

**Charakterisierung regulatorischer Schritte
in der
konstitutiven Exocytose in Pflanzenzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg August Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jens-Uwe Sutter
aus Marburg

Göttingen 2000

D7

Referent: _____

Koreferent: _____

Tag der mündlichen Prüfung: ____ . ____ . 2000

Forschung – oh, nun – das ist Heute natürlich nicht mehr ganz so, daß Sie ständig hoffen dürfen, hinter der nächsten Ecke säße der letzte lebende Säbelzahn tiger, kratze sich hinterm Ohr und warte nun nur darauf von Ihnen zum ersten Male erblickt zu werden.

Aber der Zauber ist geblieben.

... Sie sehen Dinge, die vor Ihnen keiner sah – auch wenn sich das in den zappelnden Nadeln eines XY-Schreibers niederschlagen mag anstatt in einer großen ehrfurchtgebietenden Katze.

nach [Adams & Carvadine, 1992]

Inhalt

1	Einleitung	4
1.1	Änderungen der Membranoberfläche durch Exocytose und Endocytose	4
1.2	Kalzium als Signal im Zellstoffwechsel	5
1.3	Zielsetzung	6
2	Material und Methoden	8
2.1	Zellsysteme	8
2.1.1	Zea Mais	8
2.1.2	Nicotiana Tabakum	8
2.2	Anzucht und Kultur	9
2.2.1	Kulturmedium für Tabak-Steril-Kultur	10
2.3	Meßplatz	12
2.3.1	Patch-Clamp Aufbau	12
2.3.1.1	Meßprinzip	13
2.3.1.2	Druckvorrichtung	15
2.3.1.3	Pipetten	15
2.3.2	Kalzium Messungen	16
2.4	Protoplastenisolation	16
2.4.1	Enzymlösung	17
2.4.2	Wasch-, Bad- und Pipettenlösungen	17
2.4.3	Vakuolenisolation	18
2.5	Amylase Assay	19
2.5.1	Eichung des Amylase-Assays	22
2.6	Messung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration	24
2.6.1	Kalibrierung der Fura Messungen	24
2.7	Abschätzung der Konzentration an freiem Magnesium in Zytoplasma	29
2.8	Fitverfahren	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Einfluß von Membraneigenschaften auf die Membrankapazität	32
3.1.1	Membranmodelle	32
3.1.2	Messung der Membrankapazität von Tonoplasten	34
3.2	Untersuchung von Meßartefakten	41
3.2.1	Elektrische Parameter	41
3.2.2	Komplexe Notation	41
3.2.3	Ersatzschaltbilder für Patch-Clamp Experimente	43
3.2.4	Messung mit sinusförmiger Spannung	44
3.2.5	Grenzen der vorgenommenen Näherungen	46
3.2.6	Messung mit sinusförmiger Spannung unter realen Bedingungen	47
3.2.7	Datenanalyse	48

3.3 Konstitutive Exocytose in Mais Koleoptilzellen	51
3.3.1 Charakterisierung der Exocytose in Koleoptilzellen	51
3.3.2 Wiederholte Stimulation exocytotischer Ereignisse	53
3.3.3 Das exocytotische Ereignis zeigt zwei deutlich verschiedene Phasen	54
3.3.4 Amplitude des exocytotischen Ereignisses	54
3.3.5 Modell für die Ca^{2+} -stimulierte Exocytose	55
3.3.6 Differentialgleichungen	58
3.3.7 Ratenkonstanten	58
3.3.8 Abhängigkeit der Ratenkonstanten von der Kalziumkonzentration	59
3.3.9 Bestimmung der Faktoren	60
3.3.10 Kinetik der Fusion in Abhängigkeit von der Kalziumfreisetzung	64
3.4 Kalziumstimulierte Exocytose in Tabakzellen	66
3.4.1 Relation zwischen Proteinmenge und exocytotischer Aktivität	69
3.4.2 Mathematische Beschreibung der Relation	73
3.4.3 Oberflächenzuwachs ohne zusätzliches sekretorisches Protein	74
3.4.4 Maximaler Oberflächenzuwachs	74
3.4.5 Kinetik des Membraneinbaus	75
3.4.6 Model für kalziumstimulierte Exocytose in Tabakzellen	78
4 Diskussion	82
4.1 Einfluß von Membraneigenschaften auf die durchgeführten Messungen	82
4.2 Erkennung und Beseitigung von Artefakten	84
4.3 Ca^{2+} -stimulierte Exocytose in Pflanzenzellen	85
4.4 Physiologische Relevanz der Ca^{2+} -Antwort	87
4.5 Abhängigkeit der Sekretion von der Menge sekretorischen Proteins	87
5 Zusammenfassung	90
5.1 Eigenschaften der Tonoplastenmembran	90
5.2 Messungen unter nichtidealen Bedingungen	90
5.3 Ca^{2+} -stimulierte konstitutive Exocytose in Pflanzenzellen	91
6 Verzeichnisse	92
6.1 Literatur	92
6.2 Software	100
6.3 Abbildungen	101
7 Anhang	103
7.1 Herleitung der Formeln zur Betrachtung von Meßartefakten	103

1 Einleitung

Vor inzwischen rund 20 Jahren wurde am Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen die Patch-Clamp Technik von Sackmann und Neher entwickelt [Hamil et al., 1981]. Zunächst diente das neue Meßverfahren vornehmlich der Untersuchung von Strömen über die Zellmembran. Nur kurze Zeit später entwickelten Neher und Marty [Neher & Marty, 1982] dann basierend auf der Patch-Clamp Technik ein Verfahren, welches durch Messung der Membrankapazität eine sehr genaue Bestimmung der Oberfläche von Zellen erlaubte. Diese Technik ist 1992 [Zorek & Tester, 1992] erstmalig mit Erfolg an Pflanzenzellen verwendet worden.

1.1 Änderungen der Membranoberfläche durch Exocytose und Endocytose

Rasche Änderungen der Membranoberfläche erfolgen nach heutigem Wissensstand im wesentlichen durch Exocytose oder Endocytose. Erstere bewirkt eine Oberflächenvergrößerung durch den Einbau zusätzlicher Membran, die in Form von Vesikeln bereitgestellt wird; Endocytose verringert die Membranoberfläche durch Einstülpung und anschließende Abschnürung von Vesikeln. Beide Prozesse sind in hohem Maße reguliert und erfordern eine Vielzahl miteinander wechselwirkender Proteine. Auch scheinen nach neueren Untersuchungen beide Prozesse stark konserviert zu sein. Reaktionsschritte, die an Nervenzellen nachgewiesen werden konnten, ließen sich auch in Hefen wiederfinden [Lew & Simon, 1991, Bennet & Scheller, 1993]. Die molekulare Maschinerie, die Exocytose und Endocytose ermöglicht, ist offenbar auch zwischen sehr verschiedenen Zellen ähnlich [Ferro-Novick & Jahn, 1994, Weber et al., 1998].

Exocytose dient der Erneuerung, dem Hinzufügen und dem Austausch von Membran sowie der Sekretion von Stoffen in den extrazellulären Raum. Bei der Sekretion von Stoffen aus dem Zellinneren wird zwischen zwei verschiedenen Systemen unterschieden. Werden Substanzen kontinuierlich über einen gewissen Zeitraum sezerniert, so spricht man von konstitutiver Exocytose. Der zentrale regulierende Schritt im sekretorischen Weg ist dann die Synthese des sekretorischen Proteins. Findet sich hingegen innerhalb des sekretorischen Weges ein Transportschritt, über den die Transportvesikel unter physiologischen Grundbedingungen nicht hinaus kommen können und ist ein Weitertransport über diesen kinetischen Schritt hinaus nur auf einen außerordentlichen Stimulus hin möglich, so liegt so genannte regulierte Exocytose vor. Möglicherweise stellt der Sortierungsmechanismus am Trans Golgi Netzwerk (TGN) einen wichtigen Schritt in der Unterscheidung der beiden Sekretionsformen dar. Burgess und Kelly schreiben, daß Proteine, die aggregieren, im TGN in Vesikel verpackt werden, die den regulierten sekretorischen Weg gehen, während lösliche Proteine in sogenannten glatten Vesikeln über den konstitutiven Weg transportiert werden [Burgess & Kelly, 1987].

Der regulierte sekretorische Weg stellt offenbar eine Besonderheit spezialisierter Zellen, wie neuronalen, endokrinen oder exokrinen Zellen, dar. Im Gegensatz dazu wird angenommen, daß im wesentlichen alle Zellen über einen konstitutiven sekretorischen Weg verfügen [Chavez et al., 1996].

Regulierte Exocytose steht aus mehreren Gründen deutlich mehr im Interesse der derzeitigen Forschung. Vor allem bei der Ausschüttung von Neurotransmittern dient die regulierte Exocytose in tierischen Zellen der schnellen Signalübertragung zwischen

Zellen [Neher, 1998]. Forschungen in diesem Bereich sind von beträchtlichem medizinischen Interesse.

Konstitutive Exocytose dient in tierischen Systemen häufig der Bereitstellung von Proteinen für den Gesamtorganismus. Umfangreiche Untersuchungen liegen hier vor allem zur Sekretion von Milchproteinen aus Säugerzellen vor [Wilde et al., 1997, Burgoyne & Duncan, 1998]. Die Grenzziehung zwischen den beiden Formen der Sekretion ist jedoch in einigen Aspekten relativ unklar. Turner und Mitarbeiter beschreiben einen konstitutiven und einen regulierten sekretorischen Weg für ein und das selbe Protein in einer Zelle [Turner et al., 1992].

Beispiele für regulierte Exocytose sind in pflanzlichen Systemen bisher nicht bekannt und zumindest für die 'klassischen' Bereiche regulierter Exocytose, wie schnelle Signalübertragung über weitere Strecken, besteht wohl auch kein Bedarf in Pflanzen. Von zentraler Bedeutung dagegen ist die konstitutive Exocytose. Vor allem der Aufbau der Zellwand erfordert die Sekretion großer Mengen an Proteinen und Polysacchariden in den Apoplasten [Napier & Venis, 1995].

Ein experimenteller Vorteil an regulierter Exocytose ist, daß sie im Versuch leichter zu analysieren ist. Ist ein Element der Signalkette bekannt, die schlußendlich die Exocytose auslöst, so kann der Membraneinbau gezielt ausgelöst werden und Eigenschaften der Exocytose, wie die Menge an eingebauter Membran und die Kinetik des Einbaus untersucht werden. Betrachtet man hingegen den kontinuierlich ablaufenden konstitutiven exocytotischen Prozeß, so kann das Gleichgewicht zwischen Exocytose zur Sezernierung und Endocytose zum Zwecke des Membranrecycling nur untersucht werden, wenn es gelingt, das System aus dem Zustand des Fließgleichgewichtes zu bringen. Auch dann müssen die gewonnenen Raten immer als die Differenz von exocytotischer und endocytotischer Aktivität verstanden werden.

1.2 Kalzium als Signal im Zellstoffwechsel

Neben der Tatsache, daß die Proteine, die an der Exocytose beteiligt sind, innerhalb der Eukarionten stark konserviert sind, ist auch die Interaktion mit Kalziumionen ein Charakteristikum nahezu aller exocytotischer Prozesse [Kasai, 1999]. In tierischen Systemen wie auch in Hefe sind inzwischen Proteine aus dem exocytotischen Apparat bekannt, die direkt mit Kalziumionen interagieren [Brunger, 2000]. In vielen Fällen konnte der Bindung sogar die Konformationsänderung von Proteinen zugeordnet werden, die dann möglicherweise die Fusion von Vesikel und Zielmembran auslöst [Shao et al., 1998, Davis et al., 1999].

Seit längerem sind Indizien bekannt, die darauf hindeuten, daß ein Ca^{2+} -abhängiger Sekretionsweg auch in Pflanzenzellen zu finden ist [Steer, 1988]. Inzwischen konnte für mehrere pflanzliche Zellen ein Zusammenhang zwischen Exocytose und der zytoplasmatischen Konzentration an freiem Kalzium ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$) gezeigt werden [Zorek & Tester, 1992, Homann & Tester, 1998, Caroll et al., 1998].

Ein weiterer Anhaltspunkt auch bei Pflanzenzellen nach einer Kopplung zwischen Kalziumkonzentration und Vesikelfusion zu suchen, ist die Tatsache, daß es auf einen Anstieg der Auxin (IAA) Konzentration in Pflanzenzellen zu einem Anwachsen der Kalziumkonzentration im Zytoplasma kommt [Felle, 1988]. Weiterhin ist IAA ein Hormon, welches Streckungswachstum induzieren kann [Galston, 1961]; genau jenen Zustand also, der eine hohe Sekretionsrate, bedingt durch Zellwandsynthese, bedeutet. Thiel und Mitarbeiter konnten 1994 zeigen, daß ein Anstieg in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ eine Steigerung der Sekretionsrate in Mais Koleoptilzellen bewirkt [Thiel et al., 1994].

Die Abhängigkeit der Exocytose von ($[Ca^{2+}]_{\text{cyt.}}$) ist aber kein generelles Charakteristikum von Pflanzenzellen. Für Aleuronzellen aus Gerste konnten Homann und Tester [1997] einen Ca^{2+} -unabhängigen exocytotischen Weg nachweisen.

1.3 Zielsetzung

Thema der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung regulatorischer Schritte in der konstitutiven Exocytose in Pflanzenzellen.

Aus vorliegenden Arbeiten kann geschlossen werden, daß Sekretion in Pflanzenzellen stimuliert werden kann einerseits durch die Synthese sekretorischer Proteine [Phillips et al., 1988], andererseits durch eine Signalkette, die die zytoplasmatische Kalziumkonzentration reguliert [Zorek & Tester, 1992, Homann & Tester, 1998].

Unsicher ist im Blick auf vorangegangene Arbeiten, ob auch Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration in physiologischen Bereich unterhalb von 1 μMol den sekretorischen Weg beeinflussen. Eine Beschreibung des Zusammenhanges zwischen Proteinsynthese und Sekretion steht ebenfalls aus.

In diesen beiden Punkten soll die vorliegende Arbeit über bereits Bekanntes hinausgehen.

Im Vorwege waren allerdings Bedingungen zu schaffen, die die gewünschten Experimente und Untersuchungen überhaupt erst ermöglichten.

Die Übertragung der Kapazitätsmessung von Nervenzellen auf Pflanzenzellen ist nicht trivial.

Das Meßverfahren zur Kapazitätsbestimmung geht von bestimmten Voraussetzungen an die Meßkonfiguration aus [Lindau & Neher, 1984]. Da diese Bedingungen nicht immer realisierbar waren, war es notwendig zu analysieren, welchen Einfluß nicht ideale Bedingungen auf die Meßergebnisse haben. Einen umfangreichen Teil der vorliegenden Arbeit nimmt daher die Untersuchung und Beschreibung von Artefakten ein, wie sie auftreten, wenn die Meßbedingungen nicht ideal sind. Die gewonnenen Erkenntnisse erlaubten eine wesentlich fundiertere Betrachtung der Meßergebnisse und die Entwicklung eines Programmes, das die Auswertung von Messungen ermöglichte, die sehr durch Artefakte gestört waren.

Für die konstitutive Exocytose von Protoplasten aus Mais Koleoptilzellen war bereits eine Abhängigkeit von $[Ca^{2+}]_{\text{cyt.}}$ bekannt [Thiel et al., 1994]. Auch gab es bereits ein Meßprotokoll für Kapazitätsmessungen an den Koleoptilzellen. Ausgehend von Messungen an Mais Koleoptilzellen konnte dann ein Verfahren zur Kapazitätsmessung an Tabak Mesophyllzellen entwickelt werden. Messungen der Ca^{2+} -abhängigen Sekretion dienten dazu ein reaktionskinetisches Modell zu entwickeln, daß die Beschreibung der gemessenen Vorgänge erlaubte. Diese mathematische Beschreibung der beobachteten Vorgänge nimmt in der vorliegenden Arbeit einen breiten Raum ein. Es gelang die Art der Kalziumabhängigkeit sehr genau zu charakterisieren. Auch konnte gezeigt werden, daß die an Mais Koleoptilzellen beobachteten Vorgänge denen in Tabak Mesophyllzellen sehr ähnlich sind, so daß das Modell auch zur Beschreibung konstitutiver Exocytose an Tabakzellen verwendet werden konnte.

Einen weiteren Bereich umfaßt die Untersuchung, welchen Einfluß physikalische Effekte an der untersuchten Membran auf die gewonnenen Parameter haben. Eine mechanische Dehnung der Membran wird Einfluß auf die Oberfläche und die Dicke

der Membran haben. Beides sind Parameter, die für das Kapazitätsmeßverfahren kritisch sind. Um den Effekt physikalisch bedingter Änderungen der Membran auf die gemessene Membrankapazität zu untersuchen, wurden Tonoplasten aus Tabak Mesophyllzellen isoliert und die Membrankapazität unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Tonoplasten stellen ein hervorragendes Modellsystem dar. Die Membran liegt in natürlicher Lipidzusammensetzung und mit allen normalerweise vorhandenen Membranproteinen vor. Jeong und Mitarbeiter konnten [1998] das minimale Proteinbesteck zeigen, welches notwendig ist, um Membranen miteinander fusionieren zu lassen. Obschon einerseits nur erstaunlich wenige Proteine genügen, um eine Fusion zu ermöglichen, ist doch sichergestellt, daß diese in isolierte Tonoplasten nicht zur Verfügung stehen [Jeong et al., 1998]. Vor allem zytoplasmatische Bestandteile des Fusionsapparates sind nach der Isolation sicher nicht mehr vorhanden auch konnten die beteiligten Proteine noch nie innerhalb von Tonoplasten gefunden werden. Ein solches Modellsystem steht bei tierischen Zellen nicht zu Verfügung.

Erst diese umfangreichen Vorarbeiten erlaubten dann im Folgenden die Durchführung und Auswertung von Membrankapazitätsmessungen an Protoplasten aus hypersekretorischen Zellen transgener Pflanzen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht [Sutter et al. 2000].

2 Material und Methoden

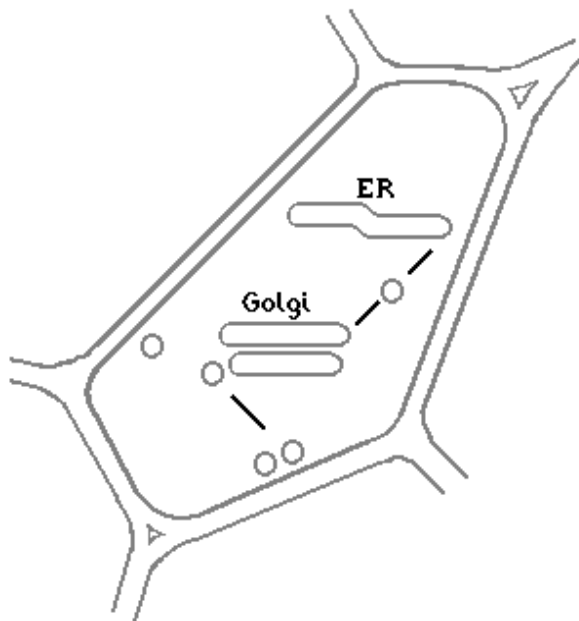
Im folgenden werden die Methoden, die in den hier beschriebenen Experimenten zur Anwendung kamen im Detail vorgestellt. Wenn bestimmte Sachverhalte den Ausschlag gaben etwas genau in der hier beschriebenen Art anzuwenden, so wird das jeweils gleich im Zusammenhang beschrieben. Parameter, die besonders kritisch auf das Meßergebnis wirkten, werden ebenfalls extra genannt.

2.1 Zellsysteme

2.1.1 *Zea Mais*

Bei der verwendeten Pflanze handelte es sich um *Zea Mais L.*, "Mutin" und "Helix". Die Koleoptile von Mais oder anderen Gräsern ist eine Schutzhülle für die auswachsenden Blätter. Es handelt sich bei Koleoptilzellen anatomisch um ein Gewebe aus vollständig ausdifferenzierten Zellen, die in einem Bereich kurz unterhalb der Spitze nur noch Längenwachstum zeigen. Isoliert man Protoplasten aus diesem Bereich, so steht ein System zur Verfügung, das eine hohe sekretorische Aktivität aufweist [Thiel et al., 1994].

2.1.2 *Nicotiana Tabakum*



Die Messungen zur konstitutiven Exocytose wurden an Mesophyllzellen aus Tabakblättern vorgenommen. Hierzu stand ein System transgener Pflanzen zur Verfügung, welches die Messung sowohl der Syntheserate als auch der Sekretionsrate eines Proteins erlaubte.

Abbildung 2.1 Tabak Alpha-Amylase System

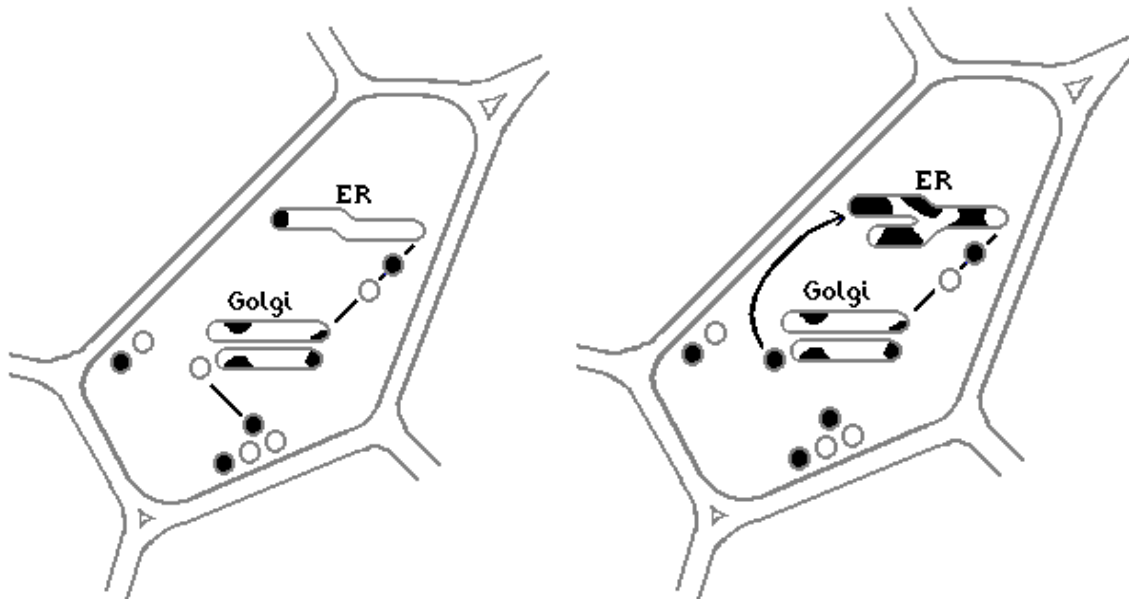
Die drei auf dieser und der folgenden Seite gezeigten Cartoons sollen das Prinzip des verwendeten Tabak Systems verdeutlichen.

Die Abbildung oben stellt eine Wild-Typ Zelle dar. Der Transport sekretorischer Proteine erfolgt vom ER zum Golgi und von dort weiter zur Plasmamembran.

Auf der folgenden Seite links ist eine sogenannte Amylase Zelle dargestellt. Zusätzlich zu den auch in der Wild-Typ Zelle vorhandenen sekretorischen Proteinen, wird am ER α -Amylase (hier als schwarze Substanz dargestellt) synthetisiert und auf dem selben sekretorischen Weg sezerniert.

Rechts davon ist eine Zelle gezeigt, die α -Amylase mit einer ER-Retentionssequenz am C-Terminus synthetisiert. Im Falle des hier vorgestellten Zellsystems wurde eine HDEL Sequenz verwendet. Es kommt zu einer Anreicherung der α -Amylase in ER und Golgi und zu einer quasi 'Überlauf-Sekretion' an neu synthetisierter α -Amylase [Crofts et al., 2000].

Die Cartoons dienen lediglich der Verdeutlichung der Transportvorgänge. Die sekretorischen Vesikel auf dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Weg sind nicht rund sondern, wie sich auf elektronenoptischen Bildern zeigt, von unregelmäßiger Gestalt. Wahrscheinlich werden die Vesikel nicht mit einem sekretorischen Protein exklusiv beladen sondern transportieren ein Proteingemisch.



In Tabakzellen des Typs *Nicotiana Tabakum L.*, "Petite Havana", SR-1 war ein Gen aus Gersten Aleuronzellen eingeschleust worden, welches für die Synthese von α -Amylase kodiert. Dem Transskript war ein 35s-Promotor vorangestellt, der die kontinuierliche Transskription des Proteins sicher stellt. Zellen, die das entsprechende Gen beinhalten, werden im Folgenden als 'Amylase-Zellen' beziehungsweise entsprechend 'Amylase-Pflanzen' oder 'Amylase-Protoplasten' bezeichnet.

Eine weitere transgene Zelllinie exprimierte in gleicher Weise eine α -Amylase, die am C-terminalen Ende eine ER-Retentionssequenz hat. Diese HDEL-Sequenz vermittelt einen rezeptorgesteuerten Rücktransport vom Cis-Golgi zurück zum ER.

Im Gleichgewichtszustand sind ER und Golgi bis zur Kapazitätsgrenze mit α -Amylase angefüllt. Wird in diesem Zustand weitere α -Amylase synthetisiert, so wird das Enzym sezerniert, als ob es keinerlei Retentionssequenz am C-Terminus haben würde. Bei der beobachteten Sekretion handelt es sich quasi um eine Art "Überlaufsekretion" [Pimpel, 2000]. Zellen dieses Typs sollten sich im Gleichgewichtszustand wie Amylase-Zellen verhalten.

2.2 Anzucht und Kultur

Die Maiskörner wurden für 24 h in Wasser vorgequollen und anschließend auf feuchtem Zelltuch in Kulturschalen ausgesät. Nach 4 bis 7 Tagen in Dunkelheit bei 20° C waren etwa 50 mm lange Koleoptilen gewachsen. Zur Protoplastierung wurden 10 mm des Gewebes 5 mm unterhalb der Spitze verwendet. In diesem Bereich finden sich vollständig ausdifferenzierte Zellen, die lediglich noch Streckungswachstum durchführen [Felle, 1988].

Die Anzucht- und Kulturbedingungen der Tabakpflanzen unterschieden sich je nach Art der aktuellen Fragestellung etwas voneinander.

Für die Isolation von Vakuolen wurden Tabaksamen auf Erde ausgesät und die Pflanzen im Gewächshaus aufgezogen. Da die Mehrzahl dieser Experimente in den Sommermonaten durchgeführt wurde, kann man einen Tag/Nacht Rhythmus von etwa 15h/9h annehmen. Pflanzen, die im Kulturraum gezogen wurden hatten einen Tag/Nacht Rhythmus von 14h/10h und wurden mit 448 Wm^{-1} beleuchtet. 160 W

entfielen auf sogenanntes Tageslicht, realisiert durch Philips TL 40 W 55 (Philips, Amsterdam), weitere je 144 W auf Gelbton-Tageslicht mittels Osram TL 36 W 55 und Tageslicht mit hohem infrarotem Anteil durch Osram L 36 W 77 "fluora" (beide: Osram, Bielefeld).

Die Pflanzen, deren Protoplasten für die Patch Clamp Experimente verwendet wurden, stammten zum überwiegenden Teil aus Sterilkulturen. Bei den verwendeten Kulturgefäßen handelte es sich um Einmachgläser der Firma WECK (Wehr, Deutschland). Als am geeignetsten in Bezug auf Nährlösungsbedarf und Platzangebot für die Pflanzen erwies sich das Model „Tulpe“. Die Gläser wurden vor Verwendung zusammen mit der Nährlösung autoklaviert und unter der Sterilbank mit je 200 ml Lösung befüllt. Die Nährlösung benötigte etwa 4 h zum Aushärten. Die Tabaksamen wurden für 10 min. in einer Waschlösung mit 10 % Natriumhypochlorid (NaOCl) und einem Tropfen Detergenz (Tween 20, Sigma-Aldrich) sterilisiert. Anschließend über einem UV-Licht sterilisierten Nylonnetz mit 70 µm Maschenweite abgossen, zweimal mit autoklaviertem Wasser gespült und dann ausgesät.

Für die Messungen an Amylase-Pflanzen war es sinnvoll isogenetische Pflanzen zur Verfügung zu haben. Hierzu wurden Sproßkulturen von einzelnen Pflanzen gezogen. Die Bereitstellung der „Kleingewächshäuser“ verlief genau wie bei der Aussaat von Tabak. Von der zu vermehrenden Pflanze wurden dann unter sterilen Bedingungen Achsilarknospen mit einem Sproßstück geschnitten und etwa einen halben Millimeter tief in den Agar gesetzt.

2.2.1 Kulturmedium für Tabak-Steril-Kultur

Im Folgenden sind die zur Kultur der Tabakpflanzen notwendigen Nährlösungen aufgeführt. Die Lösung entspricht in vielen Komponenten der von Murashige und Skoog [1962] beschriebenen Nährlösung zur Kultur von Pflanzen. Da es aber in den Stickstoff- und Kalziumkonzentrationen und in einigen der verwendeten Salze doch Abweichungen gibt, ist die Lösung hier in Detail beschrieben.

Murashige & Skoog Basismedium (Lösung I)

	g l ⁻¹	mM
NH ₄ NO ₃	16.5	200
H ₃ BO ₃	0.006	0.1
CaCl ₂	3.32	30
oder CaCl ₂ x 2H ₂ O	4.41	30
EDTA	0.372	1
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.278	1
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3.7	15
MnSO ₄ x H ₂ O	0.162	1
KNO ₃	19.0	190
KH ₂ PO ₄	1.7	12.5
ZnSO ₄	0.086	0.53
oder ZnSO ₄ x 2 H ₂ O	0.154	0.53

Kobalt / Kupfer - Lösung (Lösung II)

	mg 100 ml ⁻¹	mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	25	1
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25	1

Molybdän / Jod – Lösung (Lösung III)

	mg 100 ml ⁻¹	mM
Na ₂ MoO ₄	25	1
KJ	83	5

Vitamin- & Hormonlösungen

	mg ml ⁻¹	Endkonzentration mg l ⁻¹
Thiamin	0.4	0.4
Kinetin	0.1	0.1
2,4 D	3	3
IAA oder NAA	0.4	0.4

Zusammensetzung des vollständigen Mediums:

Lösung I	100	ml l ⁻¹
Lösung II	100	µl l ⁻¹
Lösung III	1	ml l ⁻¹
Kinetin	1	ml l ⁻¹
Thiamin	1	ml l ⁻¹
2,4 D	1	ml l ⁻¹
IAA / NAA	1	ml l ⁻¹
Mes	100	mg l ⁻¹
myo-INOSITOL	100	mg l ⁻¹
Casein (enzymatisch hydrol.)	1	g l ⁻¹
Saccharose	30	g l ⁻¹
Agar	8	g l ⁻¹

Die Gesamtlösung wird mit Bidest auf 1 l aufgefüllt. Anschließend wird der pH mit KOH auf 5.4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Die eingewogenen Mengen entsprechen einer Konzentration von ~ 4.55 g l⁻¹ eines vorgemixten Murashige & Skoog Nährsalzcocktails, wie er etwa von Sigma bezogen werden kann.

Alle verwendeten Substanzen wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Die Vitamine und Hormone werden nur in Lösungen für Sproßkulturen verwendet. Für Sterilsaat besteht die Lösung nur aus den drei Basislösungen und den Feststoffen.

Die Hormonzusammensetzung wurde in Anlehnung an Schopfer & Brennicke [1999] gewählt. Eine ausgewogene Zusammensetzung gerade von Kinetin und Auxin (hier als IAA beziehungsweise NAA) war sehr wichtig, um nicht nur Sproßwachstum oder Wurzelwachstum mit den Sproßkulturen zu erzielen. Die oben angegebenen Werte entsprechen letztendlich der Lehrbuchempfehlung. Trotzdem gab es wiederholt Ausfälle vollständiger Ansätze von zwanzig oder dreißig Sproßkulturen, weil eben

doch nur Wurzeln gebildet wurden, obwohl die Rezeptur gegenüber dem vorherigen Ansatz unverändert geblieben war

Um isogenetische Nachkommen einer Pflanze zu ziehen, sollte nicht die ganze Mutterpflanze für einen Ansatz verarbeitet werden. So ist es später möglich auch von der Mutterpflanze noch Sproßkulturen nach zu ziehen.

Die Kultur aus Sproßabschnitten ist auch ohne zusätzliche Hormongabe möglich. Die Ausbeute an Pflanzen sank dann aber von etwa 70% auf unter 50%. Auch war die Zeit bis zur Entwicklung nutzbarer Pflanzen dann um drei bis vier Wochen auf insgesamt fast zehn Wochen verlängert.

2.3 Meßplatz

Die Patch-Clamp Messungen wurden durchweg an einem Meßplatz ausgeführt. Der Aufbau des Meßplatzes ist im Detail beschrieben bei Thiel & Weise [1999], daher wird hier nur eine recht knappe Beschreibung gegeben.

2.3.1 Patch-Clamp Aufbau

Die Messungen wurden in der Whole Cell Konfiguration durchgeführt, wie sie von Hamill beschrieben wird [Hamill et al., 1981]. Die Datenerfassung erfolgte über einen Meßverstärker vom Typ EPC-9 mit PULSE Software (Heka Electronics, Lamprecht, Deutschland). Zur Messung von Membrankapazitäten stand eine auf der Lindau-Neher Technik [Lindau & Neher, 1988] basierende lock-in Erweiterung des PULSE Programmes zur Verfügung

Als Meßfrequenz wurde 1 kHz verwendet mit einer Amplitude von 20 mV zwischen Minimum und Maximum.

2.3.1.1 Meßprinzip

Die Möglichkeit der Oberflächenmessung von Zellen, Protoplasten oder Vesikeln basiert auf der grundlegenden Analogie zwischen einer Biomembran und einem Plattenkondensator. Die polaren Kopfgruppen der Lipide fungieren als leitende Platten, die Kohlenwasserstoffketten als Dielektrikum. Die Kapazität eines Plattenkondensators ist gemäß:

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{A}{d}, \quad (2.1)$$

proportional zur Fläche der Platten A , die in der Analogie zur Biomembran der Membranoberfläche entspricht. Messungen der Membrankapazität erlauben dann direkte Rückschlüsse auf die Membranoberfläche.

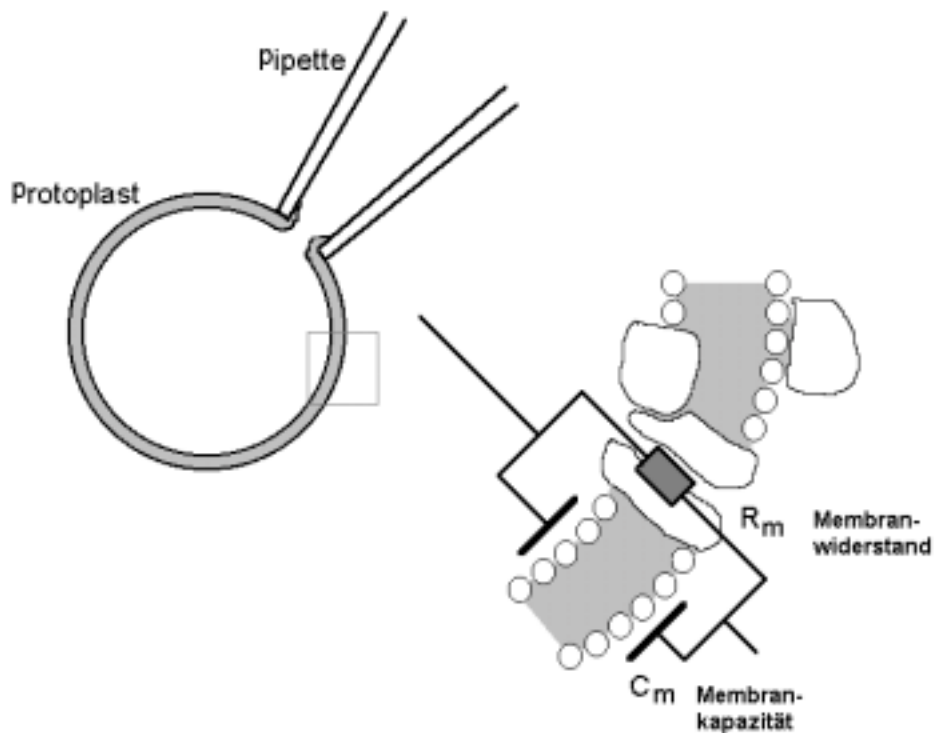


Abbildung 2.2 Meßparameter in der 'Whole-Cell' Konfiguration.

Die maßgeblichen Parameter, die die elektrischen Eigenschaften einer Zellmembran bestimmen, sind der Membranwiderstand, der ein Maß für den Transport geladener Substanzen über die Membran darstellt, sowie die Membrankapazität. Diese ist mit der Oberfläche der Zelle korreliert und ermöglicht so eine direkte *in vivo* Messung der Membranfläche.

Membranleitfähigkeit und Membrankapazität können wie in Abbildung 2.2 gezeigt mittels der Patch-Clamp Technik gemessen werden.

Ändert sich die Oberfläche durch den Einbau neuer Membran (Abbildung 2.3), so kann dies als Änderung der Membrankapazität aufgezeichnet werden. Molekulare Prozesse, die der Fusion vorangehen, werden nicht erkannt. Erst wenn die Membranen von Vesikel und Plasmalemma verschmelzen, wird der Kapazitätssprung registriert.

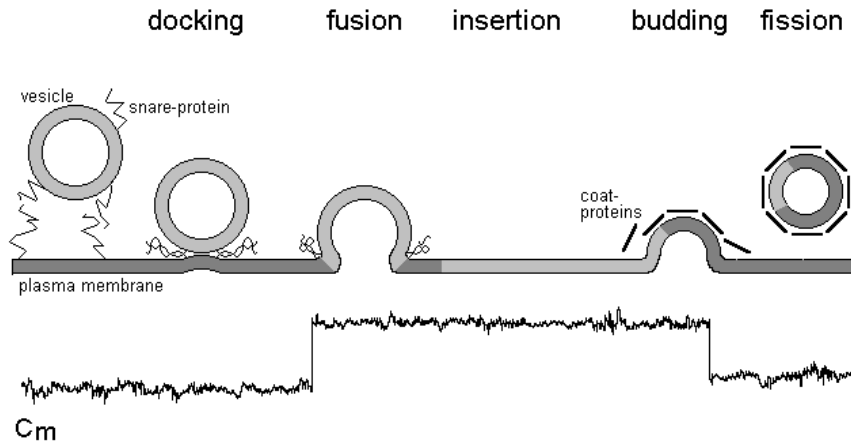


Abbildung 2.3 Exocytose und Endocytose registriert als Änderungen der Membrankapazität.

Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran sowie die Abschnürung von Vesikeln aus der Membran können mittels der Patch-Clamp Technik als Änderungen der Membrankapazität aufgezeichnet werden. Exocytotische Prozesse wie das Andocken des Vesikels an der Plasmamembran bleiben dem Experimentator im Patch-Clamp Versuch verborgen. Erst wenn sich ein elektrisches Kontinuum zwischen der Vesikelmembran und dem Plasmalemma ausbildet, wird die Fusion registriert.

Werden Patch-Clamp Messungen in Whole Cell Mode durchgeführt, so wird die Oberflächenänderung über den gesamten Protoplasten ermittelt. Abbildung 2.4 zeigt das Prinzip einer Whole Cell Kapazitätsmessung an einem Protoplasten mit paralleler Messung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration (siehe Kapitel 2.6).

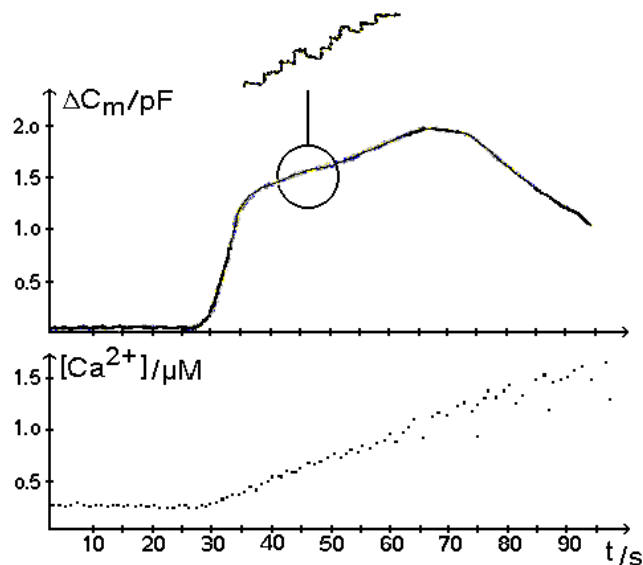


Abbildung 2.4 Prinzip der Messung eines exocytotischen Ereignisses in der 'Whole-Cell' Konfiguration.

Steigt die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration, so bewirkt das die Fusion einzelner Vesikel mit dem Plasmalemma (Vergrößerung). Die einzelnen Fusionen überlagern sich in der 'Whole-Cell' Konfiguration zu einem exocytotischen Ereignis.

2.3.1.2 Druckvorrichtung

Um bei Messungen an Tonoplasten die Möglichkeit zu haben, diese zu dehnen, wurde ein U-Rohr Manometer verwendet. Über einen dünnen Schlauch wurde ein U-Rohr an die Pipettenhalterung angeschlossen, so daß über die Pipette direkt Druck auf die Pipettenlösung und den Tonoplasten ausgeübt werden konnte. Das U-Rohr wurde mit Wasser gefüllt. Gegenüber Quecksilber, welches ebenfalls häufig in U-Rohr Manometern verwendet wird, hatte Wasser hier den Vorteil einen feiner dosierbaren Druck zu erlauben.

2.3.1.3 Pipetten

Ein für Patch-Clamp Experimente recht wichtiger Parameter ist die Art der verwendeten Pipetten. Wird für die Herstellung der Pipetten Glas verwendet, welches reich an Oberflächenladungen ist, so können sich die Sealeigenschaften gegebenenfalls um mehrere 100 M Ω verbessern [Milton & Caldwell, 1990]. Es wurden in dieser Richtung mehrere Versuche mit Pipetten, die aus Bleiglas (Garner Glass, KG-12, USA) gezogen waren unternommen. Es gelang aber nur eine unwesentliche Verbesserung der Sealwiderstände bei einer gleichzeitig deutlich erhöhten Pipettenkapazität. Da zudem mehrfach beschrieben wurde, daß diese sogenannten Weichglaspipetten Schwermetallionen an das Pipettenmedium abgeben, die Einfluß auf das Meßergebnis haben können [Copello et al., 1991; Cota & Armstrong, 1988], ist bei Verwendung solcher Pipetten zusätzlich eine Innenbeschichtung des Glases mit Sylgard® (Sigma-Aldrich) oder ähnlichen Substanzen notwendig, was die Herstellung

der Pipetten zusätzlich verkompliziert. Die Mehrzahl der Messungen wurden daher mit Pipetten aus Borosilikatglas durchgeführt (Kimax 51, Kimble Products, USA).

Die Pipetten wurden in einem Ziehgerät (Narishige PP, Narishige, Tokyo, Japan) solcherart gezogen, daß sich ein Pipettenwiderstand von 3 M Ω mit den unter 2.4.2 angegebenen Bad- und Pipettenlösungen ergab.

Die Sealwahrscheinlichkeit verbesserte sich, wenn die Pipettenspitze nach dem Ziehen mittels eines heizbaren, glasbeschichteten Paladiumdrahtes hitzepoliert wurde. Zur Reduzierung der Pipettenkapazität wurde ein cm der Pipettenspitze von außen mit Paraffin beschichtet.

