

**Physikalische Eigenschaften der Einzelphotonantworten
der Ventralnervphotorezeptorzelle des
*Limulus polyphemus***

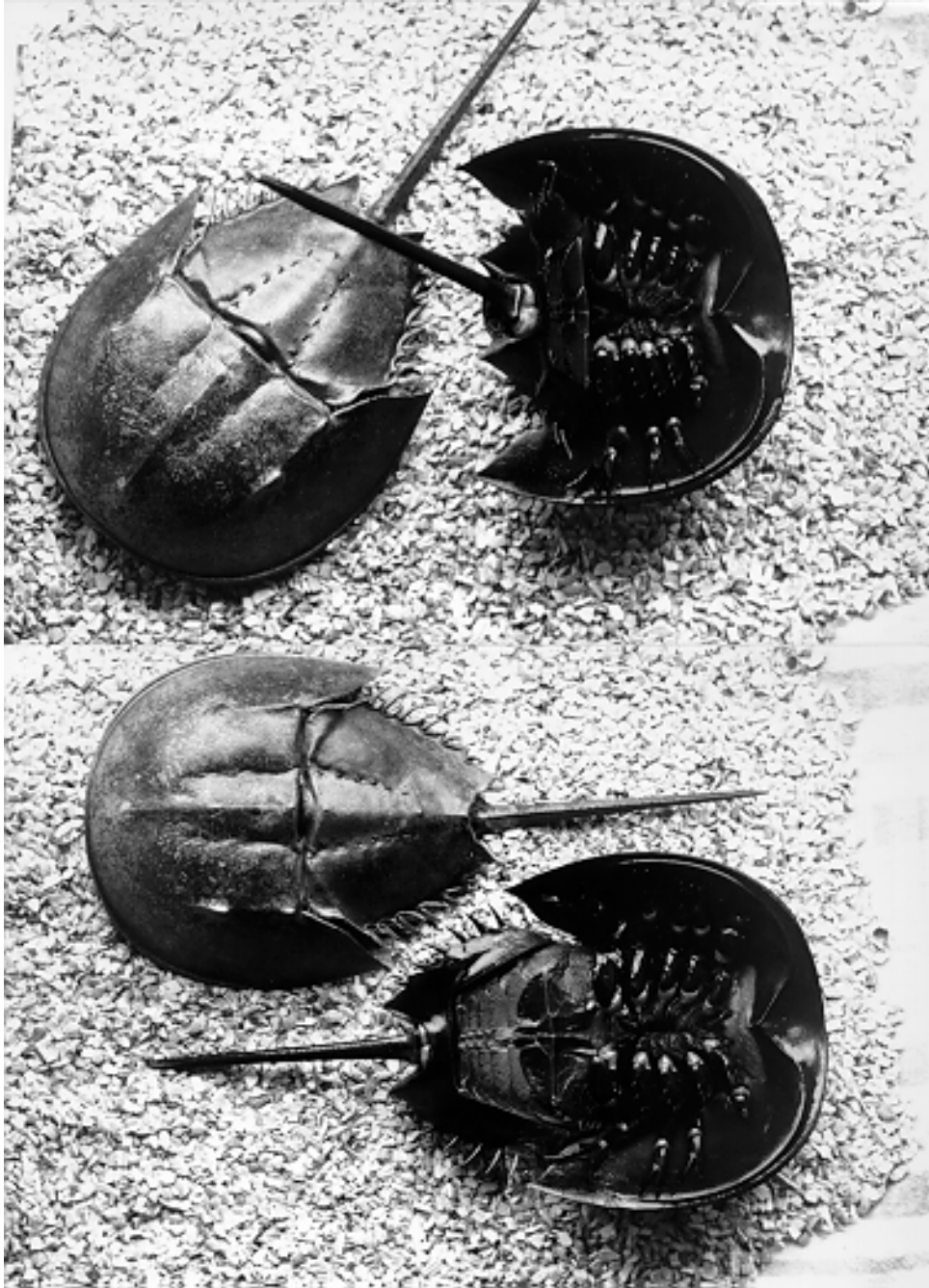
von
Marcus Wilms

Diplomarbeit in Physik

angefertigt am Institut für Biologie II / Zoologie
der RWTH-Aachen

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule
Aachen

im Mai 1996



“With a little help from my friends...”

Gliederung:

1. ABSTRACT	4
2. EINFÜHRUNG	6
2.1 Phototransduktion	
2.2 Transduktionsmechanismen im <i>Limulus polyphemus</i>	
2.3 Adaptation	
2.4 Bumps	
3. AUFGABENSTELLUNG DER DIPLOMARBEIT	16
4. MATERIAL UND METHODEN	17
4.1 Versuchstier	
4.2 Präparation	
4.3 Meßaufbau	
4.4 Meßmethode „Spannungsklemme“	
4.5 Kalibrierung des Blitzlichtgerätes	
4.6 Versuchsdurchführung	
5. AUSWERTUNG	30
5.1 Signalaufbereitung	
5.2 Parametrisierung der Bumps	
5.3 Trennung der Bump-Typen	
5.4 Bump-Statistik	
5.4.1 Probleme	
5.4.2 Korrektur der Bump-Überlagerungen und Dunkelbumps	
5.4.3 Güte der Korrektur	
6. ERGEBNISSE	44
6.1 Kennlinien für c_1 - und c_2 -Bumps	
6.2 Poissonverteilte Bumps	
6.3 Quantisierte Bumps?	
6.3.1 Befund	
6.3.2 Effekt oder Artefakt?	
7. DISKUSSION	65
7.1 Kennlinien und poissonverteilte Bumps	
7.2 Quantisierung?	
7.3 Ausblick	
8. APPENDIX	72
9. LITERATUR	76

1. ABSTRACT

In general, Phototransduction is referred to as a chain of events mediating the transduction of photon energy to an electric signal.

In terms of a biological phototransduction, absorption of photons results in closing (vertebrates) or opening (invertebrates) of light-sensitive ion-channels.

This study is based on the ventral nerve photoreceptor of the invertebrate *Limulus polyphemus*, which is a widely used preparation as it offers anatomical and electrical advantages for invertebrate phototransduction research. A main goal of this study was to focus on the physical properties of the elementary signals (*quantum bumps*) which can be observed as the photoreceptor's response to weak light stimuli. These bumps represent transient changes in the membrane potential. The range of these changes is only several millivolts and they are the result of an ionic current mainly carried by sodium ions through the photoreceptor cell's membrane.

Since the time course and size of the bumps reflect the enzymatic cascade mechanisms which generate them, a detailed study of the bump parameters can reveal important insights in phototransduction.

Limulus ventral nerves were excised and mounted in a test vessel, where they were covered with physiological saline. The experiments were carried out using the one-electrode voltage-clamp technique (voltage-clamp amplifier SEC-05L, npi). Brief flashes of weak green light (half width $\tau=35 \mu\text{s}$, wave-length $\lambda=538 \pm 23 \text{ nm}$, $I_0= 1.26 \cdot 10^{12}$ photons/cm²) were applied to the nerve preparation. The light intensity was adjusted by means of neutral density filters (Oriel). The data acquisition was controlled via a personal computer and started two seconds ahead of each flash in order to detect spontaneously occurring "dark" bumps for a quantitative correction of the number of light evoked bumps.

In some experiments bumps can be separated into two groups (c_1 - and c_2 -bumps) by means of several bump-parameters (e.g. the rise-time of a bump normalized to its amplitude, as was previously reported by Nagy et al. (1993)).

My study involved the analysis of the light intensity dependence of the number of light-evoked bumps of each bump-type as well as the statistics of bump-occurrence after single flashes of light.

In all experiments the temporal overlappings of bumps were a serious problem. Therefore I established a statistical method to recalculate the number of bumps hidden in overlappings. This method is based on the analysis of the current-time integral of overlapped bumps since the current-time integral is the only bump-parameter which is not changed in overlapped bumps. The average number of spontaneously occurring bumps was subtracted from the number of bumps that were observed after a flash.

The following points sum up the results of my investigations:

1. In flash-experiments the population of each type of bump behaves linear with increasing stimulus intensity in the low intensity range.
2. A Poissonian distribution of the number of bumps per flash of each bump-type could be observed for one experiment. It was not possible, though, to correct the temporal overlappings of bumps for the analysis of the number of bumps on every single current-trace. This is probably why other experiments failed to show a Poissonian distribution.
3. A different experiment showed that the histogram of the current-time integral of bumps reveals a discrete substructure. A detailed analysis of the substructure suggests quantum bumps themselves being quantized and therefore- in a way- not being quite that elementary. The “quantum“ out of which bumps could be reconstructed was minute ($q \approx 570$ fC) and corresponded to an opening of about 600 membrane channels.

The linear relation of the number of bumps with the light intensity as well as the Poissonian distribution of the number of bumps per flash are in accord with the model of bumps being independent one-photon events.

The finding of a quantized current-time integral of bumps might have a great impact on the *Limulus* -phototransduction research, since a quantized nature of the photoreceptor cell's electric response has not yet been considered in models of phototransduction mechanisms.

2. EINFÜHRUNG

2.1 Phototransduktion

Lichtwahrnehmung hat die Funktion, dem zentralen Nervensystem ein visuelles Abbild der Umgebung zur Verfügung zu stellen. Dazu muß Licht detektiert, in elektrische Signale transformiert und diese auf afferente Nervenfasern gegeben werden [Hartline (1935)].

Vergleicht man die Eigenschaften der Lichtwahrnehmung von Wirbeltieren mit denen von Wirbellosen auf zellulärer Ebene, stößt man bald auf wichtige Unterschiede.

Die Photorezeptoren der Wirbeltiere (Vertebraten) sind Stäbchen, die für das schwarz-weiße Sehen auch bei dämmeriger Beleuchtung (skotopisches Sehen) zuständig sind und Zapfen, die für das farbige Sehen von Details bei heller Beleuchtung (photopisches Sehen) verwendet werden. In den Stäbchen und Zapfen befindet sich das lichtempfindliche Rhodopsin, welches bei den Zapfen als 11-cis-Retinal mit drei verschiedenen Opsinen unterschiedlicher spektraler Empfindlichkeit vorliegt (Farbsehen).

Eine erfolgreiche Photonabsorption führt beim Vertebraten zu einer Überführung von Rhodopsin in eine aktive Form (Metarhodopsin II). Dieses aktive Rhodopsin vermag Transduzin zu aktivieren, welches seinerseits eine Phosphodiesterase aktiviert. Phosphodiesterase kann schließlich zyklisches Guanosin-Monophosphat hydrolysieren. Während zyklisches Guanosin-Monophosphat bei Dunkelheit Kanäle für Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen offen hält, werden sich nach einer Belichtung viele dieser Kanäle schließen, da ein Teil des zyklischen Guanosin-Monophosphat-Haushaltes hydrolysiert wird. In der Folge *hyperpolarisiert* die Rezeptorzelle von ca. -30 mV auf bis zu -70 mV (innen negativ gegen außen), weil die Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen nicht mehr in das Zellinnere strömen können [Kaupp (1986); Lamb (1986); Silbernagl and Despopoulos (1991)].

Bei Wirbellosen (Evertebraten) gibt es zum Teil ähnliche Reaktionen auf Lichtreize. Es existieren ebenfalls Rhodopsinmoleküle, die hier in die Plasmamembran der Photorezeptorzellen eingelagert sind und als primäre Lichtrezeptoren fungieren [Lisman and Bering (1977);

Calman and Chamberlain (1982); Nagy (1991)]. Anders als bei Wirbeltieren öffnen sich bei Wirbellosen nach erfolgreicher Photonabsorption lichtempfindliche Kationen-Kanäle. Der positive Einwärtsstrom bewirkt eine *Depolarisation* der Zelle. Über den Verlauf der Enzymkaskade(n) infolge der Photonabsorption ist weit weniger bekannt als bei den Vertebraten.

Die folgenden vorgeschlagenen Transduktionsmechanismen beziehen sich in erster Linie auf den Wirbellosen *Limulus polyphemus*. Er diente auch bei dieser Diplomarbeit als Versuchstier (s.a. Abschnitt 4.1). Mechanismen der Phototransduktion die an diesem Versuchstier beobachtet werden, lassen sich aber eventuell auch auf andere Evertrebraten übertragen.

2.2 Transduktionsmechanismen im *Limulus polyphemus*

Diese Arbeit möchte einen Beitrag zum Verständnis der Phototransduktion in der Ventralnerv-Photorezeptorzelle des *Limulus* leisten. Deshalb werden im Folgenden bis-herige Erkenntnisse und Modellvorstellungen zusammengestellt. Für einen detaillierteren Überblick möchte ich auf die Review-Artikel von Tsuda (1987) und Nagy (1991) verweisen.

Es existieren Hinweise auf drei verschiedene Transduktionskaskaden:

Betrachtet man die Stromantworten der Photorezeptorzelle unter festgehaltener Spannung (Prinzip der Spannungsklemme, s. Abschnitt 4.4) nach Reizung mit sukzessive intensiveren Lichtblitzen, so erkennt man drei verschiedene Stromkomponenten, die bei unterschiedlichen Reizintensitäten die Stromantwort dominieren (s.a. **Abbildung 2.1**). Allein schon die Tatsache, daß die verschiedenen Komponenten des Rezeptorstroms bei unterschiedlichen Lichtintensitäten sättigen, deutet auf verschiedene Transduktionsmechanismen hin [Deckert et al. (1992)]. Andere Hinweise auf unterschiedliche Enzymkaskaden konnten aus der selektiven Inhibierung einzelner Rezeptorstromkomponenten gewonnen werden [Nagy (1994); Nagy (1993); Contzen et al. (1995)].

Außerdem konnten in der Photorezeptorzelle drei unterschiedliche Membrankanäle (Leitfähigkeiten ca. 6 pS, 12 pS und 30 pS) nachgewiesen werden, an die wahrscheinlich jeweils spezifische Transmitter binden können [Nagy (1990); Nagy und Stieve (1990); Nagy (1991)].

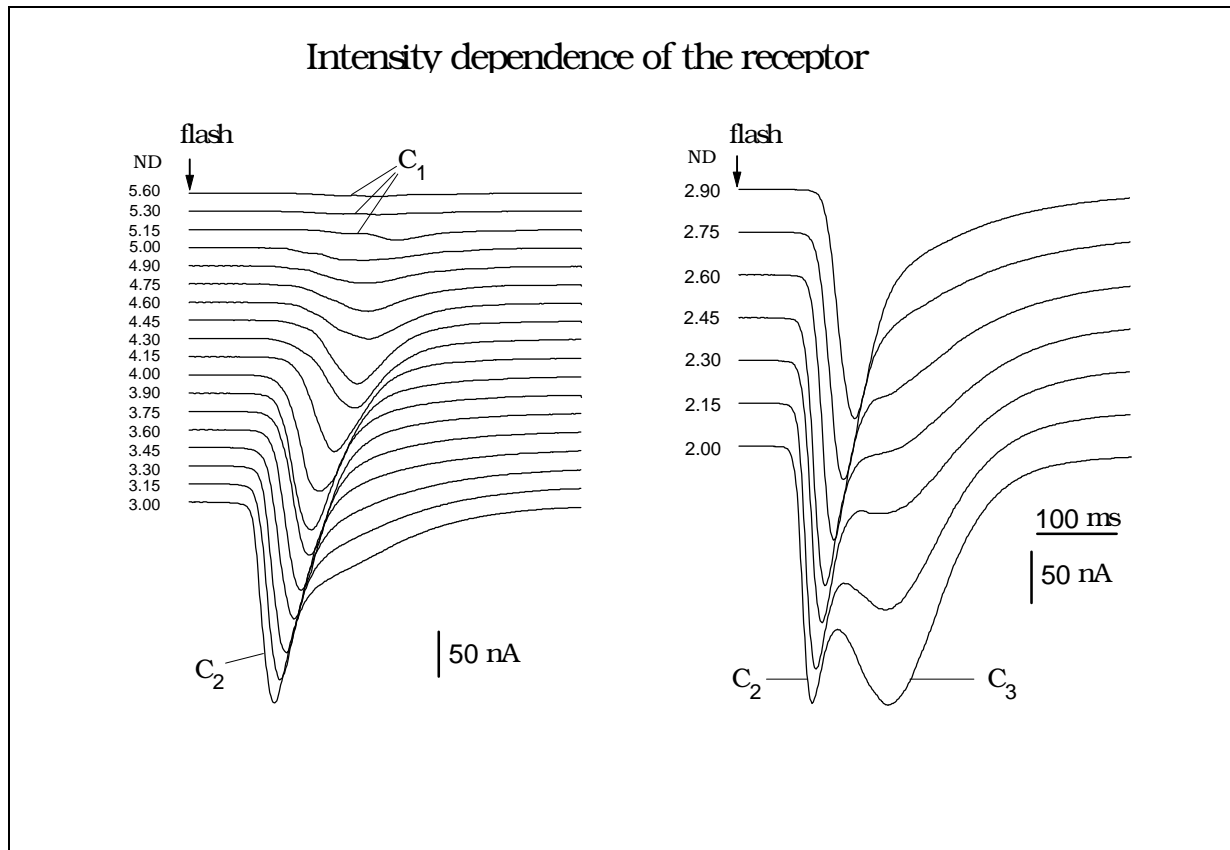


Figure 2.1: Receptor currents revealing three distinct components. The flashlight was intensified for each of the consecutive current traces (ND=density of the neutral filters). Each current component saturates at different light intensities and therefore becomes predominant in a certain light intensity range [Contzen and Nagy (1996)].

In **Abbildung 2.2** sind drei mögliche Phototransduktionsketten dargestellt. Der Index „i“ im Rhodopsin-Zyklus soll das mögliche Vorkommen von bis zu drei verschiedenen Rhodopsinen andeuten [Nagy et al. (1993)].

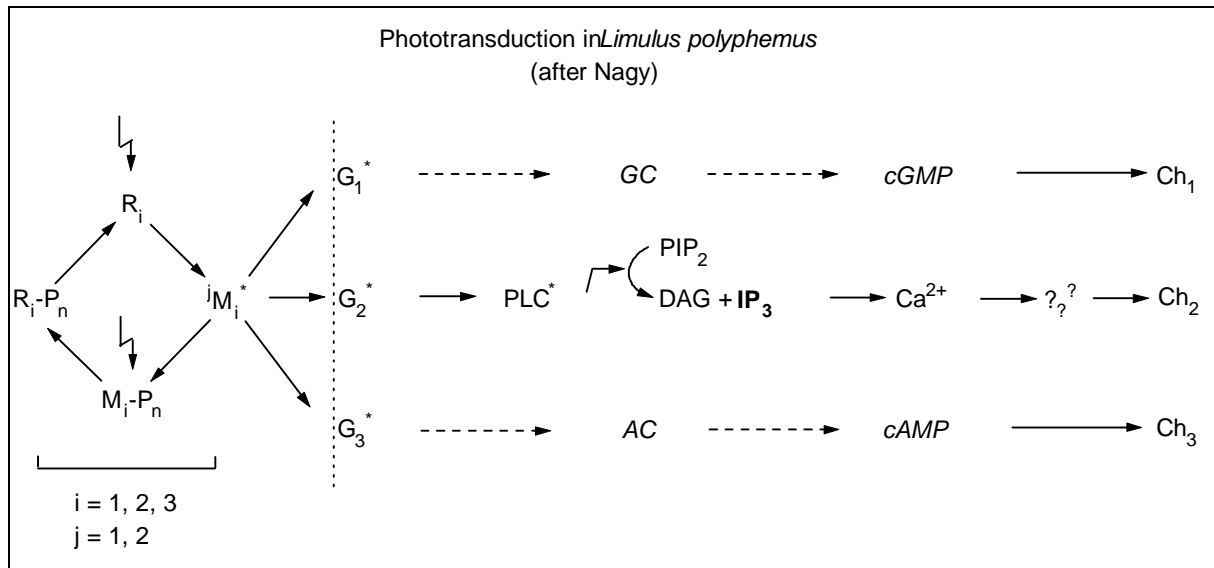


Figure 2.2: Schematic drawing of known (solid) and hypothetical (dashed) steps in the enzyme cascade in *Limulus* ventral nerve photoreceptors. Ch_i denote the channels underlying the receptor current component C_i in figure 2.1 (for explanations see text; after Nagy (1993)).

Die Phototransduktion wird durch die erfolgreiche Absorption eines Photons initiiert. Ein Photon wird von einem Rhodopsinmolekül (R_i , $i=1, 2, 3$) absorbiert. Bei dieser Photoisomerisation gelangt R_i über mehrere Zwischenschritte vom 11-*cis* in den aktivierten *all-trans* Zustand M_i^* . Mit „aktiviert“ ist hierbei die Fähigkeit des M_i^* gemeint, eine Enzymkaskade auszulösen (s.u.). Nach einer Phosphorylierung und Absorption eines weiteren Photons kann das Rhodopsin wieder den ursprünglichen lichtempfindlichen Zustand annehmen [Wald (1968); Lisman and Sheline (1976); Lisman und Goldring (1985); Nagy (1991)].

Wahrscheinlich ist die M_i^* -Deaktivierung mehrstufig [Grus (1991)]. Betrachtet man die Verteilung der Rezeptorstromgrößen (z. B. die Amplitude oder das Strom-Zeit Integral von Bumps, als Maß für die Verstärkung des gesamten Transduktionsprozesses), so beobachtet man ein Maximum der Verteilung bei kleinen Werten (s. Abbildung 6.4). Dies ist anhand von Modellrechnungen erklärbar, wenn man annimmt, daß für die Deaktivierung des M_i^* mehr als eine Stufe nötig ist [Lisman and Goldring (1994); Kirkwood and Lisman (1994)]. Lisman und Goldring (1994), sowie Kirkwood und Lisman (1994) schlugen eine zweistufige Deaktivierung vor ($j=1, 2$). Außerdem konnte Grus (1991) *in vivo* und *in vitro* ERG-Signale am besten mit einer mehrstufigen M_i^* -Deaktivierung erklären.

Im Falle der PLC-Kaskade (Phospholipase C) bindet Metarhodopsin M_i^* an ein G-Protein (GTP-bindendes Protein). Während der Bindung an das Metarhodopsin wird das G-Protein in eine G_α -GTP Untereinheit und einen $G_{\beta\gamma}$ -Komplex gespalten. Die G_α -Untereinheit aktiviert in der Membran eine PLC [Calhoon et al. (1980); Vandenberg and Montal (1984a,b); Devary et al. (1987)]. Diese wiederum vermag die Spaltung von PIP_2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) nach IP_3 (Inositol (1,4,5)-Trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol) zu katalysieren [Berridge and Irvine (1984); Berridge (1993)].

Das freigesetzte IP_3 öffnet Kanäle in den submikrovillären Zisternen, den intrazellulären Kalziumspeichern [Brown and Rubin (1984); Payne and Fein (1986); Payne et al. (1988)]. Daraufhin wird Kalzium aus den submikrovillären Zisternen in das Cytosol geschüttet und bindet entweder als terminaler Transmitter oder über einen Zwischenschritt an Membrankanäle [Ukhanov and Payne (1995)]. Diese Kanäle lassen vorwiegend Na^+ passieren [Hagins et al. (1962); Millecchia and Mauro (1969); Brown and Mote (1974)].

Ob Ca^{2+} wirklich der terminale Transmitter ist, konnte noch nicht endgültig bestimmt werden. Gesichert ist dagegen, daß die intrazelluläre Kalzium-Konzentration [Ca^{2+}]_i nach einer Belichtung der Photorezeptorzelle stark ansteigt (von unter 1 μM im dunkel adaptierten Zustand bis zu ca. 150 μM nach starker Beleuchtung [Brown and Blinks (1974); Maaz and Stieve (1980); Nagy and Stieve (1983); Ukhanov and Payne (1995)]).

Die submikrovillären Zisternen können über eine ATP-zehrende Ca^{2+} -Pumpe (Ca^{2+} -ATPase) wieder aufgefüllt werden [Payne et al. (1988); Deckert and Stieve (1991); Stommel (1995)].

Die PLC-Kaskade ist bisher am besten untersucht worden. Ein Grund hierfür mag sein, daß IP_3 in seiner Funktion als *second messenger* in vielen verschiedenen Signaltransduktionsmechanismen die mit Kalzium als Transmitter arbeiten gegenwärtig ist [Berridge (1993)].

Neben dieser Enzymkaskade existieren Hinweise auf zwei weitere Kaskaden (s. Abbildung 2.2) [Nagy et al. (1993)].

Wahrscheinlich werden diese ebenfalls über G-Proteine gestartet [Contzen and Nagy (1995)]. Unklar ist, ob dazu strukturell unterschiedliche Metarhodopsine (zwei verschiedene aktive Metakonformationen in einem Modell nach Lisman [Lisman (1985)] oder- wie in Abbildung 2.2 angedeutet- verschiedene Rhodopsine nötig sind.

Die Enzymkaskaden laufen wahrscheinlich über GC (Guanyl-Zyklase) und AC (Adenyl-Zyklase) ab, welche cGMP (zyklisches Guanosin-Monophosphat) bzw. cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat) produzieren. Der Mechanismus der cGMP-Kaskade ist bereits aus der Vertebraten-Phototransduktion bekannt (s.a. Abschnitt 2.1). Bacigalupo et al. konnten in *patch-clamp* Experimenten zeigen, daß cGMP im Gegensatz zu Ca^{2+} direkt lichtabhängige Kanäle öffnen kann [Bacigalupo et al. (1991)]. Zumindest für eine Kaskade scheint cGMP somit als terminaler Transmitter gesichert [Johnson et al. (1986); Shin et al. (1993)].

Hinweise auf die Beteiligung von G-Proteinen an den Enzymkaskaden erhielt man durch Injektion verschiedener G-Protein-Blocker oder -Aktivatoren. Mit Hilfe dieser Wirkstoffe konnte die Rezeptorantwort teilweise inhibiert bzw. evoziert werden [Corson and Fein (1983); Fein (1986); Kirkwood et al. (1989); Stieve et al. (1992); Contzen and Nagy (1995)].

Durch Hydrolyse von cAMP und cGMP mittels injizierter Phosphodiesterase gelang die selektive Blockierung einzelner Stromkomponenten [Nagy (1993); Nagy (1994); Poganiatz (1996)]. Dies deutet auf die Beteiligung dieser zyklischen Nukleotide am Transduktionsprozeß hin.

Die energiezehrende Na^+ - K^+ -ATPase sorgt nach dem lichtinduzierten Na^+ -Einstrom für die Wiederherstellung der intrazellulären Na^+ - bzw. K^+ -Konzentration bis zum Ruhepotential [Smith et al. (1968); Brown and Lisman (1972)].

Das aus den submikrovillären Zisternen freigesetzte Ca^{2+} wird entweder unter Energieaufwand wieder in die Zisternen zurücktransportiert oder verläßt die Zelle über den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher in der Zellmembran [Stieve et al. (1985); O`Day and Gray-Keller (1989); Deckert and Stieve (1991); Stommel (1995)].

2.3 Adaptation

Bei der Phototransduktion spielt das intrazelluläre Ca^{2+} eine wichtige Rolle, was daran gezeigt werden konnte, daß seine cytosolische Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sich nach einer Photonabsorption vergrößert [Payne et al. (1986); Nagy (1991)]. Levy und Fein (1985) konnten mit Ca^{2+} -selektiven Elektroden zeigen, daß sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach einer Illumination im lichtempfindlichen Teil der Photorezeptorzelle 20-40 mal stärker vergrößert als im lichtunempfindlichen- ein Hinweis darauf, daß Kalzium direkt mit der Phototransduktion zusammenhängt [Levy and Fein (1985); Reuß and Stieve (1993); Ukhanov and Payne (1995)]. Außerdem ist die Rezeptorstromgröße und die Latenzzeit von der aktuellen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ abhängig. Eine erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (zum Beispiel infolge einer zuvor ausgesetzten intensiven Beleuchtung, künstlich veränderter äußerer Kalziumkonzentration oder nach Ca^{2+} -Injektion) reduziert die Amplitude der Rezeptorantwort und verkürzt deren Latenz [Stieve et al. (1983); Stieve et al. (1984); Stieve et al. (1991)]. Diese Abhängigkeit der Rezeptoreigenschaften von der Belichtungsvergangenheit der Zelle wird Adaptation genannt.

