

# Mechanismen der Elektropermeabilisierung und Elektrofusion eukaryotischer Zellen und Protoplasten

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Jörg-Michael Endter**

aus Fulda

Würzburg 2008

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter : .....

Gutachter: .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen oder diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Würzburg, den

Jörg-Michael Endter

# Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Ulrich Zimmermann für die wissenschaftliche Leitung meiner Dissertation, seine hilfsbereiten Ratschläge, seine ständige Gesprächsbereitschaft sowie zahlreiche anregende Diskussionen.

Prof. Dr. Thomas Roitsch für seine wissenschaftliche Unterstützung, seine engagierte Zusammenarbeit und seine Bereitschaft, meine vorliegende Arbeit zu begutachten.

Prof. Dr. Rainer Hedrich für seine fachliche Unterstützung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Roland Benz für seine Hilfsbereitschaft und seine anregenden Diskussionen.

Dr. Vladimir Sukhorukov für seine intensive Betreuung und seine stete Unterstützung, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Petra Geßner und Andrea Biegner für ihre sachkundige Hilfe bei der Zellkultur, die zuverlässige Versorgung mit Zelllinien und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Willi Bauer, Marcus Behringer, Albert Gessner und Oliver Reichert für ihre professionelle und stets zuverlässige Unterstützung in technischen Belangen.

Dr. Martin Kiesel, Dr. Kilian Müller und Dr. Randolph Reuss für ihre langjährige Freundschaft, sowie ihre Hilfe und Unterstützung im Fachlichen wie im Privaten.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biotechnologie für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsumfeld.

Meiner Familie und meinen Freunden für ihre Hilfe und so manches aufbauende Wort.

Vielen Dank.

# Inhaltsverzeichnis

<i>Verzeichnis der Abkürzungen</i>	<i>1</i>
<b>Kapitel 1</b>	
<i>Einleitung</i>	<i>2</i>
<b>Kapitel 2</b>	
<i>Theoretischer Hintergrund</i>	<i>6</i>
2.1 Das Einschalenmodell	7
2.2 Aufladung und Durchbruch einer Membran nach einem Gleichstrompuls	11
2.3 Das Dreischalenmodell	12
2.4 Vergleich zwischen dem Ein- und dem Dreischalenmodell	13
<b>Kapitel 3</b>	
<i>Material und Methoden</i>	<i>19</i>
3.1 Zellkultur	19
3.1.1 <i>Nicotiana tabacum</i> Bright Yellow 2 (BY-2) Zellen	19
3.1.2 <i>Pichia pastoris</i>	21
3.2 Protoplasten-Isolation	22
3.2.1 Vakuolisierte und evakuolisierte BY-2 Protoplasten	22
3.2.2 <i>Pichia pastoris</i>	23
3.3 Elektrorotation	23
3.3.1 Kompensationsmethode	24
3.3.2 Frequenzspektren	24
3.4 Elektrische Feldpulse und Chemilumineszenzmessung	26
3.5 Elektrofusion	27
3.6 Flammenphotometrie	28

**Kapitel 4**

<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	29
4. Elektrofusion von <i>Pichia pastoris</i> Protoplasten zur Herstellung von Riesenzellen	29
4.1 Elektrorotation von <i>Pichia pastoris</i> Protoplasten	29
4.2 Bestimmung der elektrischen Eigenschaften von <i>Pichia pastoris</i> Protoplasten mit dem Einschalenmodell	32
4.3 Analyse des dielektrophoretischen Sammelfeldes	34
4.4 Einfluss des Sammelfeldes auf die Elektrofusion	36
4.5 Protoplastenpräparation und Medienzusammensetzung	38
4.6 Einfluss der Protoplastendichte	39
4.6 Analyse des elektrischen Durchbruchs	40

**Kapitel 5**

<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	44
5. Mechanismus elektrisch induzierter $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse in BY-2 Tabakzellen	44
5.1 Elektrorotation von vakuolisierten BY-2 Protoplasten	44
5.2 Elektrorotation von evakuolisierten BY-2 Protoplasten	48
5.3 Analyse der Elektrorotationsspektren auf der Basis des Ein- und des Dreischalenmodells	50
5.4 Induzierte Transmembranpotentiale in der Zeitdomäne	52
5.5 Applikation einzelner Feldpulse in Gegenwart von extrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$	54
5.7 Einfluss der externen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse	59
5.8 Effekte der externen Leitfähigkeit auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse	63
5.9 Reversibler Durchbruch des Plasmalemmas und des Tonoplasten	65
5.10 Anteil des vakuolären und externen $\text{Ca}^{2+}$ an den Chemilumineszenz-Kinetiken	67
5.11 Manipulation des cytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ mit subkritischen Pulssequenzen	69

**Kapitel 6**

<i>Zusammenfassung</i>	72
<i>Summary</i>	73

**Kapitel 7**

<i>Literaturverzeichnis</i>	75
-----------------------------	----

**Kapitel 8**

<i>8.1 Lebenslauf</i>	81
<i>8.2 Eigene Publikationen</i>	82
<i>8.3 Copyright Permission</i>	83

## *Verzeichnis der Abkürzungen:*

$A$	Amplitude
$C_m$	flächenspezifische Membrankapazität
$C_p$	flächenspezifische Plasmalemmkapazität
$C_t$	flächenspezifische Tonoplastenkapazität
$\chi$	Polarisierbarkeit der Zelle
$d$	Dicke der Zellmembran
$E_0$	elektrische Feldstärke
$\epsilon_{\text{cyt}}$	Permittivität des Cytosols
$\epsilon_e$	Permittivität des externen Mediums
$\epsilon_{\text{vac}}$	Permittivität der Vakuole
$\eta$	dynamische Viskosität
$F_{\text{DEP}}$	dielektrophoretische Kraft
$f$	Feldfrequenz
$f_{c1}$	charakteristische Frequenz des Antifield-peaks
$f_{c2}$	charakteristische Frequenz des Cofield-peaks
$G_m$	flächenspezifische Membranleitfähigkeit
$G_p$	flächenspezifische Plasmalemmleitfähigkeit
$G_t$	flächenspezifische Tonoplastenleitfähigkeit
$\mu$	induzierter Dipol in einer Zelle
$\Omega$	Drehgeschwindigkeit einer Zelle
$R_1$	Radius der Zelle
$R_2$	Radius der Vakuole
$\sigma_{\text{cyt}}$	spezifische Leitfähigkeit des Cytosols
$\sigma_e$	spezifische Leitfähigkeit des externen Mediums
$\sigma_m$	spezifische Membranleitfähigkeit
$\sigma_{\text{vac}}$	spezifische Leitfähigkeit des Vakuolensaftes
$\mathcal{G}$	polarer Winkel zum elektrischen Feld
$\tau_m$	Zeitkonstante der Membranaufladung
$U_m$	induzierte Transmembranspannung
$U_p$	induzierte Spannung über das Plasmalemma
$U_t$	induzierte Spannung über den Tonoplasten
$V$	Volumen der Zelle



# Kapitel 1

## Einleitung

Die Elektroporabilisierung und die Elektrofusion finden in vielen Bereichen der Biotechnologie und der Biomedizin Anwendung als etablierte Methoden zur systematischen Manipulation des Cytosols und des Genoms bei eukaryotischen Zellen [Zimmermann und Neil, 1996; Lynch und Davey, 1996, Collonier et al., 2003; Weaver, 2003; Trevor et al., 2004; Sukhorukov et al., 2006. Sasamoto et al., 2006; Valat et al., 2006]. Beiden Methoden liegt der Einsatz kurzer Gleichspannungspulse mit hoher Intensität zugrunde, durch die eine Spannung über die Zellmembranen erzeugt wird. Erreicht die induzierte Spannung einen Wert von ungefähr 1 V bei Raumtemperatur, entstehen Störungen in der Struktur der Zellmembran, die in der Literatur als elektrischer Durchbruch bezeichnet werden [Zimmermann et al. 1976]. Wird das Feld im Mikrosekundenbereich appliziert, so ist der elektrische Durchbruch reversibel und die Membranstörungen heilen wieder aus. Innerhalb dieser Ausheilphase, auch Resealing genannt, können verschiedene Substanzen (Ionen, Zucker, Proteine, Nukleinsäuren, etc.) die permeabilisierte Membran überwinden und in das Zellinnere eingebracht (Elektroinjektion) oder heraus gelassen werden (Electromilking).

Bei der Elektrofusion werden die Zellen vor dem Gleichspannungspuls in einem elektrischen Wechselfeld dielektrophoretisch gesammelt. Die Zellen reihen sich dabei zwischen den Elektroden in Form von „Perlenketten“ auf. Dadurch wird erreicht, dass zwischen benachbarten Zellen innerhalb einer Kette ein sehr enger Membrankontakt entsteht. Werden diese Kontaktbereiche elektrisch durchbrochen, können die Membranen zweier Zellen miteinander verschmelzen und ein Fusionsprodukt bilden.

Eine Verschmelzung von mehreren Zellen zu so genannten Riesenzellen wird durch eine sehr hohe Zelldichte und Feldpulse von sehr hoher Intensität begünstigt. Dies lässt sich vor allem auf die Abhängigkeit der durchbrochenen Fläche von der Stärke des applizierten Feldes zurückführen. Feldpulse von höheren Intensitäten bewirken eine Vergrößerung der durchbrochenen Fläche der Zellmembran, so dass Zellen nicht nur innerhalb einer Kette sondern auch mit Zellen benachbarter Ketten fusionieren [Zimmermann und Neil, 1996].

Die Fusion von Hefen zu Riesenzellen bietet eine besondere Möglichkeit für die Untersuchungen von Membrankanälen und -transportern. Hefen besitzen ein sehr effektives Expressionssystem für komplexe heterologe Proteine. Vor allem *Pichia pastoris* zeichnet sich durch korrekte Faltung und posttranslationalen Modifikationen, wie beispielsweise Glykosylierung und Bearbeitung von Signalsequenzen, von Proteinen höherer Eukaryoten aus [Lee et al., 2005; Jahic et al., 2006].

Weiterhin haben Untersuchungen zur Elektrofusion gezeigt, dass die Produktausbeute und die Zellvitalität stark von der Zusammensetzung der Medien abhängig sind. Zweiwertige Kationen wie beispielsweise  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  üben hier einen gewichtigen Einfluss aus [Tsoneva et al., 1992; Schnettler und Zimmermann, 1993; Haritou et al., 2000]. Die Höhe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol und im extrazellulären Medium ist kritisch für die Funktionalität intrazellulärer Kompartimente und der Membranen. Für eine optimale Stabilisierung der Membranstrukturen sind relativ hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von ungefähr 1 mM im extrazellulären Medium notwendig [Glaser und Donath, 1989]. Im Cytosol dagegen erfordern verschiedene Moleküle und biochemische Prozesse sehr viel niedrigere Mengen an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in einem Bereich von unter  $10^{-7}$  M. ATP zum Beispiel komplexiert  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, wenn diese für längere Zeit in höheren Konzentrationen vorliegen, und wird infolgedessen unfunktional. Des Weiteren sind in der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Signalübertragung  $\text{Ca}^{2+}$ -bindene Makromoleküle wie Calmodulin beteiligt, die bei einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert werden und dadurch sekundäre Signalkaskaden auslösen oder unterbinden [Knight, 2000; Sanders, 2002].

Durch die Elektropermeabilisierung der Membranen wird ein Austausch zwischen dem externen Medium und dem Cytosol ermöglicht und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können in das Zellinnere gelangen. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,1 mM im extrazellulären Medium zeigte sich für die Zellvitalität als bester Kompromiss zwischen den stark unterschiedlichen Anforderungen für Cytosol und Membranen [Chand et al., 1991; Zimmermann und Neil, 1996].

Der extrazelluläre Raum ist aber nicht die einzige Quelle für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das Cytosol. Pflanzliche Zellen besitzen ein großes wässriges Kompartiment, die Vakuole, die unter anderem als Speicherort für eine Vielzahl von Substanzen dient und  $\text{Ca}^{2+}$  in Konzentrationen von bis zu 100mM enthalten kann [Malone et al., 1991; Johannes et al., 1992]. Die elektrischen Feldpulse, die zum elektrischen Durchbruch des

Plasmalemmas eingesetzt werden, können bei ausreichend hoher Feldstärke die Permeabilität der Membran der Vakuole, den so genannten Tonoplasten, erhöhen und somit  $\text{Ca}^{2+}$  in das Cytoplasma freisetzen.

Eine Optimierung der Elektropermeabilisierung und der Elektrofusion wurde meist durch Erarbeiten von Protokollen auf der Basis von „trial and error“ - Experimenten erreicht, bei denen systematisch eine Reihe von Parametern der Versuchsbedingungen verändert wurden. Der Nachteil dieser Herangehensweise besteht darin, dass sie meist sehr zeitaufwändig und kostenintensiv ist und den Einsatz großer Mengen an Zellmaterial erfordert.

Eine Aufklärung der Flüsse von Stoffen durch die Zellmembranen, welche durch Anwendung elektrischer Feldern induziert werden, ermöglicht eine bessere Kontrolle der ins Cytosol eingebrachten Substanzen. Dadurch können dramatische Anstiege von Stoffen, wie das oben genannte  $\text{Ca}^{2+}$ , die die Zellvitalität beeinträchtigen, im Cytosol vermieden werden, wodurch sich der Umfang der Versuchsreihen deutlich reduzieren lässt.

Der Anteil des extrazellulären und des vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$  am elektrisch induzierten, cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg, hängen von den Transmembranpotentialen ab, die über das Plasmalemma und den Tonoplasten generiert werden. Der Prozess der Membranaufladung wird durch die zellulären elektrischen Eigenschaften bestimmt, die maßgeblich durch den strukturellen Aufbau der Membranen sowie der extra- und intrazellulären Kompartimente geprägt werden.

In früheren Untersuchungen der elektrischen Eigenschaften von Pflanzenzellen wurde dieser strukturelle Aufbau meist nur vereinfacht berücksichtigt, indem die einzelnen seriell geschalteten Membranen (Plasmalemma und Tonoplast) zu einer einzigen Membranbarriere zusammengefasst wurden [Glaser et al., 1983; Kaler und Jones, 1990]. Dieses einfache Zellmodell, das so genannte Einschalenmodell, welches häufig bei Untersuchungen tierischer Zellen angewandt wird, beschreibt die Zelle als leitende Kugel (Cytoplasma) umgeben von einer isolierenden Membranschicht (Plasmalemma) [Sukhorukov et al., 1993, 2001; Kriegmaier et al., 2001].

Eine genauere Analyse der Aufladungsprozesse der einzelnen Membranen der pflanzlichen Zellen während der Elektropermeabilisierung erfordert eine detailliertere Betrachtung des Membransystems. Pflanzliche Zellen sind wesentlich komplexer aufgebaut als in dem oben beschriebenen Modell angenommen wird. Innerhalb des Cytoplasmas befindet sich eine große Vakuole bestehend aus dem Tonoplasten und den

darin abgegrenzten vakuolären Saft. Das Plasmalemma ist außen von der Zellwand umgeben. Jedes dieser Elemente unterscheidet sich im Hinblick auf seine elektrischen Eigenschaften wie beispielsweise die ionische Leitfähigkeit und die dielektrische Permittivität. Dieses Modell wird daher auch Dreischalenmodell genannt.

Die dielektrische Untersuchung der Zellen erfolgt anhand der Elektrorotation, durch die die elektrischen Zelleigenschaften mittels Wechselfelder erfasst werden. Diese Methode fand in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung für die elektrische Charakterisierung biologischer Zellen [Arnold und Zimmermann, 1982, 1988; Sukhorukov et al., 1998a, 2001, 2006]. Das Phänomen der Elektrorotation basiert auf der Wechselwirkung zwischen dem angelegten Feld mit dem induzierten Dipol in den Zellen. Aufgrund der verschiedenen Relaxationsprozesse variiert der Dipol der Zelle und damit das Drehmoment, das auf die Zelle ausgeübt wird, mit der Frequenz des elektrischen Feldes auf eine komplexe Weise. Mithilfe von Elektrorotationsspektren, in welchen die Rotationsgeschwindigkeit der Zellen in Abhängigkeit der Frequenz des anliegenden Wechselfeldes dargestellt wird, können die zellulären elektrischen Eigenschaften bestimmt werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Mechanismen der Fusion von *Pichia pastoris* Protoplasten zu analysieren, um so ein Protokoll für die Herstellung von *Pichia-p.*-Riesenzellen zu entwickeln. Mit Hilfe der Elektrorotation werden die elektrischen Eigenschaften der Protoplasten basierend auf dem Einschalenmodell ermittelt und zur Optimierung der eingesetzten elektrischen Felder herangezogen.

Ferner sollen die Mechanismen der elektrisch induzierten Veränderungen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wie sie beispielsweise bei Applikation von Gleichstrompulsen während der Elektrofusion auftreten können, im Hinblick auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse aus dem extrazellulären Raum und der Vakuole bei BY-2 Zellen aufgeklärt werden. Dabei wird anhand von Chemilumineszenzmessungen an Aequorin-transformierten BY-2 Zellen gezeigt, welchen Einfluss die Stärke des äußeren elektrischen Feldes und die Leitfähigkeit des extrazellulären Mediums auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse in das Cytosol ausüben. Zur Analyse dieser Flüsse werden mit Hilfe der Elektrorotation die elektrischen Parameter BY-2 Protoplasten bestimmt und die Potentiale, die durch das externe elektrische Feld über das Plasmalemma und den Tonoplasten generiert werden, sowohl in der Frequenz- wie auch in der Zeitdomäne, beschrieben.

## Kapitel 2

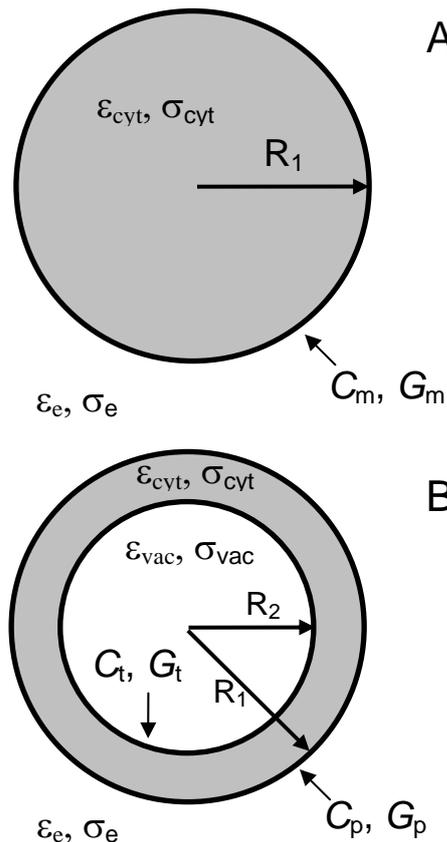
### Theoretischer Hintergrund

Setzt man eine Zelle einem Wechselstromfeld oder einem Gleichstrompuls aus, so wird in ihr ein Dipol erzeugt [Arnold und Zimmermann, 1988; Jones, 1995]. Der induzierte Dipol entsteht, indem sich freie Ladungen an den Grenzflächen der Zelle anlagern. Voraussetzung dafür ist, dass sich die Zelle hinsichtlich ihrer Permittivität und Leitfähigkeit von dem umgebenden Medium unterscheidet. Der induzierte Dipol  $\mu$  in einer sphärischen Zelle mit dem Radius  $R_1$  ist proportional zur angelegten Stärke des Feldes  $E_0$  und zur komplexen Polarisierbarkeit  $\chi^*$  der Zelle relativ zu dem umgebenden Medium [Zimmermann und Neil, 1996; Fuhr und Hagedorn, 1996]:

$$\mu^* = 4\pi\varepsilon_e R_1^3 \chi^* E_0, \quad (1)$$

wobei  $\varepsilon_e$  die Permittivität des externen Mediums ist. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem induzierten Dipol  $\mu$  und einem angelegtem Wechselfeld  $E_0$  führen zu einer Reihe von elektrokinetischen Kräften, Drücken und Drehmomenten. Die bekanntesten Phänomene sind die Elektrorotation, die Dielektrophorese und die Elektrodeformation [Fuhr und Kuzmin, 1986; Arnold und Zimmermann, 1988; Sukhorukov et al., 1998a; Pethig et al., 2002; Li et al., 2006].

Eine korrekte Beschreibung dieser Phänomene ist abhängig von der Struktur der betrachteten Zellen, das heißt, vom Aufbau der einzelnen Membranen und Kompartimente. Für die dielektrische Analyse der Protoplasten von *Pichia pastoris* und evakuolisierten Tabakzellen wurde daher das Einschalenmodell (Abb. 2.1 A) zu Grunde gelegt.



**A** **Abbildung 2.1:** A Einschalige Kugel als strukturelles Modell für evakuolierte Tabak- und *Pichia pastoris* Protoplasten.  $R_1$  bezeichnet den Zellradius.  $\varepsilon$  und  $\sigma$  sind die Permittivitäten und die Leitfähigkeiten des Cytosols (cyt) bzw. des extrazellulären Mediums (e).  $C_m$  und  $G_m$  sind die flächenspezifische Membrankapazität bzw. -leitfähigkeit.

**B** Dreischalenmodell der vakuolisierten Tabak-Protoplasten.  $R_1$  und  $R_2$  bezeichnen den Zell- bzw. den Vakuolenradius.  $\varepsilon$  und  $\sigma$  sind die Permittivitäten bzw. die Leitfähigkeiten.  $C_m$  und  $G_m$  sind die flächenspezifische Membrankapazität bzw. Leitfähigkeit. Die Indizes *e*, *cyt*, *p*, *t*, und *vac* verweisen auf das extrazelluläre Medium, das Cytosol, das Plasmalemma, den Tonoplasten bzw. den Vakuolensaft.

Die vakuolenhaltigen Protoplasten der Tabakzellen sind in ihrem Aufbau wesentlich komplexer und können mit dem einfachen Einschalenmodell nicht ausreichend genau beschrieben werden. Aus diesem Grund wurden diese Daten auf der Basis eines erweiterten Modells, dem Dreischalenmodell (Abb. 2.1 B), analysiert.

## 2.1 Das Einschalenmodell

Die Beschreibung der komplexen Polarisierbarkeit  $\chi^*$  und der induzierten Transmembranspannung  $U_m$  einer einschaligen Zelle wurde nach dem Ansatz von Jones [1995] abgeleitet. Hierbei wird die Zelle als homogene, leitende Kugel mit dem Radius  $R_1$  betrachtet, die von einer dünnen Membran mit einer sehr niedrigen Leitfähigkeit umgeben ist (Abb. 2.1 A). Es wird angenommen, dass die Zelle aus verlustfreien Dielektrika mit den Permittivitäten  $\varepsilon$  besteht. Die Zelle befindet sich in einem verlustfreien Medium mit der Permittivität  $\varepsilon_e$  und wird einem homogenen elektrischen Feld  $E_0$  ausgesetzt. Unter der Annahme, dass der Radius der Zelle um ein Vielfaches größer als die Dicke der

Zellmembran ( $R_1 \gg d$ ) ist, lassen sich die reelle Größen der Polarisierbarkeit  $\chi$  und der Transmembranspannung  $U_m$  folgendermaßen darstellen [Sukhorukov et al., 2007]:

$$\chi = \frac{R_1 C_m (\varepsilon_{cyt} - \varepsilon_e) - \varepsilon_e \varepsilon_{cyt}}{R_1 C_m (\varepsilon_{cyt} + 2\varepsilon_e) + 2\varepsilon_e \varepsilon_{cyt}} \quad (2)$$

$$U_m = \frac{3E_0 R_1^2 C_m \varepsilon_e (\varepsilon_e \varepsilon_{cyt} (2 + 3E_0) + R_1 C_m (\varepsilon_e (2 + 3E_0) + \varepsilon_{cyt}))}{(R_1 C_m (\varepsilon_{cyt} + 2\varepsilon_e) + 2\varepsilon_e \varepsilon_{cyt})^2} \cos \vartheta \quad (3)$$

wobei  $C_m$  die flächenspezifische Membrankapazität und  $\vartheta$  der polare Winkel gemessen im Verhältnis zum applizierten Feld  $E_0$  ist. Die Indizes der Permittivitäten  $\varepsilon$  beziehen sich auf das externe Medium (e) und das Cytosol (cyt).

In einem sinusförmigen oder rotierenden elektrischen Wechselfeld von hoher Frequenz (kHz-MHz) ist die Polarisierbarkeit einer Zelle eine komplexe Funktion der Frequenz.  $\chi = \chi^*(f)$  ist auch als Clausius-Mossotti-Funktion bekannt. Für die Analyse in der Frequenzdomäne kann eine Berechnung der komplexen Polarisierbarkeit  $\chi^*$  erreicht werden, indem die reellen Permittivitäten  $\varepsilon$  und die reelle flächenspezifische Membrankapazität  $C_m$  durch ihre komplexen Pendanten ersetzt wurden:  $\varepsilon^* = \varepsilon - j\sigma/\omega$  und  $C_m^* = C_m - j G_m/\omega$ .  $\sigma$  ist die reelle Leitfähigkeit,  $j = (-1)^{0,5}$  und  $\omega$  die Kreisfrequenz des Feldes mit  $\omega = 2\pi f$ . Die Verwendung der flächenspezifischen Membrankapazität  $C_m$  und der flächenspezifischen Membranleitfähigkeit  $G_m$  ist zulässig, da der Zellradius um ein Vielfaches größer als die Dicke der Membran ist.

Für die Elektrofusion ist es wichtig, Zellen vor dem Durchbruchpuls mit positiver Dielektrophorese zusammenzuziehen, damit sich stabile Zellketten mit einem sehr engen Kontakt zwischen den Nachbarzellen ausbilden. In einem inhomogenen Wechselfeld, so wie es in einer Fusionskammer erzeugt wird, werden die Zellen einer dielektrophoretischen Kraft ( $F_{DEP}$ ) ausgesetzt, die proportional zum Volumen der Zelle  $V (\propto R_1^3)$ , dem Feldgradienten  $\nabla E_0$  und dem reellen Teil der komplexen Polarisierbarkeit  $\chi^*$  ist:

$$F_{DEP} = 2\pi R_1^3 \varepsilon_e \nabla E_0^2 \operatorname{Re} \chi^* \quad (4)$$

Lagern sich Zellen in einem linearen Wechselfeld nicht in geradlinigen Perlenketten entlang der Feldlinien an, so kann es zur Multizell-Rotation kommen [Holzapfel et al., 1982]. In diesem Fall wirkt auf die Zellen ein lokales Nettofeld mit einer rotierenden Komponente, welches aus der Überlagerung des externen Feldes mit einem zweiten Feld, das durch de Dipol der benachbarten Zellen erzeugt wird, entsteht. Befinden sich zwei Zellen in nahem Kontakt, so beschreibt die folgende Gleichung die frequenzabhängige Geschwindigkeit der Multizell-Rotation [Mahaworasilpa et al., 1996]:

$$\Omega = \frac{3\varepsilon_e}{8\eta} E_0^2 \sin 2\vartheta \frac{\operatorname{Im}^2 \chi^*}{4 - \operatorname{Re} \chi^*}, \quad (5)$$

wobei  $\eta$  die dynamische Viskosität des extrazellulären Mediums und  $\vartheta$  der Winkel zwischen dem angelegten Feld und der Verbindungslinie zwischen den Mittelpunkten der betrachteten Zellen ist.

In einem Drehfeld wird durch die Phasenverschiebung zwischen dem anliegenden Feld  $E_0$  und dem induzierten Dipol  $\mu$  ein Drehmoment induziert, welches zur Rotation der Zelle führt. Während die Dielektrophorese auf dem reellen Teil der Clausius-Mosotti-Funktion beruhen, wird die frequenzabhängige Geschwindigkeit der Zellrotation  $\Omega(f)$  vollständig durch den Imaginärteil der komplexen Polarisierbarkeit  $\chi^*$  bestimmt:

$$\Omega(f) = -\frac{\varepsilon_e E_0^2}{2\eta} \operatorname{Im} \chi^* \quad (6)$$

Werden die Rotationsgeschwindigkeiten gegen die jeweils applizierten Frequenzen des Drehfeldes aufgetragen so erhält man ein Elektrorotationsspektrum. Bei biologischen Zellen weisen diese Spektren in der Regel mindestens einen Antifeld- und einen Cofeld-peak auf.



Die Elektrorotationsspektren einer einschaligen Zelle können mit zwei überlagerten Lorentz-Kurven beschrieben werden, deren Maxima durch die Maxwell-Wagner-Dispersionen an den äußeren und inneren Grenzflächen des Plasmalemmas hervorgerufen werden [Zimmermann und Neil, 1996]:

$$\Omega(f) = 2A_1 \frac{(f / f_{c1})}{1 + (f / f_{c1})^2} + 2A_2 \frac{(f / f_{c2})}{1 + (f / f_{c2})^2} \quad (7)$$

$A_1$  und  $A_2$  sind die Amplituden des Anti- bzw. des Cofeld-peaks im Frequenzbereich ihrer Maxima. Die Frequenzen dieser Maxima werden auch charakteristische Frequenzen des Antifeld- ( $f_{c1}$ ) und des Cofeld-peaks ( $f_{c2}$ ) genannt. Die beiden Elektrorotations-peaks liegen in der Regel weit auseinander, da die charakteristische Frequenz des Antifeld-peaks um mehrere Größenordnungen kleiner als die des Cofeld-peaks ist. Die Amplituden der Rotationsgeschwindigkeiten ( $A_1$  und  $A_2$ ) sowie ihre charakteristischen Frequenzen ( $f_{c1}$  und  $f_{c2}$ ) werden durch die angelegte Feldstärke, die Leitfähigkeiten, die Permittivitäten und weitere Faktoren des extrazellulären Mediums, des Plasmalemmas und des Cytosols bestimmt [Fuhr und Hagedorn, 1996]. Zur Berechnung der charakteristischen Frequenzen aus den gemessenen Elektrorotationsdaten wurde die Gleichung 7 verwendet, mit der die Daten in einem Mathematica Analyseprogramm angefitet wurden.