2.3.2 Kalzium Messungen

Zur Bestimmung der freien Kalziumionenkonzentration im Zytoplasma ($[Ca^{2+}]_{cyt.}$) wurde das ratiometrische Verfahren nach Grynkiewicz und Mitarbeitern verwendet [Grynkiewicz et al., 1985]. Der Meßplatz war zur Durchführung von Messungen mit Fluoreszenzfarbstoffen mit einer Xenon-Meßlichtanlage ausgerüstet (Till Photonics, München, Deutschland). Die Lichterfassung erfolgte mit einem Photomultiplier (Seefelder Meßtechnik, Seefeld, Deutschland). Die Daten vom Photomultiplier wurden über die PULSE Software des EPC-9 erfaßt.

Die Messungen erfolgten wie bei Thiel und Weise [1999] beschrieben.

2.4 Protoplastenisolation

Die Isolation der Protoplasten aus Mais Koleoptilen erfolgte nach dem Verfahren von Thiel und Mitarbeitern [Thiel et al., 1994]

Je nach Art der Aufzucht können die in Weckgläsern gezogenen Pflanzen von verschiedenen Zeitpunkten ab für die Protoplastierung verwendet werden. Aus Saat gezogene Pflanzen eignen sich ab vier bis sechs Wochen zur Protoplastengewinnung, aus Sproßkultur gezogene etwa ab zehn Wochen. Die meisten Pflanzen stoßen nach drei Monaten an die Wände ihres Gewächshauses, was, vermutlich infolge des Druckes, verbunden ist mit sekundären Wandverstärkungen in den betroffenen Blättern.

Zur Protoplastengewinnung wurde ein Protokoll verwendet, welches die Protoplasten über einen Saccarosegradienten aufreinigt. Das Protokoll wurde mit wenigen Modifikationen übernommen von einer Isolation, die in Labor von Tester für Wurzelzellprotoplasten entwickelt wurde [Kiegle et al., 2000]

Die nach diesen Verfahren isolierten Protoplasten ließen sich bei Lagerung im Kühlschrank etwa 24 Stunden für Patch-Clamp Experimente verwenden.

2.4.1 Enzymlösung

Die Rezeptur der Enzymlösung zur Protoplastierung blieb im Verlauf der Experimente unverändert.

Die Lösung enthielt:

5	mM	CaCl ₂	
10	mM	Na Ascorbat	
1	%	BSA	
0.5	%	PVP	
3	%	Cellulase	(Typ: „Onozuka RS“, Yakult, Tokyo, Japan)
1	%	Macerozyme	(Typ: „RS“, Yakult, Tokyo, Japan)
0.2	%	Pectolyase	(Typ „Y 23“, Seishin, Tokyo, Japan)
500	mM	Sorbitol	(Osmolarität der Gesamtlösung: 550 mOsmol kg ⁻¹)
10	mM	Mes	(pH: 5.3 mit KOH)

2.4.2 Wasch-, Bad- und Pipettenlösungen

Die Lösung, die gleichermaßen als Waschlösung nach der Protoplastierung, zur Aufbewahrung der Protoplasten und als Badlösung bei den Patch-Clamp Experimenten diente, setzte sich wie folgt zusammen:

250	mM	KCl	(Gesamtlösung: 528 mOsmol kg ⁻¹)
2	mM	CaCl ₂	
5	mM	MgCl ₂	
10	mM	TEA Cl	
10	mM	Mes	(pH: 6.25 KOH)

Das TEA dient als Blocker von K⁺-Kanälen der Reduzierung von Ganzzellströmen bei Patch-Clamp Messungen. Dies ist sinnvoll, da hohe Ganzzellströme die Bestimmung der Membrankapazität C_m im Patch-Clamp Experiment stören [Lindau & Neher, 1988].

Die Pipettenlösung für die Messungen an Tabak Protoplasten war wie folgt zusammengesetzt:

250	mM	KCl	(Gesamtlösung: 516 mOsmol kg ⁻¹)
2	mM	Na ATP	
9.607	mM	CaCl ₂	
1	mM	MgCl ₂	
10	mM	EGTA	
10	mM	Hepes	(pH: 7.2 KOH)

Die freie Kalziumkonzentration betrug 3.5 µM Ca²⁺. Die Berechnung der Konzentration Erfolgte mit dem Programm "Calcium" (Calcium 2.1, 1990).

Die Osmolarität von Bad- und Pipettenlösung ist mit $528 \text{ mOsmol kg}^{-1}$ für die Badlösung gegenüber $516 \text{ mOsmol kg}^{-1}$ bei der Pipettenlösung nicht genau isoosmotisch. Der geringe Gradient erwies sich als notwendig, um bei Patch-Clamp Experimenten eine hinreichend hohe und stabile Zugriffsleitfähigkeit zu erhalten. Wahrscheinlich verhindert ein langsamer Lösungsfluß an der Pipettenmündung das Verstopfen der Mündung durch zytoplasmatische Bestandteile. Länger andauernde Messungen im Whole Cell Mode waren bei exakt isoosmotischen Bedingungen praktisch nicht durchführbar.

2.4.3 Vakuolenisolation

Die Isolation von Tonoplasten erfolgte nach einem Rezept von Allen und Sanders [1996]. Für die Verwendung an Tabak Mesophyll Protoplasten wurde das Assay etwas abgewandelt, das Grundprinzip ist aber dasselbe.

Die isolierten Protoplasten wurden in 'Vacuole Release Medium' (VRS-Medium) überführt. Nach etwa 2 Minuten platzten zunehmend Protoplasten und herausquellende Vakuolen waren zu erkennen. Nach 10 Minuten waren etwa 90 % der Protoplasten geplatzt und hatten Vakuolen ganz oder teilweise freigegeben. Um die Vakuolenmembranen soweit zu stabilisieren, daß Patch-Clamp Experimente möglich wurden, wurden auf $300 \mu\text{l}$ VRS-Medium $3 \mu\text{l}$ 100 mM CaCl_2 -Lösung gegeben.

Das VRS-Medium setzte sich zusammen aus:

100	mM	TEA Cl
2	mM	EGTA
10	mM	Hepes (pH: 8.0 mit NaOH).

Die Lösung entspricht in den gewählten Konzentrationen, nicht jedoch in den verwendeten Salzen, der von Allan entwickelten. Das hier verwendete TEA Chlorid diente neben der Einstellung der Osmolarität auch noch der Reduktion von im Patch-Clamp Experiment auftretenden Ganzzellströmen durch Blockierung von K^+ -Kanälen.

Die Pipettenlösung für die Messungen an isolierten Vakuolen bestand aus:

100	mM	KCl
10	mM	CaCl_2
10	mM	TEA Cl
5	mM	Hepes (pH: 7.1 mit KOH).

Für Messungen, bei denen der Tonoplast mittels eines osmotischen Gradienten gedehnt wurde, enthielt die Pipettenlösung zusätzlich 75 beziehungsweise 150 mM Saccarose.

2.5 Amylase Assay

Zur Bestimmung der α -Amylase Synthese wurde ein Verfahren verwendet, welches die Enzymaktivität der freien Amylase bestimmt. Das Verfahren basiert auf einer Methode der Firma Megazyme (Megazyme Co., Bray, Irland), [Mc Cleary & Sheehan, 1987, Sheehan & Mc Cleary, 1988]. Der Lösung, deren Amylaseaktivität bestimmt werden soll, wird vermischt mit einer Lösung, die chemisch geblocktes *p*-nitrophenyl-maltoheptaoside (BPNPG7) sowie Glukoamylase und α -Glukosidase enthält. Die α -Amylase spaltet das BPNPG7, woraufhin die Maltosaccaride an der Spaltungsstelle von der Glukoamylase und der α -Glukosidase abgebaut werden können, bis an einem Ende des BPNPG7 eine freier Phenylrest über bleibt. Die Nachweisreaktion wird nach einer definierten Zeit durch Zugabe von Trizma-Base gestoppt. Die Base verhindert die weitere BPNPG7-Spaltung und färbt die freien Phanylreste gelb. Da jede enzymatische Spaltung einen Phenylrest freisetzt, welcher angefärbt wird, ist die Farbintensität direkt proportional der α -Amylaseaktivität.

Zur Bestimmung der Amylaseaktivität der transgenen Pflanzen wurde jeweils ein cm^2 vom dritten Blatt unter dem Apikalmeristem abgetrennt, mit gereinigtem Seesand fein gemörsert und in Extraktionspuffer gegeben. Gewebestandteile und Sand wurden abzentrifugiert und 30 μl der gereinigten Lösung für 10 Minuten bei 40°C mit 50 μl BPNPG7-Substratlösung vermischt. Die Reaktion wurde mit 80 μl Trizma-Lösung gestoppt und die Absorption bei 410 nm bestimmt (Spectralphotometer, Novaspek Biochrom, LKB, Frankreich). Einige der Messungen wurden auch an einem Uvikon 930 Photometer (Kontron Instruments, Tegimenta AG, Bayreuth, Deutschland) durchgeführt. In diesem Falle waren aber um den Faktor Zehn größere Lösungsmengen notwendig.

Der verwendete Extraktionspuffer war wie folgt zusammen gesetzt:

50	mM	Na Malat
50	mM	NaCl
2	mM	CaCl_2
0.005 %		NaN_3
pH: 5.2 NaOH / HCl		

Um die gemessene Aktivität auf den Gesamtproteingehalt des Gewebes beziehen zu können, wurden 50 ml der gereinigten Gewebelösung mit 50 μl Bradford-Lösung vermischt und die Absorption bei 595 nm gemessen [Bradford, 1976].

Die Bradford-Lösung setzt sich zusammen aus:

100 mg	Coomassie Brilliant Blue <i>ad</i>
1000 ml	0.085 H_3PO_4

Mit den beiden gewonnenen Werten konnte der relative Anteil der α -Amylase an der Gesamtmenge der Proteine bestimmt werden. In Abbildung 2.5 wird gezeigt, daß die Amylaseaktivität einer Pflanze über einen längeren Zeitraum stabil ist.

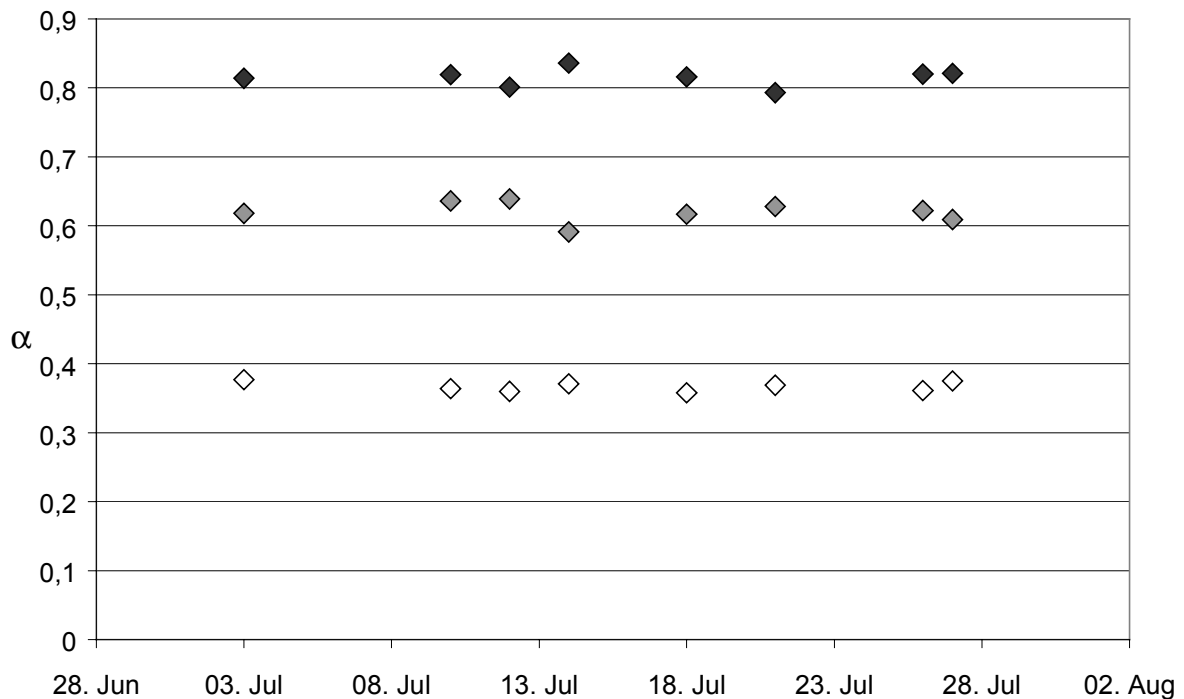


Abbildung 2.5 Die α -Amylase Aktivität im Gewebe von Versuchspflanzen ist stabil.

Gezeigt werden die Meßwerte des Amylase-Assays an Blättern dreier ausgewählter Versuchspflanzen, wie sie über mehrere Wochen aufgenommen wurden. Der Gehalt an α -Amylase in den Versuchsobjekten ändert sich nicht mit der Zeit und liegt innerhalb einer Meßgenauigkeit von etwa 0.04 Einheiten.

Dies war wichtig, um nicht jedesmal direkt nach einer erfolgreichen Patch-Clamp Messung eine Bestimmung der Amylaseaktivität an der verwendeten Pflanze durchführen zu müssen, sondern einfach in regelmäßigen Abständen die Aktivität aller zur Verfügung stehenden Versuchspflanzen messen zu können.

Um die Möglichkeit zu haben, über einen längeren Zeitraum mit Protoplasten gleicher α -Amylase-Aktivität messen zu können wurden isogenetische Pflanzen gezogen (Kapitel 2.2). In Abbildung 2.6 ist gezeigt, daß die im Amylase Assay gemessenen Werte für Pflanzen der selben Mutterpflanze gleich ist.

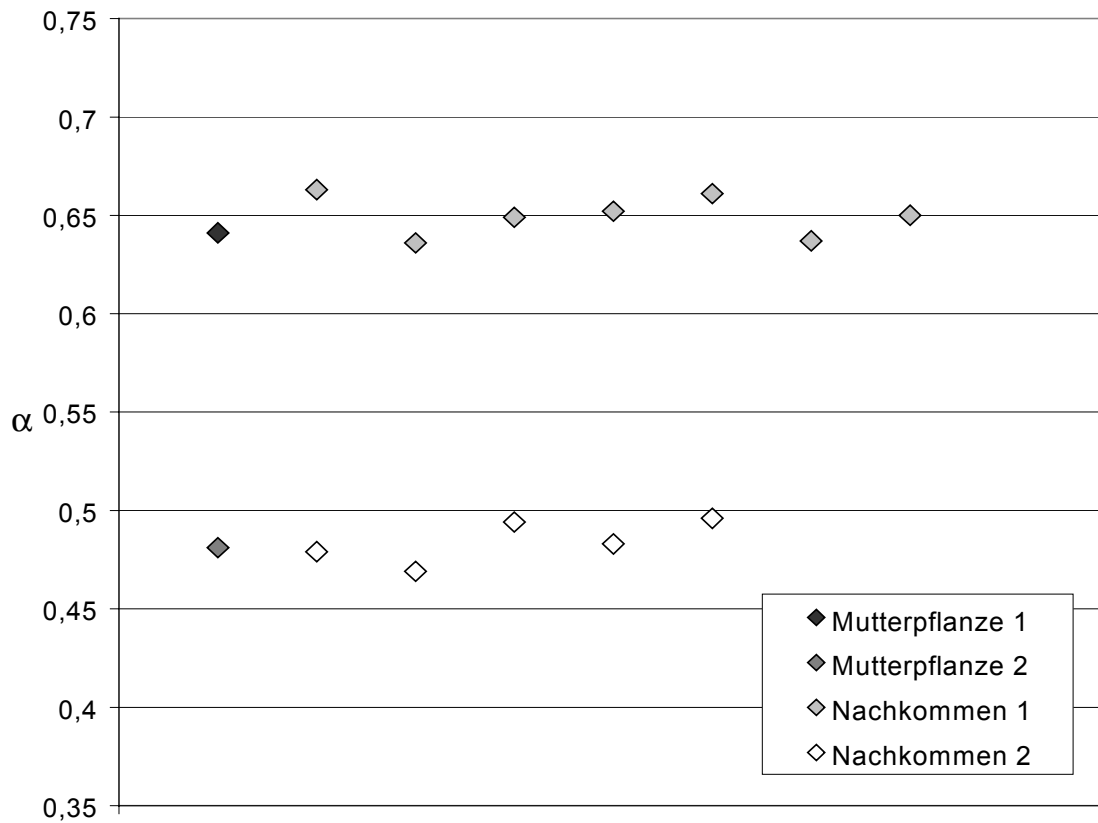


Abbildung 2.6 α -Amylase-Aktivität von Sproßkulturen einer Mutterpflanze.

Gezeigt sind die Amylase-Werte von sieben beziehungsweise fünf isogenetischen Nachkommen zweier transgener Versuchspflanzen (Mutterpflanze 1, beziehungsweise 2). Die Technik der Sproßkultur lieferte Pflanzen mit einheitlicher sekretorischer Aktivität.

Die Ergebnisse dieser Messungen waren so zunächst noch nicht nutzbar, da sie nur ein Maß für die Amylaseaktivität im gesamten Blattgewebe darstellten. Um diese Ergebnisse für die Betrachtung der Aktivität von α -Amylase in einzelnen Protoplasten nutzen zu können war es notwendig die gemessenen Werte auf Einzelzellaktivitäten umrechnen zu können. Es ist bekannt, daß die Aktivität innerhalb einheitlicher Zellen in einem Gewebe gleich ist [Crofts et al., 1999]. Dieser Punkt ist wichtig, da im Patch-Clamp Experiment ja Einzelzelldaten gewonnen werden. Es lagen keinerlei Daten vor über die Lebensdauer von sezernierter α -Amylase im Apoplasten. Die Aktivitäten, die mit der Untersuchung am vollständigen Gewebe gemessen werden, werden um den Anteil gespeicherter Amylase über der tatsächlichen Zellaktivität liegen. Das Meßverfahren mußte also geeicht werden.

2.5.1 Eichung des Amylase-Assays

Zu diesem Zweck wurde die Amylaseaktivität von Gewebe nach der oben beschriebenen Methode bestimmt und parallel Gewebe enzymatisch abgebaut, so daß eine große Zahl an isolierten Protoplasten zur Verfügung stand. Für das oben beschriebene Assay wurde jeweils etwa ein halber cm² eines Blattes benötigt. Vom verbliebenen Rest des Blattes wurden dann zur Vergleichsmessung 5 cm² verwendet, indem nach dem oben beschriebenen Verfahren Protoplasten aus dem Blatt isoliert wurden. Die gewonnenen Protoplasten wurden mehrfach gewaschen, um sicher zu stellen, daß keine signifikanten Amylasemengen mehr auf der Protoplastenoberfläche verblieben. Die Protoplasten wurden für exakt 3h in 1 ml Badlösung auf einem Rotationsschüttler (Mini-Shaker, Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz) bei 12 Rotationen min⁻¹ und 21° C bewegt. Nach der vorgegebenen Zeit wurden die Protoplasten abzentrifugiert und die Enzymaktivität der Badlösung nach den oben beschriebenen Verfahren bestimmt. Ein sehr kritischer Punkt bei dieser Prozedur ist die Notwendigkeit nur vernachlässigbar wenige Protoplasten während der Inkubation und vor allem während der Zentrifugation und dem Abnehmen der Badlösung zu zerstören. Da jeder geplatze Protoplast zusätzliche α -Amylase an das Badmedium abgeben würde, würde sonst das Meßergebnis deutlich verfälscht. Um sicher zu gehen daß keine Protoplasten geplatzt waren, wurden die Protoplasten erneut in Badlösung resuspendiert und unter dem Mikroskop auf geplatze Protoplasten oder Zellfragmente durchgesehen. Nur wenn keine Fragmente feststellbar waren, wurde die Messung in die Eichung einbezogen. Die Streuung der Eichmessungen ist nichtsdestotrotz bei den Messungen an Protoplasten deutlich höher als bei den Gewebemessungen (Abbildung 2.7). Durch mehrmaliges Messen konnte aber eine zuverlässige Eichgerade erstellt werden.

Damit war es möglich das Amylase-Assay von Gewebe mit dem von Protoplasten zu vergleichen. Abbildung 2.7 zeigt, daß der Zusammenhang von Amylaseaktivität im Gewebe und Aktivität der von Protoplasten sezernierten α -Amylase linear ist.

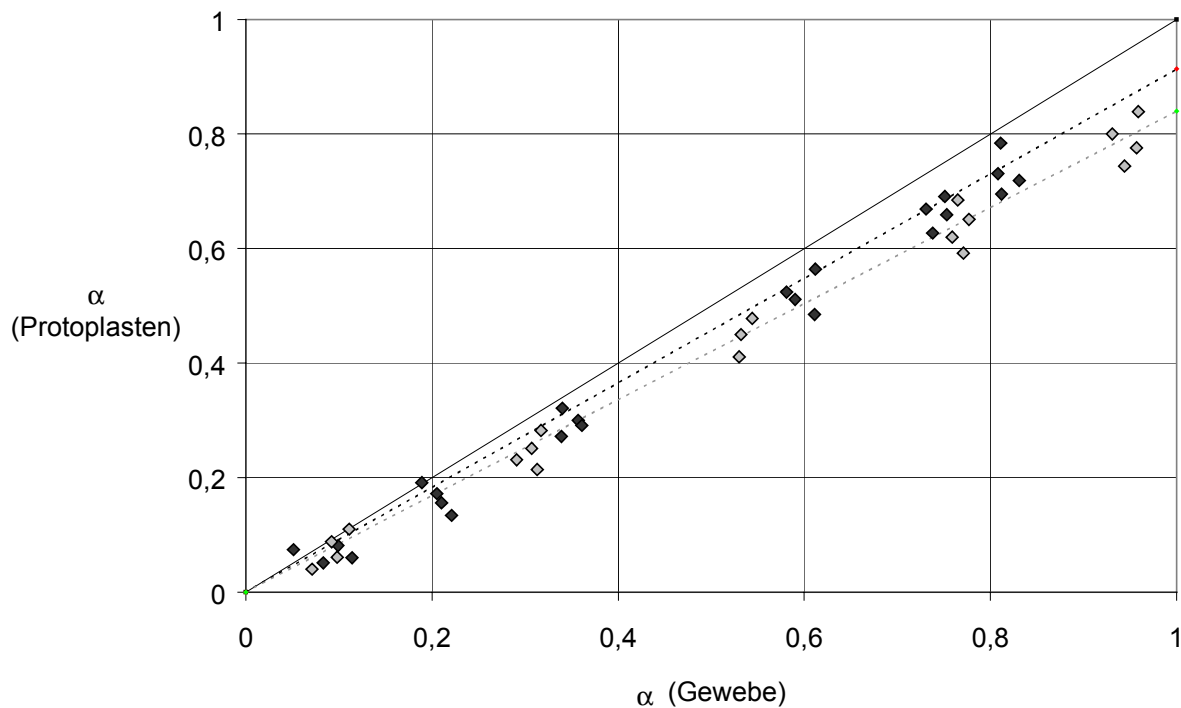


Abbildung 2.7 Eichung des α -Amylase-Assays

Bestimmung des Gehaltes an α -Amylase im Blattgewebe im Vergleich mit der Messung der α -Amylase – Sekretion von Protoplasten derselben Versuchspflanze. Die am Gewebe ermittelten Werte liegen um 10 % für Amylase Pflanzen (dunkelgraue Rauten) und um 18 % für Amylase-HDEL Pflanzen (hellgraue Rauten) über der tatsächlichen Sekretion. Mit der Kenntnis dieses Zusammenhanges konnten die deutlich einfacheren Messungen der α -Amylase-Aktivität im Gewebe herangezogen werden, um Aussagen über die tatsächliche sekretorische Aktivität zu machen.

Die Werte, die bei der Bestimmung im Blattgewebe ermittelt werden sind um 10 % höher, als die an Protoplasten ermittelten Werte. Das liegt wahrscheinlich an α -Amylase, die im Apoplasten gespeichert ist. Zur Bestimmung der tatsächlichen sekretorischen Aktivität ist der Wert, der durch Messung an Protoplasten ermittelt werden kann letztendlich also geeigneter. Messungen, die am Gewebe durchgeführt worden waren, wurden zur Auswertung auf Aktivität von Protoplasten umgerechnet. Betrachtet man die Werte in Abbildung 2.7 auf Unterschiede zwischen Amylase Pflanzen und Amylase-HDEL Pflanzen hin, so fällt auf, daß die im Gewebe ermittelte Amylaseaktivität bei HDEL Pflanzen mit etwa 20 % noch weiter von dem an Protoplasten gewonnenen Wert abweicht, als dies bei Amylase Pflanzen der Fall ist. Dieser Effekt kommt möglicherweise daher, daß neben der Speicherkapazität im Apoplasten zusätzlich Speicherung im ER und im Golgi stattfindet. Die Gesamtaktivität aller α -Amylase im sekretorischen Weg ist dann um die Aktivität der Amylase in diesen zwei Speichern vergrößert.

2.6 Messung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration

Zur Bestimmung der Kalziumkonzentration im Zytoplasma wurde die ratiometrische Messung mittels des Farbstoffes Fura-2 [Grynkiewicz et al., 1985] (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) verwendet.

Ratiometrische Meßverfahren beruhen auf der Eigenschaft einer Substanz ihr Emissionsspektrum in Abhängigkeit von der Bindung an einen bestimmten Stoff zu verändern [Grynkiewicz et al., 1985]. Die Fluoreszenz wird bei zwei Wellenlängen λ_1 und λ_2 gemessen und das Verhältnis (engl. 'Ratio') der Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Je nach dem Sättigungsgrad des Farbstoffes mit Ca^{2+} mißt man ein charakteristisches Ratio.

2.6.1 Kalibrierung der Fura Messungen

Die Kalibrierung der Fura Experimente für die Bestimmung von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in Tabak Mesophyllzellen wurde in Anlehnung an das Verfahren von Plieth und Hansen durchgeführt [Plieth & Hansen, 1996]. Die Kalibrierkurve ist gegeben durch:

$$\text{pCa} = k_d - dx \ln\left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}\right) , \quad (2.2)$$

wobei k_d die Dissoziationskonstante von Fura-2 für Ca^{2+} und dx ist das Verhältnis der Fluoreszenz F_{\min} (Fluoreszenz bei minimaler Ca^{2+} Konzentration auf λ_2) zur Fluoreszenz F_{\max} (Fluoreszenz bei maximaler Ca^{2+} Konzentration auf λ_2) sind. In den hier beschriebenen Versuchen waren $\lambda_1 = 360$ und $\lambda_2 = 380$ nm. R ist das jeweils gemessene Ratio, R_{\min} das Ratio in Ca^{2+} freier Lösung und R_{\max} das Ratio, welches gemessen wird, wenn der Farbstoff mit Ca^{2+} gesättigt ist.

Die Eichung erwies sich als relativ kompliziert. Ein erster Versuch eine Kalibrierkurve nur durch Messungen der Fluoreszenz von Lösungen definierter Kalziumkonzentration (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) zu erhalten, schlug fehl. Die Kalibrierkurve gibt zwar das Verhalten des Farbstoffes bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen wieder (Abbildung 2.8), deckte den Bereich der im Experiment gemessenen Ratios im Intervall [0.9,3.0] aber nicht ab.

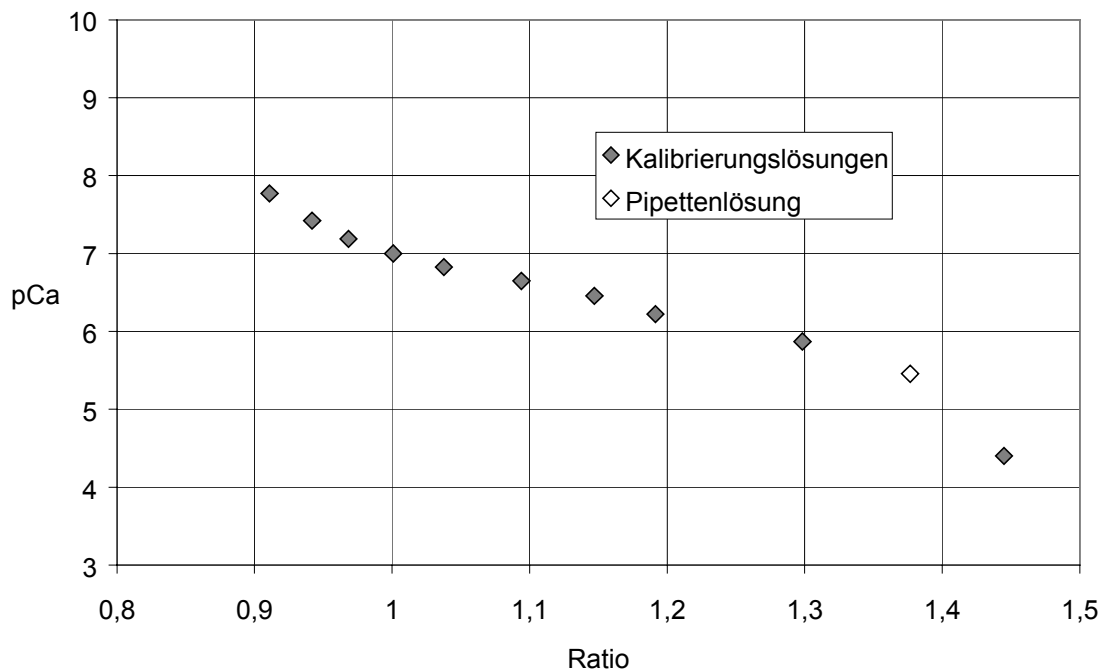


Abbildung 2.8 Kalibrierkurve für Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2.

Die Eichkurve zeigt zum einen daß die Pipettenlösung tatsächlich recht genau der berechneten Ca^{2+} -Konzentration entsprach; sie zeigt zum zweiten aber auch erhebliche Abweichungen von den durchgeführten Messungen. Die gemessenen Ratios lagen im Intervall [0,9,3,0]. Diesen Bereich deckt die Kurve bei weitem nicht ab. Der Fit mit Gleichung 2.2 ergab $R_{\max} = 1.63$ und $R_{\min} = 0.81$ bei einem k_d von 6.84.

Es war daher notwendig, weitere Kalibriermessungen durchzuführen, die eine Umrechnung der in vitro erhaltenen Kalibrierkurve auf den in vivo-Zustand erlaubte.

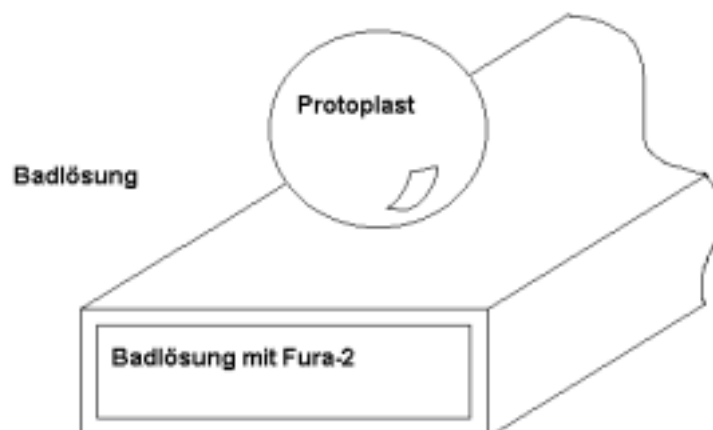


Abbildung 2.9 Anordnung von Protoplast und Fura-2.

Auf einer sehr feinen Kapillare, welche Fura-2 Lösung enthielt wurde ein Protoplast mittels Poly-L-lysine® (Sigma-Aldrich) fixiert. Der Fokus des Mikroskops war auf Höhe der Fura-2 Lösung justiert und es wurden jeweils Messungen des Ratio mit und ohne Protoplast im Strahlengang des Lichtes durchgeführt.

Um diese zusätzliche Eichung unter definierten, reproduzierbaren Bedingungen durchführen zu können, wurde zunächst folgendes Verfahren gewählt: Die Kalziumlösungen wurden in 'Micro Slides' (CamLab Ltd., Cambridge, England), das sind rechteckige Glaskapillaren mit sehr geringer Wandstärke gefüllt. Diese wurden in eine Meßkammer gelegt und Badlösung mit Protoplasten hinzu gegeben. Abbildung 2.9 zeigt die Anordnung der Protoplasten und der mit Lösung gefüllten Kapillare im Experiment. Der Fokus der Mikroskopoptik wurde auf die Fura-Lösung eingestellt, so daß im Strahlengang ein Protoplast lag.

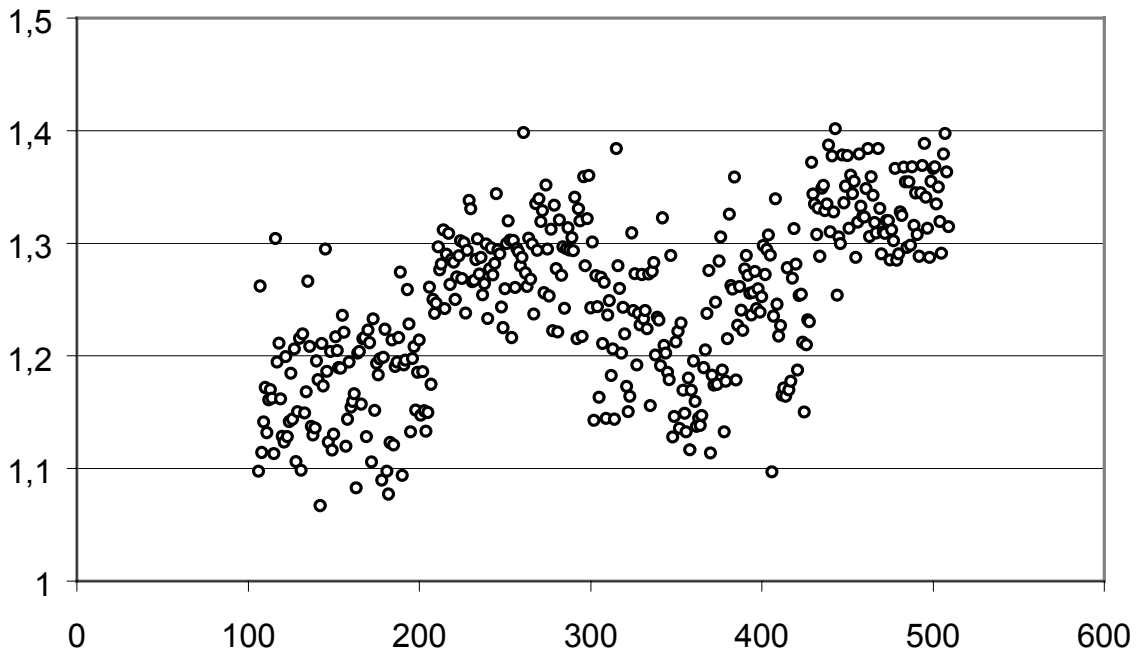


Abbildung 2.1o Ratiometrische Messung mit und ohne Protoplast im Strahlengang.

Gezeigt ist das gemessene Ratio in der Konfiguration, wie sie in Abbildung 2.9 gezeigt ist. Fokussiert ist auf einen Punkt innerhalb des 'Microslides'. In den Intervallen $t=[100,200]$ und $t=[300,400]$ liegt kein Protoplast im Strahlengang des Meßlichtes. In den beiden anderen Intervallen passiert das Meßlicht zusätzlich einen Protoplasten. Die Änderung im Ratio ist mit 8% viel zu gering, um die Abweichungen gegenüber den *in vivo* Messungen erklären zu können.

Es zeigten sich, wie in Abbildung 2.1o zu sehen ist, nur ein geringer Unterschied zwischen Ratiomessungen mit und ohne Protoplast im Strahlengang.

Offenbar erfolgte die Verschiebung der Fluoreszenz bei den gewählten Wellenlängen nicht durch Absorption der emittierten Wellen an Bestandteilen des Protoplasten. Diese hätte durch die gewählte Versuchsanordnung zumindest partiell simuliert werden können, womit die gemessenen Ratios im Bereich der im Experiment erzielten gelegen haben sollten. Vielmehr wurde die Verschiebung im Ratio wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion des Farbstoffes mit zytoplasmatischen Komponenten erreicht. Die Umrechnung der Eichkurve auf die Bedingungen der durchgeführten Experimente erforderte also eine Kalibrierung mit definierter Kalziumkonzentration im Protoplasten in der Patch-Clamp Konfiguration. Eine Verwendung der Eichlösungen von Molecular Probes kam nicht in Frage, da die Lösungen uneinheitliche und ungeeignete Osmolaritäten aufweisen. Es ergab sich daher die Notwendigkeit die Pipettenlösungen mit geeichter Kalziumkonzentration selbst herstellen zu müssen.

Die Pipettenlösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

250	mM	KCl	
2	mM	Na ATP	
1	mM	MgCl ₂	
10	mM	Hepes	(pH: 7.23 KOH)
10	mM	EGTA	
X	mM	CaCl ₂	

Verwendet wurden Pipettenlösungen mit folgenden Kalziumkonzentrationen:

freies Ca ²⁺ [nM]	X [mM] (berechnet nach 'Calcium 2.1', 1990)
0	0
500	7.91
750	8.505
1000	8.837
1500	9.199
3000	9.596
50000	10.262

Die durchgeführten Kalibriermessungen zeigten, wie in Abbildung 2.11 ersichtlich, anders als die zuvor in vitro durchgeführten Eichungen eine erhebliche Streuung.

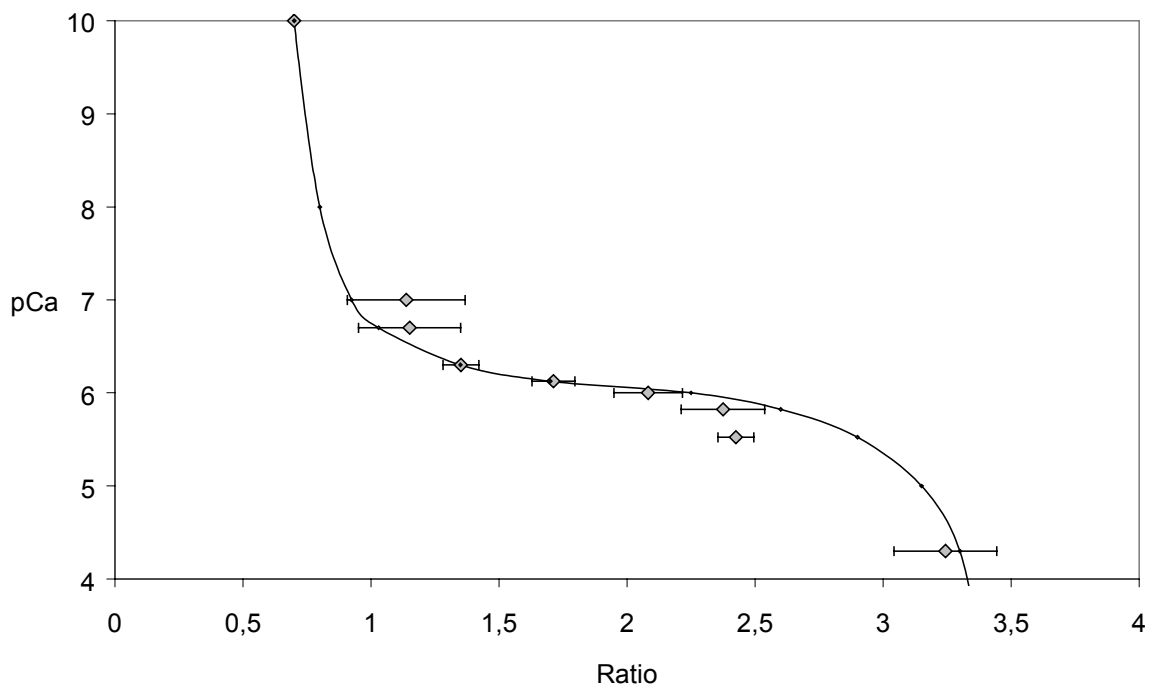


Abbildung 2.11 Ratio bei Beladung von Protoplasten mit definierten Ca²⁺-Konzentrationen

Protoplasten wurden über die Pipette mit Pipettenlösungen definierter Konzentration an freiem Ca²⁺ und Fura-2 perfundiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus jeweils vier Messungen an. Die durchgezogene Linie zeigt einen Fit mit Gleichung 2.2.

Dies kann verschiedene Ursachen haben. Je nach Güte des Zugriffswiderstandes R_a war eine mehr oder weniger rasche Perfusion des Zytoplasmas zu erwarten. Gerade bei Messungen mit größerem R_a wurde die Kalziumkonzentration möglicherweise nur teilweise von der Pipettenlösung bestimmt. Variationen in der Zusammensetzung des Zytoplasmas zwischen den einzelnen Protoplasten können eine verschieden starke Wechselwirkung mit den betrachteten Wellenlängen bewirkt haben. Bedacht werden muß auch, daß die Einstellung einer definierten freien Kalziumkonzentration im nanomolaren Bereich nicht trivial ist. Schon winzige Verunreinigungen an verwendeten Gefäßen oder Pipetten bei der Herstellung der Lösungen können erhebliche Verfälschungen der freien Kalziumkonzentration zur Folge haben. Auch der Reinheitsgrad der anderen verwendeten Salze spielt bei diesen geringen Konzentrationen eine Rolle und muß gegebenenfalls berücksichtigt werden. Jede der berechneten Lösungen wurde in drei Ausfertigungen hergestellt, um Fehler durch ungenaue Eichlösungen minimieren zu können.

Gerade weil die Ursache der Verschiebung unbekannt ist, ließ erst die Kombination von *in vitro*-Eichung zur Bestimmung der Charakteristik der Kalibrierkurve und anschließender *in vivo*-Eichung zur Umrechnung der Kurve auf die experimentellen Bedingungen recht sichere Rückschlüsse auf die tatsächlich im Experiment vorliegenden Kalziumkonzentrationen zu.

Ein Fit der Kalibrierkurve (2.2), an die Daten der *in vivo* Kalibrierungen ergab die folgenden Parameter:

$$\begin{aligned} k_d &= 6.33 \\ dx &= -0.51 \\ R_{\min} &= 0.7 \\ R_{\max} &= 3.2 \end{aligned}$$

Die Dissoziationskonstante von Fura-2 für Ca^{2+} in Lösung wird mit 6.83 angegeben (Produkt Information, Fura-2, Molecular Probes), wobei ausdrücklich darauf hingewiesen wird, daß der Wert erheblich von der Ionenstärke, dem pH und anderen intrazellulären Parametern abhängt. Der k_d ist daher von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich und muß für ein anderes Zellsystem stets neu bestimmt werden. Der Wert liegt allerdings in guter Übereinstimmung mit für andere pflanzliche Systeme gefundenen Werten, so geben Plieth und Mitarbeiter den k_d für *Chara corallina* mit 6.29 an. Der k_d für die Messungen in den Mais Protoplasten lag etwas höher mit 6.69 [Sutter et al., 2000]. Der Wert von dx kann bei der gewählten Meßkonfiguration als ein Maß für die Güte der Kalibrierung dienen, da unter Idealbedingungen dx den Wert $-(\ln 10)^{-1} = -0.434$ annehmen muß [Plieth, 1995]. Der Wert von -0.51 ist gegenüber dem Erwartungswert unter den recht schwierigen Bedingungen der *in vivo* Kalibrierung als durchaus hinreichen anzusehen.

Mit diesen Werten war die Bestimmung von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ möglich.

2.7 Abschätzung der Konzentration an freiem Magnesium in Zytoplasma

Der Farbstoff Fura-2 weist eine Querempfindlichkeit für Magnesium Ionen auf. Das bedeutet, daß die Kalzium Ionen mit dem vorhandenen Magnesium um die Bindungsplätze am Fura-2 konkurrieren. Dies führt zu einer Verschiebung des k_d des Kalziums. Da der k_d von Fura-2 für Mg^{2+} aber um 5 Größenordnungen über dem für Ca^{2+} liegt, ist die Verschiebung im gemessenen Ratio gering. Nur bei einer Mg^{2+} -Konzentration, die um Größenordnungen über der Ca^{2+} -Konzentration, wird ein meßbarer Effekt auftreten [Plieth, 1995].