2.4 Bumps

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich ausschließlich mit Einzelphotonantworten, den sogenannten „Bumps“. Belichtet man eine Photorezeptorzelle mit hinreichend schwachem Licht adäquater Wellenlänge (s. Abschnitt 4.5), so erkennt man bei gleichzeitiger intrazellulärer Ableitung kurze stochastisch auftretende Spannungsänderungen variabler Größe („Spannungsbumps“). Bei festgehaltener Spannung (s. Abschnitt 4.4) erkennt man entsprechende Strombumps (im weiteren als „Bumps“ bezeichnet).

Abbildung 2.3 zeigt eine Reihe solcher gemessener Bumps auf aufeinanderfolgenden Stromspuren.

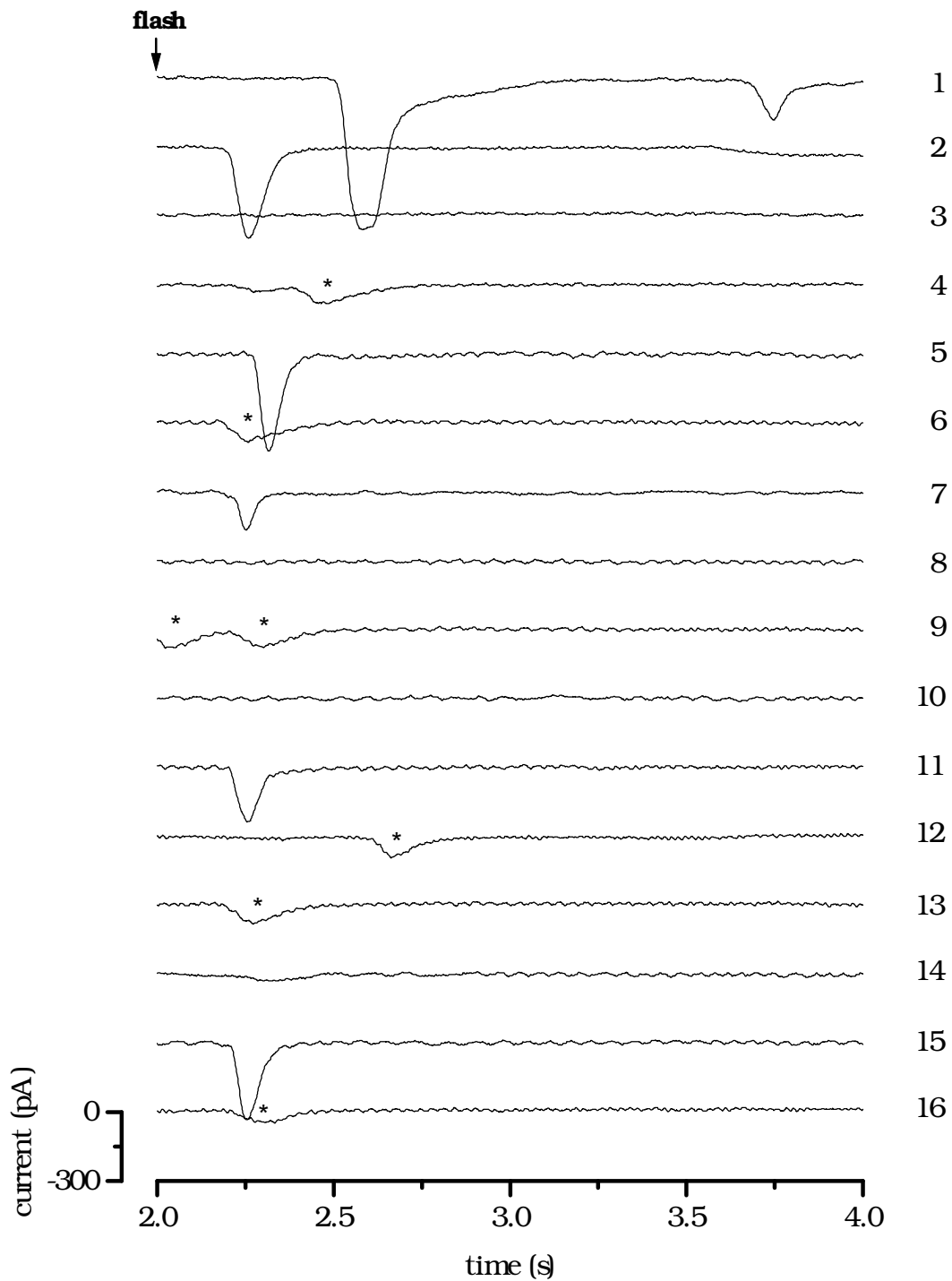


Figure 2.3: Consecutive current traces recorded under *voltage-clamp* conditions. A weak flash-illumination was applied at $t=2.0$ s ($3.99 \cdot 10^6$ Photonen/cm², $\lambda=538$ nm, λ -half-width=45 nm). c_1 -bumps are marked by asterisks. Note the early event on trace 9 and the late one on trace 1. These events were not induced by the light stimuli, since they start before the flash application (trace 9) or “much too late“ (trace 1). (Experiment mw_1808.1030ff.)

Die Photorezeptorzelle wurde mit schwachen Lichtblitzen ($3,99 \cdot 10^6$ Photonen/cm², $\lambda=538$ nm, λ -Halbwertsbreite=45 nm) bei der Zeit $t=2$ s gereizt (für Details zum Blitzprotokoll s. Abschnitt 4.6).

Man erkennt transiente Stromänderungen mit einigen 10 pA bis fast 1 nA Amplitude und Dauern bis ca. 200 ms und länger. Es konnten auch noch größere Bumps mit Amplituden bis zu einigen Nanoampere beobachtet werden. Kleinere Bumps verschwinden im Rauschen der Meßspur. Lichtinduzierte Bumps treten innerhalb ca. 500 ms nach dem Blitz auf (s. Abb. 5.6). Neben den lichtinduzierten finden sich aber auch noch solche Bumps, die viel später (s. Spur 1 und 12, Abb. 2.3) oder auch vor dem Blitz (Spur 9, Abb. 2.3) erscheinen. Diese Bumps sind wahrscheinlich nicht lichtinduziert und werden deshalb „Spontanbumps“ oder „Dunkelbumps“ (wie im weiteren) genannt.

Dunkelbumps sind im Mittel 7-8 mal kleiner als lichtinduzierte Bumps [Reuß et al. (1992)], ähneln diesen aber in vielen Eigenschaften, wie zum Beispiel der Anstiegs- und Abklingkinetik. Dies führte zu der Annahme, daß Dunkelbumps Produkte der gleichen Enzymkaskade sind wie die lichtinduzierten Bumps [Lederhofer and Schnakenberg (1991)]. Ihre geringere Größe kann mit dem Aussparen eines ersten Verstärkungsschritts erklärt werden [Reuß et al. (1992)]. Bester Kandidat für einen Dunkelbumpinitiator ist das aktivierte G-Protein, weil hier die erste Verstärkungsstufe erwartet wird. Aus dem Verhältnis der Amplitude der Dunkelbumps zu der der lichtinduzierten Bumps läßt sich der Verstärkungsfaktor bei der Aktivierung der G-Proteine errechnen. Genaue Bestimmungen gelangen durch die chemische Induzierung von Bumps mit Hilfe von G-Protein-Aktivatoren (AlF_4^-) [Reuß et al. (1992)]. Diese chemisch induzierten Bumps waren 7-8 mal kleiner als lichtinduzierte Bumps. Da chemisch induzierte Bumps sehr wahrscheinlich nur von je einem G-Protein gestartet werden, läßt sich daraus schließen, daß das aktivierte Metarhodopsin M_i^* 7-8 G-Proteine aktiviert [Kirkwood et al. (1988); Reuß et al. (1992)].

Bumps sind sehr wahrscheinlich lokale Ereignisse. Die Absorption eines Photons ruft die Öffnung von Na^+ -Kanälen in einer etwa $2 \mu\text{m}^2$ großen Membranfläche („bump-speck“) um den Absorptionsort herum aus [Behbehani and Srebro (1974); Brown and Coles (1979); Keiper et al. (1984)]. Diese Erkenntnis führte zum „bump-speck model“ [Stieve and Schlösser (1989)]: Unter der Annahme, daß für die lichtinduzierte Öffnung der Membran-kanäle mehr als ein terminales Transmittermolekül pro Kanal nötig ist, läßt sich um das Gebiet geöffneter Kanäle („bump-speck“) herum ein „Bump-Hof“ annehmen. In diesem befinden sich „entsicherte“ Kanäle, die bereits wenigstens einen aber weniger als für die Kanalöffnung nötige Transmitter gebunden haben. Wird die Lichtintensität erhöht, so steigt die Photon-Absorptionsrate und damit die Wahrscheinlichkeit, daß sich „Bump-Höfe“ räumlich überlappen. Transmitter benachbarter „Bump-Höfe“ könnten „kooperativ“ die Öffnung von zusätzlichen Membrankanälen bewirken. Diese positive „Kooperativität“ konnte auch wirklich als supralineares Verhalten in der Rezeptorstrom-Lichtintensitäts-Kurve beobachtet werden [Stieve et al. (1983); Stieve et al. (1986); Grzywacz et al. (1988); Stieve and Schlösser (1989)].

Reuß und Stieve (1993) konnten sich in ihrer Kinetik unterscheidende Bump-Typen voneinander trennen. Nagy et al. (1993) zeigten, daß langsame, kleine Bumps mit der makroskopischen C_1 -Stromkomponente und schnelle, große Bumps mit der makroskopischen C_2 -Stromkomponente korrespondieren. In Anlehnung an die makroskopischen Stromkomponenten werden die langsamen, kleinen Bumps im weiteren mit c_1 und die schnellen, großen Bumps mit c_2 bezeichnet.

3. FRAGESTELLUNG

*„Die physikalischen Eigenschaften der Einzelphotonantworten des *Limulus polyphemus*“*

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten physikalische Eigenschaften der Bumps untersucht werden.

Nachdem die Existenz von zwei in ihrer Kinetik unterschiedlichen Bump-Typen (c_1 und c_2) gezeigt werden konnte [Reuß and Stieve (1993); Nagy et al. (1993)], stellte sich die Frage, ob sich diese Bump-Typen in weiteren Eigenschaften unterscheiden.

Dazu untersuchte ich:

1. die Lichtabhängigkeit der Populationen von c_1 - und c_2 -Bumps,
2. die Verteilung der Anzahl der von einem Blitz ausgelösten c_1 - und c_2 -Bumps,
3. die Verteilung der Strom-Zeit Integrale von Bumps,
4. Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen den Enzymkaskaden,
5. Hinweise auf eine quantisierte Struktur der Bumps.

Die Motivation für diese Fragestellungen besteht in der Möglichkeit, aus der Kenntnis der physikalischen Eigenschaften der Bumps wichtige Aufschlüsse über die zugrundeliegenden Enzymkaskaden zu erhalten.

Ein Weg zur Entschlüsselung unbekannter Signalwege wird im Gebiet der Molekularbiologie gegangen. Dort wird zum Beispiel mit Hilfe von (Membran-) Kanalcharakterisierung oder Elektrophysiologie in Verbindung mit der Anwendung pharmakologisch wirksamer Substanzen Einsicht in die Struktur und Wirkungsweise von Enzymkaskaden gesucht.

In dieser Arbeit wollte ich mit statistischen Methoden elektrophysiologische Messungen analysieren und mit diesen Ergebnissen zum Verständnis der Eigenschaften der Enzymkaskaden beitragen.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Versuchstier

Die hier vorgestellten Versuche wurden alle an männlichen Exemplaren des *Limulus polyphemus* durchgeführt. Der *Limulus* gilt als „lebendes Fossil“, da er sich, gegenüber seinen ca. 175 Millionen Jahre alten Vorfahren im Jura, morphologisch kaum verändert hat [Lexikon der Biologie, Herder (1985)].

Diese Eigenschaft war historisch gesehen ein Grund dafür, Phototransduktion der Wirbellosen an dieser Spezies zu untersuchen. Man erhoffte sich von einem stammesgeschichtlich so alten Tier besonders einfache und damit leicht zugängliche Phototransduktionsmechanismen. Diese Hoffnung war allerdings nicht berechtigt und mußte aufgegeben werden. Meßtechnische Gründe allerdings sprechen für das Versuchstier *Limulus*, da die hier untersuchten Ventralnervphotorezeptorzellen mit typischen Größen von 50 µm Breite und 150-250 µm Länge groß genug sind für die Penetration mit Glaselektroden (Spitzendurchmesser < 1 µm).

Eine weitere angenehme Eigenschaft der Ventralnervphotorezeptorzellen ist deren separiertes Vorkommen auf dem Ventralnerv, wodurch elektrische Kopplung zwischen den Rezeptorzellen ausgeschlossen werden kann.

Abbildung 4.1 zeigt Zeichnungen von *Limulus polyphemus* im Ganzen und im Ausschnitt. Links erkennt man *Limulus* von dorsal. Angedeutet ist die Lage des in der Mitte vergrößert dargestellten Protocerebrums. Rechts sieht man einen Ausschnitt eines Ventralnervs mit angedeuteten Photorezeptoren.

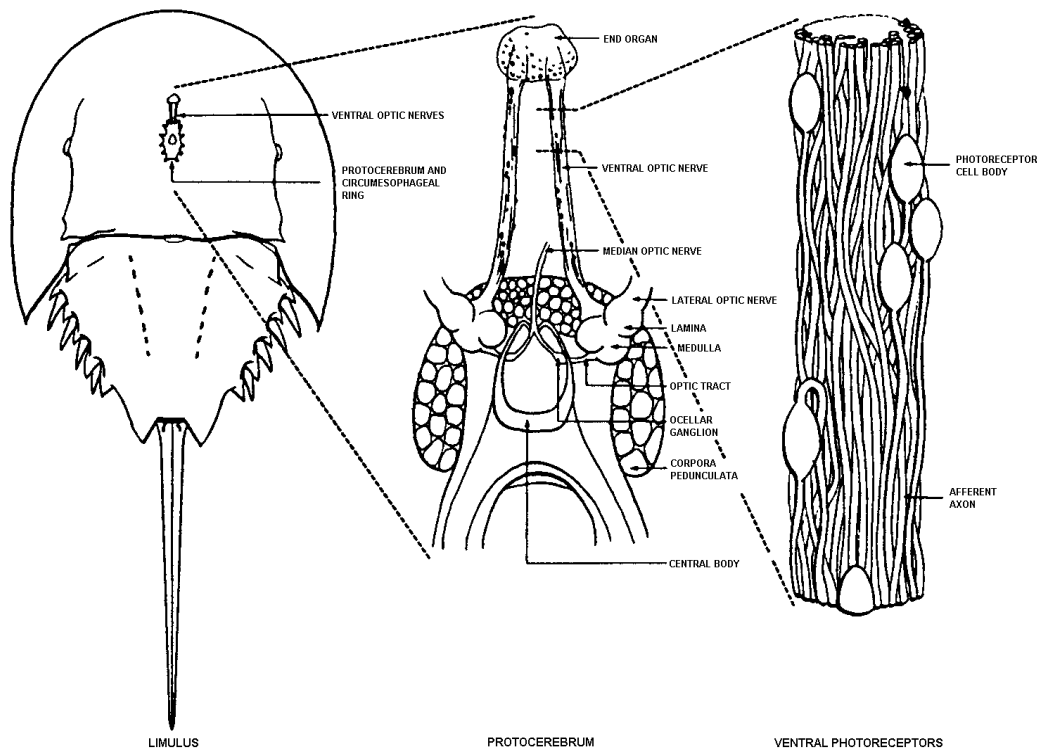


Figure 4.1: Summary drawing of the anatomy of the *Limulus* protocerebrum and ventral optic nerves (after Calman and Chamberlain (1982))

Abbildung 4.2 gibt einen Einblick in den inneren Aufbau der Photorezeptorzelle. Der Zellkörper läßt sich grob in einen lichtempfindlichen (rhabdomeralen) und einen lichtunempfindlichen (arhabdomeralen) Teil gliedern. Der arhabdomerale Teil enthält die Mehrzahl der für die Zelle lebenswichtigen Zellorganellen, wie den Zellkern, die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum. Im rhabdomeralen Teil befinden sich neben dem auch hier vorhandenen endoplasmatische Retikulum etwa 10^6 Mikrovilli, fingerförmige Ausstülpungen der Zellmembran, in denen das Photopigment Rhodopsin eingelagert ist (etwa 1000-4000 Rhodopsinmoleküle pro Mikrovillus) [Lisman and Bering (1977); Brown and Coles (1979)]. Da die größten lichtinduzierten Ströme im Bereich von $1 \mu\text{A}$ liegen, kann man aus Einzelkanalleitfähigkeitsmessungen (s.a. Abschnitt 2.2) abschätzen, daß sich in der gesamten Photorezeptorzelle etwa 10^6 Kanäle befinden müssen, also etwa 1 Kanal pro Mikrovillus [Nagy (1991)].

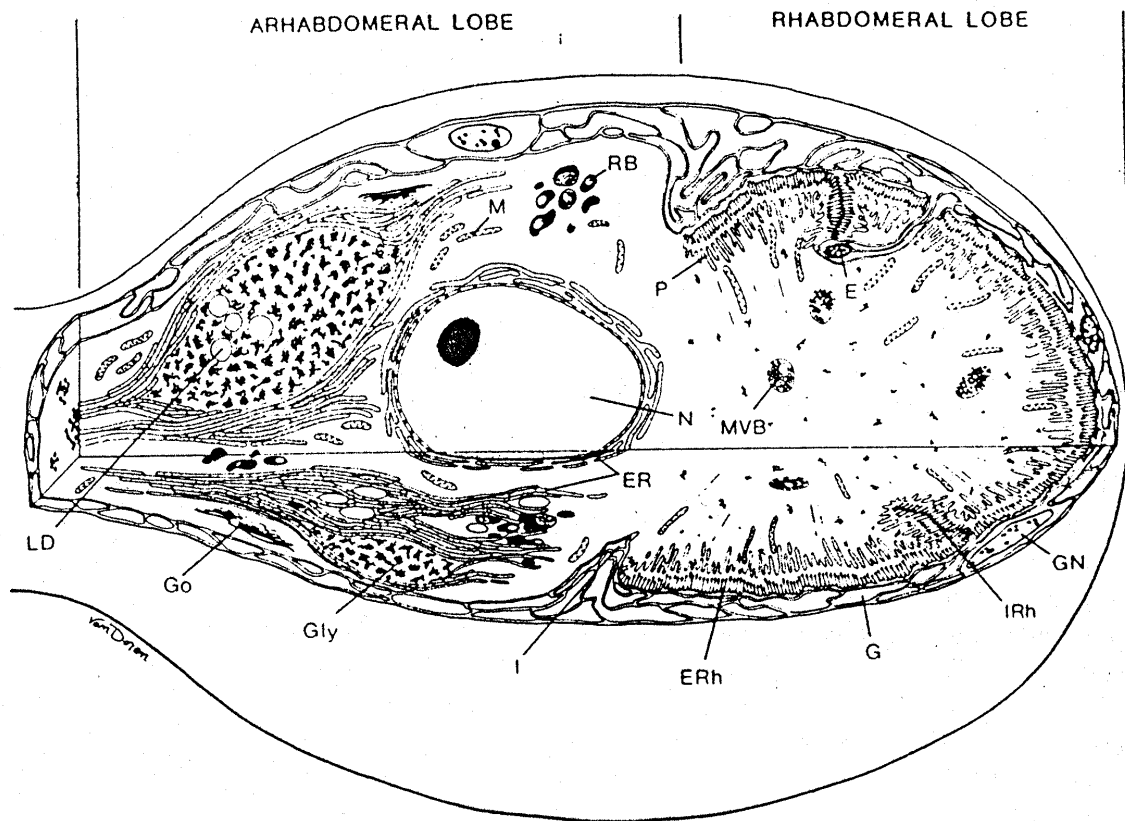


Figure 4.2: Summary drawing of a single *Limulus* ventral photoreceptor (without axon) showing the two lobes and distribution of important structures. **E:** efferent fibre; **ER:** endoplasmatic reticulum; **ERh:** external rhabdom; **G:** glial cells; **Gly:** glycogen; **Go:** Golgi complex; **GN:** nucleus of glial cell; **I:** glia-filled indentation at junction of R lobe and A lobe; **IRh:** internal rhabdom; **LD:** lipid droplet; **M:** mitochondria; **MVB:** multivesicular body; **N:** nucleus; **P:** palisade; **RB:** residual body (after Calman and Chamberlain (1982)).

4.2 Präparation

Die Präparation der Ventralnerven geschah nach einer Standardmethode, wie sie bereits an anderer Stelle beschrieben wurde [Deckert and Stieve (1991)]. Der Vollständigkeit halber möchte ich das Vorgehen aber kurz skizzieren.

Der *Limulus* wurde durch einen gut positionierten Schnitt zwischen dem zweiten und dritten Beinpaar getötet. Dadurch wurde das Gehirn durchschnitten. Das Protocerebrum mit den beiden Ventralnerven wurde unter dem Mikroskop herauspräpariert und wenigstens über

Nacht in einem Kulturmedium (nach Kass und Renninger (1988)) bei etwa +5 °C lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

Unmittelbar vor dem Versuch wurde einer der Ventralnerven vom Gehirn getrennt und mechanisch von den ihn umgebenden Blutgefäßen befreit. Zuletzt wurde der Nerv im Schüttelbad ca. 60 s in Pronase (Boehringer Mannheim, Konzentration 20 mg/ml in physiologischer Lösung) getaucht. Dies geschah mit dem Ziel, die den Nerv stützenden und versorgenden Gliazellen enzymatisch wegzudauen. Die Entfernung der Gliazellen ermöglichte später ein schonenderes Inserieren der Mikroelektrode. Durch die enzymatische Behandlung des Nervs mit Pronase konnten auch die Photorezeptorzellen beschädigt werden. Die Einwirkzeit der Pronase durfte deshalb nicht zu lang gewählt werden.

4.3 Meßaufbau

Der Meßaufbau (s.a. **Abbildung 4.3**) gliedert sich in

1. Meßvorrichtung zur Ableitung der elektrischen Aktivität des Photorezeptors
2. Signalaufbereitung mit Meßelektronik
3. Signalspeicherung und *off line* Datenanalyse

Der unmittelbar vor dem Versuch fertig präparierte Ventralnerv wurde mit Edelstahl-krampen in einer mit Sylgard („Silastic[®]“, Dow Corning) angefüllten Petri-Schale fixiert und mit 2-3 ml physiologischer Salzlösung (Zusammensetzung s.a. **Tabelle 4.1**) überdeckt.

HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid], SIGMA) diente als pH-Puffer. Die physiologische Lösung wurde auf den pH-Wert 7,5 eingestellt.

	NaCl	NaOH	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	MgSO ₄	HEPES
mM	480,8	5	10	10	25	30	10

Tabelle 4.1: Composition of the physiological saline used during the preparations and the experiments.

Mit einem Peltier-Element ließ sich die Temperatur der physiologischen Salzlösung in der Petri-Schale einstellen ($T_{Peltier}$). Alle Messungen fanden bei Temperaturen zwischen 14,0 und 15,0 °C statt.

Die Position der Photorezeptorzelle und der Meßelektrode konnte über ein invertiertes Mikroskop (Carl Zeiss) beobachtet und mit Mikromanipulatoren (MO-103M, Narishige, Japan) eingestellt werden.

Die Meßsignale wurden noch in der Meßapparatur an einen Impedanzwandler geführt und vorverstärkt (*head-stage*) und danach zu einem Verstärker (*voltage-clamp amplifier*; SEC-05L, npi) geleitet (s. Abschnitt 4.4). Die Spannungs- und Strom-Signale wurden mit einem Speicheroszilloskop (*oscilloscope*; Grundig SO40) überwacht. Die Stromsignale wurden noch im Verstärker mit einem Tiefpaß bei 100 Hz gefiltert (4-Pol-Bessel-Charakteristik, Hardwarefilter), um Aliasing-Effekte zu vermeiden. Unter einem Aliasing-Effekt versteht man die Fehlinterpretation der Frequenzanteile in einem Signal aufgrund zu kleiner Abtastraten. Die Abtastrate muß mindestens doppelt so groß sein wie die höchste im Signal vorkommende Frequenz [Press et al. (1990)]. Auf zwei Spuren (einfach und zehnfach verstärkt) wurden die Signale an die Analog-Digital-Wandler Karte eines PC gegeben. Mit dem A/D-Wandler wurden die verstärkten Meßsignale mit einer Abtastrate von 1000 Hz digitalisiert.

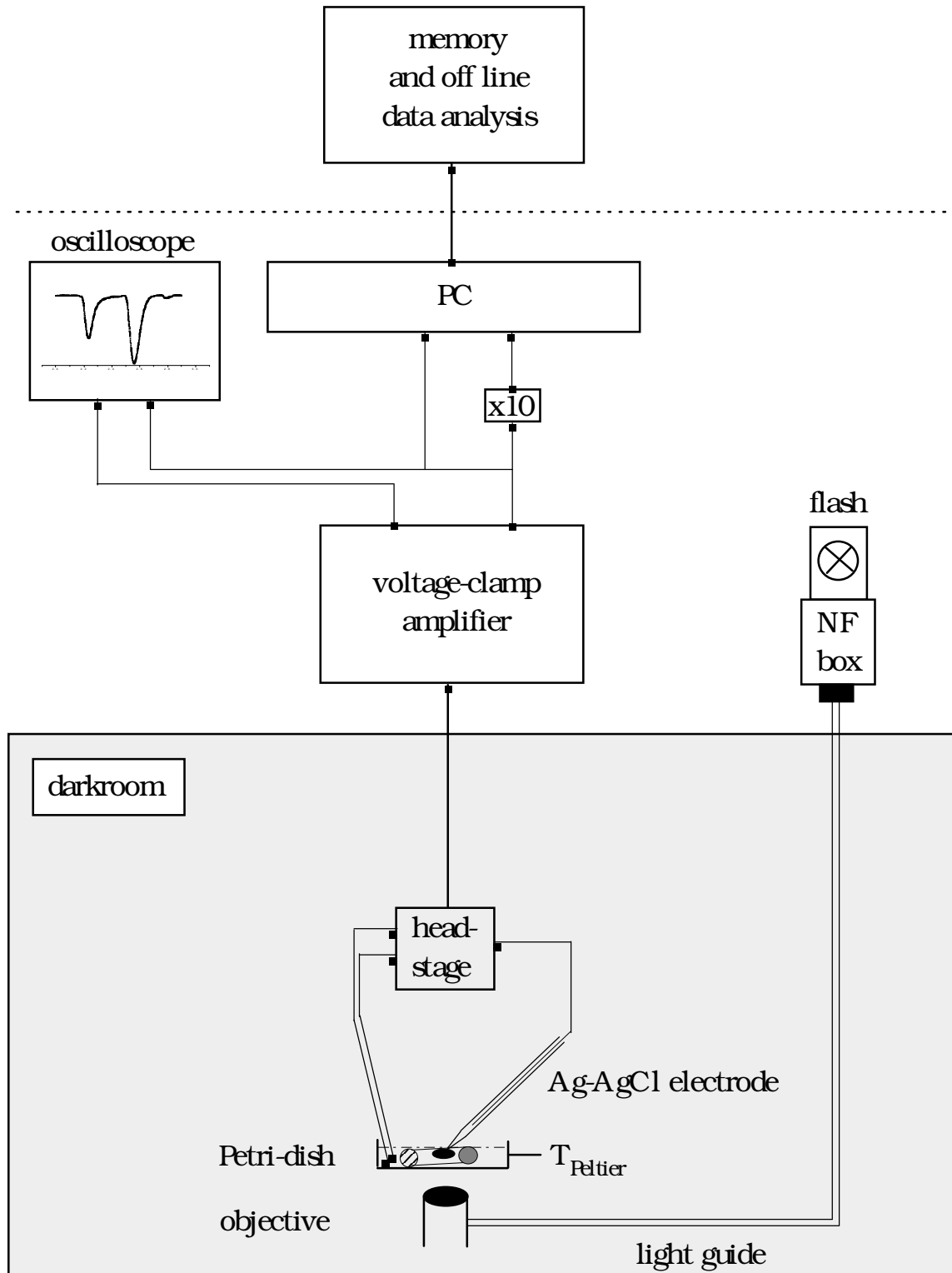


Figure 4.3: Scheme of the setup (for explanations refer to the text).