Unter der Voraussetzung, dass die Leitfähigkeit des Cytosols wesentlich größer als die des Mediums und diese wiederum wesentlich größer als die Leitfähigkeit der Zellmembran ist ( $\sigma_{\text{cyt}} \gg \sigma_e \gg \sigma_m$ ), lässt sich mit dem Einschalenmodell folgende Beziehung zwischen der charakteristischen Frequenz des Antifeld-peaks, der extrazellulären Leitfähigkeit, der flächenspezifischen Membrankapazität ( $C_m$ ) und -leitfähigkeit ( $G_m$ ) beschreiben:

$$f_{c1} \cdot R_1 = \frac{\sigma_e}{\pi \cdot C_m} + \frac{R_1 \cdot G_m}{2\pi \cdot C_m} \quad (8)$$

Die Gleichung 8 wurde für die Berechnung der  $C_m$ - und  $G_m$ -Werte mit Hilfe der  $f_{c1}$ -Daten aus der Kompensationsmethode eingesetzt.

## 2.2 Aufladung und Durchbruch einer Membran nach einem Gleichstrompuls

Die Mechanismen des reversiblen elektrischen Durchbruchs von Zellmembranen sind in der Literatur gut beschrieben [Lynch und Davey, 1996; Zimmermann und Neil, 1996; Weaver, 2003]. Wird ein elektrisches Gleichstromfeld der Stärke  $E_0$  auf eine sphärische Zelle appliziert, so steigt die Spannung über dem Plasmalemma  $U_m$  exponentiell mit der Zeit an:

$$U_m = 1,5R_1E_0 \cos \vartheta \left( 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right) \right) \quad (9)$$

wobei  $\tau_m$  die Zeitkonstante der Aufladung des Plasmalemmas ist. Die Zeitkonstante  $\tau_m$  kann mit Hilfe des Radius der Zelle, der flächenspezifischen Membrankapazität und den Leitfähigkeiten des Cytosols und des extrazellulären Raums wie folgt berechnet werden [Zimmermann und Neil, 1996]:

$$\tau_m = R_1 C_m \left( \frac{1}{\sigma_{cyt}} + \frac{1}{2\sigma_e} \right) \quad (10)$$

Entspricht die Dauer des angelegten Feldpulses dem fünf bis zehnfachen der Zeitkonstante  $\tau_m$  so erreicht die Aufladung des Plasmalemmas einen stationären Zustand. In diesem stationären Zustand lässt sich die Gleichung 9 wie folgt vereinfachen:

$$U_m = 1,5R_1E_0 \cos \vartheta \quad (11)$$

Ein Membrandurchbruch erfolgt, wenn die Spannung über dem Plasmalemma einen kritischen Wert von  $U_c$  erreicht. Die Experimente in dieser Arbeit wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, so dass für die kritische Spannung  $U_c$  ein Wert von 1 V angenommen werden kann.

### 2.3 Das Dreischalenmodell

Im Gegensatz zum Einschalenmodell, in welchem das Innere einer Zelle als homogene Phase betrachtet wird, ist das Dreischalenmodell bei der Betrachtung pflanzlicher Zellen wesentlich realistischer, da es im strukturellen Aufbau die Vakuole mit dem Radius  $R_2$  und den sie umgebenden Tonoplasten berücksichtigt (Abb. 2.1 B).

Die Beschreibungen für die Polarisierbarkeit der Zelle ( $\chi$ ) wie auch für den Spannungsabfall über das Plasmalemma ( $U_p$ ) und über den Tonoplasten ( $U_t$ ) können, wie bei Sukhorukov et al. [2007] gezeigt wurde, folgendermaßen abgeleitet werden:

$$\chi = \frac{C_p R_1 \left( \begin{aligned} &\varepsilon_{\text{cyt}} \left( 2 R_1^3 (\varepsilon_{\text{cyt}} - \varepsilon_e) - R_2^3 (2 \varepsilon_{\text{cyt}} + \varepsilon_e) \right) \varepsilon_{\text{vac}} + \\ &C_t R_2 \left( R_1^3 (\varepsilon_{\text{cyt}} - \varepsilon_e) (2 \varepsilon_{\text{cyt}} + \varepsilon_{\text{vac}}) - R_2^3 (2 \varepsilon_{\text{cyt}} + \varepsilon_e) (\varepsilon_{\text{cyt}} - \varepsilon_{\text{vac}}) \right) \end{aligned} \right) - \varepsilon_{\text{cyt}} \varepsilon_e \left( 2 (R_1^3 - R_2^3) \varepsilon_{\text{cyt}} \varepsilon_{\text{vac}} + C_t R_2 \left( R_1^3 (2 \varepsilon_{\text{cyt}} + \varepsilon_{\text{vac}}) + 2 R_2^3 (\varepsilon_{\text{vac}} - \varepsilon_{\text{cyt}}) \right) \right)}{N} \quad (12)$$

$$U_p = \frac{3 E_0 R_1 \varepsilon_{\text{cyt}} \varepsilon_e \left( 2 \varepsilon_{\text{cyt}} \varepsilon_{\text{vac}} (R_1^3 - R_2^3) + C_t R_2 \left( R_1^3 (2 \varepsilon_{\text{cyt}} + \varepsilon_{\text{vac}}) + 2 R_2^3 (\varepsilon_{\text{vac}} - \varepsilon_{\text{cyt}}) \right) \right)}{N} \cos \vartheta \quad (13)$$

$$U_t = \frac{9 E_0 C_p R_1^4 R_2 \varepsilon_{\text{cyt}} \varepsilon_e \varepsilon_{\text{vac}}}{N} \cos \vartheta \quad (14)$$

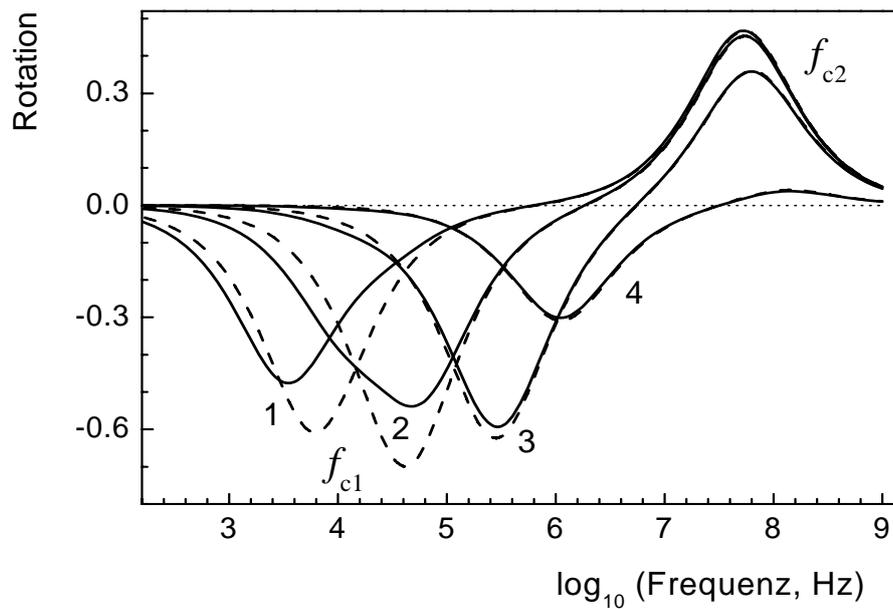
$R_1$  und  $R_2$  stehen für die Radien der Zelle bzw. der Vakuole.  $C_p$  und  $C_t$  sind die flächenspezifischen Kapazitäten des Plasmalemmas und des Tonoplasten. Die Indizes „e“, „cyt“, und „vac“ der Permittivitäten  $\varepsilon$  verweisen auf das extrazelluläre Medium, das Cytosol bzw. die Vakuole.  $U_p$  und  $U_t$  sind die Differenzen der elektrostatischen Potentiale an den inneren und äußeren Grenzflächen des Plasmalemmas bzw. des Tonoplasten. Der Nenner  $N$  der Gleichungen 12-14 lautet wie folgt:

$$N = \left( \begin{array}{l} 2\varepsilon_{\text{cyt}}\varepsilon_e \left( 2\varepsilon_{\text{cyt}}\varepsilon_{\text{vac}} \left( R_1^3 - R_2^3 \right) + C_t R_2 \left( R_1^3 \left( 2\varepsilon_{\text{cyt}} + \varepsilon_{\text{vac}} \right) + R_2^3 \left( \varepsilon_{\text{vac}} - \varepsilon_{\text{cyt}} \right) \right) \right) + \\ C_p R_1 \left( 2\varepsilon_{\text{cyt}}\varepsilon_{\text{vac}} \left( R_1^3 \left( \varepsilon_{\text{cyt}} + 2\varepsilon_e \right) + R_2^3 \left( \varepsilon_e - \varepsilon_{\text{cyt}} \right) \right) + \right. \\ \left. C_t R_2 \left( R_1^3 \left( \varepsilon_{\text{cyt}} + 2\varepsilon_e \right) \left( 2\varepsilon_{\text{cyt}} + \varepsilon_{\text{vac}} \right) - 2R_2^3 \left( \varepsilon_{\text{cyt}} - \varepsilon_e \right) \left( \varepsilon_{\text{cyt}} - \varepsilon_{\text{vac}} \right) \right) \right) \end{array} \right) \quad (15)$$

Für die Analyse der Frequenzdomäne wurden die komplexen Größen der Polarisierbarkeit ( $\chi^*$ ), des Transmembranpotentials des Plasmalemmas ( $U_p^*$ ) und des Tonoplasten ( $U_t^*$ ) ermittelt, indem die reellen Permittivitäten  $\varepsilon$  und flächenspezifischen Membrankapazitäten des Plasmalemmas ( $C_p$ ) bzw. des Tonoplasten ( $C_t$ ) in den Gleichung 12-15 durch ihre komplexen Pendanten ersetzt wurden:  $\varepsilon^* = \varepsilon - j\sigma/\omega$  und  $C^* = C - jG/\omega$ .

#### ***2.4 Vergleich zwischen dem Ein- und dem Dreischalenmodell***

Das unterschiedliche Verhalten einer ein- bzw. dreischaligen Zelle, in einem elektrischen Drehfeld wird anhand einer numerischen Simulation in Abbildung 2.2 verdeutlicht. Die durchgezogenen Kurven sind die theoretischen Elektrorotationsspektren einer hypothetischen dreischaligen Zelle, die als die imaginären Teile der komplexen Polarisierbarkeit  $\chi^*$  berechnet wurden (Gl. 12). Die Kurven 1-4 wurden für die externen Leitfähigkeiten von 0,01, 0,08, 0,64 und 5,12 mS/cm erstellt. Weitere Parameter die zur Berechnung der Spektren verwendet wurden sind in Tabelle 2.1 enthalten. Analog dazu wurden die Elektrorotationsspektren auf der Basis des Einschalenmodells berechnet, welche in Abbildung 2.2 anhand der gestrichelten Kurven gezeigt werden.



**Abbildung 2.2:** Theoretische Rotationsspektren berechnet auf der Basis des Ein- (gestrichelte Kurven) bzw. Dreischalenmodells (durchgezogene Kurven). Im Graphen wurde die Rotationsgeschwindigkeit als  $-\text{Im}(\chi)$  (Gleichung 2 bzw. 12) gegen den dekadischen Logarithmus der Frequenz aufgetragen. Die Kurven (1-4) wurden für die Leitfähigkeiten von 0,01, 0,08, 0,64 bzw. 5,12 mS/cm mit den Parametern der Tabelle 2.1 generiert.

Wie es in Abbildung 2.2 verdeutlicht wird, weisen die beiden strukturell unterschiedlichen Partikel sehr ähnliche Elektrorotationspektren über einen weiten Bereich der Leitfähigkeit auf. Betrachtet man die Cofeld-peaks, so zeigen sich diese über den gesamten Bereich der externen Leitfähigkeit für das Ein- und das Dreischalenmodell nahezu identisch. Ähnliches lässt sich auch für den Antifeld-peak bei hohen Leitfähigkeiten (0,64 und 5,12 mS/cm; Kurven 3 bzw. 4) beobachten. Bei einer niedrigen Leitfähigkeit von 80  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Kurven 2) ist der Antifeld-peak des Dreischalenmodells im Vergleich zum korrespondierenden Peak des Einschalenmodells asymmetrisch und weist

**Tabelle 2.1.** Parameter, die für die Berechnung der theoretischen Elektrorotationsspektren,  $U_p$  und  $U_t$  basierend auf dem Ein- und dem Dreischalenmodell verwendet wurden.

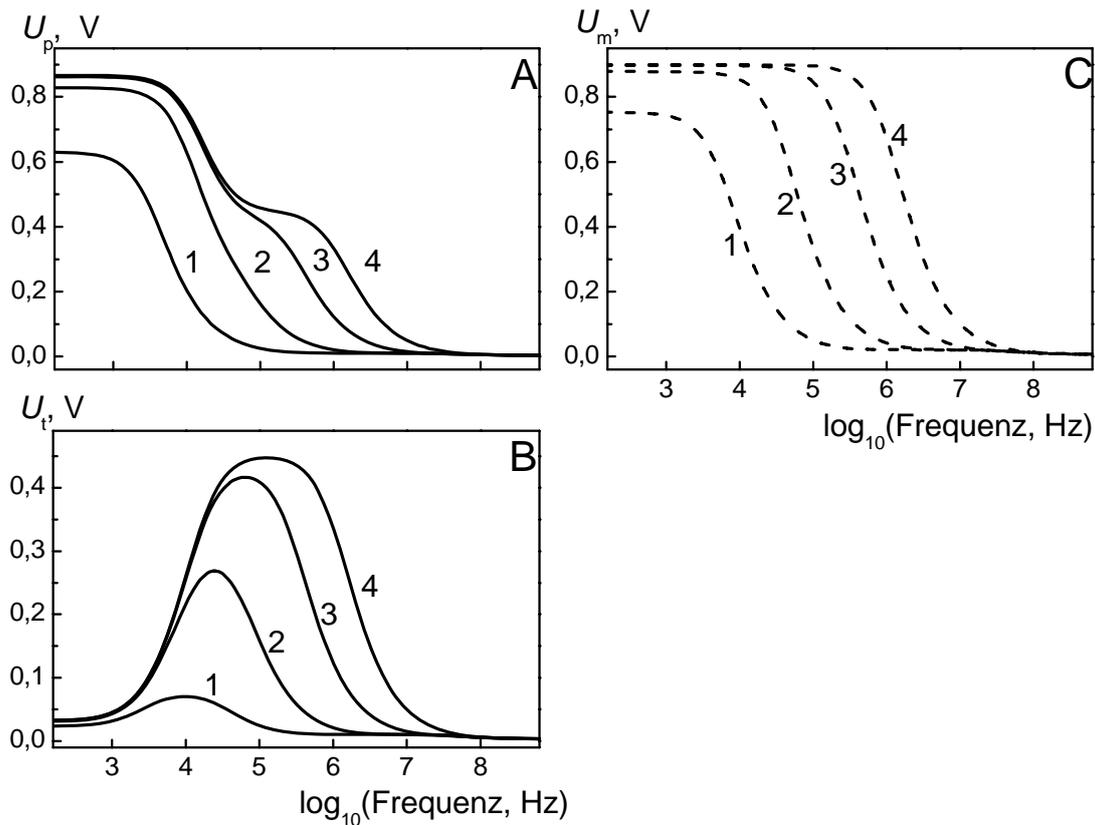
<b>Parameter</b>	<b>Symbol</b>	<b>Wert(e)</b>
<b>Gemeinsame Parameter</b>		
Radius des Protoplasten	$R_1$	15 $\mu\text{m}$
Externe Leitfähigkeit (variabel)	$\sigma_e$	0,01; 0,08; 0,64; 5,12 mS/cm
Externe Permittivität	$\epsilon_e$	80 $\epsilon_0$
Applizierte Feldstärke	$E_0$	400 V/cm
<b>Einschalenmodell</b>		
Flächenspezifische Membrankapazität	$C_m$	0,4 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
Flächenspezifische Membranleitfähigkeit	$G_m$	2,6 mS/cm <sup>2</sup>
Leitfähigkeit des Cytoplasmas	$\sigma_{\text{cyt}}$	7,3 mS/cm
Permittivität des Cytoplasmas	$\epsilon_{\text{cyt}}$	88 $\epsilon_0$
<b>Dreischalenmodell</b>		
Flächenspezifische Plasmalemmakapazität	$C_p$	0,8 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
Flächenspezifische Plasmalemmaleitfähigkeit	$G_p$	5,2 mS/cm <sup>2</sup>
Leitfähigkeit des Cytoplasmas	$\sigma_{\text{cyt}}$	4 mS/cm
Permittivität des Cytoplasmas	$\epsilon_{\text{cyt}}$	80 $\epsilon_0$
Radius der Vakuole	$R_2$	0,98 $R_1$
Flächenspezifische Tonoplastenkapazität	$C_t$	0,8 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
Flächenspezifische Tonoplastenleitfähigkeit	$G_t$	5,2 mS/cm <sup>2</sup>
Leitfähigkeit des Vakuolensaftes	$\sigma_{\text{vac}}$	8 mS/cm
Permittivität der Vakuole	$\epsilon_{\text{vac}}$	88 $\epsilon_0$

eine niedrigere Amplitude auf. Die charakteristischen Frequenzen der Antifeld-peaks stimmen jedoch in den Spektren beider Modelle überein. Die annähernd gleichen Werte der charakteristischen Frequenzen des Antifeld-peaks deuten darauf hin, dass in einem weiten Bereich der externen Leitfähigkeit (0,08-5,12 mS/cm) im Dreischalenmodell die zwei seriell geschalteten flächenspezifischen Kapazitäten des Plasmalemmas und des Tonoplasten (jeweils mit  $0,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) einer einzigen flächenspezifischen

Membrankapazität von  $0,4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  im Einschalenmodell entsprechen. Nur bei der niedrigsten Leitfähigkeit von  $10 \mu\text{S}/\text{cm}$  (Kurve 1) ist der Antifield-peak im Dreischalenmodell ( $\sim 3,5 \text{ kHz}$ ) deutlich zu niedrigeren Frequenzen verschoben als der korrespondierende Antifield-peak des Einschalenmodells.

Weitere Unterschiede zwischen dem Ein- und dem Dreischalenmodell lassen sich bei der Betrachtung der frequenzabhängigen Spektren der induzierten Transmembranpotentiale für das Plasmalemma und den Tonoplasten in Hinblick auf eine Abhängigkeit von der externen Leitfähigkeit feststellen. Unter der Voraussetzung, dass  $U_p$  und  $U_t$  komplexe Größen in der Frequenzdomäne sind, wurden für das Dreischalenmodell mit Hilfe der Gleichungen 13-15 unter Verwendung der Parametern aus Tabelle 2.1 die absoluten Werte für das Transmembranpotential des Plasmalemmas  $\text{Abs}(U_p^*)$  und des Tonoplasten  $\text{Abs}(U_t^*)$  als Funktion der Frequenz und der Leitfähigkeit (Abb. 2.3 A und B) berechnet. Wie auch bei den theoretischen Elektrorotationsspektren wurde die Berechnung für vier verschiedene Leitfähigkeiten von  $0,01$ ,  $0,08$ ,  $0,64$  und  $5,12 \text{ mS}/\text{cm}$  durchgeführt (Kurven 1-4). Die Stärke des angelegten Feldes von  $400 \text{ V}/\text{cm}$  wurde als frequenzunabhängig angenommen. Analog wurden die korrespondierenden Spektren des Transmembranpotentials  $U_m$  für das Einschalenmodell mit der Gleichung 3 berechnet (Abb. 2.3C).

Betrachtet man die Frequenzspektren oder induzierten Plasmalemmaspannung (Abb. 2.3 A und C) so zeigen sich substantielle Unterschiede zwischen dem Ein- und dem Dreischalenmodell. Beim Einschalenmodell weist jedes  $U_m$  - Spektrum eine einzelne Dispersion mit einer Grenzfrequenz auf, deren Position von der externen Leitfähigkeit abhängt. Unterhalb dieser Grenzfrequenz erreicht die Transmembranspannung des Plasmalemmas einen Wert, der mit der Gleichung 11,  $U_m = 1,5R_1E_0\cos\vartheta$ , berechnet werden kann. Oberhalb der Grenzfrequenz führt die kapazitative Überbrückung des Plasmalemmas zu einem raschen Abfall der Transmembranspannung bis zu einem Wert von fast null. Es soll hier noch darauf hingewiesen werden, dass bei den gegebenen externen Leitfähigkeiten die Grenzfrequenz der Plasmalemma-Aufladung mit den charakteristischen Frequenzen des Antifield-peaks korrespondieren.



**Abb. 2.3 :** Leitfähigkeitsabhängigkeit der induzierten Spannung über das Plasmalemma  $U_p$  bzw.  $U_m$  und den Tonoplasten  $U_t$  in der Frequenzdomäne auf der Basis des Drei- (**A**, **B**) bzw. Einschalenmodells (**C**). Die induzierten Spannungen wurden als absolute Größen gegen den dekadischen Logarithmus der Frequenz aufgetragen. Die Kurven (1-4) wurden für die Leitfähigkeiten von 0,01, 0,08, 0,64 bzw. 5,12 mit den Parametern aus den Messungen der vakuolisierten Protoplasten (Tabelle 2.1) generiert

Im Gegensatz zum Einschalenmodell weisen die Transmembranpotentiale des Plasmalemmas im Dreischalenmodell bei hohen externen Leitfähigkeiten (0,64 und 5,12 mS/cm, Kurven 3 und 4 in Abb. 2.3 A) zwei Dispersionen auf. Bei niedrigen Leitfähigkeiten (0,01 und 0,08 mS/cm, Kurven 1 und 2) verschmelzen beide Dispersionen zu einer einzelnen, so dass die Spektren denen des Einschalenmodells gleichen. Abbildung 2.3 B verdeutlicht, dass Potentiale über den Tonoplasten nur in einem begrenzten Bereich der Frequenz induziert werden können. Unterhalb von  $\sim 5$  kHz ist  $U_t$  vernachlässigbar



klein, aufgrund der Abschirmung des Zellinneren durch das Plasmalemma. Ein Anstieg der externen Leitfähigkeit (Kurven 1-4) erhöht nicht nur die induzierte Spannung des Tonoplasten sondern verschiebt auch die Grenzfrequenz, die durch den Kurzschluss der Membran verursacht wird, zu höheren Frequenzen.

## Kapitel 3

### Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, bei Sigma (Deisenhofen, Deutschland) käuflich erworben und ohne zusätzliche Reinigung oder Aufbereitung eingesetzt.

#### 3.1 Zellkultur

Für die Experimente wurden die pflanzliche Zellkultur BY-2 und die Hefekultur *Pichia pastoris* verwendet.

##### 3.1.1 *Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2 (BY-2) Zellen

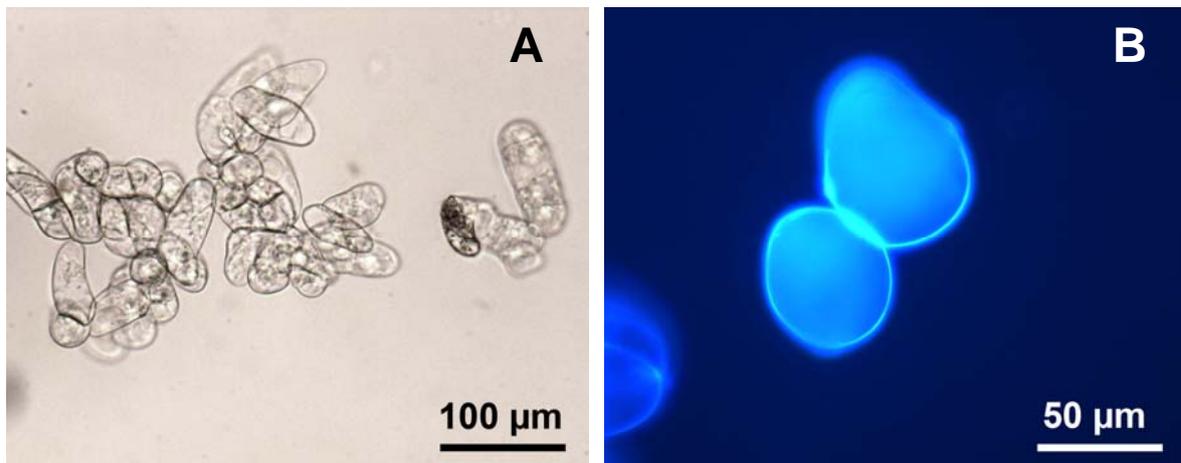
Tabak BY-2 Zellen sind eine pflanzliche Zellkulturlinie die aus einem Callus eines Keimlings der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* gewonnen wurde. BY-2 Zellen werden gerne als Modellsystem für höhere Pflanzen eingesetzt, da sie einerseits unter guten Kulturbedingungen über eine hohe Homogenität und eine schnelle Wachstumsrate verfügen. Andererseits weisen sie eine Vielzahl von grundlegenden Eigenschaften von höheren Pflanzen auf, was sie für die biologische Forschung sehr interessant machen.

Für die Messungen der feldinduzierten Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration wurde eine Linie der BY-2 Zellen verwendet, die stabil das Protein Apoaequorin exprimiert.

Die Transformation der BY-2 Zellen wurde mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) durchgeführt, welches einen aus zwei Teilen bestehenden Vector (pART27) mit den codierenden Sequenzen für Apoaequorin und dem cauliflower-35S-Promotor in sich trägt. Kanamycin resistente Kalli wurden nach der *in-vitro*-Rekonstitution von Aequorin auf  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Lumineszenz getestet [Knight et al., 1991]. Durch

Überführung der positiv getesteten transgenen Kalli in flüssiges Wachstumsmedium wurde eine Suspensionskultur etabliert. Die transformierten BY-2 Zellen wurden für die Messungen von Prof. Dr. Roitsch (Pharmazeutische Biologie, Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Die BY-2 Zellen wurden wöchentlich in einem modifizierten Medium nach Linsmaier und Skoog (LS - Medium) [Linsmaier und Skoog, 1965] subkultiviert, das eine erhöhte Konzentration an  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (370mg/l) und Vitamin B<sub>1</sub> HCl (1 mg/l) enthielt. Das modifizierte LS – Medium wurde mit 3% Saccharose und dem synthetischen Auxin 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (0,2 mg/l) ergänzt. Der pH - Wert wurde vor dem Autoklavieren mit MES-NaOH auf 5,8 eingestellt [Nagata et al., 1992]. Die Zellsuspension wurde auf einem Rotationsschüttler bei 25°C und ca. 130 U/min in gedämpftem Licht kultiviert. Die Osmolalität des Mediums betrug 230 mOsm und die Leitfähigkeit ca. 5,8 mS/cm.



**Abbildung 3.1:** Durchlicht- (A) und Fluoreszenzaufnahme (B) von BY-2 Tabakzellen aus einer 5-tägigen, nicht synchronisierten Kultur. Für die Fluoreszenzfärbung der Zellen (B) wurde der Zellwand-affine Farbstoff Calcofluor White in einer Konzentration von 1mM eingesetzt.

Abbildung 3.1 A zeigt mikroskopische Aufnahmen von typischen BY-2 Zellen einer 5 -tägigen Kultur, wie sie auch in der Literatur beschrieben werden [Nagata et al., 1992; Reisen et al., 2005]. BY-2 Zellen wuchsen in dichten Zellhaufen, wobei sie durch ihre Zellwand miteinander verbunden waren. Die dünne Zellwand konnte deutlich mithilfe

des Fluoreszenzfarbstoffes Calcofluor White dargestellt werden (Abb. 3.1 B). Innerhalb dieser Haufen wiesen die Zellen eine hohe Variabilität ihrer Form auf. Sie reichte von länglich, spitz auslaufend bis nahezu sphärisch. Während die Vakuole nahezu das gesamte Volumen der Zelle ausmachte (>90%) waren der Kern und die Organellen in einer cytosolischen Höhle gelegen, die durch die vakuoläre Membran, den Tonoplasten, gebildet wurde.

Die Messung der feldinduzierten Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration wurde an oben beschriebenen BY-2 Zellsuspensionen durchgeführt. Für Elektrorotationsmessungen wurden vereinzelte Zellen benötigt. Die Verbindung der BY-2 Zellen untereinander in den Zellhaufen war jedoch zu stabil, als dass einzelne Zellen mechanisch aus den Verbänden gelöst werden konnten. Daher wurde Zellwand enzymatisch aufgelöst und die isolierten Protoplasten für die Elektrorotation eingesetzt.

