

**ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN
EINZELLIGEN MARINEN RIESENALGEN:
DIE KOMBINIERTE LADUNGSPULS-/MIKROPERFUSIONSTECHNIK ZUR
GETRENNTEN DARSTELLUNG DER MEMBRANEIGENSCHAFTEN VON
PLASMALEMMA UND TONOPLAST**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG

VORGELEGT VON
CHRISTOPH RYSER
AUS BADEN-BADEN

WÜRZBURG IM FEBRUAR 2000

EINGEREICHT AM 28. FEBRUAR 2000

BEI DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE DER UNIVERSITÄT WÜRZBURG.

MITGLIEDER DER PROMOTIONSKOMMISSION:

VORSITZENDER: PROF. DR. WERNER GOEBEL

GUTACHTER: PROF. DR. ULRICH ZIMMERMANN

GUTACHTER: PROF. DR. HARTMUT GIMMLER

TAG DES PROMOTIONSKOLLOQUIUMS: 26. MAI 2000

DOKTORURKUNDE AUSGEHÄNDIGT AM:

1	<u>EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
2	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>8</u>
2.1	VERSUCHSOBJEKTE UND KULTURBEDINGUNGEN.....	8
2.1.1	VALONIA UTRICULARIS	8
2.1.2	VENTRICARIA VENTRICOSA.....	11
2.2	VERWENDETE MEDIEN UND LÖSUNGEN.....	13
2.2.1	EXTERNE MEDIEN	13
2.2.2	MEDIEN ZUR INTERNEN PERFUSION.....	17
2.2.3	MEDIEN ZUR GEZIELTEN PERMEABILISIERUNG DER MEMBRANEN	18
2.3	DIE KOMBINIERTER LADUNGSPULS- / MIKROPERFUSIONSTECHNIK	19
2.3.1	DIE LADUNGSPULSTECHNIK	20
2.3.2	DIE MIKROPERFUSION	23
2.4	ANALYSE DER DATEN	24
3	<u>ERGEBNISSE 1: VALONIA UTRICULARIS.....</u>	<u>28</u>
3.1	DIE VORTEILE DER MIKROPERFUSION.....	28
3.2	DER EINFLUSS DES TURGORDRUCKS AUF DAS LADUNGSPULSRELAXATIONSSPEKTRUM	31
3.3	AUSWIRKUNGEN VON NYSTATIN UND AMPHOTERICIN B AUF DAS LADUNGSPULSRELAXATIONSSPEKTRUM: ZUORDNUNG DER RELAXATIONEN ZU DEN ELEKTRISCHEN EIGENSCHAFTEN VON PLASMALEMMA UND TONOPLAST	34
4	<u>ERGEBNISSE 2: VENTRICARIA VENTRICOSA</u>	<u>39</u>
4.1	DIE EFFEKTE VON EXTERNEM UND VAKUOLÄREM NYSTATIN AUF DAS LADUNGSPULSSPEKTRUM	39
4.2	DER EINFLUSS DES EXTERNEN PH-WERTES AUF DAS RELAXATIONSSPEKTRUM	44
4.3	DIE ABHÄNGIGKEIT DER RELAXATIONSSPEKTREN UND DER LEITFÄHIGKEIT DES PLASMALEMMA UND DES TONOPLASTEN VON DEN HAUPTIONEN IM AUBENMEDIUM	45
4.3.1	DER EINFLUSS AUF DAS LADUNGSPULSSPEKTRUM	46
4.3.2	DER EINFLUSS AUF DIE LEITFÄHIGKEIT DES PLASMALEMMA.....	50
4.3.3	DER EINFLUSS AUF DIE LEITFÄHIGKEIT DES TONOPLASTEN	53

4.4	DIE WIRKUNG VON NYSTATIN UND DER EXTERNEN IONEN AUF DAS VAKUOLENPOTENTIAL.....	55
4.5	DIE TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER ELEKTRISCHEN EIGENSCHAFTEN VON PLASMALEMMA UND TONOPLAST	58
4.6	HINWEISE AUF KALIUM- UND CHLORID-KANÄLE BZW. CARRIER IM PLASMALEMMA	60
5	<u>DISKUSSION.....</u>	70
5.1	DIE KOMBINIERTER LADUNGSPULS-/MIKROPERFUSIONSTECHNIK ERMÖGLICHT EINE GEZIELTE MANIPULATION UND EXAKTE AUFZEICHNUNG WICHTIGER MEMBRANPARAMETER MARINER RIESENALGEN.....	70
5.2	DAS "ZWEI-MEMBRANEN MODELL": DIE BEIDEN RELAXATIONEN DES LADUNGSPULSRELAXATIONSSPEKTRUMS STAMMEN VON DEN PASSIVEN ELEKTRISCHEN EIGENSCHAFTEN DES PLASMALEMMAS UND DES TONOPLASTEN.....	72
5.3	DIE TONOPLASTEN OBERFLÄCHE IST DURCH FALTUNG STARK VERGRÖßERT; DER FLÄCHENSPEZIFISCHE WIDERSTAND DES TONOPLASTEN IST HOCH.....	73
5.4	DIE FALTUNG DES TONOPLASTEN KÖNNTE EINE ROLLE BEI DEM FÜR DIE TURGORREGULATION BENÖTIGTEN TURGORSENSOR SPIELEN.....	77
5.5	DIE PHYSIOLOGISCHEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN V. UTRICULARIS UND V. VENTRICOSA BESTÄTIGEN DIE TAXONOMISCHE TRENNUNG DER GATTUNGEN	79
5.6	DER EINFLUSS DER HAUPTIONEN IM AUßENMEDIUM AUF DIE PLASMALEMMALEITFÄHIGKEIT VON V. VENTRICOSA ZEIGT INDIVIDUELLE VARIATIONEN	80
5.7	DAS ZYTOPLASMA VON V. VENTRICOSA IST NEGATIV GELADEN.....	81
5.8	AUSBLICK	83
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	86
7	<u>SUMMARY.....</u>	88
8	<u>APPENDIX.....</u>	90
9	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	93

10 LITERATUR.....	95
11 PUBLIKATIONEN.....	106
12 DANKE!.....	107
13 LEBENSLAUF.....	109
14 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	110

1 Einleitung

Für viele Pflanzen stellt die Fähigkeit, Schwankungen im Turgordruck der Zellen ausgleichen zu können, eine wichtige Überlebensstrategie dar. Druckunterschiede treten beispielsweise beim Wachstum oder unter Trockenstressbedingungen auf. Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom Phänomen der Turgorregulation [Ray, Green, & Cleland, 1972; Zimmermann, 1978; Zimmermann & Steudle, 1978; Beilby, 1989a; Tomos & Pritchard, 1994; Bisson & Kirst, 1995]. Wichtigste Voraussetzung für das Ausbilden einer hydrostatischen Druckdifferenz zwischen Zelle und Atmosphäre ist das Vorhandensein einer starren Zellwand, die bei pflanzlichen Zellen – im Gegensatz zu tierischen Zellen – den Protoplasten umgibt und einer Ausdehnung des Zellvolumens entgegenwirkt.