Die so aufbereiteten Stromspuren wurden von einem Meßprogramm (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Klaus Contzen) eingelesen und konnten bereits *on line* gesichtet werden [Beschreibung der Software bei Contzen (1995)]. Die Lichtreize wurden über einen Glasfaserlichtleiter durch das Objektiv hindurch von unten auf den Mikroskopisch geleitet. Die Intensität des die Photorezeptorzelle erreichenden Lichtes wurde bei immer gleicher Blitzintensität durch das Einfügen von Neutralfiltern (*NF box*) (Oriol) unterschiedlicher Transmissionskoeffizienten eingestellt.

Alle Versuche wurden mit grünem Licht durchgeführt, weil das Absorptionsmaximum von Rhodopsin im Ventralnervphotorezeptor bei etwa 530 nm liegt [Murray (1966); Millecchia et al. (1966)]. Dazu wurde ein Spektralfilter ($\lambda=538$ nm, λ -Halbwertsbreite=45 nm, Oriol) in den Strahlengang eingefügt (*NF box*).

Die Glaselektroden (GC150TF-10 von Clark Electromedical Instruments, England) wurden mit einer 1.5 M KCl und 10 mM HEPES-Lösung gefüllt und hatten einen elektrischen Widerstand zwischen 5 und 20 M Ω .

4.4 Meßmethode „Spannungsklemme“

Um mit elektrophysiologischen Methoden Aussagen über Enzymkaskaden gewinnen zu können, müssen Beeinflussungen des Rezeptorstroms (des Meßsignals) durch Phänomene, die primär nichts mit der Transduktionskaskade zu tun haben ausgeschlossen werden. Dazu gehören spannungsabhängige Effekte, wie z.B. Ströme durch spannungsabhängige Membrankanäle, [Millecchia and Mauro (1969)] oder kapazitive Ströme. Aus diesem Grund wendet man eine Technik an, die auf Hodgkin und Huxley zurückgeht [Hodgkin and Huxley (1952)]. Die Spannung über der Membran („Membranpotential“) wird mit einem elektrischen Regelkreis künstlich „festgeklemmt“ (engl. „clamped“). Dazu wird gerade so viel Ladung über eine Elektrode in die Zelle injiziert, daß sich die vorgegebene Spannung einstellen kann. Für diesen Regelkreis sind im Prinzip zwei Elektrodenpaare nötig. Ein Paar, welches die aktuelle Membranspannung mißt und ein Paar mit dem der nötige Kompensationsstrom appliziert

werden kann. Eine Elektrode befindet sich jeweils extrazellulär (in der physiologischen Salzlösung), die andere wird in die Zelle hinein-gestochen.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Messungen konnte ein Eielektroden-Verstärker benutzt werden. Neben den zwei Referenzelektroden mußte darum nur noch eine Elektrode durch die Zellmembran gestochen werden. Dies hatte den großen Vorteil, daß die Zelle weit weniger Belastungen durch das Einstechen der Elektroden ausgesetzt war. Mit einer Frequenz zwischen 20 und 45 kHz wurde diese intrazelluläre Elektrode ab-wechselnd zur Spannungsmessung und zur Stromapplikation genutzt. Das Verhältnis der Strominjektionszeit zur Spannungsmeßzeit war immer 1:3.

4.5 Kalibrierung des Blitzlichtgerätes

Zur Reizung der Photorezeptorzelle wurde eine Photo-Blitzlampe (Mecablitz 60CT-1, Metz) benutzt.

Alle Messungen, die in dieser Arbeit verwertet sind, wurden mit derselben Blitzlampe und bei der gleichen Blitzlampeneinstellung vollzogen, um etwaige Ungenauigkeiten der Blitzlichtintensität durch ungenaues Nachstellen der Blitzregler auszuschließen. Außerdem konnte so auf eine genauere Analyse der Blitzlicht-Kennlinien verzichtet werden.

Zu Beginn und zum Ende der gesamten Meßreihe unternommene Energiemessungen des Blitzlichtes lieferten im Rahmen der Meßgenauigkeit die gleichen Ergebnisse für die Blitzlichtenergie. Es kann deshalb angenommen werden, daß auch während der Dauer der Diplomarbeit die Blitzlichtintensität konstant blieb.

Die Blitzlichtenergiekalibrierung geschah durch:

1. *Energiemessung* des Lichtblitzes am Ort des Ventralnervs
2. Bestimmung der *Querschnittsfläche* des Lichtflecks am Ort des Ventralnervs

Die *Energiemessung* des Lichtblitzes wurde mit einem pyroelektrischen Detektor (RjP-735 /EP, Polytec (Germany)) durchgeführt. Die lichtempfindliche Fläche des Detektors besteht aus einem ferroelektrischen Material, dessen permanente elektrische Polarisation temperaturabhängig ist. Der im Detektor generierte Strom ist proportional zur zeitlichen Temperaturänderung. Das Strom-Zeit Integral des Detektorstroms ist deshalb proportional zur totalen Temperaturänderung und damit zur Energie des eingestrahnten Lichts.

Das Energiemeßgerät wurde so über dem Objektisch des Mikroskops montiert, daß das Licht den gesamten während des Experiments benötigten Lichtweg passieren mußte (s. Abbildung 4.3). Wegen der sehr geringen Lichtblitzintensität konnten diese Messungen nur ohne das Einfügen der im Experiment benutzten Neutralfilter geschehen.

Das vom Meßverstärker gelieferte Signal (Strom-Zeit Integral des Detektorstroms) konnte nach weiterer 250facher Verstärkung (Ortec 4660), parallel auf einem Speicheroszilloskop beobachtet und von einem Meßprogramm [Contzen (1995)] aufgezeichnet werden. Die Benutzung des Speicheroszilloskops diente der Kontrolle. Wegen des ungünstigen Signal/Rausch-Verhältnisses wurden so viele dieser Meßspuren gemittelt, bis sich das gemittelte Signal nicht mehr meßbar veränderte.

Abbildung 4.4 zeigt eine Mittelung über $n=157$ solcher Meßkurven. Der Signalverlauf entspricht nicht dem des Lichtblitzes. Allein die Amplitude ist ein Maß für den Energie-inhalt des Lichtblitzes.

Aus Abbildung 4.4 läßt sich eine Lichtblitzenergie von $E_{\text{blitz}} = (8,817 \pm 0,064) \cdot 10^{-8} \text{ J}$ ablesen (Fehler aus Ablesegenauigkeit).

Wegen (Gleichung 2.1) entspricht dies $n_{\text{Photonen}} = (2,386 \pm 0,119) \cdot 10^{11} \text{ Photonen}$ (mit $\lambda = 538 \pm 23 \text{ nm}$) pro Blitz.

$$E_{\text{Blitz}} = n_{\text{Photonen}} \cdot \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

$$n_{\text{Photonen}} = (E \pm \Delta E) \cdot \frac{(\lambda \pm \Delta \lambda)}{h \cdot c} \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

Die Unsicherheit in der Zahl der Photonen, die bis zu der Sehzelle gelangen beträgt deshalb etwa 5 %.

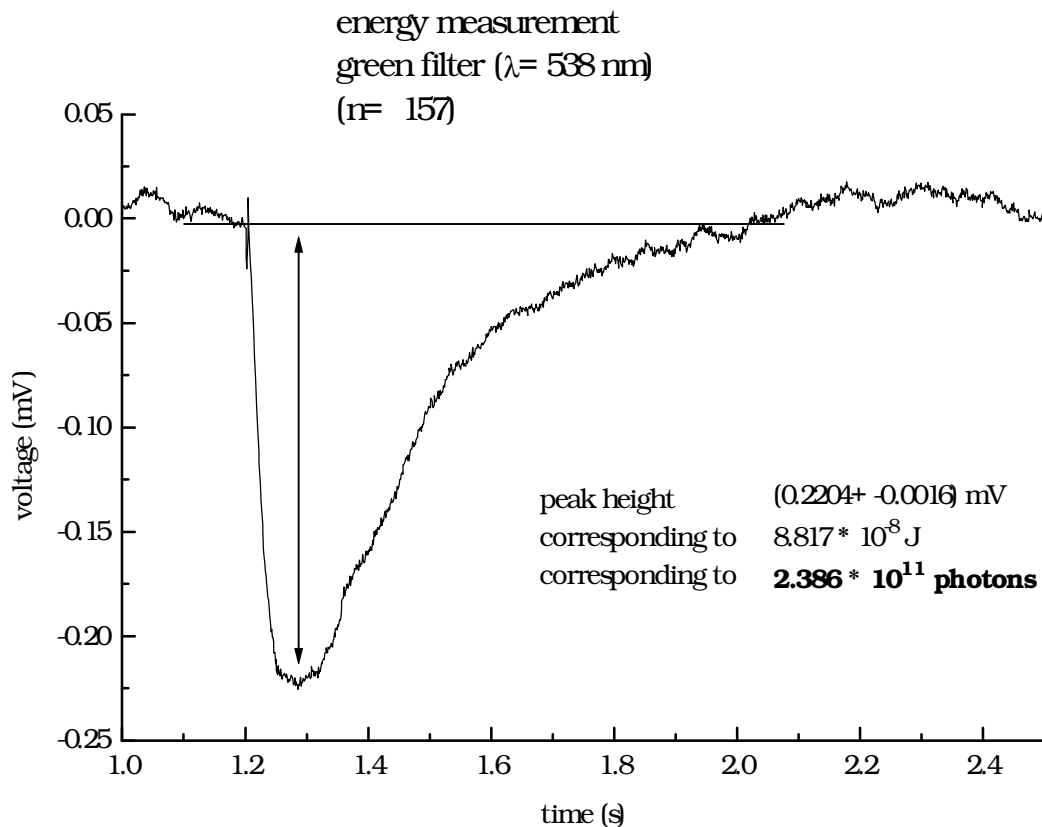


Figure 4.4: Measurement of the energy of the flash-light by means of the RjP-735/EP. The peak height of the signal is a direct measure for the total energy of the flash (see inset). [$\lambda = 538 \text{ nm}$, λ -half width of the metal interference filter = 45 nm]

Die *Querschnittsfläche* des Lichtblitzes am Ort des Ventralnervs wurde photographisch bestimmt.

Hierzu wurde der Objektisch des Meßmikroskops (s. Abbildung 4.3) so eingestellt, wie bei einer Messung. Anstelle der Ventralnerv-Präparation wurde Photopapier in die mit Sylgard gefüllte Petrischale gelegt. Nach der Belichtung konnte der Querschnitt des Lichtblitzes aus der Schwärzung auf dem Photopapier gemessen und berechnet werden. Die Querschnittsfläche A konnte nach Mittelung über drei Messungen zu

$$A = (0,189 \pm 0,054) \text{ cm}^2, \quad \text{Fehler ist Standardabweichung}$$

bestimmt werden.

Die Blitzlichtenergie wird im weiteren als Zahl der Photonen pro Quadratcentimeter angegeben. Es ergibt sich:

$$I_{\text{Blitz}} = \frac{n_{\text{Photonen}} \pm \Delta n_{\text{Photonen}}}{A \pm \Delta A}$$

$$I_{\text{Blitz}} = (1,262 \pm 0,424) \cdot 10^{12} \text{ Photonen/cm}^2$$

Die verhältnismäßig große Unsicherheit in der Größe der Blitzlichtenergie (34 %) entstammt der ungenauen Querschnittsflächenbestimmung.

Für die in dieser Diplomarbeit behandelten Fragestellungen kommt es allerdings nicht auf die Absolutwerte der Blitzlichtintensität an.

Die *Belichtungsdauer* konnte mit einem hochauflösenden Oszilloskop ausgemessen werden. Dazu wurde statt des Ventralnervs eine Photodiode in die Apparatur eingebracht.

Die Halbwertsbreite des Blitzes konnte zu

$$\tau_h = (34,7 \pm 0,4) \mu s$$

bestimmt werden (Fehler ist Standardabweichung aus n=11 Messungen).

Bei den hier benutzten sehr kurzen und schwachen Lichtblitzen spielte die Blitzdauer eine untergeordnete Rolle, weil alle beobachteten Phänomene auf einer größeren Zeitskala stattfanden (typischerweise etwa 100 ms).

4.6 Versuchsdurchführung

Vor der eigentlichen Meßreihe wurde der Ventralnerv wenigstens 15 min (meist aber mehr als 30 min) im Dunkeln belassen, damit er dunkeladaptieren konnte.

Zur Aufnahme der Lichtabhängigkeitskennlinien (s. Abschnitt 6.1) wurde das Präparat während der Messung in einem festen zeitlichen Rhythmus mit Lichtblitzen stimuliert (s. **Abbildung 4.5**). Die Zykluszeit zwischen aufeinanderfolgenden Blitzen war zu Beginn der Meßreihe 40 s. Als sich herausstellte, daß die Zahl der von einem Nerven gewonnenen Meßdaten meist zu gering war, verkürzte ich die Zykluszeit zu 30 s. Adaptationseffekte durch die kürzere Zykluszeit (etwa eine verkürzte Latenzzeit oder eine merklich veränderte Bump-Ausbeute) konnte ich nicht beobachten. Nach Nagy et al. (1993) ist eine Zykluszeit von 40 s ausreichend, um c_1 -Bumps beobachten zu können.

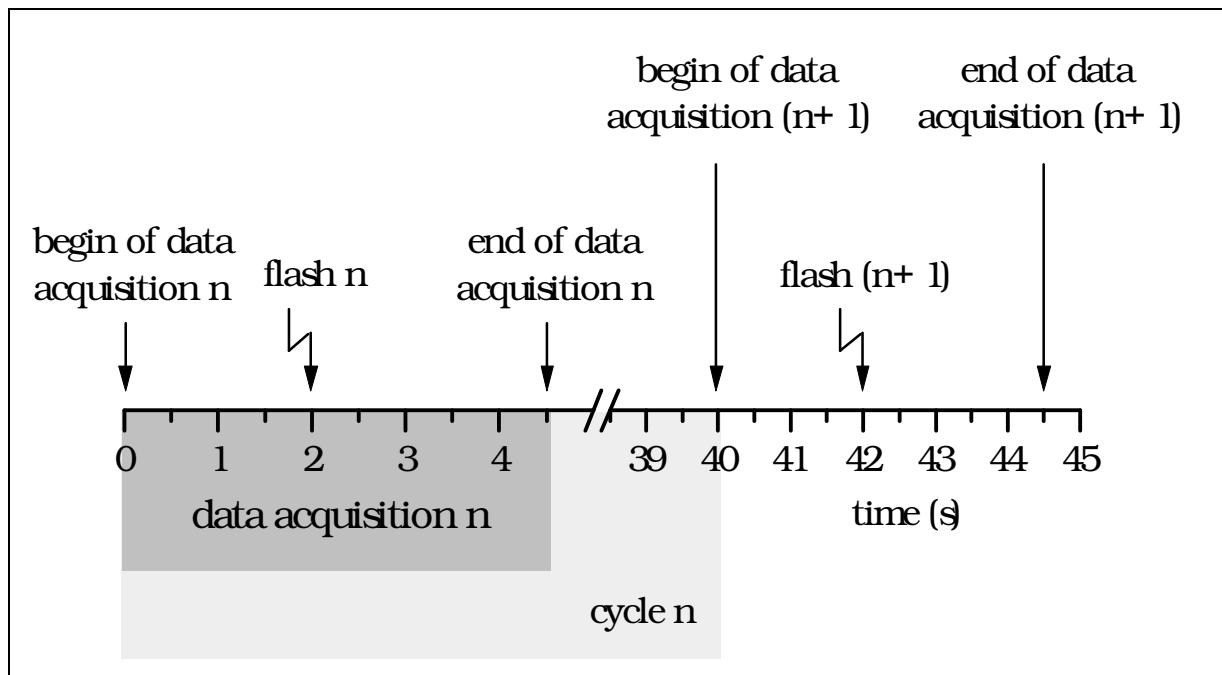


Figure 4.5: Scheme of the stimulus regime. Data acquisition started 2 s before every flash and stopped 2.5 s after the flash. Each stimulus cycle lasted 40 s.

Um bei der Bestimmung der Zahl der ausgelösten Bumps die zufälligen Dunkelbumps berücksichtigen zu können, zeichnete ich schon 2 s vor der Blitzapplikation die Stromspur auf. Unter der Annahme, daß die in diesen zwei Sekunden beobachteten Dunkelbumps mit gleicher Wahrscheinlichkeit auch in den zwei Sekunden nach dem Blitz auftreten konnten, ließen sich die Dunkelbumps in der berechneten Bump-Zahl berücksichtigen (s. Abschnitt 5.4).

Das Hauptziel meiner Untersuchungen lag darin, zu untersuchen, wie sich die Populationen der verschiedenen Bump-Sorten in Abhängigkeit von der Lichtintensität verhalten (s. Kapitel 3).

Dazu unterteilte ich die gesamte Meßzeit (typischerweise 2-7 Stunden) in Abschnitte, in denen die Zelle mit Licht gleicher Intensität belichtet wurde. Die einzelnen Abschnitte waren nicht durch Pausen voneinander getrennt. Das Wechseln der Neutralfilter zur Einstellung der gewünschten Lichtintensität für jeden Meßabschnitt geschah im Dunkeln, so daß kein Streulicht zur Auslösung unerwünschter Bumps führte. Die Größe der Meßabschnitte gleicher Lichtintensität wurde variabel nach Erfahrungswerten gewählt. Hohe Lichtintensitäten (1-3 Bumps/Blitz) bedeuteten eine große Zahl von ausgelösten Bumps. Diese Abschnitte mußten nicht allzu lang gewählt werden, um eine genügend hohe Zahl von Bumps für die statistische Auswertung zu liefern. Schwache Lichtintensitäten dagegen (0,3-0,6 Bumps/Blitz) mußten verhältnismäßig lange ausgemessen werden (min. 100 Meßspuren), um einer Statistik zu genügen.

5. AUSWERTUNG

5.1 Signalaufbereitung

Vor der quantitativen Untersuchung wurden die Meßspuren mit einem 30 Hz-Tiefpaß Filter mit Gauss-Charakteristik behandelt (das Filterungs-Programm wurde freundlicherweise von Klaus Contzen zur Verfügung gestellt). So konnten die sonst meist sehr verrauschten Signale besser ausgewertet werden. **Abbildung 5.1** illustriert den geringen Einfluß den die Filterung auf die Eigenschaften der Bumps hatte.

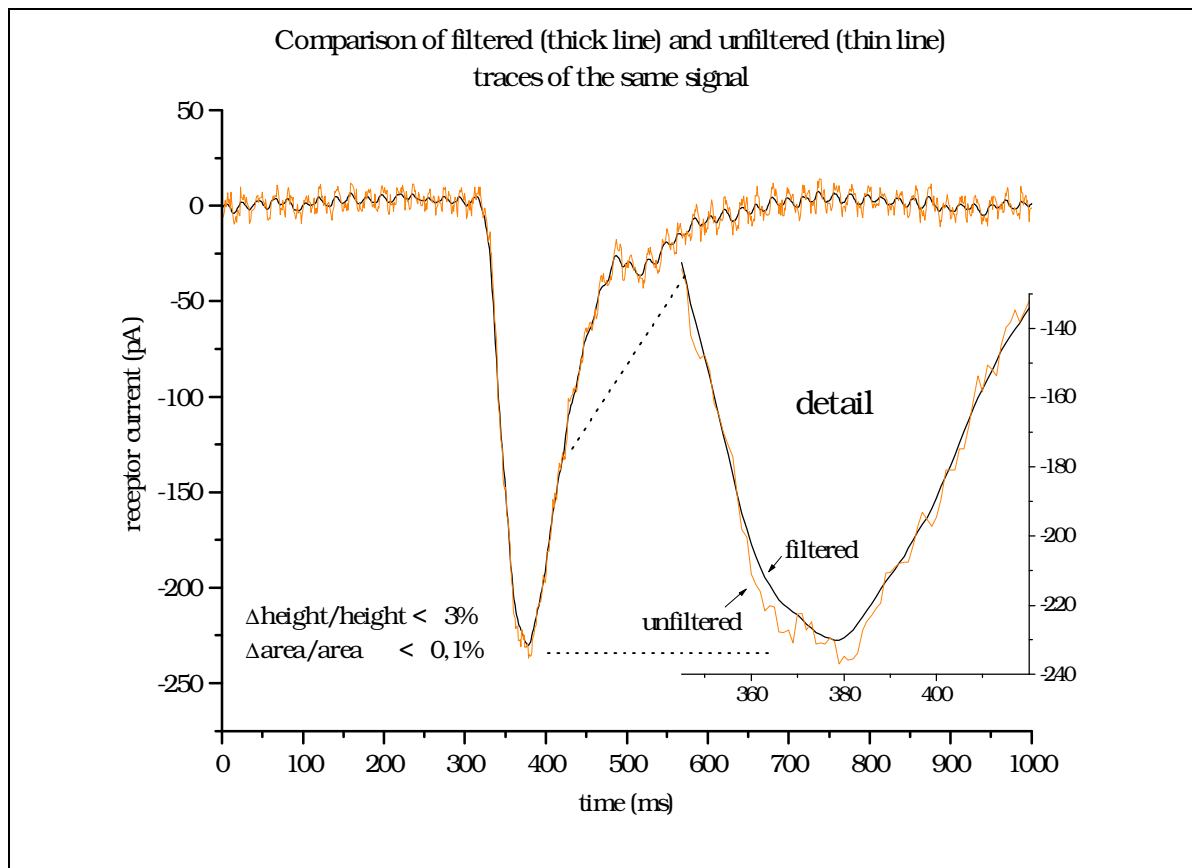


Figure 5.1: Demonstration of the influence of the filtering procedure on the bump parameters. Low pass filtering of each current was performed with Gaussian characteristics at 30 Hz. As can clearly be observed, the filtering had no significant effect on the bump kinetics or on the size of the bump. Peak height of the bump was decreased by less than 3% and the bump's current-time integral remained nearly unchanged (less than 0,1% deviation). [Exp. mw_0803.1004]

5.2 Parametrisierung der Bumps

Die den Bumps zugrunde liegenden Enzymkinetiken müssen sich in der Größe, der Latenzzeit und der Form der Bumps widerspiegeln. Dies ist unmittelbar einsichtig, wenn man bedenkt, daß jede Ladungsverschiebung durch einen Kanal abhängig von der Bindung einer bestimmten Zahl terminaler Transmitter an den Kanal ist. Die Bereitstellung dieser Transmitter ist wiederum von der davorliegenden Stufe in der Enzymkaskade abhängig und so fort. Die Enzymkinetik bestimmt also, wieviele terminale Transmitter zu jeder Zeit zur Verfügung stehen und deshalb auch, wieviel Ladung zu jeder Zeit durch die Gesamtheit der Kanäle fließt.

Um die Kinetik der Bumps quantitativ erfassen zu können, wurden die Bumps parametrisiert. Dazu stand eine Software zur Verfügung, mit der Meßspuren einzeln eingelesen und automatisch parametrisiert werden konnten [Reuß (1991)]. Allerdings wurde jede Spur noch einzeln gesichtet und kontrolliert. Die häufig notwendigen Korrekturen wurden per Hand nachgetragen.

Abbildung 5.2 zeigt schematisch die wichtigsten Parameter.

Dazu gehören:

1. die **Latenzzeit** t_{lat} , die Zeit zwischen der Blitzapplikation und dem ersten detektierbaren Anstieg des Rezeptorstroms
2. die **Zeit bis zum Maximum** t_{max} , die Zeit zwischen der Blitzapplikation und dem Erreichen der maximalen Bump-Höhe.
3. die **Zeit bis zum Bump-Ende** t_{end} , die Zeit zwischen der Blitzapplikation und dem Ende des Bumps (Bump „versinkt“ im Rauschen)
4. die **Bump-Amplitude** I_{max} .
5. t_1 , anstiegsseitige Breite des Bumps bei halber Höhe
6. t_2 , abklingseitige Breite des Bumps bei halber Höhe
7. das **Strom-Zeit-Integral** F , berechnet aus der Fläche des Bumps zwischen t_{lat} und t_{end}

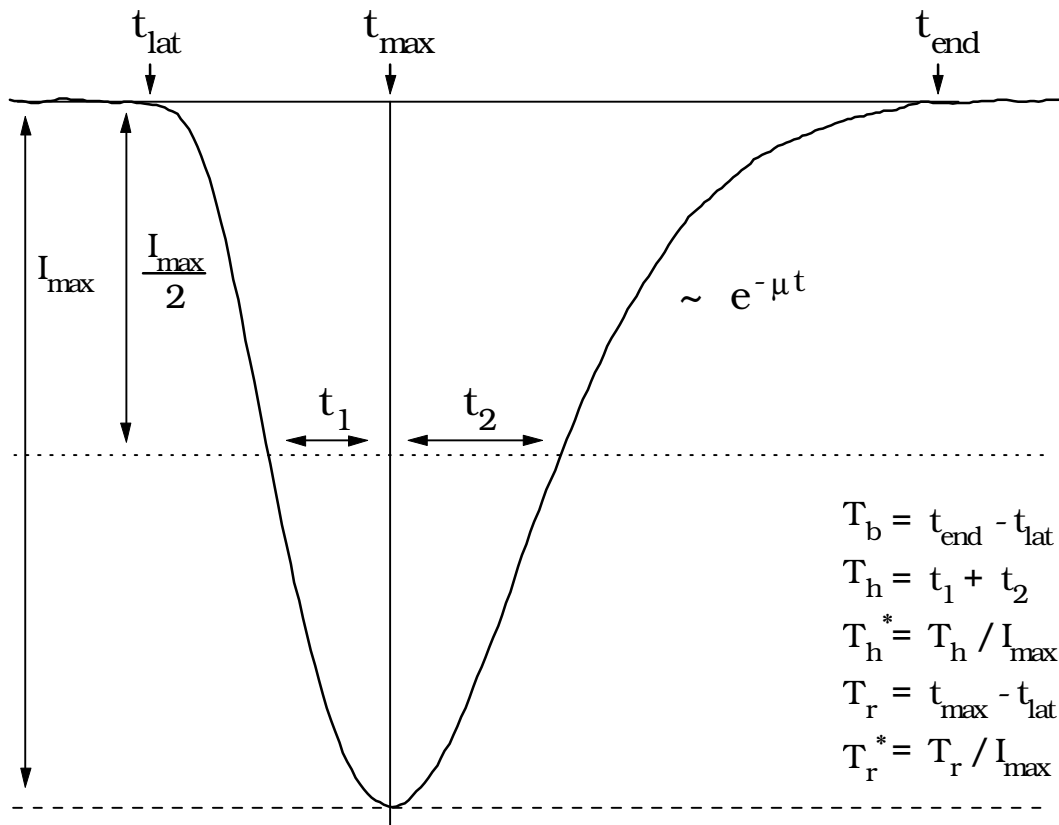


Figure 5.2: Scheme of a bump, demonstrating the parameters which were introduced to quantify the bump's time course. t_{lat} latency; t_{max} time to peak; t_{end} time to end of bump; t_1 half time of rise; t_2 half time of decay; μ time constant of the exponential decay. Inset: definition of important parameters. [Original current trace with peak height ca. 830 pA.]