### 3.1.2 *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris* ist eine methylo-trophe Hefeart aus der Familie der Saccharomycetaceae, die eines der bedeutendsten Expressionssysteme der Biotechnologie darstellt. Ihr Vorteil liegt in ihrer Fähigkeit Methanol als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen, was ihre Aufzucht im Vergleich mit anderen Nährmedien sehr preiswert macht. Sie kann in sehr hohen Zelldichten gezüchtet werden und ist von der U.S.-amerikanischen Zulassungsbehörde, der Food and Drug Administration (FDA) mit dem GRAS-Status (general regarded as safe) versehen worden, wodurch sie in den USA in der Produktion von pharmazeutischen Wirkstoffen eingesetzt werden darf. Besonders interessant ist *Pichia pastoris* wegen ihrer weit reichenden Fähigkeiten für die post-translationalen Modifikationen eukaryotischer Proteine, die sie für die biotechnologische Industrie und Forschung äußerst nützlich machen.

Für die Fusion zur Herstellung von Riesenzellen wurden *Pichia pastoris* Hefezellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Kultivierung erfolgte in YPD-Medium (1% Hefe-Extrakt, 2% Pepton und 2% Dextrose) bei 30°C in einem Wasserbad mit Schüttelfunktion (100 min<sup>-1</sup>). Das Zellwachstum wurde anhand der optischen Absorption bei 578 nm überwacht. Die Zellen wurden in der logarithmischen Phase geerntet und direkt für die Protoplasten-Präparation eingesetzt.

## 3.2 Protoplasten-Isolation

### 3.2.1 Vakuolierte und evakuolierte BY-2 Protoplasten

Die Isolation vakuolierter BY-2 Protoplasten erfolgte nach einer leicht veränderten Methode von Herzog et al. [1998]. Ein Aliquot von 1- 4 ml der Zellsuspension wurde bei 120 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml einer Enzymlösung mit 430 mM Mannitol, 1,5% Onuzuka RS Zellulase (Yakult Honsha, Tokio, Japan), 0,1% Y-23 Pectolyase, 1% R-10 Macerozym, 1% BSA, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 10 mM MES/NaOH (pH = 5,8) resuspendiert und 2-3 Stunden bei 30°C behutsam geschüttelt. Die Enzymlösung wurde anschließend durch zweimaliges Waschen mit 430 mOsm Saccharose 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 mM MES/NaOH (pH = 5,8) bei 120g entfernt. Der Fortschritt des Verdau der Zellwand wurde durch einen Färbenachweis mit dem Farbstoff Calcofluor White überprüft. Unverdaute Reste der Zellwand zeigten eine starke blaue Fluoreszenz. Die Abbildung 3.2 zeigt ein paar typische BY-2 Protoplasten.



**Abbildung 3.2:** Durchlichtaufnahmen von BY-2 Protoplasten. Nach dem Verdau der Zellwand liegen die Protoplasten vereinzelt und kugelförmig vor. Die Abbildung zeigt deutlich die große Vakuole (V), die von einer dünnen Schicht Cytoplasma von dem Plasmalemma getrennt ist. Der Zellkern und die Organellen liegen in einer Aushöhlung, die vom Tonoplasten gebildet wird (Pfeil).

Die Präparation evakuolierter Protoplasten wurde nach der Methode von Hörtensteiner et al. [1992] durchgeführt. 100 ml Suspension einer 3 Tage alten BY-2 Kultur wurden pelletiert (120 g, 10 min). Das Pellet wurde in 40 ml Enzymlösung bestehend aus 1% Onuzuka RS Zellulase, 0,1% Y-23 Pectolyase, 0,35 M Manitol und

10 mM MES/NaOH (pH = 5,5) resuspendiert und ca. 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Die Enzymlösung wurde durch Zentrifugieren entfernt (120g, 10 min) und das Pellet in einer Waschlösung mit 0,7 M Mannitol und 10 mM MES/NaOH (pH =5,5) aufgenommen. Die Protoplastensuspension wurde auf einen Percoll Gradienten (30% Percoll, GE Healthcare, UK) pipettiert und für 30 min bei 15000 g zentrifugiert. Die am Boden des Zentrifugenröhrchens abgesetzten evakuoliseirten Protoplasten wurden mit einer Pasteurpipette eingesammelt und zur Aufbewahrung in FMS Medium bestehend aus 1% Saccharose, 4,6 mg/l Murashige-und-Skoog-Pflanzen-Salzmixtur (Wako, Osaka, Japan) 1mg/l Thiamin-HCl, 100mg/l Myo-Inositol, 0,1 mg/l Naphtylessigsäure, 1mg/ml Benzyladenin und 0,5 M Mannitol überführt.

### **3.2.2 *Pichia pastoris***

Für die Protoplasten-Isolation wurden die *Pichia p.* Zellen pelletiert (2000g, 10 min) und in destilliertem Wasser einmal gewaschen (2000g, 10 min). Zum besseren Aufschluss der Zellwand erfolgte eine Inkubation in  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigem Medium (50 mM EDTA, 35 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH = 9,0) bei 30°C unter Schütteln (120 min<sup>-1</sup>). Anschließend wurden die Zellen mit einer EDTA-Sorbitol-Lösung (50 mM EDTA, 1,2 M Sorbitol, pH = 7,5) und einer TRIS-Sorbitol-Lösung (50 mM TRIS, 1,2 M Sorbitol, pH = 7,5) gewaschen (2000g, 10 min). Für den Verdau der Zellwand wurden die Zellen bei 35°C in einer Enzymlösung mit 1 mg/ml Zymolyase (100 000 U/g, MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland), 50 mM Tris (pH = 7.5), 1,2 M Sorbitol, 0,1 mM Calciumacetat und 0,5 mM Magnesiumacetat für 2-3,5 Stunden sanft bei 120 Bewegungen pro Minute geschüttelt.

### **3.3 *Elektrorotation***

Für die Analyse der zellulären Parameter wurden von BY-2 Protoplasten und *Pichia pastoris* Protoplasten mithilfe der Kompensationsmethode die Frequenz des Antifeld-peaks bestimmt und außerdem ganze Frequenzspektren gemessen.

### 3.3.1 Kompensationsmethode

Eine präzise Messung der spezifischen Frequenz des Maximums der Anti-Feld-Rotation wurde mit der Kompensationsmethode, welche auch als „contrarotating fields technique“ (CRF) bezeichnet wird [Arnold und Zimmermann, 1982], erreicht.

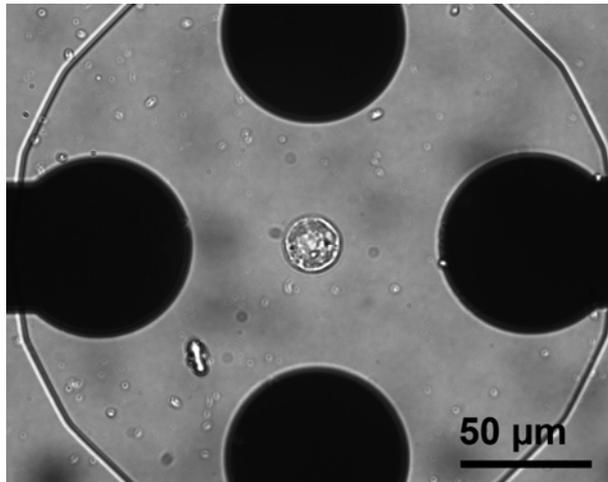
Bei dieser Methode wurden zwei rotierende Felder gleicher Amplitude ( $\sim 100$  V/cm) mit entgegengesetzter Richtung und unterschiedlicher Frequenz ( $f_1$  und  $f_2$ ) eingesetzt. Das Verhältnis der beiden Frequenzen blieb dabei konstant ( $f_1 = \frac{1}{4} \times f_2$ ). Die Felder wurden in sehr kurzer Folge appliziert, wobei der Wechsel schneller erfolgte als die Protoplasten reagieren konnten.

Um das Zentrum der Kammer waren vier Platinelektroden quadratisch angeordnet. Der Elektrodenaufbau entsprach zwei, zueinander rechtwinklig angeordneten Plattenkondensatoren mit einem Abstand von ca. 1,2 mm. Die Kammer blieb nach oben hin offen und ermöglichte so einen schnellen Wechsel der Messlösungen. Für die Messung wurden  $\sim 10 \mu\text{l}$  Protoplastensuspension in das Zentrum der Kammer pipettiert. Die Elektroden der Kammer wurden mit einem Rotationsfeldgenerator (Lehrstuhl für Biotechnologie, Universität Würzburg, Deutschland) angesteuert. Die Beobachtung der Protoplasten erfolgte an einem inversen Mikroskop (Labovert, Leitz, München, Deutschland) mit einem Durchlicht-Ölimersionsobjektiv (Vergrößerung 100x,) für eine optimale Auflösung. Das Mikroskop war mit einem kalibrierten Messokular ausgestattet, mit dem die Radii der Protoplasten bestimmt wurde. An die Messkammer war ein Konduktometer angeschlossen, mit dessen Hilfe die Leitfähigkeit innerhalb der Kammer bestimmt wurde.

### 3.3.2 Frequenzspektren

Die Messungen der Elektrorotationsspektren wurden in mikrostrukturierten Kammern durchgeführt, die im Zentrum aus einer gegenüberliegenden Anordnung von vier flachen, kreisförmigen Elektroden bestehen. Jede Elektrode hatte einen Durchmesser von  $60 \mu\text{m}$  und eine Dicke von  $140 \mu\text{m}$  und bestand aus zwei Schichten. Die obere Schicht war aus Platin und hatte eine Dicke von  $120 \mu\text{m}$ , die untere Schicht bestand aus  $20 \mu\text{m}$  Tantal. Beide Schichten sind auf einem Träger aus Quarzglas aufgebracht. Der Abstand

zwischen den Elektroden betrug 100-300  $\mu\text{m}$ . Die Herstellung Mikrostruktur erfolgte mittels Photolithographie (Fraunhofer-Institut Siliziumtechnologie, ISiT, Itzehoe, Deutschland).



**Abbildung 3.3:** Durchlichtaufnahme eines BY-2 Protoplasten im Zentrum einer Rotationskammer. Die vier kreisförmigen Elektroden sind in einem Abstand von 100  $\mu\text{m}$  angeordnet. Für die Messung der Frequenzspektren werden die Geschwindigkeiten der Zellrotation mittels einer Stoppuhr bestimmt.

Die Elektroden wurden mit zwei um  $90^\circ$  phasenverschobenen Rechteckspannungen zwischen 2 und 4,8  $V_{pp}$  angesteuert, welche mit dem Frequenzgenerator HP8130A (Hewlett-Packard, Böblingen, Deutschland) erzeugt wurden. Für die Messungen wurden 50  $\mu\text{l}$  Protoplastensuspension in die Mitte der Versuchskammer pipettiert und vorsichtig mit einem runden Deckglas von 15 mm Durchmesser abgedeckt. Durch Absaugen von Messlösung unter Verwendung von Zellstofftüchern bzw. durch Zugabe kleiner Mengen Messlösung wurden die Protoplasten durch den entstandenen Flüssigkeitsstrom zentral zwischen den vier Elektroden platziert. Zur Bestimmung der Rotationsgeschwindigkeit  $\Omega$  wurden die Protoplasten in der Kammer durch ein BX 50 Mikroskop (Olympus, Hamburg Deutschland) mit einem Long-Distance-Objektiv (LMPlan FI 100x, Olympus) beobachtet (Abb.3.3).



### ***3.4 Elektrische Feldpulse und Chemilumineszenzmessung***

Für die Generierung der elektrischen Feldpulse wurden der Multiporator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und der Pulsgenerator HP-214B (Hewlett-Packard, Boeblingen, Deutschland) verwendet. Der Multiporator erzeugt einzelne exponentiell abfallende Feldpulse von 50  $\mu$ s Dauer und Spannungen von bis zu 1200 V. Für die Applikation der Rechteckfeldpuls - Serien mit niedriger Feldstärke (75-200 V/cm, Einzelpulsdauer: 50 $\mu$ s) wurde der HP-214B Generator verwendet. Die Pulsfrequenz von 5 Pulse/s wurde mit einem Funktionsgenerator (TE 7702, Toellner, Herdecke, Deutschland) gesteuert.

Die Chemilumineszenz des Aequorin in BY-2 Zellen wurde mit Hilfe des Sirius Luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland) erfasst. Für die Messung wurde eine durchsichtige Porationsküvette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) im Probenraum des Luminometers platziert. Die Küvette enthielt zwei flächige Aluminiumelektroden (2 cm<sup>2</sup>) mit einem Abstand von 4 mm. Vorder- und Rückseite der Küvette bestanden aus lichtdurchlässigem Kunststoff. Die Elektroden der Küvette wurden über zwei flexible Kupferkabel mit den Anschlüssen des Multiporators verbunden.

16 Stunden vor den Pulsexperimenten wurde der BY-2 Zellkultur 1  $\mu$ M Coelenterazin zur Rekonstitution des Aequorins, wie bei Blume et al. [2000] beschrieben, zugegeben. Für die Rekonstitution wurde natives Coelenterazin (Berthold Detection Systems) in Form einer 5mM Stammlösung verwendet.

Für die Pulsexperimente wurden die Zellen zweimal in isotonischem Pulsmedium (230 mOsm) gewaschen (100g, 5 min) und auf eine Dichte von 10<sup>5</sup> Zellen/ml eingestellt. Das niedrigleitende Pulsmedium (0,25 mS/cm) enthielt 1,5 mM KCl und 230 mM Saccharose. Das hochleitende Pulsmedium (5 mS/cm) beinhaltete 40 mM KCl und 150 mM Saccharose. Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von 1mM MES auf 5,8 eingestellt. Für die Versuche mit extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> wurden dem Pulsmedium 0,01, 0,1 oder 1 mM CaCl<sub>2</sub> hinzugegeben. Soweit nicht anders beschrieben, lag die Standardkonzentration bei 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>. Für die Versuche mit Ausschluss von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> wurden die BY-2 10 Minuten in Ca<sup>2+</sup>-freiem Pulsmedium mit 3mM EGTA inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte in Ca<sup>2+</sup>-freiem Pulsmedium (100g, 5 min).

Für die Messung wurde ein Aliquot der Zellsuspension (~800µl) vorsichtig in die Porationsküvette pipettiert. Die Messung der Chemilumineszenz begann gewöhnlich 5-10 s vor Applikation des Feldpulses. Die Aufzeichnung der digitalisierten Signale erfolgte mit einer Rate von 5 Datenpunkte/s.

### 3.5 Elektrofusion

Die Elektrofusionsexperimente wurden zuerst in mikrostrukturierten interdigitalen Kammern durchgeführt, die aus zwei sägezahnförmigen, gegenüberliegenden Kammelektroden bestehen. Die Elektroden bestanden aus zwei Schichten. Die obere Schicht war aus Platin und hatte eine Dicke von 120 µm, die untere Schicht bestand aus 20 µm Tantal. Beide Schichten sind auf einem Träger aus Quarzglas aufgebracht. Der Abstand zwischen den Spitzen der Elektroden betrug 30 µm. Die Herstellung der Mikrostrukturen erfolgte mittels Photolithographie (Fraunhofer-Institut Siliziumtechnologie, ISiT, Itzehoe, Deutschland).

Weitere Versuche wurden in Zweidraht- und Helix-Kammern durchgeführt (Lehrstuhl für Biotechnologie, Würzburg, Deutschland). Die Zweidraht-Kammern bestanden aus zwei Platindrähten mit einem Durchmesser von 100µm, die parallel mit einem Abstand von 100 µm auf einen Objektträger aufgeklebt waren. Die Helix-Kammern bestanden aus einem Acrylglas-Zylinder, um den zwei Platindrähte mit einem Abstand von 100 µm gewickelt wurden [Zimmermann und Neil, 1996]. Der Zylinder befand sich in einem eng anliegenden Acrylglas-Mantel. Die Kammern waren über zwei Kupferdrähte an einen modifizierten Fusionsgenerator (Multiporator, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angeschlossen. Bei den Experimenten wurden die Protoplasten zunächst im Wechselfeld dielektrophoretisch bei einer Frequenz von 2 MHz und einer Feldstärke von 700-1000 V/cm für 30 s gesammelt. Die Fusion wurde durch 2-4 exponentielle Gleichspannungspulse (15 µs) mit einer Feldstärke von 9-13 kV eingeleitet. Die Zeit zwischen den aufeinander folgenden Pulsen betrug 1 s. Anschließend wurde zur Stabilisierung der Fusionate ein Wechselstromfeld mit einer Frequenz von 2 MHz und einer Feldstärke von 500 V/cm für 20 s angelegt.

Für die Elektrofusionsexperimente wurden die *Pichia pastoris* Protoplasten nach der Enzymbehandlung zweimal in niedrig leitendem Waschmedium (1,2 M Sorbitol, 0,1 mM Calciumacetat und 0,5 mM Magnesiumacetat) gewaschen (1000g, 5min) und in

Fusionsmedium (0,1 mM Calciumacetat und 0,5 mM Magnesiumacetat), welches mit Sorbitol auf eine Osmolalität von 0,8-0,9 Osmol/kg eingestellt wurde, mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^8$  bzw.  $5 \times 10^8$  Zellen/ml resuspendiert.

Die mikrostrukturierte Kammer und die Zwei-Draht-Kammer wurden mit 10-20  $\mu$ l Protoplastensuspension befüllt. Die Elektrofusion wurde anschließend mit dem BX 51 Mikroskop (Olympus, Hamburg Deutschland) beobachtet. Die Helix-Kammern wurden mit 70  $\mu$ l Protoplastensuspension befüllt. Nach der Fusion ruhte die Protoplastensuspension für 10 min, die Protoplasten wurden in 500  $\mu$ l YPD Medium aufgenommen und nach 30 min unter einem Mikroskop ausgezählt.

### ***3.6 Flammenphotometrie***

Für die Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von BY-2 Zellen wurde ihr Zellsaft in einem Flammenphotometer (ELEX 6361, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) analysiert. Ein Aliquot von 2,5 ml der BY-2 Zellsuspension wurde zweimal mit salzfreiem Sorbitolmedium (230 mOsm) gewaschen (120 g, 10 min). Die Zellen wurden anschließend pelletiert und die Reste des Medium durch Absaugen mit einem Zellstofftuch entfernt. Das getrocknete Pellet wurde in einen Homogenisator (Tenbroeck Homogenisator, Wheaton Scientific Products, Millville, New Jersey, USA) überführt und die Zellen durch zwei Einfrier/Auftau Zyklen ( $-196^\circ\text{C}$  /  $20^\circ\text{C}$ ) aufgebrochen. Reste der Zellwand wurden mittels Filtration entfernt und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im so gewonnenen Zellsaft nach Verdünnung mit doppelt destilliertem Wasser im Flammenphotometer bestimmt.

Die Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des Zellextraktes ergab einen Wert von  $1,0 \pm 0,4$  mM (n = 5.). Da die Vakuole der BY-2 mehr als 90% des Zellvolumens ausmachen liefern diese Werte eine hinreichend genaue Schätzung der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

## Kapitel 4

### Ergebnisse und Diskussion

#### ***4. Elektrofusion von Pichia pastoris Protoplasten zur Herstellung von Riesenzellen***

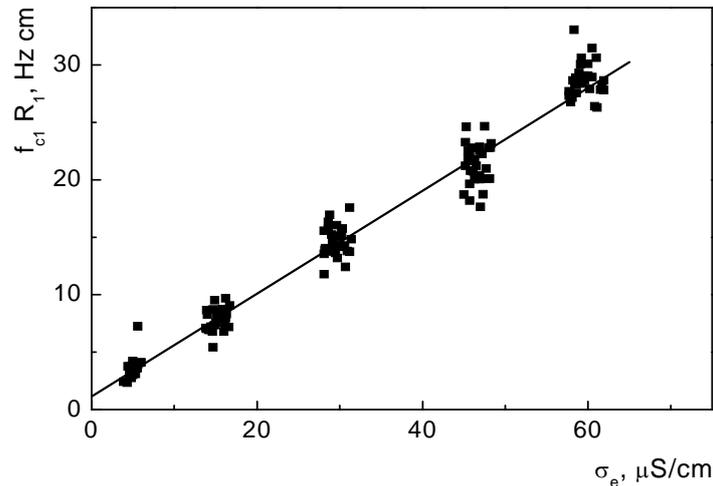
Elementare Bestandteile der Elektrofusion sind das Zustandekommen eines engen Membrankontaktes der Protoplasten mit Hilfe der positiven Dielektrophorese und der elektrische Durchbruch der anliegenden Membranzonen. Die Parameter für die eingesetzten elektrischen Felder sind abhängig von den elektrischen Eigenschaften der Membranen und Kompartimente der Protoplasten. Da die Protoplasten von *Pichia pastoris* relativ einfach aufgebaut sind, lassen sich ihre zellulären Eigenschaften sehr gut anhand einer dielektrischen Analyse auf der Basis des Einschalenmodells ermitteln. Mithilfe der so gewonnenen Daten konnten die optimalen Bedingungen für die Elektrofusion herausgearbeitet werden.

##### **4.1 Elektrorotation von *Pichia pastoris* Protoplasten**

Die elektrischen Parameter von *Pichia pastoris* Protoplasten wurden mit der Kompensationsmethode bestimmt. Bei dieser Methode werden zwei rotierende Wechselstromfelder von gleicher Amplitude mit gegenläufiger Richtung und unterschiedlicher Frequenz auf die zu untersuchenden Zellen appliziert. Anhand der Drehung der Zellen ist es sehr genau möglich, die charakteristischen Feldfrequenzen ( $f_{c1}$ ) der maximalen Antifeld-Rotation zu bestimmen.

Die Messung erfolgte über einen Leitfähigkeitsbereich von 5-60  $\mu\text{s}/\text{cm}$ . Wie in Abbildung 4.1 ersichtlich wiesen die Messdaten einen linearen Zusammenhang zwischen dem Produkt  $f_{c1} \times R_1$  und der externen Leitfähigkeit  $\sigma_e$  auf und konnten daher mit dem Einschalenmodell (Gl. 8) angefitet werden. Der Fit der Daten ergab für die

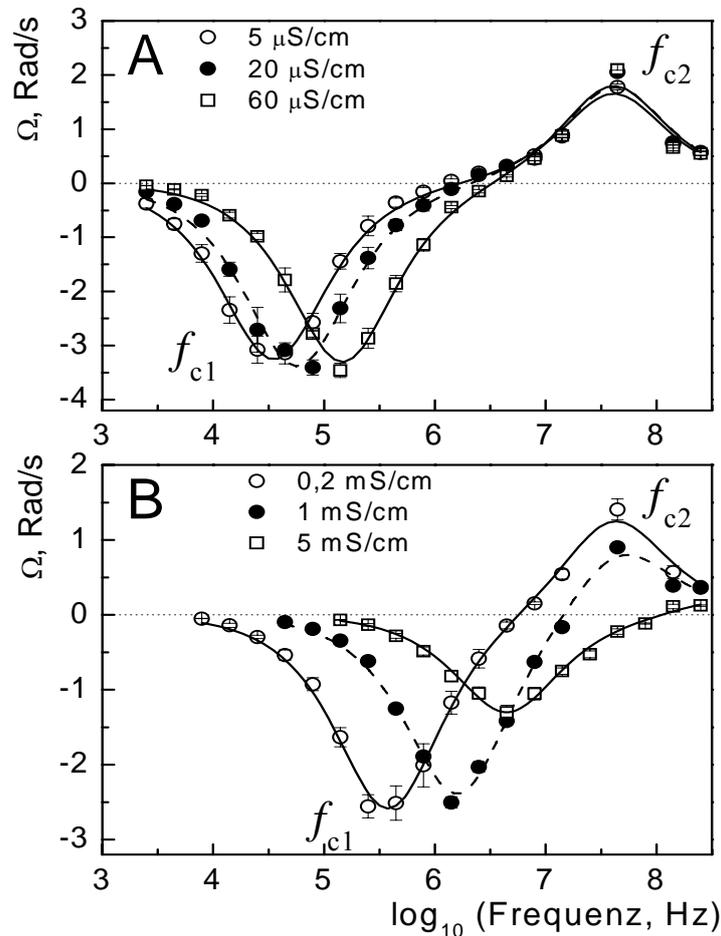
flächenspezifische Membrankapazität ( $C_m$ ) einen Wert von  $0,71 \pm 0,02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und für die flächenspezifische Membranleitfähigkeit ( $G_m$ ) einen Wert von  $18,6 \pm 5,8 \text{ mS}/\text{cm}^2$ .



**Abbildung 4.1:** Elektrorotation von *Pichia pastoris* Protoplasten mit der Kompensationsmethode. Die Abbildung zeigt die radiusnormierten Daten der charakteristischen Frequenz  $f_{c1}$  von  $\sim 160$  Protoplasten in einem Bereich der externen Leitfähigkeiten  $\sigma_e$  von 5 bis 60  $\mu\text{S}$ . Der Fit ergab für die flächenspezifische Membrankapazität einen Wert von  $C_m = 0,71 \pm 0,02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und für die flächenspezifische Membranleitfähigkeit ein Wert von  $G_m = 18,6 \pm 5,8 \text{ mS}/\text{cm}^2$ .

Zusätzlich zu den Untersuchungen mit der Kompensationsmethode wurden vollständige Elektrorotationsspektren über einen weiten Leitfähigkeitsbereich von 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$  bis 5  $\text{mS}/\text{cm}$  aufgenommen. Durch die Analyse der Elektrorotationsspektren können Kenntnisse über die elektrischen Eigenschaften des Cytoplasmas gewonnen werden. Die Abbildungen 4.2 A und B zeigen die Rotationsspektren der Protoplasten von *Pichia pastoris* bei 5-60  $\mu\text{S}/\text{cm}$  bzw. bei 0,2 bis 5  $\text{mS}/\text{cm}$ . Durch den Fit der Elektrorotationsspektren mit zwei Lorentzfunktionen (Gl. 7) wurden die charakteristischen Frequenzen  $f_{c1}$  und  $f_{c2}$  bestimmt. Der Cofeld-peak wies zwischen 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$  bis 1  $\text{mS}/\text{cm}$  nur geringe Veränderungen auf. Zwischen 5 und 200  $\mu\text{S}/\text{cm}$  war die Rotationsgeschwindigkeit nahezu konstant ( $\Omega \approx 1,5 \text{ rad}/\text{s}$ ) und sank bei 1  $\text{mS}/\text{cm}$  auf  $\sim 0,7 \text{ rad}/\text{s}$  bei einer gleich bleibenden charakteristische Frequenz  $f_{c2} \approx 40 \text{ MHz}$ . Bei 5  $\text{mS}/\text{cm}$  verschob sich der

Cofeld-peak zu Frequenzen oberhalb von 150 MHz und konnte daher nicht mehr aufgelöst werden. Die Antifeld-peaks wiesen bei 5-60  $\mu\text{S}/\text{cm}$  eine Rotationsgeschwindigkeit von  $\Omega \approx 3,5 \text{ rad/s}$  auf. Mit zunehmender Leitfähigkeit reduzierte sich diese bis auf einen Wert



**Abbildung 4.2:** Rotationsspektren von *Pichia pastoris* Protoplasten bei unterschiedlichen externen Leitfähigkeiten  $\sigma_e$  (**A:** 5-60  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , **B:** 0,2-5 mS/cm). Jedes Spektrum ist der Mittelwert ( $\pm$  SE) von 5-7 Einzelzell-Messungen. Die Kurven zeigen den Fit mit zwei Lorenzfunktionen (Gl. 7) zu den gemessenen Elektrorotationsspektren.

von  $\Omega \approx 1,4 \text{ rad/s}$  bei 5mS/cm. Die charakteristische Frequenz des Antifeld-peaks verschob sich dabei von  $\sim 30 \text{ kHz}$  auf 30 MHz.

Der Fit der Elektrorotationsspektren mit dem Einschalenmodell (Gl. 2) zeigte bezüglich der flächenspezifischen Membrankapazität keine Abhängigkeit von der

Leitfähigkeit des Mediums. Für die flächenspezifischen Membrankapazität wurde ein Wert von  $C_m = 0,52 \pm 0,01 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , für die relative Permittivität ein Wert von  $\varepsilon = 126 \pm 7$  und für die innere Leitfähigkeit ein Wert von  $\sigma_{\text{cyt}} = 5,2 \pm 0,2 \text{ mS}/\text{cm}$  berechnet ( $n = 31$ ).