Die Einstellung des Turgors auf den ursprünglichen Wert erfolgt dabei durch eine Anpassung des osmotischen Innendrucks bzw. durch eine Regulierung der osmotischen Druckdifferenz zwischen dem intrazellulären und dem extrazellulären Milieu. Sowohl für Süßwasseralgen, als auch für großzellige marine Algen liegen bislang detaillierte und systematische Untersuchungen vor, die die Abhängigkeit von Transportprozessen über pflanzliche Membranen vom Turgordruck behandeln [Bisson & Kirst, 1995]. Bei marinen Algen der Gattungen *Valonia*, *Ventricaria*, *Acetabularia* und *Chaetomorpha*, sowie auch bei einigen im Süßwasser vorkommenden Characeen (z.B. *Lamprothamnium*) erfolgt die Anpassung des Turgors primär durch die Abgabe bzw. Aufnahme von KCl.

Seit langem sind einzellige Riesenalgen bevorzugte Objekte für derartige Untersuchungen, da in die Vakuole dieser Zellen leicht Mikrokapillaren eingeführt werden können, die es erlauben, die hydraulischen und elektrischen Eigenschaften der Membranbarriere (bestehend aus Plasmalemma und Tonoplast) zu messen. Auch gezielte Manipulation des Membranpotentials und des Innendrucks der Zellen ist möglich. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung

von einzelligen Organismen ist, dass hier im Gegensatz zu mehrzelligen Geweben höherer Pflanzen keine hydraulische und elektrische Kopplung der Zellen untereinander auftritt, die die experimentellen Möglichkeiten stark einschränkt und die Interpretation der Daten erschwert.

Nach der Etablierung der Druckmesssondentechnik waren es dann auch Algen wie z.B. *Ventricaria ventricosa*, *Valonia utricularis*, *Acetabularia mediterranea* oder *Chara corallina*, an denen erstmals der Einfluss des Turgordrucks auf die Ionentransportprozesse pflanzlicher Zellen eingehend studiert und nachgewiesen werden konnte [Gutknecht, 1968; Zimmermann & Steudle, 1974; Zimmermann & Steudle, 1978; Wendler, Zimmermann, & Bentrup, 1983; Tazawa, Shimmen, & Mimura, 1987].

Schon vor etwa 60 Jahren begannen Wissenschaftler mit Experimenten, die den Austausch bzw. die Manipulation des Vakuoleninhalts zum Thema hatten [Blinks, 1934]. Dabei wurde versucht, mit Hilfe einer frühen Perfusionstechnik Erkenntnisse über die Ionentransportprozesse der Alge *Halicystis* zu erhalten. Diese Technik der vakuolären Perfusion wurde dann zwischen 1960 und 1980 von Gutknecht sowie von Tazawa und Mitarbeitern wieder aufgegriffen und bei Algen wie *Ventricaria* bzw. *Nitella* und *Chara* angewandt [Gutknecht, 1968; Tazawa, 1964; Tazawa, Shimmen, & Mimura, 1987]. Obwohl mit Hilfe dieser Technik einige interessante Kenntnisse erarbeitet werden konnten, wurde die Perfusion in den letzten Jahren nicht weiter verfolgt, da die Aussagekraft ihrer Ergebnisse limitiert war. Grund hierfür war vor allem, dass die Perfusion der Zelle nicht bei physiologischem Innendruckverhältnissen, sondern nur im turgorlosen Zustand durchgeführt werden konnte. Damit war das eigentliche Ziel dieser Experimente, nämlich die Aufklärung der Übertragung von Drucksignalen auf die Ionentransportprozesse (und deren Druckabhängigkeit), *per se* nicht erreicht worden.

Durch die Einführung der Ladungspulsrelaxationstechnik vor ca. 18 Jahren gelang es, die Prozesse, die bei der Turgorregulation der Algen ablaufen, genauer zu charakterisieren [Zimmermann, Büchner, & Benz, 1982; Benz & Zimmermann, 1983; Wang et al., 1991; Wang et al., 1997a; Wang et

al., 1997b]. Trotz umfangreicher Untersuchungen auf dem Gebiet der Turgor- und Osmoregulation mariner Algen war die Lokalisation des für diese Prozesse verantwortlichen Turgorsensors bislang nicht geglückt.

Der Hauptgrund hierfür ist sicherlich darin zu suchen, dass bei einem Einführen von Mikroelektroden oder Mikrokapillaren (wie dies beispielsweise bei der Ladungspulsmethode der Fall ist) die Spitze der Kapillare ausnahmslos in der Vakuole der Alge positioniert wird. Die starre Zellwand, die äußerst dünne zytoplasmatische Schicht (Dicke: 6-10 μm) und die hohe Elastizität der beiden Membranen Plasmalemma und Tonoplast verhindern dabei eine Platzierung der Mikroelektroden im Zytoplasma. Man erfasst also mit einer solchen Messanordnung stets nur die Summe der am Plasmalemma und am Tonoplast erzeugten Membranpotentiale bzw. die Summe der elektrischen Widerstände dieser in Serie geschalteten Membranen. Weil somit bis vor ca. drei Jahren eine separate Messung elektrischer Parameter von Plasmalemma und Tonoplast nicht möglich war, blieb lange Zeit ungeklärt, welchen Beitrag die einzelnen Membransysteme beispielsweise zum Gesamtwiderstand oder zu der gesamten Potentialdifferenz leisten. Insbesondere die Rolle des Tonoplasten war über viele Jahre Gegenstand kontrovers geführter Diskussionen [Lainson & Field, 1976; Davis, 1981; Beilby, 1989a; Wang et al., 1991].

Auch die mit Hilfe der Ladungspulstechnik gewonnenen Relaxationsspektren von *V. utricularis* und *V. ventricosa* konnten zunächst nicht eindeutig interpretiert werden [Benz & Zimmermann, 1983; Wang et al., 1991; Wang, Zimmermann, & Benz, 1993; Spieß et al., 1993]. Dabei konnte nach Aufladung einer Zelle durch Applikation eines Ladungspulses in der Regel immer eine biphasische Relaxation des Gesamtmembranpotentials beobachtet werden, die durch die Summe zweier Exponentialfunktionen beschrieben werden konnte. Geht man von nicht identischen elektrischen und geometrischen Eigenschaften der beiden Membranen aus, kann man eine solche biphasische Spannungsrelaxation erwarten, wenn zwei Membransysteme (Plasmalemma und Tonoplast) in Serie geschaltet angeordnet sind. Eine Analyse der Spektren von *V. utricularis* oder *V. ventricosa* ergab jedoch eine ungewöhnlich hohe

flächenspezifische Kapazität des Tonoplasten (etwa 6 bis 7 $\mu\text{F cm}^{-2}$), die darauf hindeutete, dass der Tonoplast durch Faltung oder schwammförmigen Aufbau eine erhebliche Oberflächenvergrößerung erfahren haben musste. Diese Hypothese stand jedoch im Widerspruch zur Literatur [Fagerberg, 1983; Fagerberg, 1984].

Es wurde daher zunächst das sog. "Modell der mobilen Ladungen" favorisiert, um die biphasische Spannungsrelaxation von *V. utricularis* oder *V. ventricosa* zu erklären. Dabei bezog man die vordere, schnell ablaufende Relaxation auf die Translokation mobiler Ladungen im Plasmalemma, während die zweite, langsamere Relaxation auf die elektrischen Eigenschaften des Plasmalemmas zurückgeführt wurde. Eine Analyse der Daten nach diesen Vorgaben führte daraufhin zu der Annahme, dass der Tonoplast hochleitend sein müsse und aus diesem Grund nicht auf das Ladungspulsrelaxationsspektrum einwirke. Diese Schlussfolgerung stand zwar im Einklang mit der Literatur über marine Rieselalgen [Beilby, 1989a], entsprach jedoch nicht den elektrischen Eigenschaften isolierter Vakuolen aus höheren Pflanzen [Bentrup et al., 1985; Bentrup et al., 1986]. Unterstützung schien dieses Modell durch Experimente zu erhalten, die die mobilen Ladungen dem elektrogenen Chlorid-Transportystem im Plasmalemma zuordnen konnten, und durch Modellexperimente mit lipophilen Anionen an planaren Lipiddoppelmembranen [Pickar & Benz, 1978a].