Hat man eine genaue Kenntnis von $[Ca^{2+}]_{cyt.}$ und eine Eichkurve, die das Ratio in Abhängigkeit von pCa angibt, so kann aus der Abweichung der gemessenen Ca^{2+} -Konzentration von dem vorgegebenen Wert, die Mg^{2+} -Konzentration abgeschätzt werden.

Das Verfahren erlaubt aus mehreren Gründen nur eine Abschätzung von $[Mg^{2+}]_{cyt.}$ und kann daher nur verwendet werden, um sehr hohe Mg^{2+} -Konzentrationen zu detektieren. Um über die Patch-Pipette eine definierte Ca^{2+} -Konzentration in einer Zelle einzustellen, muß die Zelle über einen langen Zeitraum mit Pipettenlösung durchspült werden. Selbst dann kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß $[Ca^{2+}]_{cyt.}$ exakt der Ca^{2+} -Konzentration in der Pipettenlösung entspricht. Geringe Abweichungen in der Ca^{2+} -Konzentration vom angenommenen Wert, werden wegen der geringen Verschiebung im Ratio aber bereits einen erheblichen Einfluß auf die Bestimmung von $[Mg^{2+}]_{cyt.}$ haben.

Es war aber möglich mit diesem Verfahren Kontrollmessungen durchzuführen, bei denen es notwendig war hohe Mg^{2+} -Konzentrationen im Zytoplasma nachweisen zu können.

2.8 Fitverfahren

Im Laufe der Zeit sind eine Vielzahl mathematischer Verfahren entwickelt worden, um eine Funktion an Meßdaten anzufitten. Viele diese Verfahren verwenden die wiederholte Berechnung der Funktion und ihrer Ableitungen, was zum einen sehr viel Rechenzeit beanspruchen kann und zum anderen die Gefahr in sich birgt, Rundungsfehler über mehrere Iterationen unverhältnismäßig stark anwachsen zu lassen. Eine Alternative zu solchen Verfahren stellt der sogenannte Simplexalgorithmus dar, der 1965 von Neadler und Mead [1965] entwickelt wurde und knapp zwanzig Jahre später 1984 von Caceci und Cacheris [1984] als Programm dargestellt wurde. Dieses Verfahren verwendet keine Berechnung von Ableitungen sondern gewinnt den jeweils folgenden Parametersatz durch eine geometrische Konstruktion. Die Arbeitsweise des Algorithmus soll im folgenden an einem Beispiel für zwei Parameter erklärt werden. Der Simplex läßt sich entsprechend dem Beispiel leicht auf n Parameter erweitern.

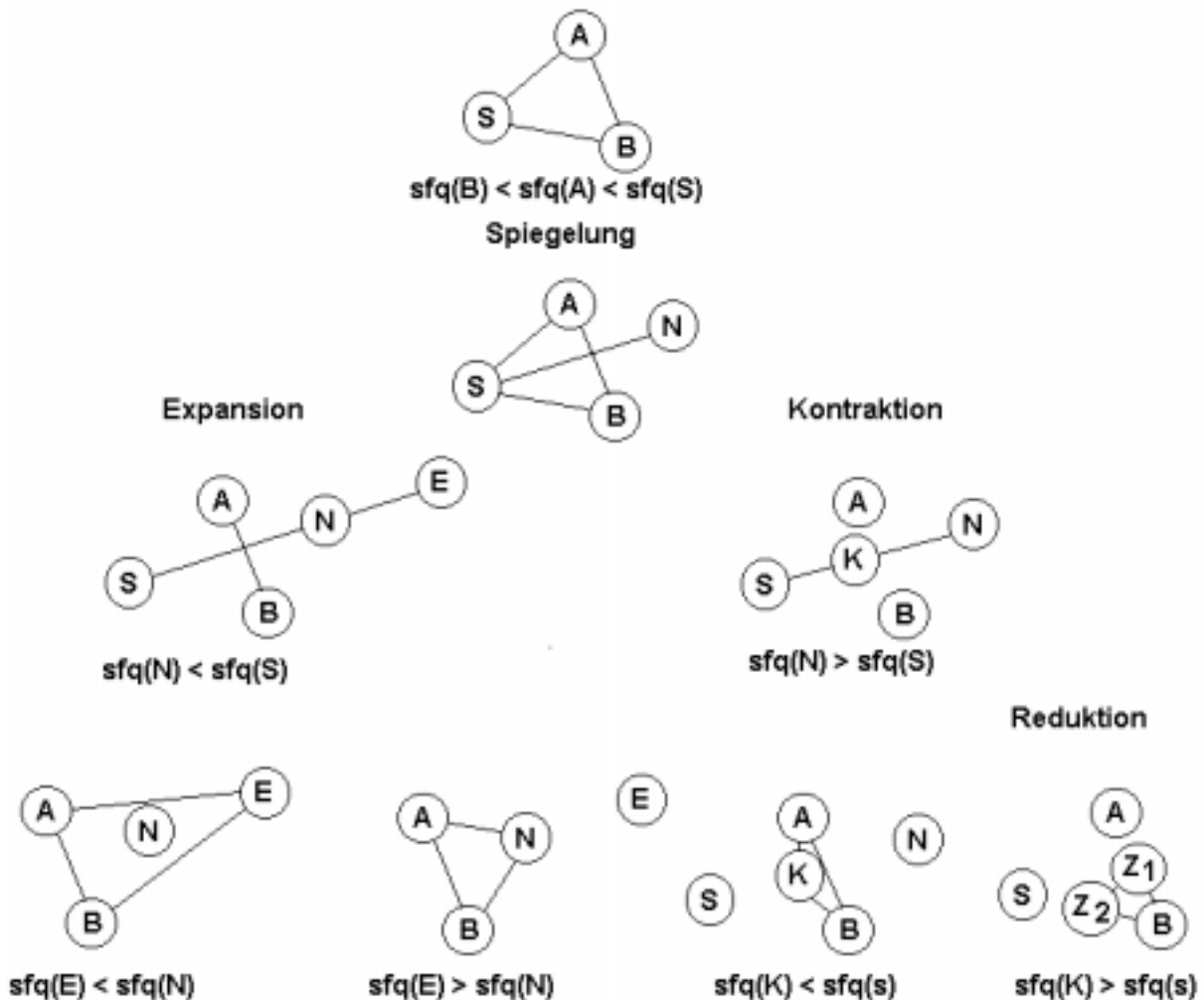


Abbildung 2.12 Arbeitsweise des Simplex Algorithmus in 2 Dimensionen.

Gezeigt ist ein zweidimensionaler Simplex und die Verfahren, die bei der Auswahl neuer Parametersätze angewandt werden (sfq bezeichnet die Summe über die Fehlerquadrate).

Aus den zwei Vorschlagswerten für die gesuchten Parameter werden zunächst drei Startwerte (ABS) bestimmt. Der Algorithmus sortiert die Startwerte nach der Summe der Fehlerquadrate. Im Beispiel ist B der beste, S der schlechteste und A ein anderer Wert. Der schlechteste Wert S wird gespiegelt und ergibt den neuen Wert N. Ist die Summe über die Fehlerquadrate für den neuen Parametersatz besser als für S, so wählt der Algorithmus einen weiteren Parametersatz in Richtung der Geraden SN. Dieser als Expansion bezeichnete Schritt ergibt den Parametersatz E. Das Fehlerquadrat des Satzes E wird berechnet. Ist der Fehler des Satzes E geringer als der von N, so wird das Dreieck ABS durch das neue Dreieck ABE ersetzt, bringt eine Expansion keinen weiteren Erfolg, so wird ABS durch ABN ersetzt. Ist jedoch schon die Spiegelung von S nach N erfolglos, so wird ein Parametersatz auf halber Strecke SN gewählt. Dieser durch Kontraktion gewonnene Satz wird mit K benannt. Liegt der Punkt K günstiger als S, so ersetzt er S im Dreieck ABS. Lediglich wenn weder Kontraktion noch Expansion in Richtung der Spiegelung erfolgreich sind, wird der Simplex auf den besten Wert B hin zusammengezogen. Im oben angeführten Beispiel wird das Dreieck ABS auf das Dreieck Z_1BZ_2 zusammengezogen. Der letzte Schritt ist relativ rechenintensiv, da $n-1$ Parametersätze neu berechnet werden müssen. In allen anderen betrachteten Fällen besteht der Simplex aus nur einem neuen und ansonsten bereits berechneten Punkten. Der Fit bricht ab, wenn das vom Simplex eingeschlossene Areal unter eine vordefinierte Genauigkeit fällt.

Die Vorteile des Simplexalgorithmus liegen in der Einfachheit der Rechenoperationen. Wird ein großer Startsimplex gewählt, so kann das Fitverfahren zudem recht gut lokalen Minima entkommen. Die Tatsache, daß die Schrittweite des Simplex durch die Möglichkeit der Expansion der Steigung des Fehlergebirges angepaßt wird, macht den Simplex zudem zu einem recht schnellen Algorithmus. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist, daß der Simplex als geometrisches Konstrukt nicht divergieren kann und nur unter sehr, sehr unglücklichen Bedingungen oszilliert. Bereits genannt wurde der Vorteil, daß Rundungsfehler weniger dramatische Folgen haben als bei Programmen, die iterativ Ableitungen berechnen. Für die Anwendung des Simplex im Programm ist es sehr schön, daß unsinnige Parametersätze einfach ausgeschlossen werden können, indem sie mit hohen Fehlersummen belegt werden. Ebenso ist es in dieser Weise sehr einfach Randbedingungen vorzugeben.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß von Membraneigenschaften auf die Membrankapazität

Die Messungen im Rahmen dieser Arbeit befassen sich mit Änderungen der Membrankapazität von Protoplasten. Diese wird als ein Maß für die Oberfläche der Protoplasten genommen und Änderungen der Kapazität entsprechend als Änderungen der Oberfläche durch Einbau von zusätzlicher Membran durch Exocytose oder als Wegnahme vorhandener Membranfläche durch Endocytose gewertet. Die Richtigkeit dieser Annahme ist vielfach belegt [Neher & Marty, 1982, Fernandez et al., 1984]. Der gemessene Parameter Kapazität hängt mit der betrachteten Oberfläche aber in nicht trivialer Weise zusammen. Die Membrankapazität ist gegeben durch:

$$C_m = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{A}{d}, \quad (3.1)$$

mit Membrankapazität C_m , Dielektrizitätskonstante ε_0 ($8.8 \cdot 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$), relative Dielektrizitätszahl ε_r , Membranoberfläche A und Membrandicke d . Die Oberfläche und die Kapazität hängen also zunächst einmal einfach über drei Proportionalitätsfaktoren zusammen. Abgesehen von der Naturkonstanten ε_0 sind diese jedoch vom thermodynamischen Zustand der Membran abhängig. Die Membrandicke ist abhängig von der mittleren Energie pro Fläche, die in der Membran enthalten ist, die relative Dielektrizitätszahl hängt ab vom Zustand des Dielektrikums zwischen den polaren Gruppen der Membran, also von der Konformation der Kohlenwasserstoffketten innerhalb der Membran. Beide Parameter werden sich innerhalb eines gewissen Rahmens ändern, wenn die Membran beispielsweise während eines Experimentes gedehnt oder gestaucht wird. Wird zusätzliche Membran eingebaut, so wird das zu einem andauernden oder vorübergehenden Abfall der Oberflächenspannung führen. Wird Membran endocytisiert, so steigt die Oberflächenspannung der Membran.

3.1.1 Membranmodelle

Im folgenden wird versucht, die aus diesen Vorgängen resultierenden Meßfehler abzuschätzen. Hierbei müssen zunächst verschiedene Membranmodelle in Betracht gezogen werden. Messungen an Tonoplastenmembranen, die gedehnt oder gestaucht wurden, erlauben dann eine bessere Einschätzung der Abweichung der Membrankapazität vom angenommenen Wert.

Wird eine Biomembran gedehnt so wird sich die gemessene Membrankapazität ändern. Dieser an sich recht trivialen Überlegung liegen recht komplexe und nur zum Teil untersuchte und verstandene Vorgänge innerhalb der Membran zu Grunde. So können sich bei Dehnung einer Biomembran eine Reihe relevanter Parameter ändern. Was tatsächlich unter Einwirkung vom lateralem Zug mit der Membran geschieht ist nicht bekannt. Wird das Volumen der Membran ($v_{mem.}$) als konstant angenommen [Stoekenius & Engelmann, 1969], so ist die Membrandicke eine Funktion des Vesikelradius. Das Membranvolumen für eine definierte Membrandicke (d_0) ist:

$$v_{mem.} = \frac{4}{3} \pi \left(r^3 - (r - d_0)^3 \right). \quad (3.2)$$

Daraus ergibt sich die Membrandicke in Abhängigkeit vom Radius zu:

$$d(r) = r \sqrt[3]{r^3 - \frac{3v_{\text{mem.}}}{4\pi}} \quad (3.3)$$

Ist die Annahme konstanten Membranzolumens korrekt, so wird eine Dehnung der Membran in zweierlei Weise Einfluß auf die Membrankapazität nehmen. Die Vergrößerung der Oberfläche bewirkt eine Steigerung der Kapazität, ebenso wie die Verkleinerung der Membrandicke im Nenner von Gleichung 3.1.

Die Annahme konstanten Volumens entspricht aber nicht unbedingt den Tatsachen. Sackmann und Mitarbeiter [Sackmann et al., 1973] beschreiben, daß eine Membran unter Zufuhr von Energie in Form von Wärme bei konstanter Fläche um 8% dicker wird. Auch die Einwirkung von lateralem Zug auf eine Membran stellt eine Energiezufuhr dar, die zu Konformationsänderungen innerhalb der Membran führt. Die Annahme, daß die Membran in gleicher Weise reagiert wie bei Energiezufuhr in Form von Wärme, ist durchaus nicht abwegig. Betrachtet man die Membrankapazität unter dieser Annahme, so wirken zwei gegenläufige Prozesse. Die Oberflächenvergrößerung bewirkt eine Steigerung, die Membranverdickung eine Verringerung der Kapazität.

Nun ist es aber ebenfalls vorstellbar, daß die als Kondensator wirksame Fläche tatsächlich konstant ist. Eine Biomembran ist eben keine Platte aus leitendem Material, sondern eine mehr oder weniger dichte laterale Packung von polaren Gruppen. Die Menge dieser Gruppen verändert sich nicht, wenn die Membran gedehnt oder gestaucht wird. Möglicherweise muß eine Biomembran also als eine Ansammlung mikroskopischer Einzelkondensatoren aufgefaßt werden, deren elektrisch relevante Fläche sich nur durch Einbau oder Wegnahme von Einzelkondensatoren, Lipidmolekülen also, ändern kann. Betrachtet man die Änderung der Membrankapazität unter dem Einfluß von Membrandehnung, so ist die Membrandicke d der einzige Parameter, der sich unter diesen Voraussetzungen ändern würde. Wie oben beschrieben, ist sowohl eine Verringerung als auch ein Anwachsen von d vorstellbar. Entsprechend würde die Kapazität entweder steigen oder sinken.

Ein Vesikel von 20 μm Durchmesser habe eine relative Dielektrizitätszahl $\epsilon_r = 3$ und eine Membrandicke $d = 8 \text{ nm}$. Ersterer Wert wurde in Anlehnung an Gillis gewählt, der in 'Single Channel Recording' ϵ_r mit 2 bis 3 angibt [Gillis, 1995]. Die Membrandicke stammt von Janas und Mitarbeitern [Janas et al., 2000]. Damit errechnet sich die Membrankapazität zu $C_m = 4.15 \text{ pF}$

Eine Biomembran wird von mehreren Autoren als um bis zu 5% dehnbar beschrieben [Dai & Sheetz, 1995; Hochmuth et al., 1996]. Betrachtet man die Änderung der Membrankapazität bei Dehnung der Membran um 5% unter den verschiedenen oben angeführten Annahmen, so ergibt sich folgendes Bild:

1. Mit der Annahme konstanten Membranvolumens und kapazitiv wirksamer Oberfläche gleich der tatsächlichen Vesikeloberfläche, ergibt sich Folgendes: Der Radius steigt infolge der Dehnung von 10 μm auf 10.247 μm . Damit berechnet sich die reduzierte Membrandicke zu 7.619 nm. Die Membrankapazität steigt um 10.3 % auf 4.572 pF.
2. Wird die kapazitiv wirksame Oberfläche durch die Zahl der vorhandenen Lipide determiniert, so geht bei konstantem Membranvolumen nur die Verringerung der Membrandicke in die Membrankapazität ein. Die Dehnung würde dann einen Anstieg von nur 5.00 % auf 4.354 pF bewirken.
3. Nimmt man umgekehrt an, daß die Membran tatsächlich nicht dünner wird und die Membrankapazität durch die reale Oberfläche bestimmt wird, so wird die gemessene Kapazität um 5.01 % auf 4.355 pF ansteigen.
4. Die Überlegung, daß die Vesikelmembran unter Zufuhr von Energie dicker wird ist schwer rechnerisch zu fassen. Überlegungen, die die mittlere freie Energie pro Lipid mit berücksichtigen, sind auf dem bestehenden Kenntnisstand müßig. Nimmt man die 8 % an, die Sackmann und Mitarbeiter bei Wärmezufuhr nachweisen konnten [Sackmann et al., 1973], so ergibt sich ein leichter Abfall der Kapazität von 2.77 % auf 4.032 pF, wenn die reale Oberfläche wirksam ist ...
5. und ein deutlicher Abfall der Membrankapazität bei Membrandehnung von 7.41 % auf 3.84 pF, wenn die Oberfläche durch die Lipidzahl determiniert ist.

Einige der aufgeführten Szenarien, sind nur durch Messungen der Kapazität bei Membrandehnung schwer zu unterscheiden. Ein Abfall der Kapazität bei Dehnung der Membran, wäre ein deutlicher Hinweis auf eine Verdickung der Membran, ebenso könnte man einen starken Anstieg als Hinweis auf ein Zusammenwirken einer Verringerung der Membrandicke und einen Zuwachs an kapazitiv wirksamer Oberfläche werten.

3.1.2 Messung der Membrankapazität von Tonoplasten

Einige der Modelle stellen eine sehr ähnliche Prognose, was die Membrankapazität betrifft. So weicht die Prognose durch die an sich recht verschiedenen Ansätze der Modelle 2 und 3 erst in der dritten Dezimalen hinter dem Komma voneinander ab. Eine Festlegung auf eines der beiden Modelle wird in diesem Rahmen nicht möglich sein. Um aber zumindest einige Modelle ausschließen zu können, wurden Messungen der Membrankapazität an Tonoplasten durchgeführt, wobei die Membran im Verlauf des Experimentes gedehnt wurde.

Isolierte Tonoplasten sind nach heutigem Kenntnisstand zur Exocytose oder Endocytose nicht fähig. Zwar besitzen Tonoplasten mit großer Wahrscheinlichkeit SNARE-Proteine vom Target-Typ, um mit Vesikeln, die zur Vakuole transportiert

werden zu fusionieren [Bassham & Raikhel, 1999, Price et al., 2000], aber ein eigenständiger Fusionsapparat, der in Abwesenheit des Zytoplasmas funktioniert ist

eigentlich nicht denkbar [Sanderford & Raikhel, 1999]. Das Anschwellen der Tonoplasten unter Druck ist also allein auf elastische Dehnung der Membran zurückzuführen. Die gleichzeitige Aufzeichnung der Tonoplastenoberfläche und der Membrankapazität erlaubt dann Rückschlüsse auf grundlegende Membraneigenschaften.

Aus Tabak Mesophyllzellen wurden Tonoplasten isoliert und anschließend deren Membrankapazität im Patch-Clamp Experiment bestimmt. Mittels eines U-Rohr Manometers, das an die Patch Pipette angeschlossen war, wurde hydrostatischer Druck auf den Tonoplasten ausgeübt und der Tonoplast bis zum Zerplatzen gedehnt. Die Oberflächenvergrößerung während des Ausdehnens wurde bestimmt, indem der Tonoplastendurchmesser im mikroskopischen Bild kontinuierlich gemessen und notiert wurde, während parallel dazu die Kapazität aufgezeichnet wurde.

Abbildung 3.1 zeigt Daten, die nach dem oben beschriebenen Verfahren aufgenommen wurden.

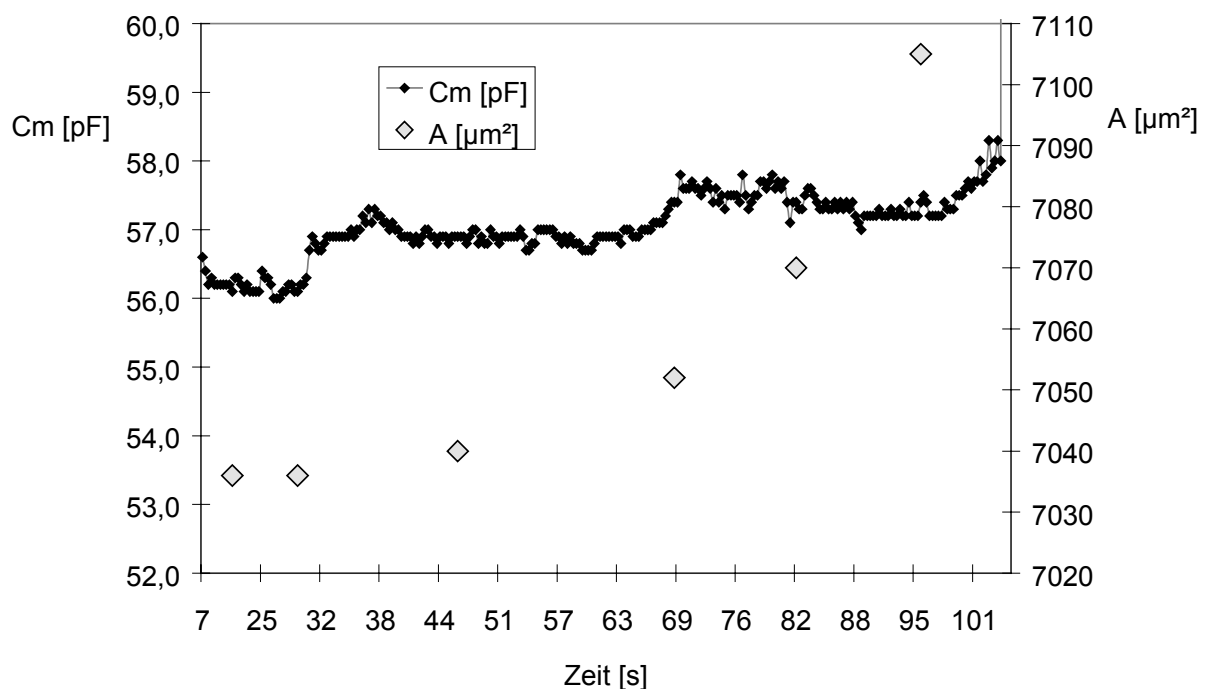


Abbildung 3.1 Membrankapazität eines Tonoplasten bei Dehnung der Membran

In einem Tonoplast mit einer Membrankapazität von 56 pF, und einer Oberfläche von 7035 µm² wird bei t = 25 ein Druck von 12 cm H₂O angelegt. Es folgt direkt darauf ein kurzer vorübergehender Anstieg der Kapazität und nach etwa 10 s ein andauernder Anstieg von 56 pF auf 57 pF. Die Membranoberfläche (graue Rauten) steigt in exponentieller Weise um etwa 70 µm². Bei t = 104 platzt der Tonoplast.

Die Oberfläche nimmt in Reaktion auf den Druck meist linear, in einigen Fällen eventuell exponentiell zu, bis der Tonoplast dann platzt. Hier lässt sich ein erster wichtiger Membranparameter gewinnen. Die mittlere elastische Dehnbarkeit der untersuchten Membran liegt bei 7 %.

Betrachtet man die Membrankapazität zu Beginn und direkt vor dem Zerplatzen des Tonoplasten, so fällt auf, daß sich die Kapazität mit der Oberfläche nur sehr wenig ändert. Abbildung 3.2 zeigt die Änderung der Kapazität gegenüber dem Oberflächenzuwachs.

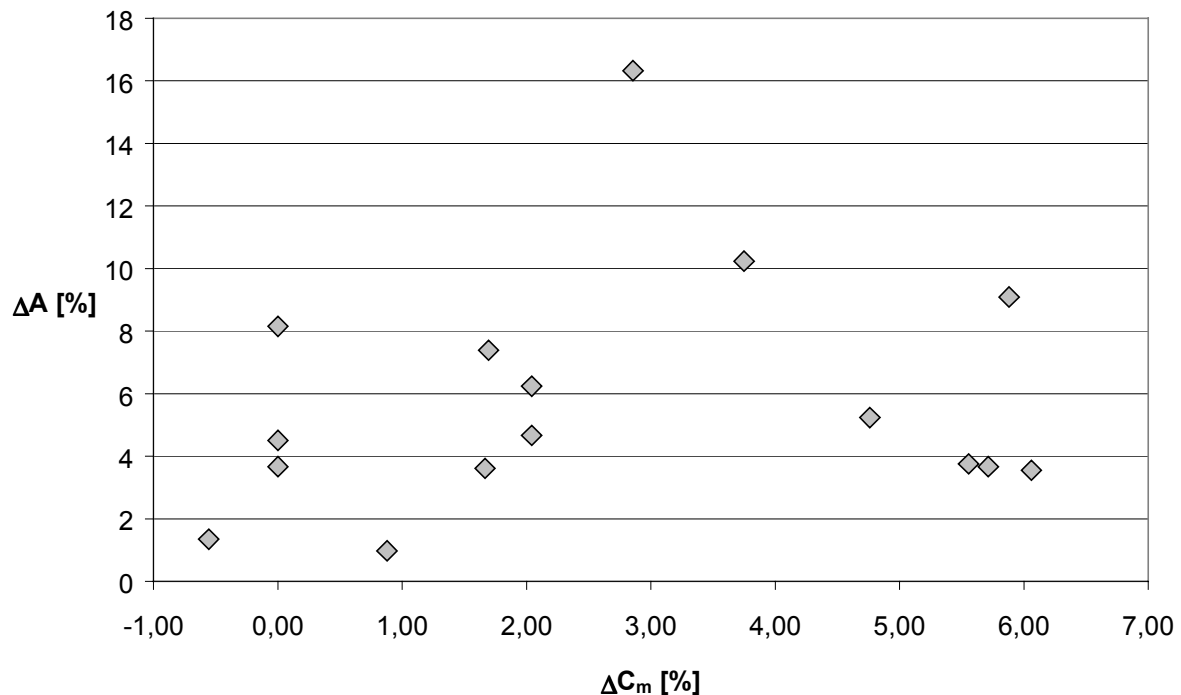


Abbildung 3.2 Änderung der Membrankapazität bei Dehnung der Membran gegenüber dem Oberflächenzuwachs.

Eine Vergrößerung der Membranoberfläche durch Dehnung geht in den meisten Fällen einher mit einem Anstieg der Membrankapazität. In einem Falle ist aber auch eine Abnahme, in drei Fällen eine konstante Kapazität zu verzeichnen. Eine deutliche Korrelation der beiden Meßgrößen zeigt sich nicht.

Ein Abfallen der Kapazität ist nur in einem, eine konstante Kapazität nur in drei Fällen zu verzeichnen. Das der Anschauung so widersprechende Modell der steigenden Membrandicke bei Dehnung der Membran (5) trifft also nicht zu.

Ein deutlicher Anstieg tritt ebenfalls nicht auf. Die Kombination von Verringerung der Membrandicke gemäß der Vorstellung von konstantem Membranzustand und dem Anstieg der elektrisch wirksamen Oberfläche mit dem Zuwachs an Oberfläche (Modell 1), würde Kapazitätsanstiege bedingen, die deutlich über den hier gezeigten liegen würden. Überhaupt läßt sich aus den hier gezeigten Daten allenfalls eine Schwache Korrelation von Änderungen der Membranoberfläche und der Membrankapazität ableiten. Die Membrankapazität ändert sich, bei einer Oberflächenänderung von 6% +/-3.5%, mit 2.7% +/- 2.3% im Mittel nur wenig.

Ein gängiger Parameter zur Beschreibung von Biomembranen ist die relative Dielektrizitätskonstante ϵ_m .

Diese ist definiert anhand von Gleichung (3.1) als $\epsilon_m = \epsilon_0 \epsilon_r / d$ und wird üblicherweise in den Einheiten pFm^{-2} oder fFcm^{-2} angegeben. Abbildung 3.3 zeigt die mittlere Dielektrizitätskonstante für Tonoplastenmembranen aus *Nicotiana Tabacum* Mesophyllzellen.

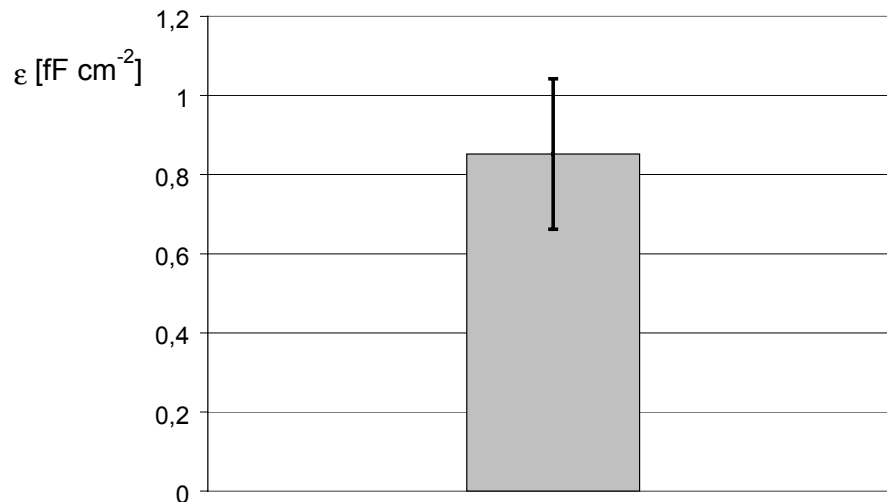


Abbildung 3.3 Mittlere relative Dielektrizitätskonstante von Tonoplastenmembranen.

Der Mittelwert von ϵ_m , wie er aus 17 Messungen ermittelt wurde. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung der Meßwerte an.

Wird die Membran gedehnt, so ändert sich die Dielektrizitätskonstante wenig. Abbildung 3.4 zeigt die Dielektrizitätskonstante im Ruhezustand (ϵ_{start}) gegenüber dem Wert bei maximal gedehnter Membran ($\epsilon_{\text{max.}}$).

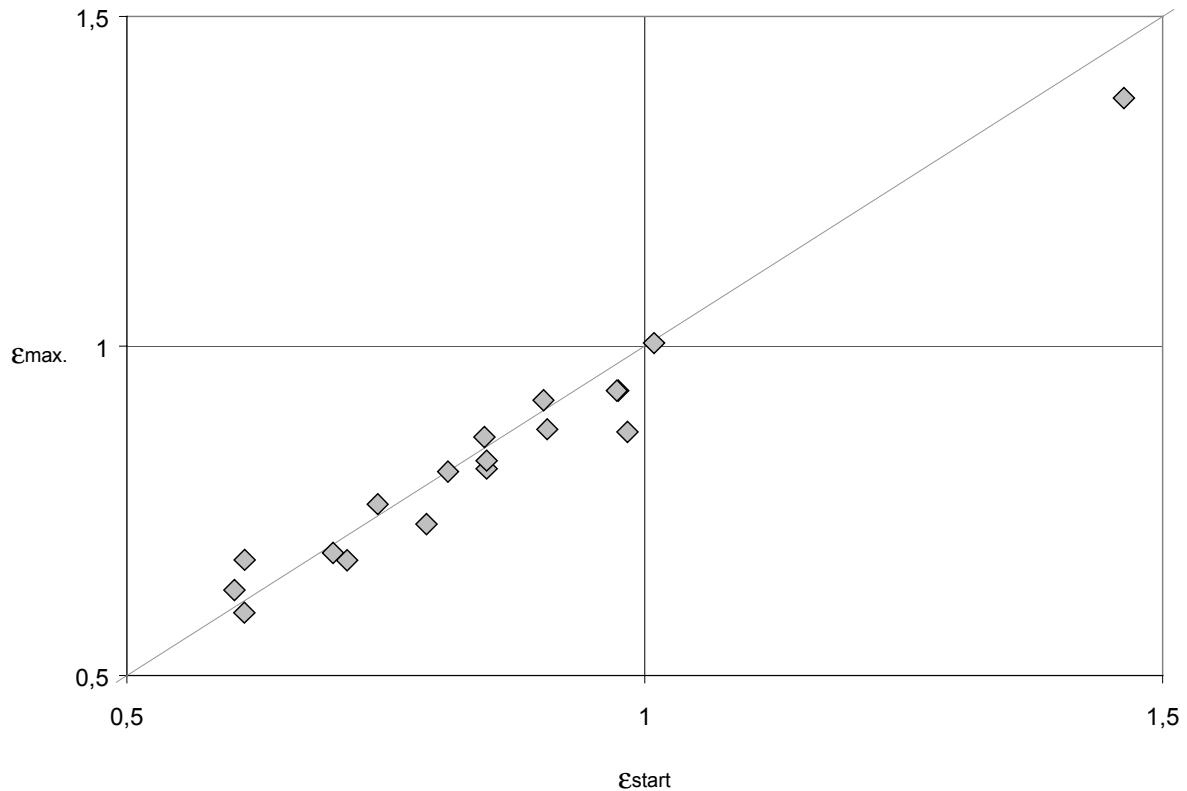


Abbildung 3.4 Änderung der relativen Dielektrizitätskonstante bei Dehnung der Membran

Änderung von ϵ_m bei Dehnung der Tonoplastenmembran. In der Mehrzahl der Experimente ist ein leichter Abfall von ϵ_m zu verzeichnen (Daten unterhalb der Diagonalen). Im Mittel beträgt er 3 %. Es kam bei einigen der Versuche aber auch zu einem geringfügigen Anstieg. Es läßt sich im Rahmen der Meßunsicherheit anhand der gezeigten Daten nicht mit Sicherheit sagen, ob und in welcher Richtung sich ϵ_m gegebenenfalls ändert. So eine Änderung von ϵ_m bei Dehnung der Membran auftritt, wird sie aber weniger als 4% betragen.

In der überwiegenden Zahl der Messungen zeigt sich ein geringfügiger Abfall des Wertes um im Mittel 3%. Es finden sich aber auch Messungen, bei denen ϵ_m mehr oder weniger konstant bleibt, in einigen Fällen sogar leicht ansteigt. Festzuhalten bleibt, daß sich dieser Membranparameter unter Membrandehnung kaum ändert.

Auffällig ist weiterhin der häufig zu verzeichnende transiente Anstieg der Membrankapazität während der Dehnung (Abbildung 3.5).

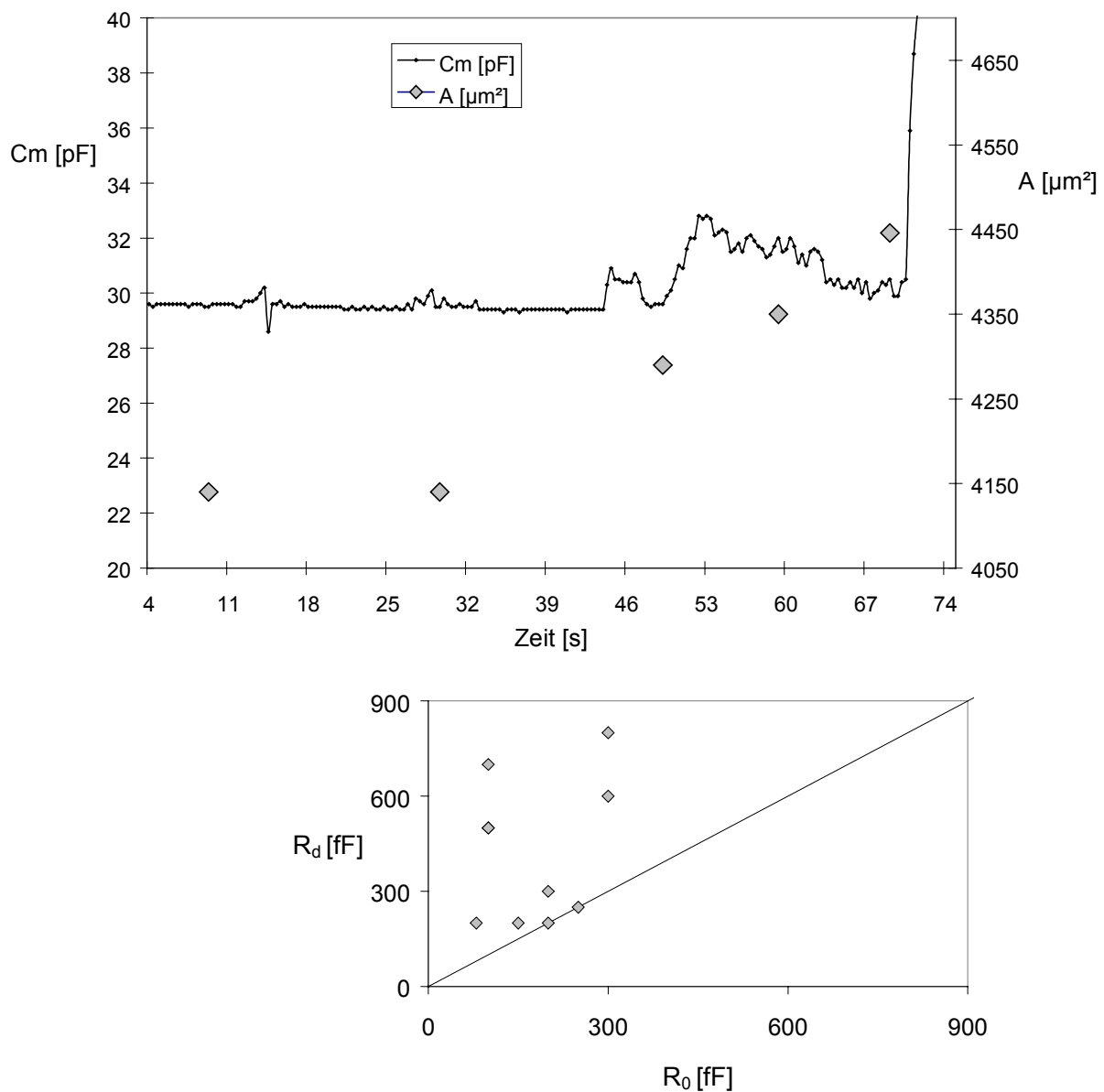


Abbildung 3.5 Transienter Anstieg der Membrankapazität

Wird die Tonoplastenmembran gedehnt, so kommt es in vielen Fällen zu einem vorübergehenden Ansteigen von C_m . Kurz vor dem Zerplatzen des Tonoplasten erreicht die Kapazität wieder nahezu ihren Ausgangswert. Dieser Effekt konnte in 50 % der durchgeführten Messungen beobachtet werden. Das Rauschen nimmt während des vorübergehenden Anstieges der Membrankapazität zu (unteres Bild). Angegeben ist die Breite des Rauschens in fF vor der Dehnung (R_0) und während der Dehnung (R_d) für 9 Messungen.

Dieser Anstieg trat in 50 % der Experimente auf. Das mittlere Rauschen ist während des Anstieges um 80 % höher als während des Ruhezustandes. Der Effekt tritt seltener auf, wenn der Tonoplast mit geringerem Druck gedehnt wird. Vermutlich zeigt sich hier ein Effekt, der einer Umlagerung von Molekülen in der Membran entspricht.

Neben der Charakterisierung des Tonoplasten ergibt sich aus den vorgestellten Ergebnissen ein wichtiges Resümee in Bezug auf die Arbeiten an Mais oder Tabak Protoplasten.

Da die Osmoregulation verglichen mit Exocytose und Endocytose ein langsamer Prozeß ist [Homann & Tester, 1997], wird es bei stimulierter Exocytose an Protoplasten stets auch zu Schwankungen in der Oberflächenspannung der Plasmamembran kommen.

Auch unter diesen Bedingungen der Dehnung oder Stauchung der untersuchten Membran ist die Membrankapazität ein sehr zuverlässiges Maß für die Membranoberfläche als Menge der vorhandenen Lipide und Membranproteine.

3.2 Untersuchung von Meßartefakten

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Verfahren der Oberflächenmessung von Protoplasten mittels Patch-Clamp Technik geht von einer Reihe von Voraussetzungen an die Meßkonfiguration aus. Parameter wie der Sealwiderstand, die Pipettenkapazität oder die Zugriffsleitfähigkeit müssen sich innerhalb bestimmter Bereiche bewegen, um eine zuverlässige Messung zu gewährleisten [Lindau & Neher, 1988, Sigworth et al. 1995a & 1995b].

Um Artefakte, die durch die Nichteinhaltung dieser Voraussetzungen entstehen, verstehen, erkennen und gegebenenfalls korrigieren zu können, war es notwendig, die Berechnung des Wertes der Membrankapazität aus den gemessenen Parametern exakt nachvollziehen zu können.

3.2.1 Elektrische Parameter

Wird eine sinusförmige Spannung über einem idealen Widerstand angelegt, so wird der resultierende Strom bestimmt sein durch das Ohmsche Gesetz:

$$v(t) = V_0 \cos \omega t \quad (3.4)$$

$$i_R(t) = \frac{v(t)}{R} = \frac{1}{R} V_0 \cos \omega t. \quad (3.5)$$

Da der Widerstand ein lineares Schaltelement ist, wird der Strom die selbe Frequenz haben wie die angelegte Spannung. Weiterhin werden Strom und Spannung in Phase sein, das heißt, daß der Nulldurchgang der Spannung zur gleichen Zeit erfolgt, wie der des Stromes. Wird die selbe Spannung über einen Kondensator angelegt, so ergibt sich der Strom zu:

$$i_C(t) = C \frac{d v(t)}{dt} = -\omega C V_0 \sin \omega t. \quad (3.6)$$

Da auch ein idealer Kondensator ein lineares Bauteil ist, wird auch in diesem Falle die Frequenz von Spannung und Strom gleich sein. Anders als beim Widerstand folgt der Strom der Spannung aber mit einer Phasenverschiebung von 90° . Wenn die Spannung ihren Maximalwert erreicht, wird der Strom einen Nulldurchgang haben. Ist die Spannung gleich Null, erreicht der Strom gerade das Maximum.

3.2.2 Komplexe Notation

Zur Vereinfachung bietet sich eine Umschreibung mit Hilfe der Eulerschen Formel an. Es ist:

$$e^{j\omega t} = \cos \omega t + j \sin \omega t, \quad (3.7)$$

mit $j = \sqrt{-1}$.

Damit lassen sich die Spannung und die Ströme über einen Widerstand und einen Kondensator darstellen als Realteile (Re) folgender Ausdrücke:

$$\begin{aligned}
 v(t) &= \operatorname{Re}[V_0 e^{j\omega t}] \\
 i_R(t) &= \operatorname{Re}\left[\left(\frac{1}{R}\right)V_0 e^{j\omega t}\right] \\
 i_C(t) &= \operatorname{Re}[j\omega C V_0 e^{j\omega t}]
 \end{aligned}
 \tag{3.8}$$

Die Ausdrücke in den Klammern werden als komplexe Spannung und Komplexe Ströme bezeichnet. Das Verhältnis der komplexen Spannung durch den komplexen Strom wird Impedanz genannt und mit dem Buchstaben 'Z' bezeichnet. Die Impedanz eines Widerstandes ist einfach:

$$Z_R = R, \tag{3.9}$$

die eines Kondensators:

$$Z_C = \frac{1}{j\omega C}. \tag{3.10}$$

Der imaginäre Term mit dem $1/j$ in der Impedanz des Kondensators gibt die 90° Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung an. Das Fehlen eines imaginären Terms in der Impedanz des Widerstandes entspricht der Phasengleichheit des Bauteils.