#### 4.2 Bestimmung der elektrischen Eigenschaften von *Pichia pastoris* Protoplasten mit dem Einschalenmodell

Für die flächenspezifische Membrankapazität wurde mit Hilfe der Kompensationsmethode (Gl. 8) ein Wert von  $C_m = 0,71 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  in einen Leitfähigkeitsbereich von 5-60  $\mu\text{S}/\text{cm}$  ermittelt. Dieser Wert befindet sich in guter Übereinstimmung mit Daten, die für Protoplasten von *Schizosaccharomyces pombe* auf Basis einer Elektrorotationsanalyse ( $C_m = 0,67 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) [Kriegmaier et al., 2001] berichtet wurden. Eine ähnliche flächenspezifische Membrankapazität von  $0,65 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  wurde für *Saccharomyces cerevisiae* Zellen unter Verwendung einer Impedanzanalyse [Asami und Yonezawa, 1996] gefunden. Diese Werte sind typisch für eukaryotische Zellen mit einer einzelnen Membran [Zimmermann und Neil, 1996]. *Pichia pastoris* Zellen besitzen zwar wie pflanzliche Zellen eine Vakuole, diese nimmt jedoch nur einen kleinen Teil des Zellvolumens ein (<5%) [Martinet et al., 1999]. Aufgrund ihrer geringen Größe konnte kein Einfluss der Vakuole auf die Elektrorotationsmessungen festgestellt werden.

Durch den Einsatz von Mikrostrukturen konnte der Messbereich auf Leitfähigkeiten von 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$  bis 5mS/cm ausgedehnt werden. Die Analyse der aufgenommenen Elektrorotationsspektren mit dem Einschalenmodell (Gl. 2) ergab für den gesamten Leitfähigkeitsbereich eine flächenspezifische Membrankapazität von  $C_m = 0,52 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , wobei dieser Wert etwas unterhalb von dem der Kompensationsmethode lag. Für die relative Permittivität und die innere Leitfähigkeit wurden Werte von  $\varepsilon = 126$  bzw.  $\sigma_{\text{cyt}} = 5,2 \text{ mS}/\text{cm}$  ermittelt.

Frühere Untersuchungen haben ergeben, dass die flächenspezifische Membranleitfähigkeit von tierischen und pflanzlichen Zellen in einem Bereich von 1 bis 20  $\text{mS}/\text{cm}^2$  liegen [Sukhorukov et al. 1998b; Kiesel et al 2006]. Mit einem Wert von  $G_m = 18,6 \text{ mS}/\text{cm}^2$  ist die flächenspezifische Membranleitfähigkeit von *Pichia pastoris* im Bereich der Werte von pflanzlichen Zellen angesiedelt. Messungen an Hefeprotoplasten von *Schizosaccharomyces pombe* ergaben einen deutlich höheren Wert mit 49  $\text{mS}/\text{cm}$

[Kriegmaier et al., 2001]. Die Autoren führten den erhöhten Wert auf zusätzliche Oberflächenstrukturen auf den Protoplasten wie beispielsweise unverdaute oder neu gebildete Fragmente der Zellwand zurück. Diese Strukturen bewirken eine Steigerung der tangentiellen Leitfähigkeit auf der Zelloberfläche, die sich in den Messergebnissen widerspiegelt. Da der hier gefundene Wert deutlich niedriger ist, kann davon ausgegangen werden, dass nur im geringen Maße Rückstände oder regenerierte Strukturen der Zellwand auf der Protoplastenmembran vorhanden sind. Dies ist wichtig, da bereits geringe Rückstände der Zellwand Verschmelzung der Membranen bei der Elektrofusion stark behindern können.

Die relative Permittivität von  $\varepsilon = 126$  stimmt gut mit dem Wert überein, der bei Untersuchungen an *Schizosaccharomyces pombe* Protoplasten ermittelt wurde ( $\varepsilon = 133$ ) [Kriegmaier et al., 2001], ist aber im Vergleich zu *Saccharomyces cerevisiae* Zellen ( $\varepsilon = 50-60$ ) [Asami und Yonezawa, 1996] relativ hoch. Eine Erklärung hierfür kann durch die Betrachtung der Struktur des Cytoplasmas gefunden werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass *Pichia pastoris* Zellen eine Reihe von Zellorganellen und einen relativ großen, von zwei Membranen umgebenen Zellkern besitzen [Mogelsvang et al., 2003]. Der Radius des Zellkerns nimmt etwa zwei Drittel der Größe des Radius der Gesamtzelle ein. Es ist somit denkbar, dass eine Dispersion des Cytoplasmas auftritt, die maßgeblich durch die elektrischen Parameter und die Größe des Zellkerns beeinflusst wird. Die Frequenz der Dispersion ( $f_d$ ) lässt sich wie folgt in erster Annäherung berechnen [Sukhorukov et al., 1998b]:  $f_d = (\sigma_{\text{cyt}} + R_k G_k) / (2\pi R_k C_k)$ . Unter Berücksichtigung der zwei seriell geschalteten Membranen der Kernlamina ist ein effektiver Wert von  $0,4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  für die flächenspezifische Membrankapazität der Kernlamina ( $C_k$ ) anzunehmen. Bei einer inneren Leitfähigkeit von  $5,2 \text{ mS}/\text{cm}$ , einem Zellkernradius von  $R_k \approx 1 \mu\text{m}$  und unter Vernachlässigung des Produktes aus dem Radius und der flächenspezifischen Leitfähigkeit des Zellkerns lässt sich eine Dispersion des Cytoplasmas bei einer Frequenz des Drehfeldes von  $\sim 20 \text{ MHz}$  erwarten. Daraus wird deutlich, dass sich die effektive innere Dispersion des Cytoplasmas, die mit der Elektrorotation gemessen wurde, aus einer Überlagerung der Dispersionen des Cytosols und großer Organellen, wie den hier beschriebenen Zellkern, zusammensetzt.

In Hinblick auf die innere Leitfähigkeit wurde bei Untersuchungen an *Schizosaccharomyces pombe* Protoplasten eine Abhängigkeit von der Leitfähigkeit des umgebenen Mediums beobachtet [Kriegmaier et al., 2001]. Je niedriger die externe



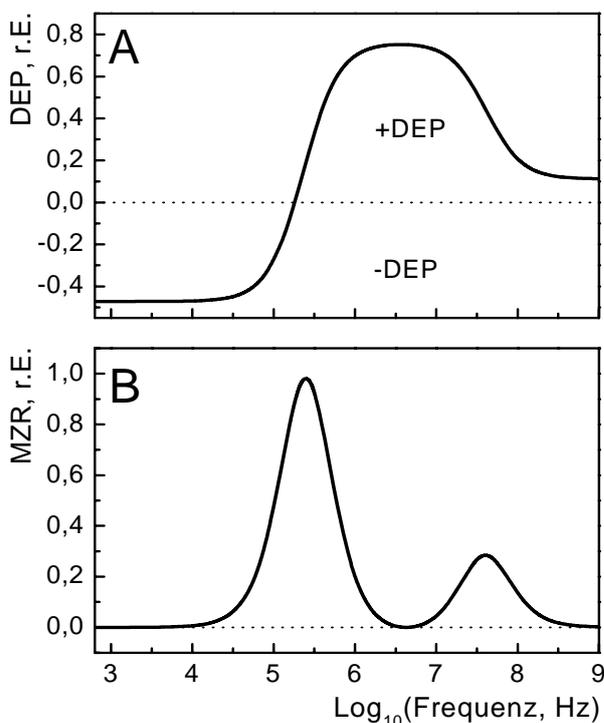
Leitfähigkeit eingestellt wurde, umso kleiner war die gemessene Leitfähigkeit im Cytosol der Protoplasten. Die Autoren erklären diesen Effekt durch Ionenverlust aus dem Cytosol infolge der stark belastenden enzymatischen Behandlung, die zur Isolation der Protoplasten notwendig war. Obwohl bei der Isolation der *Pichia pastoris* Protoplasten ähnliche Bedingungen eingesetzt wurden (siehe Material und Methoden), wiesen die Protoplasten keine derartige Veränderung der inneren Leitfähigkeit bei unterschiedlichen externen Leitfähigkeiten auf. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Veränderungen des Plasmalemmas infolge der enzymatischen Behandlungen nur geringfügig sind und keine größere Ionenpermeabilität induziert wurde. Die gemessene innere Leitfähigkeit von 5,2 mS/cm ist zwar im Vergleich zu *Schizosaccharomyces pombe* Zellen (9-10 mS/cm) relativ gering, andere Hefespezies weisen jedoch auch niedrigere Werte auf, wie beispielsweise *Candida tropicalis* Zellen (6,3 mS/cm) [Radu et al., 1996].

### 4.3 Analyse des dielektrophoretischen Sammelfeldes

Die dielektrophoretische Kraft, mit der die Zellen gesammelt und ihre Membranen in engen Kontakt zusammengebracht werden, verändert sich mit der Frequenz des elektrischen Wechselfeldes auf eine komplizierte Weise. Eine direkte Messung von Dielektrophoresespektren ist im Gegensatz zu den Elektrorotationsspektren experimentell nur sehr schwierig durchzuführen. Aus diesem Grund wurde ein Dielektrophoresespektrum für die Bedingungen berechnet, die für die Elektrofusion zu erwarten sind (Abb. 4.3 A). Das Spektrum wurde anhand der Gleichungen für die elektrische Polarisierbarkeit und die dielektrophoretische Kraft (Gl. 2 und 4) mithilfe der elektrischen Parameter, die mit der Elektrorotation ermittelt wurden, berechnet. Die Abbildung 4.3 A zeigt ein theoretisches Dielektrophoresespektrum für einen *Pichia pastoris* Protoplasten mit einem Radius von 1,5  $\mu\text{m}$ . Die dielektrophoretische Kraft ist oberhalb der Übergangsfrequenz von 300 kHz über einen weiten Frequenzbereich positiv. Zwischen 1 und 10 MHz weist das Spektrum ein breites Plateau auf, bei dem die dielektrophoretische Kraft ihr Maximum erreicht. In diesem Frequenzbereich wird die dielektrophoretische Kraft hauptsächlich durch die Leitfähigkeiten des Mediums und des Cytosols beeinflusst [Gimsa et al. 1991; Sukhorukov et al. 1998a]:  $F_{DEP} \propto (\sigma_{\text{cyt}} - \sigma_e) / (\sigma_{\text{cyt}} + 2\sigma_e)$ . Aus diesem Grund wurde für das Fusionsmedium eine möglichst niedrige Leitfähigkeit von 70  $\mu\text{S/cm}$  im Vergleich zu

5,2 mS/cm der inneren Leitfähigkeit gewählt, um die dielektrophoretische Kraft zu maximieren.

Während hochfrequente Felder notwendig sind, um Zellen durch positive Dielektrophorese in einen engen Kontakt zu bringen, treten in diesem Frequenzbereich aber auch Phänomene auf, die diesen Prozess behindern können. Eines dieser Phänomene ist die die Multizellrotation. Aufgrund der sehr hohen Dichte der Protoplastensuspension befinden sich viele Protoplasten nicht nur in Richtung des externen Feldes sondern auch parallel dazu in engem Kontakt. So überlagern sich das äußere und das durch den Dipol benachbarter Zellen erzeugte Feld, wodurch ein Drehmoment induziert werden kann [Holzapfel et al., 1982; Mahaworasilpa et al., 1996]. Durch diese Drehbewegungen kann es zur Destabilisierung oder sogar zu Abrissen der Zellketten kommen. Dies führt zu einem Verlust des Kontakts zwischen den Fusionspartnern. Die Abbildung 4.3 B zeigt ein theoretisches Frequenzspektrum für die Multizell-Rotation, welches, unter Verwendung der elektrischen Parameter aus den Elektrorotationsexperimenten, für einen *Pichia pastoris* Protoplasten mit einem Radius von 1,5  $\mu\text{m}$  berechnet wurde (Gl. 2 und 5).



**Abb. 4.3:** Theoretische Spektren für die Dielektrophorese (DEP, **A**) und die Multizellrotation (MZR, **B**) berechnet aus dem reellen Teil der komplexen Polarisierbarkeit  $\chi^*$  (Gl. 4 und 5). Die Spektren wurden für eine Zelle mit einem Radius von 1,5  $\mu\text{m}$  und den elektrischen Parametern, die mit den Elektrorotationsmessungen bestimmt wurden, erstellt. Für die äußere Leitfähigkeit wurde der Wert des Fusionsmediums von  $\sigma_e \approx 70 \mu\text{S/cm}$  eingesetzt.

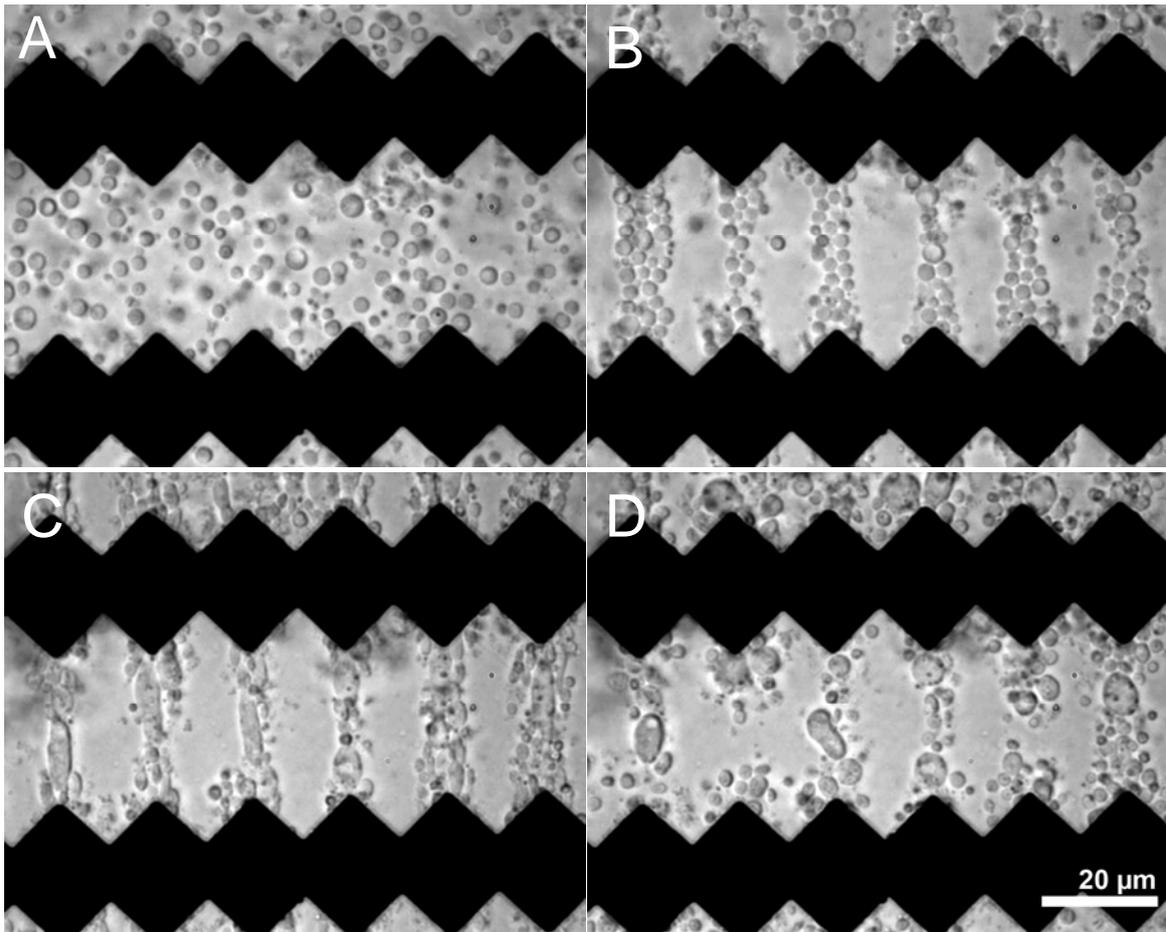
Die externe Leitfähigkeit entspricht der des Fusionsmediums von  $70 \mu\text{S}/\text{cm}$ . Das Spektrum der Multizell-Rotation weist zwei Rotationsmaxima bei 250 kHz und 40 MHz auf. In einem Frequenzbereich von 2 bis 8 MHz ist das induzierte Drehmoment nur minimal oder fast null, während die dielektrophoretische Kraft ihren maximalen positiven Wert erreicht (Abb. 4.3). Die verwendete Frequenz von 2 MHz ist somit optimal für die dielektrophoretische Sammlung der Zellen geeignet.

#### 4.4 Einfluss des Sammelfeldes auf die Elektrofusion

Für qualitative Voruntersuchungen der Elektrofusion von *Pichia pastoris* Protoplasten wurden zunächst interdigitale Mikrostrukturen eingesetzt, deren Elektroden sägezahnförmig in einem Abstand von  $30 \mu\text{m}$  gegenüberlagen (Abb. 4.4). Die Verwendung solcher Mikrostrukturen erlaubte es bei der geringen Größe der Protoplasten, die einzelnen Phasen der Fusion, wie die Kettenbildung, den elektrischen Durchbruch und das Verschmelzen der Membranen, sowie das Abrunden der Fusionate, genau zu beobachten und den Einfluss der verschiedenen Versuchsparameter zu ermitteln.

Ein wichtiger Faktor für gute Fusionsausbeuten war die Stärke der Sammelfelder. Um die Protoplasten fusionieren zu können, musste ein ausreichend enger Kontakt zwischen den Membranen hergestellt werden. Hier zeigte sich, dass für das Sammelfeld vor dem Durchbruchpuls Feldstärken von  $\geq 700 \text{ V}/\text{cm}$  notwendig waren, um eine Verschmelzung der Membranen zu erreichen. Als optimal erwiesen sich Feldstärken von  $900\text{-}1000 \text{ V}/\text{cm}$ . Vergleicht man diese Werte mit denen aus Experimenten von tierischen Zellen, so übersteigen sie diese um den Faktor von 3-4 [Sukhorukov et al., 2005; Schmidt et al., 2001; Zimmermann und Neil, 1996].

Betrachtet man die Gleichung für die dielektrophoretische Kraft (Gl. 4), so erkennt man deutlich die starke Abhängigkeit der dielektrophoretischen Kraft vom Radius der Zelle. Für die recht kleinen Protoplasten von *Pichia pastoris* ist es also notwendig, Felder von hoher Intensität einzusetzen. So wird eine starke Kraft erzeugt, die einen sehr engen Kontakt zwischen den Polen der Protoplasten ermöglicht.



**Abbildung 4.4:** Elektrofusion von *Pichia pastoris* Protoplasten. Die Protoplastensuspension (0,85 Osm, 70  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) wurde für die Fusion auf eine sägezahnförmige Mikrostruktur mit einem Elektrodenabstand von 30  $\mu\text{m}$  gegeben (A). Durch Anlegen eines Wechselfeldes (2 MHz, 1 kV/cm) reihten sich die Protoplasten perlenkettenartig auf (B). Die Applikation von 3 Gleichstrompulsen mit einer Feldstärke von 12 kV/cm und einer Pulsdauer von 15  $\mu\text{s}$  führte in den Perlenketten zur Bildung großer Fusionate aus mehreren Protoplasten (C). Nach Abschalten des Wechselfeldes bildeten die Fusionate langsam eine kugelförmige Gestalt aus (D).

Dagegen musste das Sammelfeld nach dem Durchbruchpuls eine wesentlich geringere Intensität aufweisen, da der Radius der fusionierten Zellen stark zunahm und damit auch die dielektrophoretische Kraft, die auf das Fusionat wirkte. Überstieg die angelegte Feldstärke einen Wert von 500 V/cm, so wurden die sich bildenden Fusionate durch die Kraft des Feldes wieder auseinander gerissen. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „cell fission“ bezeichnet, welches auch zielgerichtet für die Herstellung von kleinen Zellkörperchen verwendet wird [Marszalek, 1995]. Um Fusionate mit einem

Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  und darüber hinaus stabil zu halten, darf das Wechselfeld eine Feldstärke von 500 v/cm nicht überschreiten.

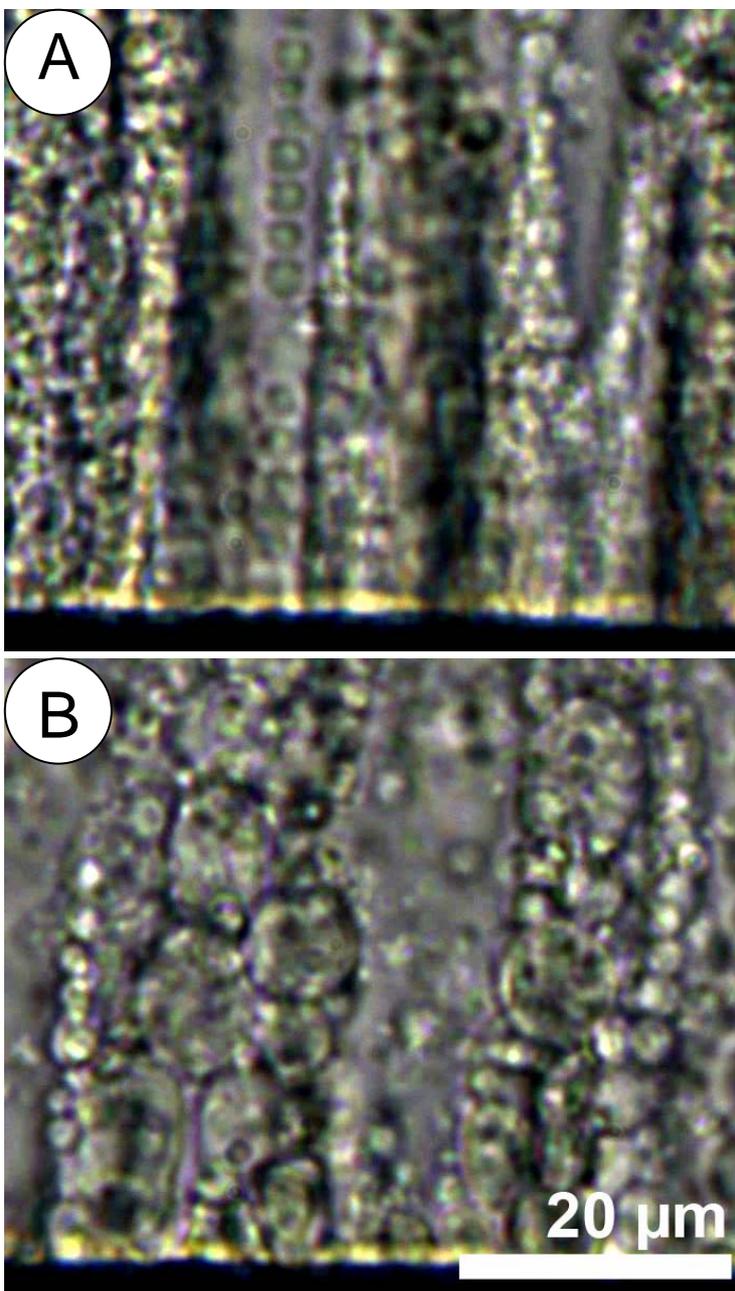
#### 4.5 Protoplastenpräparation und Medienzusammensetzung

Einen deutlichen Einfluss auf die Fusionsausbeute hatte die Oberflächenbeschaffenheit der Protoplasten. Bereits geringe Rückstände der Zellwand reichten aus, eine Fusion der Membranen zu unterbinden, da die Membranen nicht in einen engen Kontakt gebracht werden können. Aus diesem Grund wurde mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Calcofluor White der Fortschritt der Präparation der Protoplasten überprüft und der Zellwandverdau gegebenenfalls verlängert. Obwohl durch diesen mikroskopischen Nachweis gewährleistet werden konnte, dass die Zellwand nahezu vollständig verdaut wurde, ist es möglich, dass dennoch kleinste Spuren störender Oberflächenstrukturen zurückgeblieben sind. Untersuchungen von Fusionen mit stark strukturierten Oberflächen haben gezeigt, dass ein Sammelfeld von hoher Stärke notwendig ist, um eine gute Fusionseffizienz zu erreichen [Sukhorukov et. al, 2006].

Das Erreichen eines engen Membrankontaktes der Protoplasten wurde zusätzlich durch die Verwendung von hypoosmolaren Medium unterstützt. Der Radius der Protoplasten schwoll leicht von  $1,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$  bei 1,2 Osm auf  $1,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$  bei 0,85 Osm an. Da *Pichia pastoris* Protoplasten keine Mikrovilli besitzen [Mogelsvang et al., 2003], kann die Vergrößerung der Oberfläche nur durch Einbau von intrazellulären Membranspeichern erfolgen. Hierbei zeigte sich nur ein schmaler Bereich der Medienosmolarität für die Fusion der Protoplasten geeignet. Eine Absenkung der Osmolarität auf  $\leq 0,8$  Osm führte zu einer deutlichen Steigerung der Protoplasten-Mortalität während der Sammel- und der Durchbruchphase. Die Dehnung der Plasmalemmas, die durch das Anschwellen der Protoplasten verursacht wird, ist bei diesen Werten so stark, dass durch die applizierten Felder die Membran den induzierten Kräften nicht standhalten kann und aufreißt. Dagegen führte eine Erhöhung der Osmolarität auf  $\geq 0,9$  Osm zu einer nahezu vollständigen Unterbindung der Fusion. Nur vereinzelt zeigten sich Fusionate von geringer Größe. Als optimal erwies sich eine Osmolarität von 0,85 Osm, die für die weiteren Experimente beibehalten wurde.

#### 4.6 Einfluss der Protoplastendichte

Bei den Versuchen in der interdigitalen Mikrostruktur stellte sich heraus, dass mit dieser Elektrodengeometrie Fusionate mit einem maximalen Durchmesser von  $8\ \mu\text{m}$  hergestellt werden konnten. Die Verwendung von größeren Versuchskammern, bestehend aus zwei nebeneinander liegenden Platindrahtelektroden mit einem Abstand von 100 und  $200\ \mu\text{m}$  (Abb. 4.5) bzw. von Helixkammern mit gleichem Elektrodenabstand machte



**Abbildung 4.5:**

Riesenzellenfusion in einer Zweidrahtkammer. Die Verwendung einer Fusionskammer mit größeren Elektrodenabständen (hier  $200\ \mu\text{m}$ ) und die Erhöhung der Dichte der Protoplastensuspension auf  $5 \times 10^8$  Zellen/ml ermöglichte es, sehr viele Protoplasten während der Perlenkettenbildung in engen Kontakt zu bringen (A). So bildeten sich nach Applikation dreier Gleichstrompulse mit  $13\ \text{kV/cm}$  zahlreiche Riesenzellen mit einem Durchmesser von über  $10\ \mu\text{m}$  (B).

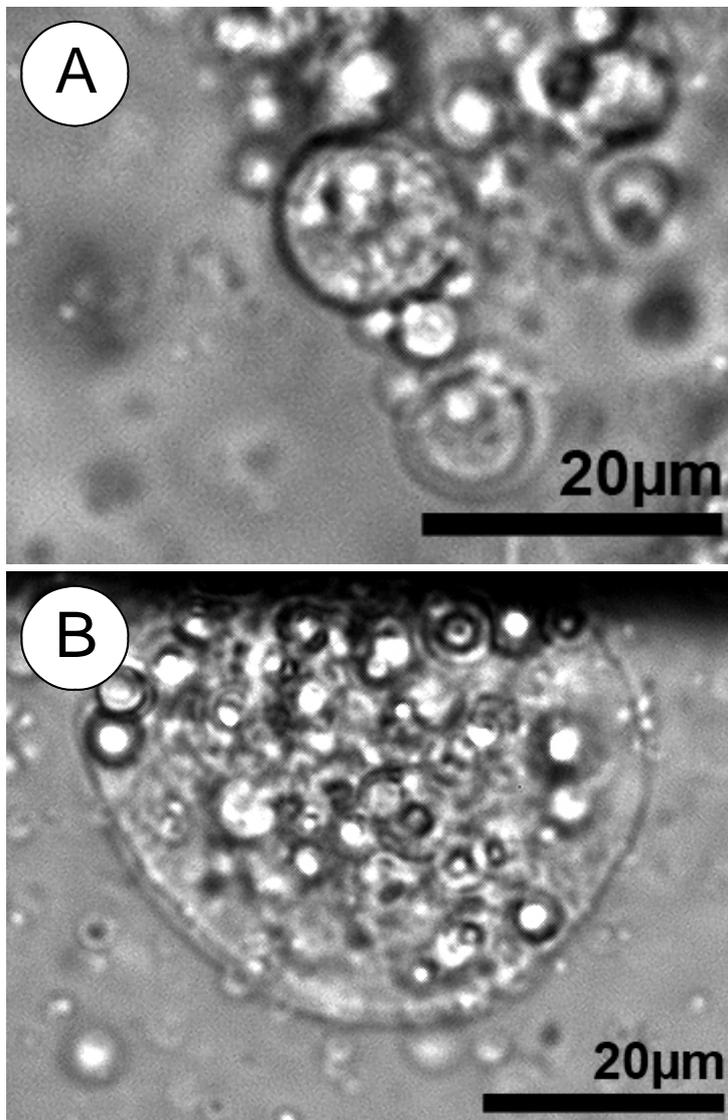
es möglich, eine erhöhte Anzahl von Protoplasten im Sammelfeld in nahen Kontakt zusammenzubringen. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Einsatz hoher Zelldichten die Größe der gebildeten Fusionate gesteigert werden kann [Pilwat et al., 1981; Scheurich und Zimmermann, 1981]. Einen deutlichen Effekt zeigte die Steigerung der Zelldichte von  $2 \times 10^8$  auf  $5 \times 10^8$  Zellen/ml. Die Größe der fusionierten Zellen stieg um 10-20%. Eine weitere Verdichtung der Zellsuspension hatte zur Folge, dass in der Fusionskammer schon bei Durchbruchpulsen von 10 kV/cm starke Verwirbelungen der Protoplasten auftraten. Durch den Verlust des Kontaktes konnten weniger Zellen miteinander verschmelzen, was die maximale Größe der Fusionate stark reduzierte (6-8  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.7 Analyse des elektrischen Durchbruchs

Wie es aus der Gleichung für die Aufladung einer Zellmembran (Gl. 9) ersichtlich wird, ist die optimale Zeitdauer des Durchbruchpulses maßgeblich durch die Zeit bestimmt, die für die Aufladung der Membran notwendig ist ( $\tau_m$ ). Die Gleichung  $\tau_m = R_1 C_m \left( \frac{1}{\sigma_{\text{cyt}}} + \frac{1}{2\sigma_e} \right)$  (Gl.10) zeigt das Verhältnis der Zeitkonstanten  $\tau_m$  zu der flächenspezifischen Kapazität, dem Radius der Zelle, der inneren und der äußeren Leitfähigkeit an [Zimmermann und Neil, 1996]. Verwendet man die elektrischen Parameter, die aus der Analyse der Rotationsdaten gewonnen wurden, bei einem mittleren Radius von 1,5  $\mu\text{m}$  und einer externen Leitfähigkeit von  $\sigma_e = 70 \mu\text{S/cm}$ , so erhält man für  $\tau_m$  einen Wert von 1,5  $\mu\text{s}$ . Die induzierte Membranspannung  $U_p$  erreicht ein stationäres Niveau nach dem 5-10-fachen von  $\tau_m$ . Folglich wurde eine Zeitdauer von 15  $\mu\text{s}$  für den Durchbruchpuls gewählt.