Endgültig konnte die Frage, ob der Tonoplast mariner Algen, wie z.B. *V. utricularis* oder *V. ventricosa*, hochleitend ist, oder einen hohen elektrischen Widerstand aufweist (und dann in der Konsequenz möglicherweise stark gefaltet ist) erst durch die Entwicklung der Mikroperfusionstechnik beantwortet werden. Diese Technik erlaubt den kontrollierten Austausch des Vakuolenmediums unter Turgordruck.

Schon in früheren Arbeiten wurde mit perfundierten Zellen der Alge *V. ventricosa* [Gutknecht, 1967] oder an Internodial-Zellen von Characeen [Tazawa, Kikuyama, & Shimmen, 1976] experimentiert. Da diese Messungen jedoch stets nur unter (annähernd) turgorlosen Bedingungen durchgeführt

werden konnten, waren die Erkenntnisse im Bezug auf die turgor-regulatorischen Vorgänge dieser Algen wenig aufschlussreich.

Mit der 1997 vorgestellten kombinierten Ladungspuls-/Mikroperfusions-technik [Wang et al., 1997a] ist es gelungen, den Vakuoleninhalt mariner Riesenalgen unter unabhängiger Kontrolle des Zellurgors und der Perfusionsgeschwindigkeit gezielt zu verändern. Der Turgor kann dabei innerhalb eines weiten Bereiches reguliert werden. Außerdem ist es möglich, die Perfusionsgeschwindigkeit unabhängig davon frei einzustellen. Gleichzeitig zur Manipulation des Vakuolenmediums erlauben in die Perfusionspipetten integrierte Mikroelektroden Ladungspulsrelaxations- oder "Voltage-Clamp"-Experimente an diesen einzelligen Riesenalgen.

Zum Beginn dieser Arbeit wurden für die Interpretation der Ladungspulsspektren mariner Algen zwei Modelle diskutiert: Das favorisierte "Modell der mobilen Ladungen" und das so genannte "Zwei-Membranen Modell".

Experimente an *V. utricularis* lieferten in der Vergangenheit einige Hinweise darauf, dass die Übertragung von Drucksignalen in Transportprozesse primär über mobile Ladungen eines Chlorid-Transportsystems im Plasmalemma erfolgt [Wang et al., 1991]. Experimente an planaren Lipidmembranen konnten zeigen, dass diese mobilen Ladungen generell zum Auftreten einer Relaxation führen [Pickar & Benz, 1978b]. Im biphasischen Relaxationsspektrum wurde dann die schnelle Relaxation den passiven elektrischen Eigenschaften des Plasmalemmas zugeordnet, während die langsame Relaxation auf die Translokation mobiler Ladungen im Plasmalemma zurückgeführt wurde. Ein großer Kritikpunkt dieses Carrier-Modells war jedoch die zwingende Annahme eines hochleitenden, aber salzimpermeablen Tonoplasten, der keinen Beitrag zum Ladungspulsrelaxationsspektrum leistet.

Das zweite Modell, das das Auftreten zweier Relaxationen nach Applikation eines Ladungspulses erklären konnte, stützte sich auf die Hypothese, dass sich die passiven elektrischen Eigenschaften der in Serie

angeordneten Membranen Plasmalemma und Tonoplast in einem solchen biphasischen Spektrum widerspiegeln (siehe Abbildung 1). Eine Analyse der Spektren auf der Grundlage dieses "Zwei-Membranen Modells" ergab aber eine ungewöhnlich hohe flächenspezifische Kapazität und einen hohen Widerstand des Tonoplasten, was in krassem Gegensatz zur Literatur stand [Beilby, 1989b]. Voraussetzung hierfür wäre, dass die Tonoplastenoberfläche z.B. durch Faltung erheblich vergrößert ist, und/oder eine nicht geringe Anzahl mobiler Ladungen eines (nicht näher identifizierten) elektrogenen Transportsystems enthält.

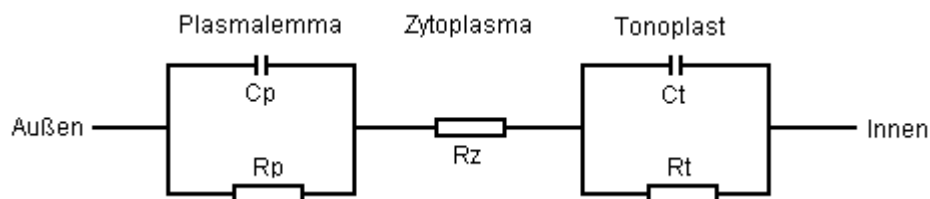


Abbildung 1: Ersatzschaltbild der Membransysteme einer Zelle von *V. utricularis* oder *V. ventricosa* auf Basis des "Zwei-Membranen Modells". Die beiden mit den Widerständen R parallel geschalteten Kapazitäten C sind die Schaltbilder für das Plasmalemma (Index p) bzw. den Tonoplasten (Index t). Der Widerstand des Zytoplasmas ist durch den Widerstand R_z simuliert. Mit "Außen" und "Innen" werden das Badmedium bzw. der Vakuoleninhalt bezeichnet.

Ein Schwerpunkt dieser Dissertation ist daher zum einen die Überprüfung des "Zwei-Membranen Modells" für eine exakte Charakterisierung der Membranparameter von *V. utricularis* und *V. ventricosa*. Des weiteren soll die neue Technik der integrierten Perfusions-/Ladungspulstechnik bei der marinen Riesenalge *V. ventricosa* Anwendung finden, um die elektrischen Eigenschaften und Transportvorgänge dieser Spezies genauer kennen zu lernen.

Vor ca. einem Jahrzehnt erfolgte die Umbenennung und Neu-Klassifizierung von *Ventricaria ventricosa* (früher *Valonia ventricosa*; Olsen & West, 1988). Auch vor diesem Hintergrund ist eine differenzierte

Gegenüberstellung der beiden Spezies hinsichtlich ihrer elektrischen und Membrantransportparameter sehr interessant.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsobjekte und Kulturbedingungen

Sämtliche Experimente wurden mit einzelligen eukaryotischen Rieselalgen der Arten *Valonia utricularis* und *Ventricaria ventricosa* durchgeführt.

2.1.1 *Valonia utricularis*

Valonia utricularis wird der Abteilung der *Chlorophyta* (Grünalgen) zugeordnet, die viele Gemeinsamkeiten mit höheren Pflanzen aufweist (Vorkommen von Chlorophyll a und Chlorophyll b, Stärke als Speicherstoff). Einige Vertreter dieser Abteilung sind als ausgesprochene Landpflanzen bekannt und tolerieren somit eine weitgehende Austrocknung [Strasburger, 1996].

Innerhalb der Abteilung der *Chlorophyta* wird *Valonia utricularis* zur Klasse der *Chlorophyceae* gezählt, die wiederum in sieben Ordnungen unterteilt ist. *Valonia* gehört der Ordnung der *Siphonales* an. Diese zeichnet sich durch einen besonderen Bauplan aus, bei dem nur die Keimzellenbehälter durch Querwände abgetrennt werden. Ein weiteres Charakteristikum dieser Ordnung ist das Vorhandensein von Siphonoxanthin und Siphonein als akzessorischen Pigmenten.