Zur Berechnung von Schaltungen eignet sich meistens die Leitfähigkeit besser als die Impedanz. Die komplexe Leitfähigkeit ist der Kehrwert der Impedanz und wird bezeichnet mit dem Buchstaben 'Y'. Die komplexe Leitfähigkeit eines Widerstandes ist:

$$Y_R = \frac{1}{R}. \tag{3.11}$$

Die komplexe Leitfähigkeit eines Kondensators ergibt sich zu:

$$Y_C = j\omega C. \tag{3.12}$$

3.2.3 Ersatzschaltbilder für Patch-Clamp Experimente

Ein Protoplast im Patch-Clamp Experiment in der whole-cell Konfiguration lässt sich durch ein Ersatzschaltbild beschreiben (Abbildung 3.6).

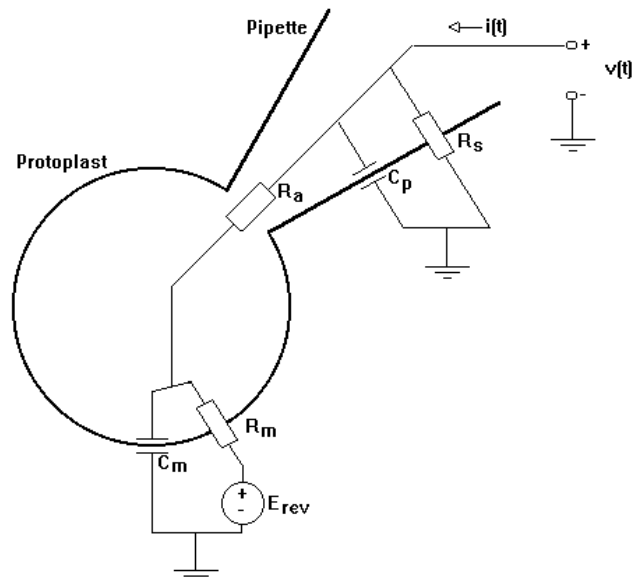


Abbildung 3.6 Ersatzschaltbild für einen Protoplasten in 'Whole-Cell' Konfiguration.

Das Patch Clamp Experiment wird in der 'Whole-Cell' Konfiguration maßgeblich durch die hier gezeigten Parameter bestimmt. Den einzelnen Größen sind die entsprechenden elektrischen Bauteile zugeordnet, mit denen eine Beschreibung der Messung als Vorgang an einem Schaltplan möglich ist.

Die Gesamtleitfähigkeit des Netzwerkes lässt sich dann wie folgt angeben:

$$Y = j\omega C_p + \frac{1}{R_s} + \frac{1}{R_a + \frac{1}{j\omega C_m + \frac{1}{R_m}}} \quad (3.13)$$

Die Oberflächenbestimmung durch Messung der Membrankapazität erfolgt nun unter einer Reihe von Annahmen. Der Sealwiderstand (R_s) ist idealerweise unendlich groß, die Pipettenkapazität (C_p) gleich Null. Unter dieser Annahme fallen die ersten beiden Summanden weg und die Gleichung vereinfacht sich zu:

$$Y = \frac{1}{R_a + \frac{1}{j\omega C_m + \frac{1}{R_m}}} \quad (3.14)$$

oder weiter vereinfacht:

$$Y = \frac{1 + j\omega R_m C_m}{R_a + R_m + j\omega R_a R_m C_m}. \quad (3.15)$$

Das entsprechende, vereinfachte Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.7 gezeigt.

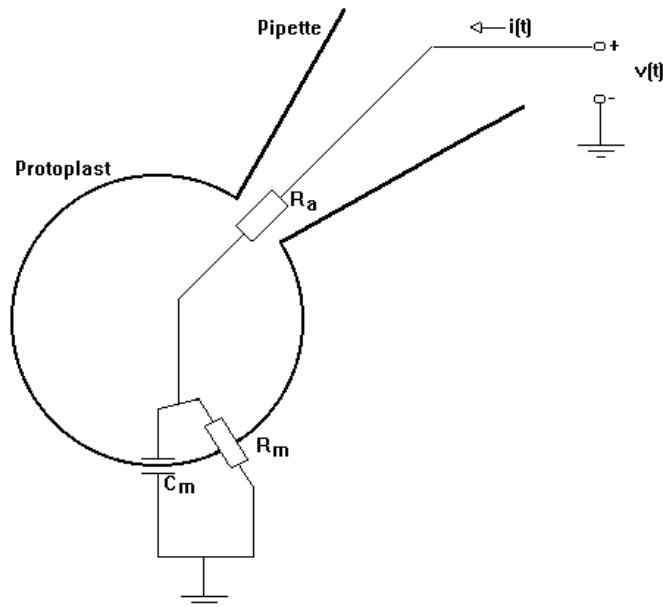


Abbildung 3.7 Vereinfachtes Ersatzschaltbild für einen Protoplasten in 'Whole-Cell' Konfiguration.

Wenn der Sealwiderstand R_s als unendlich groß angenommen werden kann, die Pipettenkapazität C_p vernachlässigbar klein ist und die Membranspannung konstant ist, so kann ein vereinfachtes Schaltbild zur Beschreibung des Experimentes herangezogen werden.

Betrachtet man die Frequenzabhängigkeit der komplexen Leitfähigkeit, so zeigt sich, daß für sehr kleine Frequenzen, der imaginäre Term vernachlässigt werden kann und die Leitfähigkeit von der Serienschaltung der Widerstände R_a und R_m bestimmt wird. Für sehr hohe Anregungsfrequenzen, wird die Leitfähigkeit des Kondensators C_m unendlich groß, so daß der Widerstand R_m kurzgeschlossen ist und die Gesamtleitfähigkeit von R_a bestimmt wird. Für mittlere Frequenzbereiche ist die komplexe Leitfähigkeit Y nahezu proportional zur Kapazität. In diesem Frequenzbereich kann C_m durch Messung der Leitfähigkeit bestimmt werden.

3.2.4 Messung mit sinusförmiger Spannung

Zur Messung wird eine sinusförmige Spannung über die Membran angelegt und der resultierende ebenfalls sinusförmige Strom aufgezeichnet. Der Strom wird in seine reale und seine imaginäre Komponente zerlegt. Der Realteil des Stromes liegt in Phase mit der angelegten Spannung, der Imaginärteil eilt der Spannung um 90° nach. Je nach verwendetem Verstärkertyp wird der Strom unterschiedlich zerlegt. Der in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen meist verwendete EPC-9 analysiert den aufgezeichneten Strom mittels geeigneter Computerprogramme, die im Labor ebenfalls verwendeten Hennigmann-Verstärker (Swam IIC) zerlegen den Strom über elektronische Schaltungen. Unabhängig von der Art der Stromanalyse werden sowohl

Software-Verstärker als auch Hardware-Verstärker dieses Typs als lock-in Verstärker bezeichnet.

Eine komplexe Größe kann stets dargestellt werden in der Form:

$$z = a + jb \quad (3.16)$$

Damit kann die komplexe Leitfähigkeit für das Schaltbild in Abbildung 3.6 geschrieben werden als:

$$Y = a + jb \quad (3.17)$$

mit:

$$a = \frac{R_a + R_m + R_a \omega^2 R_m^2 C_m^2}{(R_a + R_m)^2 + \omega^2 R_a^2 R_m^2 C_m^2}, \quad (3.18)$$

$$b = \frac{(R_a + R_m) \omega R_m C_m - \omega R_a R_m C_m}{(R_a + R_m)^2 + \omega^2 R_a^2 R_m^2 C_m^2}. \quad (3.19)$$

Diese beiden Meßgrößen werden von dem Verstärker aufgezeichnet. Es zeigt sich hier, daß der Realteil nicht nur von 'realen' Bauteilen bestimmt wird, ebensowenig wie der Imaginärteil nur durch die einen imaginären Term enthaltende Kapazität.

Als dritte unabhängige Meßgröße verwenden lock-in Verstärker den Gleichstrom I_{DC} . Dieser wird wie oben beschrieben nur durch die Serienschaltung der beteiligten Widerstände bestimmt und es gilt einfach das Ohmsche Gesetz:

$$I_{DC} = \frac{V_m}{R_a + R_m}. \quad (3.20)$$

Hierbei ist V_m die angelegte Membranspannung. In die Berechnung der gesuchten Größen geht dann der Serienwiderstand $R_a + R_m$ ein als:

$$R_a + R_m = \frac{V_m}{I_{DC}}. \quad (3.21)$$

Aus den drei unabhängigen Meßgrößen können nun durch Auflösen einer Gleichung und jeweiliges Einsetzen in die anderen Gleichungen die drei Parameter R_a , R_m und C_m berechnet werden. Die Gleichungen für die gesuchten Größen ergeben sich nach konzentriertem Rechnen oder Anwendung eines geeigneten Mathematikprogrammes zu:

$$R_a = \frac{a(R_a + R_m) - 1}{(a^2 + b^2)(R_a + R_m) - a}, \quad (3.22)$$

$$R_m = \frac{(a^2 + b^2)(R_a + R_m)^2 - 2a(R_a + R_m) + 1}{(a^2 + b^2)(R_a + R_m) - a}, \quad (3.23)$$

$$C_m = \frac{(a^2 + b^2)^2 (R_a + R_m)^2 - 2(R_a + R_m)b^2 a - 2(R_a + R_m)a^3 + a^2}{\omega(b((a^2 + b^2)(R_a + R_m)^2 - 2a(R_a + R_m) + 1))}. \quad (3.24)$$

Mit diesen Formeln rechnen alle gebräuchlichen lock-in Verstärker.

Nun sind aber in die Berechnung eben dieser Gleichungen Annahmen eingegangen. Annahmen, die gerade bei Patch-Clamp Experimenten an Pflanzenzellen nicht immer zutreffen. Die Meßbedingungen sind nur begrenzt an den für die korrekte Berechnung der gesuchten Größen notwendigen Idealzustand heranzuführen.

3.2.5 Grenzen der vorgenommenen Näherungen

Nachdem sich gezeigt hatte, daß eine weitere Verbesserung der Meßbedingungen, vor allem des Sealwiderstandes und der Zugriffsleitfähigkeit, über einen Status quo hinaus nicht machbar war, blieb die Möglichkeit, im Rahmen einer weitest möglichen Fehleranalyse die Einflüsse verschiedener nicht idealer Parameter zu bestimmen. Da alle beteiligten Parameter in einer so komplexen Art und Weise zusammenwirken, ist es unmöglich den Einfluß einer einzelnen Größe isoliert zu betrachten.

Eine mögliche Fehlerquelle ist der Sealwiderstand, der, ganz unabhängig von der untersuchten Zellspezies, niemals unendlich groß ist. Ein Sealwiderstand in Bereich von mehreren 10 G Ω kann noch guten Gewissens als quasi unendlich approximiert werden. Ein Widerstand von nur einem G Ω eventuell auch noch, einer von 500 M Ω möglicherweise nicht mehr.

Problematisch ist auch die Pipettenkapazität C_p , die zunächst mit null angenommen wurde. Die Pipettenkapazität hängt unter anderem von der Eintauchtiefe der Pipette in das Badmedium ab. Ändert sich diese im Verlauf des Experimentes durch Schwankungen der Badtiefe bei Messungen mit Baddurchfluß, oder im Verlaufe längerer Messungen durch Verdunstung aus dem Bad, so wird auch die Pipettenkapazität größer oder kleiner.

Weiterhin ist die Annahme, daß V_m zum einen die tatsächlich anliegende Membranspannung und zum zweiten konstant sei, nicht unbedingt richtig. Gerade bei Experimenten, bei denen V_m möglicherweise nicht konstant ist, wie eben beim Einbau von zusätzlicher Membran durch Exocytose, können Leitfähigkeiten infolge der Oberflächenspannung aktivieren oder deaktivieren. Tatsächlich liegt über der Membran eine Spannung von $V_m - E_{rev}$ an, wobei E_{rev} das Umkehrpotential der jeweils aktiven Leitfähigkeiten ist.

Diese drei Parameter haben Einfluß auf alle drei zu bestimmenden Meßgrößen, werden bei der Berechnung derselben jedoch vernachlässigt.

Weiterhin geht der Parameter R_a in die Berechnung von R_m ein, beide zusammen in die Berechnung von C_m . Fehler in der Bestimmung der beiden Widerstände werden sich also in der Membrankapazität niederschlagen. Auch starke Schwankungen der Werte können möglicherweise Änderungen in C_m hervorrufen, die tatsächlich gar nicht stattfinden. Das Zusammenwirken der Parameter ist zu komplex, als das der Einfluß einer Meßgröße einzeln betrachtet werden könnte.

3.2.6 Messung mit sinusförmiger Spannung unter realen Bedingungen

Um einschätzen zu können, in welchem Maße die gewonnenen Ergebnisse von den Meßbedingungen verfälscht wurden, war es also notwendig die Berechnungen, die die verwendeten Patch-Clamp Verstärker zur Gewinnung der Meßgrößen durchführen, mit den tatsächlich vorliegenden Parametern durchzuführen.

Gemäß dem Ersatzschaltbild in Abbildung 3.6 ist die Gesamtleitfähigkeit gegeben durch:

$$Y = j\omega C_p + \frac{1}{R_s} + \frac{1}{R_a + \frac{1}{j\omega C_m + \frac{1}{R_m}}} \quad (3.25)$$

Diese Gleichung läßt sich vereinfachen zu:

$$Y = \frac{-(\omega^2 C_p R_s R_a R_m C_m - j\omega C_p R_s R_a - j\omega C_p R_s R_m - j\omega R_a R_m C_m - j\omega R_s R_m C_m - R_s - R_a - R_m)}{R_s (j\omega R_a R_m C_m + R_a + R_m)} \quad (3.26)$$

und wie oben gezeigt als:

$$Y = a + jb, \quad (3.27)$$

in Realteil und Imaginärteil zerlegen;

mit:

$$a = \frac{R_a^2 + 2R_a R_m + R_m^2 + R_s R_a + R_s R_m + \omega^2 R_a^2 R_m^2 C_m^2 + \omega^2 R_s R_a R_m^2 C_m^2}{R_s (R_a^2 + 2R_a R_m + R_m^2 + \omega^2 R_a^2 R_m^2 C_m^2)} \quad (3.28)$$

und:

$$b = \omega \frac{C_p R_a^2 + 2C_p R_a R_m + C_p R_m^2 + R_m^2 C_m + \omega^2 C_p R_a^2 R_m^2 C_m^2}{R_a^2 + 2R_a R_m + R_m^2 + \omega^2 R_a^2 R_m^2 C_m^2} \quad (3.29)$$

Damit hat man Real- und Imaginärteil der Leitfähigkeit dargestellt, wie sie tatsächlich unter nichtidealen Bedingungen in die Berechnungen der Meßgrößen eingehen. Auch die dritte verwendete Größe stellt sich ein wenig komplizierter dar, wenn alle beteiligten Parameter betrachtet werden. Der Gleichstrom unter steady state Bedingungen ist:

$$I_{DC} = \frac{(V_m - E_{rev.})(R_s + R_a + R_m)}{R_s R_a + R_s R_m} \quad (3.30)$$

Der aus der Membranspannung und dem Gleichstrom bestimmte Widerstand ist also tatsächlich nicht einfach die Serienschaltung der beiden Widerstände R_a und R_m sondern die Serienschaltung der beiden parallel mit dem Sealwiderstand R_s . In den Realteil des Stromes geht zusätzlich der Sealwiderstand ein, im Imaginärteil steht zusätzlich die Pipettenkapazität.

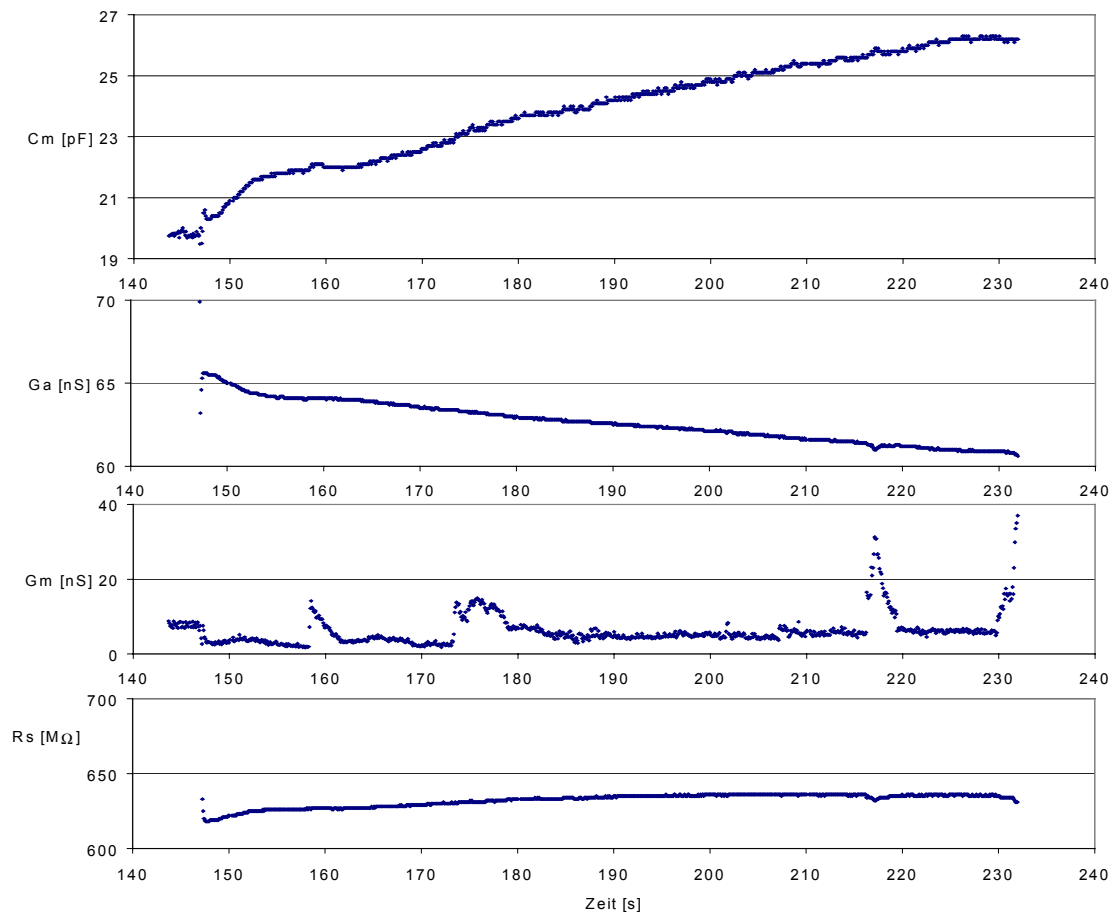
Diese drei Größen a , b und I_{DC} sind also die tatsächlich von der Meßapparatur aufgenommenen Werte. Diese gehen dann als Rechengrößen in die Gleichungen zur Berechnung von R_a , R_m und C_m ein (3.22, 3.23 & 3.24). Setzt man die Formeln für a , b

und I_{DC} (3.28, 3.29, 3.30) in die Gleichungen für die gesuchten Meßwerte ein, so erhält man Formeln, die die tatsächlich vorgenommenen Berechnungen sehr gut beschreiben. Diese Formeln sind hier nicht in sinnvoller Weise zu Papier zu bringen sondern finden sich separat im Anhang (Kapitel 7). Die Formel für die Membrankapazität erstreckt sich in Zehnpunkt Schrift über etwa dreieinhalb Meter. Der Umfang der entstehenden Gleichungen macht dann auch deutlich, warum Clamp Verstärker mit den genäherten Formeln rechnen müssen. Patch-Clamp Verstärker können im ms-Bereich abtasten. Das heißt, daß in jedem Zeitintervall die Berechnungen für alle drei Meßwerte einmal durchgeführt werden müssen. Das ist nur möglich mit Formeln von einer begrenzten Länge.

3.2.7 Datenanalyse

Mit den Formeln, die hier hergeleitet wurden, konnten Daten analysiert werden, die sonst für eine Untersuchung kaum geeignet gewesen wären. Im Vorgriff auf die Vorstellung der Ergebnisse, die an Tabak Mesophyll Protoplasten gefunden wurden, sei hier ein Datensatz gezeigt:

Abbildung 3.8 Messung an einem Tabak Mesophyll Protoplasten



Ein Protoplast aus dem Mesophyll von Tabak wird mit Pipettenlösung mit $3.6 \mu\text{Mol}$ freiem Ca^{2+} perfundiert. Infolge des Anstieges in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ fusionieren Vesikel mit der Plasmamembran und es ist ein Anstieg der Membrankapazität zu verzeichnen.

Der Sealwiderstand betrug ursprünglich $1.1 \text{ G}\Omega$, die Zugriffsleitfähigkeit 130 nS . Kurz nach dem Einbrechen in die 'Whole Cell' Konfiguration ($t = 147$) verschlechtern sich beide Werte sprunghaft. Der Sealwiderstand stabilisiert sich dann auf niedrigem Niveau, während die Zugriffsleitfähigkeit langsam weiter abfällt.

Betrachtet man den Verlauf der Membrankapazität, so zeigt sich kurz nach dem Einbrechen in die 'Whole Cell' Konfiguration ein rascher Anstieg bis zu einem Plateauwert, der von einer zweiten langsameren Phase der Exocytose gefolgt wird. Die Daten sind nicht ausgesucht schlecht, aber der Sealwiderstand liegt weit unter einem $G\Omega$ und die Zugriffsleitfähigkeit mit unter 70 nS eigentlich zu gering. Problematisch ist aber vor allem, daß die Zugriffsleitfähigkeit nicht konstant ist, sondern langsam auf etwa 60 nS absinkt.

Berechnet man die Fehler, die sich aus der unzureichenden Erfüllung der Voraussetzungen ergeben, und subtrahiert diese von den gemessenen Daten, so ergeben sich einige leichte Änderungen gegenüber der Ursprungsmessung. Abbildung 3.9 zeigt die Kapazitätsspur, wie sie sich nach der Bereinigung von Meßartefakten darstellt.

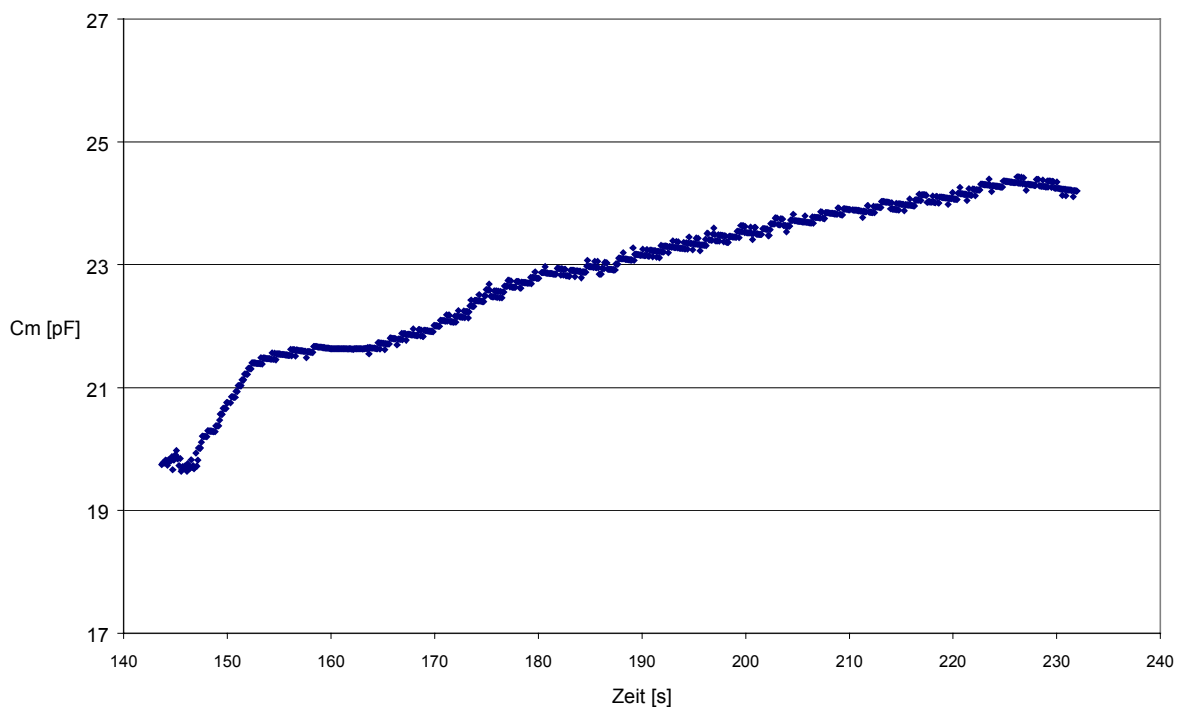


Abbildung 3.9 Von Artefakten bereinigte Messung der Membrankapazität.

Die Analyse der Meßdaten wie sie in Abbildung 3.8 gezeigt wurden mit den im vorliegenden Kapitel erläuterten Formeln ergab einige Korrekturen an der gemessenen Kapazitätsspur. Die Amplitude des exocytotischen Ereignisses ist tatsächlich geringer, als in den ursprünglichen Daten. Weiterhin sind einige Schwankungen der Membrankapazität verschwunden, die mit kurzzeitigen Sprüngen in der Membranleitfähigkeit zusammenhingen ($t = 159$, $t = 217$).

Die gerade auch in Bezug auf die vorliegende Arbeit wichtigste Korrektur ist die der Amplitude des exocytotischen Ereignisses. Anders als in den Ursprungsdaten gezeigt, liegt die Ausgangskapazität nicht bei 20.0 pF sondern bei nur etwa 19.6 pF. Dieser Offset kommt durch das Zusammenwirken von Sealwiderstand und Zugriffsleitfähigkeit in der Bestimmung von C_m zustande. Da die Zugriffsleitfähigkeit über die Messung nicht konstant ist, nimmt die Abweichung von den tatsächlichen Werten gegen Ende der Messung noch zu. Der tatsächliche Anstieg beträgt nur 4.9 pF, während die unkorrigierte Messung einen Anstieg von 6.3 pF zeigt.

Viele der in Kapitel 3.4 vorgestellten Meßdaten mußten in der hier gezeigten Art und Weise analysiert werden, um trotz oft geringer Sealwiderstände und Zugriffsleitfähigkeiten, sichere Aussagen über den tatsächlichen Verlauf der Membrankapazität machen zu können.

3.3 Konstitutive Exocytose in Mais Koleoptilzellen

Um einer Grundlage schaffen zu können für die geplanten Versuche am Tabaksystem, wurden zunächst Messungen an Mais Koleoptilzellen durchgeführt. Es war aus Vorarbeiten bekannt, daß diese Zellen eine hohe sekretorische Aktivität zeigen und es gab bereits ein Protokoll zur Isolation von Protoplasten aus den Koleoptilen [Thiel et al., 1994].

3.3.1 Charakterisierung der Exocytose in Koleoptilzellen

Ein Protoplast wurde über die Pipettenlösung mit Kalzium beladen welches an DM-Nitrophen gebunden war. Mittels Freisetzung von Ca^{2+} aus einem sogenannten 'cage' war es möglich ein exocytotisches Ereignis auszulösen. Abbildung 3.1o zeigt die maßgeblichen Daten, die im Rahmen solch eines Experimentes gewonnen wurden.

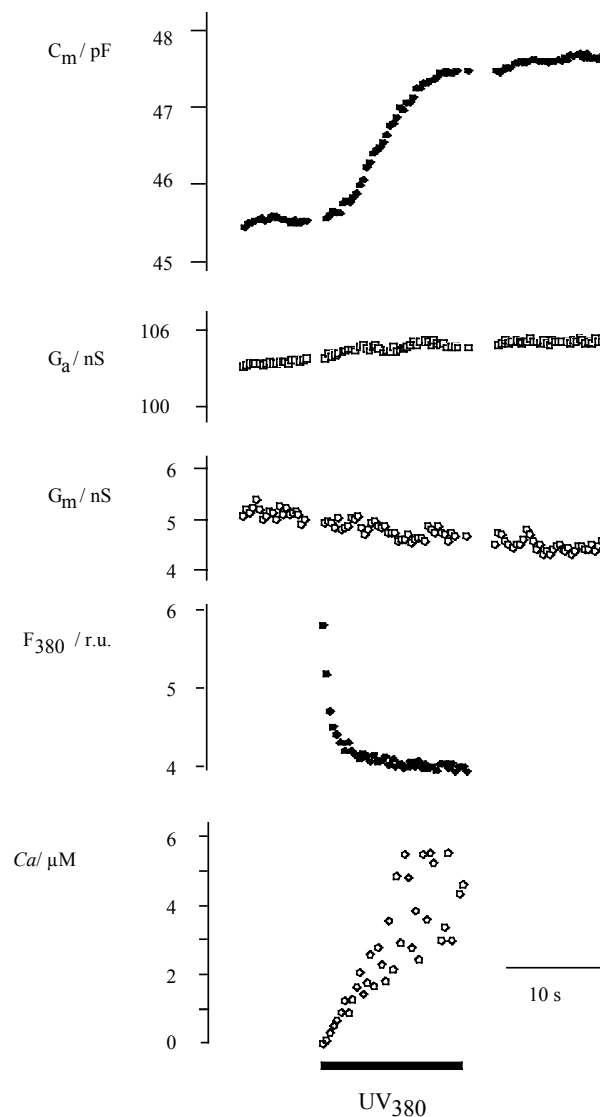


Abbildung 3.1o Ein Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ bewirkt ein Anwachsen der Membrankapazität.

Wird Ca^{2+} durch Bestrahlung mit UV-Licht (Balken) aus dem 'cage' entlassen, so kann ein Anstieg der Membrankapazität verzeichnet werden. Die Konzentration von Ca^{2+} wird mittels fluoreszenzoptischer Messungen bestimmt. Gezeigt ist die Fluoreszenz bei 380 nm. Die Zugriffsleitfähigkeit G_a und die Membranleitfähigkeit G_m bleiben von dem Anstieg in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ und in C_m unbeeinflusst.

Auf eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ durch Freisetzung von Ca^{2+} aus dem 'cage' hin, erfolgte stets ein Anstieg der Membrankapazität C_m . Weder bei der Zugriffsleitfähigkeit G_a , noch bei der Membranleitfähigkeit G_m fanden sich charakteristische Änderungen. Im hier gezeigten Beispiel steigt G_a während der Messung langsam an. Der Anstieg ist aber sehr gering und innerhalb eines Bereiches, in dem er für die Bestimmung der Meßgrößen irrelevant ist (Kapitel 3.2). Zur Auswertung verwendet wurden Messungen an Mais Zellen nur wenn G_a größer als 100 nS war. Im hier gezeigten Beispiel fällt G_m leicht ab. Um zu untersuchen, inwieweit die Parameter C_m und G_m tatsächlich unabhängig voneinander waren, wurden die Änderungen ΔC_m und ΔG_m gegeneinander aufgetragen. Der Plot in Abbildung 3.11 macht deutlich, daß es keine Korrelation der beiden Größen gibt. Daß es während eines exocytotischen Ereignisses, während des Einbaues zusätzlicher Membran also zu einer Abnahme von G_m kommt, ist zunächst überraschend. Tatsächlich sind aber Erklärungen möglich. Vorstellbar wäre zum Beispiel eine Deaktivierung von Kanälen infolge der Änderung der Oberflächenspannung des Plasmalemma bei der Exocytose.

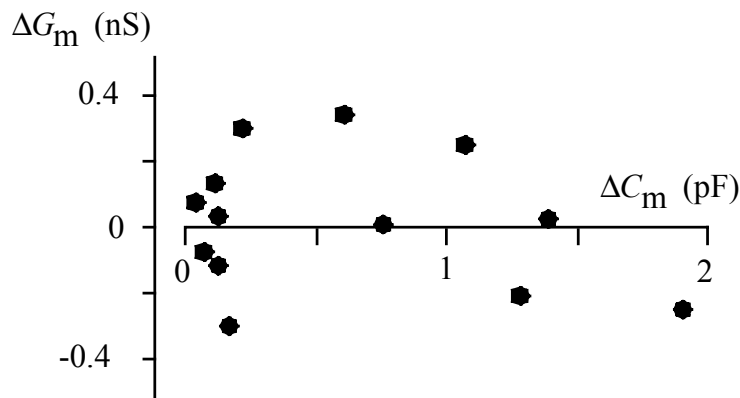


Abbildung 3.11 Eine Änderung der Membrankapazität ist nicht korreliert mit einer spezifischen Änderung der Leitfähigkeit.

Der Plot von ΔC_m und ΔG_m zeigt, daß der Einbau von Membran während der Exocytose nicht zu einer charakteristischen Änderung in der Leitfähigkeit führt.

Damit ist festgestellt, daß die im Rahmen eines Ca^{2+} -stimulierten exocytotischen Ereignisses eingebaute Membran nicht über eine ausgewählte Art oder Anzahl von Membrantransportern verfügt.

3.3.2 Wiederholte Stimulation exocytotischer Ereignisse

Wird nach einer vorangegangenen Stimulation mit Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ erneut erhöht, indem UV-Licht appliziert wird, so löst dies ein weiteres exocytotisches Ereignis aus. Es zeigte sich aber daß die Amplitude des zweiten Ereignisses eine Funktion der Wartezeit zwischen den Stimuli war.

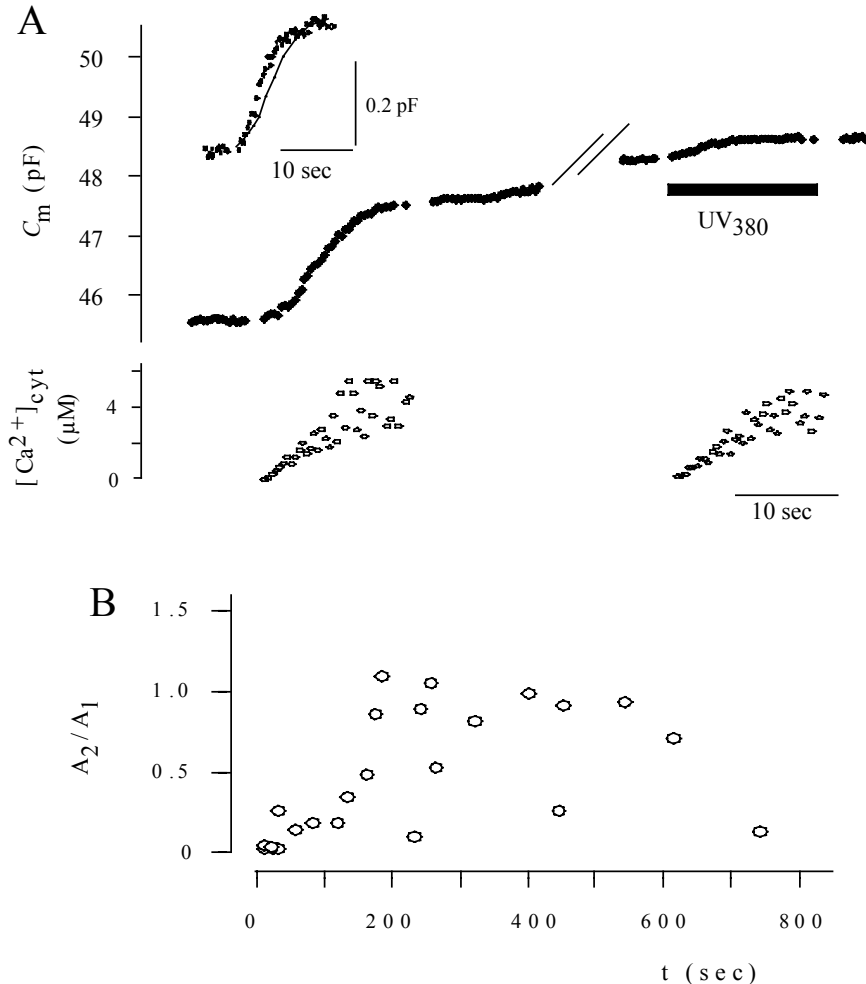


Abbildung 3.12 Wiederholte Stimulation exocytotischer Ereignisse.

A In einem Protoplasten wurde durch einen Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ein exocytotisches Ereignis stimuliert. Nach einer Wartezeit von 155 s wurde mittels UV-Licht (Balken) erneut Ca^{2+} freigesetzt und es wurde erneut Exocytose stimuliert. Die Amplitude des zweiten Anstieges ist geringer. Im Einschub links oben sind die beiden exocytotischen Ereignisse übereinandergelegt dargestellt. Um die Kinetiken vergleichen zu können, ist die Amplitude des zweiten Anstieges auf die erste normiert worden. Die Kinetik des Membraneinbaus ist gleich.

B Das Verhältnis der Amplituden in Abhängigkeit von der Zeit zwischen den Ereignissen. Die Amplitude eines zweiten exocytotischen Ereignisses ist eine Funktion der Wartezeit zwischen zwei Stimuli. Nach einer Wartezeit von etwa 300 s erreicht ein exocytotisches Ereignis die Amplitude des vorhergehenden Ereignisses.

Die Kinetik der Kapazitätsantwort hingegen änderte sich nicht bei wiederholter Stimulation. Dies ist ein Hinweis darauf, daß es keine Änderung des exocytotischen Mechanismus gibt, sondern die Menge an exocytotischen Vesikeln für die Erschöpfung des Prozesses verantwortlich ist.

Festzuhalten bleibt: Es gibt keine Totzeit, das heißt das System ist sofort nach einem Ereignis wieder mit Ca^{2+} stimulierbar. Die Amplitude des Ereignisses ist aber eine Funktion der Wartezeit zwischen zwei Stimuli.

3.3.3 Das exocytotische Ereignis zeigt zwei deutlich verschiedene Phasen

Betrachtet man den Verlauf der Membrankapazität in Abbildung 3.10 so fällt auf, daß es zwei deutlich unterscheidbare Phasen der Exocytose gibt. Zunächst einen schnellen Anstieg, der dann von einem langsameren Einbau weiterer Membran in das Plasmalemma gefolgt wird. Diese Zweiphasigkeit des Membraneinbaus war ein Charakteristikum aller untersuchten exocytotischen Ereignisse. Stets folgte auf eine Phase schnelle Exocytose eine zweite langsamere Phase. Während die erste Phase bei allen untersuchten Protoplasten im Wesentlichen gleich verlief, war die zweite Phase von Protoplast zu Protoplast verschieden. In einigen Fällen folgte ein langsamerer Anstieg der Kapazität, in anderen verharrte die Kapazität auf einem konstanten Niveau oder fiel auch langsam wieder ab. Abbildung 3.13 zeigt exocytotische Ereignisse, wobei die Amplituden auf Datenpunkt 5 s nach Einschalten des UV-Lichtes normiert sind.

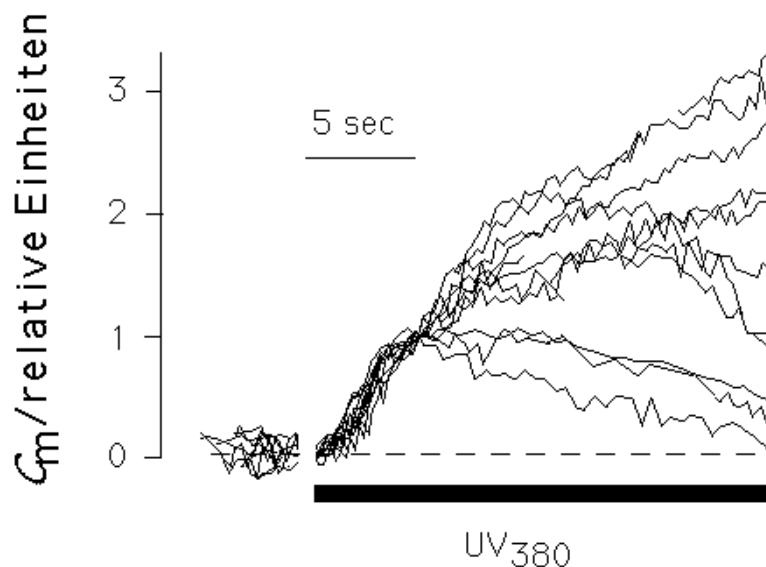


Abbildung 3.13 Die Ca^{2+} -stimulierte Exocytose zeigt eine deutliche Zweiphasigkeit.

Eine Schar exocytotischer Ereignisse, wobei die einzelnen Datenreihen auf eine gemeinsame Amplitude der ersten schnellen Phase des Membraneinbaus normiert sind. Alle gemessenen Kurven zeigen eine erste schnelle Phase der Exocytose, die von einer zweiten, variableren Phase gefolgt ist. In einigen Fällen folgt ein langsamerer weiterer Anstieg der Kapazität, in anderen ein langsamer Abfall zurück in Richtung der Ausgangskapazität.

Diese zwei unterschiedlichen Phasen deuten auf das Vorhandensein zweier Populationen von exocytotischen Vesikeln hin.

3.3.4 Amplitude des exocytotischen Ereignisses

In der Mehrzahl der Messungen erreichte die Membrankapazität einen Spitzenwert und fiel dann langsam wieder in Richtung auf die Ausgangskapazität hin ab. Abbildung 3.14 zeigt, den Zusammenhang zwischen der Amplitude des Kapazitätsanstieges und der Kapazität zu Beginn des Stimulus.

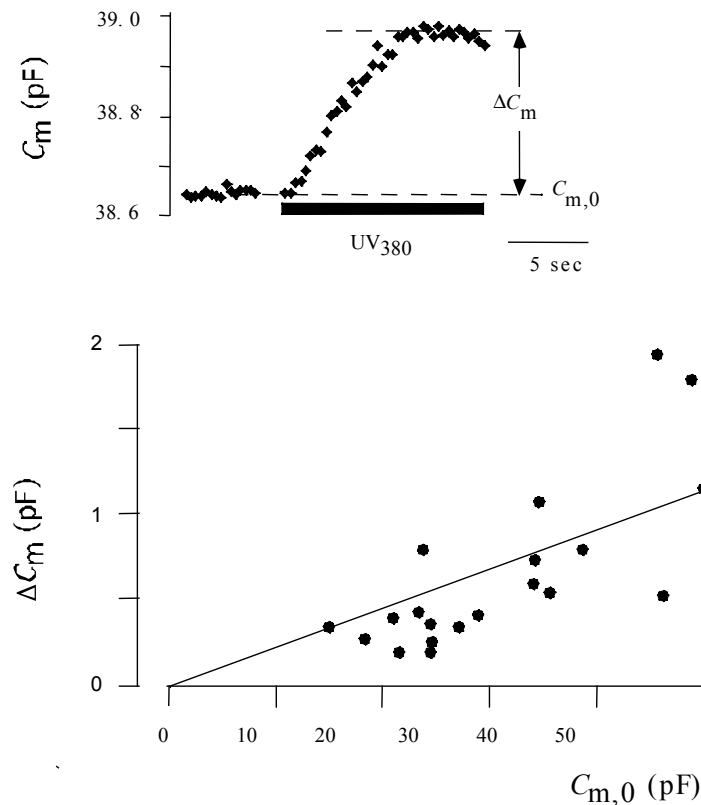


Abbildung 3.14 Amplitude des exocytotischen Ereignisses als Funktion der Ausgangskapazität

In allen Datensätzen, in denen der kapazitive Anstieg einen eindeutigen Gipfel aufwies, wurde die Amplitude ΔC_m bestimmt (obere Abbildung) und gegen die Ausgangskapazität $C_{m,0}$ aufgetragen. Ein Fit der Daten mit einer Geraden ergab einen Mittelwert von 2.5 %.

Es wurde jeweils der Kapazitätsanstieg zwischen dem Gipfel des exocytotischen Ereignisses und dem Ausgangswert gemessen und ins Verhältnis zur Ausgangskapazität gesetzt. Dieser relative Kapazitätsanstieg gibt ein Maß für die Menge an Membran, die auf einen Ca^{2+} -Stimulus hin für die Exocytose zur Verfügung steht. Im Mittel können 2.5 % der Plasmamembranfläche zusätzlich eingebaut werden.

3.3.5 Modell für die Ca^{2+} -stimulierte Exocytose

Die Meßergebnisse aus den Koeptizellen stellten die Grundlage dar für die Entwicklung eines Modells welches konstitutive Exocytose beschreiben sollte. Ausgehend von den Charakteristika der gemessenen Kurven ergaben sich mehrere Punkte, denen ein Modell gerecht werden mußte.