Die kritische Feldstärke  $E_c$ , die notwendig ist, um die den Elektroden zugewandten Membranflächen ( $\cos \vartheta = 1$ ) zu durchbrechen, kann näherungsweise mit der integrierten Laplace-Gleichung (Gl.11) ermittelt werden. Für die hier verwendeten *Pichia pastoris* Protoplasten ergibt sich mit einer kritischen Durchbruchspannung  $U_c = 1 \text{ V}$  bei Raumtemperatur, einem Formfaktor von 1,5 für sphärische Zellen und dem mittleren Radius von 1,5  $\mu\text{m}$  ein  $E_c$ -Wert von 4,4 kV/cm. In früheren Studien wurde gezeigt, dass die geeignetesten Feldstärken für den Durchbruch das 1-3 fache von  $E_c$  betragen [Zimmermann et al. 2000].

Für die Experimente wurden dementsprechend Feldstärken von 9-13 kV/cm eingesetzt. Mit zunehmender Feldstärke konnte eine Steigerung der Größe der gebildeten Riesenzellen festgestellt werden. In Einklang mit der integrierten Laplace-Gleichung (Gl. 11) vergrößert sich die durchbrochene Membranfläche mit zunehmender Feldstärke. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass durchbrochene Membranstellen nicht nur innerhalb von linearen Ketten sondern auch in Verzweigungen bei größeren Zelltrauben in ausreichend engen Kontakt treten und somit mehrerer Zellen gleichzeitig miteinander fusionieren. Die besten Ergebnisse wurden bei Feldstärken von 13 kV/cm erreicht ( $13,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$ , Abb. 4.6).



**Abbildung 4.6:** Riesenzellen aus *Pichia pastoris* Protoplasten. Durch Applikation von 3 Feldpulsen mit einer Feldstärke von 13 kV/cm und einer Zelldichte von  $5 \times 10^8$  Zellen/ml wurde bei den 5% größten Riesenzellen ein mittlerer Durchmesser von  $13,2 \mu\text{m}$  erzielt (A). In einzelnen Fällen wurde bei den Fusionen auch deutlich größeren Riesenzellen beobachtet, die einen Durchmesser von bis zu  $42 \mu\text{m}$  erreichten (B).



Eine weitere Erhöhung der Feldstärke auf 15 kV/cm und darüber hinaus führte zu starken Verwirbelungen der Protoplasten bei der Pulsapplikation, die die Fusion deutlich beeinträchtigten. Diese Verwirbelungen sind vermutlich einerseits auf eine starke Erwärmung des Zellinneren zurückzuführen, wodurch eine starke Konvektion entsteht. Andererseits können sehr kurze Gleichstrompulse mit hoher Feldstärke einen dielektrophoretischen Impuls erzeugen, wodurch die Zellen in Bewegung geraten. In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der Fusionen mittels Helixkammern in Abhängigkeit der Zelldichte, Anzahl und Feldstärke der applizierten Durchbruchpulse zusammengefasst. Die angegebenen Durchmesser sind die gemittelten Werte der größten 5 % der gemessenen fusionierten Protoplasten.

**Tabelle 4.1:** Einfluss der Pulsbedingungen auf die durchschnittliche Größe der Riesenzellen\*

Pulszahl	Stärke des Feldpulses		
	9 kV/cm	11 kV/cm	13 kV/cm
2	9,4 ± 0,1 µm	11,2 ± 0,2 µm	11,3 ± 0,2 µm
	(8,5 ± 0,1 µm)	(9,9 ± 0,1 µm)	(10,5 ± 0,2 µm)
3	9,8 ± 0,1 µm	11,5 ± 0,1 µm	13,2 ± 0,2 µm
	(9,2 ± 0,1 µm)	10,5 ± 0,1 µm	(11,0 ± 0,2 µm)
4	9,7 ± 0,1 µm	11,6 ± 0,2 µm	12,5 ± 0,2 µm
	(9,0 ± 0,1 µm)	(10,1 ± 0,2 µm)	(10,8 ± 0,1 µm)

\* Die Daten sind die Mittelwerte ± SE von 5-6 unabhängigen Messungen. Die Experimente wurden bei Zelldichten von  $2 \times 10^8$  (in Klammern gesetzt) und  $5 \times 10^8$  Zellen/ml durchgeführt.

Hinsichtlich der Anzahl der Feldpulse wurden folgende Beobachtungen gemacht. Eine Erhöhung der Pulszahl von 2 auf 3 führte zu einer deutlichen Zunahme der Fusionatsgröße um 5-20 %. Die Verwendung von 4 Durchbruchpulsen resultierte in keiner weiteren Steigerung der Größe der Riesenzellen bzw. teilweise in einer Verminderung. Der Grund hierfür kann einerseits in der zunehmenden Belastung und daraus folgenden Schädigung der Protoplasten durch die weiteren Pulse liegen, wodurch eine Fusion erschwert oder verhindert wurde. Außerdem wird gerätebedingt das Wechselfeld für die Applikation der Durchbruchpulse abgeschaltet. Diese Zeit beträgt pro zusätzlichen Puls 1s,

so dass die Protoplasten zunehmend auseinander trieben und der Kontakt zwischen den durchbrochenen Membranstellen verloren ging.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei einer Feldstärke von 13 kV/cm mit 3 Pulsen und einer Zelldichte von  $5 \times 10^8$  Zellen/ml ein Optimum für die Riesenzellen mit einem mittleren Durchmesser von 13,2  $\mu\text{m}$  erzielt wurde. Die fusionierten Protoplasten wiesen dabei Größen von 9-19  $\mu\text{m}$  auf. In einzelnen Fällen wurde bei den Fusionen auch deutlich größeren Riesenzellen beobachtet, die einen Durchmesser von bis zu 42  $\mu\text{m}$  erreichten. Die Herstellung solch großer Zellen war jedoch eher zufällig und konnte nicht zuverlässig reproduziert werden.

## Kapitel 5

### Ergebnisse und Diskussion

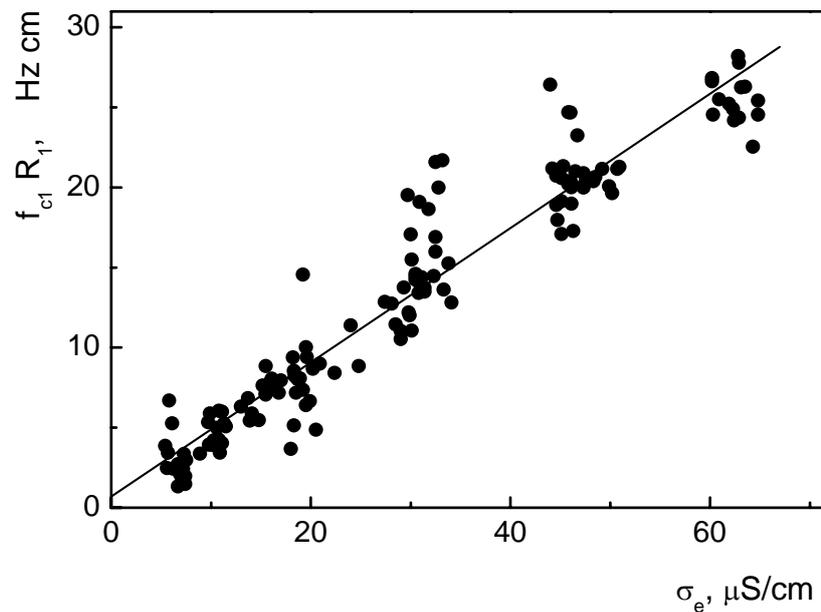
#### 5. Mechanismus elektrisch induzierter $Ca^{2+}$ -Flüsse in BY-2 Tabakzellen

Im vorangegangenen Kapitel wurden mit einer gründlichen dielektrischen Untersuchung die Parameter für die Elektrofusion der relativ einfach strukturierten *Pichia pastoris* Protoplasten ermittelt. Im Gegensatz dazu muss bei der Applikation elektrischer Felder auf BY-2 Tabakzellen ihre Vakuole berücksichtigt werden, da diese über 90 % des Zellvolumens ausmacht. Beim Einsatz elektrischer Gleichstromfelder, wie sie bei der Elektrofusion und der Elektropermeabilisierung verwendet werden, können sowohl das Plasmalemma als auch der Tonoplast elektrisch aufgeladen und durchbrochen werden.

In diesem Kapitel sollen die Aufladungsprozesse von Plasmalemma und Tonoplast zum einen anhand ihrer elektrischen Membraneigenschaften auf Basis des Dreischalenmodells und zum anderen durch die Analyse von  $Ca^{2+}$ -Transmembranflüssen mithilfe des  $Ca^{2+}$ -Reporterproteins Aequorin beschrieben werden.

##### 5.1 Elektrorotation von vakuolisierten BY-2 Protoplasten

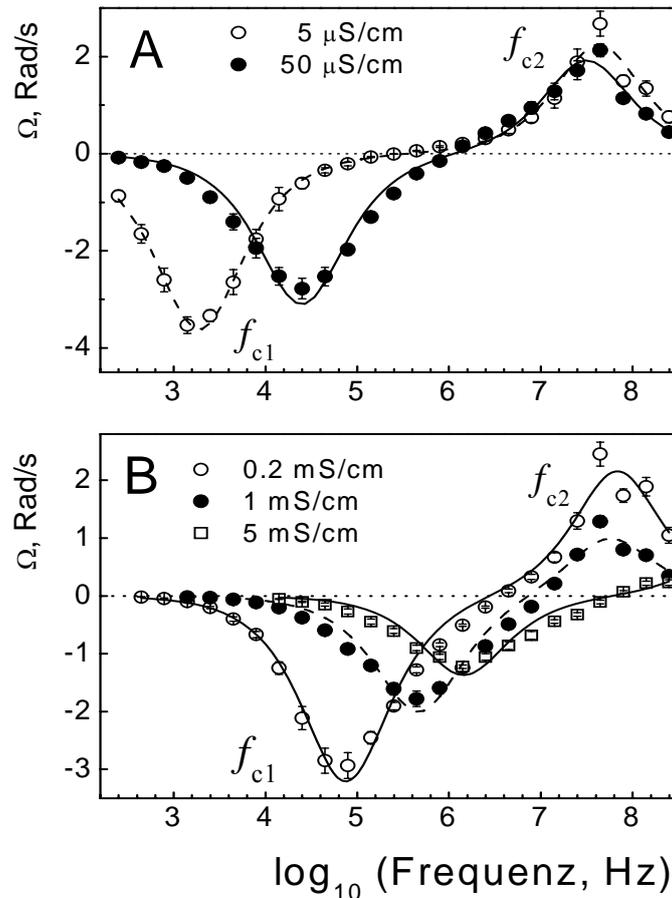
Die Bestimmung der elektrischen Parameter der Zellmembranen von vakuolisierten BY-2 Protoplasten wurde mit der Elektrorotationsmethode durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Kompensationsmethode eingesetzt. Die Messungen erfolgten in einem Leitfähigkeitsbereich von 5-65  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Die Daten der Kompensationsmethode zeigten ein deutliches lineares Verhältnis zwischen dem Produkt  $f_{c1} \times R_1$  und der externen Leitfähigkeit  $\sigma_e$  in Übereinstimmung mit dem Einschalenmodell (Gl. 8) (Abb. 5.1). Somit war es möglich die Werte für die flächenspezifische Membrankapazität ( $C_m$ ) und die flächenspezifische Membranleitfähigkeit ( $G_m$ ) zu berechnen. Der Fit der Daten ergab die Werte  $C_m = 0,76 \pm 0,02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und  $G_m = 2,6 \pm 0,02 \text{mS}/\text{cm}^2$



**Abbildung 5.1:** Untersuchung von vakuolisierten BY-2 Protoplasten mittels der Kompensationsmethode. Die Abbildung zeigt die radiusnormierten Daten der charakteristischen Frequenz  $f_{c1}$  des Maximums der Anti-Feld-Rotation von ungefähr 140 Protoplasten, die bei sehr geringen externen Leitfähigkeiten  $\sigma_e$  zwischen  $\sim 5$  und  $65 \mu\text{S/cm}$  gemessen wurden. Die Daten wurden mithilfe der Gleichung 8 angefitet, wobei für die flächenspezifische Membrankapazität ein Wert von  $C_m = 0,76 \pm 0,02 \mu\text{F/cm}^2$  und für die flächenspezifische Membranleitfähigkeit ein Wert von  $G_m = 2,6 \pm 1,4 \text{ mS/cm}^2$  berechnet wurden.

Um die elektrischen Parameter der BY-2 Protoplasten über einen größeren Bereich der Leitfähigkeit bestimmen zu können, wurden vollständige Elektrorotationspektren zwischen  $5 \mu\text{S/cm}$  und  $5 \text{ mS/cm}$  gemessen. Wie Abbildung 5.2 veranschaulicht, weisen die Elektrorotationspektren zwei weit auseinander liegende Maxima entgegengesetzter Richtung auf. Die Fits der Elektrorotationspektren mit zwei Lorentzfunktionen (Gl. 7) erlaubt eine genaue Bestimmung der charakteristischen Frequenzen  $f_{c1}$  und  $f_{c2}$  für die Maxima der Antifeld-Rotation bzw. der Cofeld-Rotation. Zur Verdeutlichung der Daten wurden die charakteristischen Frequenzen  $f_{c1}$  und  $f_{c2}$  gegen die externe Leitfähigkeit  $\sigma_e$  aufgetragen (Abb. 5.3).

Der Cofeld-peak wies im Bereich einer Leitfähigkeit von  $5 \mu\text{S/cm}$  bis  $1 \text{ mS/cm}$  nur geringe Veränderungen auf. Zwischen  $5$  und  $200 \mu\text{S/cm}$  war die

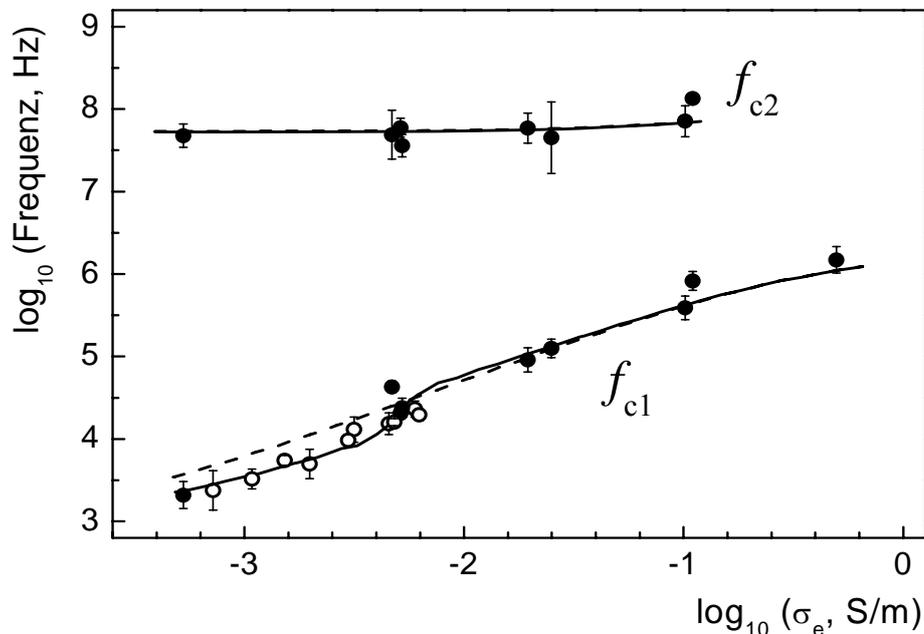


**Abbildung 5.2:** Rotationsspektren von vakuolisierten BY-2 Protoplasten bei unterschiedlichen externen Leitfähigkeiten  $\sigma_e$  (**A:** 5-50  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , **B:** 0,2-5  $\text{mS}/\text{cm}$ ). Jedes Spektrum eines Leitfähigkeitsbereichs stellt den Mittelwert ( $\pm$  SE) der Einzelspektren von 9-14 Zellen dar. Die Kurven zeigen die Fits mit zwei Lorentzfunktionen (Gl. 7) zu den gemessenen Elektrorotationsspektren. Die charakteristischen Frequenzen  $f_{c1}$  und  $f_{c2}$  korrespondieren mit den Maxima der Anti- bzw. Co-Feld-Rotation.

Rotationsgeschwindigkeit nahezu konstant ( $\Omega \approx 2$  rad/s) und verminderte sich bei 1  $\text{mS}/\text{cm}$  auf  $\sim 0,8$  rad/s. Die charakteristische Frequenz  $f_{c2}$  bewegte sich dabei in einem Bereich von 40-60 MHz. Bei einer Leitfähigkeit von 5  $\text{mS}/\text{cm}$  verschob sich der Cofeld-peak zu Frequenzen oberhalb von 150 MHz und konnte daher nicht mehr aufgelöst werden. Im Gegensatz zur Cofeld-Rotation wies die Antifeld-Rotation eine viel stärkere Abhängigkeit von der externen Leitfähigkeit auf. Bei einer Leitfähigkeit von  $\sigma_e = 5$   $\mu\text{S}/\text{cm}$  trat die schnellste Antifeld-Rotation mit einer Geschwindigkeit von  $\Omega \approx 4$  rad/s auf. Mit

zunehmender Leitfähigkeit sank die Rotationsgeschwindigkeit des Antifeld-peaks bis auf einen Wert von  $\Omega \approx 1,5$  rad/s bei einer Leitfähigkeit von 5 mS/cm. Die charakteristische Frequenz des Antifeld-peaks verschob sich dabei von  $\sim 2$  kHz auf 1,6 MHz.

Der Fit der Elektrorotationsspektren der vakuolisierten BY-2 Protoplasten mit dem Einschalenmodell (Gl. 2) ergab in einem Leitfähigkeitsbereich des Mediums von 0,2-5 mS/cm für die flächenspezifische Membrankapazität einen Wert von  $C_m = 0,41 \pm 0,01$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $n = 22$ ).



**Abbildung 5.3:** Abhängigkeit der charakteristischen Frequenzen  $f_{c1}$  und  $f_{c2}$  der Maxima der Anti- bzw. Co-Feld-Rotation von der externen Leitfähigkeit  $\sigma_e$ . Die Daten setzen sich aus den Werten der Rotationsspektren (ausgefüllte Punkte) und der Kompensationsmethode (leere Punkte) zusammen. Die Kurven wurden mit dem Einschalenmodell (gestrichelte Linie) bzw. dem Dreischalenmodell (durchgezogene Linie) auf der Basis der Daten aus Tabelle 2.1 (Theoretischer Hintergrund) erstellt.

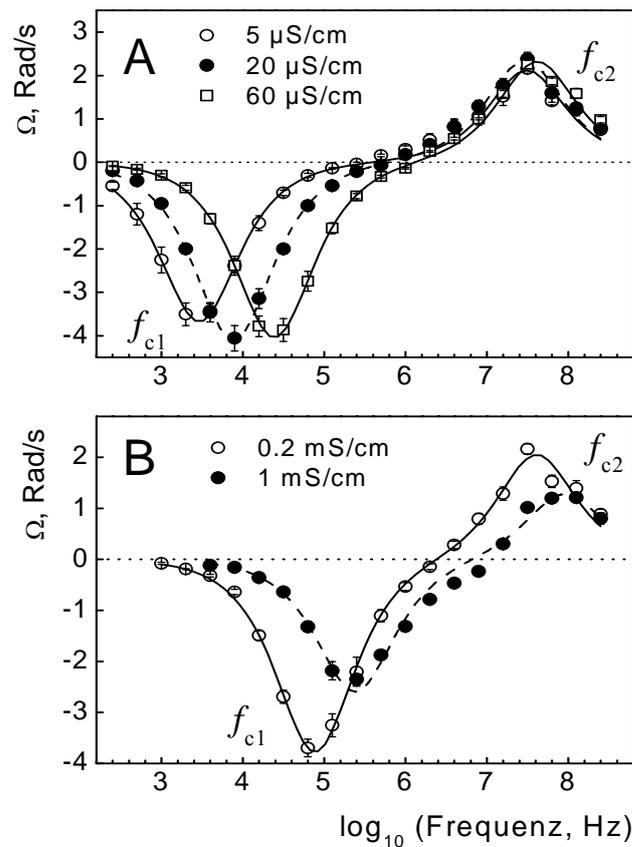
Bei niedrigen externen Leitfähigkeiten (5-50  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) wurde ein deutlich höherer Wert von  $0,60 \pm 0,02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $n = 16$ ) berechnet. Im Gegensatz zur flächenspezifischen Membrankapazität zeigten die cytosolischen Parameter keine Abhängigkeit von der externen Leitfähigkeit. Über den ganzen Leitfähigkeitsbereich von 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$  - 5  $\text{mS}/\text{cm}$  wurden für die relative Permittivität ein Wert von  $\epsilon = 88 \pm 6$  und für die innere Leitfähigkeit ein Wert von  $\sigma_{\text{cyt}} = 7.3 \pm 0,4 \text{ mS}/\text{cm}$  erhalten.

Die Abbildung 5.3 verdeutlicht, dass die Abhängigkeit der charakteristischen Frequenz von der externen Leitfähigkeit nicht linear ist.

## 5.2 Elektrorotation von evakuolisierten BY-2 Protoplasten

Die Untersuchung evakuolierter Protoplasten mittels der Elektrorotation sollte Aufschluss darüber geben, in wie weit die Abhängigkeit der charakteristischen Frequenz des Antifeld-peaks von der externen Leitfähigkeit durch den Tonoplasten beeinflusst wird. Evakuolierte Protoplasten enthalten, wie der Name sagt, keine Vakuole und entsprechen damit dem Einschalenmodell.

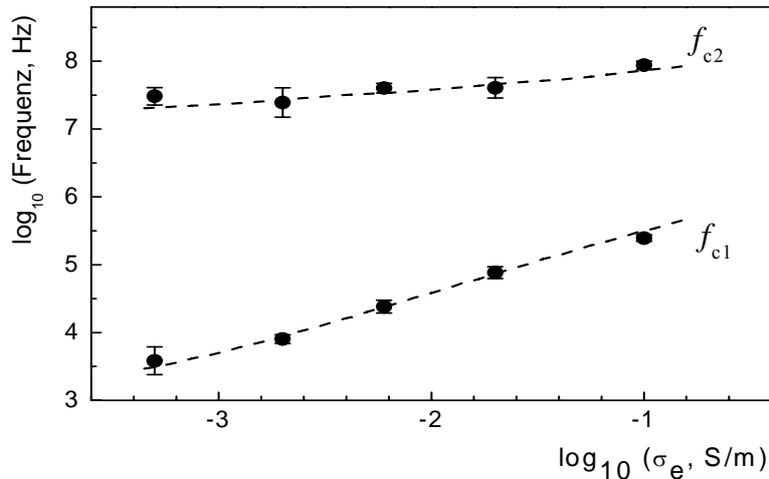
Die Elektrorotationsspektren wurden in einem Leitfähigkeitsbereich von 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$  bis 1  $\text{mS}/\text{cm}$  aufgenommen. Die charakteristischen Frequenzen der Antifeld- und Cofeld-Rotation  $f_{c1}$  bzw.  $f_{c2}$  wurden durch einen Fit mit zwei Lorentzfunktionen (Gl. 7) bestimmt. Die Abbildung 5.4 A und B zeigen die Rotationsspektren der evakuolisierten Protoplasten bei 5-60  $\mu\text{S}/\text{cm}$  bzw. bei 0,2 bis 1  $\text{mS}/\text{cm}$ . Ähnlich wie bei vakuolisierten Protoplasten zeigte der Cofeld-peak nur geringe Veränderungen. Zwischen 5 und 200  $\mu\text{S}/\text{cm}$  war die Drehgeschwindigkeit der Protoplasten nahezu gleich bleibend ( $\Omega \approx 2 \text{ rad}/\text{s}$ ) und

**Abbildung 5.4:**

Rotationspektren von evakuolierten BY-2 Protoplasten bei verschiedenen externen Leitfähigkeiten  $\sigma_e$  (**A**: 5-60  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , **B**: 0,2-1  $\text{mS}/\text{cm}$ ). Jedes Spektrum ist der Mittelwert ( $\pm$  SE) von 5-7 Zellen. Die Kurven zeigen die Fits mit zwei Lorentzfunktionen (Gl. 7) zu den gemessenen Elektrorotationspektren. Die charakteristischen Frequenzen  $f_{c1}$  und  $f_{c2}$  korrespondieren mit den Maxima der Anti- bzw. Cofeld-Rotation.

verminderte sich bei 1  $\text{mS}/\text{cm}$  auf  $\sim 1$   $\text{rad}/\text{s}$ . Die charakteristische Frequenz blieb dabei nahezu konstant bei  $f_{c2} \approx 30$   $\text{MHz}$ . Die Rotationsgeschwindigkeit des Antifeld-peaks blieb zwischen 5 und 200  $\mu\text{S}/\text{cm}$  ebenfalls nahezu unverändert ( $\Omega \approx 3,5-4$   $\text{rad}/\text{s}$ ) und betrug bei 1  $\text{mS}/\text{cm}$   $\sim 2,5$   $\text{rad}/\text{s}$ . Die charakteristische Frequenz verschob sich dabei von 4  $\text{kHz}$  auf 100  $\text{kHz}$ . Die Abbildung 5.5 verdeutlicht die Abhängigkeit der charakteristischen Frequenzen von der externen Leitfähigkeit. Während bei den vakuolisierten Protoplasten eine deutliche Diskontinuität in der Steigung der  $f_{c1}$ -Werte zu erkennen war (Abb. 5.3), zeigte sich bei evakuolierten Protoplasten eine nahezu lineare Abhängigkeit von  $f_{c1}$  von  $\sigma_e$ .





**Abbildung 5.5:** Leitfähigkeitsabhängigkeit der charakteristischen Frequenzen  $f_{c1}$  und  $f_{c2}$  aus den Rotationspektren von evakuolierter BY-2 Protoplasten. Jeder Punkt ist der Mittelwert ( $\pm$  SE) von 5-7 Zellen. Die Kurven wurden basierend auf den berechneten Parametern der Rotationspektren mit Hilfe des Einschalenmodells generiert ( $\epsilon = 116 \pm 5$ ,  $\sigma_i = 5,1 \pm 0,2$  mS/cm,  $G_m = 1,6 \pm 0,3$  mS/cm<sup>2</sup>,  $n = 26$ )

Der Fit der Elektrorotationsspektren der evakuolisierten BY-2 Protoplasten mit dem Einschalenmodell (Gl 2) zeigte keine Abhängigkeit der flächenspezifischen Membrankapazität von der Leitfähigkeit des Mediums. Über den gesamten Bereich der externen Leitfähigkeit wurden für die flächenspezifischen Membrankapazität ein Wert von  $C_m = 0,65 \pm 0,01$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , für die relative Permittivität ein Wert von  $\epsilon = 116 \pm 5$  und für die innere Leitfähigkeit ein Wert von  $\sigma_{\text{cyt}} = 5,1 \pm 0,2$  mS/cm berechnet ( $n = 26$ ).

### 5.3 Analyse der Elektrorotationsspektren auf der Basis des Ein- und des Dreischalenmodells

Die Auswertung der Elektrorotationsspektren von vakuolisierten und evakuolisierten BY-2 Protoplasten unter Zuhilfenahme des Einschalenmodells zeigte, dass die zellulären elektrischen Parameter sich deutlich bezüglich ihrer Abhängigkeit von der externen Leitfähigkeit unterschieden. Die Leitfähigkeit und die Permittivität des Cytoplasmas wiesen keine Veränderung über den betrachteten Leitfähigkeitsbereich des

Mediums auf. Dies verdeutlicht die Auftragung der charakteristischen Frequenzen  $f_{c2}$  der Cofeld-Rotation gegen die externe Leitfähigkeit (Abb. 5.3 und 5.5).