Ferner sind folgende abgeleitete Größen im weiteren von Bedeutung:

1. die **Bump-Breite** $T_b = t_{end} - t_{lat}$
2. die **Halbwertsbreite** $T_h = t_1 + t_2$, die zeitliche Breite des Bumps bei halber Bump-Höhe
3. die **Anstiegszeit** $T_r = t_{max} - t_{lat}$
4. die **normierte Bump-Breite** $T_b^* = T_b / I_{max}$
5. die **normierte Halbwertsbreite** $T_h^* = T_h / I_{max}$
6. die **normierte Anstiegszeit** $T_r^* = T_r / I_{max}$

Hier weniger von Bedeutung sind die häufig angegebenen Parameter für die Steigung im linearen Teil des Anstiegs und die Abklingzeitkonstante μ .

5.3 Trennung der Bump-Typen

Beobachtet man die Rezeptorströme genau, so unterscheidet man oft- jedoch nicht immer- zwei Klassen von Bumps. Die eine Klasse besteht aus kleinen und langsamen Bumps (c_1 -Bumps), während die zweite große und schnelle beinhaltet (c_2 -Bumps) (s. Abschnitt 2.4). Typische Größen sind Amplituden von bis zu 100 pA für die kleinen und 200-1000 pA für die großen Bumps.

Die Amplitude allein ist allerdings kein hinreichendes Unterscheidungskriterium, da Bumps eines Typs stark in ihrer Größe schwanken können. Anhand der Amplitude läßt sich allenfalls die Verstärkung einer Enzymkaskade, nicht aber deren Kinetik bestimmen.

Im Gegensatz zu den Amplituden unterscheiden sich die Bump-Breiten T_b und die Anstiegszeiten T_r für c_1 - und c_2 -Bumps im Mittel kaum voneinander (typische Werte sind 100-250 ms für T_b und 40-80 ms für T_r). Dieser Umstand läßt sich zur Trennung der Bump-Typen ausnutzen.

Abbildung 5.3 zeigt den Zusammenhang zwischen T_b und der Amplitude bzw. T_r und der Amplitude. Darunter finden sich die entsprechenden Histogramme für die auf die Amplitude normierten Zeiten T_b^* und T_r^* .

In den beiden oberen Diagrammen erkennt man sauber voneinander getrennte Punkt-wolken sowohl für T_b als auch für T_r als Funktion von der Amplitude. Diese getrennten Punktwolken korrespondieren mit jeweils zwei lokalen Maxima in den darunter gelegenen Histogrammen für die normalisierte Bump-Breite T_b^* und die normalisierte Anstiegszeit T_r^* . Bei dieser Messung konnte eine Trennung der beiden Bump-Typen somit durch die Definition eines Schwellenwertes im Minimum der Histogrammverteilung erreicht werden. Die

Schwellenparameter für T_b^* und für T_r^* waren in diesem Fall gleichwertig, daß heißt sie kategorisierten nahezu dieselben Bumps als c_1 - bzw. c_2 -Bumps.

Während T_r^* von den gut zugänglichen Parametern t_{lat} und t_{max} abhängt (beide lassen sich bei der Parametrisierung recht scharf bestimmen), ist T_b^* auch durch t_{end} bestimmt. Da sich der Bump nur langsam der Ruhelinie annähert, ist t_{end} mit einem weit größeren Fehler behaftet. Deshalb ist T_r^* meist der geeignetere Schwellenparameter.

Eine weitere Möglichkeit zur Trennung der beiden Bump-Sorten besteht in der Wahl des Parameters T_h^* . Hierfür ergeben sich sehr ähnliche Diagramme, wie in Abbildung 5.3.

In den meisten Fällen war eine saubere Trennung der Bump-Typen kaum oder gar nicht möglich, da entweder nur ein Bump-Typ ausgelöst wurde oder die Verteilungen der verschiedenen Parameter für potentielle c_1 - und c_2 -Bumps teilweise oder vollkommen überlappten.

In den Fällen teilweiser Überlappung der Parameter-Histogramme für c_1 - und c_2 -Bumps wurde versucht, durch Anpassung von angenommenen Verteilungen für die c_1 - bzw. c_2 -Bumps einen „möglichst guten“ Schwellenwert zu bestimmen.

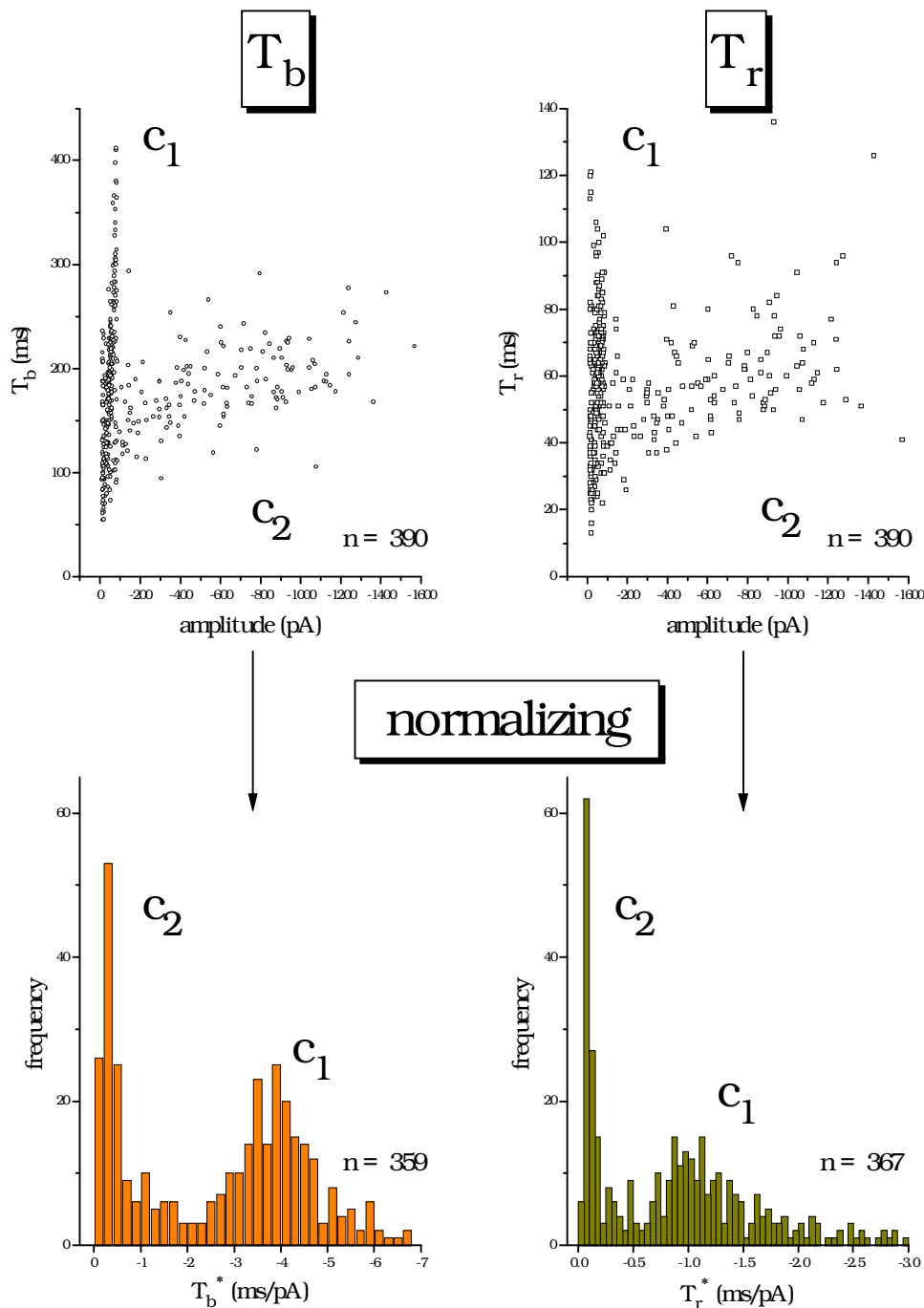


Figure 5.3: Four diagrams demonstrating the procedure for separation of bumps. The upper plots show the bump width T_b and the bump rise time T_r as functions of the amplitude I_{\max} . The lower ones are histograms for the normalized bump width T_b^* and the normalized rise time T_r^* , respectively. The two data groups in each of the upper plots correspond to separated distributions in both of the lower histograms and represent the two bump populations. In this experiment separation of the two bump-types could easily be achieved by setting a threshold at $T_b^* = -2$ ms/pA or $T_r^* = -0,5$ ms/pA. Both thresholds separated the bumps equally well, i.e. nearly all bumps were categorized in the same way. [Experiment mw_1310]

5.4 Bump-Statistik

5.4.1 Probleme

Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war die Analyse der Bump-Populationen für c_1 - und c_2 -Bumps als eine Funktion der Lichtblitzintensität.

Um hierzu quantitative Aussagen machen zu können, mußte die Zahl der im Mittel von einem Lichtblitz bestimmter Intensität ausgelösten Bumps möglichst exakt bestimmt werden.

Insbesondere konnte nicht einfach das Strom-Zeit Integral als Ersatzmaß für die Bump-Ausbeute gewählt werden. Hierfür hätte die Unabhängigkeit der Bump-Fläche (Fläche eines einzelnen Bumps) von der Lichtintensität und deren Konstanz während der gesamten Messung gesichert sein müssen. Letzteres ist aber nicht der Fall. Vielmehr konnte ich Fluktuationen in der Bump-Größe feststellen, die vor allem von dem momentanen Zustand der Zelle abhingen.

Hierzu gibt **Abbildung 5.4** einen Eindruck. Dargestellt ist ein Überblicksdiagramm, indem die Amplitude jedes Rezeptorstromereignisses (also nicht nur der Einzelbumps) gegen die fortlaufende Nummer der Meßspur aufgetragen ist. Bei dieser Messung (mw_1310) wurden drei verschiedene Lichtintensitäten gewählt (Neutralfilter 5,5, 4,8 und 5,0). Links sind alle $n=599$ parametrisierbaren Ereignisse dieser Messung eingezeichnet. Auf der rechten Seite sind die kleinsten Ereignisse (bis $I_{max}=-160$ pA, $n=270$) im Detail aufgetragen. Man erkennt deutlich eine Gruppe von Ereignissen eng umgrenzter Amplituden, die sich geschlossen und unabhängig von der Lichtintensität im Laufe der Messung verschiebt. Eine genaue Untersuchung der in dieser Gruppe enthaltenen Bumps zeigte, daß diese gerade die c_1 -Bumps sind.

Diese Bumpgrößenverschiebungen konnte ich in mehreren Messungen beobachten.

Eine Abhängigkeit der Bumpgröße von der Lichtintensität konnte ich nicht beobachten.

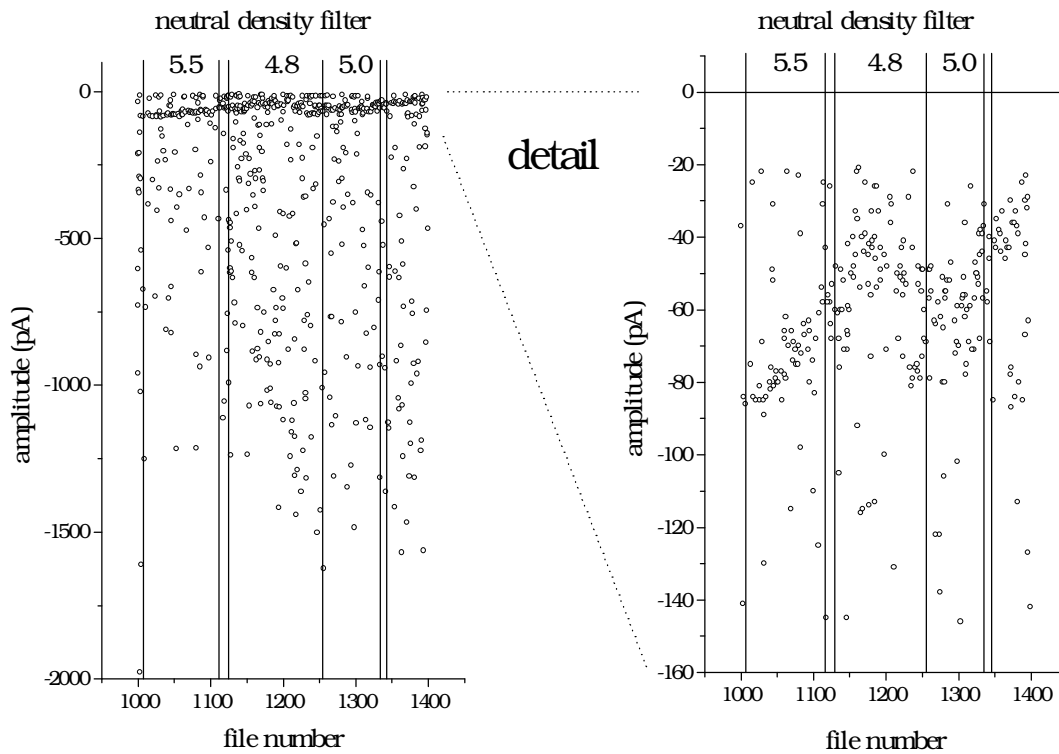


Figure 5.4: Demonstration of light intensity independent fluctuations in the bump's amplitude. **Left:** general view of the experimental data ($n=599$). Peak height of every response to flashes of different light intensities (*neutral density filter*) was plotted against the file number. **Right:** detailed view of the low amplitude range of the responses ($n=270$). Cycle time (time between flashes) was 30 s in this experiment (100 file numbers represent 50 min). Note that a group of data points shifts from about 80 pA to 40 pA within about 100 min (file number 1000 to 1200) and afterwards rises again to nearly 60 pA (file number 1300). [Experiment mw_1310]

Das Strom-Zeit Integral ist aus den genannten Gründen kein gutes Maß, wenn man genaue quantitative Aussagen über die Bump-Ausbeute gewinnen will. Es läßt sich aber zur statistischen Analyse der Bump-Überlagerungen heranziehen (s. Abschnitt 5.4.2).

Mit wachsender Lichtblitzintensität überlagern sich die Bumps immer häufiger zu einer Summenantwort. Lederhofer et al. (1991) schätzten aus theoretischen Überlegungen anhand von Bump-Modellen ab, daß bis zu 20% der „Bumps“ eigentlich Mehrfach-ereignisse darstellen, die aufgrund ihrer zeitlichen Überlagerung nicht entschlüsselt werden können.

Für eine ausführliche Beschreibung der Veränderung von Bump-Parametern aufgrund von zeitlichen Bump-Überlagerungen verweise ich auf die Arbeit von Lederhofer (1989).

Abbildung 5.5 zeigt Beispiele für Meßspuren mit Bump-Überlagerungen. In den oberen Spuren erkennt man noch deutlich voneinander getrennte Bumps. Weiter unten werden die Überlagerung so dominierend, daß eine Identifikation der Bumps aus denen sich die Überlagerungen zusammensetzen anhand der Bump-Form nicht mehr möglich ist. Allein das Strom-Zeit Integral der Gesamtantwort bleibt von einer Überlagerung unberührt, da sich die Ströme durch die Zellmembran additiv überlagern. Aus diesem Grund wurde diese Größe zur Entschlüsselung der Überlagerungen verwendet (s. Abschnitt 5.4.2).

Ein einfaches Außerachtlassen der Spuren mit Überlagerungen war nicht möglich, weil dadurch die mittlere Zahl der ausgelösten Bumps sicherlich zu gering berechnet worden wäre (die Spuren mit vielen Bumps hätten in der Statistik gefehlt). Außerdem wäre bei Lichtintensitäten, die im Mittel mehr als einen Bump pro Blitz auslösten kaum noch eine Spur übrig geblieben, die nicht irgendeine suspekta Bump-Überlagerung beinhaltet hätte.

Bei der Bestimmung der Größe der Bump-Populationen durfte auch der Anteil der Dunkelbumps auf den Meßspuren nicht vernachlässigt werden. Dunkelbumps traten mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von $(0,118 \pm 0,055) \text{ s}^{-1}$ auf ($n=5$ Messungen). Der Anteil der „dunklen c_1 -Bumps“ an allen Dunkelbumps war ca. 70-80 %. Dieser Wert unterscheidet sich von dem von Reuß und Stieve (1993), die bei ihren Messungen für das Auftreten von „dunklen c_1 -Bumps“ eine ca. 20fach geringere Wahrscheinlichkeit angaben als für das Auftreten von „dunklen c_2 -Bumps“.

Dunkelbumps wurden bei der Bestimmung der Bump-Populationen berücksichtigt (s. Abschnitt 5.4.2).

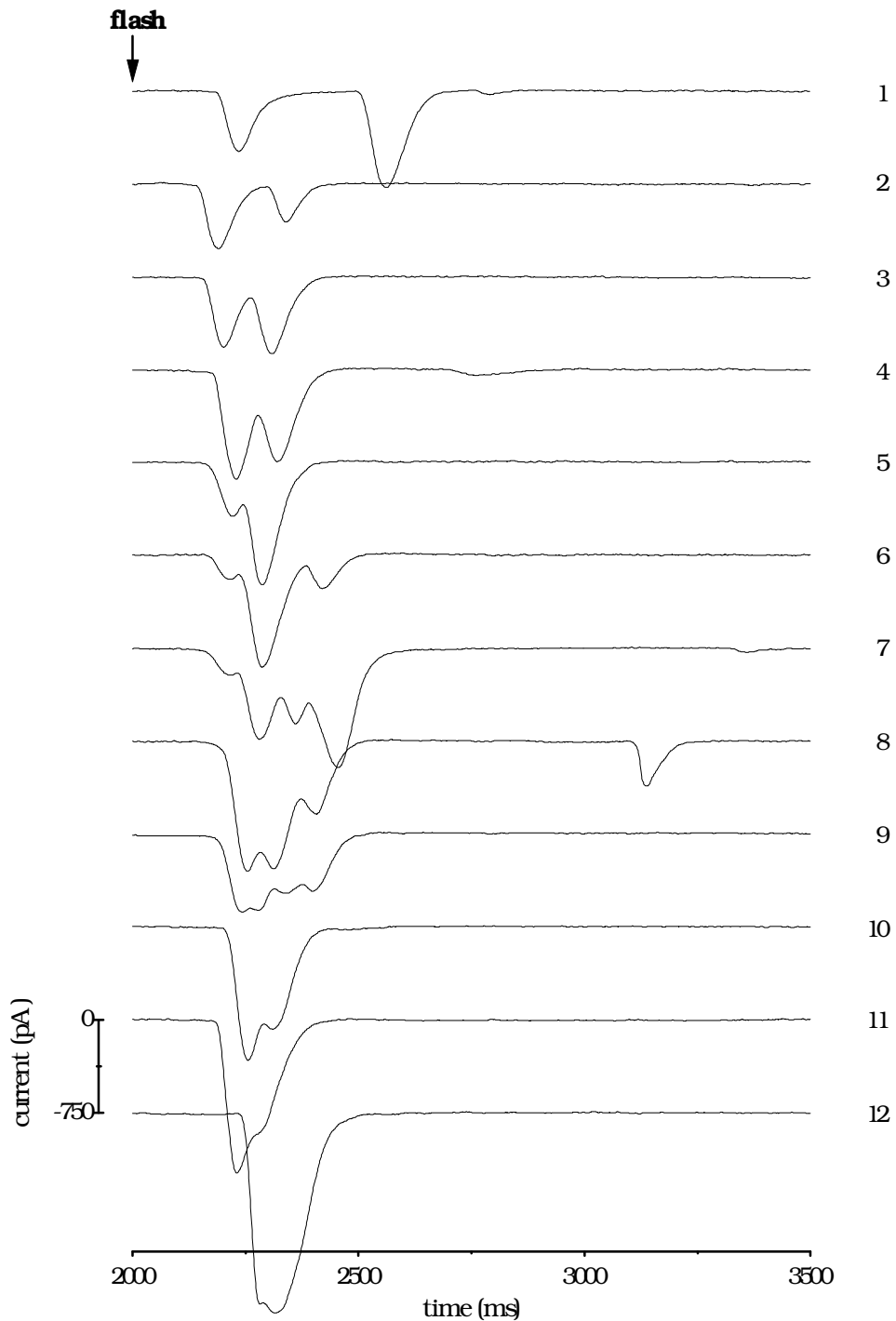


Figure 5.5: Current-traces demonstrating a variety of more or less severe overlappings of bumps. Whereas the uppermost traces (trace 1,2) show separated bumps, the lower ones demonstrate gradually increasing overlappings. Bumps become indistinguishable, if the degree of overlapping becomes too severe. In these cases a statistical analysis of the mean total current-time integral (i.e. the area of the multiple-bump currents) was performed. [Data taken at different light intensities from experiment mw_1310]

5.4.2 Korrektur der Bump-Überlagerungen und Dunkelbumps

Bump-Überlagerungen konnten grundsätzlich entweder „intuitiv“ nach Erfahrungswerten durch Betrachtung der Stromspuren korrigiert werden oder anhand einer statistischen Behandlung der nach der Parametrisierung vorliegenden Daten.

Die erste Möglichkeit hat den enormen Vorteil, daß sie weit weniger aufwendig und viel schneller durchführbar ist. Allerdings ist diese Form der Auswertung nur beschränkt reproduzierbar, da viele Entscheidungen (ob z.B. drei, vier oder fünf Bumps in einer Überlagerung enthalten sind, etc.) „aus dem Bauch heraus“ getroffen werden müssen.

Aus diesem Grund wurde die statistische Behandlung in jedem Fall bevorzugt angewendet. Ein Vergleich der beiden Verfahren führte nur beschränkt zu einer guten Übereinstimmung in den Werten für die Populationen (s. Abschnitt 5.4.3).

Das Prinzip der Überlagerungskorrektur beruht auf einer statistischen Betrachtung des Strom-Zeit Integrals. Dieser Parameter ist der einzige, der nicht durch Überlagerungen verfälscht wird, da sich bei einer zeitlichen Überlagerung von Bumps die Ströme addieren. Kurz gefaßt besteht die Methode der Überlagerungskorrektur darin, die Strom-Zeit Integrale von Meßspuren mit Überlagerungen zusammenzufassen und von diesem Summenintegral den erwarteten Anteil der Dunkelbumps und c_1 -Bumps abzuziehen. Das Restintegral beinhaltet danach nur noch c_2 -Bumps und liefert nach einer Division durch die mittlere c_2 -Bump-Fläche die Anzahl der überlagerten c_2 -Bumps.

Dunkelbumpzeiten wurden aus den Bumps bestimmt, die in den letzten zwei Sekunden vor jedem Lichtblitz aufgezeichnet wurden. Diese Bumps waren sehr wahrscheinlich nicht lichtevoziert, da der vorherige Lichtblitz 28 oder 38 Sekunden früher gegeben wurde.

Die Methode zur Korrektur von Bump-Überlagerungen und Dunkelbumps wird im Appendix detailliert dargestellt.

5.4.3 Güte der Korrektur

Tabelle 5.1 gibt einen Eindruck von der Güte der oben (und im Appendix) beschriebenen Überlagerungskorrektur. Eingetragen sind für zwei Messungen die berechneten (korrigierten) und die abgezählten Anzahlen von c_1 - bzw. c_2 -Bumps bei verschiedenen Lichtintensitäten. Beide Datensätze wurden dunkelbumpkorrigiert.

Exp.	N	NF	counted		calculated		$\Delta c_1/c_1$ (%)	$\Delta c_2/c_2$ (%)
			c_1	c_2	c_1	c_2		
mw_1310	110	5,5	43,75	36	29,8	43,1	-32	20
	124	4,8	98,5	129,5	88,8	126,4	-10	-2
	84	5,0	61,75	63	45,9	68,6	-26	9
	63	5,0	35,75	63,5	28,9	65,5	-19	3
mw_1808	100	5,5	49,2	28,6	34,6	121,7	-30	326
	50	5,0	34,8	55,5	23,7	89,5	-32	61
	100	6,0	12,6	26	12,1	28,8	-4	11
	100	5,3	55,6	67,2	42,3	87,6	-24	30
	103	5,5	39,4	32,3	33	67,2	-16	108
	77	5,0	58,5	55,4	62,1	115,4	6	108

Table 5.1: Comparison of *counted* (visually evident) and *calculated* (corrected) total numbers of bumps at different light intensities (light intensity given in logarithmical units; neutral density filters, NF). N : number of current traces analysed. Calculated numbers of c_1 -bumps were too low compared to the counted ones (negative percentages) because of the disregarding of c_1 -overlappings during correction. Conversely the number of c_2 -bumps may have been overestimated due to an underestimation of the number of c_1 -bumps. However the discrepancy between calculated and counted data is mainly due to the unresolved overlappings in the counted data

Bei diesen beiden Messungen ließen sich die c_1 - und c_2 -Bumps anhand ihrer Amplitude unterscheiden und auf den Meßspuren abzählen. Die Trennung mit der normierten Anstiegszeit hatte weitgehend den gleichen Effekt.

In den beiden rechten Spalten sind die Abweichungen der berechneten gegenüber den gezählten Werten in Prozent angegeben. Ein negatives Vorzeichen bedeutet, daß die berechnete Zahl kleiner als die gezählte ist.

Offensichtlich fallen die berechneten Werte für c_1 -Bumps gegenüber den gezählten niedriger und die der c_2 -Bumps in der Regel höher aus. Dies hat verschiedene Ursachen:

Die Zahl der c_1 -Bumps fällt bei der Korrektur zu niedrig aus, weil Überlagerungen der c_1 -Bumps nicht berücksichtigt werden konnten (s. „Rezept“ Nr. 2). Dafür wurden die Werte für die c_2 -Bump Populationen zu hoch berechnet, da ein etwas zu geringer Flächenanteil von c_1 -Bumps angenommen wurde (s. „Rezept“ Nr. 7). Dieser Fehler in der Zahl der c_2 -Bumps ist aber als klein anzunehmen, da die c_2 -Bumps aufgrund ihrer Größe ca. 95 % (Messung mw_1808) bzw. ca. 87 % (Messung mw_1310) der gesamten Fläche ausmachen.

Die Ursache für die teilweise großen Unterschiede zwischen den gemessenen und berechneten Werten bei den c_2 -Bumps liegt hauptsächlich darin, daß bei dem Abzählen sehr dicht überlagerte Bumps nicht getrennt gezählt werden können. Die statistische Auswertemethode ist dagegen von der Form der Bumps unabhängig und kann deshalb beliebig umfangreiche Überlagerungen entschlüsseln, vorausgesetzt die mittlere Bump-Fläche ist hinreichend genau bekannt ist. Wegen der Bestimmung der mittleren Fläche einzelner Bumps, ist die statistische Methode allerdings indirekt auch von Formparametern abhängig. Diese Formabhängigkeit reduziert sich aber auf Entscheidungen, ob ein Ereignis ein Einzelbump oder eventuell ein Mehrfachereignis ist (Einteilung der Meßspuren in Gruppe I oder II, s. Abschnitt 5.4.2).