Ein Modell, das die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ -stimulierte Exocytose hinreichend gut beschreiben soll, muß mehrere Phänomene erklären können:

- Während einer Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ kommt es zu einem sigmoidalen Anstieg der Membrankapazität (Abbildung 3.10).
- Die Membrankapazität ist stets durch Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ zu beeinflussen. Die Amplitude des exocytotischen Ereignisses ist aber eine Funktion der Wartezeit nach einem vorangegangenen Stimulus (Abbildung 3.12).
- Nach einem exocytotischen Anstieg der Membrankapazität kann diese entweder wieder absinken, auf einem konstanten Niveau verharren oder (langsamer) weiter ansteigen (Abbildung 3.13).

Heinemann und Mitarbeitern war es 1998 gelungen ein gutes Modell zur Beschreibung von Exocytose zu erstellen [Heinemann et al., 1993]. Das Modell in der Form, die Heinemann verwendete, ist in Abbildung 3.15 zu sehen.

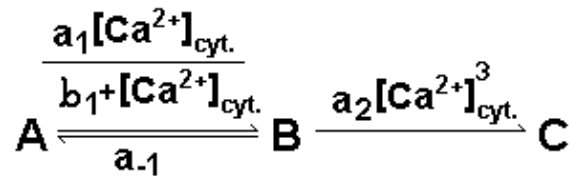


Abbildung 3.15 Modell zur regulierten Exocytose.

Mit diesem Modell konnten Heinemann und Mitarbeiter [1993] erfolgreich Ca^{2+} -abhängige regulierte Exocytose in Chromaffinzellen beschreiben. Aus einem Speicherpool A werden Vesikel in einem Schritt, dessen Ca^{2+} -Abhängigkeit durch eine Michaelis-Menten Kinetik beschrieben werden kann, in einen Pool B überführt. Von diesem führt ein Schritt, bei dem drei Ca^{2+} -Ionen kooperativ zusammenwirken in die Exocytose C. Vom Pool B ist ein Rücktransport in den Pool A möglich. Dieser zeigt keinerlei Ca^{2+} -Abhängigkeit.

Es besteht im wesentlichen aus zwei Pools von Vesikeln, die im Folgenden mit A und B bezeichnet werden und in Serie hintereinander geschaltet sind. Vom Pool B führt ein Reaktionsschritt zur Exocytose. Die Membran, die exocytiert wird, wird hier als Pool C bezeichnet. Die Vesikel werden zwischen den Pools A und B mit den Ratenkonstanten k_1 (von A nach B) und k_{-1} (Gegenrichtung) hin und her transportiert. In die Exocytose führt die Ratenkonstante k_2 .

Das von Heinemann verwendete Meßverfahren war dem von mir an den Mais Protoplasten benutzten sehr ähnlich und die Ergebnisse zeigten in einigen charakteristischen Details Übereinstimmungen. Es lag daher nahe zu versuchen, das Heinemann-Modell auch zur Beschreibung der Sekretion von Koleoptilzellen zu verwenden. Die Übertragung des Modells auf die vorliegenden Messungen war aber vor allem deshalb nicht ganz einfach, da Heinemann und Mitarbeiter bei der Erstellung ihres Modells regulierte Exocytose beschrieben, während es sich bei den hier gezeigten Phänomenen um konstitutive Exocytose handelte. Daraus ergaben sich eine Reihe deutlicher Unterschiede zu den zu untersuchenden Messungen.

Der Schritt k_1 vom Pool A in den Pool B wurde von Heinemann und Mitarbeitern mit einer Michaelis-Menten Kinetik beschrieben. Damit sollte der Überlegung Rechnung getragen werden, daß auf einen Stimulus hin aus einem als nicht zu erschöpfend angesehenen Reservoir an sekretorischen Vesikeln ein der Stärke des Reizes entsprechender Anteil an Vesikeln ausgeschüttet wird. Wie auch im Bereich der Beschreibung von Transport durch Membrankanäle zeigte sich der recht universell einsetzbare Charakter von enzymkinetischen Modellen. Die Annahme eines nicht zu erschöpfenden Speichers an Vesikeln widerspräche aber dem Konzept von konstitutiver Exocytose, wo ja gerade davon ausgegangen wird, daß sich keine Vesikel innerhalb des Transportweges aufstauen. Der Schritt von A nach B wurde daher für die Mais Koleoptilzellen durch eine Ratenkonstante multipliziert mit einer Funktion der Kalziumkonzentration beschrieben.

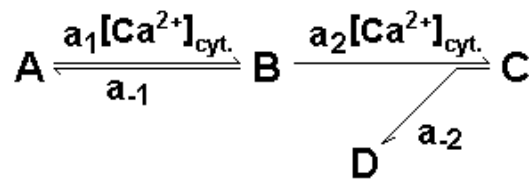


Abbildung 3.16 Modell für die Ca^{2+} -stimulierte konstitutive Exocytose in Mais Koleoptilzellen.

Die Vesikel werden zwischen zwei in Serie liegenden Pools A und B hin und her transportiert. Der Weitertransport von Pool B führt in die Exocytose C. Beide Schritte in Richtung der Exocytose sind in linearer Weise von Ca^{2+} abhängig. Von Pool B ist ein Ca^{2+} -unabhängiger Rückschritt in den Pool A möglich. Ein endocytotischer Schritt entfernt Membran aus dem Plasmalemma

Bei den Experimenten an den Mais Koleoptilzellen zeigte sich des Öfteren ein Abfallen der Membrankapazität nach einem durch den Stimulus ausgelösten exocytotischen Ereignis. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß innerhalb des betrachteten Zeitraumes bereits Endocytose wirksam ist. Daher mußte ein Reaktionsschritt k_2 von Pool C mit berücksichtigt werden. Im Experiment an den Maiszellen konnte gezeigt werden, daß der Reaktionsschritt k_2 nicht zurück nach B führt, sondern in einen eigenen Pool endocytierter Vesikel, der als Pool D bezeichnet wird. Starke endocytotische Aktivität hätte sonst wiederum zu einer verstärkten Exocytose aus dem Pool B geführt, so daß sich ein Fließgleichgewicht zwischen dem exocytotischen und dem endocytotischen Schritt hätte einstellen müssen. Im Experiment hätte dies dazu geführt, das ein Gleichgewichtszustand erreicht worden wäre, ein Abfallen der Membrankapazität entsprechend einem Überwiegen der Endocytose hätte nicht stattfinden können. Es bleibt also fest zu halten, daß die endocytierten Vesikel nicht sofort wieder zur Exocytose zur Verfügung stehen.

Insgesamt stellt der deutliche Einfluß der Endocytose einen beträchtlichen Unterschied zu den von Heinemann und Mitarbeitern untersuchten Vorgängen dar [Heinemann et al., 1993 & 1994]. Hierfür können zwei verschiedene Gründe in Betracht gezogen werden. Zum einen ist die Exocytose in den Chromaffinzellen ein sehr schneller Prozeß, so daß möglicherweise endocytotische Prozesse erst deutlich nach einem exocytotischen Ereignis starten, während die Exocytose in den Mais Koleoptilzellen etwas langsamer abläuft, so daß die Endocytose schon innerhalb des betrachteten Zeitrahmens beginnt.

Betrachtet man aber die Grundidee zur konstitutiven Exocytose, so kommt vor allem die Möglichkeit in Betracht, daß ein endocytotischer Prozeß in den Maiszellen nicht erst stimuliert werden muß, da die Zelle ja aus einem Zustand des Fließgleichgewichtes zwischen Exocytose und Endocytose heraus angeregt wird. Wird einer der beiden Prozesse kurzzeitig stimuliert, so wird in dem System nach der Auslenkung aus dem Ruhezustand der andere Prozeß überwiegen, bis der Ruhezustand wieder erreicht ist. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß die Endocytose nach einem exocytotischen Ereignis solange dominierte, bis die Membrankapazität erreicht wurde, die zu Beginn des Experimentes gemessen wurde. Ein Beispiel für diese Beobachtung ist in Abbildung 3.18 gezeigt.

Sowohl Heinemann an Chromaffinzellen als auch Thiel an Koleoptilzellen fanden eine Zweiphasigkeit im Anstieg der Membrankapazität [Heinemann et al., 1993, Thiel et al., 1994]. In beiden Fällen konnte daher geschlossen werden, daß die

Ratenkonstante k_1 kleiner als k_2 sein muß. Das heißt, Pool B wird in der Regel schneller exocytisiert, als er von A aus nachgefüllt werden kann.

3.3.6 Differentialgleichungen

Mit diesen Vorgaben an ein Modell zur Beschreibung von konstitutiver Exocytose in Mais Koleoptilzellen ergaben sich die Differentialgleichungen für die Vesikelpools sowie die Ratenkonstanten wie folgt:

$$\frac{dA}{dt} = k_0E + k_{-1}B - k_1A, \quad (3.31)$$

$$\frac{dB}{dt} = k_1A - (k_{-1} + k_2)B, \quad (3.32)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_2B - k_{-2}C, \quad (3.33)$$

mit den Ratenkonstanten:

$$\begin{aligned} k_0 &= a_0 \\ k_1 &= a_1 [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}} \\ k_{-1} &= a_{-1} \\ k_2 &= a_2 [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}} \\ k_{-2} &= a_{-2}, \end{aligned} \quad (3.34)$$

wobei die a_i Konstanten sind. E gibt die gesamte unterhalb des Golgi Apparates und oberhalb von Pool A verfügbare Vesikelmenge an.

Es zeigte sich an den gemessenen Daten, daß die Ratenkonstante k_0 offenbar um mehrere Größenordnungen kleiner ist als die anderen beteiligten Ratenkonstanten (Abbildung 3.12 B). Auch wenn das Membranreservoir oberhalb von Pool A als beträchtlich groß abgeschätzt werden kann, hat der Reaktionsschritt keinen meßbaren Einfluß auf den Membraneinbau während eines exocytotischen Ereignisses. Gleichung (3.31) wurde daher vereinfacht zu:

$$\frac{dA}{dt} = k_{-1}B - k_1A. \quad (3.35)$$

Mit diesen Differentialgleichungen stand ein Gleichungssystem zur Verfügung, das die Beschreibung konstitutiver Exocytose in Koleoptilzellen ermöglichte.

3.3.7 Ratenkonstanten

Um die Eignung von Parametern zur Beschreibung der Messungen zu untersuchen wurde ein Programm geschrieben, das mittels eines Fit-Algorithmus [Numerical Recipes] versuchte die Meßdaten anhand des jeweiligen Modells zu simulieren. Anstatt die Differentialgleichungen für die einzelnen Pools zu lösen und den Fit jeweils anhand der Lösungen vorzunehmen, wurde ein iterativer Algorithmus verwendet, der den jeweils folgenden Datenpunkt aus dem oder je nach Komplexität auch den vorangegangenen Datenpunkt(en) bestimmt. Für diese Wahl waren mehrere Gründe ausschlaggebend. Änderungen in den Differentialgleichungen, um einen bestimmten Aspekt zusätzlich zu berücksichtigen oder einen Term weg fallen zu lassen, erfordern keine erneute Berechnung der Lösungen. Wird die Schrittweite im

Iterationsverfahren etwa so weit gewählt, wie die Abtastrate der abzubildenden Messung, so können Effekte, die auf eine verrauschte Messung zurückzuführen sind wesentlich leichter erkannt und kompensiert werden. Eine Abbildung durch eine mathematische Lösung hat zwischen zwei Datenpunkten unendlich viele Punkte. Eine Iteration geeigneter Schrittweite hat hingegen keine zusätzlichen Punkte, was die Darstellung von Rauschen erleichtert.

3.3.8 Abhängigkeit der Ratenkonstanten von der Kalziumkonzentration

Mittels dieses Programmes wurden Abhängigkeiten der einzelnen Ratenkonstanten von der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration untersucht. Regulierte Exocytose konnte in mehreren Fällen [Heinemann et al., 1993, Heidelberger et al., 1994] erfolgreich beschrieben werden, indem ein oder mehrere Schritte von der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration in quadratischer oder kubischer Weise abhängig modelliert wurden. Die Abhängigkeit der Sekretion von der Ionenkonzentration ist dann sehr steil, so daß schon kleine Änderungen in der Kalziumkonzentration einen starken Effekt haben. Änderungen wirken dann quasi wie ein Schalter zwischen zwei Zuständen.

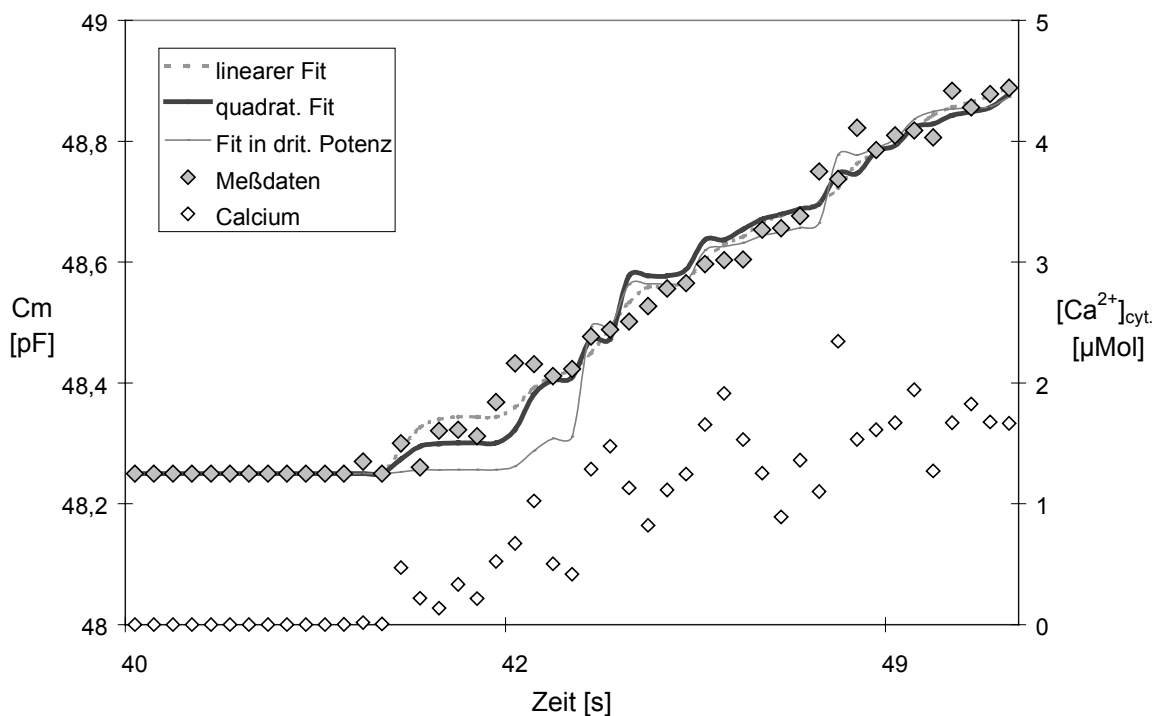


Abbildung 3.17 Ca^{2+} wirkt beim Übergang zwischen den Pools nicht kooperativ.

Es wurde versucht den exocytotischen Schritt vom Pool B nach C mit kooperativ wirkenden Ca^{2+} -Ionen zu beschreiben. Gezeigt ist eine Datenreihe und drei unterschiedliche Kurven, die unter verschiedenen Annahmen an die Daten gefittet wurden. Die erste Kurve (unterbrochene Linie) entstand unter der Voraussetzung, daß der exocytotische Schritt eine lineare Ca^{2+} -Abhängigkeit aufweist. Die zweite Kurve (schwarz, breit) zeigt eine quadratische Abhängigkeit und die dritte (schwarz, schmal) eine Abhängigkeit wie im Modell für regulierte Exocytose mit $k_2 = a_2 ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}})^3$. Die mittlere Abweichung pro Datenpunkt ist für den linearen Fit 33 fF, 37 fF für den quadratischen und 45 fF für den kubischen Fit. In 9 untersuchten Spuren ergab in einem Falle eine Abhängigkeit von $([\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}})^2$ das beste Ergebnis, in allen anderen Fällen war ein linearer Fit am geeignetsten. Ein Zusammenhang wie bei regulierter Exocytose war in keinem Fall geeignet.

Erwartungsgemäß fand sich in der vorliegenden Arbeit eine solche Abhängigkeit zur Beschreibung konstitutiver Exocytose nicht. Beide kalziumabhängigen Schritte werden von der Kalziumkonzentration in linearer Weise beschleunigt.

Vor allem in der ersten schnellen Phase des Kapazitätsanstieges zeigten Fits mit Abhängigkeiten in höherer Potenz deutliche Abweichungen von den gemessenen Spuren (Abbildung 3.17). Kalzium wirkt in keinem Reaktionsschritt des konstitutiven, sekretorischen Weges in kooperativer Weise. Das heißt, stets wird beim Übergang von einem zum nächsten Reaktionsschritt nur ein Kalziumion gebunden.

3.3.9 Bestimmung der Faktoren

Zur Bestimmung der Ratenkonstanten wurde das Computerprogramm um eine Möglichkeit zum so genannten 'Joint-Fit' erweitert. Damit war es möglich mehrere Datensätze mit ein und dem selben Satz an Ratenkonstanten aber verschiedenen Poolgrößen für die einzelnen Messungen zu fitten. Die Grundidee hierbei war, daß die Ratenkonstanten durch zellbiologische Gegebenheiten determiniert sind, die für alle Protoplasten einheitlich sind. Es ist anzunehmen, daß die Proteine, die an der Sekretion beteiligt sind ebenso wie die Transportwege für alle Zellen eines Gewebes einheitlich sein. Die Poolgrößen, also die Menge an Vesikeln die exakt zum Zeitpunkt der Messung in dem Protoplasten vorhanden ist, hingegen werden bestimmt durch die Vorgeschichte der Zelle. Protoplasten, die aus Gewebereichen stammen, die zum Zeitpunkt der Isolation stärker wuchsen, werden auch eine höhere sekretorische Aktivität zeigen [Phillips et al., 1988]. Auch die Protoplastierung selbst kann die Menge an sekretorischen Vesikeln innerhalb eines Protoplasten verändern. Selbst bei sehr sorgfältigen und vorsichtigen Protoplastieren kann es zu Membranrupturen kommen, die als Stimulus für Exocytose wirken [Wolfe et al., 1985] und so vorhandene Vesikelansammlungen verbrauchen können. Auch nur Membrandehnungen, wie sie beim Filtrieren der Protoplasten durch des Nylonnetz denkbar sind, können bereits starke exocytotische Aktivität auslösen [Thiel et al., 2000]. Auch können Veränderungen oder Beschädigungen am Zytoskelett Einfluß auf den Transport von Vesikeln zur Plasmamembran haben. Die Menge an Vesikeln, die auf einen Kalziumstimulus hin für ein exocytotisches Ereignis zur Verfügung steht wird also mit großer Wahrscheinlichkeit von Protoplast zu Protoplast unterschiedlich sein.

Auch wenn Datenreihen mit sehr unterschiedlicher Charakteristik zusammen gefittet wurden, konnten gemeinsame Parameter ermittelt werden (Abbildung 3.18).

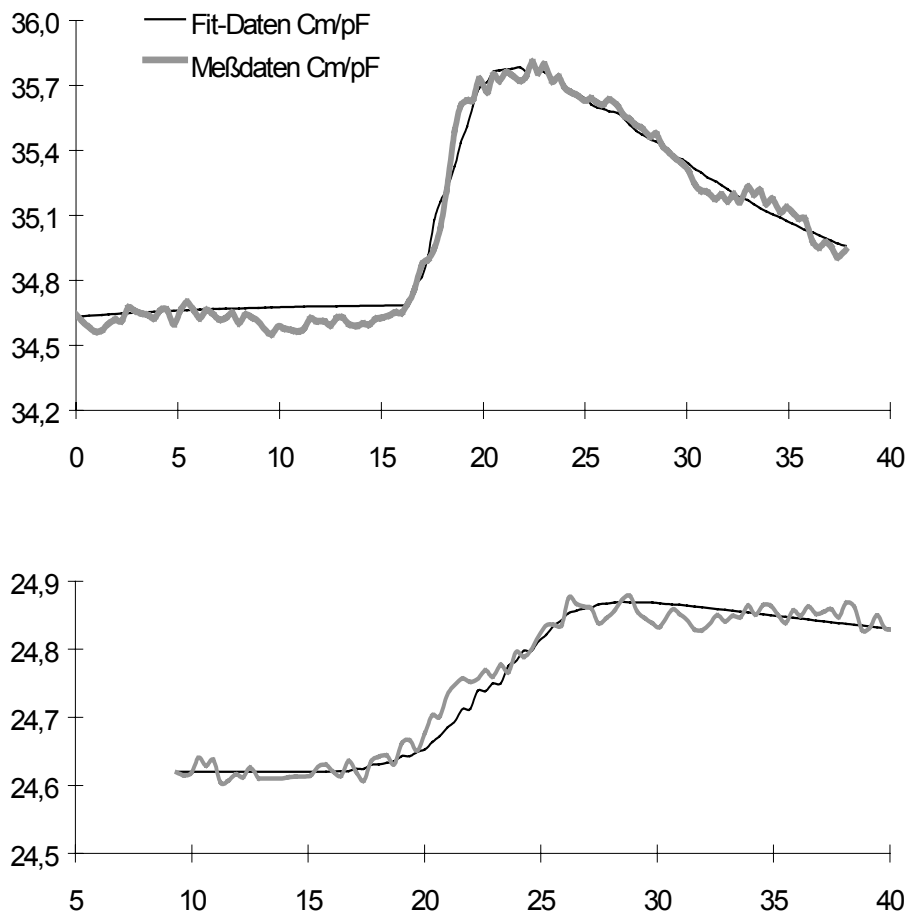


Abbildung 3.18 Joint-Fit zweier Datensätze

Gemeinsamer Fit zweier Datensätze mit unterschiedlicher Charakteristik mit den selben Ratenkonstanten. Im Falle der ersten Messung wurde $[Ca^{2+}]_{cyt}$ sehr schnell erhöht, wodurch ein sehr schneller Anstieg von C_m bedingt war. Bei der zweiten Messung war die Ca^{2+} -Freisetzung durch einen Graufilter im Strahlengang des UV-Lichtes deutlich verlangsamt. Als Folge davon steigt C_m deutlich langsamer an.

Der Fit ergab für die Poolgrößen: $A_1 = 0.033$ pF, $B_1 = 1.337$ pF (obere Abbildung), $A_2 = 0.919$ pF und $B_2 = 0.214$ pF.

Die Ratenkonstanten ergaben sich mit: $k_1 = 0.10$ $[Ca^{2+}]_{cyt} \cdot s^{-1}$, $k_{-1} = 0.006$ s^{-1} , $k_2 = 1.81$ $[Ca^{2+}]_{cyt} \cdot s^{-1}$ und $k_{-2} = 0.11$ s^{-1} . Der mittlere Fehler pro Datenpunkt beträgt 141 fF.

Das unterstreicht die Richtigkeit der oben angeführten Überlegungen.

Die Ratenkonstanten k_i ergeben sich zu:

Ratenkonstanten	Fehler: γ
$k_1 = 0.098$ $[Ca^{2+}]_{cyt}$	+/- 0.02
$k_{-1} = 0.002$	+/- 0.015
$k_2 = 2.31$ $[Ca^{2+}]_{cyt}$	+/- 1.25
$k_{-2} = 0.07$	+/- 0.017

Der Fehler γ wurde ermittelt als die mittlere Differenz der Vorfaktoren a_i aus dem Joint-Fit und der Vorfaktoren, wie sie sich ergaben, wenn jede Datenreihe einzeln gefittet wurde.

Um darüber hinaus zu zeigen, daß das Model nicht nur einzelnen Datensätzen oder Gruppen von Datensätzen gerecht wird, wurde versucht die Charakteristik einer Schar von Meßkurven durch modellierte Kurven nachzuzeichnen. Abbildung 3.19 zeigt eine simulierte Kurvenschar.

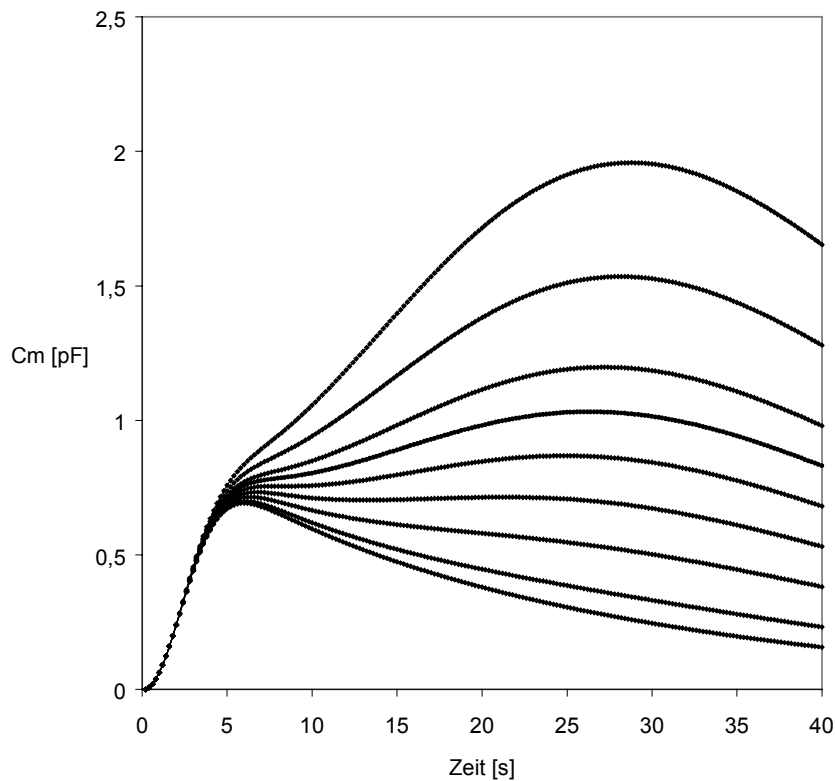


Abbildung 3.19 modellierte Kurvenschar

Um deutlich zu machen, daß das verwendete Modell die Charakteristika der gemessenen Kurven wiedergeben kann, wurde eine Schar von Kurven generiert. Diese entstanden mit einer einheitlichen Poolgröße B, was einer Normierung auf eine Amplitude der ersten, schnellen exocytotischen Reaktion entspricht und varrierenden Poolgrößen A.

Die Ratenkonstanten sind die oben ermittelten, Pool B = 1000 fF, Pool A = 0 (untere Kurve), 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500 und 3000 fF.

Die Kurvenschar wurde generiert unter der Voraussetzung, daß der Pool B eine einheitliche Größe hat. Dies entspricht der Normierung von gemessenen Kurven auf die Amplitude der ersten schnellen Phase des Kapazitätsanstieges. Die Größe des zweiten Pools wurde von vollständig entleert bis hin zu sehr großen Pools variiert. Die Kurvenschar ist abgesehen von höherfrequenten Schwankungen identisch mit der aus den Meßdaten ermittelten (Abbildung 3.13).

Zusammenfassend lassen sich aus diesen Ergebnissen zwei wichtige Punkte benennen.

- Die Kinetik eines exocytotischen Ereignisses auf einen Kalziumstimulus hin wird für alle Zellen einheitlich bestimmt durch die Ratenkonstanten zweier Schritte im sekretorischen Weg.
- Die Amplitude des exocytotischen Ereignisses ist abhängig von der Menge sekretorischer Vesikel im Zytoplasma des jeweils untersuchten Protoplasten und variiert von Zelle zu Zelle.

3.3.1o Kinetik der Fusion in Abhängigkeit von der Kalziumfreisetzung

Um den Einfluß der Kalziumkonzentration auf die Exocytose genauer charakterisieren zu können, wurde der Anstieg der Membrankapazität in Abhängigkeit vom Anstieg der Kalziumkonzentration betrachtet (Abbildung 3.2o).

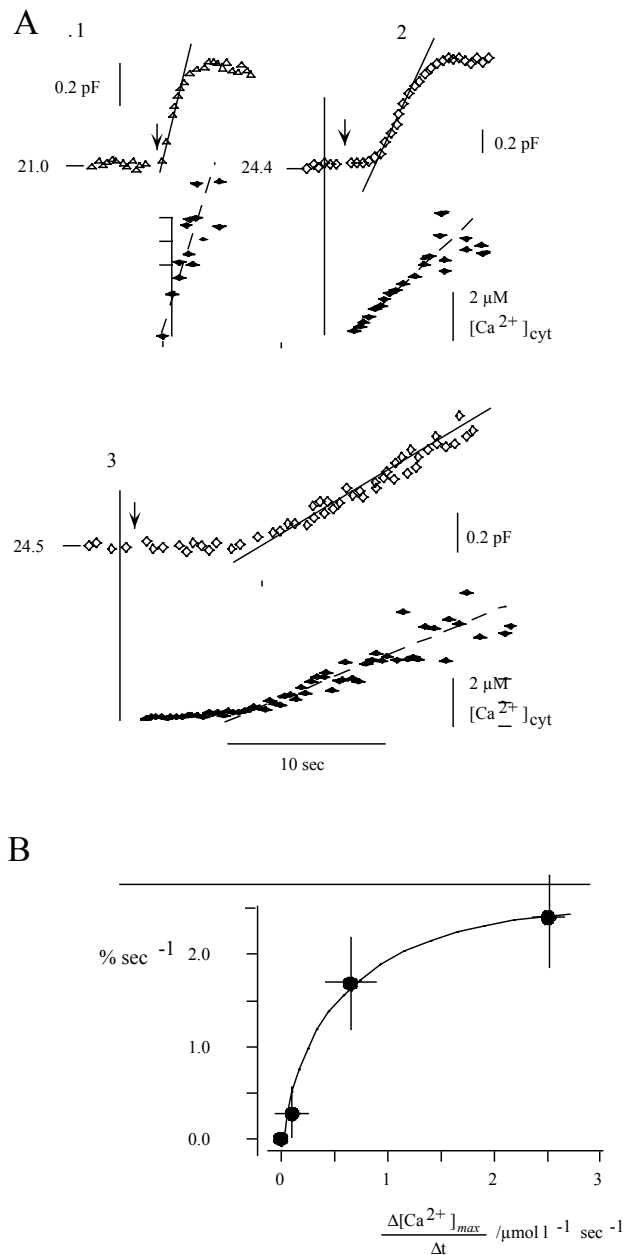


Abbildung 3.2o Abhängigkeit der Exocytoserate von der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung.

A Drei ausgewählte Beispiele exocytotischer Ereignisse (offene Rauten), die jeweils mit unterschiedlichen Freisetzungsraten von Ca^{2+} (schwarze Rauten) aus dem 'cage' ausgelöst wurden. Der Pfeil deutet jeweils auf den Beginn der Bestrahlung mit UV-Licht und damit die Freisetzung von Ca^{2+} . Für geringe Intensitäten des UV-Lichtes (Messung 3) erfolgt der Anstieg von $[Ca^{2+}]_{cyt}$ mit einer Verzögerung. Dies ist vermutlich auf erneute Bindungen von freigesetztem Ca^{2+} mit dem 'cage' zurückzuführen. Die Zahlen an den Kapazitätsspuren geben die Ausgangskapazität an.

B Raten des Kapazitätsanstieges und des Anstieges in $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Die Daten können durch eine Michaelis-Menten Funktion beschrieben werden. Der maximale kapazitive Anstieg beträgt 2.9 % der Ausgangskapazität pro Sekunde.

Es zeigt sich, daß die Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran um so schneller abläuft, je schneller die Kalziumkonzentration ansteigt. Die Fusionsgeschwindigkeit geht bei sehr schnellem Anstieg der Kalziumkonzentration in Sättigung. Der Prozeß läßt sich mit einer Michaelis-Menten Kinetik sehr gut beschreiben. Der Maximalwert des Membraneinbaus beträgt 2.9 % der Ruhekapazität pro Sekunde. Die halbmaximale Sättigung wird für eine Kalziumfreisetzung von $0.49 \mu\text{Mol s}^{-1}$ erreicht.

Die Tatsache, daß kein Schwellwert der Kalziumkonzentration feststellbar ist oberhalb dessen überhaupt erst ein Effekt auftritt, unterstreicht, daß es sich bei dem betrachteten Prozeß um konstitutive Exocytose handelt. Zusammengenommen mit dem Ergebnis, daß Kalzium nur in linearer Weise beschleunigend auf die Sekretion wirkt, zeigt sich deutlich, daß das Kalzium hier nur als quasi Modulator beziehungsweise als Überträger innerhalb einer Signalkette wirkt.

3.4 Kalziumstimulierte Exocytose in Tabakzellen

Protoplasten aus Tabak Mesophyllzellen wurden über die Pipettenlösung mit einer hohen Konzentration [3.5 μMol] freier Kalziumionen beladen. Dieser Stimulus löste genau wie in den Zellen aus der Koleoptile von Mais, eine exocytotisches Ereignis aus. Ein Beispiel für eine Messung ist in Abbildung 3.9 gezeigt.

Die Beladung mit Ca^{2+} über die Pipettenlösung stellte gegenüber den Versuchen an Mais Protoplasten, in denen der Ca^{2+} -Stimulus durch Freisetzung von Ca^{2+} aus einem 'cage' erfolgt war, eine deutliche Änderung dar. Um sicher zu gehen, daß es sich trotz der unterschiedlichen Technik des Ca^{2+} -Stimulus auch hier um Ca^{2+} -abhängige Exocytose handelte, wurden zwei Vorversuche gemacht

Wird das Kalzium in der Pipettenlösung gegen Magnesium gleicher oder auch höherer freier Ionenkonzentration ausgetauscht, so bleibt die Membrankapazität unverändert, wie in Abbildung 3.21 gezeigt ist.

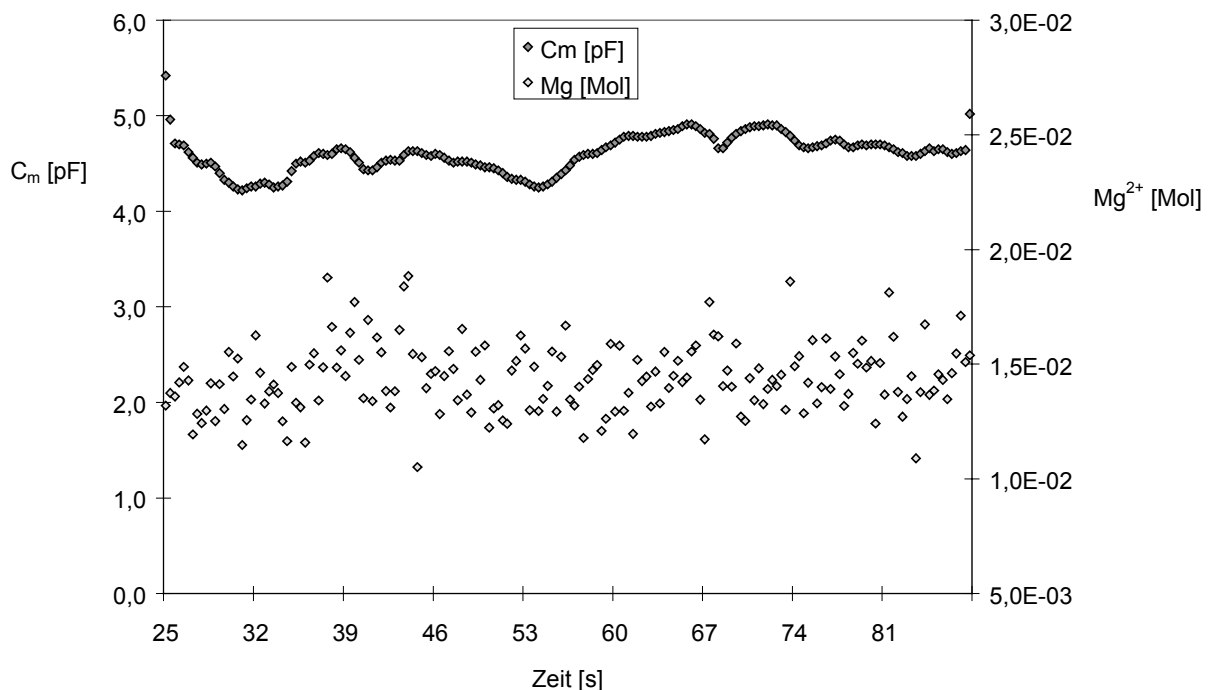


Abbildung 3.21 Die Membrankapazität ist unabhängig von der Magnesiumkonzentration.

Ein Protoplast aus dem Mesophyll von Tabak wurde über die Pipettenlösung mit 100 nMol freiem Ca^{2+} und 25 mMol freiem Mg^{2+} beladen. $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{cyt}}$ wurde abgeschätzt aus der Verschiebung des Fura-2 Ratios. Die hohe Mg^{2+} -Konzentration löst kein exocytotisches Ereignis aus.

Die beobachtete Exocytose ist also nicht durch die Perfusion des Protoplasten mit einem anderen zweiwertigen Ion auszulösen.

Wird die Kalziumkonzentration in der Pipette durch zusätzliches EGTA in der Pipettenlösung auf eine freie Ionenkonzentration von 2 nMol gepuffert, so ist ebenfalls keine Veränderung der Membrankapazität zu beobachten (Abb. 3.22). Der Effekt ist also zusätzlich auch an das Überschreiten einer bestimmten Kalziumkonzentration im Zytoplasma gebunden.

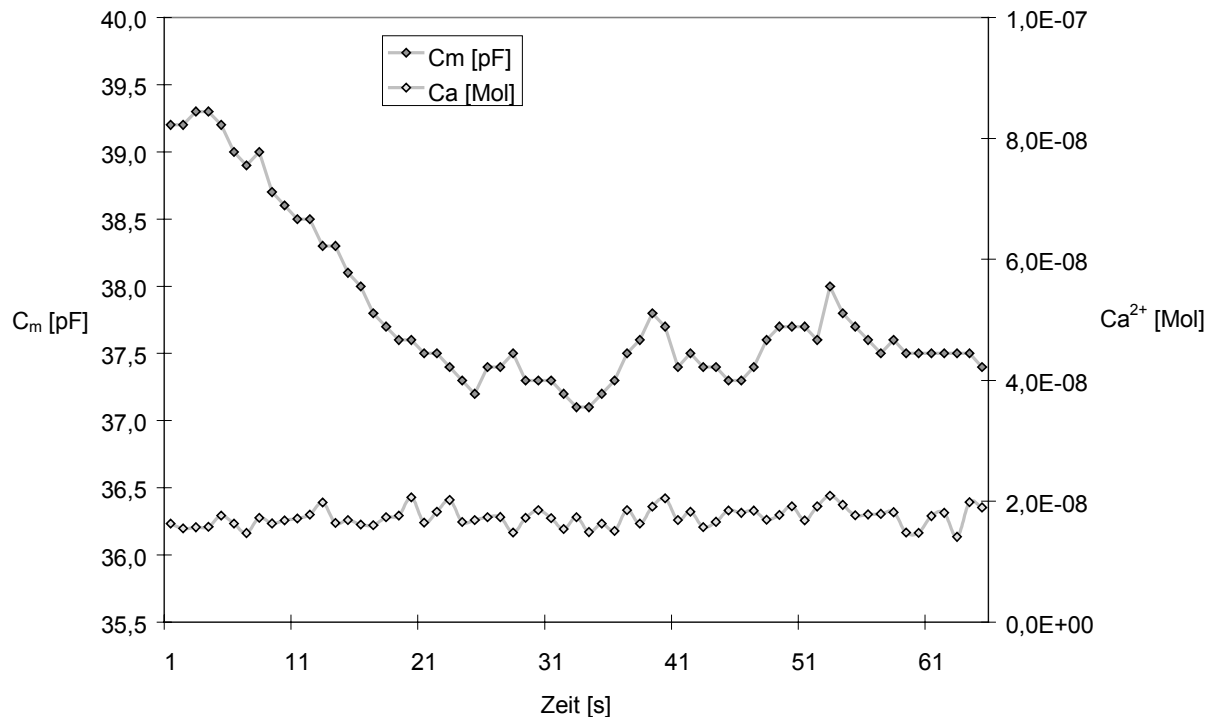


Abbildung 3.22 Geringe Werte von $[Ca^{2+}]_{cyt}$ bewirken kein exocytotisches Ereignis.

Durch EGTA in der Pipettenlösung ist $[Ca^{2+}]_{cyt}$ auf einen Wert von 2 nMol gepuffert. Es zeigt sich kein exocytotisches Ereignis. Der Wert von C_m fällt sogar geringfügig von 39.2 pF auf 37.5 pF. Geringe Werte von $[Ca^{2+}]_{cyt}$ lösen ein endocytotisches Ereignis aus.

Tatsächlich ist in Abbildung 3.22 sogar ein geringer Abfall der Membrankapazität zu beobachten. Das bedeutet, daß die Endocytose überwiegt und so die Protoplastenoberfläche geringer wird. Das stützt die Idee von einem bestehenden Fließgleichgewicht zwischen Exocytose und Endocytose, welches durch die freie Kalziumionenkonzentration im Zytoplasma quasi balanciert wird. Wird, wie in der Mehrzahl der Experimente, die Ca^{2+} -Ruhekonzentration überschritten, so überwiegt die Exocytose, wird sie unterschritten so überwiegt die Endocytose. Schon dieser erste Befund stützt die Ansicht, daß es sich bei dem beobachteten Prozeß um konstitutive Exocytose handelt, bei der es einen ständigen Membranfluß gibt, während bei regulierter Exocytose Momente exocytotischer Aktivität mit Pausen im Membraneinbau abwechseln würden. Ein solches System wäre durch die oben beschriebenen Experimente nicht quasi stufenlos regulierbar. Zusammen mit weiteren Ergebnissen, die durch die Modellierung des Prozesses gewonnen werden konnten, ist dieser Effekt ein guter Hinweis darauf, daß der endocytotische Schritt nicht kalziumabhängig ist. Dieses deckt sich gut mit Arbeiten von Gilbert, die zeigen konnte, daß die Formation endocytotischer Vesikel Ca^{2+} -unabhängig ist [Gilbert et al., 1997].

Um zu untersuchen, inwieweit die Auslösung des exocytotischen Ereignisses von der Ca^{2+} -Konzentration abhängt, wurde wie bei den Mais Zellen, die Abhängigkeit der Exocytoserate von der Rate des Anstieges in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ aufgetragen. Der Plot (Abbildung 3.23) deutet auf einen ähnlichen Zusammenhang hin, wie er für die konstitutive Exocytose in Mais Koleoptilzellen gefunden wurde (Abbildung 3.20).