Aus dem Fit der Elektrorotationspektren konnten die relative Permittivität, die interne Leitfähigkeit und die flächenspezifische Membranleitfähigkeit berechnet werden. Die Berechnungen zeigten, dass bei evakuolisierten Protoplasten auch die flächenspezifische Membrankapazität unabhängig von der externen Leitfähigkeit ist (Abb. 5.5). Es ergab sich für den ganzen Leitfähigkeitsbereich ein gemittelter Wert von  $C_m = 0,65 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Ein deutlicher Unterschied hierzu konnte bei den vakuolisierten Protoplasten festgestellt werden. Im Bereich von hohen Leitfähigkeiten (0,2-5 mS/cm) wurde ein Wert von  $C_m = 0,41 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $n = 22$ ) ermittelt. Dieser Wert stimmt gut mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen an pflanzlichen Zellen ( $C_m = 0,24\text{-}0,48 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) überein, bei denen die flächenspezifischen Membrankapazitäten in der Regel nur halb so groß oder kleiner waren als die, die bei tierischen Zellen ( $0,8\text{-}1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) gefunden wurden [Arnold und Zimmermann, 1982; Glaser et al., 1983; Kaler und Jones, 1990; Sukhorukov et al., 1993; Sukhorukov et al., 1994]. Bei niedrigen externen Leitfähigkeiten stieg die flächenspezifische Membrankapazität deutlich auf einen Wert von  $C_m = 0,60 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  an. Die Kompensationsmethoden ergab sogar noch höhere Werte von  $C_m = 0,76 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Besonders deutlich wird der Anstieg des  $C_m$ -Wertes anhand der strengen Nichtlinearität der Abhängigkeit der charakteristischen Frequenz  $f_{c1}$  des Antifeld-Rotationspeaks von der externen Leitfähigkeit (Abb. 5.3).

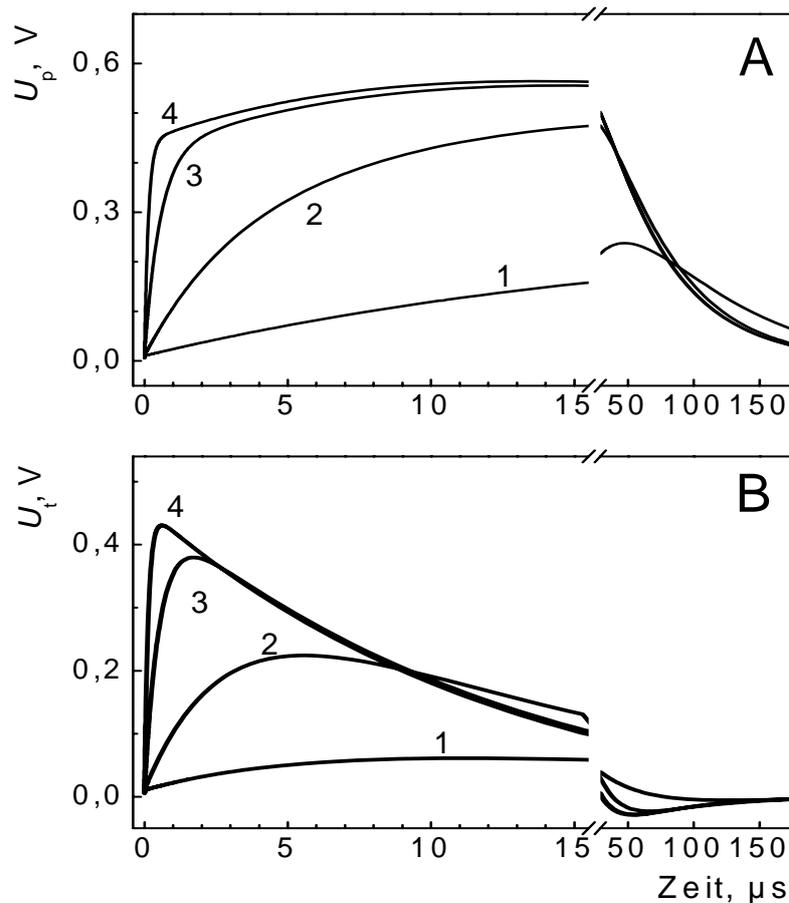
Die verschiedenen  $C_m$ -Werte bei hohen und niedrigen Leitfähigkeiten lassen sich unter der Annahme erklären, dass die Aufladung des Plasmalemmas und des Tonoplasten unterschiedlich von der externen Leitfähigkeit beeinflusst werden. Ein deutlicher Hinweis hierauf ergibt sich aus dem Vergleich der experimentell erworbenen Rotationsdaten (Abb. 5.2 und 5.4) mit den numerisch simulierten Elektrorotationspektren, die auf der Basis des Ein- und Dreischalenmodells berechnet wurden (Abb. 2.2, Theoretischer Hintergrund). Man kann beobachten, dass sich die experimentell ermittelten Cofeld-peaks unabhängig von der externen Leitfähigkeit gleich gut sowohl mit dem Ein- als auch mit dem Dreischalenmodell beschreiben lassen. Für die Antifeld-peaks trifft dies auch im Bereich von hohen Leitfähigkeiten (Abb. 2.2, Kurven 3 und 4) zu. Bei niedrigen Leitfähigkeiten ( $< 50 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) jedoch beschreibt das Dreischalenmodell den Antifeld-peak wesentlich besser als das Einschalenmodell, da es dessen Verschiebung zu niedrigeren Frequenzen, wie sie experimentell beobachtet wurden, vorhersagt. Die gute Übereinstimmung zwischen den experimentell ermittelten und den theoretischen

Elektrorotationspektren des Dreischalenmodells führen zu der Vermutung, dass sowohl das Plasmalemma als auch der Tonoplast ähnliche flächenspezifische Kapazitäten ( $C_p$  und  $C_t$ ) besitzen, deren Effekt auf die Elektrorotation jedoch von der externen Leitfähigkeit abhängt. Bei hohen Leitfähigkeiten werden beide Membranen aufgeladen. Das bedeutet, dass die flächenspezifische Membrankapazität der gesamten Membranbarriere einen Wert von  $0,4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  annimmt, da die einzelnen Membranen in Serie geschaltet sind. Bei sehr niedrigen Leitfähigkeiten (z. B.  $10 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) jedoch wird nur eine der beiden Membranen aufgeladen, so dass die effektive flächenspezifische Membranleitfähigkeit auf  $0,6$ - $0,76 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ansteigt. Ein ähnlicher Wert wurde auch bei den einschaligen evakuolisierten Protoplasten gefunden. Diese Vermutung wird durch die berechneten Transmembranpotentiale des Plasmalemma und des Tonoplasten in der Frequenzdomäne bestätigt (siehe Theoretischer Hintergrund, Abb. 2.3).

#### 5.4 Induzierte Transmembranpotentiale in der Zeitdomäne

Während die Frequenzspektren anhand der Elektrorotationsdaten vakuolisierten Protoplasten berechnet wurden, sind die pulsinduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmembranflüsse bei unverdauten BY-2 Zellen mit intakter Zellwand gemessen worden. Dennoch ist eine Transformation der Frequenzspektren in die Zeitdomäne zulässig, da die Zellwand aufgrund ihrer Durchlässigkeit und ihrer hohen Leitfähigkeit nur einen sehr geringen Effekt auf die Aufladung der Membranen zeigt [Geier et al., 1987]. Die Abbildung 5.6 verdeutlicht den zeitlichen Verlauf der Spannungen über das Plasmalemma  $U_p$  und den Tonoplasten  $U_t$  nach einem exponentiell abfallenden Feldpuls mit einer Stärke von  $400 \text{ V}/\text{cm}$ . Es ist deutlich zu erkennen, dass der Aufladungsprozess des Plasmalemmas in den ersten  $10 \mu\text{s}$  bei niedrigen Leitfähigkeiten mit einer exponentiellen Funktion beschrieben werden kann (Abb. 5.6 A, Kurven 1 und 2), während bei hohen Leitfähigkeiten zwei exponentielle Funktionen nötig sind (Kurven 3 und 4).

Nach  $50 \mu\text{s}$  fällt  $U_p$  mit einer Zeitkonstante von ungefähr  $50 \mu\text{s}$  ab, was der Zeitkonstanten des applizierten Feldpulses entspricht. Außerdem steigt mit zunehmender Leitfähigkeit die Amplitude der induzierten Spannung  $U_p$ , während sich gleichzeitig die Aufladung des Plasmalemmas beschleunigt. Wie aus den Frequenzspektren erwartet werden konnte, verläuft die Aufladung des Tonoplasten in den ersten  $15 \mu\text{s}$  nicht monoton, besonders in Hinblick auf die hohen Leitfähigkeiten (Kurven 2-4).



**Abbildung 5.6:** Abhängigkeit der induzierten Spannung über das Plasmalemma  $U_p$  und den Tonoplasten  $U_t$  von der externen Leitfähigkeit als Funktion der Zeit. Die Kurven (1-4) wurden für die Leitfähigkeiten von 0,01, 0,08, 0,64 bzw. 5,12 mit den Parametern aus den Messungen der vakuolisierten Protoplasten (Tabelle 2.1, Theoretische Hintergrund) generiert. Die Spannungstransienten wurden für einen exponentiell abfallenden Feldpuls von 400 V/cm mit einer Zeitkonstante von 50  $\mu\text{s}$  berechnet.

Nach einem Feldpuls wird der Tonoplast schnell bis zum Erreichen des Maximalwertes von  $U_t$  geladen und entlädt sich darauf hin wieder langsam. Nach ungefähr 15  $\mu\text{s}$ , wenn die Aufladung des Plasmalemmas ihr Maximum erreicht hat, ist die Spannung über den Tonoplasten sehr niedrig. Interessanterweise werden, wie bei  $U_p$ , die Höhe und die Steigerungsrate von  $U_t$  durch die Leitfähigkeit des Mediums beeinflusst. Beide Parameter steigen mit Zunahme der externen Leitfähigkeit. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden nun die Untersuchungen an BY-2 Zellen ausgeführt.

## 5.5 Applikation einzelner Feldpulse in Gegenwart von extrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$

Die Analyse der Membranaufladungsprozesse mittels Gleichstromfelder wurden anhand von Experimenten mit elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmembranflüsse durchgeführt. Setzt man Zellen einem kurzen, elektrischen Gleichstrompuls aus, so können die induzierten Transmembranpotentiale die Membranpermeabilität erhöhen und somit einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Cytosol bewirken. In Aequorin-transformierten BY-2 Zellen lässt sich diese Zunahme an freiem cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  durch einen Anstieg der Chemilumineszenz messen. Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der Chemilumineszenzantwort von der Zusammensetzung des externen Mediums und der Stärke des angelegten elektrischen Feldes untersucht.

Betrachtet man Aequorin-transformierte BY-2 Zellen in einem Pulsmedium mit 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , so zeigte sich vor Applikation eines elektrischen Feldpulses ein konstanter Hintergrundlevel der Chemilumineszenz von  $(0,4-0,6) \times 10^3$  relativen Einheiten (r.E.). Legte man nun einen einzelnen Feldpuls von mindestens 200 V/cm an, so stiegen die Werte der Chemilumineszenz, verursacht durch den Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, innerhalb kurzer Zeit auf einen Maximalwert  $CL_{\max}$ . Bei einem Feldpuls von beispielsweise 400 V/cm wurde innerhalb von 0,2 s nach Pulsapplikation ein  $CL_{\max}$ -Wert von  $\sim 8 \times 10^4$  r.E. erreicht (Abb. 5.7). Bei einer Steigerung der Feldstärke von 400 auf 800 V/cm erhöhte sich der  $CL_{\max}$ -Wert etwa um das Zehnfache. Nachdem die Chemilumineszenz ihren höchsten Wert erreicht hatte, verminderte sie sich allmählich bis zu einem finalen Wert  $CL_f$  von ungefähr  $10^3$  r.E. Dieser finale Wert lag etwas über dem Hintergrundwert  $CL_0$ , der vor der Pulsapplikation gemessen wurde. Qualitativ vergleichbare Chemilumineszenzsignale wurden in einem Bereich der Feldstärke von 200 bis 800 V/cm nach Pulsapplikation gemessen.



$$CL(t) = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2} + CL_f \quad (16)$$

$A_1$  und  $A_2$  sind die Amplituden der zwei Komponenten und  $\tau_1$  und  $\tau_2$  ihre korrespondierenden Zeitkonstanten. Da die Reststärke der Chemilumineszenz  $CL_f$  erheblich kleiner als der Maximalwert war, ergab die Summe der beiden Amplituden ( $A_1 + A_2$ ) einen Wert, der nahezu  $CL_{\max}$  entsprach.

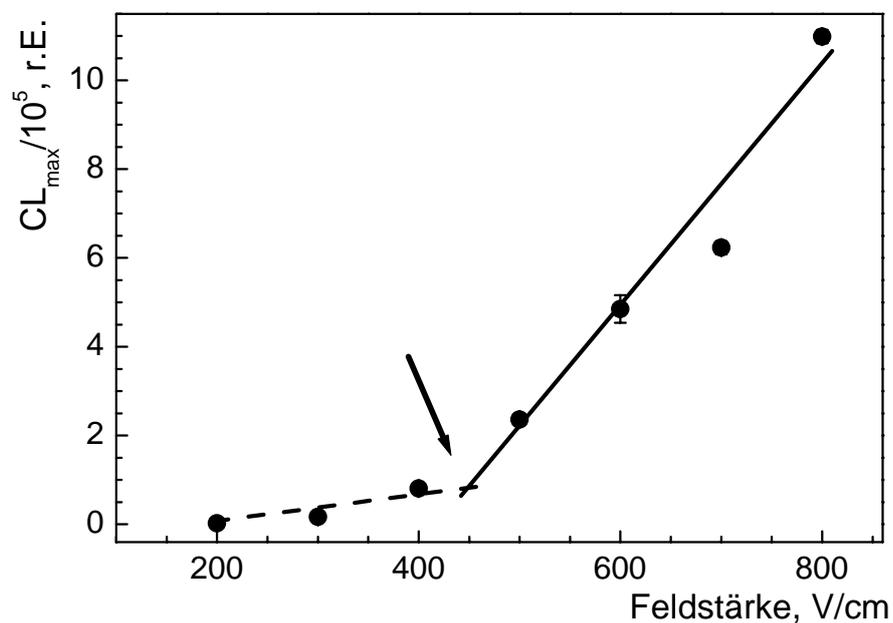
**Tabelle 5.1:** Parameter aus dem Fit mit der doppelt exponentiellen Funktion (Gl. 16) des abklingenden Teils der Chemilumineszenzsignale nach Feldpulsen mit unterschiedlicher Feldstärke in einem Medium mit 0,1 mM  $Ca^{2+}$  \*

Feldstärke , V/cm	$A_1/10^3$ , r.E.	$\tau_1$ , s	$A_2/10^3$ , r.E.	$\tau_2$ , s	$CL_f/10^3$	$r^2$
200	$2,0 \pm 0,2$	$0,51 \pm 0,04$	$0,6 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,8$	$0,6 \pm 0,2$	0,967
300	$10 \pm 2$	$0,40 \pm 0,02$	$6,7 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	0,998
400	$53 \pm 5$	$0,44 \pm 0,04$	$28 \pm 2$	$2,8 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$	0,999
500	$171 \pm 13$	$0,52 \pm 0,04$	$65 \pm 1$	$4,1 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$	0,999
600	$303 \pm 31$	$0,51 \pm 0,05$	$182 \pm 34$	$4,8 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	0,999
700	$399 \pm 15$	$0,40 \pm 0,01$	$324 \pm 9$	$4,7 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	0,997
800	$518 \pm 15$	$0,45 \pm 0,07$	$581 \pm 33$	$4,7 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$	0,995

\* Die Daten sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von 3-4 unabhängigen Messungen.

Der Fit der Chemilumineszenzdaten nach einem elektrischen Puls mit 400 V/cm mit der Gleichung 16 ergab für die Amplituden die Werte  $A_1 \approx 5 \times 10^4$  r.E. und  $A_2 \approx 3 \times 10^4$  r.E. Für die Zeitkonstanten ließen sich Werte von  $\tau_1 \approx 0,4$  s für die schnelle und  $\tau_2 \approx 2,8$  s für die langsame Komponente berechnen. Die Steigerung der Feldstärke auf 800 V/cm erhöhte die Amplituden der beiden Komponenten um nahezu eine Größenordnung auf die Werte  $A_1 \approx 5 \times 10^5$  r.E. und  $A_2 \approx 6 \times 10^5$  r.E., während sich die korrespondierenden Zeitkonstanten nur sehr geringfügig veränderten ( $\tau_1$  : 0,4-0,5 s und  $\tau_2$  : 2,7-5,6 s).

In Tabelle 5.1 sind die gefitteten Mittelwerte für die Amplituden  $A_1$  und  $A_2$ , die Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  und die finale Chemilumineszenzintensität  $CL_f$  zusammengefasst. Die zugrunde liegenden Änderung der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration wurden in einem Bereich der Feldstärke von 200 bis 800 V/cm gemessen. Die quadratischen Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) für die Fits zeigten Werte von ungefähr 0,99. Nur bei sehr niedrigen Feldstärken wie 200 V/cm wurde ein niedriger Wert für  $r^2$  ermittelt (etwa 0,97), was auf das schwache Chemilumineszenzsignal zurückzuführen ist.



**Abbildung 5.8:** Abhängigkeit der maximalen Chemilumineszenzintensität ( $CL_{max}$ ) von der applizierten Feldstärke bei 0,1 mM extrazellulärem  $Ca^{2+}$ . Die beiden Geraden verdeutlichen die starke Zunahme der Steigung der  $CL_{max}$ -Werte oberhalb von Feldstärken von 500 V/cm. Der Übergang bei 450 V/cm wird durch den Pfeil angezeigt.

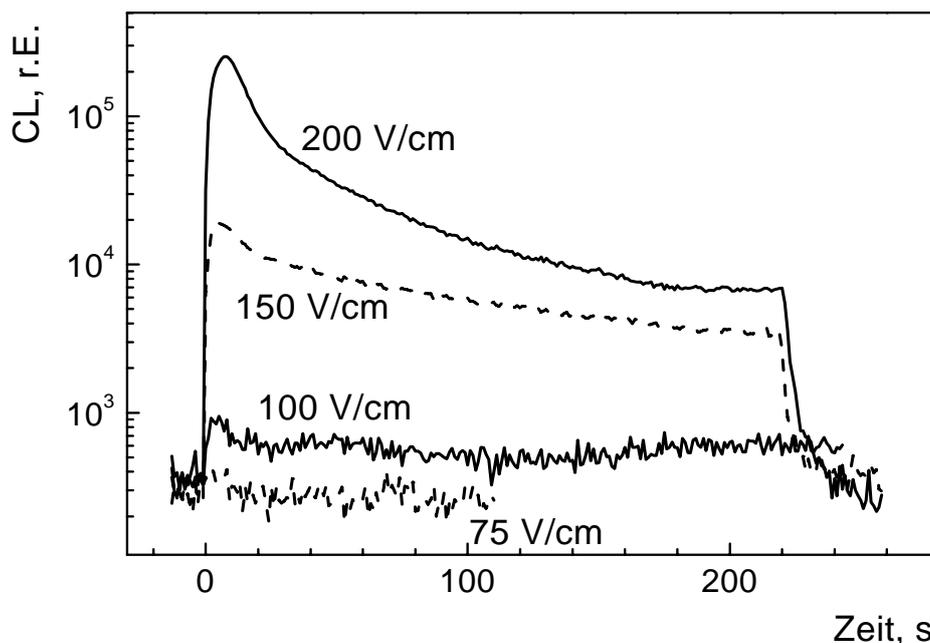
Die Abbildung 5.8 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen den gemessenen Maximalwerten der Chemilumineszenz und den applizierten Feldstärken. Hierbei lassen sich drei Bereiche unterscheiden. Bei niedrigen Feldstärken zwischen 200 und 400 V/cm steigt die resultierende  $CL_{max}$  nur relativ flach an, was durch die gestrichelte Linie verdeutlicht wird. Oberhalb von 500 V/cm nimmt die Steigung der Abhängigkeit  $CL_{max}$  von der applizierten Feldstärke dramatisch zu. Dies kann deutlich anhand der durchgezogenen Linie gezeigt werden, mit denen die  $CL_{max}$ -Werte oberhalb der



Steigungsdiskontinuität angefittet wurden. Aus dem Schnittpunkt der beiden Geraden ergibt sich ein Wert von etwa 450 V/cm für die Feldstärke, bei denen sich die Steigung der  $CL_{max}-E_0$  Relation ändert. Unterhalb von 200 V/cm führte die Applikation eines Feldpulses zu keiner Erhöhung des Chemilumineszenzsignals.

## 5.6 Applikation von Pulssequenzen niedriger Intensität

Die Versuche mit einzelnen Gleichspannungspulsen haben veranschaulicht, dass unterhalb von 200 V/cm keine wesentliche Steigerung der Chemilumineszenz zu erkennen



**Abbildung 5.9:** Chemilumineszenzantwort von BY-2 Zellen auf Sequenzen von Rechteckspannungspulsen bei 0,1 mM  $Ca^{2+}$ . Die Pulssequenzen setzten sich aus Einzelpulsen mit einer Dauer von 50  $\mu$ s zusammen und hatten eine Wiederholungsfrequenz von 5 Pulsen/s. Die Abbildung zeigt die Chemilumineszenzsignale bei Applikation von Pulssequenzen der angegebenen Feldstärken für etwa 4 Minuten. Ein messbarer Anstieg der Chemilumineszenz wurde erst oberhalb eines Schwellenwertes der Feldstärke von 100 V/cm beobachtet. Nach Abschalten der Pulssequenz kehrte die Chemilumineszenz relativ schnell wieder auf ihren Hintergrundwert zurück.

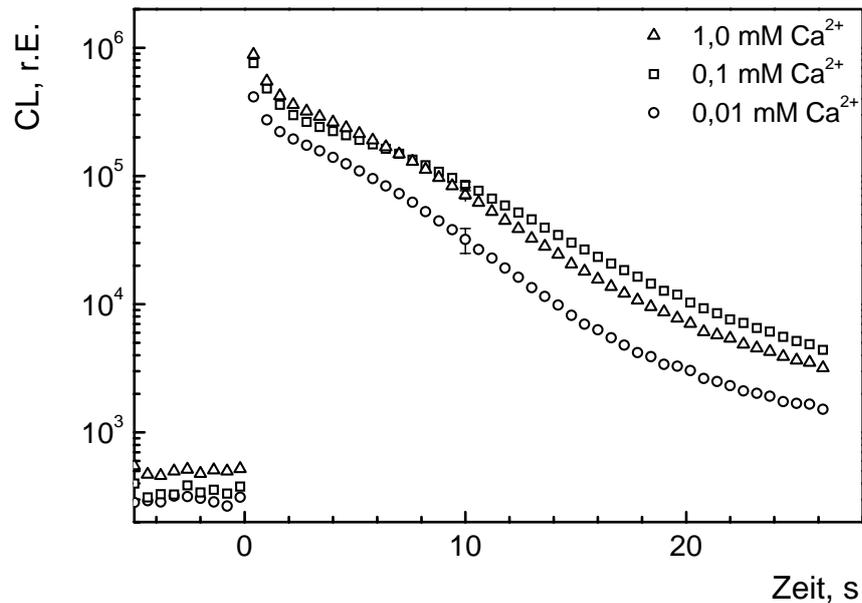
war. Wurde jedoch eine Sequenz von Rechteckpulsen in Gegenwart von 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  angelegt, so konnte auch in diesem Feldstärkebereich deutlich ein Chemilumineszenzsignal erzeugt werden. Die Abbildung 5.9 zeigt, dass eine Applikation von 5 Pulsen pro Sekunde mit einer Feldstärke von 100 V/cm einen deutlichen Anstieg der Chemilumineszenz von 350 r.E. auf etwa 650 r.E. verursachte. Die Erhöhung der Chemilumineszenz blieb für die Dauer der Pulssequenz von etwa 4 Minuten stabil.

Wurde eine Feldstärke von 150 V/cm angelegt, so zeigte sich im Vergleich zu dem Experiment mit 100 V/cm eine mehr als zehnfache Erhöhung der maximalen Chemilumineszenzintensität auf einen Wert von ungefähr  $1,9 \times 10^4$  r.E. Nach Erreichen des Maximalwertes verminderte sich das Chemilumineszenzsignal langsam innerhalb von 3 min auf einen Wert von ungefähr 4000 r.E. Eine weitere Erhöhung der Feldstärke auf 200 V/cm führte zu einer erheblichen Steigerung der Chemilumineszenzsignale, der zeitliche Verlauf blieb jedoch qualitativ vergleichbar. Unabhängig von der angelegten Feldstärke fiel die Chemilumineszenz nach Abschalten der Pulssequenzen auf den Hintergrundwert wieder zurück.

### 5.7 Einfluss der externen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse

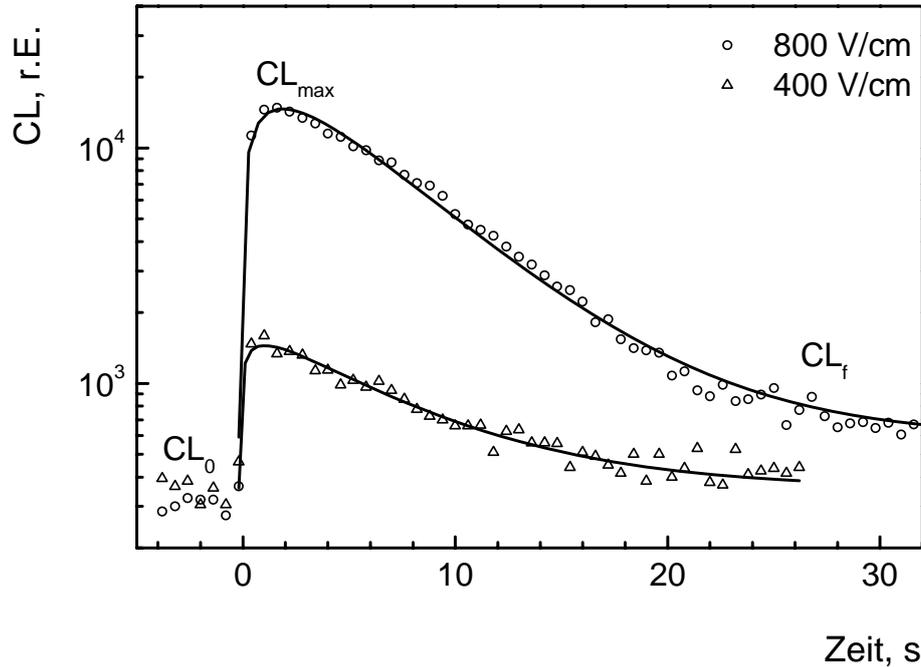
Die oben genannten Experimente wurden bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Standardkonzentration von 0,1 mM durchgeführt. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der elektrisch induzierten Änderung des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  von der externen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden zunächst Medien mit 1 und 0,01 mM  $\text{Ca}^{2+}$  eingesetzt. Zur Depletion des externen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde nach einer Behandlung der Zellen mit 3 mM EGTA  $\text{Ca}^{2+}$ - freies Medium verwendet.

Die Steigerung der externen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,1 auf 1 mM zeigte keinen wesentlichen Effekt auf die maximale Chemilumineszenzintensität oder den Verlauf des Abklingen des Signals (Abb. 5.10). Diese Beobachtung schließen ein, dass ab einer Konzentration von 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ein Sättigungslevel für  $CL_{\max}$  erreicht worden ist. Im Einklang hiermit führte eine Senkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,1 mM auf 0,01 mM zu einer deutlichen Verminderung der maximalen Chemilumineszenzintensität. Bei einer applizierten Feldstärke von 800 V/cm wurde der  $CL_{\max}$ -Wert von ungefähr  $10^6$  auf  $0,4 \times 10^6$  r.E. reduziert.



**Abbildung 5.10:** Einfluss der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf den elektrisch induzierten Anstieg des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Abbildung zeigt den Verlauf der Chemilumineszenzsignale bei  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  von 0,01 (Kreise), 0,1 (Quadrate) und 1 mM (Dreiecke). Die Signale wurden durch Applikation eines Feldpulses mit einer Feldstärke von 800 V/cm induziert.

Die Depletion von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  führte jedoch zu dramatischen Veränderungen bezüglich der Amplituden, der Zeitkonstanten des Signalabfalls und insbesondere der Form des zeitlichen Verlaufs der elektrisch induzierten Chemilumineszenzsignale. Betrachtet man beispielsweise bei einer Feldstärke von 400 V/cm die Chemilumineszenzantworten in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium, so zeigte sich eine Reduzierung der maximalen Chemilumineszenzintensität  $CL_{\text{max}}$  auf einen Wert von etwa  $10^3$  r.E. (Abb. 5.11). Eine deutliche Veränderung lies sich auch in der Zeitdauer beobachten, mit welcher der  $CL_{\text{max}}$  erreicht wurde. Diese stieg auf 1-2 s an.



