Lond.)* 271, 119-133
- Dwyer, T.M., Adams, D.J., and Hille, B. (1980): The permeability of the endplate channel to organic cations in frog muscle. *J. gen. Physiol.* 75, 469-492
- 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. Biophys. Bioeng.* 8, 353-383
- Eckert, R. and Naitoh, Y. (1970): Passive electrical properties of *Paramecium* and problems of ciliary coordination. *J. gen. Physiol.* 55, 467-483
- Eckert, R. and Tillotson, D.L. (1981): Calcium-mediated inactivation of the calcium conductance in caesium-loaded giant neurones of *Aplysia californica*. *J. Physiol. (Lond.)* 314, 265-280
- Eckert, R., Naitoh, Y., and Friedman, K. (1972): Sensory mechanism in *Paramecium*. I. Two components of the electric response to mechanical stimulation of the anterior surface. *J. exp. Biol.* 56, 683-694

- 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
- Eckert, R., Tillotson, D.L., and Brehm, P. (1981): Calcium-mediated control of Ca and K currents. In: Calcium currents in excitable membranes. Fed. Proc. 40, 2226-2232
- Fenwick, E.M., Marty, A., and Neher, E. (1982): Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. J. Physiol. (Lond.) 331, 599-635
- Fukuda, J. and Kawa, K. (1977): Permeation of manganese, cadmium, zinc, beryllium through calcium channels of an insect muscle membrane. Science 196, 309-311
- Gelei, J. (1935): Ni-Infusorien im Dienste der Forschung und des Unterrichtes. Biol. Zbl. 55, 57-74
- Hagiwara, S. (1973): Ca spike. Advan. in Biophys. 4, 71-102
- Hagiwara, S. (1975): Ca-dependent action potential. In: Membranes - A Series of Advances (G. Eisenman, ed.), 3, 359-381, New York: Dekker
- Hagiwara, S. and Byerly, L. (1981): Calcium channel. Ann. Rev. Neurosci. 4, 69-125
- Hagiwara, S. and Takahashi, K. (1967): Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. J. gen. Physiol. 50, 583-601
- Hagiwara, S., Fukuda, J., and Eaton, D. (1974): Membrane currents carried by Ca, Sr, and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp. J. gen. Physiol. 63, 564-578
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981): Improved patch-clamp-techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Arch. 391, 85-100
- Hildebrand, E. (1975): Bedeutung der Konkurrenz zwischen Calcium und anderen Kationen für die Steuerung der Leitfähigkeit sensorischer Membranen. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1974, 24-28

- Hildebrand, E. (1978): 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. (1983): Dependence of ciliary reversal in Paramecium on extracellular Ca^{2+} concentration. J. comp. Physiol. A, in the press
- Hille, B. (1971): The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. J. gen. Physiol. 58, 599-619
- Hille, B. (1972): The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve. J. gen. Physiol. 59, 637-658
- Hille, B. (1973): Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations. J. gen. Physiol. 61, 669-686
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952a): Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. (Lond.) 116, 449-472
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952c): The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol. (Lond.) 116, 497-506
- Hodgkin, A.L. and Katz, B. (1949): The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol. (Lond.) 108, 37-77
- Hook, C. and Hildebrand, E. (1979): Excitation of Paramecium. A model analysis. J. Math. Biol. 8, 197-214
- Hook, C. and Hildebrand, E. (1980): Excitability of Paramecium and the significance of negative surface charges. J. Math. Biol. 9, 347-360
- Jennings, H.S. (1904): The behavior of Paramecium. Additional features and general relations. J. comp. Neurol. and Psychol. 14, 441-510
- Kamada, T. (1934): Some observations on potential differences across the ectoplasm membrane of Paramecium. J. exp. Biol. 11, 94-102

- Katz, G.M. and Schwartz, T.L. (1974): Temporal control of voltage-clamped membranes: an examination of principles. *J. Membrane Biol.* 17, 275-291
- Kinosita, H., Dryl, S., and Naitoh, Y. (1964): Spontaneous change in membrane potential of *Paramecium caudatum* induced by barium and calcium ions. *Bull. L'Acad. Pol. Sci. Cl. II* 12, 459-461
- Kuźnicki, L. (1963): Reversible immobilisation of *Paramecium caudatum* by nickel ions. *Acta protozool.* VI, 301-312
- Lee, K.S. and Tsien, R.W. (1982): Reversal of current through calcium channels in dialysed single heart cells. *Nature* 297, 498-501
- Ling, K.-Y. and Kung, C. (1980): Ba^{++} influx measures the duration of membrane excitation in *Paramecium*. *J. exp. Biol.* 84, 73-87
- Machemer, H. und Grabowski, P. (1980): Praktikumsanleitung zum Kurs "Biologische Elektronik; Übungen zur praktischen Elektrophysiologie". Ruhr-Universität Bochum
- Martinac, B. and Hildebrand, E. (1981): Electrically induced Ca^{++} -transport across the membrane of *Paramecium caudatum* measured by means of flow-through technique. *Biochim. Biophys. Acta* 649, 244-252
- McLaughlin, S.G.A., Szabo, G., and Eisenman, G. (1971): Divalent ions and the surface potential of charged phospholipid membranes. *J. gen. Physiol.* 58, 667-687
- Meech, R.W. and Standen, N.B. (1975): Potassium activation in *Helix aspersa* neurones under voltage clamp: A component mediated by calcium influx. *J. Physiol. (Lond.)* 249, 211-239
- Meves, H. (1978): Inactivation of the sodium permeability in squid giant nerve fibers. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 33, 207-230
- Meves, H. and Vogel, W. (1973): Calcium inward currents in internally perfused giant axons. *J. Physiol. (Lond.)* 235, 225-265