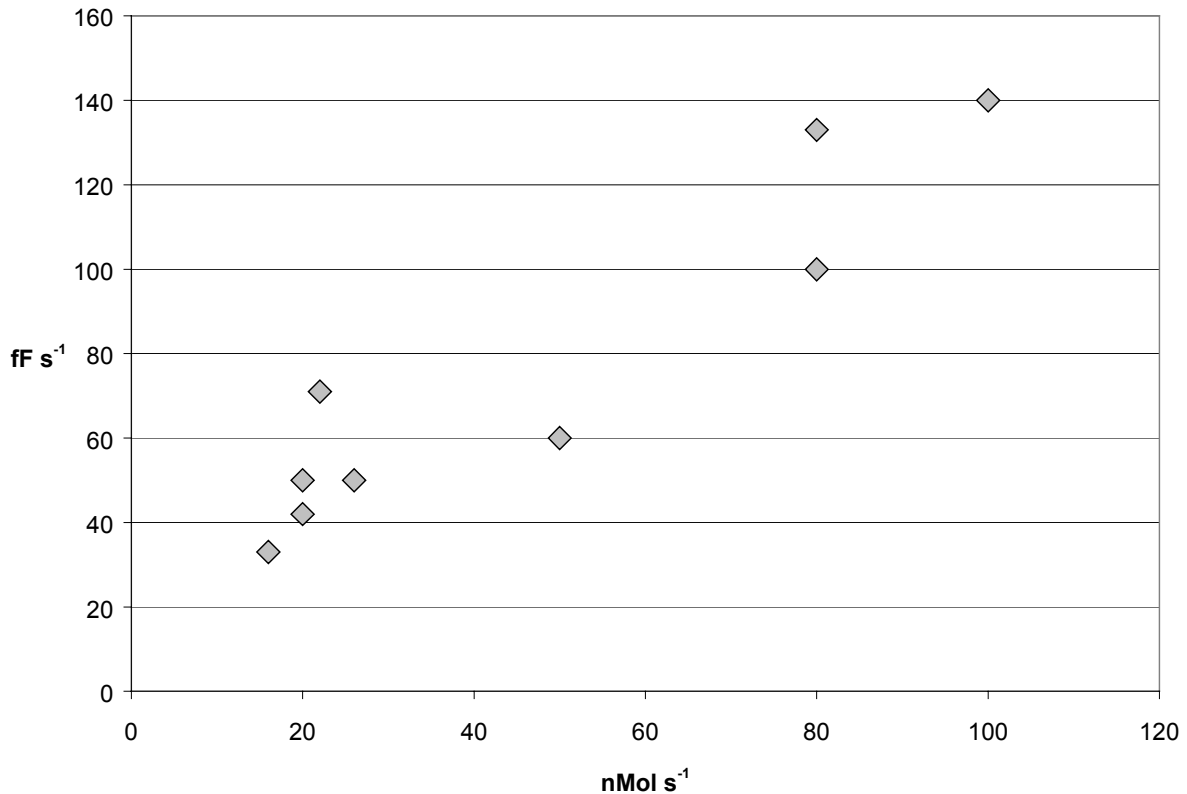


Abbildung 3.23 Abhängigkeit der Exocytoserate von der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Einstromes

Ähnlich wie schon für die Exocytose in Mais Koleoptilzellen wird hier die Rate des Membraneinbaues in Abhängigkeit der Rate des Ca^{2+} -Einstromes gezeigt. Die Messungen an den Tabakzellen wurden mit deutlich geringeren Ca^{2+} -Konzentrationen durchgeführt, als die Messungen an den Koleoptilzellen. Es gelang daher nicht die Sättigung der Ca^{2+} -Konzentration zu bestimmen, oberhalb derer eine erhöhte Konzentration die Vesikelfusion nicht mehr beschleunigt.

Es gelang jedoch nicht eine Sättigungskonzentration wie im Falle der Exocytose in Mais zu bestimmen. Ausschlaggebend hierfür ist vor allem die Tatsache, daß die Messungen an Tabak mit deutlich geringeren Konzentrationen an Ca^{2+} durchgeführt wurden.

Die nicht wirksame Konzentration von 2 nMol liegt deutlich unterhalb der normalen Ruhekonzentration im Zytoplasma (Abbildung 3.24), was sich auch mit dem Befund deckt, daß dann die endocytotische Aktivität überwiegt. Die Ruhekonzentration konnte nur mit begrenzter Genauigkeit bestimmt werden. Abbildung 3.24 zeigt die Konzentrationen an freiem zytoplasmatischem Kalzium, wie sie für 15 Protoplasten direkt nach dem Einbrechen in den Whole-Cell Mode gemessen wurden.

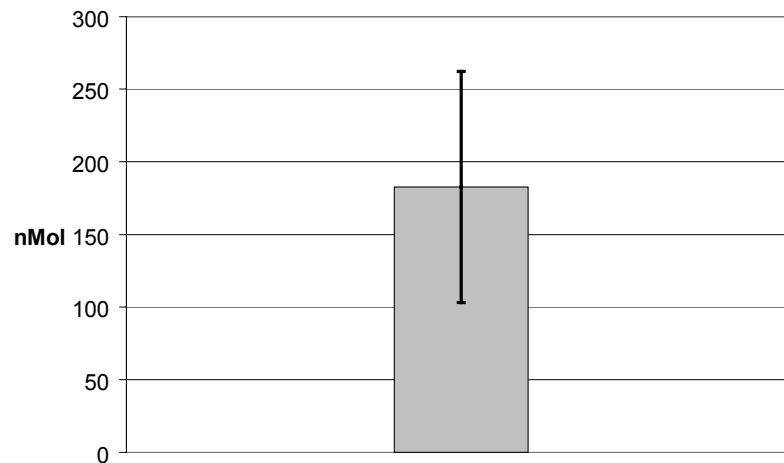


Abbildung 3.24 Mittelwert von $[Ca^{2+}]_{cyt.}$

Mittelwert der freien Kalziumkonzentration im Zytoplasma. Der Wert wurde aus 15 Messungen unmittelbar nach dem Einbrechen in die 'Whole Cell'-Konfiguration ermittelt.

Die Meßwerte streuen etwas und es muß weiterhin bedacht werden, daß mit dem Einstrom des zur Messung verwendeten Fura-2 auch Kalzium aus der Pipette einströmt, so daß die Werte nur eine obere Abschätzung der Ruhekonzentration darstellen können.

Dennoch bleibt anzumerken, daß bei jeder Messung, bei der eine Kalziumkonzentration oberhalb der im Rahmen der Kalibrierung der Fura-2 Messungen ermittelten Ruhekonzentration von 180 nMol gemessen wurde, stimulierte Exocytose auftrat. Damit unterstreichen diese Ergebnisse die Auffassung, daß es sich bei dem betrachteten Transportweg eindeutig um konstitutive Exocytose handelt. Jede Auslenkung der Kalziumkonzentration über die Ruhekonzentration hinaus hat also offenbar einen stimulierenden Effekt auf die Exocytose, während im Falle von regulierter Exocytose ein eindeutiger Schwellwert hätte feststellbar sein müssen.

3.4.1 Relation zwischen Proteinmenge und exocytotischer Aktivität

Man kann davon ausgehen, daß die Sekretionsrate eines Proteins von der Anzahl der in den Zellen vorhandenen Kopien des entsprechenden Synthese-Gens abhängt. Dies gilt zumindest wenn, wie im vorliegenden Falle das Gen unter dem Regime eines konstitutiven Promotors steht. Entsprechend sollten Protoplasten aus Tabakpflanzen mit unterschiedlicher Anzahl an Kopien des für α -Amylase kodierenden Gens auch unterschiedliche Sekretionsraten zeigen. Dieser Zusammenhang wurde durch Messung an Protoplasten aus Pflanzen mit unterschiedlicher α -Amylase-Aktivität untersucht.

Damit war es möglich einen Schritt über die Arbeiten, wie sie an den Maiszellen durchgeführt worden waren, hinauszugehen.

Abbildung 3.25 zeigt die Amplitude des kapazitiven Anstieges 90 s nach dem Beginn des Anstieges. Das Meßprinzip ist nebenstehend gezeigt.

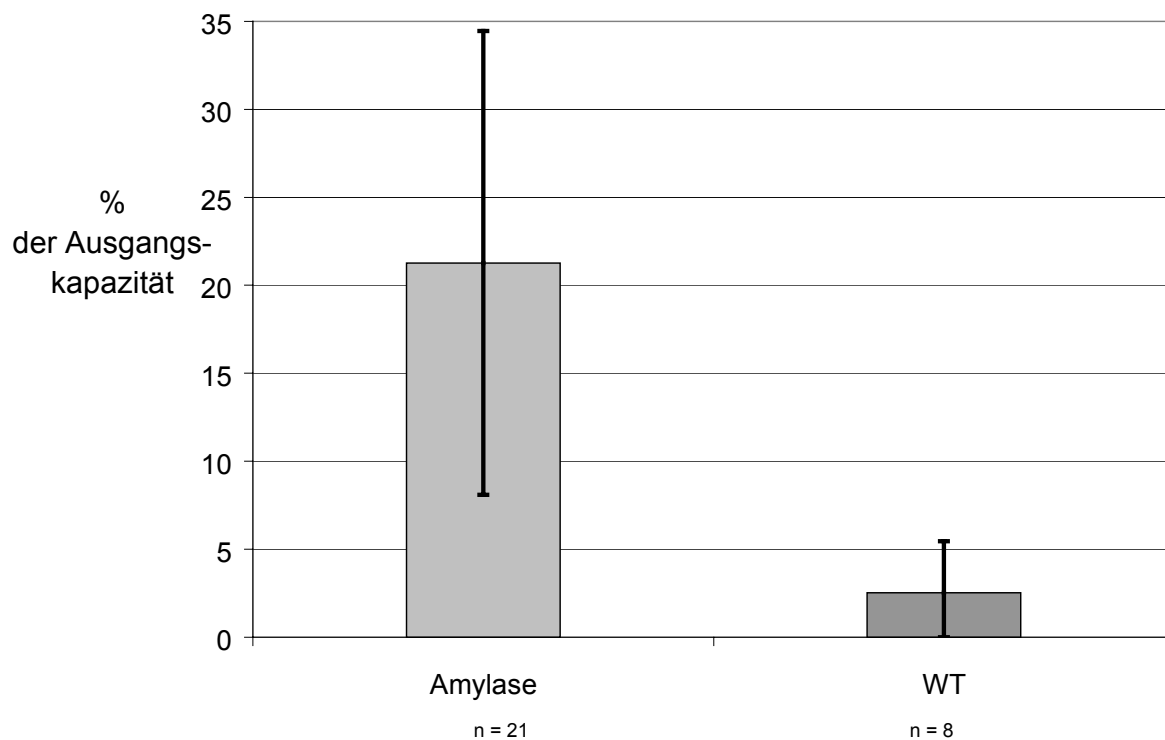
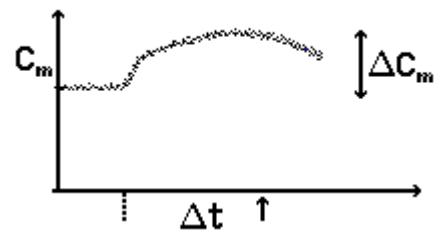


Abbildung 3.25 Amplitude des exocytotischen Ereignisses in transgenen und Wild-Typ Protoplasten.

In 21 Experimenten an transgenen Protoplasten und in 8 an Wild-Typ Protoplasten wurde nach einer Zeit $\Delta t = 90$ s nach Erreichen der Whole Cell Konfiguration die Amplitude ΔC_m des Kapazitätsanstieges gemessen. Vergleicht man die relativen Amplituden $\Delta C_m / C_m$ des exocytotischen Ereignisses in transgenen und Wild-Typ Protoplasten, so zeigt sich, daß die Amplitude in den transgenen Protoplasten mit 22 % um nahezu eine Größenordnung höher ist, als in Wild-Typ Protoplasten mit 2.5 %.

In Wild-Typ Protoplasten beträgt die Amplitude 2.5 % der Ausgangskapazität. Das heißt es werden auf den Kalziumstimulus hin 2.5 % der Membranoberfläche durch Vesikelfusion hinzugefügt. In transgenen Protoplasten beträgt die Amplitude nach der gleichen Zeit 22 % des Ausgangswertes. In transgenen Protoplasten steht also fast zehnmal mehr Membran in Vesikeln für die Exocytose zur Verfügung. Der beträchtliche Fehlerbalken für die transgenen Pflanzen deutet hier weniger Meßungenauigkeiten an, als vielmehr unterschiedliche Expressionsraten der α -Amylase in den verschiedenen transgenen Pflanzen.

Ist im untersuchten Protoplasten ein vergrößerter Anteil an sekretorischem Protein vorhanden, so ist der Betrag an Membran, der auf einen Kalziumstimulus hin eingebaut wird, ebenfalls erhöht.

Das zusätzlich verwendete Amylase-Assay ermöglichte nun weiterhin eine Abschätzung des Gehaltes an α -Amylase, die innerhalb eines bestimmten Zeitraumes setserniert wird. Mit der Bestimmung des Gehaltes an α -Amylase konnte dann die exocytotische Aktivität mit der Syntheserate an sekretorischem Protein zusammen gebracht werden. Abbildung 3.26 zeigt den Zusammenhang der Menge an sekretorischem Protein in dem Protoplasten und die exocytotische Aktivität auf einen Kalziumstimulus hin.

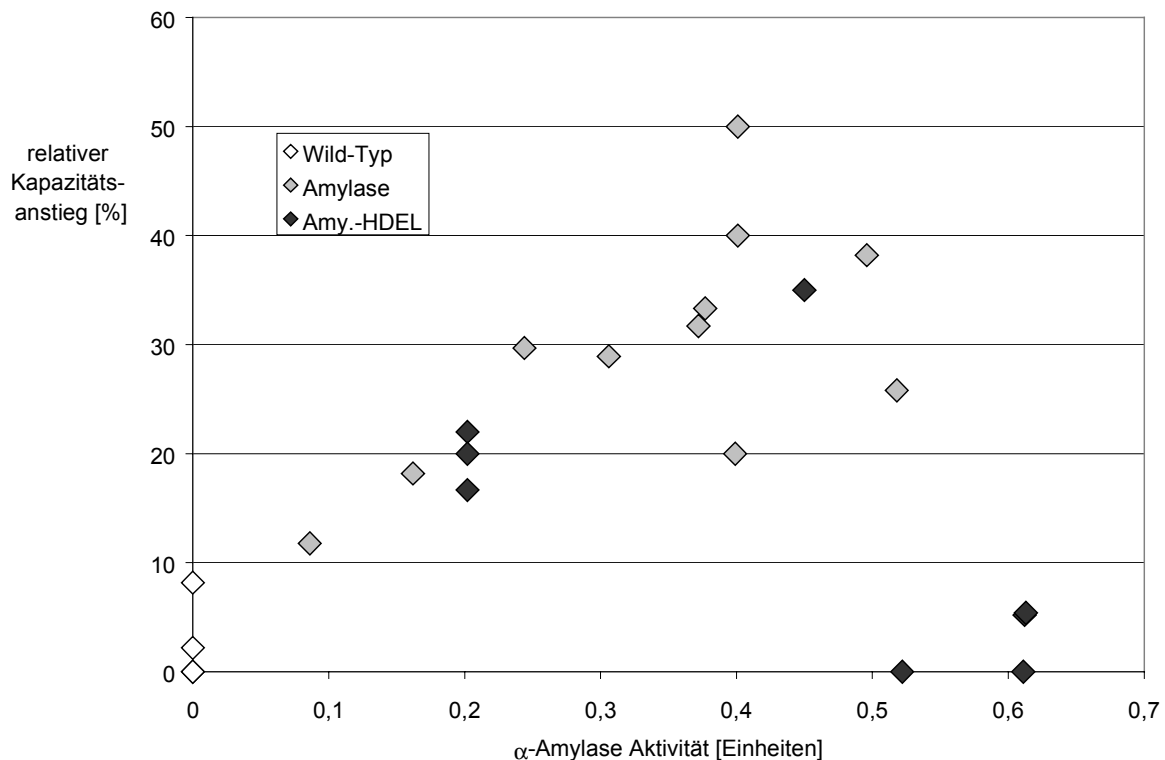


Abbildung 3.26 Zusammenhang zwischen sekretorischer Aktivität und Gehalt an sekretorischem Protein

Für Protoplasten von Wild-Typ Zellen (weiße Rauten), Amylase Zellen (hellgraue Rauten und Amylase-HDEL Zellen (dunkelgraue Rauten) ist hier der relative Kapazitätsanstieg in Abhängigkeit von der Aktivität an α -Amylase gezeigt. Während sich für die Amylase Protoplasten eine 'je-mehr-desto-größer' Relation abzeichnet, liegen einige der Meßdaten von Amylase-HDEL Protoplasten trotz hoher Amylase Aktivität im Bereich sekretorischer Aktivität, wie ihn auch Wild-Typ Protoplasten zeigen.

Es fällt zunächst auf, daß einige der Meßwerte, die an Protoplasten von Amy.-HDEL Pflanzen gewonnen wurden etwas aus dem Rahmen fallen. Obwohl die Syntheseraten recht hoch sind, zeigen die Messungen keine erhöhte sekretorische Aktivität. Dieser Befund gab Anlaß zu genaueren Untersuchungen der an HDEL-Protoplasten gemachten Messungen.

Abbildung 3.27 zeigt die Amplitude des Kapazitätsanstieges von HDEL-Zellen in Abhängigkeit der Zeit, die zwischen der Protoplastierung und der Durchführung der Messung lag.

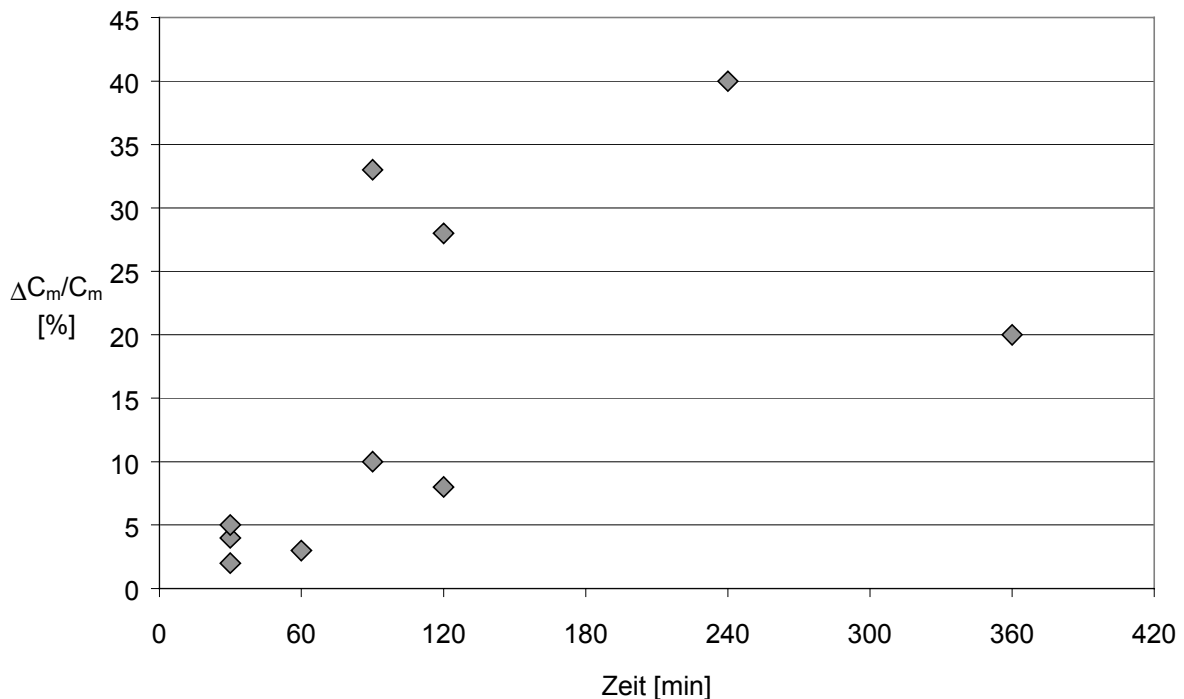


Abbildung 3.27 Sekretorische Aktivität von HDEL Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Protoplastierung.

Wird eine Messung der sekretorischen Aktivität innerhalb der ersten 1½ Stunden nach der Protoplastierung durchgeführt, so ist der relative kapazitive Anstieg im Bereich, wie er auch für Wild-Typ Zellen ermittelt wird. Erst nach dieser Zeit ergeben sich bei Messungen Werte, die denen von Amylase Zellen vergleichbar sind.

Auf Grund der relativ geringen Zahl an Meßwerten, kann das Ergebnis allenfalls eine Arbeitshypothese darstellen, aber es bleibt festzuhalten, daß es bei HDEL-Protoplasten einen Zeitbereich nach der Protoplastierung gibt, in dem sie sich unter dem hier verwendeten Meßverfahren wie Wild-Typ Zellen verhielten, während nach Ablauf dieser Zeit Messungen Ergebnisse ergaben, die denen an Amylase-Zellen entsprechen. Möglicherweise wird das Fließgleichgewicht in dem sich die α -Amylase in einer HDEL-Zelle befindet durch die Protoplastierung derart gestört, das für eine gewisse Zeit nach der Prozedur wieder Speicherkapazität im ER und/oder im Golgi vorhanden ist. Erst wenn wieder ein Gleichgewichtszustand erreicht ist, sekretieren die Protoplasten in einer Art Überlaufsekretion wieder wie eine Amylase-Zelle. Die 'Totzeit' nach der Protoplastierung kann mit etwa 90 min. abgeschätzt werden. Der Wert beinhaltet aber zugegebenermaßen eine beträchtliche Unsicherheit, der Effekt an sich ist aber eindeutig.

Mit diesem zusätzlichen Wissen werden einige Meßwerte, die von HDEL-Protoplasten stammen und nur kurz nach der Protoplastierung gewonnen wurden, im Folgenden als Wild-Typ Messungen gewertet.

3.4.2 Mathematische Beschreibung der Relation

Der tatsächliche Zusammenhang zwischen der Expression eines Gens, der Synthese eines Proteins und schließlich der Amplitude eines exocytotischen Einbaus von Transportvesikeln in die Plasmamembran auf einen Kalziumreiz hin, ist sicher komplex und schwer in Formeln zu fassen. Näherungen, die auf einer Relation zwischen Vesikelvolumen und Vesikeloberfläche beruhen, wären vorstellbar. Derartige mathematische Beschreibungen der Transportvorgänge würden aber Zusammenhänge implizieren, über die zum jetzigen Zeitpunkt nichts bekannt ist. Unklar ist, ob Vesikel exklusiv mit jeweils einer Sorte sekretorischen Proteins beladen werden, ob die Beladungsdichte konstant ist und ob in einem Transportvesikel verschiedene Proteine exklusiv oder entsprechend ihrer Häufigkeit im Golgi auftreten. Zur Beschreibung der Korrelation wurde daher ein Mathematisches Modell gewählt, welches keine Voraussagen über die Verteilung von Transportgut und Membran macht. Wenn ein Substrat aus einem als nicht zu erschöpfenden Pool an Substanz einen Reaktions- oder Bindungspartner rekrutiert, so läßt sich dieser Vorgang durch eine sogenannte Michaelis-Menten Kinetik beschreiben. Diese mathematische Formulierung entstand auf der Grundlage von Substrat-Enzym Reaktionen, weswegen derartige Beziehungen auch als enzymkinetische Modelle bezeichnet werden. Derartige Beschreibungen wurden bereits mit Erfolg auch auf Bereiche außerhalb von Enzymreaktionen angewandt. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Beschreibung von Ionenflüssen durch Membrankanäle mit enzymkinetischen Modellen [Hansen et al., 1981]. Für den hier untersuchten Prozeß stellt die α -Amylase das Substrat dar und die Lipidvorräte des Golgi entsprechen dem unbegrenzten Pool an Substanz. Diese Näherung ist natürlich ab einem gewissen Grade zweifelhaft. Da aber keinerlei Hinweise bekannt sind, daß die Membranmenge innerhalb einer Zelle limitierender Faktor der Proteinsynthese oder des Proteintransportes ist, ist die Beschreibung so gerechtfertigt. Abbildung 3.28 zeigt einen Fit der Michaelis-Menten Funktion an die Meßdaten.

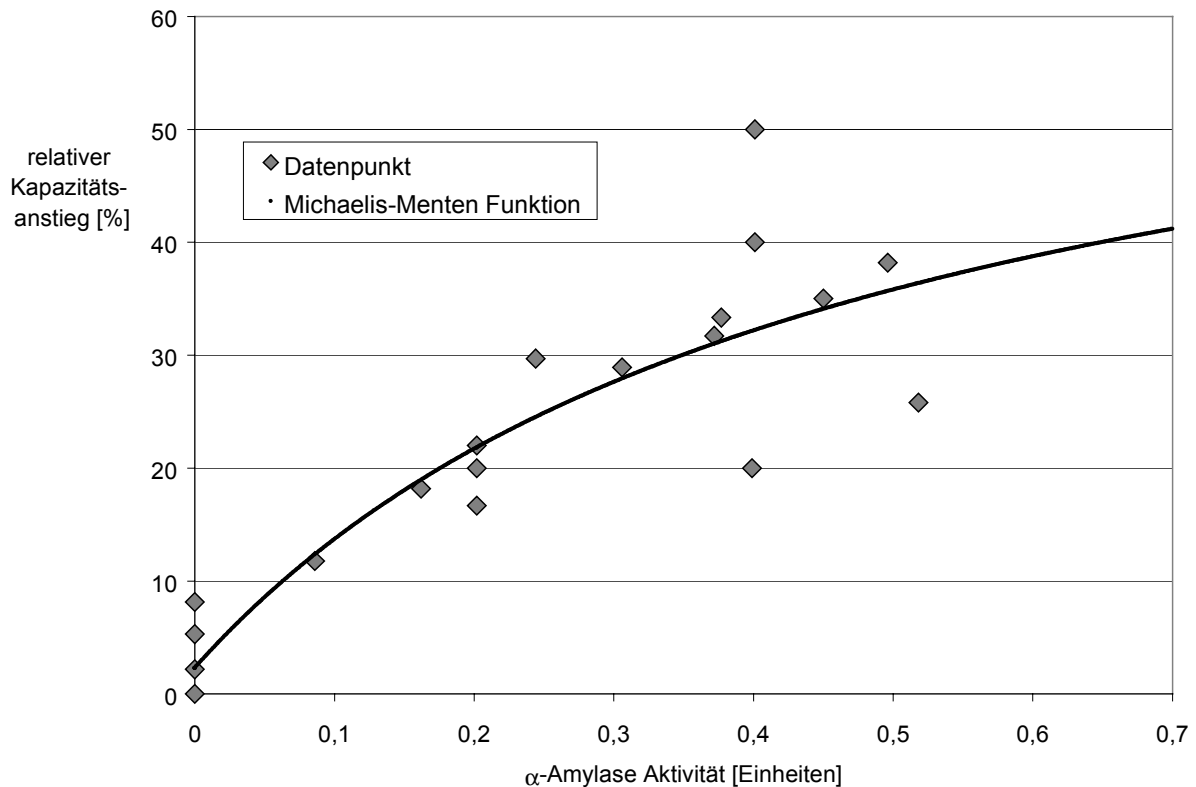


Abbildung 3.28 Mathematische Beschreibung der Relation von sekretorischer Aktivität und Gehalt an sekretorischem Protein

Die Daten wurden mit einer Michaelis-Menten Funktion mit einem zusätzlichen Offset beschrieben. Der Offset trägt der Tatsache Rechnung, daß auch Protoplasten ohne zusätzliche α -Amylase eine sekretorische Aktivität zeigen. Der Fit ergab für die Sättigung im Bereich der sekretorischen Aktivität einen relativen Kapazitätsanstieg von 63 %. Die Sekretionsrate ohne zusätzliches Protein beträgt 2.5 %.

Mit dem Fit ergeben sich die folgenden Parameter.

3.4.3 Oberflächenzuwachs ohne zusätzliches sekretorisches Protein

Die Rate an Kapazitätszuwachs, die auftritt, wenn kein zusätzliches rekombinantes Protein vorhanden ist, beträgt 2.5 %. Das ist genau der Wert, der sich auch als Kapazitätszuwachs für Mais Koleoptilzellen ergab (Abbildung 3.14). Damit konnte an zwei verschiedenen pflanzlichen Zellsystemen gezeigt werden, daß der Oberflächenzuwachs auf einen Kalziumstimulus hin 2.5 % beträgt und für beide Systeme gleich ist.

3.4.4 Maximaler Oberflächenzuwachs

Sowohl für die α -Amylase-Aktivität als auch für den relativen Kapazitätsanstieg muß es eine obere Grenze geben. Die Menge an sekretorischem Protein, die eine Zelle sezernieren kann, muß einen Maximalwert haben. Die Natur dieser Grenze kann vielfältig sein. Der Energiehaushalt einer Zelle erlaubt notwendigerweise nur eine bestimmte maximale Syntheserate, die Kapazitäten von ER und Golgi sind zwangsläufig begrenzt. Es ist mit den hier vorgestellten Versuchen nicht möglich festzustellen, was die Syntheserate begrenzt, es kann aber mit Sicherheit gesagt werden, daß eine maximale Syntheserate existieren muß.

Ebenfalls beschränkt muß die Sekretionsrate sein. Vermutlich bedingt einfach der im Zytoplasma für Vesikel vorhandene Platz eine obere Grenze für Sekretion. Denkbar

wäre aber auch, daß einzelne Schritte des sekretorischen Weges eine maximale Kapazität haben.

Im Bereich, der von dem hier vorgestellten Meßverfahren abgedeckt wird, zeigt sich lediglich die Sättigung im Membraneinbau. Als Maximalen Oberflächenzuwachs auf einen Kalziumstimulus hin ergibt sich ein Wert von 60 % der Ruheoberfläche. Da bei dem gewählten Meßverfahren der Protoplast kontinuierlich mit einer hohen Konzentration an freiem Kalzium aus der Pipette durchspült wird, muß man annehmen, daß alle zellulären Kalziumpuffer gesättigt sind und der Kalziumstimulus einen Plateauwert erreicht. Die 60 % Membran, die eingebaut werden können, stellen also vermutlich den gesamten Pool an Membran dar, der zur Verfügung steht.

3.4.5 Kinetik des Membraneinbaus

Die höhere Amplitude des Kapazitätsanstieges in Zellen mit hoher Proteinsyntheserate kann unterschiedliche Ursachen haben. Möglicherweise läuft mit zunehmendem Vorrat sekretorischer Proteine die Sekretion schneller. Je mehr sekretorische Proteine vorhanden sind, desto mehr Membran müßte dann pro Zeiteinheit via Exocytose in die Plasmamembran eingebaut werden (Abbildung 3.29, Mitte).

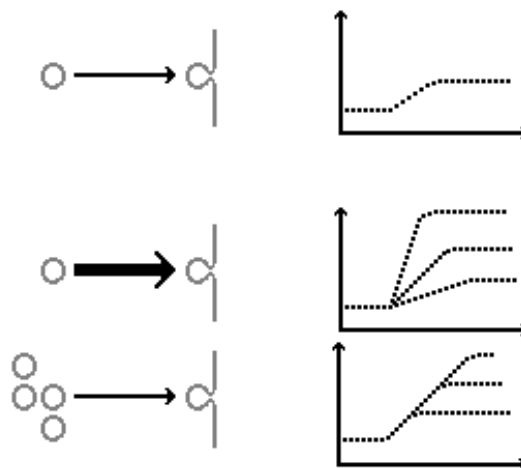


Abbildung 3.29 Modelle für die Kinetik des Membraneinbaus in das Plasmalemma.

Wird Membran in Form von Vesikeln in die Plasmamembran eingebaut, so registriert man einen Anstieg der Membrankapazität (Abbildung oben). Um mehr Membran einzubauen, gibt es generell zwei verschiedene Wege.

Ist die Menge an sekretorischen Vesikeln auf eine feste Größe begrenzt und wird die vergrößerte Amplitude realisiert indem die Fusionsmaschinerie schneller arbeitet, so registriert man bei höheren Amplituden einen schnelleren Membraneinbau.

Ist die Geschwindigkeit in der die Vesikelfusion stattfinden kann eine Feste Größe und die Menge an sekretorischen Vesikeln

Denkbar wäre aber auch, daß die Sekretionsrate eine feste Größe darstellt und mehr Transport über einen längeren Zeitraum und eine größere Anzahl an sekretorischen Vesikeln realisiert wird. In diesem Falle, sollte der Membraneinbau pro Zeiteinheit unverändert bleiben, wenn mehr oder weniger Protein setserniert werden soll (Abbildung 3.29, unteres Bild).

Um zwischen den beiden Modellen unterscheiden zu können, wurden die Kinetiken des Membraneinbaus untersucht. Abbildung 3.3o zeigt eine Meßreihe, die an einer Amylase-Zelle aufgenommen wurde, und eine, die von einer Wild-Typ Zelle stammt. Zunächst fällt der deutliche Unterschied in der Amplitude ins Auge und man ist geneigt, die Kinetiken zu gleichen Zeitpunkten zu vergleichen, womit sich ein deutlicher Unterschied in der Rate des Membraneinbaues ergäbe.

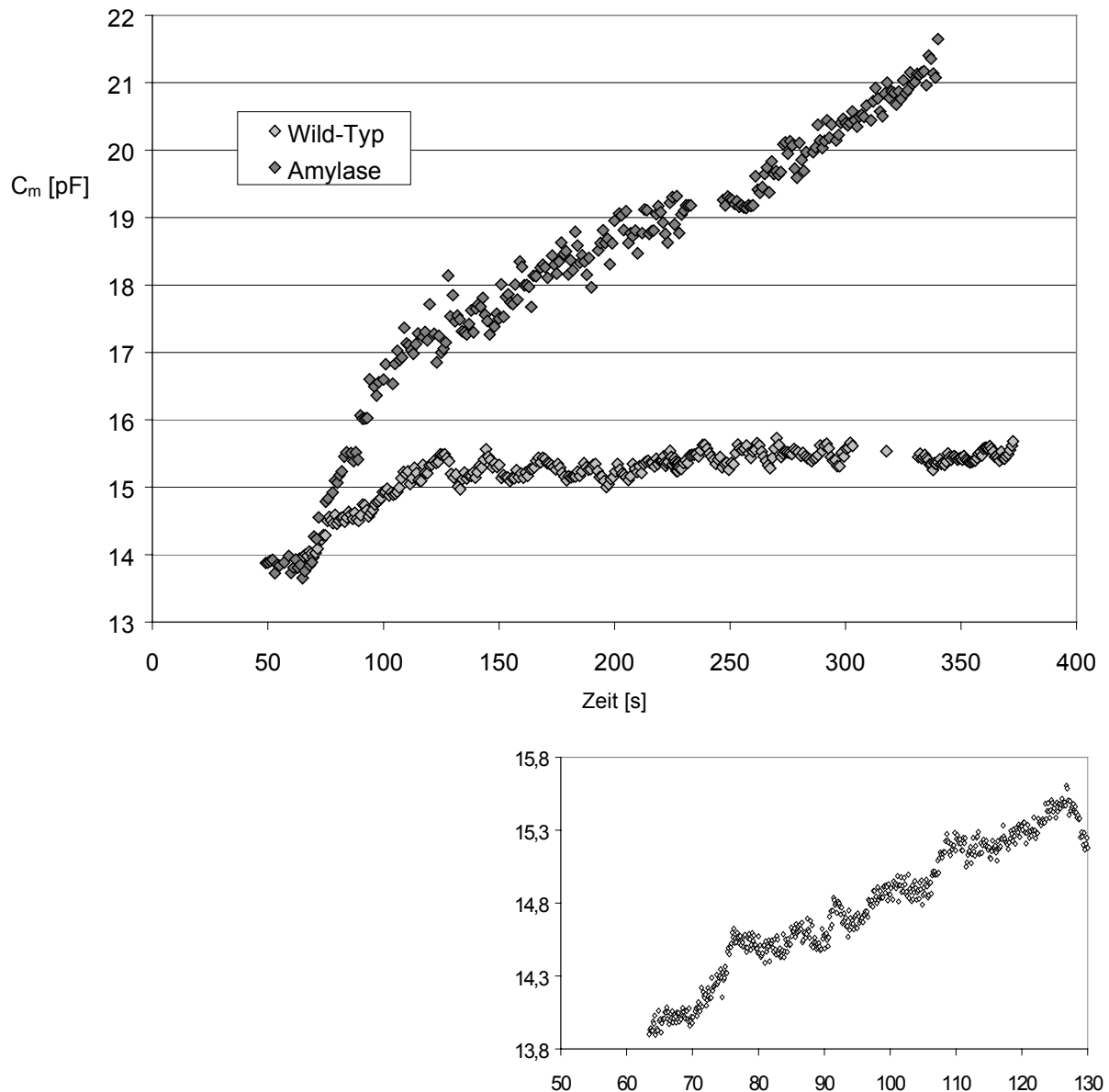


Abbildung 3.3o Vergleich der Kinetik an transgener und Wild-Typ Zelle

Vergleich einer Messung an einem Wild-Typ Protoplasten mit einer Messung an einem Amylase-Protoplasten.

Der Membraneinbau zeigt bei dem transgenen Protoplasten eine deutliche Zweiphasigkeit mit einer schnellen Phase (3 pF in 30 s ($t=[70,100]$)) und daran anschließend einer langsameren Phase (4 pF in 230 s ($t=[100,330]$)). Beim Wild-Typ scheint nur die langsamere Phase aufzutreten mit 1 pF in 50 s ($t=[75,125]$)).

Vergrößert man den ersten Abschnitt der Messung am Wild-Typ (kleines Bild), so kann man auch hier eine erste schnelle Phase des Membraneinbaus von 0,5 pF in 5 s erkennen.

Die Kinetiken des Membraneinbaus sind in transgenen und Wild-Typ Protoplasten gleich. Es gibt eine schnelle Phase mit 100 fF s^{-1} und eine langsamere Phase von etwa 20 fF s^{-1} .

Vergrößert man aber den ersten kurzen Abschnitt der Meßreihe von der Wild-Typ Zelle, so zeigt sich, daß zwar die Amplitude und auch die Dauer der ersten Phase des Membraneinbaus sehr viel geringer sind als bei der transgenen Zelle. Die Kinetik aber ist gleich. In beiden Fällen werden die vorhandenen Vesikel mit der gleichen Geschwindigkeit eingebaut. Die größere Amplitude, die die Amylase-Zelle erreicht, muß demnach durch eine größere Menge sekretorischer Vesikel im Zytoplasma realisiert werden, die über einen längeren Zeitraum setserniert werden.

Um zu zeigen, daß diese einheitlichen Kinetiken ein Charakteristikum aller untersuchten Protoplasten sind, wird in Abbildung 3.31 eine Aufstellung der Kinetiken für mehrere Zellen gezeigt.

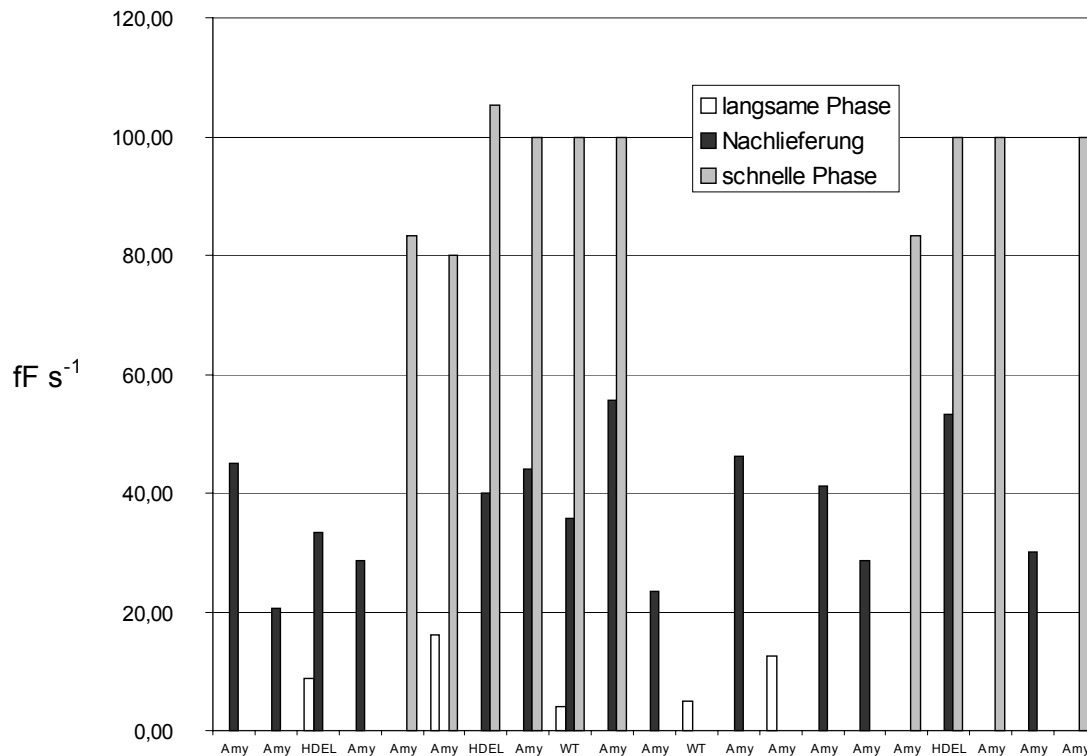


Abbildung 3.31 Kinetiken, wie sie aus verschiedenen Datensätzen ermittelt wurden.

Gezeigt sind die Kinetiken, die aus 21 ausgewählten Messungen ermittelt wurden. In etwa 30% der Meßreihen treten mehrere Phasen auf.

Unabhängig von der Art der untersuchten Zelle finden sich stets ähnliche Kinetiken: Eine schnelle Phase mit 100 fF s^{-1} und eine Nachlieferungreaktion mit etwa 35 fF s^{-1} .

Hier sieht man, daß einzelne Reaktionsgeschwindigkeiten unabhängig von der Art der Zelle immer wieder zu finden sind. Es gibt offenbar eine schnelle Reaktion von 100 fF s^{-1} und eine darauf folgende langsamere von 38 fF s^{-1} . Die schnelle Reaktion entspricht wahrscheinlich der direkten Fusion von angedockten Vesikeln, die langsamere Reaktion einem Nachlieferungsschritt. Eine weitere noch langsamere Reaktion im Bereich von 5 fF s^{-1} ist so nicht signifikant. Möglicherweise ist hier ein weiterer langsamerer Nachlieferungsschritt zu sehen. Es ist aber auch denkbar, daß Regulationen, die an der Endocytose angreifen, in der Überlagerung mit der Exocytose eine Kinetik simulieren, die tatsächlich die zufällige Überlagerung nicht gekoppelter Prozesse ist.

Untersucht man die gefundenen Kinetiken gezielt auf transgene und Wild-Typ sowie wild-typ-artige von HDEL-Zellen, so ergibt sich das Bild in Abbildung 3.32.

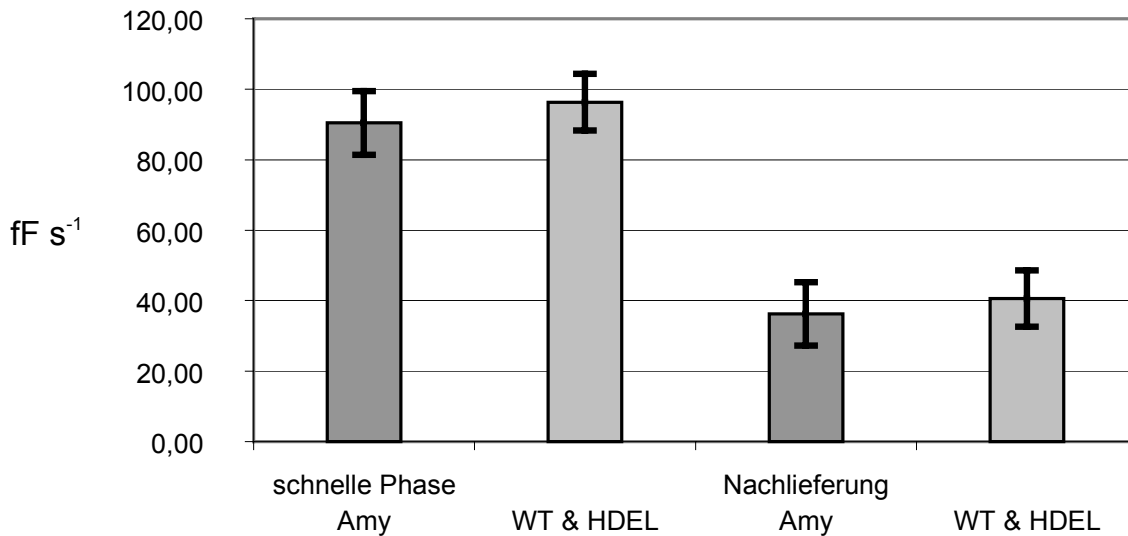


Abbildung 3.32 Kinetische Phasen der Exocytose in transgenen und Wild-Typ Zellen

Es lassen sich deutlich zwei Phasen des Membraneinbaues bei der konstitutiven Exocytose erkennen. Die Phasen sind unabhängig von der Menge des sekretorischen Proteins in der Zelle.

Die Geschwindigkeit der Exocytose ist unabhängig von der Menge sekretorischen Proteins. Eine Vergrößerung der Pools an sekretorischem Protein bewirkt eine Vergrößerung des Pools an sekretorischen Vesikeln.