Ein spezieller Teilungsmechanismus, bei dem sich die abgetrennten Protoplasten noch im Mutterthallus mit einer Zellwand umgeben, ist innerhalb der Ordnung der *Siphonales* typisch für die Familie der *Valoniaceae*. Die Gattung *Valonia* stellt den Hauptvertreter dieser Familie dar, die sich in 18 Arten gliedert. Eine dieser Arten ist *Valonia utricularis*, eine marine Alge, deren Thallus aus mehreren keulig-blasenförmigen Zellen besteht, die palisadenartig

dicht nebeneinander gepackt sind (Abbildung 2). Die einzelnen Zellen können eine Größe von 1-2 cm und mehr aufweisen.

In tropischen und subtropischen Gewässern bildet *V. utricularis* bis zu 4 cm hohe Polster auf steinigem Untergrund aus, vor allem in nicht zu sehr dem Sonnenlicht exponierten Felsspalten, die gut von der Brandung durchspült werden. Man findet diese Polster sowohl in geringer Wassertiefe und sogar zeitweise der Luft ausgesetzt am Felsen haftend, als auch in freien ballenförmigen Aggregationen auf dem Meeresgrund.



Abbildung 2: *Valonia utricularis*. Polster mit dicht aneinandergepackten keuligen Einzelzellen. Skalierungsbalken: 7 mm.

Die Zellen von *V. utricularis* besitzen eine große Zentralvakuole, die etwa 99% des gesamten Zellvolumens ausmacht. Diese wird von einem mäßig dicken (6-10 μm) plasmatischen Wandbelag umgeben, der eine große Anzahl

an Zellkernen und mehrere plattenförmige Chloroplasten enthält, die durch feine Fäden netzartig verbunden sind [Fott, 1956]. Die Zellwand besteht aus kristalliner Cellulose-I, die ein gekreuztes fibrilläres Muster aufweist [Nicolai & Preston, 1952]. Daneben treten auch Mannan und Xylan als Zellwandbausteine auf.

Valonia ist diploid; die Reduktionsteilung findet bei der Bildung der Gameten statt. Die Zellteilung vollzieht sich nach Anhäufung von Kernen und Chloroplasten durch Abschnürung mittels einer gewölbten Zellwand, wodurch sich kleine linsenförmige Zellen bilden. Der basale Bereich dieser neuen Zellen bildet Rhizoide aus, wohingegen im apikalen Bereich laterale Zellen entstehen [Van den Hoek, 1984]. Außer auf dem geschilderten vegetativen Weg, kann die Vermehrung von *Valonia* auch asexuell über Zoosporen [Schussnig, 1954; Hori & Enomoto, 1978] oder sexuell durch Gametenbildung erfolgen.

Die spezielle Wundreaktion dieser Alge bei Verletzung wurde gut untersucht [Preston, 1974]. Wurde eine Zelle durch Nadelstiche verletzt, kontrahierte sich der Protoplast in der Regel zu kleinen Kugeln, sog. Aplanosporen, von denen jede für sich zu einem neuen Individuum auswachsen konnte [Preston, 1974]. Bei einer Zellwandverletzung, die einen größeren Durchmesser als 300 µm aufweist, teilt sich das Zytoplasma der "Mutterzelle" in mehrere "Tochterzellen" auf. Diese können zu neuen Protoplasten regenerieren (ca. 500 µm im Durchmesser), die unter günstigen Umständen auch in der Lage sind, eine neue Zellwand auszubilden. Ähnliche Wundreaktionen wurden auch von anderen *Siphonocladales* (beispielsweise *Boergesenia forbesii* und *Ventricaria ventricosa*) berichtet [Menzel, 1988; La Claire II, 1982; Nawata, Kikuyama, & Shihira-Ishikawa, 1993]. Ein ausgearbeitetes Protokoll zur erfolgreichen Regenerierung zellwandbildender Protoplasten aus *V. utricularis* wurde von Wang [Wang et al., 1997b] publiziert.

Die für die durchgeführten Experimente verwendeten Algen der Art *V. utricularis* wurden jedes Jahr im September an den Steilküsten im Osten der Insel Ischia, Italien, gesammelt. Nach Entfernung von Fremdorganismen wurden die Algen in Mittelmeerwasser (Natural Sea Water, NSW) nach

Würzburg transportiert. Zur weiteren Kultivierung teilte man die Algen in einem auf $16\pm 1^\circ\text{C}$ klimatisierten Raum auf mehrere 40 l Acryl-Becken auf, die ebenfalls mit NSW gefüllt, belüftet und gegebenenfalls mittels Umwälzpumpen gereinigt wurden. Die Beleuchtung der Becken erfolgte durch Fluoreszenzlampen mit einer Leistung von 25 W (Typ Fluora, 25 W, 1500 Lux, Fa. Osram, München) in einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus. Das Mittelmeerwasser hatte einen pH-Wert von 8.1 und eine Osmolalität von $1.124 \text{ Osmol kg}^{-1}$, die wöchentlich kontrolliert (kryoskopisches Osmometer, Typ Osmomat 0-30, Fa. Gonotec GmbH, Berlin) und bei Bedarf auf den Sollwert nachreguliert wurde. In den Becken lagen die Algen sowohl in größeren Polstern, als auch als isolierte Einzelzellen vor.

2.1.2 *Ventricaria ventricosa*

Ausführliche Verwandtschaftsuntersuchungen hinsichtlich Morphologie, Zellteilung und Zellproteine erforderten die Ausgliederung einer neuen Gattung *Ventricaria* für die bisherige Art *Valonia ventricosa* [Olsen & West, 1988].

Ventricaria ventricosa ist eine ebenfalls vielkernige Zelle, die jedoch im Gegensatz zu *Valonia* aus unverzweigten, blasigen Vesikeln besteht, die Durchmesser von normalerweise 1-4 μm aufweisen können. Rhizoide Zellen an der basalen Seite sorgen für eine Anheftung an den Untergrund (Abbildung 3). Auch bei *Ventricaria* nimmt eine Zentralvakuole den größten Teil (> 95 %) des Zellvolumens ein.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *V. ventricosa* [Shihira-Ishikawa & Nawata, 1992] zeigten, dass das Protoplasma hauptsächlich von Chloroplasten und Zellkernen gebildet wird und eine dünne ca. 10 μm dicke Schicht zwischen Zellwand und Vakuole darstellt. Die Chloroplasten kommen dabei hauptsächlich eng aneinandergepackt in einer Art Monolayer an der inneren Seite des Plasmalemmas zu liegen; die Zellkerne befinden sich gleichmäßig verteilt innerhalb dieser Chloroplastenaggregation. Mikrotubulare Systeme, das sog. Zytoskelett, stabilisieren diese an sich recht fragile

Organisation: An der Plasmaseite gelegene kortikulare Mikrotubuli verbinden die Chloroplasten untereinander und fixieren diese in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran. Außerdem ziehen große kernassoziierte Mikrotubulinbündel in Strahlen zu den Chloroplasten und sorgen damit für die Verankerung und gleichmäßige Verteilung der Kerne.



Abbildung 3: *Ventricaria ventricosa*. Blasenförmig-kugelige Einzelzelle von beträchtlicher Größe.