Die statistisch bestimmte Zahl der c_1 - bzw. c_2 -Bumps hängt empfindlich von der mittleren Fläche eines c_1 - bzw. c_2 -Bumps ab. Besonders große Abweichungen in den Populations-größen gehen deshalb mit stark vom Durchschnitt abweichenden Flächen der Standard-bumps einher. In diesen Fällen waren nur wenige Einzelereignisse vorhanden, so daß die Bestimmung der mittleren Bump-Fläche ungenau wurde.

Die wirkliche Zahl ausgelöster Bumps liegt wahrscheinlich zwischen der gezählten und der berechneten, jedoch eher viel näher an dem berechneten Wert. Als Indiz hierfür mag die Feststellung dienen, daß die berechneten Daten ein lineares Verhalten mit der Lichtintensität zeigten (s. Abschnitt 6.1), die ausgezählten aber nur streuten.

6. ERGEBNISSE

6.1 Kennlinien für c_1 - und c_2 -Bumps

Die **Abbildungen 6.1** und **6.2** zeigen die ermittelten Kennlinien der c_1 - und c_2 -Bump-Populationen für zwei Messungen.

Aufgetragen sind die Anzahlen der im Mittel pro Blitz auftretenden Bumps als Funktion der Lichtblitzintensität, jeweils in kartesischer (oben) und doppelt logarithmischer Darstellung (unten). Die Daten wurden entsprechend dem „Korrekturrezept“ (s. Abschnitt 5.4) korrigiert. In den logarithmischen Darstellungen wurde die Zahl der Bumps pro Blitz nach Subtraktion des y-Achsenabschnitts aus den linearen Darstellungen eingetragen. Die Anpassungsgeraden wurden durch eine lineare Regression auf einer „linearisierten Skala“ bestimmt („fitted by the eye“).

Man erkennt einen linearen Anstieg der Bump-Häufigkeiten für c_1 - und c_2 -Bumps und für die Summe der Häufigkeiten der beiden Bump-Typen c_x mit steigender Lichtintensität. Die Steigungen sind für c_1 -Bumps kleiner als für c_2 -Bumps. Dies war zu erwarten, da bei der Überlagerungskorrektur keine c_1 -Überlagerungen berücksichtigt werden konnten (s. Abschnitt 5.4). In den logarithmischen Darstellungen ergeben sich für die Regressionsgeraden Steigungen nahe eins, was einen linearen Zusammenhang bestätigt.

In **Abbildung 6.2** wurden jeweils drei Werte für die linearen Regressionen nicht beachtet (eingeklammerte Datenpunkte) weil diese Daten sind mit großen Fehlern behaftet sind. Entweder wurden viele c_1 -Bumps von großen c_2 -Bumps verdeckt (scheinbar niedrige Häufigkeit für c_1 -Bumps bei hoher Lichtintensität) oder es waren zu wenig Einzelereignisse vorhanden um eine gute Näherung für die durchschnittliche c_2 -Bump-Fläche zu bestimmen (scheinbar hohe Häufigkeit für c_2 -Bumps bei niedriger Intensität). Außerdem konnten bei den gleichen Lichtintensitäten andere Datenpunkte aufgenommen werden, die genau dem linearen Zusammenhang folgen.

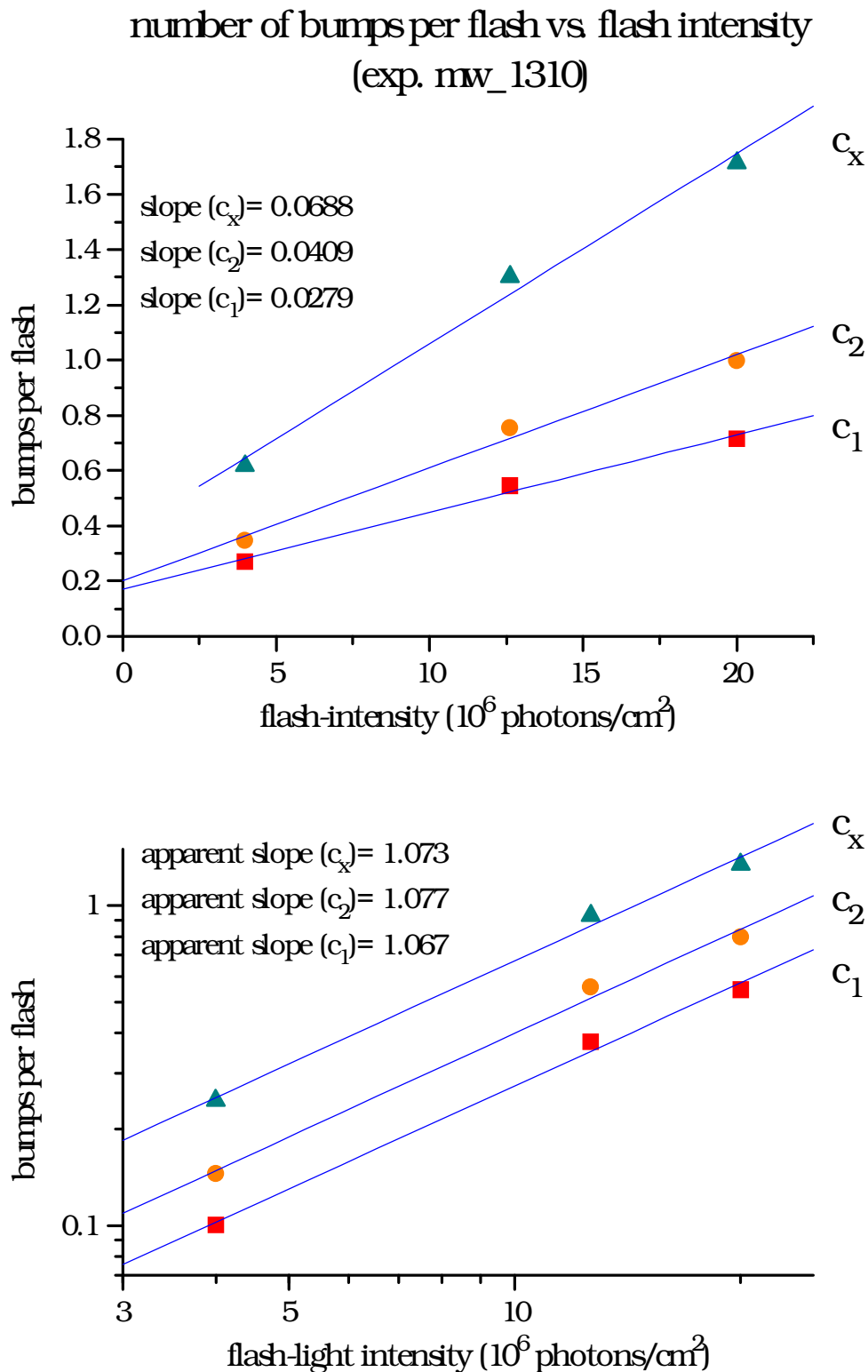


Figure 6.1: Bump response curves, demonstrating the average number of c_1 - and c_2 -bumps evoked by flashes at different light intensities (c_x =any bump). **Top:** Cartesian plot of the bump-response curves. **Bottom:** double logarithmic plot of the bump-response curves. Insets give the (apparent) slopes for the linear regression curves.

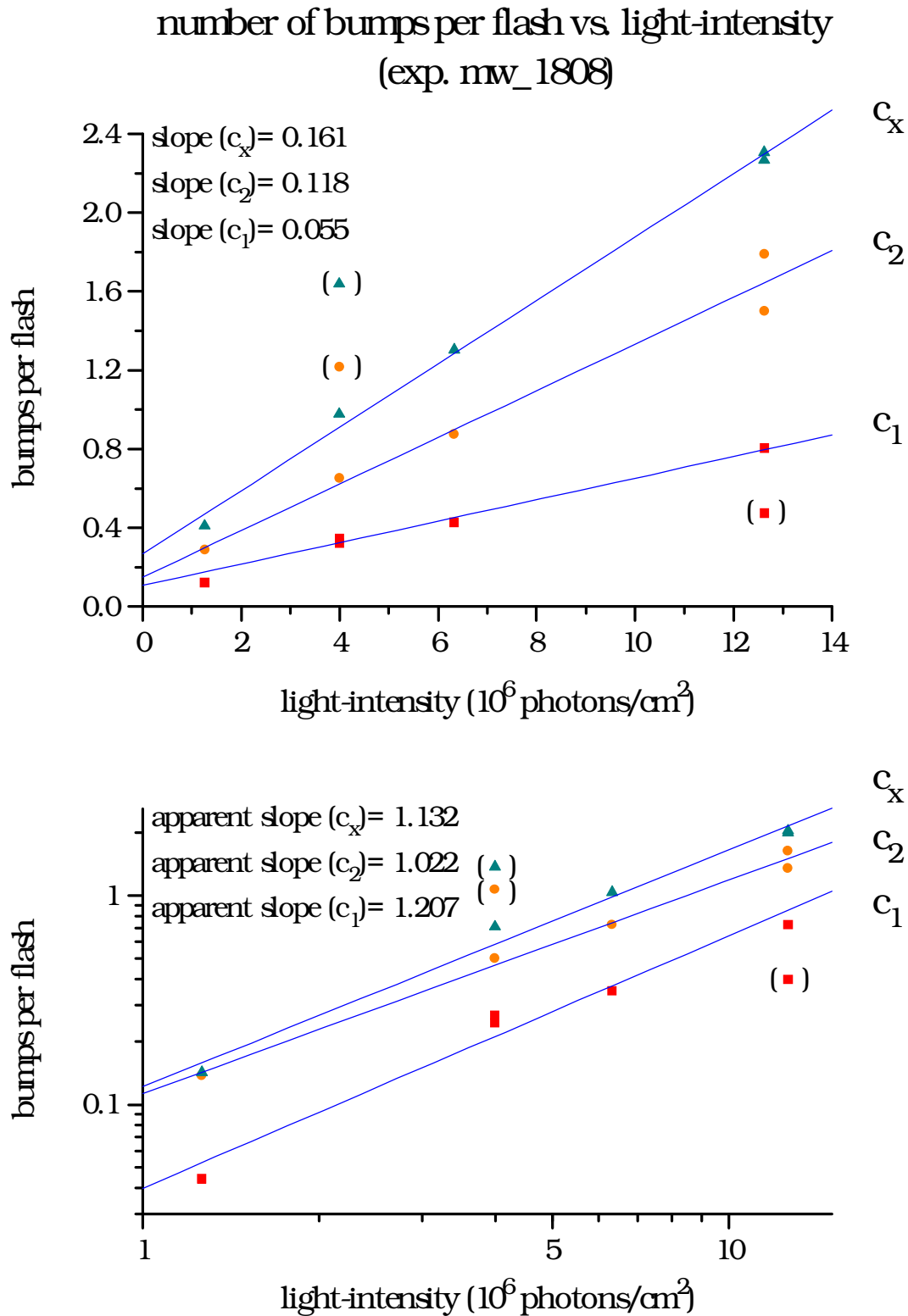


Figure 6.2: Bump response curves, demonstrating the average number of c_1 - and c_2 -bumps evoked by flashes at different light intensities (c_x =any bump). **Top:** Cartesian plot of the bump-response curves. **Bottom:** double logarithmic plot of the bump-response curves. Insets give the (apparent) slopes for the linear regression curves.

Alle nicht berücksichtigten Datenpunkte korrespondieren mit besonders großen Abweichungen zu den ausgezählten Daten (s. Tabelle 5.1, z.B. $\Delta c_2/c_2 = 321\%$).

Tabelle 6.1 faßt die Steigungen der Regressionsgeraden für diese beiden Messungen zusammen. Die Steigungen unterscheiden sich zwischen diesen Zellen um einen Faktor 2-3.

experiment	linear slope c_1	linear slope c_2	linear slope c_x	log. slope c_1	log. slope c_2	log. slope c_x
mw_1310	0.0279	0.0409	0.0688	1.067	1.077	1.073
mw_1808	0.0550	0.118	0.161	1.207	1.022	1.132
average (\pm SD)	0.041 (± 0.019)	0.079 (± 0.055)	0.115 (± 0.065)	1.137 (± 0.099)	1.050 (± 0.039)	1.103 (± 0.042)

Table 6.1: Summary of the slopes of the bump-response curves in figures 6.1 and 6.2.

Es fällt auf, daß alle Regressionsgeraden einen deutlich von Null verschiedenen positiven y-Achsenabschnitt aufweisen. Dieses Phänomen kann nicht mit der ungenauen Angabe der Blitzlichtintensität (34 % Meßungenauigkeit, s. Abschnitt 4.5) erklärt werden, da eine andere Skalierung der Lichtintensitätsachse den y-Achsenabschnitt nicht verändern würde. Andererseits wurden die zu erwartenden Dunkelbumps bereits korrigiert.

Der Achsenabschnitt entspricht ungefähr der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von c_1 -Dunkelbumps, oder der 2-5fachen Wahrscheinlichkeit für c_2 -Dunkelbumps.

Die Regressionsgeraden ergaben für die ausgezählten Bump-Häufigkeiten ebenfalls einen von Null verschiedenen Achsenabschnitt vergleichbarer Größe (z.B. ca. 0,3 c_1 - und 0,15 c_2 -Bumps/Blitz [Experiment mw_1310]).

Bei anderen Messungen wurden dagegen auch Achsenabschnitte nahe Null und darunter gefunden, wenn man die gesamte Stromantwort (Ladungsmenge) pro Blitz gegen die Lichtintensität auftrug (die entsprechenden Kennlinien für die Bump-Häufigkeiten konnten hier

nicht ermittelt werden). Deshalb sind die oben beschriebenen Achsenabschnitte als zellabhängig oder zufällig und nicht als ein systematischer Meßfehler einzustufen.

Für den Fall, daß der positive Achsenabschnitt nicht zufällig ist stellt sich die Frage, ob unterhalb der von mir bestimmten Meßpunkte eine größere Steigung der Kennlinie nachgewiesen werden könnte. Diese müßte vorliegen, da die Kennlinie den Koordinatenursprung erreichen muß (Bumps, die nicht lichtinduziert und nicht „dunkel“ sind, sind nicht akzeptabel!). Die Ursache dieser hypothetischen größeren Empfindlichkeit der Photorezeptorzelle bei sehr schwachen Lichtreizen könnte ein „Mini-Adaptationseffekt“ sein: bei Lichtreizen, die nur ca. 0,1 Bumps pro Blitz auslösen, könnte sich die Zelle über mehrere Blitzzyklen hinweg vom letzten Bump erholen. Andererseits könnte auch der „facilitation“-Effekt die Ursache für eine vergrößerte Lichtempfindlichkeit bei sehr niedrigen Lichtintensitäten sein. Mit „facilitation“ beschreibt man den Effekt, durch einen schwachen Konditionierungsblitz eine vergrößerte Antwort der Rezeptorzelle auf einen nachfolgenden Testblitz zu erhalten. Dieser Effekt wurde bei *Limulus* beobachtet [Stieve et al. (1991)]. Allerdings betrug der zeitliche Abstand zwischen Konditionierungs- und Testblitz bei dem Nachweis der „facilitation“ nur 2 Sekunden. Bei meinen Messungen fällt der Konditionierungsblitz mit dem Testblitz des vorherigen Blitzzyklus zusammen. Der zeitliche Abstand zwischen „Konditionierungs-“ und Testblitz beträgt darum 30 oder 40 Sekunden.

6.2 Poissonverteilte Bumps

Gegenüber den bei höheren Lichtintensitäten beobachteten Wechselwirkungen (Oszillation der makroskopischen C_2 -Stromkomponente [Nagy (1992)]), konnte für schwache Lichtintensitäten bisher kein Hinweis darauf gefunden werden, daß Bumps voneinander abhängige Ereignisse sind. Für unabhängige Bumps ist aber eine Poissonstatistik zu erwarten. Insbesondere sollte die Anzahl der in einem beliebigen Zeitintervall auf der Meßspur auffindbaren Bumps poissonverteilt sein. Dies konnte sowohl für Blitz-, als auch für Dauerlichtexperimente

nachgewiesen werden, wenn nicht zwischen den Bump-Typen unterschieden wurde [Keiper (1983); s. Diskussion].

Poganiatz (1996) konnte zeigen, daß unter Dauerlichtbedingungen ausgelöste c_1 - und c_2 -Bumps getrennt auch Poissonverteilungen gehorchen. Für die Zahl aller Bumps (ohne Unterscheidung der Bump-Typen) fand sie allerdings keine gute Übereinstimmung mit einer Poissonverteilung. Von Interesse ist, ob auch die von Blitzen ausgelösten Bumps einer Poissonstatistik genügen. Da die Versuchssituation sehr verschieden von der Dauerbelichtung ist, kann dies nicht sofort gefolgert werden, wenn auch die Vermutung nahe liegt. Grundlegend unterschiedlich ist der möglicherweise schwach hell adaptierte Zustand der Photorezeptorzelle unter Dauerlichtbedingungen mit kaum abschätzbaren Auswirkungen auf die enzymatische Kinetik. Unter Dauerlicht aufgenommene Meßreihen zeigten weit weniger häufig detektierbare c_1 -Bumps, als die in Blitzlichtexperimenten gewonnenen (persönliche Kommunikation mit Iris Poganiatz).

Abbildungen 6.3a-c zeigen jeweils sechs Histogramme für die Häufigkeiten, n c_1 -Bumps (Abb. 6.3a), c_2 -Bumps (Abb. 6.3b) oder n mal irgendwelche Bumps „ c_x “ (Abb. 6.3c) auf einer Meßspur zu finden. Aus den in Abschnitt 5.4 erörterten Gründen (Überlagerungen etc.) mußten die Daten auf den Spuren ausgezählt werden. Den Histogrammen liegt eine Messung zugrunde, bei der c_1 - und c_2 -Bumps aufgrund ihrer Amplitude diskriminiert werden konnten (Schwellenwert =100 pA). Die Zahl N gibt an, wieviele Meßspuren in jedem Histogramm aufgenommen wurden.

Die gewonnenen Häufigkeiten brauchten nicht nach Dunkelbumps korrigiert zu werden, da Dunkelbumps als voneinander unabhängig angenommen wurden. Dunkelbumps treten deshalb poissonverteilt auf. Da sich zwei Poissonverteilungen desselben Merkmals wieder zu einer Poissonverteilung zusammenfügen, ändern die poissonverteilten Dunkelbumps nichts an dem Charakter (Poisson oder nicht Poisson) der Verteilung der lichtinduzierten Bumps, wenn auch sie poissonverteilt auftreten. Das Einschließen der Dunkelbumps in die Verteilungen hatte den Vorteil, etwas mehr Bumps in die Statistik aufnehmen zu können. So blieben in einigen Fällen mehr Freiheitsgrade für den χ^2 -Anpassungstests übrig.

statistics on counted data (columns):
dotted line: Poisson-fit on columns
solid line: theoretical distribution (Poisson with $\lambda_{\text{theo}} = \text{average}$)

C₁

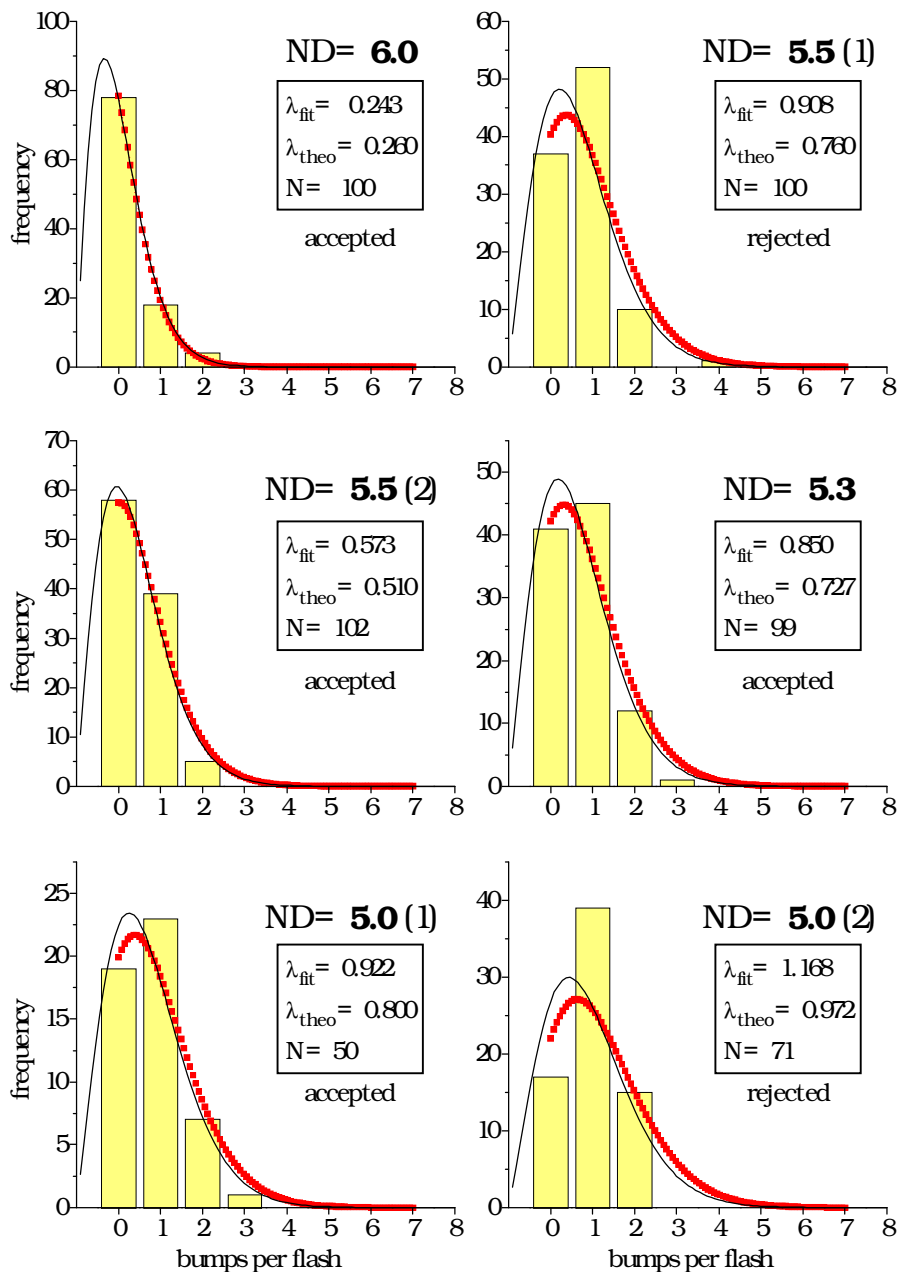


Figure 6.3a: Histograms of the number of c_1 -bumps elicited by one flash. Data were taken at different light intensities as indicated by the bold numbers (ND=neutral density filters). **Dotted line:** Experimental data were fitted with a Poisson distribution by means of the least square method. **Solid line:** expected distribution assuming a Poisson distribution with average λ_{theo} as calculated from the counted data. [Experiment mw_1808]

statistics on counted data (columns):
 dotted line: Poisson-fit on columns
 solid line: theoretical distribution (Poisson with λ_{theo} = average)

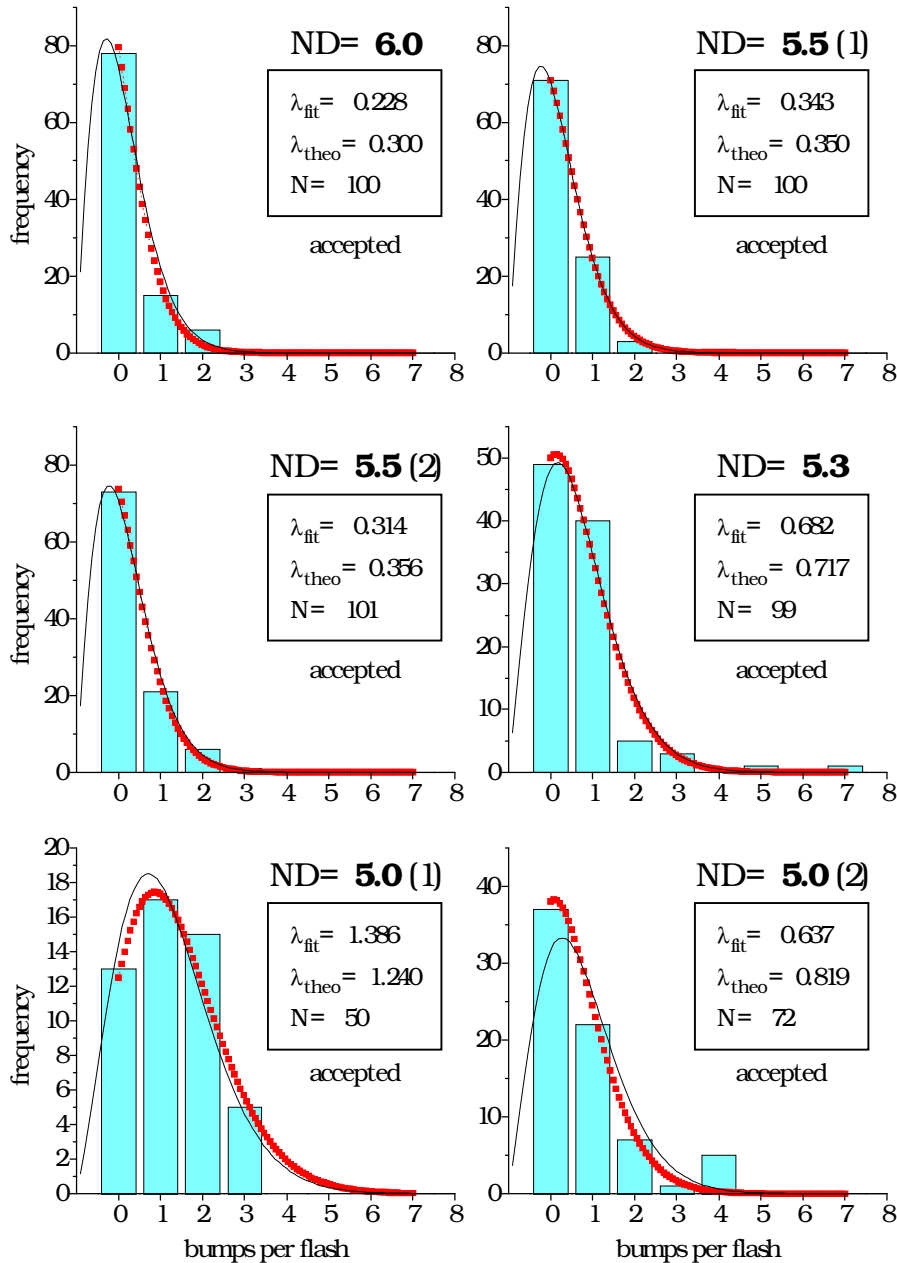
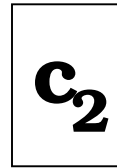


Figure 6.3b: Histograms of the number of c_2 -bumps elicited by one flash. Data were taken at different light intensities as indicated by the bold numbers (ND=neutral density filters). **Dotted line:** Experimental data were fitted with a Poisson distribution by means of the least square method. **Solid line:** expected distribution assuming a Poisson distribution with average λ_{theo} as calculated from the counted data. [Experiment mw_1808]

statistics on counted data (columns):
 dotted line: Poisson-fit on columns
 solid line: theoretical distribution (Poisson with λ_{theo} = average)