3.4.6 Model für kalziumstimulierte Exocytose in Tabakzellen

Es wurde vermutet, daß die Amylase in konstitutiver Weise sezerniert werden würde. Das bedeutet, daß der zentrale Regulierungsmechanismus für die exocytotische Aktivität nicht innerhalb des sekretorischen Weges angesiedelt ist, sondern durch die Proteinsynthese selbst gegeben ist. Einer vergrößerten Proteinsynthese sollte eine erhöhte exocytotische Aktivität folgen, während Substanzen wie ATP oder eben Kalzium, die am sekretorischen Weg wirken nur modulierende Funktion haben dürften. Um zeigen zu können, daß es sich tatsächlich um konstitutive Exocytose handelt, wurde versucht die gemessenen Daten durch das Model für konstitutive Exocytose zu beschreiben, welches an Mais Koleoptilzellen erstellt worden war. Erste Versuche zeigten bereits sehr deutlich, daß das Model tatsächlich beiden Vorgängen gerecht wird. Obwohl die Messungen an doch recht unterschiedlichen Zellsystemen durchgeführt worden waren und zudem eines der Systeme genetisch manipuliert war, um höhere exocytotische Aktivität zu zeigen, konnten beide mit ein und demselben Modell beschrieben werden. Abbildung 3.33 zeigt einen Fit einer Datenreihe von Tabak, die mit dem Modell für die Ca²⁺-abhängige konstitutive Exocytose in Mais Koleoptilzellen (Abbildung 3.16) durchgeführt wurde.

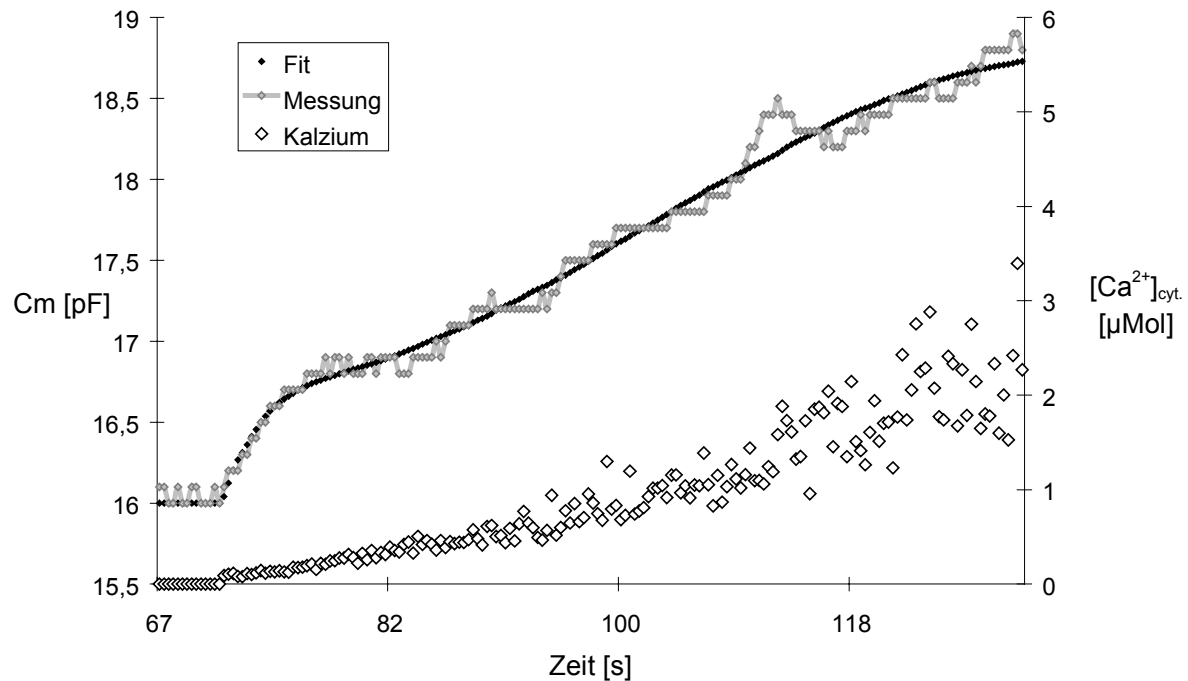


Abbildung 3.33 Fit des Modells für konstitutive Exocytose in Mais Koleoptilzellen an Daten von Tabakzellen

Die Membrankapazität und die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wurden synchron gemessen. Die Abbildung zeigt den Fit einer Datenreihe mit dem Modell für Ca^{2+} -abhängige konstitutive Exocytose, wie es an den Daten von Mais Koleoptilzellen entwickelt wurde. Der Fit ergab für die Poolgrößen: $A = 1.805$ pF, $B = 1.066$ pF, die Ratenkonstanten ergaben sich mit: $k_1 = 0.046$ [Ca^{2+}] $_{\text{cyt.}}$ [s^{-1}], $k_{-1} = 0.08$ [s^{-1}], $k_2 = 2.89$ [Ca^{2+}] $_{\text{cyt.}}$ [s^{-1}] und $k_{-2} = 0.0001$ [s^{-1}]. Der mittlere Fehler pro Datenpunkt beträgt 69 fF.

Die Ratenkonstanten, die sich aus der Anpassung an die Meßdaten ergeben, liegen durchweg innerhalb derselben Größenordnung, wie sie sich auch an Protoplasten aus Mais ergab.

Die Ratenkonstanten k_i ergeben sich, gemittelt über 14 Fits an Tabak Mesophyllprotoplasten zu (in Klammern angegeben die Faktoren a_i , wie sie für Mais Koleoptilzellen ermittelt wurden):

Ratenkonstanten	Fehler γ	a_i (Mais)
$k_1 = 0.05$ [Ca^{2+}] $_{\text{cyt.}}$ [s^{-1}]	+ 0.48, -0.05	(0.098)
$k_{-1} = 0.01$ [s^{-1}]	+ 0.36, -0.01	(0.002)
$k_2 = 2.60$ [Ca^{2+}] $_{\text{cyt.}}$ [s^{-1}]	+/- 1.61	(2.31)
$k_{-2} = 0.04$ [s^{-1}]	+/- 0.04	(0.07)

Der Fehler γ gibt die Abweichung der ermittelten Faktoren, wie sie sich im 'Joint-Fit' ergeben von den Faktoren bei Fit der einzelnen Datensätze an. Die ermittelten Werte machen deutlich, daß die Faktoren in den Ratenkonstanten noch relativ unsicher sind.

In einigen Tabakzellen lag die sekretorische Aktivität bis zu einem Faktor von 25 über dem normalen Wert, der an Mais Protoplasten oder an Tabak Wildtyp Zellen ermittelt werden konnte. Daher war es möglich, daß es bei der Weiterleitung der Transportvesikel durch den sekretorischen Weg an einigen Stellen zu Engpässen kommen würde. Das würde einen Stau von Vesikeln vor einigen kinetischen Schritten des Transportweges bewirken. Auf einen Stimulus hin würden dann zunächst Vesikel aus einem als nicht erschöpfbar anzusehenden Pool rekrutiert werden. Die Beschreibung des Vesikeltransportes sollte in diesem Falle analog zum Modell von Christian Heinemann für regulierte Exocytose besser durch eine Michaelis-Menten Kinetik möglich sein als durch einen Faktor (Abbildung 3.15). Dies gilt natürlich nur für den Transportschritt von Pool A nach B, da bei dem exocytotischen Schritt von B nach C davon auszugehen ist, daß die Vesikel im Pool bereits an der Plasmamembran andockt liegen und nur ein Kalziumstimulus zur finalen Fusion fehlt. Ein solcher Schritt ist, unabhängig von der Zahl der Vesikel in Pool B, nicht durch ein enzymkinetisches Modell zu beschreiben.

Gelänge eine bessere Beschreibung der Meßdaten mit einem Michaelis-Menten Schritt im Modell, so wäre das ein Hinweis auf einen Schritt im sekretorischen Weg, der als limitierender Faktor wirkt. Dann könnte man ausschließen, daß die Speicherkapazitäten des Golgi als begrenzender Faktor wirken.

Abbildung 3.34 zeigt einen Fit einer Messung an einer Zellen mit sehr hoher Amylaseaktivität, wobei ein modifiziertes Modell mit einem enzymkinetischen Nachlieferungsschritt verwendet wurde.

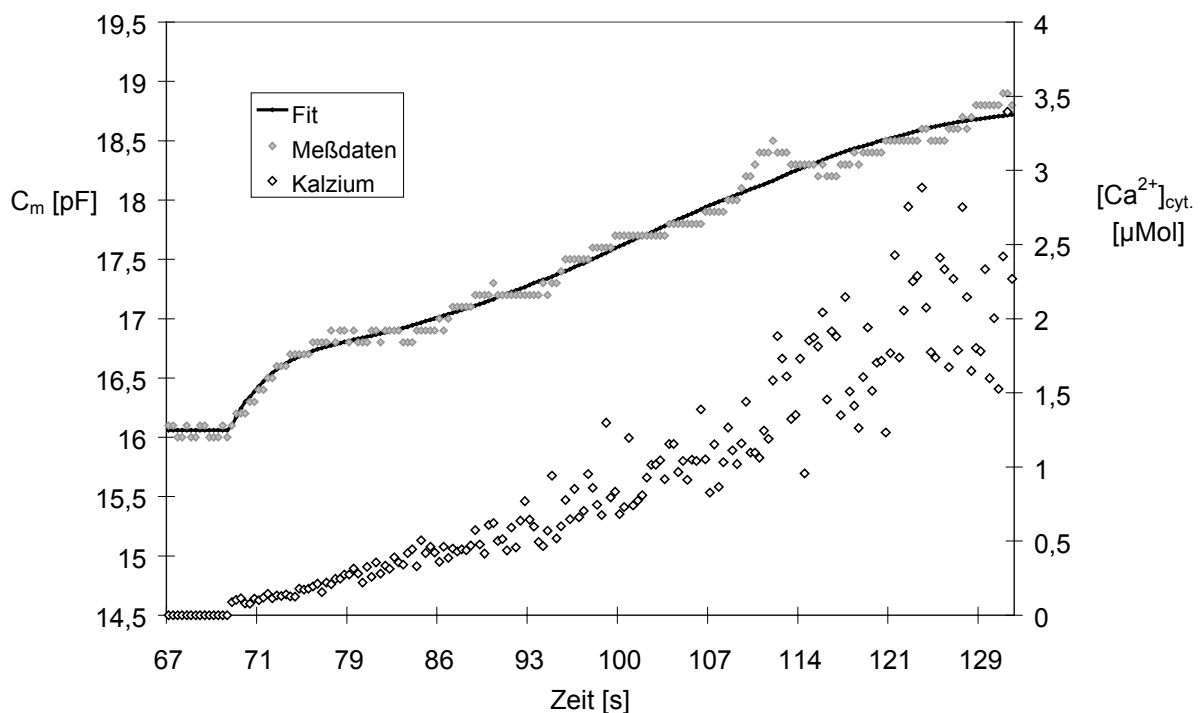


Abbildung 3.34 Versuch zur Bestimmung der Natur der Sättigung im Bereich hoher sekretorischer Aktivität

Die Abbildung zeigt einen Fit mit einem Modell, welches den Übergang von Pool A nach Pool B mit einer Michaelis-Menten Kinetik beschreibt (vergleiche hierzu Abbildung 3.33). Die Parameter ergeben sich mit: Poolgrößen: A = 0.990 pF, B = 1.790 pF und den Ratenkonstanten: $k_1 = 3.01 [Ca^{2+}]_{cyt.} / (0.054 + [Ca^{2+}]_{cyt.}) [s^{-1}]$, $k_{-1} = 0.116 [s^{-1}]$, $k_2 = 1.51 [Ca^{2+}]_{cyt.} [s^{-1}]$ und $k_{-2} = 0.07 [s^{-1}]$. Der mittlere Fehler pro Datenpunkt beträgt 67 fF.

Der Fit dieses Datensatzes mit dem an den Mais Zellen entwickelten Modell ist in Abbildung 3.33 gezeigt. Der Fit mit der Michaelis-Menten Funktion in Schritt von Pool A zu Pool B liefert ein Ergebnis mit einer geringfügig kleineren Abweichung von den Daten. Die Verbesserung der Fits durch die Einführung eines Michaelis-Menten Schrittes in das Modell ist aber so gering, daß die Ergebnisse nicht als signifikant aufgefaßt werden können. In gleicher Weise wurden 4 andere Datensätze untersucht, die an Zellen mit sehr hoher α -Amylase Aktivität aufgenommen wurden. In keinem Falle verbesserte die geänderte Komponente den Mittleren Fehler pro Datenpunkt um mehr als 3 fF.

Die Natur der Sättigung im sekretorischen Weg kann somit nicht sicher bestimmt werden. Die Tatsache, daß Fits mit Sättigungskinetik nicht deutlich besser sind, kann aber als Hinweis gewertet werden, daß die Sättigung der Sekretion bei hohem Gehalt an sekretorischem Protein oberhalb der hier untersuchten Vorgänge in frühen sekretorischen Weg zwischen ER und Golgi zu suchen ist.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Ca^{2+} -stimulierte Exocytose in Pflanzenzellen untersucht. Schwerpunkte der Arbeit sind dabei die Charakterisierung der Ca^{2+} -Abhängigkeit und die Beschreibung des Zusammenhanges zwischen sekretorischer Aktivität und der Menge an sekretorischem Protein.

Die Messungen zur sekretorischen Aktivität wurden mittels der Kapazitätsmessung durch die Patch Clamp Technik durchgeführt.

4.1 Einfluß von Membraneigenschaften auf die durchgeführten Messungen

Eine Vielzahl von möglichen Membranmodellen stand zur Verfügung. Jedes davon mit einer unterschiedlichen Prognose inwieweit die Membrankapazität von Dehnung oder Stauchung der Membran beeinflusst werden würde.

Messungen an Tonoplasten, die durch hydrostatischen Druck gedehnt wurden erlaubten hier zwar nicht die genaue Festlegung auf ein bestimmtes Modell, konnten aber zumindest einige Möglichkeiten ausschließen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Konformationsänderungen der Tonoplastenmembran durch Dehnung nur einen sehr geringen Einfluß auf die Kapazität der Membran haben. Dementsprechend kann geschlossen werden, daß die Zunahme an Membrankapazität das Resultat von Einlagerung zusätzlicher Membran in die PM anzeigt.

Die mittlere Dehnbarkeit der Membran, die mit den Experimenten an Tonoplasten ermittelt werden konnte ist mit $> 6\%$ höher als die von $< 5\%$, die von Steponkus und Mitarbeitern angegeben werden [Wolfe & Steponkus, 1981, Wolfe et al., 1985], oder die 2-3%, die Evans und Mitarbeiter ermittelten [Evans et al., 1976].

Betrachtet man diese Daten aber in Zusammenhang mit den Ergebnissen aus dem Labor von Steponkus [Steponkus, 1991], so ist das nicht überraschend. Steponkus interpretiert das Zerreißen von Membran infolge Dehnung als einen Anstieg einer Wahrscheinlichkeit für einen Membranriß mit zunehmendem Zug. Diese Interpretation wird gestützt durch sehr umfangreiche Experimente bei denen auch unterschiedliche Methoden zur Dehnung verwendet wurden [Gordon-Kamm & Steponkus, 1983, Wolfe & Steponkus, 1983]. Damit ist das Zerplatzen des Tonoplasten oder Protoplasten determiniert durch ein statistisches Ereignis, welches an einem lokalen Ort auf der Membran stattfindet. Ein einzelner Ort auf der Membran bestimmt also das Gesamtergebnis mit. Damit müssen Verfahren, die keinen Ort der Membran besonderer Belastung aussetzen, zwangsläufig zur höheren Membranfestigkeiten führen als Methoden, die zur Dehnung der Membran an einem Ort angreifen, wie das Einsaugen in eine Pipette [Wolfe et al., 1985, Nicol & Hutter, 1996] oder das Dehnen an einem 'Bead' (Membrananker) [Sheetz & Dai, 1996]. Das Schwellen eines Tonoplasten infolge eines gleichmäßig wirkenden Druckes ist verglichen mit Methoden die an einem lokal recht begrenzten Ort angreifen ein sehr schonendes Verfahren. Auch innerhalb der hier vorgestellten Experimente fällt auf, daß die größtmöglichen Dehnungen gerade dann erreicht wurden, wenn der Tonoplast mit sehr geringem hydrostatischen Druck gedehnt wurde.

Offenbar ist der Tonoplast über den für das Plasmalemma verschiedener Zellen ermittelten Wert [Evans et al., 1976, Wolfe et al., 1985, Needham & Hochmuth, 1989] hinaus dehnbar.

Der hier ermittelte Wert von $(6 \pm 0.7)\%$ liegt relativ dicht unterhalb der von Stoeckenius und Engelman [1969] an Hand von Berechnungen über die Struktur von

Biomembranen prognostizierten Wert von etwa 7-8% . Auch Sackmann und Mitarbeiter [1973] geben die Dehnbarkeit von Biomembranen auf Grund von Modellbetrachtungen mit 7 % an. Diese Werte scheinen also durch ein hinreichend schonendes experimentelles Verfahren tatsächlich verifizierbar zu sein.

Angemerkt werden muß zu den Vergleichen allerdings, daß alle oben angeführten Experimente an der äußeren Zellmembran durchgeführt wurden. Es ist vorstellbar, daß die Tonoplastenmembran sich in ihrer Lipidzusammensetzung oder in den Membranproteinen in einer Art unterscheidet, die eine höhere Dehnbarkeit erlaubt. Die Berechnungen der Membrandehnbarkeit basieren stets auf der Betrachtung reiner [Sackmann et al., 1973], bei Stoeckenius und Engelmann [1969] sogar homogener Lipidlayer. Die Art und der Anteil von Membranproteinen mag eine erhebliche Rolle bei der Dehnbarkeit realer Membranen spielen, was Unterschiede zwischen Messungen am Plasmalemma und dem Tonoplasten auf der einen Seite und Berechnungen für Lipidlayer auf der anderen Seite erklärt.

Solsona und Mitarbeiter prognostizieren [1998], daß der Wert von $\epsilon_m = \epsilon_0 \epsilon_r / d$ mit 5 pFm^{-2} eine quasi Naturkonstante für alle Biomembranen darstellt. Abweichende, größere Werte kommen, so Solsona, durch Einfaltungen der Membran an zytoplasmatischen Strukturen zustande, die eine fehlerhafte, zu geringe Abschätzung der Oberfläche bewirken.

In diesem Zusammenhang ist der Tonoplast als Modellsystem gut geeignet, da eine isolierte Vakuole in Lösung Kugelgestalt annimmt, was eine exakte Berechnung der Oberfläche erlaubt. Weiterhin ist aus elektronenoptischen Untersuchungen des Tonoplasten bekannt, daß die Membran keinerlei Einfaltungen aufweist. Messungen am Tonoplasten erlauben eine genaue Bestimmung der Gesamtmembranfläche.

Die Hypothese Solsonas konnte hier nicht bestätigt werden. Der Wert von ϵ_m , der in den hier beschriebenen Experimenten ermittelt wurde lag durchweg über 5 pFm^{-2} . Die relative Membrankapazität des Tonoplasten beträgt im Mittel 8.5 pFm^{-2} . Wird der Tonoplast maximal gedehnt, so sinkt der Wert von ϵ_m auf 8.3 pFm^{-2} .

Die relative Dielektrizitätskonstante wird für reines Lipid von Kwok und Evans mit 3 bis 4 pFm^{-2} angegeben [Kwok & Evans, 1981]. Für reale Membranen aus Organismen ergeben sich deutlich höhere Werte. Gustin gibt den Wert für die Plasmamembran von Hefe mit zwischen 6 pFm^{-2} und 11 pFm^{-2} an [Gustin et al., 1988], für die Hüllmembran roter Blutkörperchen wird von Evans ein Wert von 6 – 12 pFm^{-2} beschrieben [Evans et al., 1976].

Werte, wie sie für die Plasmamembran von Pflanzenzellen ermittelt wurden, liegen genau im Bereich, der hier für den Tonoplast gefunden wurde. Homann und Tester ermittelten [1998] einen Wert von 7.5 pFm^{-2} für das Plasmalemma von Gersten Aleuronzellen, Carroll und Mitarbeiter Werte von 8 pFm^{-2} für Mais Koleoptilzellen und 7.5 pFm^{-2} für Zellen aus Mais Wurzelspitzen [Carroll et al., 1998].

Mit der Hypothese von Solsona besteht insofern Übereinstimmung, als daß prognostiziert wird, daß sich die Dielektrizitätskonstante einer Membran, die nicht an zytoplasmatischen Strukturen gefaltet ist, unter Dehnung auch kaum ändern sollte. Das ist genau, was hier für den Tonoplasten bestätigt werden konnte.

Wollte man mit dem hier verwendeten Verfahren weitere, präzisere Messungen durchführen, so müßte man als erstes wohl eine Kühlung des Badmediums in Betracht ziehen. Die Kugelgestalt des Untersuchungsobjektes und die Möglichkeit

die Dehnung schon mit sehr geringen Kräften durchführen zu können, erlauben vermutlich schon Messungen bis dicht an die Schwelle, oberhalb derer Membranen bei Dehnung auf Grund ihrer molekularen Struktur zerreißen. Könnten darüber hinaus Molekülbewegungen durch Kühlung verringert werden, so würde die Rauschbreite geringer, was eventuell eine Festlegung auf ein Membranmodell erlauben würde und darüber hinaus würde □, die Wahrscheinlichkeit für eine Ruptur pro wirksamen Zuges, noch einmal verringert.

Neben den Ergebnissen zur Natur von Tonoplastenmembranen stützen die Befunde die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Annahme, dass Änderungen der Membrankapazität stets den Einbau oder die Wegnahme von Membranmaterial bedeuten. Messungen der Membrankapazität stellen auch unter verschiedenen thermodynamischen Bedingungen ein direktes Maß für die Oberfläche dar.

4.2 Erkennung und Beseitigung von Artefakten

Es muß hier zunächst noch einmal deutlich betont werden, daß das hier verwendete Modellsystem transgener Tabakzellen trotz vieler Vorteile nur bedingt für die durchgeführten Experimente geeignet war.

Die Grundvoraussetzung bei jeder Art von Patch-Clamp Messung ist die Ausbildung des Abdichtwiderstandes in der Größenordnung von $G\Omega$ zwischen Pipette und Membran. Ohne diese elektrisch dichte Verbindung ist ein vernünftiges Messen nicht denkbar. Die Untergrenze für den Sealwiderstand wird von Penner mit einigen $G\Omega$ angegeben [Penner, 1995]. Gerade im Bereich der Pflanzenzellen werden Meßsysteme häufig auch unter dem Aspekt gewählt, ob eine vernünftige Wahrscheinlichkeit besteht, einen Abdichtwiderstand im $G\Omega$ -Bereich zu erreichen [Elzenga et al., 1991; De Boer et al., 1994].

Für Messungen der Membranleitfähigkeit ist der Sealwiderstand insofern weniger kritisch, als daß das Signal-Rausch Verhältnis eine direkte Einschätzung des Wertes einer Messung erlaubt. In die Messung der Membrankapazität geht der Sealwiderstand in leidlich komplexer Weise ein [Gillis, 1995]. Eine Abschätzung der Güte einer Messung ist relativ schwierig.

Wenn der Widerstand sich wie mit den hier verwendeten Zellen statt im Bereich von $G\Omega$ routinemäßig nur im Bereich mehrerer hundert $M\Omega$ bewegt, so sind die gewonnenen Daten für Kapazitätsmessungen nicht mehr ohne weiteres nutzbar.

In Anlehnung an die detaillierten Ausführungen von Gillis in 'Single Channel Recording' [1995] wurden Algorithmen erstellt, mit denen die Meßbedingungen an lock-in Verstärkern zuverlässig simuliert werden konnten [Sigworth et al., 1995b].

An einer Messung wurde beispielhaft gezeigt, daß Artefakte, die durch geringe oder instabile Werte des Sealwiderstandes oder der Zugriffsleitfähigkeit entstehen, korrigiert werden können. Auch Schwankungen in der Membranleitfähigkeit oder der Membranspannung können nachträglich ausgeglichen werden.

Erst mit dieser Methode war es möglich Kapazitätsmessungen zur Oberflächenbestimmung an Protoplasten aus transgenen Tabak Mesophyllzellen durchzuführen.

4.3 Ca²⁺-stimulierte Exocytose in Pflanzenzellen

Sekretion in Pflanzenzellen wird reguliert durch die Synthese des sekretorischen Proteins.

Treten innerhalb der sekretorischen Weges Ca²⁺-abhängige Schritte auf, so dienen diese lediglich der Modulation der sekretorischen Aktivität oder der Kopplung an einen hormonellen Signalweg.

Ausgehend von einem Modell, welches Heinemann und Mitarbeiter zur Beschreibung von regulierter Exocytose entwickelt haben [Heinemann et al., 1993 & 1994], konnte ein Modell erstellt werden, das die gewonnenen Daten beschreiben kann.

Es gelang zu zeigen, daß die Sekretion in den untersuchten Zellen tatsächlich in konstitutiver Weise abläuft, daß also die Synthese der sekretorischen Proteine der maßgebliche regulierende Schritt ist und innerhalb des Transportweges keine regulatorischen Schritte angesiedelt sind, an denen ein Weitertransport der Vesikel unter normalen physiologischen Bedingungen nicht statt findet.

Das erstellte Modell steht in guter Übereinstimmung mit der Vorstellung von konstitutiver Exocytose als einem System im Fließgleichgewicht. Die Tatsache, daß kein Schwellenwert für die Kalziumkonzentration benötigt wird, ebenso wie die im Hintergrund permanent ablaufende Endocytose, beschreiben genau die entsprechenden Prozesse.

Die Auflösungsgenauigkeit des Modells wirkt im Vergleich zu Modellen an anderen Zellsystemen recht grob. Einzelne Schritte der Exocytose vor allem in Nervenzellen sind inzwischen auf einem Level modelliert, der es erlaubt einzelnen kinetischen Schritten die Reaktion einzelner Moleküle zu zuordnen [Xu et al. 1998 & 1999, Review, Brunger, 2000]. Besonders die Fortschritte, die in den letzten Jahren auf dem Gebiet der an der Fusion von Vesikeln und Zielmembran direkt beteiligten Proteine gemacht wurden, haben es ermöglicht Bindungsreaktionen zwischen Proteinen und Konformationsänderungen einzelner Proteine in die Erstellung von Modellen mit einzubeziehen [Chapman & Davis, 1998, Wei et al., 2000].

Betrachtet man aber konkret das Gebiet der konstitutiven Exocytose, so ist das Auflösungsvermögen von beschreibenden Modellen noch wesentlich geringer als für regulierte Exocytose.

Auch muß angemerkt werden, daß die verschiedenen Modelle auf deutlich unterschiedlichen Zeitskalen arbeiten. Die Prozesse, die einzelnen Proteinreaktionen zugeordnet werden können, nehmen innerhalb des Zeitraumes, der von dem hier beschriebenen Modell abgedeckt wird, einen winzigen Zeitbereich in Anspruch. Zieht man andere Modelle heran, die einen größeren Bereich im sekretorischen Weg zu beschreiben suchen, so findet man vergleichbare Auflösung einzelner Schritte. [Heinemann et al., 1993 & 1994; Fujita-Yoshigaki, 2000].

Die Abhängigkeit der Exocytoserate von der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration konnte in linearer Weise beschrieben werden. Regulierte Exocytose wurde mehrfach mit einer Kalziumabhängigkeit in quadratischer oder kubischer Weise beschrieben [Heinemann et al., 1993, Heidelberger et al. 1994]. Das bewirkt, daß Änderungen in der Konzentration des freien Kalziums im Zytoplasma einen starken Einfluß auf die Exocytoserate haben. Im hier untersuchten Fall hat das Kalzium offenbar mehr einen modulierenden Einfluß. In gleicher Weise wurde konstitutive Exocytose auch von Bourgoyne und Mitarbeitern [Bourgoyne et al., 1998] in Epithelzellen aus dem Milchgewebe von Mäusen beschrieben. Es wurden aber auch in regulierten sekretorischen Wegen lineare Ca²⁺-Abhängigkeiten gezeigt, so von Thomas und

Mitarbeitern, die eine Abhängigkeit von 3 nicht kooperativ wirkenden Ca^{2+} -Ionen im letzten Sekretionsschritt in Melanotrophen zeigen konnten [Thomas et al., 1993]. Für mehrere Zellsysteme konnte auch kalziumunabhängige konstitutive Exocytose gezeigt werden [Lew & Simon, 1991; Burgoyne & Duncan, 1998], dies schließt auch pflanzliche Systeme ein [Homann & Tester, 1997]. Im Falle der von Lew und Simon vorgestellten Ergebnisse an Hefezellen ist die Interpretation aber immer noch umstritten. Burgoyne konnte neben einem Ca^{2+} -sensitiven sekretorischen Weg noch einen Anteil an Sekretion nachweisen, der Ca^{2+} -unabhängig sezerniert wurde.

Da konstitutive Exocytose also auch Ca^{2+} -unabhängig vorkommt, stellt sich die Frage nach einer möglichen physiologischen Bedeutung der Ca^{2+} -stimulierten Exocytose, wie sie in den Mais Koleoptilen realisiert ist. Bei Zellen aus dem oberen Bereich der Mais Koleoptile handelt es sich um vollständig ausdifferenzierte Zellen, die lediglich noch Streckungswachstum durchführen. Streckungswachstum beinhaltet die Notwendigkeit zu erhöhter sekretorischer Aktivität [Willison, 1981], um Zellwandproteine in den Apoplasten zu sezernieren. Weiterhin wird Streckungswachstum in Pflanzenzellen gemeinhin mit dem Phytohormon IAA in Verbindung gebracht [Galston 1961]. Felle konnte [1988] zeigen, daß ein Stimulus mit IAA einen vorübergehenden Anstieg in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ zu Folge hat. Die dabei gemessenen Amplituden der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ -Auslenkung lagen im Bereich von einigen 100 nMol bis zu einem μMol . Mit Ca^{2+} -Auslenkungen in genau diesem Bereich wurde in der vorliegenden Arbeit in Protoplasten aus der Mais Koleoptile Sekretion stimuliert.

Möglicherweise stellt die hier aufgezeigte Kopplung der konstitutiven Sekretion an $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ ein Bindeglied innerhalb der Signalkette von IAA dar.

Vergleicht man die am Modell ermittelten Ratenkonstanten mit Literaturdaten anderer Zellsysteme, so zeigt sich, daß der exocytotische Schritt in derselben Größenordnung liegt wie von Heinemann [Heinemann et al., 1993] oder Heidelberger [Heidelberger et al., 1994] beschrieben. Das legt die Vermutung nahe, daß diese Ratenkonstante durch einen Schritt determiniert wird, der für alle untersuchten Zellarten nahezu gleich ist. Denkbar ist hier eine Interaktion zwischen einem Kalziumion und einem so genannten SNARE-Komplex [Brunger, 2000]. Bock und Scheller konnten zeigen, daß Vesikel mit der Zielmembran fusionieren, wenn der SNARE-Komplex eine Konformationsänderung durchmacht [Bock & Scheller, 1999]. Ein denkbarer Stimulus für solch eine Änderung wäre die Bindung mit einem Kalziumion [Sugita & Südhof, 2000]. Mit der ermittelten Ratenkonstanten für den sekretorischen Schritt im konstitutiven exocytotischen Weg ergibt sich ein erster, wenn auch indirekter, Hinweis auf die Beteiligung von SNAREs auch an den Fusionsvorgängen in Mais Koleoptilzellen.

4.4 Physiologische Relevanz der Ca^{2+} -Antwort

Herauszustreichen ist sicher, daß die Messungen an Mais und Tabak Protoplasten mit unterschiedlichen Techniken des Ca^{2+} -Stimulus durchgeführt wurden. Gerade die Infusionstechnik, die bei den Messungen an Tabak angewendet wurde, bewirkte nur einen sehr geringen Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ auf Werte meist unterhalb von $1 \mu\text{M}$. Gerade hohe Werte von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ können Anlaß zu Artefakten sein. Oberhauser und Mitarbeiter beschreiben eine regulierte exocytotische Komponente, die nur unter sehr hohen, wahrscheinlich unphysiologisch hohen, Ca^{2+} -Konzentrationen auftritt [Oberhauser et al., 1995a]. Erst vergleichende Messungen von Membrankapazität und Amperometrie erlaubten eine Aufklärung der gemessenen Phänomene [Oberhauser et al., 1995b]. Oberhauser und Mitarbeiter warnen ausdrücklich vor der Verwendung unphysiologischer Ca^{2+} -Konzentrationen zur Stimulierung von Exocytose. Daß die Messungen an Tabak mit geringen Ca^{2+} -Konzentrationen ähnliche Ergebnisse liefern, wie die an Mais, wo Werte von bis zu $4 \mu\text{M}$ für $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ erreicht wurden, ist ein Hinweis, daß auch bei den Messungen an Mais keine Artefakte auftraten.

Auch das stützt die Überlegungen zu einer möglichen Einbindung der hier beschriebenen Ca^{2+} -Abhängigkeit in die Reaktionskette IAA-induzierten Längenwachstums.

4.5 Abhängigkeit der Sekretion von der Menge sekretorischen Proteins

Die an dem Tabaksystem gewonnenen Daten stellen erstmals eine parallele Messung vom Vorkommen eines sekretorischen Proteins einerseits und der resultierenden exocytotischen Aktivität andererseits dar.

Einer Menge sekretorischer Proteine in einer Pflanzenzelle entspricht ein Pool sekretorischer Vesikel im Zytoplasma.

Vergrößert oder verringert sich das Aufkommen an sekretorischem Transportgut, so führt das zu einer Änderung der Poolgröße. Änderungen der sekretorischen Aktivität werden nicht durch kinetische Änderungen am Sekretionsmechanismus selbst vermittelt.

Dies steht in guter Übereinstimmung mit neueren Arbeiten zu den an der Sekretion beteiligten Proteinen [Brunger, 2000]. Die Proteine zur Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran vermitteln danach einen 'Alles-oder-Nichts' Prozeß. Regulation muß vor dem eigentlichen Sekretionsprozeß angreifen.

Exocytose wird derzeit vor allem unter dem Aspekt der Regulation von Reaktionsschritten kurz vor der Fusion des Transportvesikels mit der Plasmamembran oder während der Fusion selbst untersucht. Selbst bei Arbeiten an Systemen, die eine oder mehrere Proteinsorten konstitutiv sezernieren, wird der Fokus der Experimente im Wesentlichen auf Schritte im Transportwege gerichtet [Lew & Simon, 1991, Burgoyne & Duncan, 1998]. Das Grundkonzept zur Unterscheidung der konstitutiven von der regulierten Exocytose basiert aber eben gerade darauf, daß der zentrale regulatorische Schritt in der konstitutiven Sekretion die Syntheserate des sekretorischen Proteins selbst ist. Willison zeigte [1981], daß erhöhte Sekretion gerade in Zellen zu verzeichnen ist, die hohe Raten an Zellwandproteinen synthetisieren.

Schritte innerhalb des Transportweges haben nur modulierenden Charakter.

Um ein Maß für die Syntheserate eines sekretorischen Proteins zu haben, bietet es sich an, an Systemen zu messen, die Enzyme sezernieren. Lew und Simon konnten eine umfangreiche Analyse konstitutiver Exocytose von Invertase aus Hefezellen erstellen [Lew & Simon, 1991], wobei sie sich die enzymatische Wirkung der Invertase zur Synthesebestimmung zu Nutze machen konnten. Im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, fanden sie die konstitutive Exocytose in Hefe vollständig kalziumunabhängig. Schmitt allerdings beschreibt, daß eine hohe Kalziumkonzentrationen im Zytoplasma die eingeschränkte Sekretion einer temperatursensitiven Hefe-Mutante (*ypt1*) wieder herstellen kann [Schmitt et al. 1988]. Dieser Effekt deutet auf einen kalziumempfindlichen Schritt im sekretorischen Weg der untersuchten Zellen hin.

Neu an den hier vorgestellten Ergebnissen ist die Fokussierung auf den Zusammenhang von Proteinsyntheserate und exocytotischer Aktivität. Das System der transgenen Tabakpflanzen lieferte Meßobjekte, die eine weite Bandbreite von Proteinsyntheserate abdecken: von keiner zusätzlichen Proteinsynthese und Exocytose, wie in Wildtyp Pflanzen und in HDEL-Exemplaren kurz nach der Protoplastierung, bis hin zu extrem hohen Syntheseraten in einigen transgenen Amylase Pflanzen. Die Tatsache, daß es sich bei dem zusätzlich sezernierten Protein um das Enzym α -Amylase handelt, für das eine Vielzahl etablierter Assays zur Aktivitätsbestimmung existieren, ermöglichte dann erst die Quantifizierung der in einer Zelle synthetisierten Menge. Bei der mathematischen Beschreibung des Zusammenhanges der Synthese sekretorischen Proteins und der Sekretionsrate wurde mit einem enzymkinetischen Modell bewußt ein Modell gewählt, welches keinerlei Implikationen über Art oder Transportgut der sekretorischen Vesikel beinhaltet. Anders als Vesikel des regulierten sekretorischen Weges sind die sogenannten glatten Vesikel des konstitutiven Weges von uneinheitlicher und höchst unregelmäßiger Gestalt [Schmoranzner et al. 2000, Toomre et al., 2000]. Damit sind Annahmen über das Verhältnis von exocytierter Membran zur Menge sekretorischen Proteins bisher nicht möglich.

Neben der Beschreibung der konstitutiven Exocytose in Abhängigkeit von der Synthese sekretorischen Proteins gelang es weitere Daten zu gewinnen, die für zukünftige Arbeiten an dem verwendeten Zellsystem von Nutzen sind. Die Ca^{2+} -Gleichgewichtskonzentrationen im Zytoplasma beträgt 180 nM in Tabakzellen. Der Wert liegen in einem Bereich, der auch schon für andere Pflanzliche Systeme ermittelt wurde, so 1997 von Bauer für die Grünalge *Eremosphaera virides* mit 160 nMol [Bauer et al., 1997] und für die auch hier verwendeten Zellen aus der Mais Koleoptile mit 120 nMol [Felle, 1988]. Mit der Kenntnis der Ca^{2+} -Gleichgewichtskonzentration ist es möglich, Experimente so zu gestalten, daß nur geringe Auslenkungen von der Gleichgewichtskonzentration auftreten.

Um an den Tabak System weitere Ergebnisse zu gewinnen, wären länger andauernde Messungen erstrebenswert. Es gelang aufgrund der meist nur kurz haltenden Sealwiderstände nicht Messungen durchzuführen, die den endocytotischen Schritt genauer charakterisiert hätten. Nach den hier vorgestellten Ergebnissen wird die Endocytose weder von $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ noch von dem exocytotischen Ereignis stimuliert. Wahrscheinlich entspricht die Endocytoserate nach einem exocytotischen Ereignis der Rate im Gleichgewichtszustand. Da im Gleichgewichtszustand Exocytose und Endocytose gerade ausbalanciert sind, entspricht, die Rate, die aus längeren Meßreihen ermittelt werden könnte der Exocytoserate im Ruhezustand.

Ebenfalls erstrebenswert wäre die Verwendung eines reduzierbaren sekretorischen Proteins, welches der Amperometrie zugänglich wäre [Gonon et al., 1993], oder eines fluoreszenzmarkierten Proteins, welches mittels Evanescent Light Microscopy [Omann & Axelrod, 1996, Oheim et al., 1998] detektiert werden könnte.

Jeder der Techniken würde eine genauere Aufklärung des Verhältnisses von exocytierter Membran zu sezerniertem Protein erlauben, da damit parallel zur Messung der Exocytose eine Messung der Sekretion erfolgen könnte.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Ca^{2+} -stimulierten Exocytose in Pflanzenzellen. Im Vorwege war es notwendig die Eignung der gewählten Untersuchungstechnik für die Fragestellung zu untersuchen.

5.1 Eigenschaften der Tonoplastenmembran

Es konnte gezeigt werden, daß die Größe der Membrankapazität mit dem thermodynamischen Zustand der Membran nur schwach korreliert ist.

- Die experimentelle Bestimmung der Oberfläche eines Tonoplasten oder eines Protoplasten mittels Messung der Membrankapazität wird durch Effekte, wie die Dehnung oder Stauchung der Membran wenig beeinflusst und ist gut geeignet auch unter solchen Bedingungen Exocytose und Endocytose aufzuzeichnen.

Mit einem vergleichsweise einfachen Versuchsaufbau wurde weiterhin eine Menge an Membraneigenschaften bestimmt oder zumindest eingegrenzt. 'Einfach' ist weniger der recht komplexe Meßaufbau als vielmehr der am Untersuchungsobjekt selbst angreifende Teil des Aufbaus. Es werden keine Verankerungen für Zugvorrichtungen in der Membran verwendet und der Protoplast oder Tonoplast wird nicht in irgendeine besondere Geometrie verformt. Das Untersuchungsobjekt hat ideale Kugelform ohne Stellen, an denen besondere Kräfte angreifen.

- Der Tonoplast ist um 6 % dehnbar.
- Die relative Membrankapazität des Tonoplasten beträgt 8.5 pF m^{-2} und ändert sich bei Dehnung der Membran kaum.

5.2 Messungen unter nichtidealen Bedingungen

Die verwendeten Zellsysteme waren der gewählten experimentellen Technik nur bedingt zugänglich.

- Es können aber auch unter Bedingungen, die im Patch Clamp Experiment erhebliche Artefakte verursachen, verlässliche Kapazitätsmessungen durchgeführt werden.

Mit Algorithmen, die Störungen der Messung durch ungünstige Meßparameter berücksichtigen, konnten an transgenen Tabakzellen Messungen von Exocytose und Endocytose durchgeführt werden.

5.3 Ca²⁺-stimulierte konstitutive Exocytose in Pflanzenzellen

An zwei verschiedenen pflanzlichen Zellsystemen wurden Charakteristika der Ca²⁺-stimulierten Exocytose untersucht und beschrieben.

- In beiden untersuchten Fällen handelt es sich um konstitutive Exocytose, das heißt, Sekretion in diesen Zellen ist ein Prozeß, der gesteuert wird durch die Syntheserate an Transportgut und der in sekretorischen Weg von [Ca²⁺]_{cyt.} modifiziert wird.

In beiden Systemen konnte die Abhängigkeit der Exocytose von Änderungen in [Ca²⁺]_{cyt.} beschrieben werden.

- Ein kinetisches Modell zeigt, daß in sekretorischen Weg wenigstens zwei Ca²⁺-stimulierte Schritte liegen. Beide Schritte sind in linearer Weise von [Ca²⁺]_{cyt.} abhängig.
- Zeigen verschiedene Zellen unterschiedliche Sekretionsraten, so resultiert dies aus verschiedenen großen Pools sekretorischer Vesikel im Zytoplasma der Zellen.

Der letztgenannte Punkt wurde unter Verwendung hypersekretorischer Pflanzen weiter untersucht. Damit gelang im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Korrelation einer Menge eines sekretorischen Proteins mit exocytotischer Aktivität.

- Auch in hypersekretorischen Pflanzernzellen wird die vergrößerte Sekretionsrate nur durch einen Anstieg in der Menge der sekretorischen Vesikel realisiert.

Die Abhängigkeit der sekretorischen Aktivität von der Menge an sekretorischem Protein, welches synthetisiert wird, gehorcht einer Sättigungskinetik. Der Faktor, welcher für die Sättigung verantwortlich ist liegt vermutlich im frühen sekretorischen Weg zwischen ER und Golgi.

6 Verzeichnisse

6.1 Literatur

Artikel, die in bestimmten Aspekten wesentlich für die vorliegende Arbeit waren, sind jeweils kurz kommentiert.

Allen, G.J. & Sanders, D. (1996) "Control of Ionic Currents in Guard Cell Vacuoles by Cytosolic and Luminal Calcium" *Plant J.* **10**, 1055-1069.