Unterschiedlich große Exemplare von *Ventricaria ventricosa* wurden an der Küste von Oahu, Hawaii, USA gesammelt und in kleinen Gefäßen mit Meerwasser schnellstmöglich nach Würzburg gebracht. In 5 bis 10 l Glasbecken wurden die Zellen in gefiltertem Originalwasser bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$, ausreichender Belüftung und nur indirekter Beleuchtung (s.o.) gehalten. Es wurden sowohl frische als auch mehr als ein Jahr in Kultur gehaltene Exemplare untersucht. Bei den frisch gesammelten Exemplaren wurde zusätzlich noch zwischen kleinen ($V_z < 0.5 \text{ ml}$) und großen Zellen ($V_z > 1.0 \text{ ml}$) unterschieden. Man nahm an, dass es sich bei den kleinen Exemplaren um

jüngere Algen handelte, während die großen Zellen als älter betrachtet wurden. Der pH-Wert der *Ventricaria*-Kultur betrug ebenfalls 8.1, die Osmolalität war mit $1.024 \text{ Osmol kg}^{-1}$ deutlich niedriger als bei den Kulturen von *V. utricularis*. Auch hier wurde wöchentlich die Osmolalität überprüft (s.o.) und gegebenenfalls nachreguliert.

2.2 Verwendete Medien und Lösungen

2.2.1 Externe Medien

Standard Artificial Sea Water (Standard-ASW):

Während der Experimente wurden die Algen von künstlichem Meerwasser (Artificial Sea Water, ASW) umspült. Zusammengesetzt aus den wichtigsten im natürlichen Meerwasser vorkommenden Ionen wurde es an die jeweiligen Versuchsvoraussetzungen angepasst und seine Osmolalität analog dem natürlichen Meerwasser der jeweiligen Algenart reguliert. Der pH-Wert wurde mittels HEPES-Puffer (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]) und NaOH bzw. KOH auf 8.1 eingestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Standard-ASW-Lösung für *V. utricularis* und *V. ventricosa*

Verwendete Verbindung	Konzentration / mM	
	<i>V. utricularis</i>	<i>V. ventricosa</i>
NaCl	545	510
KCl	12	11
CaCl ₂	11	10
MgCl ₂	10	9
HEPES/NaOH	10	10

ASW-Lösungen mit variiertes Osmolalität:

Die hyper- bzw. hypoosmotischen Turgorregulationsexperimente konnten durchgeführt werden, wenn das Standard-ASW (siehe Tabelle 1) mit NaCl auf die gewünschte Osmolalität aufgesalzt, bzw. mit *aqua dest.* verdünnt wurde.

ASW-Lösungen mit verändertem pH-Wert:

Für Experimente mit variierten pH-Werten im Außenmedium wurde der Puffer des Standard-ASW (10 mM HEPES) gegen einen Puffer ausgetauscht, der für den jeweiligen pH-Bereich passend war. Nach Herstellung einer 0.1 M Stammlösung wurde die entsprechende Menge (Endkonzentration 10 mM) dem Ansatz beigegeben und mit einer 1 M NaOH-Lösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

Es wurden folgende biologische Puffer verwendet:

HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
PIPES	Piperazine N,N'-bis[ethansulfonsäure]
MES ⁻	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MALAT	L-2-Hydroxybutandionsäure

Genauere Angaben über die Eigenschaften dieser Substanzen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Die wirksamen pH-Bereiche und die pK_a-Werte obiger Puffer bei einer Konzentration von 0.1 M und einer Temperatur von 25°C (entnommen aus dem Katalog der Fa. Sigma, München, 1997/98).

Puffer	Molgewicht / g mol ⁻¹	benötigter pH-Wert	wirksamer pH-Bereich	pK _a
HEPES	238.3	8.1	6.8 – 8.2	7.5
PIPES	302.4	7.0	6.1 – 7.5	6.8
MES ⁻	195.2	6.0	5.5 – 6.7	6.1
MALAT	134.1	4.0 und 5.0		3.4; 5.2

ASW-Lösungen mit unterschiedlichem Gehalt der Hauptionen:

In verschiedenen Experimenten wurde die Konzentration der wichtigsten Ionen im Badmedium variiert, bzw. es wurden diese vollständig durch andere Substanzen substituiert. Durch Mischen dieser Medien mit Standard-ASW konnte der Gehalt der betreffenden Ionensorte leicht verändert werden. Die Zusammensetzung der Substitutions-Medien ist aus Tabelle 3 ersichtlich. Dabei wurde Natrium durch Cholinchlorid ersetzt (ASW / -Na), Kalium durch Natrium (ASW / -K) und Chlorid durch MES⁻ (ASW / -Cl).

ASW-Lösungen mit Ionenkanal-blockierenden Agenzien:

Zur Beantwortung der Frage, welche Ionenkanäle in der Physiologie von *V. utricularis* und *V. ventricosa* eine Rolle spielen, wurden dem ASW Substanzen zugesetzt, die Ionenkanäle selektiv blockieren können. Dabei kam zur Blockierung der Chloridkanäle DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure) in unterschiedlichen Konzentrationen zum Einsatz, während die Kalium-sensitiven Kanäle durch Zugabe von TEA (Tetraethylammonium) und BaCl₂ untersucht wurde. Auf die jeweils eingesetzten Konzentrationen dieser Blocker wird im Ergebnisteil genauer eingegangen.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Substitutions-Medien für *V. utricularis* und *V. ventricosa*

Lösung	verwendete Verbindungen	Konzentration / mM	
		<i>V. utricularis</i>	<i>V. ventricosa</i>
ASW / -Na	Cholinchlorid	545	510
	KCl	12	11
	CaCl ₂	11	10
	MgCl ₂	10	9
	HEPES/KOH	10	10
ASW / -K	NaCl	557	521
	CaCl ₂	11	10
	MgCl ₂	10	9
	HEPES/NaOH	10	10
ASW / -Cl	MES	484	452
	NaOH	469	438
	KOH	12	11
	Ca(OH) ₂	11	10
	Mg(MES) ₂	10	9
	HEPES/NaOH	10	10

2.2.2 Medien zur internen Perfusion

Neben der Variation der Außenlösungen kann mit Hilfe der sog. Mikroperfusion (zum Aufbau siehe 2.3.2) auch der Inhalt der Zentralvakuole der Algen verändert und gezielt manipuliert werden. Dazu wurden Perfusionsmedien entwickelt [Spieß, 1996; Wang et al., 1997a], die in ihrer Zusammensetzung dem vakuolären bzw. zytoplasmatischen Saft von *V. utricularis* und *V. ventricosa* entsprachen.