**Abbildung 5.11:** Feldstärkenabhängigkeit des elektrisch induzierten Anstiegs des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  von EGTA behandelten BY-2 Zellen in  $\text{Ca}^{2+}$ - freiem Medium. Die Abbildung verdeutlicht den zeitlichen Verlauf eines Chemilumineszenzsignals nach einem einzelnen elektrischen Feldpuls von 400 V/cm (Dreiecke) bzw. 800 V/cm (Kreise). Die Kurven zeigen die Fits der experimentellen Daten mit der Gleichung 17.

Aus der Abbildung 5.11 wird deutlich, dass die schnelle Phase des Abfalls des Chemilumineszenzsignals mit dem Entfernen des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  verschwunden ist. Der veränderte zeitliche Verlauf der Chemilumineszenzantwort, insbesondere der verzögerte Anstieg der Chemilumineszenz lässt sich sehr gut durch eine Pulsfunktion beschreiben, die sowohl die Anstiegs- als auch die Abfallphase berücksichtigt:

$$CL(t) = A(1 - e^{-t/\tau_R})e^{-t/\tau_D} + CL_f \quad (17)$$

Hierbei ist  $A$  ein Parameter, welcher der Amplitude von  $CL_{\text{max}}$  beschreibt,  $\tau_R$  und  $\tau_D$  sind die Zeitkonstanten für den Anstieg bzw. den Abfall des Chemilumineszenzsignals.

Qualitativ ähnliche Chemilumineszenzsignale wurden in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium über den gesamten Bereich der Feldstärke von 200-800 V/cm beobachtet. In Tabelle 5.2 sind die Parameter gegeben, die durch Anpassen der Chemilumineszenzdaten bei Feldstärken  $\geq 400$  V/cm mit der Gleichung 17 berechnet wurden.

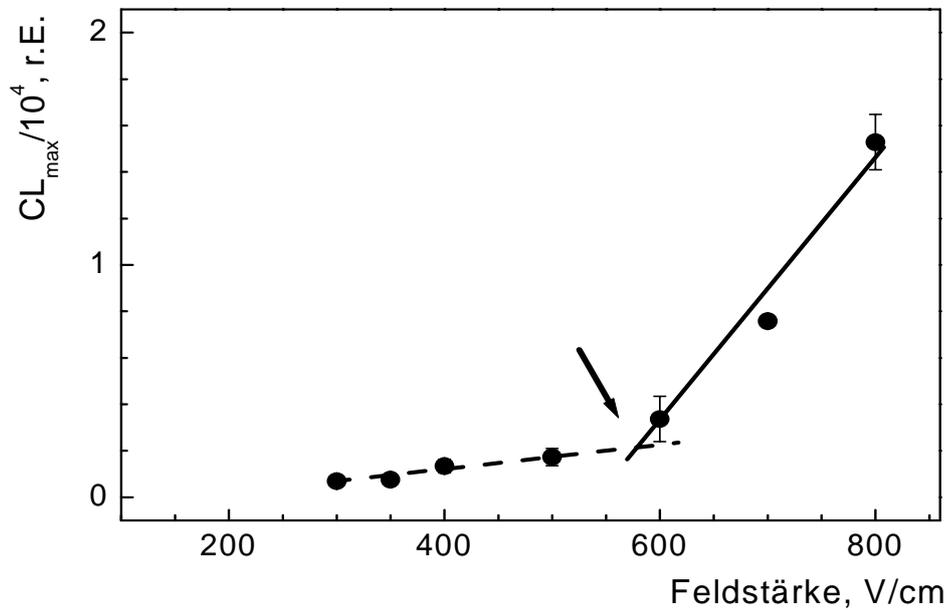
**Tabelle 5.2:** Parameter aus dem Fit mit der Pulsfunktion (Gl. 17) der Chemilumineszenzsignale nach Feldpulsen mit unterschiedlicher Feldstärke in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium \*

Feldstärke, V/cm	$A/10^3$ , r.E.	$\tau_R$ , s	$\tau_D$ , s	$CL_f/10^3$ , r.E.	$r^2$
400	$1,4 \pm 0,2$	$2,9 \pm 1,5$	$6,5 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,1$	0,980
500	$2,3 \pm 0,3$	$3,5 \pm 1,8$	$5,4 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$	0,986
600	$4,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	0,995
700	$11,3 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	0,998
800	$26,2 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	0,997

\* Die Daten sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von 3-4 unabhängigen Messungen.

Obwohl bei niedrigeren Feldstärken von 300 und 350 V/cm nachweisbare Chemilumineszenzsignale erzeugt werden konnten, konvergierten deren Daten jedoch nicht mit der Fitfunktion. Dies ließ sich auf ein niedriges Signal/Rauschen Verhältnis zurückführen. Betrachtet man die Werte der quadratischen Korrelationskoeffizienten (0,98-0,998), so verdeutlichen sie die Genauigkeit, mit der die Gleichung 17 die Kinetiken der Chemilumineszenzsignale beschreibt. Daraus folgt, dass in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medien die Chemilumineszenzantwort monoexponentiell abfällt und nicht biexponentiell wie in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Medien (Abb. 5.7). Wie die Werte in Tabelle 5.2 zeigen, führte eine Erhöhung der Feldstärke von 400 auf 800 V/cm zu einer nahezu zwanzigfachen Steigerung des Parameter  $A$  von  $1,4 \times 10^3$  auf  $26 \times 10^3$  r.E., wobei sich die Zeitkonstanten für den Anstieg und den Abfall des Chemilumineszenzsignals nur geringfügig änderten ( $\tau_R \approx 1-3$  s und  $\tau_D \approx 5-6$  s).

Ähnlich wie in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medien (Abb. 5.8) zeigten die Maximalwerte der Chemilumineszenzsignale in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medien eine streng nicht lineare Abhängigkeit von der applizierten Feldstärke (Abb. 5.12).



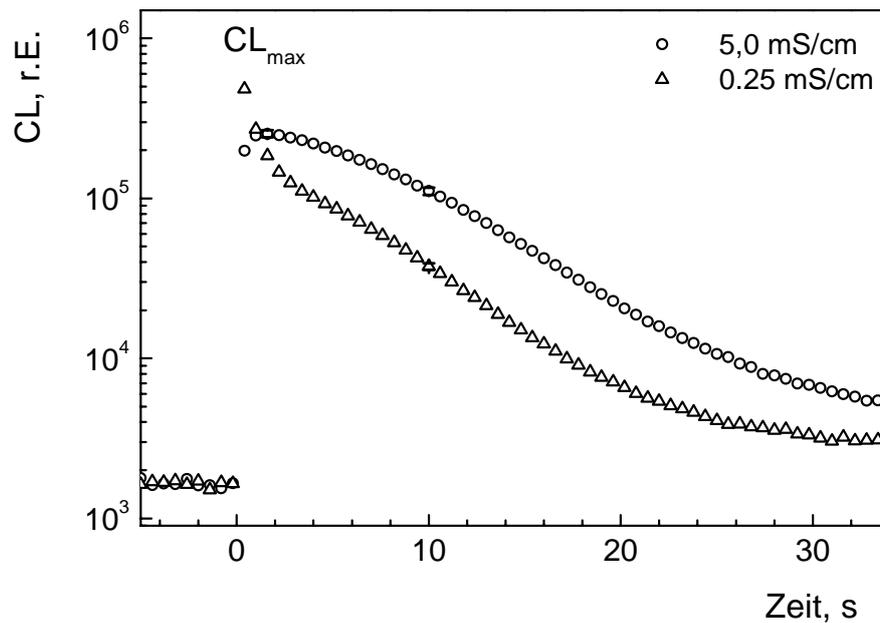
**Abbildung 5.12:** Abhängigkeit der maximalen Chemilumineszenzintensität ( $CL_{\max}$ ) von der applizierten Feldstärke nach EGTA Behandlung in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium. Vergleichbar zu den Messungen in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium (Abb. 5.8) zeigte die Steigung der  $CL_{\max}$ -Werte bei EGTA behandelten Zellen eine deutlich Diskontinuität bei 580 V/cm (Pfeil).

In einem Feldstärkenbereich zwischen 300 und 500 V/cm stieg  $CL_{\max}$  nur geringfügig von  $\sim 0,7 \times 10^3$  auf  $1,7 \times 10^3$  r.E., was durch die gestrichelte Linie verdeutlicht wird. Oberhalb von 600 V/cm nahm die Steigung der Feldstärkenabhängigkeit von  $CL_{\max}$  stark zu (durchgezogene Linie). Der Schnittpunkt dieser beiden Linie ergab einen Schwellenwert von  $\sim 580$  V/cm.

## 5.8 Effekte der externen Leitfähigkeit auf den $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss

Eine weitere Frage stellte sich, in wie weit die Leitfähigkeit des externen Mediums auf das Chemilumineszenzsignal Einfluss nimmt. Hiefür wurde die externe Leitfähigkeit

auf die Werte 0,25 und 5 mS/cm durch Zugabe von entsprechenden Mengen KCl (1,5 bzw. 40 mM) eingestellt, während die Osmolarität (230 mOsm) und die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (0,1 mM) konstant gehalten wurden. Die Abbildung 5.13 zeigt entsprechende Chemilumineszenzantworten nach Applikation eines Gleichstromfeldpulses mit einer Feldstärke von 800 V/cm. Deutlich zu erkennen ist der



**Abbildung 5.13:** Einfluss der externen Leitfähigkeit  $\sigma_e$  auf den elektrisch induzierten Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in BY-2 Zellen bei 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf einer Chemilumineszenzantwort nach einem einzelnen elektrischen Feldpuls von 800 V/cm bei einer externen Leitfähigkeit von  $\sigma_e = 0,25$  mS/cm (Dreiecke) bzw. 5 mS/cm (Kreise). Die Leitfähigkeit des Mediums wurde durch Ersetzen von Saccharose durch entsprechende Mengen KCl erhöht.

Einfluss der externen Leitfähigkeit auf die Kinetik der Chemilumineszenzantwort. Durch die Erhöhung der Leitfähigkeit auf 5 mS/cm reduzierte sich der Maximalwert der Chemilumineszenz etwa um die Hälfte von  $\sim 5,5 \times 10^5$  auf  $\sim 2,5 \times 10^5$  r.E. Des Weiteren verlangsamte sich die Abnahme der Chemilumineszenzintensität, was offenbar durch das Fehlen der schnellen Komponente des Abklingens der Chemilumineszenzantwort bedingt war (Tabelle 5.1). Interessanter Weise scheint durch die Erhöhung der externen

Leitfähigkeit die Formen der Chemilumineszenzantwort denen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium zu gleichen (Abb. 5.11). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Pulsen von niedriger Feldstärke erzielt.

## 5.9 Reversibler Durchbruch des Plasmalemmas und des Tonoplasten

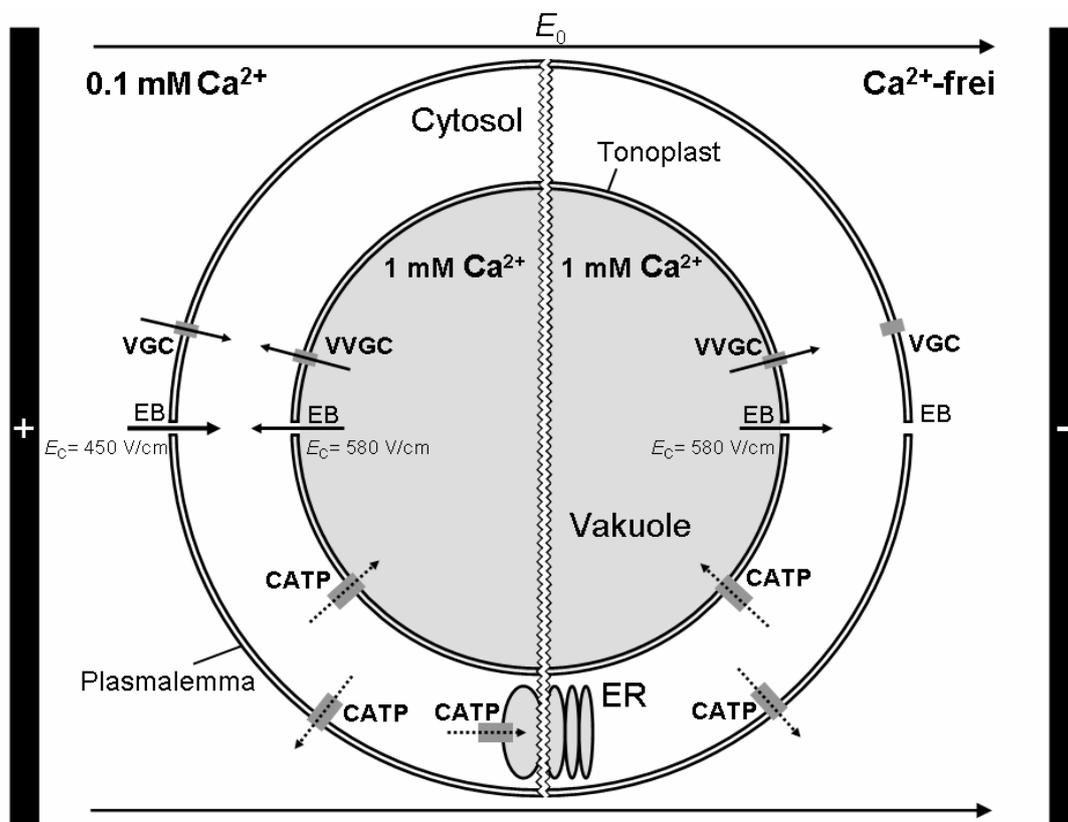
Vergleicht man die Ergebnisse, die aus der dielektrischen Analyse gewonnen wurden mit den Resultaten aus den Chemilumineszenz-Experimenten so lassen sich folgende Schlüsse ziehen.

Die unterschiedlichen Profile der Aufladung des Plasmalemmas und des Tonoplasten und ihre Abhängigkeit von der externen Leitfähigkeit haben offensichtlich einen starken Einfluss auf den reversiblen Durchbruch dieser zwei Membranen. Die Feldstärke, die nötig ist um die Durchbruchsspannung einer Membran zu erreichen, kann mit der integrierten Laplace-Gleichung  $U_m = 1,5R_1E_0\cos\vartheta$  (Gl. 11) näherungsweise bestimmt werden [Jeltsch und Zimmermann, 1978]. Die Gleichung wurde für eine einschalige Zelle erstellt und setzt voraus, dass über der Membran eine stationäre Spannung erreicht wird. Unter der Annahme, dass die Durchbruchsspannung einer Biomembran 1V bei Raumtemperatur beträgt [Zimmermann und Neil, 1996] wurde für die kritische Feldstärke ( $E_c$ ) bei einer Zelle mit einem Radius von 15  $\mu\text{m}$  ein Wert von 440 V/cm berechnet. Dieser Wert stimmt gut mit der experimentell ermittelten Feldstärke in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium überein, bei welcher die Diskontinuität der Feldstärkenabhängigkeit von  $CL_{\text{max}}$  beobachtet werden konnte (Abb. 5.8). Betrachtet man die Potentialprofile über dem Plasmalemma und dem Tonoplasten in Abbildung 5.6 genauer, so zeigt sich, dass die  $U_p$ -Transienten eine größere Amplitude erreichen und sich stärker in der Zeit ausdehnen als die korrespondierenden  $U_t$ -Transienten. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Durchbruchsspannung des Plasmalemmas bei einer niedrigeren externen Feldstärke erreicht werden sollte, als die des Tonoplasten. Folglich kann die dramatische Zunahme der Chemilumineszenz oberhalb von 450 V/cm sehr wahrscheinlich dem Durchbruch des Plasmalemmas zugeschrieben werden. Betrachtet man die Messungen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium (Abb. 5.12), so ist unter diesen Bedingungen offenbar eine Feldstärke von 580 V/cm notwendig, um einen Durchbruch des Tonoplasten zu erreichen. Durch die Entfernung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  kann eine Zunahme der Chemilumineszenz nur aus einer Ausschüttung von vakuolärem  $\text{Ca}^{2+}$  in das Cytoplasma resultieren. Zur Verdeutlichung wurden die möglichen Wege, auf denen  $\text{Ca}^{2+}$  elektrisch



induziert in das Cytosol gelangen kann, schematisch in Abbildung 5.14 dargestellt. Die linke Seite der Abbildung illustriert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse in Gegenwart die rechte Seite in Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ .

Im Feldstärkenbereich unterhalb des Durchbruchs des Plasmalemmas, das heißt unterhalb von 450 V/cm, wurden nur sehr schwache Chemilumineszenzsignale nach



**Abb. 5.14:** Schematische Darstellung der Wege für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ein- und Ausströme (durchgezogene bzw. gestrichelte Pfeile) in einer Tabakzelle. In Gegenwart von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  (linke Seite) löst ein externes elektrisches Feld durch Aufladung des Plasmalemmas  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme über spannungsaktivierte Kanäle (VGC) in das Cytosol aus. Oberhalb einer kritischen Feldstärke  $E_c$  von 450 V/cm verursacht der elektrische Durchbruch (EB) des Plasmalemmas einen erheblichen Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$  Einstroms. Analog kann ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus der Vakuole über spannungsaktivierte Kanäle im Tonoplasten (VVG) oder durch Durchbruch des Tonoplasten oberhalb von  $E_c = 580$  V/cm induziert werden. In  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium tragen nur die vakuolären Wege zu den elektrisch erzeugten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen bei. Wie in der Literatur beschrieben [Sanders, 2002] können an der Reduzierung des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  energieabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen im Plasmalemma, dem Tonoplasten und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) beteiligt sein.

Applikation eines einzelnen Feldpulses beobachtet. Diese resultieren vermutlich aus dem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  über spannungsgesteuerte Kanäle, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde [Link et al., 2002; Sano et al., 2006]. Dem entsprechend können Feldpulse unterhalb des Durchbruchs des Tonoplasten zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom über spannungsgesteuerte Kanäle im Tonoplasten aus der Vakuole führen [Pantoja et al., 1992; Ping et al., 1992].

Die hohe Vitalitätsrate, die mit dem Trypan-Blau-Färbetest gemessen wurde (siehe Kapitel 5.5) deutet darauf hin, dass obwohl für die Experimente superkritische Felder von bis zu 800 V/cm verwendet wurden, was einem zweifachen der theoretisch berechneten kritischen Feldstärke entspricht, der Durchbruch des Plasmalemmas vollständig reversibel war. Daher ist ein Ausstrom größerer Mengen des Aequorins unwahrscheinlich. Folglich sind die gemessenen Chemilumineszenzsignale über den ganzen Bereich der Feldstärke den Interaktionen von  $\text{Ca}^{2+}$  und Aequorin innerhalb des Cytosols zuzuschreiben.

### **5.10 Anteil des vakuolären und externen $\text{Ca}^{2+}$ an den Chemilumineszenz-Kinetiken**

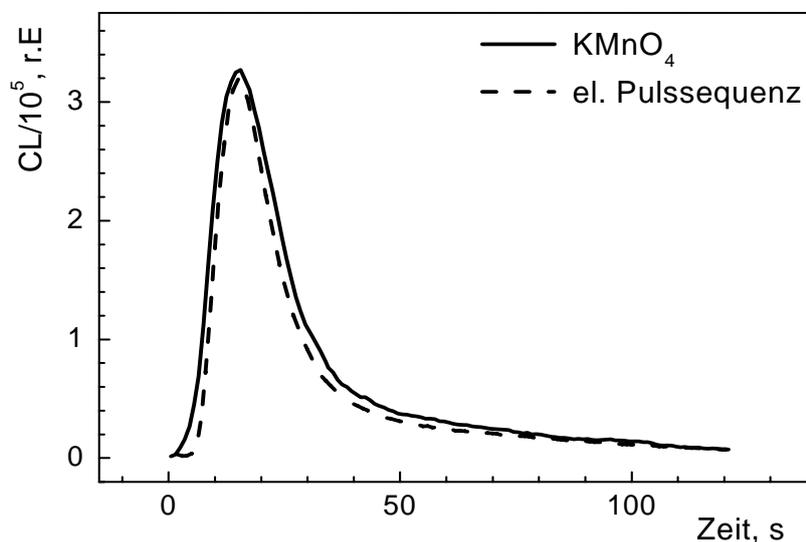
Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Vakuole (1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) bei BY-2 Zellen ist um eine Größenordnung höher als die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Medien, in denen die meisten Experimente durchgeführt wurden (0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ). So sollte man auf den ersten Blick erwarten, dass der Anstieg der cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgrund des großen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten eher auf eine feldinduzierte Ausschüttung des vakuolären denn des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  in das Cytoplasma zurückzuführen ist. Jedoch die nachhaltige Reduzierung der Amplitude der Chemilumineszenzsignale durch die Entfernung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  veranschaulicht, dass der Anteil des vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$  an den Chemilumineszenzsignalen deutlich geringer sein muss als der des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ . In Anbetracht der vorhergehenden theoretischen Überlegungen kann dieser Befund sehr schlüssig mit den Unterschieden in den Amplituden und den zeitlichen Ausdehnungen der erzeugten Plasmalemma- und Tonoplastenpotentiale erklärt werden. Aus den Potentialprofilen, die über dem Plasmalemma und dem Tonoplasten generiert wurden (Abb. 5.6) ergibt sich die Schlussfolgerung, dass sowohl unter- als auch oberhalb des Durchbruchbereiches der Membranspannung die feldinduzierten Änderungen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität im Plasmalemma immer größer als die im Tonoplasten sein müssen. Außerdem muss die Zeitdauer, in der eine erhöhte Permeabilität vorherrscht, beim

Plasmalemma wesentlich kürzer als beim Tonoplasten sein. Dies wird durch die Abklingkinetiken der Chemilumineszenz verdeutlicht. Die Reaktion, bei der Aequorin Chemilumineszenzen erzeugt, setzt das Vorhandensein von freiem  $\text{Ca}^{2+}$  voraus [Lecourieux, 2002]. Somit hängt die Abklinggeschwindigkeit des Chemilumineszenzsignals einerseits von der Abbaukinetik ab, mit der freies  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Cytoplasma entfernt wird. Dies geschieht beispielsweise durch Bindung an Makromoleküle oder durch aktive Transportsysteme wie  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen durch die Membranen [Sanders, 2002]. Andererseits hängt sie von der Nachschubkinetik ab, mit der weiteres  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Vakuole oder dem extrazellulären Raum in das Cytoplasma nachfließt (Abb. 5.14). Die Messungen der Chemilumineszenzsignale in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium haben eindeutig gezeigt, dass die langsame Abklingkomponente einer Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Vakuole in das Cytoplasma zugeschrieben werden muss, da die schnelle Komponente verschwunden oder zu klein geworden ist, um noch aufgelöst zu werden. Der Wegfall der schnellen Abklingkomponente legt die Vermutung nahe, dass diese Komponente in erster Linie durch den Fluss von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in das Cytoplasma bestimmt ist. Das bedeutet, dass nach Erreichen des Maximums der Zufluss von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  sehr schnell wieder abnimmt, während die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern noch für eine gewisse Zeit anhält, wodurch die Abnahme von freiem  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytoplasma verzögert wird. Die lang anhaltende Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Vakuole hängt möglicherweise mit sekundären Prozessen zusammen, wie beispielsweise der Aktivierung von so genannten „slow vacuolar“ (SV) Kanälen, die sowohl für  $\text{Ca}^{2+}$  durchlässig sind, als auch durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden [Hedrich und Neher, 1987; Bewell et al., 1999].

Eine weitere interessante Beobachtung zeigte, dass bei Versuchen in Medien mit einer hohen externen Leitfähigkeit und in Gegenwart von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  die schnelle Abklingkomponente nicht nachweisbar war. In Bezug auf die Anstiegs- und Abklingkonstanten stellte sich heraus, dass ähnliche Werte, wie bei den Versuchen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medien, festgestellt werden konnten (Abb. 5.11). Allerdings war die Amplitude deutlich höher als die in  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medien. Dies kann nur durch Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Raum in das Cytoplasma erklärt werden. Daraus folgt, dass bei hohen externen Leitfähigkeiten die zeitliche Ausdehnung des Zustandes, bei dem eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität des Plasmalemmas vorliegt, in der gleichen Größenordnung liegt, wie die des Tonoplasten.

### 5.11 Manipulation des cytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ mit subkritischen Pulssequenzen

Im Kapitel 5.6 konnte gezeigt werden, dass durch Applikation von Sequenzen kurzer Pulse eine deutliche Steigerung in der Chemilumineszenz auch in niedrigen Feldstärkenbereichen erzeugt werden kann, in welchen bei einzelnen Pulsen keine messbare Reaktion zu beobachten war. Es konnte beispielsweise bei einer Feldstärke von 200 V/cm in der Sequenz etwa die gleiche maximale Chemilumineszenz wie bei einem einzelnen überkritischen Puls von 500 V/cm erreicht werden. Besonders interessant ist, dass sich der zeitliche Verlauf des Chemilumineszenzsignals durch eine Modulation der Feldstärke der Pulssequenz steuern lässt. Die gestrichelte Kurve in der Abbildung 5.15 zeigt den Verlauf eines Chemilumineszenzsignals, dessen Kinetik durch Steigern der Pulssequenzamplitude innerhalb der ersten 20 s von einer Feldstärke von 100 V/cm auf 200 V/cm und der darauf folgenden langsamen Reduzierung in einem Zeitraum von 80 s



**Abbildung 5.15:** Simulation einer typischen  $\text{KMnO}_4$  induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Signatur mit einer amplitudenmodulierten Pulssequenz. Die durchgezogene Linie zeigt das Chemilumineszenzsignal einer typischen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Signatur von BY-2 Zellen nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$   $\text{KMnO}_4$ . Der zeitliche Verlauf des Chemilumineszenzsignals konnte sehr genau durch Anlegen einer amplitudenmodulierten Pulssequenz (gestrichelte Linie) nachgeahmt werden.

geformt wurde. Als Vorbild diente eine typische Chemilumineszenzantwort einer BY-2 Zellsuspension nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{KMnO}_4$  (durchgezogene Kurve), welche mit der elektrisch simulierten nahezu deckungsgleich ist.

Die Fähigkeit, reizspezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten mit elektrischen Feldern nachzuahmen, ermöglicht eine neue Methode zur Untersuchung der Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$  im zellulären Signalweg.  $\text{Ca}^{2+}$  wurde als sehr wichtiger „second messenger“ für die zelluläre Signalverarbeitung bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen sowie für die Stressantwort identifiziert [Knight, 2000; Sanders et al. 2002]. Neben dem oben gezeigten oxidativen Stress führen eine Reihe weiterer exogener Reize, wie beispielsweise Kälte oder osmotischer Schock, zu spezifischen Kinetiken des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ . Diese Kinetiken werden in der Literatur als  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaturen bezeichnet. [Knight et al., 1996; Cessna et al., 2001; Mithöfer und Mazars, 2002]. Untersuchungen haben gezeigt, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaturen reizspezifische Antworten der Zellen vermitteln. Die Zugabe von oxidativen Substanzen beispielsweise löste einen charakteristischen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aus, der zur Apoptose der behandelten Zellen führte [Price et al., 1994; Levine et al., 1996]. Eine weitere Untersuchung ergab, dass Oszillationen des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  in Schließzellen von *Arabidopsis* dem Verschluss der Stomata vorausgehen [Allen et al., 2001]. Es gibt eine Reihe weiterer Hinweise, dass reizspezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaturen ein weites Spektrum von adaptiven Prozessen in Pflanzenzellen steuern [Rudd und Franklin-Tong, 2001; Lecourieux et al., 2002].

Kälte, osmotischer Schock und Chemikalien verursachen persistierende Reize, welche häufig zu unvorhersagbaren Kaskaden sekundärer Reaktionen in der Zelle führen können. Daher ist eine Interpretation dieser Daten nicht immer eindeutig, da es ungewiss bleibt, ob die Veränderungen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in erster Linie von den exogenen Stimuli verursacht wurden. Die Induktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüssen mittels externer elektrischer Felder teilen diese Nachteile nicht, da die Wechselwirkungen zwischen den elektrischen Feldern mit den Zellen auf gründlich etablierten physikalischen Prinzipien beruhen [Zimmermann und Neil, 1996; Bobanovic et al., 1999]. Ein weiterer Vorteil der elektrischen Felder liegt in ihrer zeitlichen Präzision, mit denen sie angewendet werden können. Diese liegt im Bereich von Mikrosekunden.

Erste Untersuchungen haben veranschaulicht, dass durch Applikation von Gleichstromfeldern Prozesse initiiert werden können, die durch cytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  gesteuert werden. So konnte die Aktivierung von MAP Kinasen und die Induktion von

Verteidigungsgenen nachgewiesen werden [Link et al., 2002]. Mit der oben beschriebenen Methode wurden eine elektrische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signatur erstellt, die den Verlauf einer Kaliumpermanganat-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signatur simulierte. Diese Signatur verzögerte in qualitativ gleicher Weise den Zellzyklus, wie ihr chemisch erzeugtes Vorbild [Sano et al., 2006]. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe elektrischer Felder die Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$  als „second messenger“ in zellulären Regulationsprozessen aufgeklärt werden können.