Adams, D. & Carvadine, M. (1992) 'Last Chance to See', 2. Auflage, (Birmingham, Ballantine Books).

Bauer, C.S., Plieth, C., Hansen, U.P., Sattelmacher, B., Simonis, W. und Schönknecht, G. (1997) "Repetitive Ca²⁺-Spikes in a Unicellular Green Alga" *FEBS Lett* **405**, 390-393.

Bassham, D.C. & Raikhel, N.V. (1999) "The Pre-Vacuolar t-SNARE AtPEP12p Forms a 20S Complex that Dissociates in the Presence of ATP" *Plant J.* **19**, 599-603.

Bennet, M.K. und Scheller, R.H. (1993) "The Molekular Machinery is Conserved from Yeast to Neurons" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2559-2563.

Bock, J.B. & Scheller, R.H. (1999) "SNARE Proteins Mediate Lipid Bilayer Fusion" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12227-12229.

Bradford, M.M. (1976) "A Rapid Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye binding" *Anal. Biochem.* **72**, 248-254

Brunger, A.T. (2000) "Structural Insights Into the Molecular Mechanism of Ca²⁺-Dependent Exocytosis" *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 293-302.

Burgess, T.L. & Kelly, R.B. (1987) "Costitutive and Regulated Exocytosis of Proteins" *Ann. Rev. Cell Biol.* **3**, 243-293.

Burgoyne, R.D., Duncan, J.S. und Sudlow, A.W. (1998) "Role of Calcium in the Pathway for Milk Protein Secretion and Possible Relevance for Mammary Gland Physiology" *Biochem. Soc. Symp.* **63**, 91-100.

Burgoyne, R.D. & Duncan, J.S. (1998) "Secretion of Milk Proteins" *j. Mam. Gland Biol. Neoplasia* **3**, 275-286.

Cacci, M.S., and Cacheris, W.P. (1984) "Fitting Curves to Data - The Simplex Algorithm is the Answer" *BYTE* **5**, 340-362.

Carrol, A.D., Moyen, C., Van Kesteren, P., Tooke, F., Battey, N. und Brownlee, C. (1998) "Ca²⁺, Annexins and GTP Modulate Exocytosis From Maize Root Cap Protoplasts" *Plant Cell* **10**, 1267-1276.

Chapman, E.R. & Davis, A.F. (1998) "Direct Interaction of a Ca^{2+} -Binding Loop of Synaptotagmin with Lipid Bilayers" *J. Biol. Chemistry* **273**, 13995-14001.

Chavez, R.A., Miller, S.G. und Moore, H.P. (1996) "A Biosynthetic Regulated Secretory Pathway in Constitutive Secretory Cells" *J. Cell Biol.* **133**, 1177-1191.

Copello, J., Simon, B., Segal, Y., Wehner, F., Ramanujam, V.M., Alcock, N. und Reuss, L. (1991) " Ba^{2+} Release from Soda Glass Modifies Single Maxi K^+ Channel Activity in Patch Clamp Experiments" *Biophys. J.* **60**, 931-941.

Cota, G. & Armstrong, C.M. (1988) "Potassium Channel "Inactivation" Induced by Soft Glass Patch Pipettes" *Biophys. J.* **53**, 107-109.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse geben einen Überblick über das Sekretionsverhalten von Proteinen mit ER-Retentionssequenzen wie dem HDEL-Terminus.

Crofts, A.J., Leborgne-Castel, N., Hillmer, S., Robinson, D.G., Phillipson, B., Carlsson, L., Ashford, D.A., und Denecke, J. (1999) "Saturation of the Endoplasmic Reticulum Retention Machinery Reveals Anterograde Bulk Flow" *Plant Cell* **11**, 2233-2248.

Dai, J. & Sheetz, M.P. (1995) "Mechanical Properties of Neuronal Growth Cone Membranes Studied by Tether Formation with Laser Optical Tweezers" *Biophys. J.* **68**, 988-996.

Davis, A.F., Bai, J., Fasshauer, D., Wolowick, M.J., Lewis, J.L. und Chapman E.R. (1999) "Kinetics of Synaptotagmin Responses to Ca^{2+} and Assembly of SNARE Complex onto Membranes" *Neuron* **24**, 363-376.

De Boer, A.H., Van Duijn, B., Giesberg, P., Wegner, L., Obermeyer, G., Koehler, K. und Linz, K.W. (1994) "Laser Microsurgery: A Versatile Tool in Plant (Electro) Physiology" *Protoplasma* **178**, 1-10.

Elzenga, J.T.M., Keller, C.P., Van Volkenburgh, E. (1991) "Patch Clamping Protoplasts from Vascular Plants" *Plant Physiol.* **97**, 1573-1575.

Evans, E.A., Waugh, R. und Melnik, L. (1976) "Elastic Area Compressibility Modulus of Red Cell Membrane" *Biophys. J.* **16**, 585-595.

Aus dieser Arbeit ergeben sich mögliche Schlüsse für die Wirkungsweise des Ca^{2+} bei der konstitutiven Exocytose in Pflanzenzellen.

Felle, H. (1988) "Auxin Causes Oscillations of Cytosolic Free Calcium and pH in *Zea Mays* Coleoptiles" *Planta* **174**, 495-499.

Fernandez, J.M., Neher, E. und Gomperts, B.D. (1984) "Capacitance Measurements Reveal Stepwise Fusion Events in Degranulating Mast Cells" *Nature* **312**, 453-455.

Ferro-Novick, S. & Jahn, R. (1994) "Vesicle Fusion from Yeast to Man" *Nature* **370**, 191-193.

Fujita-Yoshigaki, J. (2000) "Simulation of Regulated Exocytosis of Amylase from Salivary Parotid Acinar Cells by a Consecutive Reaction Model Comprising Two Sequential First-Order Reactions" *J. theor. Biol.*, **204**, 165-177.

Galston, A.W. (1961) "The Life of the Green Plant", Verlag: 'Prentice Hall, Englewood Cliffs.

Gilbert, A., Paccaud, J.P. und Carpentier, J.L. (1997) "Direct Measurement of Clathrin-Coated Vesicle Formation Using a Cell-Free Assay" *J. Cell Sci.* **110**, 3105-3115.

In diesem Kapitel wird im Detail dargestellt, wie aus den gemessenen Größen die Membrankapazität berechnet wird und welche Näherungen und Annahmen hierbei eingehen.

Gillis, K.D. (1995) "Techniques for Membrane Capacitance Measurements" In 'Single Channel Recording', 2. Auflage, B. Sakmann und E. Neher, (New York, Plenum Press), 155–198.

Gonon, F., Bao, J.X., Msghina, M. Suaud-Chagny, M.F. und Stjaerne, L. (1993) "Fast and Local Electrochemical Monitoring of Noradrenaline Release from Synaptic Terminals in Isolated Rat Tail Artery" *J. Neurochem.* **60**, 1251-1257.

Gordon-Kamm, W.J. & Steponkus, P.L. (1983) "The Influence of Cold Acclimation on the Behavior of the Plasma Membrane Following Osmotic Contraction of Isolated Protoplasts" *Protoplasma* **123**, 161-173.

Grill, E. & Himmelbach A. (1998) "ABA Signal Transduction" *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 412-418.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) "A New Generation of Ca^{2+} Indicators With Greatly Improved Fluorescent Properties" *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.

Gustin, M., Zhou, X.L., Martinac, B. und Kung, C. (1988) "A Mechanosensitive Ion Channel in the Yeast Plasma Membrane" *Science* **242**, 762-765.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., und Sigworth, F.J. (1981) "Improved Patch-Clamp Technique for High Resolution Current Recordings from Cells and Cell-Free Membrane Patches" *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **391**, 85–100

Hansen, U.P., Gradmann, D., Sanders, D. und Slayman, C.L. (1981) "Interpretation of Current-Voltage Relationships for "Active" Ion Transport Systems: I. Steady-State Reaction-Kinetic Analysis of Class-I Mechanisms" *J. Mem. Biol.* **63**, 165-190.

Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E. und Matthews, G. (1994) "Calcium Dependence of the Rate of Exocytosis in a Synaptic Terminal" *Nature* **371**, 513-515.

Hier wird die Entwicklung eines reaktionskinetischen Modells zur regulierten Exocytose beschrieben. Das Paper ist die Grundlage zur Entwicklung des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Modells.

Heinemann, C., von Rüden, L., Chow, R.H., and Neher, E. (1993) "A Two-Step Model of Secretion Control in Neuroendocrine Cells" *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **424**, 105–112.

Heinemann, C., Chow, R.H., Neher, E., and Zucker, R.S. (1994) "Kinetics of the Secretory Response in Bovine Chromaffin Cells Following Flash Photolysis of Caged Ca^{2+} " *Biophys. J.* **67**, 2546–2557.

Hochmuth, F.M., Shao, J.Y., Dai, J. and Sheetz, M.P. (1996) "Deformation and Flow of Membrane into Thethers Extracted from Neuronal Growth Cones" *Biophys. J.* **70**, 358-369.

Homann, U. & Tester, M. (1997) " Ca^{2+} -independent and Ca^{2+} /GTP-binding Protein-Controlled Exocytosis in a Plant Cell" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6565-6570.

Homann, U. & Tester, M. (1998) "Patch-Clamp Measurements of Capacitance to Study Exocytosis and Endocytosis" *Trends Plant Sci.* **3**, 110-114.

Janas, T., Walinska, K., Chojnacki, T. und Swiezewska, E. (2000) " Modulation of Properties of Phospholipid Membranes by the Long-Chain Polyprenol" *Chem Phys Lipids* **106**, 31-40.

Jeong, E.H., Webster, P., Khuong, C.Q., Abdus Sattar, A.K., Satchi, M. und Jena, B.P. (1998) "The Native Membrane Fusion Machinery in Cells" *Cell Biol. Int.* **22**, 657-670

Der Autor gibt eine umfangreiche Übersicht über Ratenkonstanten bei Ca^{2+} -stimulierter Exocytose in verschiedenen Zellsystemen.

Kasai, H. (1999) "Comparative Biology of Ca^{2+} -dependent Exocytosis: Implications of Kinetic Diversity for Secretory Function" *Trends Neurosci.* **22**, 88–93.

Kiegle, E., Moore, C.A., Haseloff, J., Tester, M.A. und Knight, M.R. (2000) "Cell-Type-Specific Calcium Responses to Drought, Salt and Cold in the Arabidopsis Root" *Plant J.* **23**, 267-278.

Kwok, R & Evans, E.A. (1981) "Thermoelasticity of Large Lecitin Bilayer Vesicles" *Biophys. J.* **35**, 637-652.

Lew, D.J. & Simon, S.M. (1991) "Characterization of Constitutive Exocytosis in the Yeast *Saccaromyces cerevisiae*" *J. Mem. Biol.* **123**, 261-268.

Lindau, M. & Neher, E. (1988) "Patch-Clamp Techniques for Time Resolved Capacitance Measurements in Single Cells" *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **411**, 137-146.

Die Grundlagen des verwendeten α -Amylase Assays werden in dieser Arbeit beschrieben.

McCleary, B.V. & Sheehan, H. (1987) "Measurement of Cereal α -Amylase: A New Assay Procedure" *Journal of Cereal Science*, **6**, 237-251.

Milton, R.L. & Caldwell, J.H. (1990)"How Do Patch Clamp Seals Form ?" *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **416**, 758-765.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962) "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture" *Physiol. Plant* **15**, 473-497.

Napier, R.M. & Venis, M.A. (1995) "Auxin Action and Auxin Binding Proteins" *New Phytol.* **129**, 167-201.

Nedler, J.A., & Mead, R. (1965) "A Simplex Method for Function Minimization" *Comput. J.* **7**, 308.

Needham, D. & Hochmuth, R.M. (1989) "Electro-Mechanical Permeabilization of Lipid Vesicles – Role of Membrane Tension and Compressibility" *Biophys. J.* **55**, 1001-1009.

Neher, E. & Marty, A. (1982) "Discrete Changes of Cell Membrane Capacitance Observed Under Conditions of Enhanced Secretion in Bovine Adrenal Chromaffin Cells" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6712-6716

Neher, E. (1998) "Vesicle Pools and Ca²⁺ Microdomains: New Tools for Understanding Their Roles in Neurotransmitter Release" *Neuron* **20**, 389-399.

Nicol, J.A. & Hutter, O.F. (1996) "Tensile Strength and Dilatational Elasticity of Giant Sarcolemmal Vesicles Shed from Rabbit Muscle" *J. Physiol.* **493**, 187-198.

Oberhauser, A.F., Robinson, I.M. und Fernandez, J.M. (1995a) "Do Caged Ca²⁺-Compounds Mimic the Physiological Stimulus for Secretion?" *J. Physiol. Paris* **89**, 71-75.

Oberhauser, A.F., Robinson, I.M. und Fernandez, J.M. (1995b) "Simultaneous Capacitance and Amperometric Measurements of Exocytosis: A Comparison" *Biophys. J.* **71**, 1131-1139.

Oheim, M., Loerke, D., Stühmer, W. und Chow, R.H. (1998) "The Last few Milliseconds in the Life of a Secretory Granule" *Eur. Biophys. J.* **27**, 83-98.

Omann, G.M. & Axelrod, D. (1996) "Membrane-Proximal Calcium Transients in Stimulated Neutrophils Detected by Total Internal Reflection Fluorescence" *Biophys. J.* **71**, 2885-2891.

Palade, G. (1975) "Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis" *Science* **189**, 347-358.

Penner, R. (1995) "A Practical Guide to Patch Clamping" " In 'Single Channel Recording', 2. Auflage, B. Sakmann und E. Neher, (New York, Plenum Press), 3–28.

Phillips, G.D., Preshaw, R.E. und Steer, M.W. (1988) "Dictyosome Vesicle Production and Plasma Membrane Turnover in Auxin-Stimulated Outer Epidermal Cells of Coleoptile Segments from *Avena sativa* L." *Protoplasma* **145**, 59-65.

In einer für Ende 2000 / Anfang 2001 geplanten Publikation werden molekularbiologische Daten zur Sekretion im Amylase- / Amylase-HDEL-Tabak-Zellsystem vorgestellt.

Pimpel, P. (2000) "COP II Vesicles Support Active Transport as Well as Bulk Flow", Vortrag auf dem '3rd International Workshop on Plant Endomembranes', Heidelberg, September 2000.

In dieser Arbeit finden sich viele hilfreiche Tips und Hinweise zu Messungen mit ratiometrischen Farbstoffen und zur Kalibrierung solcher Meßverfahren.

Plieth, C. (1995) "Bestimmung von Ionenkonzentrationen und ihrer Änderungen in Grünen Pflanzlichen Zellen und Geweben mit Hilfe der Bildverarbeitenden Ratiometrischen Fluoreszenz-Mikroskopie und der Laser-Doppler-Anemometrie" Dissertation, Kiel.

Plieth C, Hansen U-P (1996) "Methodological Aspects of Pressure Loading of Fura-2 into Characean Cells" *J. Exp. Bot.* **47**, 1601-1612.

Plieth C, Sattelmacher B, Hansen U-P, Thiel G (1998) "The Action Potential in *Chara*: Ca²⁺ Release from Internal Stores Visualized by Mn²⁺-Induced Quenching of Fura-dextran" *Plant J.* **13**, 167-175

Price, A., Wickner, W. und Ungermann, C. (2000) "Proteins Needed for Vesicle Budding from the Golgi Complex are also Required for the Docking Step of Homotypic Vacuole Fusion" *J. Cell Biol.* **148**, 1223-1229.

Rothman JE, Wieland FT. (1996) "Protein Sorting by Transport Vesicles" *Science* **272**,227-234.

Sackmann, E., Träuble, H., Galla, H.J. und Overath, P. (1973) "Lateral Diffusion, Protein Mobility, and Phase Transitions in Escherichia Coli Membranes. A Spin Label Study" *Biochemistry* **12**,5360-5369.

Sanderfoot, A.A. & Raikhel, N.V. (1999) "The Specificity of Vesicle Trafficking: Coat Proteins and SNAREs" *Plant Cell* **11**, 629-642.

Schmitt, H.D., Puzicha, M. und Gellwitz, D. (1988) "Study of a Temperature-Sensitive Mutant of a ras-Related YPT-1 Gene Product in Yeast Suggests a Role in the Regulation of Intracellular Calcium" *Cell* **53**, 635-647.

Schmoranzner, J., Goulian, M., Axelrod, D. und Simon, S.M. (2000) "Imaging Constitutive Exocytosis with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy" *J. Cell Biol.* **149**, 23-31.

Schopfer, P. & Brennicke, A. 'Pflanzenphysiologie', 5. Auflage, (Berlin, Springer Verlag).

Shao, X., Fernandez, I., Südhof, T.C. und Rizo, J. (1998) "Solution Structures of the Ca²⁺-free and the Ca²⁺-bound C2A Domain of Synaptotagmin I: Does Ca²⁺ Induce a Conformational Change?" *Biochemistry* **17**, 16106-16115.

Sheehan, H. & McCleary, B.V. (1988) "A New Procedure for the Measurement of Fungal and Bacterial α -Amylase" *Biotechnology Techniques*, **2**, 289-292.

Sheetz, M.P. & Dai, J. (1996) "Modulation of Membrane Dynamics and Cell Motility by Membrane Tension" *Trends Cell Biol.* **6**, 85-89.

- Sigworth, F.J., Affolter, H. und Neher, E. (1995) "Design of the EPC-9, a Computer Controlled Patch Clamp Amplifier. 1. Hardware" *J. Neurosci. Methods* **56**, 195-202.
- Sigworth, F.J., Affolter, H. und Neher, E. (1995) "Design of the EPC-9, a Computer Controlled Patch Clamp Amplifier. 2. Software" *J. Neurosci. Methods* **56**, 203-215.
- Solsona, C., Innocenti, B. and Fernández, J.M. (1998) "Regulation of Exocytotic Fusion by Cell Inflation" *Biophys. J.* **74**, 1061-1073.
- Steer, M. (1988) "The Role of Calcium in Exocytosis and Endocytosis in Plant Cells" *Physiologia Plantarum* **72**, 213-220.
- Steponkus, P.L. (1991) "Behaviour of the Plasma Membrane During Osmotic Excursions" in 'Endocytosis, Exocytosis and Vesicle Traffic in Plants', 1. Auflage, C.R. Hawes, J.O.D. Coleman und D.E. Evans, (Cambridge University Press), 103-128.
- Stoekenius, W. & Engelman, D.M. (1969) "Current Models for the Structure of Biological Membranes" *J. Cell Biol.* **42**, 613-646.
- Sugita, S., Südhof, T.C. (2000) "Specificity of Ca²⁺-Dependent Protein Interactions Mediated by the C2A Domains of Synaptotagmins" *Biochemistry* **39**, 2940-2949.
- Sutter, J.U., Homann, U. und Thiel, G. (2000) "Ca²⁺-stimulated Exocytosis in Maize Coleoptile Cells" *Plant Cell* **12**, 1127-1136.
- Thiel, G., Rupnik, M., and Zorec, R. (1994) "Raising the Cytosolic Ca-Concentration Increases the Membrane Capacitance of Maize Coleoptile Protoplasts: Evidence for Ca-Stimulated Exocytosis" *Planta* **195**, 305-308.
- Thiel, G. & Weise, R. (1999) "Auxin Augments Conductance of K⁺ Inward Rectifier in Maize Coleoptile Protoplasts" *Planta* **208**, 38-45.
- Thiel, G., Sutter, J.U. und Homann, U. (2000) "Ca²⁺-sensitive and Ca²⁺-insensitive Exocytosis in Maize Coleoptile Protoplasts" *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **439**, R152-153.
- Thomas, P., Wong, J.G., Lee, A.K. und Almers, W. (1993) "A Low Affinity Ca²⁺ Receptor Controls the Final Steps in Peptide Secretion from Pituitary Melanotrophs" *Neuro* **11**, 93-104.
- Toomre, D., Streyer, J.A., Keller, P., Almers, W. und Simons, K. (2000) "Fusion of Constitutive Membrane Traffic with the Cell Surface Observed by Evanescent Wave Microscopy" *J. Cell Biol.* **149**, 33-40.
- Turner, M.D., Rennison, M.E., Handel, S.E., Wilde, C.J. und Burgoyne, R.D. (1992) "Proteins are Secreted by Both Constitutive and Regulated Secretory Pathways in Lactating Mouse Mammary Epithelial Cells" *J. Cell Biol.* **117**, 296-278.
- Vogelzang, S.A. & Prins, H.B.A. (1992) "Plasmalemma Patch-Clamp Experiments in Plant Root Cells: Procedure for Fast Isolation of Protoplasts with Minimal Exposure to Cell Wall Degrading Enzymes" *Protoplasma* **171**, 104-109.

-
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachel, M., Parlatti, F., Söllner, T.H. und Rothman, J.E. (1998) "SNAREpins, Minimal Machinery for Membrane Fusion" *Cell* **92**, 759-772.
- Wei, S., Xu, T., Ashery, U., Kollwe, A., Matti, U., Antonin, W., Rettig, J. und Neher, E. (2000) "Exocytotic Mechanism Studied by Truncated and Zero Layer Mutants of the C-Terminus of SNAP-25" *EMBO J.* **19**, 1279-1289.
- Wilde, C.J., Addey, C.V.P., Bryson, J.M., Knight, C.H. und Peaker, M. (1997) "Autocrine Regulation of Milk Secretion" *Biochem. Soc. Ann. Symp.* **63**, 81-90.
- Willison, J.H.M. (1981) "Secretion of Cell Wall Material in Higher Plants" In 'Plant Carbohydrates II, Extracellular Carbohydrates', 1. Auflage, W. Tanner & F.A. Loewus, (Encyclopedia of Plant Physiology), **13 b**, 513 ff.
- Wolfe, J. & Steponkus, P.L. (1981) "The Stress-Strain Relation of the Plasma Membrane of Isolated Plant Protoplasts" *Biochim. Biophys. Acta* **643**, 663-668.
- Wolfe, J. & Steponkus, P.L. (1983) "Mechanical Properties of the Plasma Membrane of Isolated Protoplasts" *Plant Physiol.* **71**, 276-285.
- Wolfe, J., Dowgert, M.F. und Steponkus, P.L. (1985) "Dynamics of Membrane Exchange of the Plasma Membrane and the Lysis of Isolated Protoplasts during Rapid Expansion in Area" *J. Mem. Biol.* **86**, 127-138.
- Xu, T., Naraghi, M., Kang, H. und Neher, E. (1997) "Kinetic Studies of Ca²⁺ Binding and Ca²⁺ Clearance in the Cytosol of Adrenal Chromaffin Cell" *Biophys. J.* **73**, 532-545.
- Xu, T., Binz, T., Niemann, H. und Neher, E. (1998) "Multiple Kinetic Components of Exocytosis Distinguished by Neurotoxin Sensitivity" *Nature Neurosci.* **1**, 192-200.
- Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A.R., Neher, E. und Jahn, R. (1999) "Inhibition of SNARE Complex Assembly Differentially Affects Kinetic Components of Exocytosis" *Cell* **99**, 713-722.
- Zorec, R., and Tester, M. (1992) "Cytoplasmic Ca²⁺ Stimulates Exocytosis in a Plant Secretory Cell" *Biophys. J.* **63**, 864-867.

6.2 Software

Der Meßplatz war mit einem softwaregestützten Meßverstärker des Typs EPC-9 versehen. Dieser wurde angesteuert mittels des Programmes

- Pulse 7.0 (mit lock-in Erweiterung), HEKA, Lambrecht, Deutschland.

Zur Lösung komplexerer mathematischer Probleme wurden folgende Programme verwendet:

- MathCAD 7.0, MathSoft, Bagshot, Surrey, UK
- Mathematica 2.1, Wolfram Research, UK.

Die Computerprogramme zum Fit der Modelle an die Meßdaten und zur Betrachtung von Artefakten bei der Datenberechnung wurden erstellt mit:

- Turbo Pascal 7.0, Borland, Amsterdam, Niederlande, 1994
- Delphi 3.0, Borland, Amsterdam, Niederlande, 1998.

Der innerhalb der Fit-Routine verwendete Simplex Algorithmus stammt aus den:

- Numerical Recipes in Pascal, Cambridge, UK.

Die Berechnung der freien Kalziumkonzentration in Lösungen wurde durchgeführt mit:

- Calcium 2.1, Karl-Joseph Foehr & Wojciech Warchol, 1989/1990.

Wurden Fits einzelner Datenplots durchgeführt so kam üblicherweise das Programm

- Curve Expert 1.34, Daniel Hyams, 1997

zum Einsatz. Lediglich die Kalibrierkurven zu den Fura-2 Messungen wurden mit:

- Origin 3.5, Microcal Software, Northampton, Ma., USA, 1994

durchgeführt.

6.3 Abbildungen

Abbildung 2.1 Tabak Alpha-Amylase System	8
Abbildung 2.2 Meßparameter in der 'Whole-Cell' Konfiguration.....	13
Abbildung 2.3 Exocytose und Endocytose registriert als Änderungen der Membrankapazität.	14
Abbildung 2.4 Prinzip der Messung eines exocytotischen Ereignisses in der 'Whole- Cell' Konfiguration.....	15
Abbildung 2.5 Die α -Amylase Aktivität im Gewebe von Versuchspflanzen ist stabil...	20
Abbildung 2.6 α -Amylase-Aktivität von Sproßkulturen einer Mutterpflanze.	21
Abbildung 2.7 Eichung des α -Amylase-Assays	23
Abbildung 2.8 Kalibrierkurve für Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2....	25
Abbildung 2.9 Anordnung von Protoplast und Fura-2.	25
Abbildung 2.10 Ratiometrische Messung mit und ohne Protoplast im Strahlengang..	26
Abbildung 2.11 Ratio bei Beladung von Protoplasten mit definierten Ca^{2+} - Konzentrationen.....	27
Abbildung 2.12 Arbeitsweise des Simplex Algorithmus in 2 Dimensionen.....	30

Abbildung 3.1 Membrankapazität eines Tonoplasten bei Dehnung der Membran.....	35
Abbildung 3.2 Änderung der Membrankapazität bei Dehnung der Membran gegenüber dem Oberflächenzuwachs.	36
Abbildung 3.3 Mittlere relative Dielektrizitätskonstante von Tonoplastenmembranen.	37
Abbildung 3.4 Änderung der relativen Dielektrizitätskonstante bei Dehnung der Membran	38
Abbildung 3.5 Transienter Anstieg der Membrankapazität	39
Abbildung 3.6 Ersatzschaltbild für einen Protoplasten in 'Whole-Cell' Konfiguration. .	43
Abbildung 3.7 Vereinfachtes Ersatzschaltbild für einen Protoplasten in 'Whole-Cell' Konfiguration.....	44
Abbildung 3.8 Messung an einem Tabak Mesophyll Protoplasten.....	48
Abbildung 3.9 Von Artefakten bereinigte Messung der Membrankapazität.....	49
Abbildung 3.1o Ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_{cyt}$ bewirkt ein Anwachsen der Membrankapazität.	51
Abbildung 3.11 Eine Änderung der Membrankapazität ist nicht korreliert mit einer spezifischen Änderung der Leitfähigkeit.	52
Abbildung 3.12 Wiederholte Stimulation exocytotischer Ereignisse.....	53
Abbildung 3.13 Die Ca^{2+} -stimulierte Exocytose zeigt eine deutliche Zweiphasigkeit. .	54
Abbildung 3.14 Amplitude des exocytotischen Ereignisses als Funktion der Ausgangskapazität	55
Abbildung 3.15 Modell zur regulierten Exocytose.	56
Abbildung 3.16 Modell für die Ca^{2+} -stimulierte konstitutive Exocytose in Mais Koleoptilzellen.....	57
Abbildung 3.17 Ca^{2+} wirkt beim Übergang zwischen den Pools nicht kooperativ.	59
Abbildung 3.18 Joint-Fit zweier Datensätze.....	61
Abbildung 3.19 modellierte Kurvenschar	62
Abbildung 3.2o Abhängigkeit der Exocytoserate von der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung.....	64
Abbildung 3.21 Die Membrankapazität ist unabhängig von der Magnesiumkonzentration.....	66
Abbildung 3.22 Geringe Werte von $[Ca^{2+}]_{cyt}$ bewirken kein exocytotisches Ereignis..	67
Abbildung 3.23 Abhängigkeit der Exocytoserate von der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Einstromes.....	68
Abbildung 3.24 Mittelwert von $[Ca^{2+}]_{cyt}$	69
Abbildung 3.25 Amplitude des exocytotischen Ereignisses in transgenen und Wild-Typ Protoplasten.....	70
Abbildung 3.26 Zusammenhang zwischen sekretorischer Aktivität und Gehalt an sekretorischem Protein	71
Abbildung 3.27 Sekretorische Aktivität von HDEL Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Protoplastierung.....	72
Abbildung 3.28 Mathematische Beschreibung der Relation von sekretorischer Aktivität und Gehalt an sekretorischem Protein.....	74
Abbildung 3.29 Modelle für die Kinetik des Membraneinbaus in das Plasmalemma. .	75
Abbildung 3.3o Vergleich der Kinetik an transgener und Wild-Typ Zelle	76
Abbildung 3.31 Kinetiken, wie sie aus verschiedenen Datensätzen ermittelt wurden.	77
Abbildung 3.32 Kinetische Phasen der Exocytose in transgenen und Wild-Typ Zellen	78
Abbildung 3.33 Fit des Modells für konstitutive Exocytose in Mais Koleoptilzellen an Daten von Tabakzellen	79
Abbildung 3.34 Versuch zur Bestimmung der Natur der Sättigung im Bereich hoher sekretorischer Aktivität.....	80

Anhang

7.1 Herleitung der Formeln zur Betrachtung von Meßartefakten

Auch Gleichungen, die im Ergebnisteil bereits angegeben wurden, sind hier der Übersichtlichkeit halber aufgeführt und in die Kapitelnummerierung mit einbezogen worden.

Herleitung der Formeln zur Berechnung der Zugriffsleitfähigkeit, der Membranleitfähigkeit und der Membrankapazität anhand der tatsächlichen Real- und Imaginärteile der Stromes.

Die Leitfähigkeit gemäß Abbildung 3.6 ist gegeben durch:

$$Y = j\omega C_p + \frac{1}{R_s} + \frac{1}{R_a + \frac{1}{j\omega C_m + \frac{1}{R_m}}} \quad (7.1)$$

Zerlegt man die Leitfähigkeit in die reale und die imaginäre Komponente, so ergibt sich:

$$Y = a + jb, \quad (7.2)$$

mit:

$$a = \frac{R_a^2 + 2R_a R_m + R_m^2 + R_s R_a + R_s R_m + \omega^2 R_a^2 R_m^2 C_m^2 + \omega^2 R_s R_a R_m^2 C_m^2}{R_s (R_a^2 + 2R_a R_m + R_m^2 + \omega^2 R_a^2 R_m^2 C_m^2)} \quad (7.3)$$

und:

$$b = \omega \frac{C_p R_a^2 + 2C_p R_a R_m + C_p R_m^2 + R_m^2 C_m + \omega^2 C_p R_a^2 R_m^2 C_m^2}{R_a^2 + 2R_a R_m + R_m^2 + \omega^2 R_a^2 R_m^2 C_m^2} \quad (7.4)$$

Aus dem vereinfachten Schaltbild (Abbildung 3.7) wurden die Gleichungen für die Zugriffsleitfähigkeit R_a , die Membranleitfähigkeit R_m und die Membrankapazität C_m aus der realen und der imaginären Komponente der komplexen Leitfähigkeit, sowie dem Gleichgewichtsstrom I_{ss} bestimmt. Die Herleitung hierzu ist in Kapitel 3.2 gezeigt. Es ergaben sich folgende Gleichungen:

$$R_a = \frac{a(R_a + R_m) - 1}{(a^2 + b^2)(R_a + R_m) - a} \quad (7.5)$$

$$R_m = \frac{(a^2 + b^2)(R_a + R_m)^2 - 2a(R_a + R_m) + 1}{(a^2 + b^2)(R_a + R_m) - a}, \quad (7.6)$$

$$C_m = \frac{(a^2 + b^2)^2(R_a + R_m)^2 - 2(R_a + R_m)b^2a - 2(R_a + R_m)a^3 + a^2}{\omega(b((a^2 + b^2)(R_a + R_m)^2 - 2a(R_a + R_m) + 1))}. \quad (7.7)$$

Eine sehr genaue Abschätzung der Werte, die vom lock-in Verstärker ermittelt werden, erhält man indem die Meßparameter (a , b sowie die Summe $(R_a + R_m)$, die aus I_{SS} ermittelt wird), wie sie aus dem vollständigen Schaltbild berechnet wurden in die Gleichungen für R_a , R_m und C_m einsetzt. Das ist mit erheblichem Rechenaufwand verbunden und ergibt für den gemessenen Wert des Zugriffswiderstandes ($R_{a\text{-est.}}$):

$$R_{a\text{-est.}} = \frac{\Phi}{\Psi}$$

mit:

$$\Phi = R_m^3 R_s R_a C_m^2$$

und:

$$\begin{aligned} \Psi = & \omega^2 R_m^3 R_s R_a^2 C_p^2 C_m^2 + R_m^3 R_a C_m^2 + R_m^3 R_s C_p^2 + R_m^3 R_s C_m^2 + 2R_m^3 R_s C_p C_m + \\ & \omega^2 R_m^2 R_s R_a^3 C_p^2 C_m^2 + 3R_m^2 R_s R_a C_p^2 + 2R_m^2 R_s R_a C_p C_m + 3R_m R_s R_a^2 C_p^2 + R_s R_a^3 C_p^2 \end{aligned} \quad (7.8)$$

Analog erhält man die Gleichung für den tatsächlich gemessenen Membranwiderstand ($R_{m\text{-est.}}$):

$$R_{m\text{-est.}} = \frac{\Gamma}{\Xi}$$

mit:

$$\Gamma = R_s^2 (\omega^2 R_m^4 R_a^2 C_p^2 C_m^2 + 2R_m^4 C_p C_m + R_m^4 C_p^2 + R_m^4 C_m^2 + 2\omega^2 R_m^3 R_a^3 C_p^2 C_m^2 + 4R_m^3 R_a C_p C_m) +$$

$$R_s^2 (4R_m^3 R_a C_p^2 + \omega^2 R_m^2 R_a^2 C_p^2 C_m^2 + 6R_m^2 R_a^2 C_p^2 + 2R_m^2 R_a^2 C_p C_m + 4R_m R_a^3 C_p^2 + R_a^4 C_p^2)$$

und:

$$\Xi = (R_m + R_s + R_a) (\omega^2 R_m^3 R_s R_a^2 C_p^2 C_m^2 + R_m^3 R_a C_m^2 + R_m^3 R_s C_p^2 + R_m^3 R_s C_m^2 + 2R_m^3 R_s C_p C_m) +$$

$$(R_m + R_s + R_a) (\omega^2 R_m^2 R_s R_a^3 C_p^2 C_m^2 + 3R_m^2 R_s R_a C_p^2 + 2R_m^2 R_s R_a C_p C_m + 3R_m R_s R_a^2 C_p^2 + R_s R_a^3 C_p^2)$$

(7.9)

Die Gleichung für die Membrankapazität ($C_{m\text{-est.}}$), wie sie sich aus den tatsächlich gemessenen Parametern errechnet, sieht wie folgt aus:

$$C_{m\text{-est.}} = \frac{\Sigma}{P\Theta}$$

mit:

$$\begin{aligned} \Sigma = & R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^6 + R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_a^6 + C_m^4 \cdot R_m^6 \cdot R_s^2 + C_m^4 \cdot R_a^2 \cdot R_m^6 + 4 \cdot C_m^3 \cdot R_s^2 \cdot C_p^3 \cdot R_m^4 \cdot \omega^2 \cdot R_a^4 \\ & + C_m^4 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^4 \cdot \omega^4 \cdot R_a^6 + 16 \cdot C_m \cdot R_s^2 \cdot C_p^3 \cdot R_m^3 \cdot R_a^3 + 6 \cdot C_m^2 \cdot R_s^2 \cdot R_m^6 \cdot C_p^2 \\ & + 2 \cdot C_m^2 \cdot R_s^2 \cdot R_m^3 \cdot C_p^2 \cdot R_a^3 + 2 \cdot C_m^4 \cdot R_a^4 \cdot R_s \cdot C_p^2 \cdot R_m^5 \cdot \omega^2 + 6 \cdot C_m^2 \cdot R_a^3 \cdot R_m^4 \cdot R_s \cdot C_p^2 \\ & + 4 \cdot C_m \cdot R_s^2 \cdot C_p^3 \cdot R_m^2 \cdot R_a^4 + 4 \cdot C_m^3 \cdot R_a \cdot R_s^2 \cdot C_p \cdot R_m^5 + 14 \cdot C_m^2 \cdot R_s^2 \cdot R_m^5 \cdot C_p^2 \cdot R_a \\ & + 4 \cdot C_m^3 \cdot R_a \cdot R_s \cdot C_p \cdot R_m^6 + 16 \cdot C_m \cdot R_s^2 \cdot C_p^3 \cdot R_m^5 \cdot R_a^2 + 2 \cdot C_m^2 \cdot R_a^2 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^6 \cdot \omega^2 \\ & + 4 \cdot C_m^3 \cdot R_s^2 \cdot C_p \cdot R_m^6 + 24 \cdot C_m \cdot R_s^2 \cdot C_p^3 \cdot R_m^4 \cdot R_a^2 + 8 \cdot C_m^2 \cdot R_a^3 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^5 \cdot \omega^2 \\ & + C_m^4 \cdot R_a^4 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^6 \cdot \omega^4 + 2 \cdot C_m^4 \cdot R_a^3 \cdot \omega^2 \cdot R_s \cdot C_p^2 \cdot R_m^6 + 2 \cdot C_m^4 \cdot \omega^2 \cdot R_s^2 \cdot R_m^6 \cdot C_p^2 \cdot R_a^2 \\ & + 2 \cdot C_m^4 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^5 \cdot \omega^4 \cdot R_a^5 + 4 \cdot C_m \cdot R_s^2 \cdot C_p^3 \cdot R_m^6 + 10 \cdot C_m^2 \cdot R_s^2 \cdot R_m^4 \cdot C_p^2 \cdot R_a^2 \\ & + 6 \cdot C_m^2 \cdot R_a^2 \cdot R_m^5 \cdot R_s \cdot C_p^2 + 2 \cdot C_m^4 \cdot \omega^2 \cdot R_s^2 \cdot R_m^5 \cdot C_p^2 \cdot R_a^3 + 8 \cdot C_m^3 \cdot R_s^2 \cdot C_p^3 \cdot R_m^5 \cdot \omega^2 \cdot R_a^3 \\ & + 4 \cdot C_m^3 \cdot R_a^2 \cdot R_s \cdot C_p \cdot R_m^5 + 15 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^2 \cdot R_a^4 + 20 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^3 \cdot R_a^3 \\ & + 15 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^4 \cdot R_a^2 + 6 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^5 \cdot R_a^4 + 4 \cdot C_m^3 \cdot R_a^2 \cdot R_s^2 \cdot C_p^3 \cdot R_m^6 \cdot \omega^2 \\ & + 2 \cdot C_m^2 \cdot R_a^4 \cdot R_m^3 \cdot R_s \cdot C_p^2 + 2 \cdot C_m^2 \cdot R_a \cdot R_m^6 \cdot R_s \cdot C_p^2 + 2 \cdot C_m^2 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^2 \cdot \omega^2 \cdot R_a^6 \\ & + 8 \cdot C_m^2 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^3 \cdot \omega^2 \cdot R_a^5 + 2 \cdot C_m^4 \cdot R_a \cdot R_m^6 \cdot R_s + 12 \cdot C_m^2 \cdot R_a^4 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m^4 \cdot \omega^2 \\ & + 6 \cdot R_s^2 \cdot C_p^4 \cdot R_m \cdot R_a^5 \end{aligned}$$

und:

$$P = C_p \cdot R_a^2 + 2 \cdot C_p \cdot R_a \cdot R_m + C_p \cdot R_m^2 + C_m \cdot R_m^2 + R_a^2 \cdot \omega^2 \cdot C_m^2 \cdot R_m^2 \cdot C_p$$

und:

$$\begin{aligned} \Theta = & R_s^2 (C_m^2 \cdot C_p^2 \cdot R_m^2 \cdot \omega^2 \cdot R_a^4 + 2 \cdot C_m^2 \cdot C_p^2 \cdot R_m^3 \cdot \omega^2 \cdot R_a^3 + C_m^2 \cdot R_m^4 \cdot C_p^2 \cdot \omega^2 \cdot R_a^2 + C_m^2 \cdot R_m^4) \\ & + R_s^2 (2 \cdot C_m \cdot C_p \cdot R_m^2 \cdot R_a^2 + 4 \cdot C_m \cdot C_p \cdot R_m^3 \cdot R_a^2 + 2 \cdot C_m \cdot R_m^4 \cdot C_p + C_p^2 \cdot R_a^4 + 4 \cdot C_p^2 \cdot R_m \cdot R_a^3) \\ & + R_s^2 (6 \cdot C_p^2 \cdot R_m^2 \cdot R_a^2 + 4 \cdot C_p^2 \cdot R_m^3 \cdot R_a^2 + R_m^4 \cdot C_p^2) \end{aligned}$$

(7.10)

Während die Gleichungen 7.8 und 7.9 zumindest noch eine Abschätzung der Abweichungen von den von 'lock-in' Verstärkern nach Gleichung 3.22 und 3.23 berechneten Werten erlauben, ist die Gleichung für die Membrankapazität (7.10) in dieser Form lediglich ein Tribut an das Streben nach Vollständigkeit.

Es ist geplant, die Herleitung, sowie die Formeln auf der Homepage der Biophysik der Georg August Universität Göttingen unter:

www.biophysik.uni-goettingen.de

in MathCAD-Format (MathCAD 7.0, Mathsoft) zugänglich zu machen. Dies ermöglicht dann das Kopieren der Gleichungen in dieses oder andere Mathematikprogramme.

... Gerhard für die Arbeit mit Allem drum und dran,

... Ulrike, weil's einfach schön is' mit ihr zu arbeiten,

... Hanna für das Arbeitsklima und für rund 1.2 Tonnen schwarzen Tee,

... Ralf und Michel, meinen Mitphysikern in der Diaspora, für gemeinsam veranstaltete Praktika, für zahllose gelesene Seiten, Debatten und Diskussionen,

... Sandra, Barbara, Inga und Bernd für all die feinen Dinge bei der Arbeit und nicht bei der Arbeit,

... Peter für die gemeinsamen Arbeiten,

... Torben, Steffi und Annette für das Willkommen in diesem Laden,

... Andreas für den (mehr oder minder stabilen) Draht zur weiten Welt,

... Gandhi, dem 'Gastgeber' von's Ganze

Miriam & Lena Britt !

Lebenslauf Jens-Uwe Sutter geb. Blohm

- | | |
|---------------|---|
| 19. Feb. 1968 | geboren in Marburg als zweites Kind der Eheleute Almut gebohrene Friedrich und Karsten Blohm |
| 1974 – 1978 | Besuch der Gundschule in Neumünster |
| 1978 – 1987 | Besuch der Immanuel Kant Schule in Neumünster |
| 30. Mai 1987 | Allgemeine Hochschulreife |
| 1987 – 1989 | Zivildienst |
| 1989 – 1996 | Studium der Physik an der Christian Albrechts Universität zu Kiel |
| April 1992 | Vordiplom der Physik mit der Fächerkombination: Angewandte Physik, Experimentalphysik, Theoretische Physik und Chemie |
| 17. Juni 1994 | Heirat mit Miriam Sutter |
| Oktober 1996 | Diplom der Physik mit der Fächerkombination: Biophysik, Angewandte Physik, Botanik und Theoretische Physik |
| 1997 – 2000 | Wissenschaftlicher Angestellter der Georg August Universität zu Göttingen |
| 20. Okt. 1997 | Geburt meiner Tochter Lena Britt |
| November 2000 | Promotion mit der Fächerkombination: Botanik, Biophysik und Zoologie |