Standard Perfusionslösung (Artificial Vacuolar Sap, AVS):

Diese Lösung konnte dazu benutzt werden, um in ihr gelöste Substanzen, deren Wirkung untersucht werden sollte, in die Vakuole der Algen zu schleusen. Ihre Zusammensetzung ist in Tabelle 4 aufgezeigt. Die Osmolalität betrug $1.340 \text{ Osmol kg}^{-1}$; der pH-Wert wurde mittels Phosphatpuffer auf 6.3 für *Valonia*, bzw. 6.1 im Falle von *Ventricaria* eingestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Standard-Perfusionslösung AVS bei *V. utricularis* und *V. ventricosa*

Verwendete Verbindung	Konzentration / mM	
	<i>V. utricularis</i>	<i>V. ventricosa</i>
NaCl	220	0
Na ₂ SO ₄	0	22
KCl	440	625
CaCl ₂	3	3
MgCl ₂	3	3
Phosphatpuffer	3	3

Künstliches Zytoplasma-analoges Perfusionsmedium (Artificial Cytoplasmic Sap, ACS):

Zur Applikation von Substanzen, die in der Lage sind, Poren in die Vakuolenmembran der Algen einzubauen (s. weiter unten), musste ein Perfusionsmedium entwickelt werden, das speziell an das zytoplasmatische Milieu von *V. utricularis* und *V. ventricosa* angepasst war [Wang et al., 1997a]. Die Zusammensetzung von ACS ist in Tabelle 5 beschrieben. Die Osmolalität betrug bei *V. utricularis* 1.116 Osmol kg⁻¹ und bei *V. ventricosa* 1.040 Osmol kg⁻¹; der pH-Wert wurde durch HEPES/KOH auf 7.5 eingestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des zytoplasmatischen Mediums ACS bei *V. utricularis* und *V. ventricosa*

Verwendete Verbindung	Konzentration / mM	
	<i>V. utricularis</i>	<i>V. ventricosa</i>
NaCl	40	40
KCl	80	40
K ₂ SO ₄	408	408
CaCl ₂	5	5
MgCl ₂	10	10
EGTA	10	10
HEPES/KOH	10	10

2.2.3 Medien zur gezielten Permeabilisierung der Membranen

Um eine Trennung der elektrischen Eigenschaften von Plasmalemma und Tonoplast erreichen zu können, wurde überlegt, die jeweils eine Membran selektiv mit einem porenbildenden Antibiotikum (Nystatin, Amphotericin B) zu dotieren und dadurch elektrisch kurz zu schließen. Dazu wurden die Antibiotika in einer Konzentration von 5 mM als Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO)

gelöst. Eine entsprechende Menge dieser Stammlösung wurde zu dem künstlichen Zytoplasma-Medium ACS gegeben, so dass das Antibiotikum in einer Endkonzentration von 50 μM vorlag. Das dabei in einer Konzentration von 1% vorhandene DMSO hatte, wie Kontrollmessungen ergaben, keinen Einfluss auf die verwendeten Algenzellen [Wang et al., 1997a; Ryser et al., 1999].

Für die Herstellung der Medien wurden Salze der Firma Merck, Darmstadt verwendet. Die Puffer, Nystatin, Amphotericin B, TEA und DMSO wurden von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen. DIDS kam von der Firma Fluka, Neu-Ulm. Die angesetzten Medien wurden, wenn erforderlich, sterilfiltriert und bis zu ihrer Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.3 Die kombinierte Ladungspuls- / Mikroperfusionstechnik

Zur Durchführung der Experimente wurde eine Messapparatur verwendet, die eine Kombination der Ladungspulstechnik mit einer Methode zur kontrollierten Manipulation des Vakuoleninhalts und des Turgordrucks der Zellen (der sog. Mikroperfusion) darstellt (Abbildung 4). Über erstere Komponente wurde schon mehrfach ausführlich berichtet [Zimmermann & Benz, 1980; Benz & Zimmermann, 1983; Zimmermann, Büchner, & Benz, 1982; Wang et al., 1991; Wang, 1992; Spieß et al., 1993]. Die Technik der Mikroperfusion (vgl. Spieß 1996) soll hier dargestellt werden (siehe dazu auch 3.1).

Die gesamte Apparatur befand sich zur elektrischen Abschirmung in einem Faraday-Käfig und ruhte schwingungsgedämpft auf einer schweren Granitplatte.

Turgor von ca. 0.1 – 0.2 MPa (*Valonia*) bzw. ca. 0.2 – 0.4 MPa (*Ventricaria*) zu beobachten war. Diese Elektroden waren zu diesem Zweck mit Druckwandlern versehen und dienten somit im Stil einer Druckmesssonde gleichzeitig zur Erfassung des Zellurgors. Die Druckmesssonde [Zimmermann & Steudle, 1974] besteht im wesentlichen aus einer luftblasenfrei mit Silikonöl - oder in diesem Fall - Wasser gefüllten Plexiglaskammer, auf welcher ein Druckwandler (Typ CPS 125-200, Kulite Semiconductor Products, Ridgefield, New Jersey, USA) montiert ist, der den in der Kammer herrschenden Druck proportional in eine Spannung umformt, die dann auf einem Voltmeter (*D1*, *D2*, *D3*) direkt abgelesen werden kann. Eine Glaspipette, die an der Spitze dünn ausgezogen wurde (Innendurchmesser ca. 10 – 40 μm) wird – ebenfalls luftblasenfrei gefüllt – druckdicht an die Kammer geschraubt, so dass über das Füllmedium eine Verbindung zwischen der Zelle und dem Druckwandler hergestellt wird. Die Druckmesssonde misst somit direkt den in der Zelle herrschenden Turgordruck.

Eine in der Einlasspipette (*P1*) integrierte Elektrode (3 M KCl/Ag/AgCl) erlaubt, zusätzlich das vakuoläre Ruhepotential (V_{vo}) in Bezug zum Außenmedium zu messen. Dieses liegt bei *Valonia* bei ca. +1 mV, bei *Ventricaria* werden ca. +4 mV gemessen.

Während des gesamten Experimentes wurde die Alge kontinuierlich von ASW, bzw. den jeweiligen Versuchslösungen umspült. Eine Peristaltikpumpe (Typ MS-Reglo, Fa. Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) förderte das Außenmedium in einem Kreislauf aus dem Vorratsbehälter in die Messkammer und wieder zurück. Vor dem Eintritt in die Messkammer wurde die Badlösung durch einen Thermostat (Typ RM9, Fa. Lauda, Lauda-Königshofen) über einen Sekundärkreislauf auf 20°C konstant eingeregelt.

Ein flexibler Lichtleiter einer Kaltlichtquelle (Typ KL 150B, Fa. Schott, Wiesbaden) leuchtete die Messkammer von unten aus. Mit Hilfe eines über der Kammer angebrachten Binokulars (Typ Wild M8, Fa. Leica Heerbrugg, Heerbrugg, Schweiz) konnte der Anstich und der Zustand der Zelle während des Experimentes optisch verfolgt werden. Zusätzlich diente die Verwendung eines Messokulars zur planimetrischen Bestimmung der Oberfläche der Alge.

Nach dem Anstich genügte eine Ausheilzeit von 60 – 120 min bis eine Konstanz in den Messwerten (Turgordruck, Vakuolenpotential, Relaxationszeiten) zu verzeichnen war.

Bei der Ladungspulstechnik wird ein von einem Pulsgenerator (*PG*, Typ 241B, Fa. Hewlett Packard, Böblingen) erzeugter Rechteckpuls von 1 μ s Dauer über eine Diode (*D*) und den Platindraht (*PW*), der als Stromelektrode fungiert, in die Zelle appliziert. Die Ladungspulsmenge *Q* kann aus dem Strompuls I_p berechnet werden, der über eine am Boden der Messkammer angebrachte plattenförmige Referenzelektrode (*RE1*) mit einem dazwischengeschalteten 10 Ω Widerstand (*R*) auf dem digitalen Speicheroszilloskop (*DO2*, Typ 490, Fa. Nicolet, Madison, Wisconsin, USA) aufgezeichnet wird. Nach dem Strompuls schaltet die Diode (*D*) aufgrund der positiven Membranspannung ($V_m(t)$; geladen durch den Strompuls) sofort in den Sperrzustand. Der große Sperrwiderstand der Diode (*D*) von mehr als $10^{10} \Omega$ und der hohe Eingangswiderstand des Verstärkers (*A*) stellen sicher, dass die nun resultierende Spannungsrelaxation ausschließlich über die Membransysteme der Alge erfolgte.