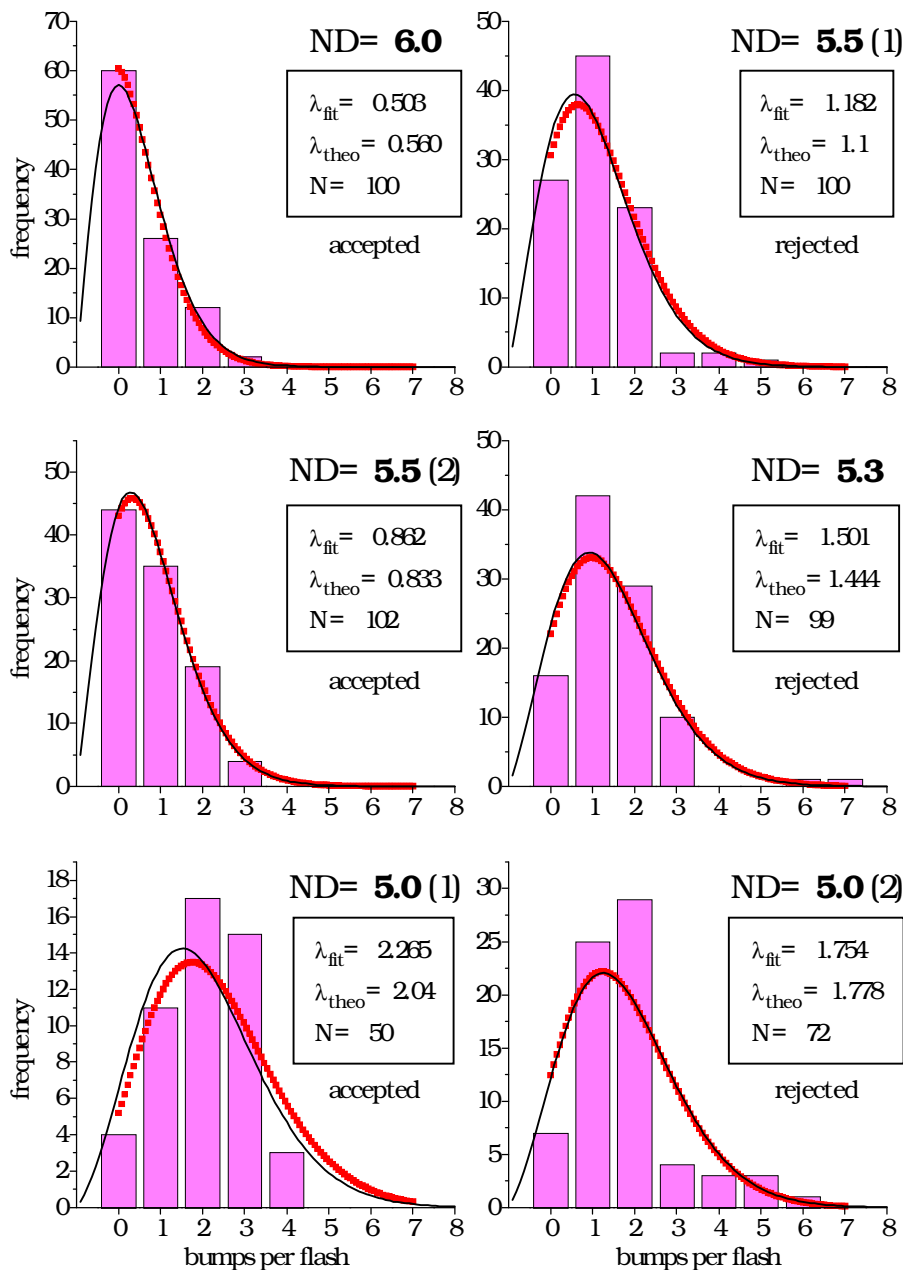
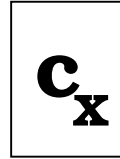


Figure 6.3c: Histograms of the number of bumps (without distinction between c_1 - and c_2 -bumps) elicited by one flash. Data were taken at different light intensities as indicated by the bold numbers (ND=neutral density filters). **Dotted line:** Experimental data were fitted with a Poisson distribution by means of the least square method. **Solid line:** expected distribution assuming a Poisson distribution with average λ_{theo} as calculated from the counted data. [Experiment mw_1808]

An die gemessenen Verteilungen (Säulen in den Abbildungen 6.3a-c) wurden mit der Methode der Varianzminimierung Poissonverteilungen $P(n)$ angepaßt (Quadrate in den Histogrammen) und diese mit den experimentellen Verteilungen verglichen.

$$P(n) = \frac{\lambda^n \exp(-\lambda)}{n!}, \quad \text{Poissonverteilung mit Mittelwert } \lambda$$

$$X^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(F_i - f_i)^2}{F_i}, \quad \text{Prüfgröße für den } \chi^2\text{-Anpassungstests}$$

(F_i erwarteter Wert, f_i experimenteller Wert)

Die Werte der Prüfgrößen X^2 sind in **Tabelle 6.2** für alle χ^2 -Anpassungstests eingetragen. Es wurden nur k Klassen berücksichtigt, in denen die erwarteten Häufigkeiten größer oder gleich drei waren [Bendat and Piersol (1986)]. In Klammern sind die Freiheitsgrade $f=k-2$ für X^2 angegeben.

Auf dem 5 %igen Signifikanzniveau konnten die meisten Anpassungen akzeptiert werden. Zwei weitere verfehlten das Signifikanzniveau nur knapp (sie hätten dem 2 %igen Niveau genügt).

		6.0	5.5 (1)	5.5 (2)	5.3	5.0 (1)	5.0 (2)
C₁	X^2 (f) test (5 %)	1.29 (1) <i>accepted</i>	14.4 (2) <i>rejected</i>	3.21 (1) <i>accepted</i>	5.60 (2) <i>accepted</i>	1.48 (1) <i>accepted</i>	13.8 (2) <i>rejected</i>
C₂	X^2 (f) test (5 %)	too few bins	0.351 (1) <i>accepted</i>	1.76 (1) <i>accepted</i>	4.82 (2) <i>accepted</i>	0.825 (2) <i>accepted</i>	0.310 (1) <i>accepted</i>
C_x	X^2 (f) test (5 %)	3.12 (1) <i>accepted</i>	7.58 (2) <i>rejected</i> (2 %)	0.780 (2) <i>accepted</i>	9.88 (3) <i>rejected</i> (2 %)	5.05 (3) <i>accepted</i>	13.4 (3) <i>rejected</i>

Table 6.2: χ^2 -goodness-of-fit test parameters from figures 6.3a-c. Numbers in parenthesis give the degree of freedom for X^2 . Only those classes k of which the expected frequencies exceeded a value of three were taken into consideration. Measured data (columns in figure 6.3a-c) was fitted with a Poisson distribution by means of the least-square-method. Testing was performed at the 5 % level of significance.

Neben den angepaßten Kurven wurden noch Poissonverteilungen um den Mittelwert λ_{theo} der gemessenen Daten in die Histogramme gezeichnet (durchgezogene Linien). Dies sind die erwarteten Poissonverteilungen, wenn die Bumps unabhängig voneinander ausgelöst wurden.

Man erkennt in den meisten Fällen eine gute Übereinstimmung von angepaßter und erwarteter Poissonverteilung.

Bei den Histogrammen mit schlechter Übereinstimmung sind die mittleren Säulen gegenüber denen bei größeren n immer überrepräsentiert, was wahrscheinlich auf nicht entschlüsselte Überlagerungen zurückzuführen ist. Als Folgefehler wird die mittlere Anzahl der Bumps pro Blitz zu klein berechnet und die erwarteten Verteilungen werden zu kleineren Werten hin verschoben (s. Abbildung 6.3a).

Zumindest für diese Messung läßt sich zusammenfassend sagen, daß die Anzahl der von einem Blitz ausgelösten c_1 - bzw. c_2 -Bumps, für alle vier untersuchten Lichtintensitäten poissonverteilt nachgewiesen werden konnte. Aus den Poissonverteilungen läßt sich bei diesem Blitzexperiment auf die Unabhängigkeit der c_1 -Bumps untereinander und ebenso der c_2 -Bumps untereinander schließen. Abhängigkeiten zwischen den beiden Bump-Typen können nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere ergaben die Anpassungen an die Häufigkeitsverteilungen für das Finden irgendwelcher Bumps (c_x) keine sehr guten Übereinstimmungen mit Poissonverteilungen (Abbildung 6.3c; s. Diskussion).

Wenn auch dieses Resultat recht eindeutig erscheint, möchte ich noch auf die mit Fehlern behaftete Auswertemethode hinweisen.

Einige Bumps wurden nicht erkannt, weil sie von anderen überlagert wurden (s. Abschnitt 5.4). Dies führte zu einer Verschiebung der Gesamtverteilung der Bumps pro Spur nach kleineren Werten. Andererseits war die Unterscheidung zwischen c_1 - und c_2 -Bumps nicht immer eindeutig, so daß Fehlinterpretationen nicht ausgeschlossen werden können.

Die χ^2 -Anpassungstests konnten nur mit sehr kleinen Freiheitsgraden f durchgeführt werden, weil die Zahl der ausgelösten Bumps so gering war (zwischen 0,2-2 Bumps/Blitz). Andererseits hätte eine Erhöhung der Blitzlichtintensität den Anteil der Überlagerungen vergrößert und somit die Abzählbarkeit der Bumps erheblich eingeschränkt.

Vermutlich gelangen wegen der zeitlichen Überlagerungen der Bumps bei meinen anderen Messungen keine solch guten Anpassungen mit Poissonverteilungen.

6.3 Quantisierte Bumps?

6.3.1 Befund

In diesem Abschnitt möchte ich noch von einem interessanten Phänomen berichten, auf das ich bei der Untersuchung der Bump-Parameter gestoßen bin.

Abbildung 6.4 zeigt zwei Histogramme für das Strom-Zeit Integral („Fläche“) von Bumps einer Messung (Experiment mw_0910). Bumps, die sich teilweise überlagerten wurden als ein Ereignis in das Histogramm aufgenommen. Das obere Histogramm zeigt in einem Überblick 98 % der Daten. Die wenigen Ereignisse mit größeren Flächen wurden abgeschnitten. Die Verteilung hat ein Maximum bei sehr kleinen Werten und wird mit größeren Flächen exponentiell kleiner (s. Abschnitt 2.2). Das untere Histogramm zeigt einen Ausschnitt der Flächenverteilung mit einer feineren Auflösung. Man erkennt nun im exponentiell abfallenden Bereich eine regelmäßige Unterstruktur. Die Säulenbreite (bin=117 pAms) wurde so eingestellt, daß diese Peaks besonders gut zu erkennen sind.

Im weiteren habe ich die Peaks auf ihre Äquidistanz hin untersucht. Dazu versuchte ich mit der Methode der Varianzminimierung eine Anpassung des Histogramms (Abbildung 6.4 unten) mit so vielen Gauß-Funktionen, wie Peaks zu erkennen waren. Die Gauß-Funktionen habe ich unter der Annahme gewählt, daß die Peaks von statistisch unabhängigen Ereignissen gebildet werden.

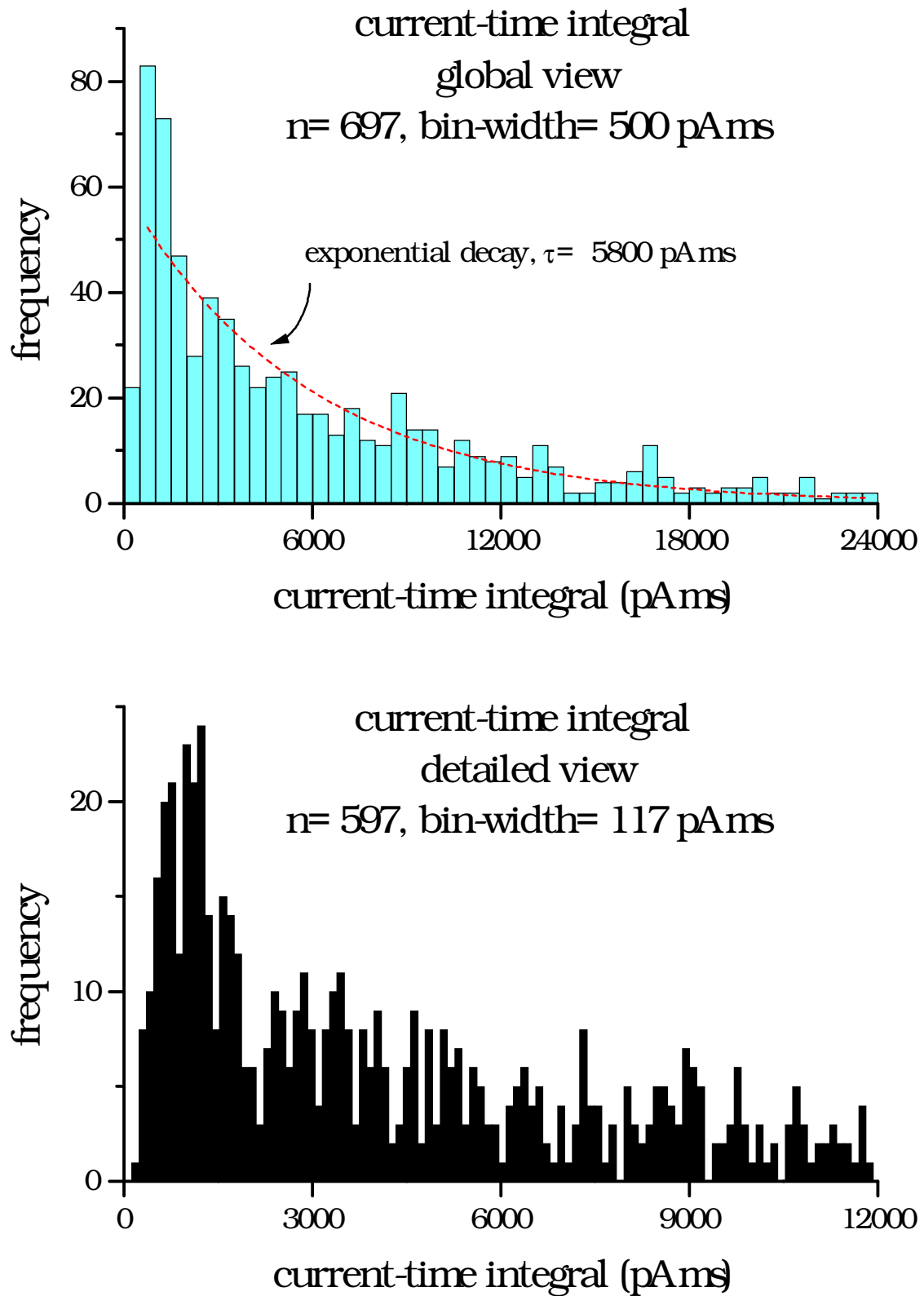


Figure 6.4: Histograms of the current-time integral of bumps. **Top:** global view. **Bottom:** detailed view, revealing a multiple peaked substructure.

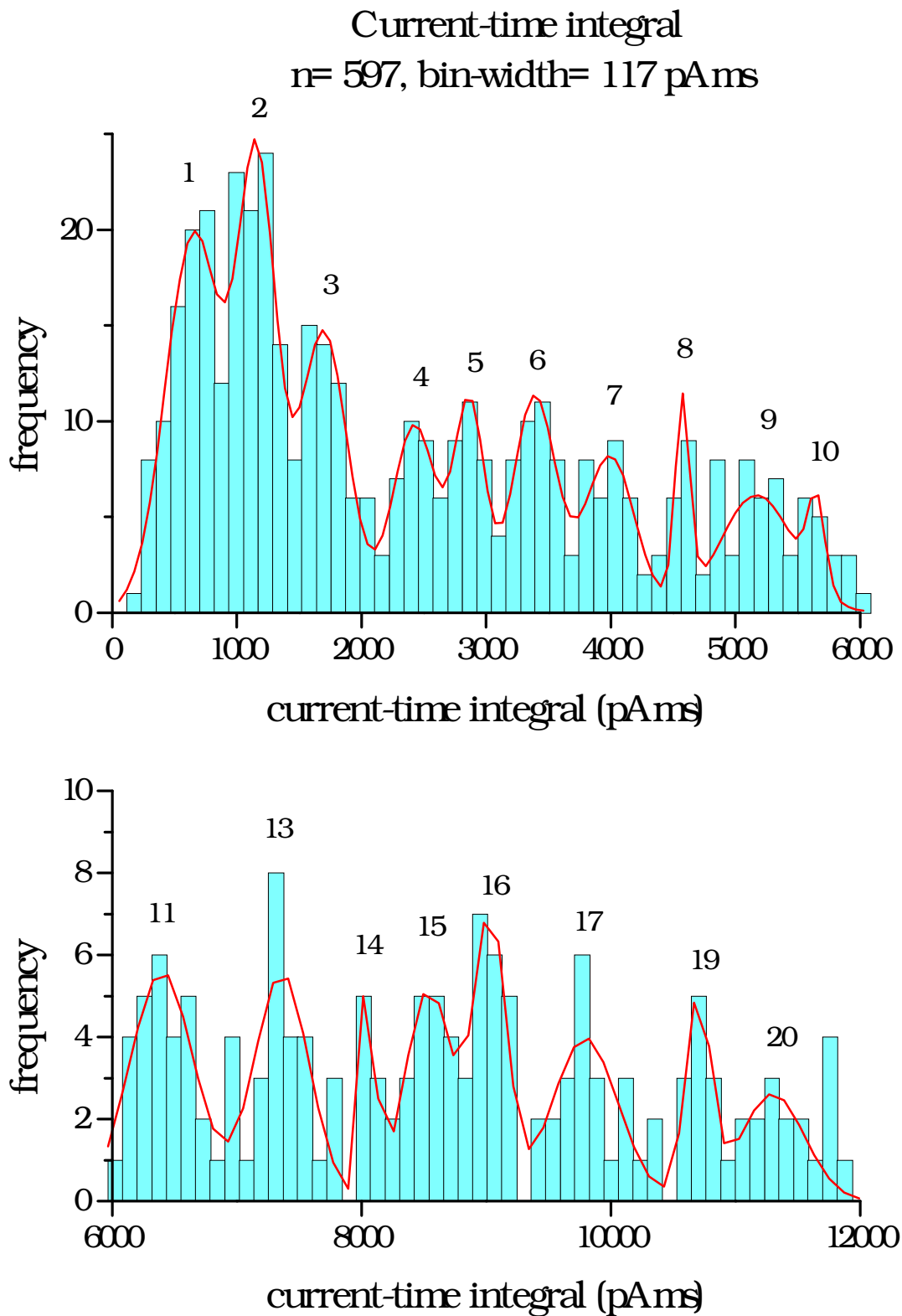


Abbildung 6.5 zeigt das Resultat. Aus Gründen der Deutlichkeit wurde die Abszisse in zwei Teile unterteilt. Oben sind Bump-Flächen von Null bis 6000 pAms und unten solche von 6000-12000 pAms aufgetragen. Die Zahlen an den Maxima der Anpassungskurve geben die fortlaufenden Nummern der Peaks an. Die Nummern $k=12$ und $k=18$ wurden aus Gründen ausgelassen, die später beschrieben werden.

Tabelle 6.3 faßt die gewonnenen Peakpositionen zusammen:

In der ersten Spalte befinden sich die Peak-Nummern k und in der zweiten die zugehörigen Peak-Positionen F_k (Maxima der angepaßten Gauß-Funktionen). In der dritten Spalte sind die Quotienten q aus Peak-Position und Peak-Nummer eingetragen. Die Werte für q sind mit zwei Ausnahmen eng verteilt. Als Mittelwerte berechnet man

$$q = 577,3 \pm 22,4, \quad n=18$$

oder ohne Peak 1 und 4

$$q = 570,5 \pm 6,2, \quad n=16$$

Die Peaks lassen sich also in einfacher Weise als Vielfache von q darstellen:

$$F_k = k \cdot q.$$

Eine Methode zur Untersuchung periodischer Anteile in Verteilungen ist die Fourier-Analyse. Da die regelmäßig auftretenden Peaks als periodische Funktion der Bump-Fläche mit einer „Periodendauer“ q aufgefaßt werden können, sollte die FFT (*Fast Fourier*

Peak-number k	position of peak F_k (pAms)	$q = F_k/k$ (pAms)
1	657	657
2	1163	581.5
3	1694	564.7
4	2426	606.5
5	2867	573.4
6	3388	564.7
7	3993	570.4
8	4574	571.8
9	5173	574.8
10	5648	564.8
11	6398	581.6
12	-	-
13	7360	566.2
14	8067	576.2
15	8542	569.5
16	9034	564.6
17	9794	576.1
18	-	-
19	10700	563.2
20	11298	564.9

Table 6.3: Fitting data obtained from Figure 6.5.

Transformation) einen besonders großen Anteil der Frequenz $1/q$ im Histogramm aufspüren. **Abbildung 6.6** zeigt die FFT vom Histogramm in **Abbildung 6.4** unten. Deutlich ist ein Peak bei der Frequenz $1/565$ pAms zu erkennen.

Der Kehrwert der Frequenz gibt die Periodenlänge der Peak-Folge, also den Abstand zwischen den Peaks an:

$$q_{fft} = 565 \text{ pAms}$$

Der mit Hilfe der FFT bestimmte Wert für q liegt innerhalb der Fehlergrenzen der graphischen q -Bestimmung.

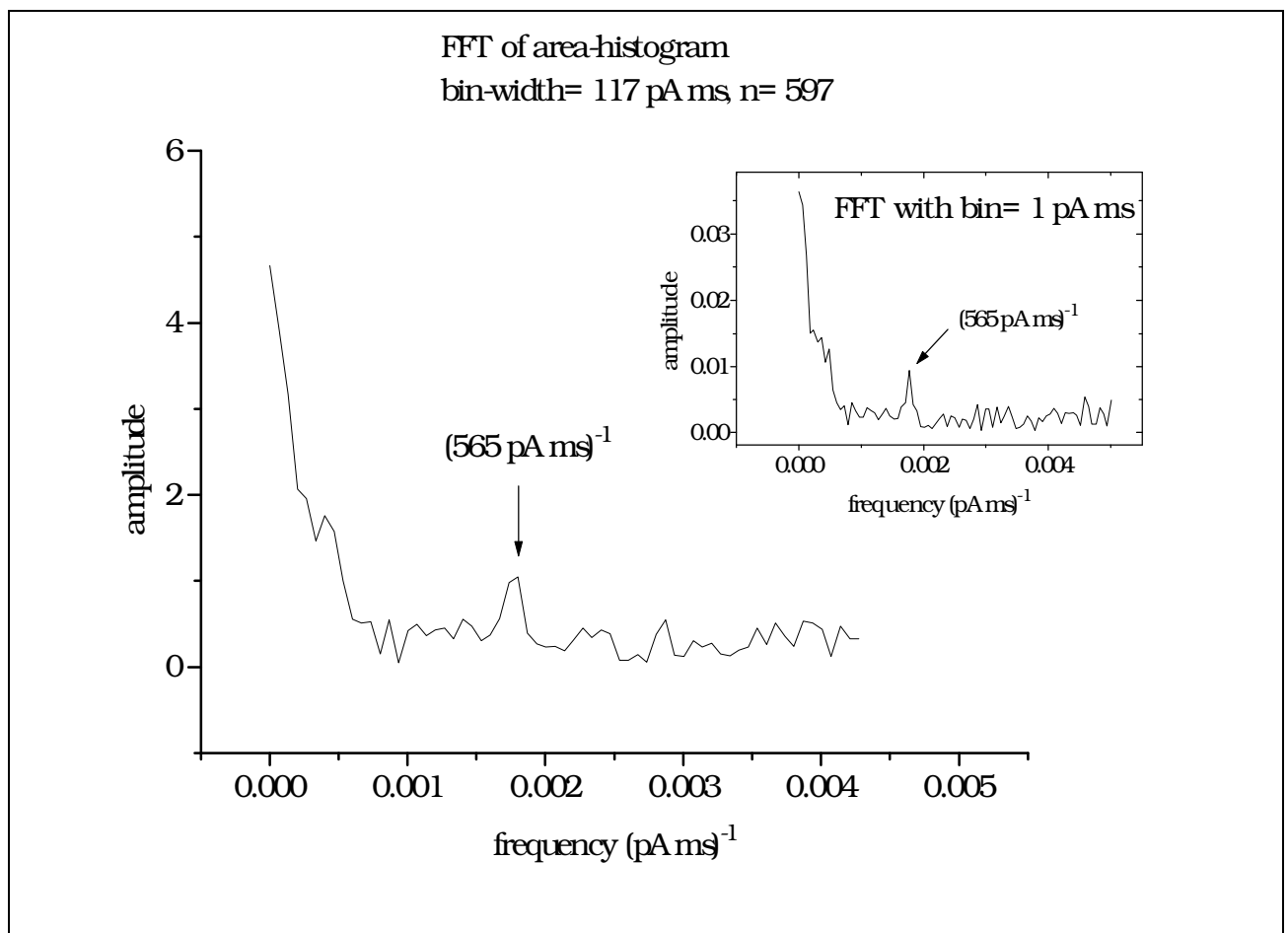


Figure 6.6: Fast Fourier transformation of the histogram in figure 6.4 (bottom). Note the peak at frequency= $(565 \text{ pAms})^{-1}$. **Inset:** FFT of the same data with different bin-width (bin=1 pAms). Detection of q was independent of bin-width.

Wahrscheinlich hat die FFT dieselben äquidistanten Häufigkeitsschwankungen erkannt, wie sie in Abbildung 6.5 graphisch hervorgehoben wurden.

Die Entschlüsselung des Quotienten q gelang mit Hilfe der FFT auch bei Säulenbreiten, bei denen graphisch kaum noch Peaks auszumachen waren (z.B. bin=1 pAms, s. Inset in Abbildung 6.6)).

Die Bump-Fläche scheint „quantisiert“ zu sein. q ist hierbei als „Ladungsquantum“ für einen Bump zu verstehen. Dies würde bedeuten, daß die Phototransduktion in einem diskreten Ladungstransport durch lichtaktivierte Membrankanäle resultiert.

6.3.2 Effekt oder Artefakt?

Es stellt sich die wichtige Frage, inwieweit die beschriebenen Beobachtungen physio-logischer Natur sind oder ob ein Meß- oder Auswertefehler vorliegt.

Da der Quantisierungs-Effekt nicht auch bei anderen Messungen gesehen werden konnte, erscheint es mir unwahrscheinlich, daß er auf einem systematischen Meßfehler auf apparativer Seite beruht (z.B. diskretisiert der 50 Hz-Brumm die Latenzzeit bei allen Auswertungen).

Andererseits liegt die Annahme eines Artefakts nahe, da bei der Auswertung die Bump-Parameter nicht immer präzise angebar sind (s. Abbildung 6.7) und das ermittelte Quantum äußerst klein ist.

Da die Bump-Fläche im wesentlichen durch die Bump-Amplitude und die Bump-Breite bestimmt wird, sollte wenigstens einer dieser beiden Parameter ebenfalls eine gepeakte Verteilung aufweisen. Für die Amplitude konnte ich diese nicht finden. Bei der Bump-Breite zeigen sich nur stark verschmierte Peaks im 20 ms -Abstand, die aus dem 50 Hz-Brumm resultieren (s. **Abbildung 6.7**).

Die Rauschamplitude ΔI lag bei der vorliegenden Messung zwischen 5 und 10 pA (Peak-zu-Peak). Die dominierende Rauschfrequenz war 50 Hz und 100 Hz mit einer entsprechenden Wellenlänge von $\Delta t = 20$ ms bzw. 10 ms.