- Naitoh, Y. (1966): Reversal response elicited in nonbeating cilia of *Paramecium* by membrane depolarisation. *Science* 154, 660-662
- Naitoh, Y. (1974): Bioelectric basis of behavior in Protozoa. *Am. Zool.* 14, 883-893
- Naitoh, Y. (1979): Membrane currents in voltage-clamped *Paramecium* and their relations to ciliary motion. *Acta Protozool.* 18, 1-6
- Naitoh, Y. and Eckert, R. (1968a): Electrical properties of *Paramecium caudatum*: Modification by bound and free cations. *Z. vergl. Physiol.* 61, 427-452
- Naitoh, Y. and Eckert, R. (1968b): Electrical properties of *Paramecium caudatum*: All-or-none electrogenesis. *Z. vergl. Physiol.* 61, 453-472
- Naitoh, Y. and Eckert, R. (1972): Electrophysiology of ciliate Protozoa. *Exp. Physiol. Biochem.* 5, 17-38
- Naitoh, Y. and Eckert, R. (1974): The control of ciliary activity in Protozoa. In: *Cilia and Flagella* (M.A. Sleigh, ed.), Academic Press, London, New York
- 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., Eckert, R., and Friedman, K. (1972): A regenerative calcium response in *Paramecium*. *J. exp. Biol.* 56, 667-681
- Oertel, D., Schein, S.J., and Kung, C. (1977): Separation of membrane currents using a *Paramecium* mutant. *Nature* 268, 120-124
- Ogura, A. and Machemer, H. (1979): Electrophysiological consequence of deciliation in *Paramecium*. *Acta Protozool.* 18, 183
- Ogura, A. and Machemer, H. (1980): Distribution of mechanoreceptor channels in the *Paramecium* surface membrane. *J. comp. Physiol.* 135, 233-242
- Ogura, A. and Takahashi, K. (1976): Artificial deciliation causes loss of calcium-dependent responses in *Paramecium*. *Nature* 264, 170-172

- Ohmori, H. and Yoshii, M. (1977): Surface potential reflected in both gating and permeation mechanisms of sodium and calcium channels of the tunicate egg cell membrane. *J. Physiol. (Lond.)* 267, 429-463
- Okamoto, H., Takahashi, K., and Yoshii, M. (1976): Two components of the calcium current in the egg cell membrane of the tunicate. *J. Physiol. (Lond.)* 255, 527-561
- Reuter, H. and Scholz, H. (1977): A study of the ion selectivity and the kinetic properties of the calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 264, 17-47
- Richter, K. (1979): *Allgemeine Elektrophysiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Sachs, F. and McGarrigle, R. (1980): An almost completely shielded microelectrode. *J. Neurosci. Meth.* 3, 151-157
- Sachs, L. (1974): *Angewandte Statistik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Saimi, Y. and Kung, C. (1982): Are ions involved in the gating of calcium channels? *Science* 218, 153-156
- Satow, Y. (1978): Internal calcium concentration and potassium permeability in *Paramecium*. *J. Neurobiol.* 9, 81-91
- Satow, Y. (1982): Effects of K^+ , Ba^{++} , and Ca^{++} on the excitable membrane in *Paramecium tetraurelia*. *Comp. Biochem. Physiol.* 71, 29-40
- Satow, Y. and Kung, C. (1976): A mutant of *Paramecium* with increased relative resting potassium permeability. *J. Neurobiol.* 7, 325-338
- Satow, Y. and Kung, C. (1979): Voltage sensitive Ca-channels and the transient inward current in *Paramecium tetraurelia*. *J. exp. Biol.* 78, 149-161
- Satow, Y. and Kung, C. (1980a): Membrane currents of pawn mutants of the pwA group in *Paramecium tetraurelia*. *J. exp. Biol.* 84, 57-71
- Satow, Y. and Kung, C. (1980b): Ca-induced K^+ -outward current in *Paramecium tetraurelia*. *J. exp. Biol.* 88, 293-303

Smith, T.G., Barker, J.L., Smith, B.M., and Colburn, P. (1980):
Voltage clamping with microelectrodes. J. Neurosci. Meth.
3, 105-128

VanBreemen, C., Farinas, B.R., Casteels, R., Gerba, P., Wuytack,
F., and Deth, R. (1973): Factors controlling cytoplasmic
 Ca^{2+} concentration. Philos. Trans. R. Soc. London B 265,
57-71