Die Spannungsrelaxation wird über eine Spannungselektrode (*PE*, 3 M KCl/Ag/AgCl) und eine Referenzelektrode (*RE2*, 3 M KCl/Agarbrücke/Ag/AgCl) abgeleitet und über einen Verstärker (*A*) mit dem digitalen Speicheroszilloskop (*DO1*, Typ 490, Fa. Nicolet, Madison, Wisconsin, USA) aufgezeichnet. Die Relaxationskurven (4096 Datenpunkte, 12 bit Auflösung) werden auf Diskette (3.5") für die weitere Auswertung abgespeichert. Wie von Wang gezeigt wurde [Wang et al., 1991] kann durch den Gebrauch von zwei getrennten Referenzelektroden (*RE1*, *RE2*) vermieden werden, dass es zu Polarisierungseffekten an der Spannungselektrode kommt, die durch die Stromimpulse ausgelöst werden.

2.3.2 Die Mikroperfusion

Die grundsätzliche Idee und gleichzeitig der große Vorteil der hier verwendeten Mikroperfusionsanlage (Abbildung 4) besteht darin, das vakuoläre Medium der Algenzellen unter unabhängiger Kontrolle des Turgordrucks und der Perfusionsgeschwindigkeit definiert auszutauschen und zu manipulieren. Parallel dazu können mit denselben Kapillaren ($P1$, $P2$), durch die das Perfusat in die Zelle gelangt, durch Integration der erforderlichen Strom- und Potentialelektroden (PW , PE), Ladungspulsmessungen durchgeführt werden (siehe oben).

Die Perfusionslösung wird von einer in ihrer Geschwindigkeit exakt zu regulierenden Pumpe (PP , Perfusor[®] segura FT, Fa. B. Braun, Melsungen) durch druckdichte Zuleitungen (Schläuche aus Teflon[®], Innendurchmesser 0.5 mm, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) in die Einlasskammer ($PC1$) gepumpt und über die daran angebrachte Glaskapillare ($P1$, Innendurchmesser 1.6 mm) in die Vakuole der Zelle gefördert. Durch die am gegenüberliegenden Ende der Alge positionierte Auslasskapillare ($P2$, Innendurchmesser 1.6 mm) fließt daraufhin der Vakuoleninhalt bzw. das Perfusionsmedium in die Auslasskammer ($PC2$). Eine ebenfalls druckdicht angeschlossene Gegendruckkammer (PC) dient zum einen zum Auffangen des Perfusats, zum anderen wird hier durch Erzeugung eines exakt einzustellenden Gegendrucks der Turgordruck vorgegeben, der dann im gesamten hydraulischen Perfusionssystem herrscht. Über drei Druckwandler ($PT1$, $PT2$, $PT3$) kann der an den entscheidenden Stellen im System herrschende Turgor gemessen und angezeigt ($D1$, $D2$, $D3$) werden. Zwei Ventile ($V1$, $V2$) ermöglichen die hydraulische Abtrennung der Zelle und der beiden Kapillaren von der Perfusionspumpe und der Gegendruckkammer.

Mit diesem Aufbau ist eine Perfusion im Druckbereich zwischen 0 - 0.4 MPa möglich. Die Perfusionsgeschwindigkeit zeigt über weite Bereiche (0 – 30 $\mu\text{l min}^{-1}$) keinen signifikanten Einfluss auf die Zellmembranparameter; eine Standardgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l min}^{-1}$ stellt einen genügend schnellen

Medienaustausch bei minimaler Beeinflussung der Messparameter sicher [Spieß, 1996]. Bei dieser Perfusionsgeschwindigkeit beträgt die Austauschzeit des Vakuolensaftes ca. 5 min.

Das unerwünschte Verstopfen der Auslasskapillare während der Perfusion durch Zellwandbestandteile und gelartige Substanzen der Vakuole kann durch vorsichtiges Bewegen des in dieser Kapillare integrierten Platindrahts (*PW*, der eigentlichen Stromelektrode der Ladungspulsapparatur) elegant beseitigt werden. Da diese Bewegungen nahezu erschütterungsfrei erfolgen, erfährt die Anstichstelle keinerlei Vibrationen, die die Druckdichtigkeit beeinflussen könnten. Nach etwa 20 Minuten Perfusionsdauer trat dieses Problem in der Regel nicht mehr auf.

2.4 Analyse der Daten

Wie in 2.3.1 beschrieben kommt es nach Applikation eines Ladungspulses in die Vakuole von *V. utricularis* oder *V. ventricosa* zu einer Relaxation des Gesamtmembranpotentials über die beiden Membranen (Tonoplast und Plasmalemma) dieser Algen. Ein typisches Relaxationsspektrum von *V. ventricosa* ist in Abbildung 5 dargestellt.

Man erkennt eine biphasische Relaxation des Gesamtmembranpotentials V_m , die in erster Näherung durch die Summe zweier Exponentialfunktionen beschrieben werden kann [Benz & Zimmermann, 1983]. Man benutzt hierzu entweder ein multiexponentielles Anpassungsprogramm ("least-square-fit") oder den Levenberg-Marquard-Algorithmus für nichtlineare Regressionen:

$$V_m(t) = V_1 \exp(-t/\tau_1) + V_2 \exp(-t/\tau_2)$$

$$V_m(t) = V_0 (a_1 \exp(-t/\tau_1)) + (a_2 \exp(-t/\tau_2))$$

(Gleichung 1)

Dabei bezeichnen V_m die Spannungsrelaxation, t die Zeit, τ_1 und τ_2 die Zeitkonstanten der Relaxation, V_1 und V_2 die absoluten Anfangsamplituden des schnellen und langsamen Spannungsabfalls und a_1 und a_2 die relativen Anfangsamplituden des schnellen bzw. langsamen Spannungsabfalls.

Weiterhin gilt :