Der Fehler in der Fläche aufgrund der möglicherweise fehlerhaften Parameter I und t_b ist dann schätzungsweise (s. **Abbildung 6.8**)

$$\Delta F \approx \Delta I \cdot (t_b + \Delta t) = \Delta I \cdot t_b + \Delta I \cdot \Delta t$$

(Gleichung 7.1)

Der zweite Term in **Gleichung 7.1** vermag demnach nur einen Beitrag von 100-200 pAms bzw. 50-100 pAms zum Fehler ΔF zu leisten und kann somit kaum die Quantisierung erklären (der Fehler müßte wenigstens $q_{\text{ff}}/2 \approx 280$ pAms groß sein).

Der erste Term in Gleichung 7.1 erreicht die Größenordnung von q_{ff} , schießt aber mit Größen von 750-1500 pAms etwas über das Ziel hinaus (typische Bump-Breiten sind $t_b = 150$ ms).

Die Digitalisierung der Stromsignale geschah in dieser Messung mit einer Auflösung von ca. $\Delta I_{\text{Digit}} = 0,25$ pA pro bit (4096 bit pro 1 nA). Der Einfluß dieser diskreten Stromauflösung auf das Strom-Zeit Integral liegt nur in der Größenordnung

$$\Delta I_{\text{digit}} \cdot t_b \approx 50 \text{ pAms}$$

und kann die Quantisierung der Bump-Fläche ebenfalls nicht erklären.

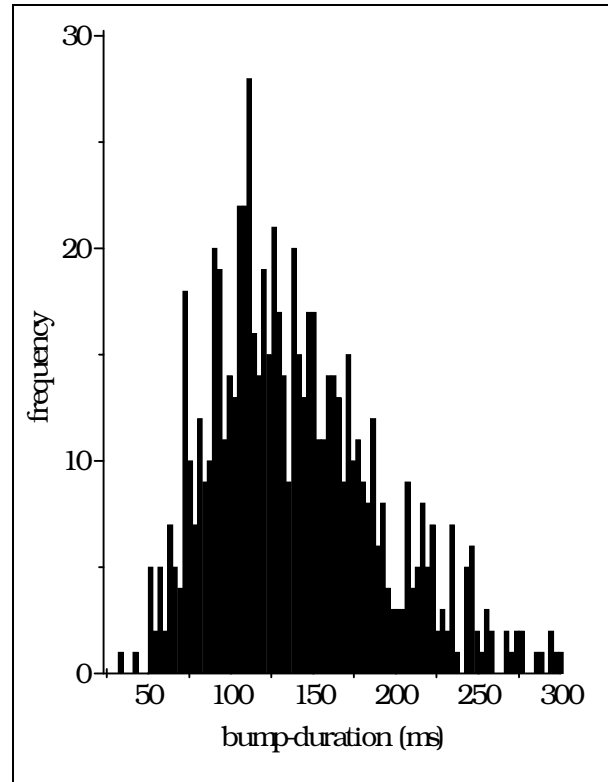


Figure 6.7: Histogram for the duration of bumps (N= 703).

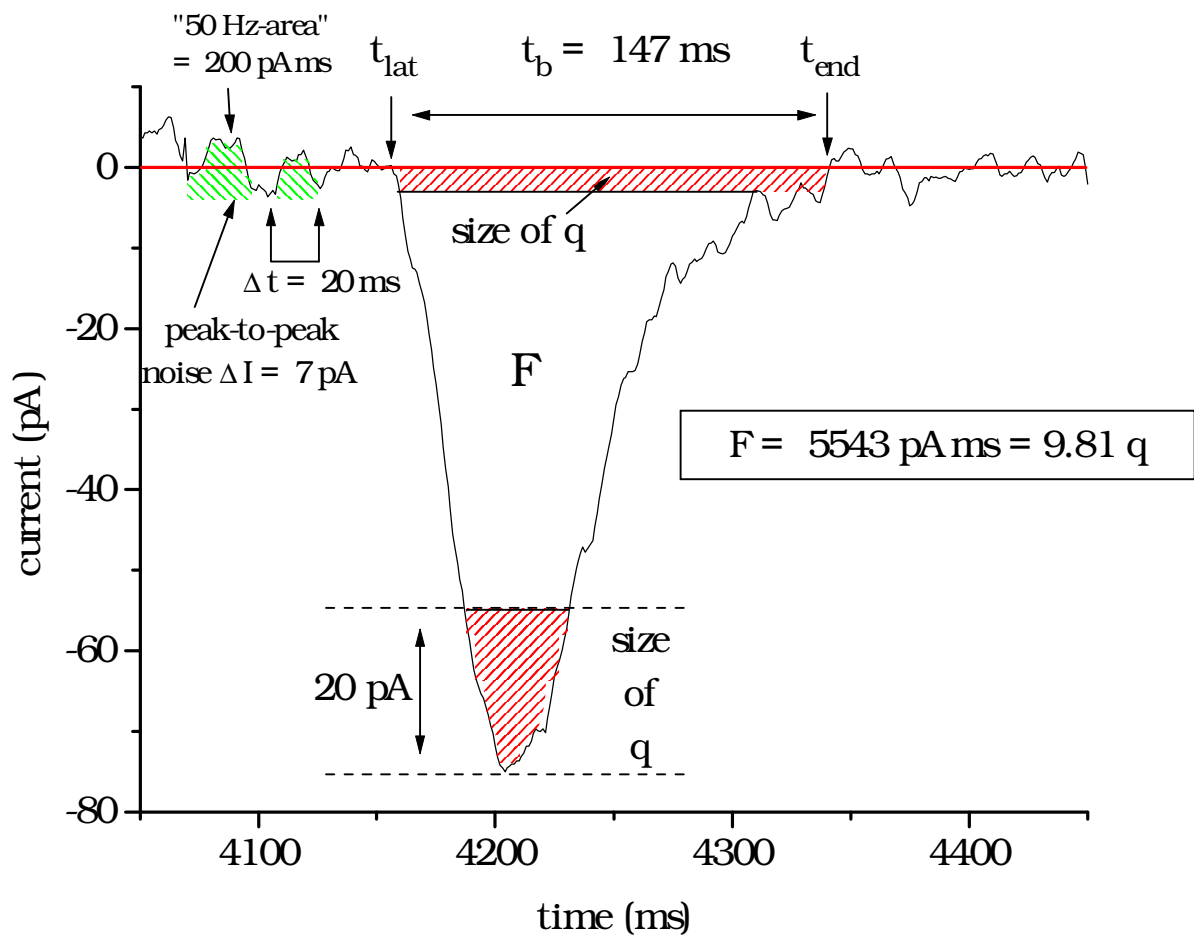


Figure 6.8: Demonstration of the size of the quantum q .

Eine genaue Untersuchung der Bump-Flächen mit Hilfe einer anderen Software zeigte im Vergleich zu den Daten der Standardauswertung (s. Abschnitt 5.2) kleine Abweichungen in den Bump-Flächen, die durch etwas unterschiedliche Parametrisierungen zustande kamen. Eine Stichprobe von 10 Bumps ergab Unterschiede in der ermittelten Fläche von $\Delta F = 248 \pm 142$ pAms (Fehler ist Standardabweichung). Die nachträglich ermittelten Flächen waren meistens „geradzahligere“ Vielfache von q_{fit} als die mit der Standardauswertung ermittelten.

Ein Grund dafür, daß die Quantisierung bei dieser und keiner anderen Messung beobachtet werden konnte, liegt wahrscheinlich in den besonders rauscharmen Meßspuren dieses Experiments. Die Rauschamplitude war nach dem Filtern (s. Abschnitt 5.1) nur 5-10 pA (Peak-zu-Peak) groß, was den Fehler bei der Parametrisierung verhältnismäßig klein machte (s.o.). Außerdem waren alle aufgezeichneten Bumps klein im Vergleich zu den übrigen Messungen (mittlere Bump-Amplitude $I = 71 \pm 56$ pA; zum Vergleich: Exp. mw_1310, $I = 346 \pm 413$ pA und mw_1808, $I = 328 \pm 687$ pA).

Eine Trennung der Bump-Typen war bei diesem Experiment mit keinem Trennparameter möglich. Entweder waren beide Bump-Typen vorhanden, konnten unglücklicherweise aber nicht getrennt werden oder es gab nur einen Bump-Typ, weil die Enzymkaskade, die für den anderen Bump-Typ zuständig gewesen wäre versagte. Wenn nur ein Bump-Typ vorhanden war, dann handelte es sich wahrscheinlich um c_2 -Bumps. Einige Bumps dieser Messung erreichten Amplituden bis 200 pA und darüber. Bumps dieser Größe waren bei allen anderen Experimenten c_2 -Bumps. Außerdem zeigte in diesem Experiment die Bump-Halbwertsbreite eine schwache Amplitudenabhängigkeit. Dieser Zusammenhang gilt auch nur für c_2 -Bumps. Wegen der erheblichen Unterschiede in der Bump-Kinetik und -Größe zwischen verschiedenen Zellen kann eine Zuordnung des Bump-Typs aber nur spekulativ sein, wenn nicht beide Bump-Typen vorhanden sein

Es kann aus der bis hierher geführten Argumentation nicht abschließend entschieden werden, ob die Quantisierung im Flächen-Histogramm ein physiologischer Effekt oder lediglich ein Meß- bzw. Auswertartefakt ist. In jedem Fall sind weitere Messungen vonnöten, die zuverlässige Parametrisierungen der Bumps zulassen.

In **Tabelle 6.3** sind die Argumente, die für und wider eine Quantisierung der Bump-Fläche sprechen zusammengestellt.

physiologischer Effekt	Meßartefakt
ruhige Meßspuren und wenig Überlagerungen (\Rightarrow Q. bei dieser Messung nicht verschmiert?)	(Rauschamplitude \cdot Bump-Breite) in Größenordnung von $q_{ffn}=565 \text{ pAms}$
Auflösung des Rezeptorstroms bei 0,25 pA (\Rightarrow Q. nicht mit Digitalisierung des Stroms erklärbar)	Ungenauigkeit der Flächenbestimmung der Standardauswertung in der Größenordnung von $q_{ffn}/2$
keine Peaks im Amplituden-Histogramm (\Rightarrow keine systematisch falsche Grundlinienbestimmung)	
zu wenig Peaks im t_b -Histogramm (\Rightarrow Q. nicht mit 50 Hz-Brumm erklärbar)	
nur ein Bump-Typ (c_2) (\Rightarrow Q. nicht durch zweiten Bump-Typ verschmiert?)	
Q. nicht in anderen Messungen (\Rightarrow kein apparativer Meßartefakt)	

Table 6.3: Brief summary of arguments as to whether the quantisation is just an artefact or is based on physiological evidence.

7. DISKUSSION

7.1 Kennlinien und poissonverteilte Bumps

Aus der Poissonstatistik sowohl für die Zahl der Bumps als auch für die zeitlichen Abstände zwischen den Bumps, die nach einer Belichtung auftreten, läßt sich auf voneinander unabhängige Bump-Auslösungen schließen. Dies ist konsistent mit der Hypothese, daß ein Photon nur einen Bump auslösen kann [Yeandle (1958); Fuortes and Yeandle (1964); Adolph (1964); Borsellino and Fuortes (1968); Yeandle and Spiegler (1973); Stieve (1985); Yeandle (1985)]. Borsellino und Fuortes (1968) zeigten für schwache Lichtintensitäten, daß die Summe aller Rezeptorpotentiale (Spannung-Zeit Integrale), die in einer Meßreihe von n Zyklen gemessen wurde nur von der Gesamtzahl der absorbierten Photonen abhängt, nicht aber von der Zahl der pro Blitz absorbierten Photonen. Dies läßt sich am besten mit der Annahme erklären, daß genau ein absorbiertes Photon für die Auslösung eines Bumps notwendig ist.

Bei Blitzexperimenten konnte ich getrennte Poisson-Statistiken für die Häufigkeiten von c_1 - und c_2 -Bumps zeigen (s. Abschnitt 6.2). Diese Bumps werden also wahrscheinlich voneinander unabhängig ausgelöst. Ein Photon kann deshalb nur einen c_1 - oder einen c_2 -Bump auslösen. Ähnlich wie Poganiatz (1996) bei Dauerlichtexperimenten, konnte ich bei Blitzexperimenten die Bump-Häufigkeits-Histogramme weit weniger gut mit Poisson-Verteilungen anpassen, wenn ich nicht zwischen den Bump-Typen unterschied (c_x -Bumps). Dies deutet darauf hin, daß diese beiden Gruppen von Bumps (c_1 - und c_2 -Bumps) voneinander abhängig sind, denn voneinander unabhängige poissonverteilte Stichproben fügen sich wieder zu einer poissonverteilten Stichprobe zusammen (dabei addieren sich die Mittelwerte).

Die Vermutung einer abhängigen Bump-Auslösung wird von der Beobachtung unterstützt, daß die Blockierung der makroskopischen C_2 -Stromkomponente mit Heparin oder Neomycin die Amplitude der C_1 -Komponente reduziert [Contzen et al. (1995)]. Außerdem wurde berichtet, daß c_2 -Bumps besonders häufig einem c_1 -Bump folgen [Nagy et al. (1993)]. Eventuell bleiben

viele c_1 -Bumps durch die Überlagerung mit einem früheren c_2 -Bump unbeobachtet, weil c_2 -Bumps eine langsamere Abkling- als Anstiegskinetik besitzen. Auf diese Weise wäre eine scheinbare Häufung von c_1 -Bumps vor c_2 -Bumps erklärbar.

Die Abweichung der Häufigkeits-Verteilungen für c_x -Bumps (Abbildung 6.3c) von Poissonverteilungen läßt sich auch unter der Annahme nicht detektierter Überlagerungen verstehen. Nach Lederhofer et al. (1991) sind bis zu 20% der „Bumps“ fehlinterpretierte Mehrfachereignisse, die sich aufgrund ihrer zeitlichen Überlagerung nicht mehr entschlüsseln lassen. Da die Häufigkeiten, viele Bumps pro Blitz zu finden, meistens zu klein gegenüber den theoretisch zu erwartenden ausfiel (s. Abbildung 6.3a-c), ist zu vermuten, daß häufig Mehrfachereignisse nur als Einzel- oder Doppel-Bump erkannt wurden, obwohl mehr Bumps vorhanden waren. Die entsprechenden Säulen sind in den Histogrammen meistens überrepräsentiert. Die Fehldeutung der Anzahl der Bumps pro Spur ist offensichtlich um so umfangreicher, je größer die mittlere Zahl der Bumps pro Spur ist. In der Tat mußten gerade die Anpassungen mit den größten Mittelwerten λ verworfen werden.

Zum Teil waren Anpassungen der gemessenen Verteilungen mit Poissonverteilungen bei der selben Zelle nicht reproduzierbar, weil die mittlere Zahl der ausgelösten Bumps im Laufe der Messung lichtintensitätsunabhängig variierte (z.B. Abbildung 6.3a, ND=5,5 (1) und ND=5,5(2)).

Wenn c_1 - bzw. c_2 -Bumps voneinander unabhängige Ereignisse sind, ist die Wahrscheinlichkeit für die Auslösung eines Bumps proportional zu der Zahl der Photonen, die die Rezeptorzelle erreichen. Die Bump-Häufigkeiten sollten deshalb linear mit der Lichtintensität zunehmen. Während dieser Zusammenhang für c_x -Bumps schon nachgewiesen wurde [Fuortes and Yeandle (1964)], konnte ich die Linearität bei niedrigen Lichtintensitäten für die beiden Bump-Typen erstmalig getrennt nachweisen (Abschnitt 6.1).

Die Intensitätsabhängigkeit der Bump-Häufigkeiten läßt sich oberhalb der von mir untersuchten Lichtintensitäten (etwa $>2-3$ effektive Photonen (Bumps) pro Blitz) wegen der großen Anzahl von Überlagerungen nur noch abschätzen (s. Abschnitt 5.4). Als Maß für die Bump-Ausbeute kann aber die durchschnittliche Amplitude oder das Strom-Zeit Integral der

Rezeptorantwort betrachtet werden (unter Berücksichtigung der intensitäts-unabhängigen Bump-Größenfluktuationen, s. Abbildung 5.4).

Untersuchungen der Intensitätsabhängigkeit der Rezeptorantwort bis zur Sättigung des Rezeptorstroms haben ein supralineares Verhalten bei mittleren Reizintensitäten [Lisman and Brown (1975); Stieve and Pflaum (1978); Stieve et al. (1983b); Grzywacz (1988)] und ein sublineares bei sehr intensiven Lichtreizen aufgedeckt [Brown and Coles (1979); Stieve and Schlösser (1989)].

Eine getrennte Betrachtung der einzelnen Stromkomponenten zeigt für die makroskopische C_1 -Komponente einen linearen Anstieg bis zu hohen Lichtintensitäten. Dagegen vergrößert sich die Steigung für die C_2 -Komponente in einem mittleren Intensitätsbereich. In doppeltlogarithmischen Darstellungen bestimmten Deckert et al. (1991) für die C_2 -Komponente Steigungen bis größer drei und schlossen so (wie auch Stieve und Schlösser (1989)) auf eine positive Kooperativität mit dem Hill-Faktor vier.

Aktuelle Untersuchungen von Contzen und Nagy (1996) mit Hilfe eines Rezeptorstrommodells deuten auf eine Kooperativität mit einem Hill-Faktor von zwei hin.

Eine Supralinearität dieser Potenz konnte ich durch die Analyse von supralinearen Kennlinien (von Stieve und Schlösser) bestätigen. Hierzu habe ich den Koordinatenursprung der cartesischen Darstellung der Kennlinie in den Beginn des supralinearen Kurvenstücks transformiert. Diese Koordinatentransformation ist nötig, um in der doppeltlogarithmischen Darstellung der Kennlinie Aussagen über den Exponenten der Kennlinienfunktion im supralinearen Kurventeil gewinnen zu können.

Die lineare Intensitätsabhängigkeit für die C_1 -Komponente bei höheren Lichtintensitäten deutet auf einen von der C_2 -Komponente verschiedenen Mechanismus hin. Die bei sehr großen Lichtintensitäten beobachtbare dritte Stromkomponente C_3 (s. Abbildung 2.1) verhält sich ähnlich wie C_1 ungefähr linear mit der Lichtintensität [Deckert et al. (1991)].

Stieve und Schlösser (1989) gaben mit dem „Bump-Fleck“-Modell eine mögliche Erklärung für die Entstehung eines supralinearen Verhaltens der Rezeptorstromgröße (s. Abschnitt 2.4). Allerdings bleibt offen, warum nicht für alle Stromkomponenten ein supralineares Verhalten nach dem „Bump-Fleck“-Modell beobachtet werden konnte. Naheliegender wäre der Schluß, daß die Membrankanäle, die für die C_1 - (bzw. C_3 -) Stromkomponente zuständig sind, nur eine

Bindungsstelle für terminale Transmitter (evtl. cGMP und cAMP (s. Abschnitt 2.2)) haben. Es existierten dann- um in der Sprache des „Bump-Fleck“-Modells zu bleiben- keine „entsicherten“ Kanäle mehr, die bei einer Überlappung der Bump-Höfe (infolge großer Lichtintensitäten) kooperativ geöffnet werden könnten.

Stieve und Stommel (1992) wiesen mit Hilfe des Ca-Indikators Arsenazo III eine supralineare Intensitätsabhängigkeit der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach. Deshalb wird die Supralinearität des Rezeptorstroms zumindest teilweise schon vor den Kanälen erzeugt.

Der Anteil von Dunkelbumps an der Gesamtantwort der Photorezeptorzelle kann- unter der Annahme, daß ihre Entstehungswahrscheinlichkeit durch die Lichtblitze nicht verändert wird- leicht berücksichtigt werden. Dagegen machten bei allen quantitativen Auswertungen die Bump-Überlagerungen ernste Probleme (s. 5.4.1). Die vorliegenden Ergebnisse sind darum immer unter Berücksichtigung von nicht vollständig entschlüsselten Überlagerungen zu verstehen.

Contzen und Nagy (1996) zeigten kürzlich mit Hilfe eines mathematischen Modells für die Simulation von Rezeptorströmen [Contzen (1995)], daß sich vermeintliche „Einzelbumps“ mittlerer Größe (etwa 250 pA und größer) oft am besten durch eine Summe von zwei oder mehr simulierter Bumps anpassen lassen. Unter der Voraussetzung der Gültigkeit des zugrundeliegenden mathematischen Modells für Bumps (das Modell wurde ursprünglich für makroskopische Ströme entwickelt) muß geschlossen werden, daß sich viele Rezeptorstromereignisse aus einer Mehrzahl von Bumps zusammensetzen. Diese Überlagerungen können auch durch das von mir benutzte Korrekturschema (s. Abschnitt 5.4) nicht entschlüsselt werden, weil zur Bestimmung der mittleren Einzelbumpfläche „saubere Bumps“ verwendet wurden, die nach Contzen und Nagy (1996) zum Teil keine Einzelbumps sind.

7.2 Quantisierung?

Die beobachtete diskrete Verteilung im Histogramm für das Strom-Zeit Integral („Fläche“) wurde meines Wissens bisher noch nicht berichtet. Häufig sind im Amplituden- Histogramm (und weniger gut auch im Flächen-Histogramm) äquidistante lokale Maxima („Humps“) auf einer größeren Skala beobachtbar (z.B. Fig. 7 bei Stieve (1985)). Sie können durch die Überlagerung von n Bumps zu einem Rezeptorstrom n -facher Größe entstehen. Die entsprechenden Maxima im Flächen-Histogramm sind Vielfache von typischen Bump-Flächen (>10.000 pAms) und deshalb wahrscheinlich nicht identisch mit den hier berichteten. Kass beschreibt Bumps die in den k -ten Peak eines Amplitudenhistogramms fallen als Produkte einer durch k G-Proteine getriggerten Enzymkaskade. Er schreibt Bumps somit eine gequantelte Struktur zu [persönliche Kommunikation mit Prof. Kass].

In dieser Messung konnte ich keine quantisierte Amplitudenverteilung finden.

Die „Flächen-Quanten“ q der betrachteten Messung hatten eine Größe von circa

$$q = 570 \text{ pAms} = 5,7 \cdot 10^{-13} \text{ C} = 3,6 \cdot 10^6 e \quad (1e=1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}=1 \text{ Elementarladung}).$$

Mit einer Kanalleitfähigkeit von $\gamma=12$ pS, einer mittleren Kanal-offen-Zeit von $\Delta t=1,6$ ms [Nagy (1991)] und einem Membranpotential bei ca. $U_M=-50$ mV läßt sich die durch einen einzelnen Kanal während einer Kanalöffnung verschobene Ladung abschätzen zu:

$$Q_{\text{kanal}} = \gamma \cdot \Delta t \cdot U_M$$

$$\Rightarrow Q_{\text{kanal}} = 0,96 \cdot 10^{-15} \text{ C} = 0,96 \text{ pAms}$$

Damit entspricht ein „Quantum“ q der Öffnung von

$$q/ Q_{\text{kanal}} = 589 \text{ Kanäle}$$

Das bei dieser einen Messung eine diskrete Verteilung im Flächen-Histogramm beobachtet werden konnte liegt wahrscheinlich an den durchweg kleinen Bumps. 97 % der Bumps waren kleiner als 200 pA groß (752 von 775), 75 % waren kleiner als 100 pA (585 von 775). Darum war die Ereignisdichte im Flächenhistogramm bei kleinen Flächen besonders hoch (ungefähr

doppelt so groß gegenüber allen anderen Messungen). Kleine lokale Häufigkeitsunterschiede können in einem Histogramm offensichtlich besser detektiert werden, wenn die Ereignisdichte groß ist.

In dieser Messung konnte ich nur einen Bump-Typ nachweisen. Vielleicht überdeckt das Auftreten beider Bump-Typen bei anderen Messungen die Diskretisierung im Flächenhistogramm, weil die Bump-Typen je aus verschieden großen Quanten zusammengesetzt werden.

In Abschnitt 6.3.2 habe ich beschrieben, daß die Quantisierung der Bump-Fläche nicht einfach mit einem Meßartefakt erklärbar ist.

Durch die Digitalisierung der Stromsignale erzeugte Diskretisierungen von Bump-Parametern (vor allem der Bump-Amplitude) können die Quantisierung im Strom-Zeit Integral ebenfalls nicht erklären und sollten -wenn vorhanden- wie der 50 Hz-Brumm bei allen Experimenten beobachtbar sein.

Es ist überraschend, daß die diskrete Verteilung der Bump-Fläche bis hin zu großen Flächen scharf genug bleibt um aufgelöst zu werden. Da jede Stufe der Enzymkaskade eine exponentiell abklingende Lebensdauer aufweist, sollte auch die Verstärkung nach jeder Kaskadenstufe unscharf sein. Daraus läßt sich schließen, daß die Quantisierung in einem späten Schritt der Enzymkaskade passieren muß.

Ursache einer quantisierten Bump-Fläche könnte auch eine gruppierte Anordnung von Membrankanälen sein. Terminale Transmitter der Phototransduktionskaskade könnten, je nach der Menge der Transmitter, eine verschieden große Zahl von Membrankanal-Clustern erreichen und so nur eine diskrete Zahl von Membrankanälen öffnen. Dies setzt voraus, daß die Cluster alle die gleiche Zahl von Membrankanälen besitzen. Eine clusterförmige Anordnung von Membrankanälen wurde bisher nicht nachgewiesen, ihre Existenz aber auch nicht ausgeschlossen.

7.3 Ausblick

Eine weitergehende Untersuchung der Quantisierung des Strom-Zeit Integrals von Bumps erscheint mir äußerst vielversprechend.

Eine Möglichkeit wäre der Versuch zellspezifische Ladungsquanten q mit Hilfe statistischer Methoden aus den Bumps zu rekonstruieren. Unter der Bedingung, daß Campbell's Theoreme gelten (hier: Bumps sind Superpositionen *unabhängiger* und *identischer* Elementarereignisse („Quanten“)), sollten zum Beispiel mit der „shot noise analysis“ Häufigkeit und Größe der Ladungsquanten direkt beobachtbar sein. Eventuell lassen sich mit dieser Methode auch bei Messungen Quantisierungen des Strom-Zeit Integrals von Bumps nachweisen, wo sie mit den in dieser Arbeit vorgestellten Methoden (z. B. FFT) nicht beobachtbar waren.

Im Falle einer Bestätigung des Phänomens „Quantisierung des Strom-Zeit Integrals von Bumps“ wäre ein völlig neuer Hinweis auf die Struktur der Phototransduktion bei *Limulus polyphemus* gefunden.

8. APPENDIX

Abbildung A.2 zeigt schematisch das Vorgehen bei der Korrektur der Überlagerungen. In Klammern angegebene Bemerkungen beziehen sich auf **Abbildung A.2**.

Die Gesamtheit aller Meßspuren, die bei einer bestimmten Lichtintensität aufgenommen wurden (*all traces at a certain light intensity*), ließ sich in drei Gruppen einteilen:

Gruppe I („ <i>dark traces</i> “)	Dies sind die ersten zwei Sekunden jeder Meßspur (vor der Belichtung). In dieser Datengruppe befinden sich nur Dunkelbumps
Gruppe II („ <i>clean traces</i> “)	Dies sind n^c Spuren, die nur eindeutig voneinander trennbare Bumps enthalten
Gruppe III („ <i>impure traces</i> “)	Dies sind n^i Spuren, die wenigstens eine Überlagerung von Bumps aufweisen

Aus der *ersten Gruppe* konnten Informationen über Dunkelbumps (dc_1 und dc_2) gewonnen werden. Im Rahmen einer „Dunkelbumpkorrektur“ wurden die im Mittel zu erwartenden Dunkelbumps ($p(dc_1)$ und $p(dc_2)$) berechnet.