## Kapitel 6

### Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten grundlegende Erkenntnisse über die Wirkung elektrischer Felder auf Membranen von eukaryotischen Zellen gewonnen werden. Dieses Wissen ermöglichte eine detaillierte Aufklärung der Mechanismen der Elektropermeabilisierung und der Elektrofusion. Maßgeblich hierfür war die dielektrische Analyse von Pflanzen- bzw. Hefeprotoplasten durch umfassende Messungen auf Basis der Elektrorotationsmethode.

Mithilfe dieser Methode wurden die elektrischen Eigenschaften wie die flächenspezifische Membrankapazität und die innere Leitfähigkeit von *Pichia pastoris* Protoplasten ermittelt. Die Kenntnis dieser Zelleigenschaften verhalf dazu, einerseits das Sammelfeld im Hinblick auf seine Feldstärke und Frequenz einzustellen. Damit wurde ein optimaler Kontakt der Zellmembranen während der Fusion ermöglicht und störende Einflüsse, wie beispielsweise die Multizellrotation, minimiert. Andererseits wurde der Durchbruchpuls bezüglich der Pulslänge und der Feldstärke den Anforderungen für die Elektrofusion der relativ kleinen Protoplasten angepasst. In Folge dessen war es möglich, ein Protokoll zur Herstellung von Riesenzellen aus *Pichia pastoris* Protoplasten zu erstellen.

Diese Erkenntnisse sind besonders interessant, da der Einsatz von Riesenzellen die Erforschung der aktiven elektrischen Eigenschaften von Zellmembranen durch kombinierte Anwendung intrazellulärer Mikroelektroden mit etablierten elektrophysiologischen Techniken ermöglicht. Als Beispiele seien hier „current-“, und „voltage-clamp“, „patch clamp“ sowie die Ladungspulsmethode genannt. Die erhebliche Vergrößerung der Membranoberfläche bei Riesenzellen führt zu einer Erhöhung der Gesamtzahl von Membranproteinen wie beispielsweise Transmembrankanäle. Daher kann erwartet werden, dass kanalvermittelte Signale deutlich stärker ausfallen und ihre Untersuchungen erleichtert werden.

Die komplexen Ergebnisse der Elektrorotation von vakuolisierten BY-2 Protoplasten konnten sehr genau mit Hilfe des Dreischalenmodells erklärt werden, welches die Struktur der pflanzlichen Zellen, insbesondere die zwei seriell geschalteten Kapazitäten

des Plasmalemmas und des Tonoplasten, berücksichtigt. Die Anwendung dieses Modells erlaubte eine getrennte Berechnung der Potentialprofile über das Plasmalemma ( $U_p$ ) und den Tonoplasten ( $U_t$ ), welche durch einen kurzen Gleichstrompuls induziert wurden. Anhand dieser Potentialprofile war es möglich, die Abhängigkeit des  $Ca^{2+}$ -Einstromes in das Cytoplasma aus der Vakuole oder dem extrazellulären Raum vom applizierten elektrischen Feld und der externen Leitfähigkeit zu erklären. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aufladung des Plasmalemmas und des Tonoplasten und daraus folgend der elektrische Membrandurchbruch der jeweiligen Membran stark von der externen Leitfähigkeit abhängen. Die Tatsache, dass elektrische Pulssequenzen von niedriger Intensität einen erhebliche Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration bewirken können und sich durch Modulation ihrer Amplitude reizspezifische  $Ca^{2+}$ -Signaturen simulieren lassen, eröffnet eine schonende Möglichkeit zur Untersuchung von Veränderungen des cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Spiegels unabhängig von persistierenden exogenen Stimuli. Da  $Ca^{2+}$  in Pflanzen ein wichtiger „second messenger“ ist, bieten sich elektrische Felder als neues wirksames Werkzeug zur Kontrolle zellinterne Signalwege für die Grundlagenforschung sowie für Anwendungen in der Biotechnologie, wie beispielsweise Elektrotransfektion und -fusion, an. Als wichtige Konsequenz kann aus den hier gewonnen Erkenntnissen gezogen werden, dass Behandlungen pflanzlicher Zellen mit elektrischen Feldern in niedrig leitende Medien durchgeführt werden, um eine minimale Freisetzung von  $Ca^{2+}$  und anderen Inhaltsstoffen aus der Vakuole zu gewährleisten.

## Summary

In this study fundamental findings could be obtained about the effects of electrical fields on membranes of eukaryotic cells. This knowledge enabled a detailed clarification of the mechanisms of Electroporation and Electrofusion. This was achieved by the dielectric analysis of protoplasts obtained from plants and yeast based on the Electrorotation method.

With this method the electrical characteristics of *Pichia pastoris* protoplasts like the area-specific membrane capacity and the internal conductivity were determined. The knowledge of these cell characteristics on the one hand helped to adjust the collecting field with regard to its field strength and frequency. Thus an optimal contact of the cell membranes was enabled during the fusion and disturbing influences, as for example the



multi-cell rotation, were minimized. On the other hand the breakdown pulse was adapted to the requirements for the Electrofusion of the relatively small protoplasts concerning the pulse length and the field strength. In consequence it was possible to elaborate a protocol for the production of giant cells from protoplasts of *Pichia pastoris*.

These findings are particularly interesting, since the use of giant cells allows the study of the active electrical characteristics of cell membranes by combination of intracellular microelectrodes with established electrophysiological techniques like current and voltage clamp, patch clamp as well as the charge-pulse method. The substantial enlargement of the membrane surface of giant cells leads to an increase of the total number of membrane proteins as for example transmembrane channels. So it can be expected that channel-mediated signals occur more strongly and their investigations are facilitated.

The complex results of the Electrorotation of vacuolated BY-2 protoplasts could be explained very accurately with the help of the three-shell model. This model regards the structure of the plant cells, in particular the two serially connected capacities of the plasmalemma and the tonoplast. The application of this model permitted a separate calculation of the potential profiles induced by a short direct current pulse over the plasmalemma ( $U_p$ ) and the tonoplast ( $U_t$ ). Based on these potential profiles it was possible to explain the dependency of the  $Ca^{2+}$  fluxes into the cytoplasm out of the vacuole or the extracellular media on the applied electrical field and the external conductivity. In addition it could be shown that the charging of the plasmalemma and the tonoplast and thereby the electrical breakdown of the respective membranes strongly depend on the external conductivity.

Electrical pulse sequences of low intensity resulted in a substantial rise of the cytosolic  $Ca^{2+}$ -concentration and the modulation of the pulse amplitude enabled the simulation of stimulus-specific  $Ca^{2+}$ -signatures. These observations disclose an effective and gentle method for the investigation of changes of cytosolic  $Ca^{2+}$  which is independent of persisting exogenous stimuli. Since  $Ca^{2+}$  is an important second messenger in plants, electrical fields present themselves as new effective tools to study cellular signal pathways for the basic research as well as for applications in the biotechnology, as for example to Electrotransfection and Electrofusion. In consequence these findings show that treatment of plant cells with electric fields have to be performed in low conductive media in order to ensure a minimum release of  $Ca^{2+}$  and other contents from the vacuole.

## Kapitel 7

### Literaturverzeichnis

**Allen,G.J., Chu,S.P., Harrington,C.L., Schumacher,K., Hoffman,T., Tang,Y.Y., Grill,E. and Schroeder,J.I.** (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**:1053-1057.

**Arnold,W.M. and Zimmermann,U.** (1982) Rotating-field-induced rotation and measurement of the membrane capacitance of single mesophyll cells of *Avena sativa*. *Z. Naturforsch. [C]* **37**:908-915.

**Arnold,W.M. and Zimmermann,U.** (1988) Electro-rotation - Development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles. *J. Electrostat.* **21**:151-191.

**Asami,K. and Yonezawa,T.** (1996) Dielectric behavior of wild-type yeast and vacuole-deficient mutant over a frequency range of 10 kHz to 10 GHz. *Biophys J.* **71**:2192-2200.

**Bewell,M.A., Maathuis,F.J.M. Allen,G.J. and Sanders,D.** (1999) Calcium-induced calcium release mediated by a voltage-activated cation channel in vacuolar vesicles from red beet. *FEBS Lett.* **458**:41-44.

**Blume,B., Nürnberger,T., Nass,N. and Scheel,D.** (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**:1425-1440.

**Bobanovic,F., Bootman,M.D., Berridge,M.J. Parkinson,N.A. and Lipp,P.** (1999) Elementary  $[Ca^{2+}]_i$  signals generated by electroporation functionally mimic those evoked by hormonal stimulation. *FASEB J.* **13**:365-376.

**Cessna,S.G., Messerli,M.A., Robinson,K.R. and Low,P.S.** (2001) Measurement of stress-induced  $Ca^{2+}$  pulses in single aequorin-transformed tobacco cells. *Cell Calcium* **30**:151-156.

**Chand,P.K., Davey,M.R., Power,J.B. and Cooking,E.C.** (1991) Amphidiploid somatic hybrids between *Solanum viarum* and *S. dulcamara* by micromanipulation of heterokaryons following protoplast electrofusion. *The Nucleus*, **34**:53

**Collonnier,U., Fock,I., Daunay,M.-C., Servaes,A., Vedel,F., Sijak-Yakovlev,S., Souvannavong,V. and Sihachakr,D.** (2003) Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbriifolium*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant Sci.* **164**:849-861.

**Fuhr,G. and Kuzmin,P.I.** (1986) Behavior of cells in rotating electric fields with account to surface charges and cell structures. *Biophys. J.* **50**:789-795.

- Fuhr,G. and Hagedorn,R.** (1996) Cell Electrorotation. In *Electrical Manipulation of Cells*, P.T.Lynch and M.R.Davey, eds (NY: Chapman & Hall), pp. 38-70.
- Geier,B.M., Wendt,B., Arnold,W.M. and Zimmermann,U.** (1987) The Effect of Mercuric-Salts on the Electrorotation of Yeast-Cells and Comparison with A Theoretical-Model. *Biochim. Biophysica Acta* **900**:45-55.
- Gimsa,J., Marszalek,P., Loewe,U. and Tsong,T.Y.** (1991) Dielectrophoresis and electrorotation of neurospora slime and murine myeloma cells. *Biophys. J.* **60**:749-760.
- Glaser,R., Fuhr,G. and Gimsa,J.** (1983) Rotation of erythrocytes, plant cells, and protoplasts in an outside rotating electric field. *Stud. Biophys.* **96**:11-20.
- Glaser,A. and Donath,E.** (1989) Extracellular multivalent cations are necessary for plasma membrane expansion in oat protoplasts. *Studia biophysica* **131**: 35
- Haritou,M., Yova,D., Loukas, S.** (2000) Agents facilitating the electric field-induced fusion of intact rabbit erythrocytes. *Bioelectrochem.* **52**:229-238
- Hedrich,R. and Neher,E.** (1987) Cytoplasmic Calcium Regulates Voltage-Dependent Ion Channels in Plant Vacuoles. *Nature* **329**:833-836.
- Herzog,E., Hemmer,O., Hauser,S., Meyer,G., Bouzoubaa,S. and Fritsch,C.** (1998) Identification of genes involved in replication and movement of peanut clump virus. *Virology* **248**:312-322.
- Holzapfel,C., Vienken,J. and Zimmermann,U.** (1982) Rotation of cells in an alternating electric-field - theory and experimental proof. *J. Membr. Biol.* **67**:13-26.
- Hörtensteiner,S., Martinoia,E. and Amrhein,N.** (1992) Reappearance of hydrolytic activities and tonoplast proteins in the regenerated vacuole of evacuated protoplasts. *Planta.* **187**:113-121.
- Jahic,M., Veide,A., Charoenrat,T., Teeri,T. and Enfors,S.-O.** (2006) Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* **22**:1465-1473.
- Jeltsch,E. and Zimmermann,U.** (1979) Particles in A Homogeneous Electrical-Field - Model for the Electrical Breakdown of Living Cells in A Coulter-Counter. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **6**:349-384.
- Johannes,E., Brosnan,J.M. and Sanders,D.** (1992) Parallel pathways for intracellular Ca<sup>2+</sup> release from the vacuole of higher plants. *Plant J.* **2**:97-102.
- Jones,T.B.** (1995) *Electromechanics of Particles*. New York: Cambridge University Press.
- Kaler,K.V.I.S. and Jones,T.B.** (1990) Dielectrophoretic spectra of single cells determined by feedback-controlled levitation. *Biophys. J.* **57**:173-182.

- Kiesel,M., Reuss,R., Endter,J., Zimmermann,D., Zimmermann,H., Shirakashi,R., Bamberg,E., Zimmermann,U. and Sukhorukov,V.L.** (2006) Swelling-activated pathways in human T-lymphocytes studied by cell volumetry and electrorotation. *Biophys. J.* **90**:4720-4729.
- Knight,H., Trewavas,A.J. and Knight,M.R.** (1996) Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* **8**:489-503.
- Knight,H.** (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int.Rev.Cytol.***195**:269-324.
- Knight,M.R., Campbell,A.K., Smith,S.M. and Trewavas,A.J.** (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352**:524-526.
- Kriegmaier,M., Zimmermann,M., Wolf,K., Zimmermann,U. and Sukhorukov VL.** (2001) Dielectric spectroscopy of *Schizosaccharomyces pombe* using electrorotation and electroorientation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1568**:135-46.
- Lecourieux,D., Mazars,C., Pauly,N., Ranjeva,R. and Pugin,A.** (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* **14**:2627-2641.
- Lee,C.C., Williams,T.G., Wong,D.W.S. and Robertson,G.H.** (2005) An episomal expression vector for screening mutant gene libraries in *Pichia pastoris*. *Plasmid* **54**:80-85.
- Levine,A., Pennell,R.I., Alvarez,M.E., Palmer,R. and Lamb,C.** (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* **6**:427-437.
- Li,Y., Dalton,C., Crabtree,H. J., Nilsson,G. and Kaler,K. V. I. S.** (2006) Continuous dielectrophoretic cell separation microfluidic device. *Lab Chip.* **7**:239-248.
- Link,V.L., Hofmann,M.G., Sinha,A.K., Ehness,R., Strnad,M. and Roitsch,T.** (2002) Biochemical evidence for the activation of distinct subsets of mitogen-activated protein kinases by voltage and defense-related stimuli. *Plant Physiol.* **128**:271-281.
- Linsmaier,E.M. and Skoog,F.** (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **18**:100-127.
- Lynch,P.T. and Davey,M.R.** (1996) *Electrical Manipulation of Cells* NY: Chapman & Hall.
- Linsmaier,E.M. and Skoog,F.** (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **18**:100-127.
- Mahaworasilpa,T.L., Coster,H.G.L. and George,E.P.** (1996) Forces on biological cells due to applied alternating (AC) electric fields. II. Electro-rotation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1281**:5-14.

- Malone, M., Leigh, R.A. and Tomos, A.D.** (1991) Concentrations of vacuolar inorganic ions in individual cells of intact wheat leaf epidermis. *J. Exp. Bot.* **42**:305-309.
- Marszalek, P. and Tsong, T.Y.** (1995) Cell fission and formation of mini cell-bodies by high-frequency alternating electric-field. *Biophys. J.* **68**:1218-1221.
- Martinet, W., Van den Plas, D., Raes, H., Reekmans, R. and Contreras, R.** (1999) Bax-induced cell death in *Pichia pastoris*. *Biotech. Lett.* **21**:821-829.
- Mogelsvang, S., Gomez-Ospina, N., Soderholm, J., Glick, B.S. and Staehelin, L.A.** (2003) Tomographic evidence for continuous turnover of Golgi cisternae in *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Cell.* **14**:2277-2291.
- Mithöfer, A. and Mazars, C.** (2002) Aequorin-based measurements of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -signatures in plant cells. *Biol. Proc. Online* **4**:105-118.
- Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S.** (1992) Tobacco BY-2 cell-line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **132**:1-30.
- Pantoja, O., Gelli, A. and Blumwald, E.** (1992) Voltage-dependent calcium channels in plant vacuoles. *Science* **255**:1567-1570.
- Pethig, R., Bressler, V., Carswell-Crumpton, C., Chen, Y., Foster-Haje, L., Garcia-Ojeda, M.E., Lee, R.S., Lock, G.M., Talary, M.S. and Tate, K.M.** (2002) Dielectrophoretic studies of the activation of human T lymphocytes using a newly developed cell profiling system. *Electrophoresis* **23**:2057-2063.
- Pilwat, G., Richter, H.-P. and Zimmermann, U.** (1981) Giant culture cells by electric field-induced fusion. *FEBS Lett.* **133**:169-174.
- Ping, Z., Yabe, I. and Muto, S.** (1992) Identification of  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the vacuolar membrane of tobacco cell suspension cultures. *Protoplasma* **171**:7-18.
- Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewavas, A.J. and Knight, M.R.** (1994) Oxidative Signals in Tobacco Increase Cytosolic Calcium. *Plant Cell* **6**:1301-1310.
- Radu, M., Petcu, I., Sommer, A. and Avram, D.** (1996) Changes in membrane electrical parameters of yeast following chemical treatment for protoplast isolation. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **40**:159-166.
- Reisen, D., Marty, F. and Leborgne-Castel, N.** (2005) New insights into the tonoplasts architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biol.* **5**:1-13.
- Rudd, J.J. and Franklin-Tong, V.E.** (2001) Unravelling response-specificity in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling pathways in plant cells. *New Phytol.* **151**:7-33.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. and Harper, J.F.** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**:401-417.

- Sano,T., Higaki,T., Handa,K., Kadota,Y., Kuchitsu,K., Hasezawa,S., Hoffmann,A., Endter,J., Zimmermann,U., Hedrich,R. and Roitsch,T.** (2006) Calcium ions are involved in the delay of plant cell cycle progression by abiotic stresses. *FEBS Lett.* **580**:597-602.
- Sasamoto,H., Wakita,Y., Yokota,S., Yoshizawa,N., Katsuki,T., Nishiyama,Y., Yokoyama,T. and Fukui,M.** (2006) Effects of electric cell fusion treatment among leaf protoplasts of *Populus alba* and *Alnus firma* on growth, leaf morphology, and RAPD pattern of eleven acclimatized plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **42**:174-178.
- Scheurich,P. and Zimmermann,U.** (1981) Giant human-erythrocytes by electric-field-induced cell-to-cell fusion. *Naturwissenschaften* **68**:45-46.
- Schmidt,E., Leinfelder,U., Gessner,P., Zillikens,D., Bröcker,E.-B. and Zimmermann,U.** (2001) CD19(+) B lymphocytes are the major source of human antibody-secreting hybridomas generated by electrofusion. *J. Immunol. Methods.* **255**:93-102.
- Schnettler,R. and Zimmermann,U.** (1993) Zinc ions stimulate electrofusion of hansenula-polymorpha protoplasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 47-52.
- Sukhorukov,V.L., Arnold,W.M. and Zimmermann,U.** (1993) Hypotonically induced changes in the plasma membrane of cultured mammalian cells. *J. Membr. Biol.* **132**:27-40.
- Sukhorukov,V.L., Djuzenova,C.S., Arnold,W.M. and Zimmermann,U.** (1994) DNA, protein, and plasma-membrane incorporation by arrested mammalian cells. *J. Membr. Biol.* **142**:77-92.
- Sukhorukov,V.L., Mussauer,H. and Zimmermann,U.** (1998a) The effect of electrical deformation forces on the electropermeabilization of erythrocyte membranes in low- and high-conductivity media. *J. Membr. Biol.* **163**:235-245.
- Sukhorukov,V.L., Benkert,R., Obermeyer,G., Bentrup,F. and Zimmermann,U.** (1998b) Electrorotation of isolated generative and vegetative cells, and of intact pollen grains of *Lilium longiflorum*. *J. Membr. Biol.* **161**:21-32.
- Sukhorukov,V.L., Kürschner,M., Dilsky,S., Lisek,T., Wagner,B., Schenk,W.A., Benz,R. and Zimmermann,U.** (2001) Phloretin-induced changes of lipophilic ion transport across the plasma membrane of mammalian cells. *Biophys. J.* **81**:1006-1013.
- Sukhorukov,V.L., Reuss,R., Zimmermann,D., Held,C., Müller,K.J., Kiesel,M., Gessner,P., Steinbach,A., Schenk,W.A., Bamberg,E. and Zimmermann,U.** (2005) Surviving high-intensity field pulses: strategies for improving robustness and performance of electrotransfection and electrofusion. *J. Membr. Biol.* **206**:187-201.
- Sukhorukov,V.L., Reuss,R., Endter,J.M., Fehrmann,S., Katsen-Globa,A., Gessner,P., Steinbach,A., Müller,K.J., Karpas,A., Zimmermann,U. and Zimmermann,H.** (2006) A biophysical approach to the optimisation of dendritic-tumour cell electrofusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**:829-839.

- Sukhorukov,V.L., Endter,J.M., Zimmermann,D., Shirakashi,R., Fehrmann,S., Kiesel,M., Reuss,R., Becker,D., Hedrich,R., Bamberg,E., Roitsch,T. and Zimmermann,U.** (2007) Mechanisms of electrically mediated cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients in aequorin-transformed tobacco cells. *Biophys. J.* **93**:3324-3337.
- Takahashi,K., Isobe,M., Knight,M.R., Trewavas,A.J. and Muto,S.** (1997) Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in tobacco suspension-culture cells. *Plant Physiol.* **113**:587-594.
- Trevor,K.T., Cover,C., Ruiz,Y.W., Akporiaye,E.T., Hersh, E.M., Landais,D., Taylor,R.R., King,A.D. Walters,R.E.** (2004) Generation of dendritic cell-tumour cell hybrids by electrofusion for clinical vaccine application, *Cancer Immunol. Immunother.* **53**:705–714.
- Tsoneva,I., Tomov,T., Panova,I. and Doncheva,J.** (1992) Electrofusion in the presence of divalent-cations. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **27**: 37-40.
- Valat,L., Fuchs,M., and Burrus,M.** (2006) Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of Grapevine fanleaf virus: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation. *Plant Sci.* **170**:739-747.
- Weaver,J.C.** (2003) Electroporation of biological membranes from multicellular to nano scales. *IEEE Trans. Diel. Electr. Insul.* **10**:754–768.
- Zimmermann,U., Riemann,F. and Pilwat,G.** (1976) Enzyme loading of electrically homogeneous human red blood cell ghosts prepared by dielectric breakdown. *Biochim. Biophys. Acta.* **436**:460-474.
- Zimmermann,U. and Neil,G.A.** (1996) *Electromanipulation of Cells*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Zimmermann,U., Friedrich,U., Mussauer,H., Gessner,P., Hamel,K. and Sukhorukov,V.** (2000) Electromanipulation of mammalian cells: Fundamentals and application. *IEEE Trans. Plasma. Sci.* **28**:72-82.

## Kapitel 8

### Anhang

#### 8.1 Lebenslauf

##### Persönliche Angaben:

Vorname, Name: Jörg-Michael Endter  
 Geburtstag: 06. Februar 1975  
 Geburtsort: Fulda

##### Schulbildung:

1981-1985 Grundschule Marbach  
 1985-1994 Rabanus-Maurus-Schule Fulda  
 06/1994 Abitur

##### Zivildienst:

09/1994-10/1995 Zivildienst beim Malteser Hilfsdienst in Fulda

##### Hochschulbildung:

11/1995-12/2001 Studium der Biologie(Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

1997 Vordiplom

2001 Diplom

Hauptfach: Biotechnologie

Nebenfächer: Biochemie, Zell- und Entwicklungsbiologie

*Diplomarbeit:* Elektrische Feldeffekte auf Zellmembranen:  
 Untersuchung neuer optischer Verfahren zur Darstellung elektrischer Feldeffekte auf Zellmembranen

Seit 12/2001 Promotionsstudium am Lehrstuhl für Biotechnologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg



## 8.2 Eigene Publikationen

**Reuss,R., Horbaschek,M., Endter,J. M., Zimmermann,U. and Sukhorukov,V. L.** (2004) The effect of disaccharides on the transport of lipophilic ions in cell membranes studied by electrorotation. *Electrostatics* **178**:101-106.

**Kiesel,M., Reuss,R., Endter,J., Zimmermann,D., Zimmermann,H., Shirakashi,R., Bamberg,E., Zimmermann,U. and Sukhorukov,V.L.** (2006) Swelling-activated pathways in human T-lymphocytes studied by cell volumetry and electrorotation. *Biophys. J.* **90**:4720-4729.

**Sano,T., Higaki,T., Handa,K., Kadota,Y., Kuchitsu,K., Hasezawa,S., Hoffmann,A., Endter,J., Zimmermann,U., Hedrich,R. and Roitsch,T.** (2006) Calcium ions are involved in the delay of plant cell cycle progression by abiotic stresses. *FEBS Lett.* **580**:597-602.

**Sukhorukov,V.L., Reuss,R., Endter,J.M., Fehrmann,S., Katsen-Globa,A., Gessner,P., Steinbach,A., Müller,K.J., Karpas,A., Zimmermann,U. and Zimmermann,H.** (2006) A biophysical approach to the optimisation of dendritic-tumour cell electrofusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**:829-839.

**Dessie,S.W., Rings,F., Hölker,M., Gilles,M., Jennen,D., Tholen,E., Havlicek,V., Besenfelder,U., Sukhorukov,V.L., Zimmermann,U., Endter,J.M., Sirard,M.A., Schellander,K. and Tesfaye,D.** (2007) Dielectrophoretic behavior of in vitro-derived bovine metaphase II oocytes and zygotes and its relation to in vitro embryonic developmental competence and mRNA expression pattern. *Reproduction* **133**:931-946.

**Sukhorukov,V.L., Endter,J.M., Zimmermann,D., Shirakashi,R., Fehrmann,S., Kiesel,M., Reuss,R., Becker,D., Hedrich,R., Bamberg,E., Roitsch,T. and Zimmermann,U.** (2007) Mechanisms of electrically mediated cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients in aequorin-transformed tobacco cells. *Biophys. J.* **93**:3324-3337.

### ***8.3 Copyright Permission***

Die Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden - mit großer Unterstützung von Prof. Dr. U. Zimmermann und Dr. V.L. Sukhorukov - im Biophysical Journal veröffentlicht.

Die vorliegende Arbeit stützt sich auf den nachfolgend genannten Artikel und besteht teilweise aus Übersetzung von diesem. Ich möchte den Rechteinhabern für ihre Erlaubnis dazu danken. Auf den nächsten Seiten ist die „Copyright Permission“ angeführt.

**Sukhorukov,V.L., Endter,J.M., Zimmermann,D., Shirakashi,R., Fehrmann,S., Kiesel,M., Reuss,R., Becker,D., Hedrich,R., Bamberg,E., Roitsch,T. and Zimmermann,U.** (2007) Mechanisms of electrically mediated cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients in aequorin-transformed tobacco cells. *Biophys J.* **93**:3324-3337.

Auf der Internet-Seite des Biophysical Journals, ist im Bereich für „Subscriptions“ nachfolgender Absatz zu finden:

In consideration of the publication of this article, the author represents that the article is his/her original work. If the article was prepared jointly, the author agrees to inform the co-authors of the terms of this agreement and to obtain their permission to sign on their behalf. The article is submitted only to this Journal, and has not been published before. (If excerpts from copyrighted works are included, the author will obtain written permission from the copyright owners and show credit to the sources in the article.) The author also represents that, to the best of his/her knowledge, the article contains no libelous or unlawful statements and does not infringe on the rights of owners. The author grants to us or our successors all rights in the article of whatsoever kind of nature, including those now or hereafter protected by Copyright Laws of the United States and all foreign countries, as well as any renewal, extension, or reversion of copyright, now or hereinafter provided, in any country.

Biophysical Society, in turn, grants to the author the following:

1. Proprietary rights other than copyright, such as patent rights.
2. The right to make copies of all or part of the article for the authors use in classroom teaching.
3. The royalty-free right to use, after publication, all or part of the article in any book of which he or she is the author or editor.
4. The right to make copies of the article for internal distribution within the institution which employs the author.
5. The right to use figures and tables from the article, and up to 250 words of text, for any purpose.
6. The right to make oral presentations of material from the article.

All copies made under the above instances are subject to the expressed condition that lawful notice of claim of copyright is given.

In the case of an article prepared under United States Government contract, the U.S. Government may reproduce, royalty-free, all or portions of the article and may authorize others to do so, for noncommercial U.S. Government purposes only.

In all instances where the article is prepared as a "work made for hire" for an employer, the employer(s) of the author(s) retain(s) the right to revise, adapt, prepare derivative works, publish, reprint, reproduce, and distribute the work provided that all such use is for promotion of its business enterprise.

Wie diese Copyright Information ausführt, ist es nicht nötig, eine spezielle Erlaubnis beim Verlag einzuholen, um Textmaterial oder Abbildungen aus folgendem Artikel in einer Dissertation zu verwenden

(siehe <http://submit.biophysj.org/journals/biophysj/forms/copyright.pdf>).

**Sukhorukov,V.L., Endter,J.M., Zimmermann,D., Shirakashi,R., Fehrmann,S., Kiesel,M., Reuss,R., Becker,D., Hedrich,R., Bamberg,E., Roitsch,T. and Zimmermann,U.** (2007) Mechanisms of electrically mediated cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients in aequorin-transformed tobacco cells. *Biophys J.* **93**:3324-3337.

Die angegebene Seite wurde am 29.06.2008 abgerufen und überprüft.