Unter der Annahme, daß Dunkelbumps genauso wahrscheinlich vor wie nach der Belichtung auftreten können, konnte der Anteil der Dunkelbumps an der Gesamtantwort korrigiert werden. **Abbildung A.1** gibt einen Eindruck von den relativen Häufigkeiten der Dunkelbumps gegenüber denen der lichtinduzierten Bumps. Dargestellt sind die Latenzzeiten aller parametrisierten Ereignisse einer Messung (Experiment mw_2707). Die Stromspur wurde schon 2 s vor der Belichtung der Zelle aufgezeichnet. Vor allem bei schwachen Lichtintensitäten machten die Dunkelbumps bis zu 50 % der aufgezeichneten Ereignisse aus.

Die überlagerungsfreien Spuren der zweiten Gruppe boten die Möglichkeit, die Bump-Typen zu trennen und Aussagen über die Kinetik und die Größe der Bumps machen zu können. Insbesondere konnten die mittleren Flächen f (Strom-Zeit Integrale) von einzelnen c_1 - bzw. c_2 -Bumps bestimmt werden ($f(c_1)$ und $f(c_2)$). Die auf diesen Spuren ebenfalls vorhandenen Dunkelbumps wurden berücksichtigt.

Die Spuren der dritten Gruppe bargen Unsicherheiten in der Interpretation. Einzig deren Strom-Zeit Integral blieb von den Überlagerungen unverfälscht. Deshalb wurde die Summe der Strom-Zeit Integrale aller dieser Spuren ($F^i(c_1, c_2, dc_1, dc_2)$) zur weiteren Analyse herangezogen.

Die zugrundeliegende Korrekturmethode läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. bestimme aus Gruppe I die Wahrscheinlichkeit Dunkelbumps zu finden $p(dc_1)$ und $p(dc_2)$
2. bestimme aus Gruppe II die Wahrscheinlichkeit c_1 - Bumps (lichtinduzierte und „dunkle“) zu finden $p^c(c_1, dc_1)$
3. bestimme die Wahrscheinlichkeit lichtinduzierte c_1 - Bumps $p_{corr}(c_1)$ zu finden aus:

$$p_{corr}(c_1) = p^c(c_1, dc_1) - p(dc_1),$$

Gleichung A.1

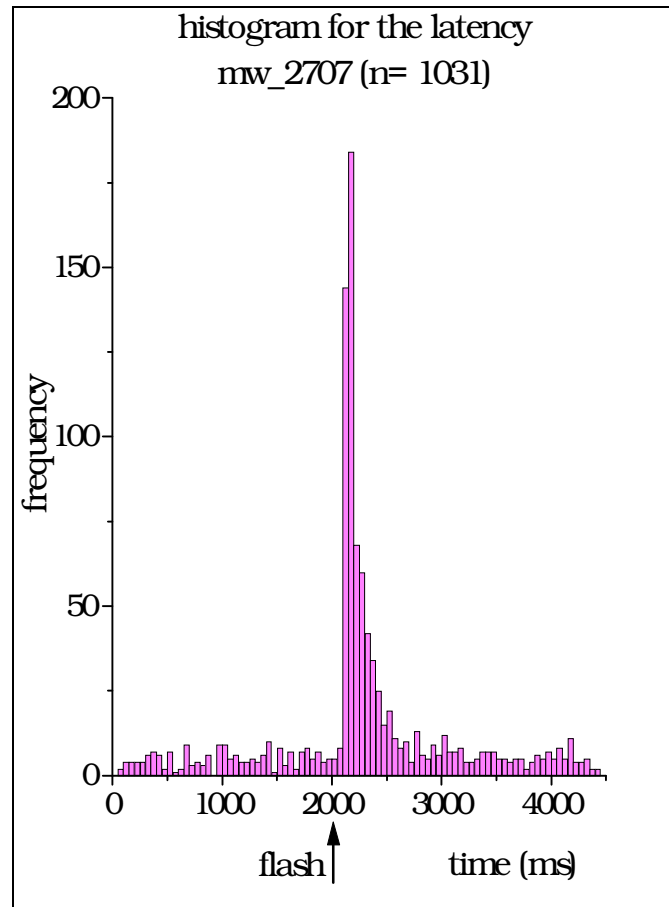


Figure A.1: Histogram for the latency of bumps. The flash was applied at $t=2000$ ms.

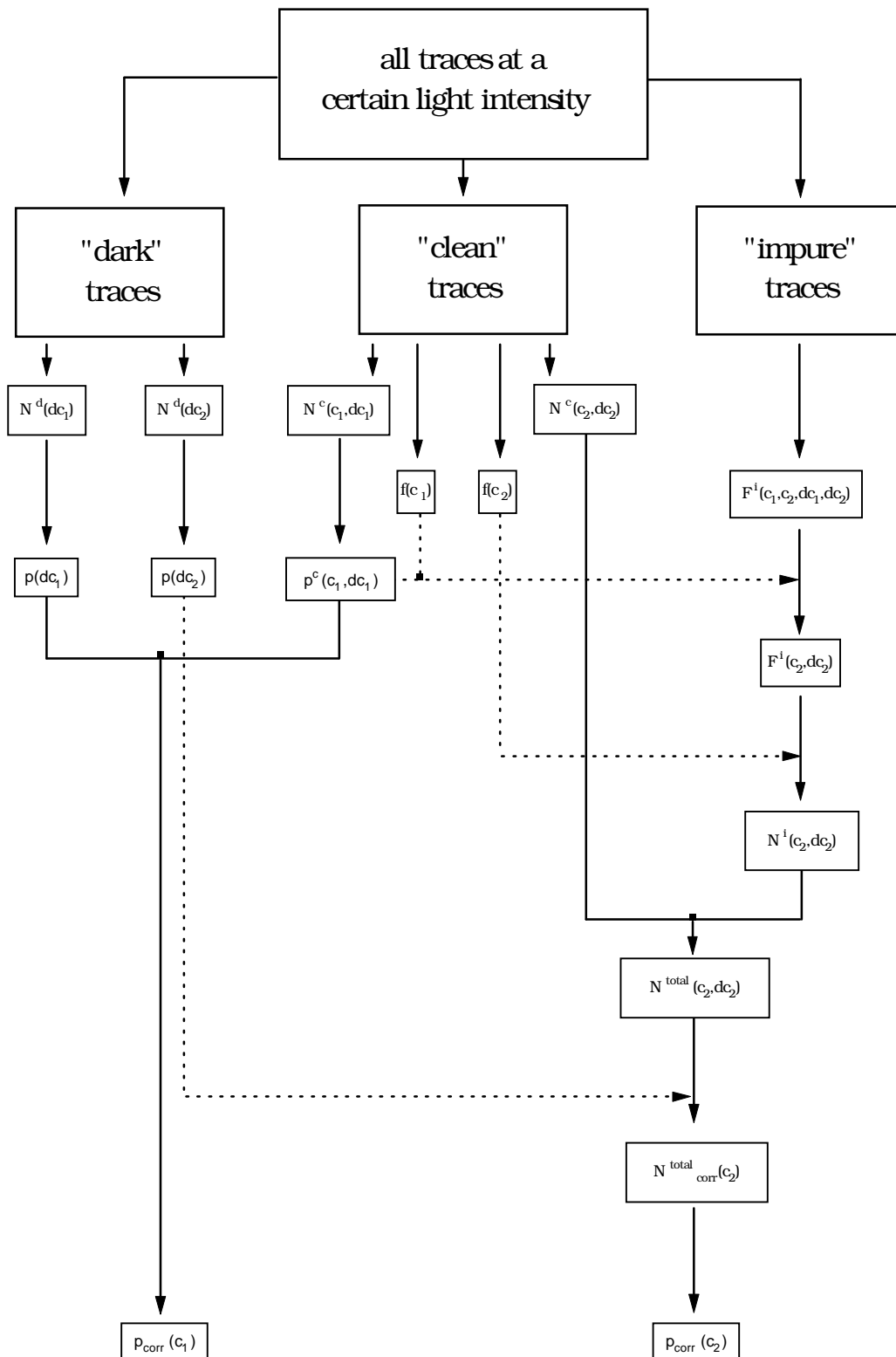


Figure A.2: Scheme of the correction-method applied to data containing overlappings (for explanations refer to the text).

4. bestimme aus Gruppe II die mittlere Fläche der c_1 - und c_2 -Bumps $f(c_1)$ und $f(c_2)$
5. bestimme die Zahl $N^c(c_2, dc_2)$ der in Gruppe II enthaltenen c_2 -Bumps (lichtinduzierte und „dunkle“)
6. bestimme in Gruppe III die Gesamtfläche aller Antworten $F^i(c_1, c_2, dc_1, dc_2)$
7. subtrahiere den wahrscheinlichen Flächenanteil der c_1 -Bumps an $F^i(c_1, c_2, dc_1, dc_2)$ und erhalte den wahrscheinlichen Flächenanteil der c_2 -Bumps $F^i(c_2, dc_2)$ nach:

$$F^i(c_2, dc_2) = F^i(c_1, c_2, dc_1, dc_2) - p^c(c_1, dc_1) \cdot F(c_1) \cdot n^i, \quad \text{Gleichung A.2}$$

8. dividiere $F^i(c_2, dc_2)$ durch die mittlere c_2 -Bump-Fläche $f(c_2)$ und erhalte die Zahl $N^i(c_2, dc_2)$ der in Gruppe III enthaltenen c_2 -Bumps (lichtinduzierte und „dunkle“)
9. addiere hierzu die Zahl der c_2 -Bumps aus Gruppe II $N^c(c_2, dc_2)$ und erhalte die Zahl der c_2 -Bumps insgesamt $N^{total}_{corr}(c_2, dc_2)$
10. subtrahiere die Zahl der insgesamt zu erwartenden „dunklen“ c_2 -Bumps und erhalte die Zahl der lichtinduzierten c_2 -Bumps $N^{total}_{corr}(c_2)$ nach

$$N^{total}_{corr}(c_2) = N^{total}_{corr}(c_2, dc_2) - p(dc_2) \cdot n^{total}, \quad \text{Gleichung A.3}$$

11. bestimme die Wahrscheinlichkeit, lichtinduzierte c_2 - Bumps zu finden $p_{corr}(c_2)$

Wesentlich ist an diesem Verfahren die Annahme, daß sich auf den überlagerten Spuren im Mittel nicht mehr c_1 -Bumps befinden als auf den „sauberen“ Spuren (Rezept Nr. 2, 7). Wahrscheinlich finden sich auf den überlagerten Spuren aber mehr c_1 -Bumps, da die Überlagerungen auch von diesen gebildet werden.

9. LITERATUR

- Adolph A.R. (1964) *J. Gen. Physiol.* **48**, 297-322
Spontaneous slow potential fluctuations in the *Limulus* photoreceptor
- Bacigalupo J., Johnson E.C., Vergara C., Lisman J.E. (1991)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 7938-7942
Light-dependent channels in excised patches of *Limulus* ventral photoreceptors are opened by cGMP
- Behbehani M., Srebro R. (1974) *J. Gen. Physiol.* **64**, 186-200
Discrete waves and phototransduction in voltage-clamped ventral photoreceptors
- Bendat J.S., Piersol A.G. (1986) Wiley-Interscience
Random data/ Analysis and measurement procedures
- Berridge M.J. , Irvine R.F. (1984) *Nature* **312**, 315-321
Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction
- Berridge M.J. (1993) *Nature* **361**, 315-325
Inositol trisphosphate and calcium signalling
- Borsellino A., Fuortes M. (1968) *J. Physiol.* **196**, 507-539
Responses to single photons in visual cells of *Limulus*
- Brown J.E., Lisman J.E. (1972) *J. Gen. Physiol.* **59**, 720-733
An electrogenic pump in *Limulus* ventral photoreceptor cells
- Brown J.E., Mote M.I. (1974) *J. Gen. Physiol.* **63**, 337-350
Ionic dependence of reversal voltage of the light response in *Limulus* ventral photoreceptors
- Brown J.E., Blinks J.R. (1974) *J. Gen. Physiol.* **64**, 643-665
Changes in intracellular free calcium concentration during illumination of invertebrate photoreceptors.
Detection with aequorin
- Brown J.E., Coles J.A. (1979) *J. Physiol.* **296**, 373-392
Saturation of the response to light in *Limulus* ventral photoreceptor

- Calhoon R., Tsuda M., Ebrey T.G. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **94**, 1452-1457
A light-activated GTPase from octopus photoreceptors
- Calman B.G., Chamberlain S.C. (1982) *J.Gen.Physiol.* **80**, 839-862
Distinct lobes of *Limulus* ventral photoreceptors.
II. Structure and Ultrastructure
- Contzen K. (1995) Dissertation, RWTH Aachen
Die Inositolphosphat-Enzymkaskade im Ventralnerv-
Photorezeptor von *Limulus polyphemus*
- Contzen K., Nagy K. (1995) *NeuroReport* **6**, 1905-1908
Current components stimulated by different G-Proteins in
Limulus ventral photoreceptor
- Contzen K., Richter K.H., Nagy K. (1995) *J. Comp. Physiol. A* **177**, 601-610
Selective inhibition of the phospholipase C pathway blocks
one light-activated current component in *Limulus*
photoreceptor
- Contzen K., Nagy K. (to be published in 1996)
A mathematical model for the components of the receptor
currents in *Limulus* ventral nerve photoreceptors
- Corson D.W., Fein A. (1983) *J. Gen. Physiol.* **82**, 639-657
Chemical excitation of *Limulus* photoreceptors
- Deckert A., Stieve H. (1991) *J. Gen. Physiol.* **433**, 467-482
Electrogenic Na⁺-Ca⁺ exchanger, the link between intra- and
extracellular calcium in the *Limulus* ventral photoreceptors
- Deckert A., Nagy K., Helrich C.S., Stieve H. (1992) *J. Gen. Physiol.* **453**, 66-96
Three components in the light-induced current of the *Limulus*
ventral photoreceptor
- Devary O., Heichal O., Blumenfeld, A., Cassel D., Suss E., Barash S., Rubinstein C.T., Minke
B., Selinger Z. (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* **84**, 3939-3943
Coupling of photoexcited rhodopsin to inositol phospholipid
hydrolysis in fly photoreceptors
- Fein A. (1986) *Science* **232**, 1543-1545
Blockade of visual excitation and adaptation in *Limulus*
photoreceptor by GDP-β-S
- Fuortes M.G.F., Yeandle S. (1964) *J. Gen. Physiol.* **47**, 443-463
Probability of occurrence of discrete potential waves in the eye
of *Limulus*

- Grus, F.-H. (1990) Dissertation, RWTH-Aachen
 Elektrophysiologische *in vivo* und *in vitro* Versuche zur Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung von Rhodopsin im Medianauge von *Limulus polyphemus*
- Grzywacz N. M., Hillman P., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 232-235
 Statistical test of linearity of photoreceptor transduction process: *limulus* passes, others fail
- Grzywacz N.M., Hillman P., Knight B.W. (1988) J. Gen. Physiol. **91**, 659-684
 The quantal source of area supralinearity of flash responses in *Limulus* photoreceptors
- Hagins et al. (1962) Nature **194**, 844-847
 Local membrane current in the outer segments of squid photoreceptors
- Hartline H.K. (1934) J. Cell. Comp. Physiol. **5**, 229-247
 Electrical responses from single optic nerve fibers, *Limulus*
- Hodgkin and Huxley (1952) J. Physiol. **117**, 500-544
 A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve
- Johnson E.C., Robinson P.R., Lisman J.E. (1986) Nature **324**, 468-470
 Cyclic GMP is involved in the excitation of invertebrate photoreceptors
- Kaupp U.B. (1986) Verh. Dtsch. Zool. Ges. **79**, 51-68
 II. Rezeptorphysiologie und Orientierung/ Mechanismus der Photorezeption im Wirbeltierauge
- Kirkwood A., Weiner D., Lisman J.E. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 3872-3876
 An estimate of the number of G regulatory proteins activated per excited rhodopsin in living *Limulus* ventral photoreceptors
- Keiper (1983) Dissertation, RWTH-Aachen
 Zur Theorie der Photorezeption/ Analyse experimenteller Daten und stochastischer Modelle am Beispiel des ventralen Photorezeptors von *Limulus polyphemus*
- Keiper W., Schnakenberg J., Stieve H. (1984) Z. Naturforsch. **39c**, 781-790
 Statistical analysis of quantum bump parameters in *Limulus* ventral photoreceptors

- Lamb T.D. (1986) TINS 224-228
 Transduction in vertebrate photoreceptors: the roles of cyclic GMP and calcium
- Lederhofer R. (1989) Dissertation RWTH-Aachen
 Stochastische Beschreibung der elementaren Photorezeptorantworten: Analyse von Latenz und Überlagerung am Beispiel der ventralen Photorezeptorzelle von *Limulus polyphemus*
- Lederhofer R., Schnakenberg J. (1991) Z. Naturforsch. **46c**, 291-304
 Stochastic treatment of bump latency and temporal overlapping in *Limulus* ventral photoreceptors
- Levy S., Fein A. (1985) J. Gen. Physiol. **85**, 805-841
 Relationship between light sensitivity and intracellular free Ca concentration in *Limulus* ventral Photoreceptors. A quantitative study using Ca-selective microelectrodes
- Lexikon der Biologie (1983) Verlag Herder Freiburg i. Br.
- Lisman J.E. (1985) J. Gen. Physiol. **85**, 171-187
 The role of metarhodopsin in the generation of spontaneous quantum bumps in ultraviolet receptors of *Limulus* median eye
- Lisman J.E., Brown J.E. (1975a) J. Gen. Physiol. **66**, 473-488
 Light-induced changes of sensitivity in *Limulus* ventral photoreceptors
- Lisman J.E., Sheline Y. (1976) J. Gen. Physiol. **68**, 487-501
 Analysis of the Rhodopsin cycle in *Limulus* ventral photoreceptors using the early receptor potential
- Lisman J.E., Bering H. (1977) J. Gen. Physiol. **70**, 621-633
 Electrophysiological measurements of the number of rhodopsin molecules in single *Limulus* photoreceptors
- Lisman J.E., Goldring M. (1985) Neuroscience Research, Suppl.2 S101-117
 Early events in visual transduction in *Limulus* photoreceptors
- Maaz G., Stieve H. (1980) Biophys. Struct. Mech. **6**, 191-208
 The correlation of the receptor potential with the light-induced transient increase in intracellular calcium-concentration measured by absorption change of arsenazo III injected into *Limulus* ventral nerve photoreceptor cell
- Millecchia R., Bradbury R., Mauro A. (1966) Science **154**, 1199-1201
 Simple photoreceptors in *Limulus polyphemus*

- Millecchia R., Mauro A. (1969a) *J. Gen. Physiol.* **54**, 310-330
 The ventral photoreceptor of *Limulus*. II. The basic photoresponse
- Murray (1966) *Science* **154**, 1182-1183
 Intracellular absorption difference spectrum of *Limulus* extra-ocular photolabile pigment
- Nagy K. (1990) *Eur. Biophys. J.* **19**, 47-54
 Kinetic properties of single-ion channels activated by light in *Limulus* ventral nerve photoreceptors
- Nagy K. (1991) *Rev. Biophysics* **24**, 2 pp.165-226
 Biophysical processes in invertebrate photoreceptors: recent progress and a critical overview on *Limulus* photoreceptors
- Nagy K. (1992) *Neuroscience Letters* **144**, 99-102
 Non-independent quantum bumps in *Limulus* ventral nerve photoreceptors - a new insight in the light transduction mechanism
- Nagy K. (1993) *Neuroscience Letters* **152**, 1-4
 Cyclic nucleotides and inositol trisphosphate activate different components of the receptor current in *Limulus* ventral nerve photoreceptors
- Nagy K. (1994) *NeuroReport* **5**, 847-849
 Inhibition of the first component of the receptor current in *Limulus* photoreceptors
- Nagy K., Stieve H. (1983) *Biophys. Struct. Mech.* **9**, 207-223
 Changes in intracellular calcium ion concentration, in the course of dark adaptation measured by arsenazo III in *Limulus* photoreceptor
- Nagy K., Stieve H. (1990) *Eur. Biophys. J.* **18**, 221-224
 Light-activated single channel currents in *Limulus* ventral nerve photoreceptors
- Nagy K., Contzen K., Stieve H. (1993) *Eur. Biophys. J.* **22**, 341-350
 Two components of the receptor current are developed from distinct elementary signals in *Limulus* ventral nerve photoreceptor
- O`Day P.M., Gray-Keller M.P. (1989) *J. Gen. Physiol.* **93**, 473-492
 Evidence for electrogenic $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in *Limulus* ventral photoreceptors

- Payne R., Corson D., Fein A., Berridge M.J. (1986) *J. Gen. Physiol.* **88**, 127-142
Excitation and adaptation of *Limulus* ventral photoreceptors by Inositol 1,4,5 trisphosphate result from a rise in intracellular calcium
- Payne R., Walz B., Levy S., Fein A. (1988) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **320**, 359-379
The localisation of calcium release by inositol trisphosphate in *Limulus* photoreceptors and its control by negative feedback
- Poganiatz I. (1996) Diplomarbeit, RWTH Aachen
Einfluß pharmakologisch wirksamer Substanzen auf die durch einzelne Photonen ausgelösten Membranströme in Ventralnerv-Photorezeptoren von *Limulus polyphemus*
- Press W.H., Flannery B.P., Tenkolsky S., Vetterling W. (1990) Cambridge University Press
Numerical Recipes in C / The art of scientific computing
- Reuß H. (1991) Dissertation RWTH-Aachen
Bumps, die elementaren Reizantworten der Photorezeptorzelle des *Limulus polyphemus*
- Reuß H., Rack M., Stieve H. (1992) *Z. Naturforsch.* **47c**, 95-99
Spontaneous bumps of the *Limulus* photoreceptor cell are probably triggered by the spontaneous activation of single G-Protein molecules
- Reuß H., Stieve H. (1993) *J. Comp. Physiol. A* **173**, 377-383
Bump amplitude, but not latency and time-course, can depend on position of illumination in *Limulus* photoreceptor cells
- Reuß H., Stieve H. (1993) *Z. Naturforsch.* **48c**, 92-95
Two different bump types of the ventral photoreceptor of *Limulus*
- Shin J., Richard E.A., Lisman J.E. (1993) *Neuron* **11**, 845-855
Ca²⁺ is an obligatory intermediate in the excitation cascade of *Limulus* photoreceptors
- Silbernagel S., Despopoulos A. (1991) Georg Thieme Verlag, 4. Auflage
„Taschenbuch der Physiologie“,
- Smith T.G., Stell W.K., Brown J.E., Freeman J.A., Murray G. (1968) *Science* **162**, 456-458
A role for the sodium pump in photoreception in *Limulus*
- Stieve H. (1985) Dahlem Konferenzen, Mol. Mech. Photorecep. (ed. H. Stieve), 199-230
Bumps, the elementary excitatory responses of invertebrates

- Stieve H., Pflaum, M. (1978) *Vision Res.* **18**, 747-749
 The response height versus stimulus intensity curve of the ventral nerve photoreceptor of *Limulus* depending on adaptation and external calcium concentration
- Stieve H., Bruns M., Gaube H. (1983a) *Z. Naturforsch.* **38c**, 471-483
 The influence of the extracellular concentration of calcium, magnesium and sodium on the repolarizing phase of the receptor potential of the *Limulus* ventral nerve photoreceptor
- Stieve H., Bruns M., Gaube H. (1983b) *Z. Naturforsch.* **38c**, 1043-1054
 The intensity dependence of the receptor potential of the *Limulus* ventral nerve photoreceptor in two defined states of light- and dark adaptation
- Stieve H., Bruns M., Gaube H. (1984) *Z. Naturforsch.* **39c**, 662-679
 The sensitivity shift due to light adaptation depending on the extracellular calcium ion concentration in *Limulus* ventral nerve photoreceptor
- Stieve H., Gaube H., Klomfaß J. (1986) *Z. Naturforsch.* **41c**, 1092-1110
 Effect of external calcium concentration on the intensity dependence of light-induced membrane current and voltage signals in two defined states of adaptation in the photoreceptor of *Limulus*
- Stieve H., Schlösser B. (1989) *Z. Naturforsch.* **44c**, 999-1014
 The light energy dependence of the *Limulus* photoreceptor current in two defined states of adaptation
- Stieve H., Reuß H., Hennig T., Klomfaß J. (1991) *Z. Naturforsch.* **46c**, 461-486
 Single photon-evoked events of the ventral nerve photoreceptor cell of *Limulus*. - Facilitation, adaptation and Dependence of lowered external calcium
- Stieve H., Niemeyer B., Aktories K., Hamm H.E. (1992) *Z. Naturforsch.* **47c**, 915-921
 Disturbing GTP-binding protein function through microinjection into the visuell cell of *Limulus*
- Stieve H., Stommel G. (1992) *Proc. 20th Gött. Neurobiol. Conf.*; Ed. Elsner N., Richter D.
 Cooperativity in signal transduction leading to intracellular Ca^{2+} release in *Limulus* ventral nerve photoreceptor
- Stommel G. (1995) Dissertation, RWTH-Aachen
 Die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration beim Ventralnerv Photorezeptor von *Limulus polyphemus*

- Tsuda M. (1987) Photochem. Photobiol. **45**, 915-931
Photoreception and phototransduction in invertebrate photoreceptors
- Ukhanov K., Payne R. (1995) Cell Calcium **18**, 301-313
Light activated calcium release in *Limulus* ventral photoreceptors as revealed by laser confocal microscopy
- Vandenberg C.A., Montal M. (1984) Biochem. **23**, 2339-2347
Light-regulated biochemical events in invertebrate photoreceptors. 1. Light-activated guanosinetriphosphatase, guanine nucleotide binding and cholera toxin catalyzed labeling of squid photoreceptor membranes
- Vandenberg C.A., Montal M. (1984) Biochem. **23**, 2347-2352
Light-regulated biochemical events in invertebrate photoreceptors. 2. Light-regulated phosphorylation of rhodopsin and phosphoinositides in squid photoreceptor membranes
- Wald G. (1968) Nature **219**, 800-807
The molecular basis of visual excitation
- Yeandle S. (1958) Am. J. Ophthalmol. **46**, 81-87
Electrophysiology of the visual system-discussion
- Yeandle S., Spiegler J. B. (1973) J. Gen. Physiol. **61**, 552-571
Light-evoked and spontaneous discrete waves in the ventral nerve photoreceptor of *Limulus*
- Yeandle S. (1985) Federation Proc. **44**, 2947-2949
Statistics and quantum bumps in arthropod photoreceptors

Danke

Herzlich möchte ich Herrn Prof. H. Stieve
für die Möglichkeit danken, diese Diplomarbeit an seinem Institut anfertigen zu können.
Herrn Prof. J. Schnakenberg danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Károly Nagy, der den wesentlichen Teil der Betreuung
dieser Diplomarbeit übernommen hat und mir bei vielen Fragen mit
Interesse und seiner großen Erfahrung zur Seite stand.

Iris, Klaus und Karl-Heinz danke ich für
ihre ermutigende Anteilnahme
bei „bumpy“ Messungen.

Marlies hatte
immer ein offenes Ohr
für meine Messungen- außer
während der Kaffeerunde.- Herzlichen Dank!

Marianne, Hendrik, Dieter, Tom und Herrn Naynert
danke ich für ihre tierpflegerische bzw. technische Unterstützung.

Allen Institutsangehörigen danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Alex hat mit seinem sowjetischen Photoapparat zwei schöne Bilder von
Limulus polyphemus geschossen.

Maria-Christine.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für die Ermöglichung meines Studiums.