$$V_0 = V_1 + V_2, \text{ und}$$

$$a_1 = V_1/V_0, \text{ bzw. } a_2 = V_2/V_0$$

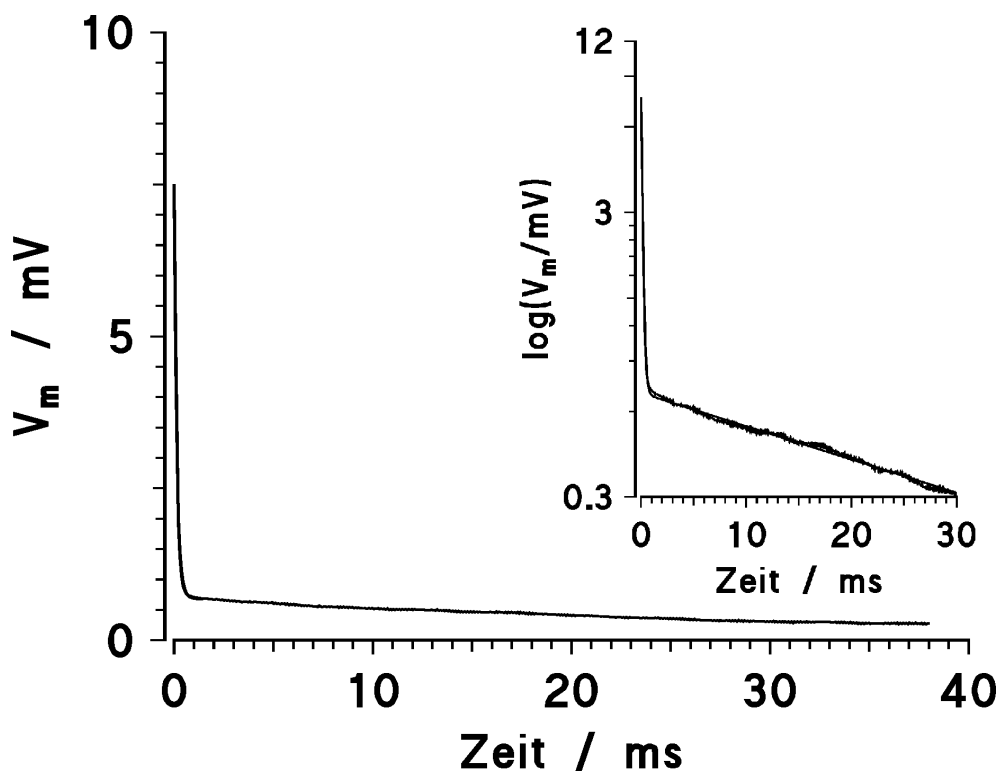


Abbildung 5: Spektrum einer biphasischen Spannungsrelaxation über die Zeit einer Zelle von *V. ventricosa* in ASW (1.024 Osmol kg^{-1} , pH 8.1). Das Spektrum wurde nach einem Puls von 1 μs Dauer aufgenommen (Ladungsmenge $Q = 7.32 \text{ nAs}$). Das vakuoläre Ruhepotential betrug $V_{v0} = +8.2 \text{ mV}$; die Alge hatte eine Oberfläche von $A_z = 80 \text{ mm}^2$ und ein Volumen von $V_z = 66 \text{ mm}^3$. Der Turgor wurde zu $P = 0.16 \text{ MPa}$ bestimmt. Im Inset ist eine halblogarithmische Darstellung derselben

Relaxation zu sehen, die nach Gleichung 1 mittels zweier Exponentialfunktionen angepasst wurde.

Zum Berechnen der Relaxationszeitkonstanten τ_1 und τ_2 wird in der halblogarithmischen Auftragung zunächst der hintere, langsame Teil des Relaxationsspektrums mit einer linearen Regression angepasst. Aus dieser in guter Näherung als Gerade darstellbaren Funktion erhält man die Parameter V_2 und τ_2 . Daraufhin wird die langsame Relaxation von dem gemessenen Spektrum subtrahiert und erneut halblogarithmisch aufgetragen. Aus dieser zweiten linearen Regression erhält man die Parameter V_1 und τ_1 .

Die Kurvenanpassung der experimentellen Daten war in allen Fällen höchst signifikant ($P < 0.001$, nach Student's t -test).

Die Interpretation der so erhaltenen Daten war in der Vergangenheit sehr umstritten (vgl. Einleitung). So konnte das Auftreten von zwei Relaxationszeitkonstanten in einem System von zwei in Serie geschalteten Membranen zum einem mit dem sog. "Konzept der mobilen Ladungen", zum anderen mit dem sog. "Zwei-Membranen Modell" erklärt werden [Wang et al., 1997a; Ryser et al., 1999].

Erst nach der erfolgreichen Trennung der elektrischen Parameter der beiden Membranen ließe sich diese Kontroverse eindeutig zu Gunsten des "Zwei-Membranen Modells" klären. Vor diesem Hintergrund könnte man die schnelle Relaxation und die daraus resultierenden Parameter (V_1 und τ_1) dem Plasmalemma zuordnen, während die langsame Relaxation und die sich daraus ergebenden Parameter (V_2 und τ_2) den Tonoplasten repräsentieren.

Auf der Basis dieses "Zwei-Membranen Modells" lassen sich die flächenspezifischen Kapazitäten und die flächenspezifischen Leitfähigkeiten von Plasmalemma und Tonoplast wie folgt berechnen:

Unter der Voraussetzung, dass die Oberfläche des Plasmalemmas und des Tonoplasten der geometrischen Oberfläche der Algenzelle (A_Z) entsprechen, gilt:

$$C_p = Q / (A_Z V_1) \text{ und } R_p = 1/G_p = \tau_1/C_p \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$C_t = Q / (A_Z V_2) \text{ und } R_t = 1 / G_t = \tau_2 / C_t \quad (\text{Gleichung 3})$$

Dabei ist Q die injizierte Ladungsmenge und $C_{p,t}$, $R_{p,t}$, $G_{p,t}$ die flächenspezifischen Kapazitäten (C), Widerstände (R) und Leitfähigkeiten (G) von Plasmalemma (Index p) und Tonoplast (Index t).

Allerdings muss in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass die tatsächliche Oberfläche der Membranen, v.a. die des Tonoplasten, nicht unbedingt mit der geometrischen Fläche der Alge gleichzusetzen ist. Dieses Problem wird in 3.3 noch ausführlich behandelt.

3 Ergebnisse 1: *Valonia utricularis*

Ein wichtiger Schritt zur getrennten Identifizierung der Membranparameter von Plasmalemma und Tonoplast stellte die Entwicklung der Mikroperfusionsapparatur dar. Mit Hilfe dieser Technik ist es erstmals gelungen, neben den externen Bedingungen auch das vakuoläre Milieu von marinen Riesenalgen unter Beibehaltung des physiologischen Turgors der Zellen zu manipulieren.

3.1 Die Vorteile der Mikroperfusion

Ein Schema des Versuchsaufbaus der integrierten Ladungspuls-/Mikroperfusionsanlage ist in Abbildung 4 dargestellt und im Abschnitt 2.3.2 erläutert.

Experimente im Vorfeld zeigten, dass die Verwendung von Glaskapillaren mit einem Spitzendurchmesser von mehr als 100 μM die Zellen sehr stark, meist irreversibel, schädigen konnten. Vor allem bei dem Anlegen eines Turgors von 0.2 MPa, war eine druckdichte Verbindung der Zellwand mit der Glaskapillare nicht mehr möglich. Aus diesem Grund kamen bei allen Experimenten Borosilikat-Pipetten mit einem Spitzendurchmesser von weniger als 30 μM als Auslasskapillaren (*P2* in Abbildung 4) zum Einsatz. Konnte mit solch feinen Spitzen zwar eine übermäßig große Beschädigung der Zelle vermieden werden, so zeigte sich bei der Perfusion des Vakuoleninhalts jedoch das Problem der Verstopfung der Kapillare durch Zellwandbestandteile und gelartige Substanzen der Vakuole (diese Tatsache war wohl schon bei früheren Untersuchungen mariner Riesenalgen bekannt und führte zu der Verwendung von Kapillaren mit Spitzen von etwa 200 μM Durchmesser [Gutknecht, 1967]).

Bei der hier vorgestellten Anlage kann diesem Problem wie schon beschrieben begegnet werden: In die Auslasspipette *P2* ist die Stromelektrode *PW* der Ladungspulsapparatur integriert (siehe Abbildung 4). Dieser Platindraht

kann innerhalb der Pipette mit Hilfe einer Mikrometerschraube vorsichtig bewegt werden, so dass Verstopfungen an der Spitze der Kapillare leicht beseitigt werden können.

Als Standard-Perfusionsmedium, in dem die zu untersuchenden Substanzen in den meisten Fällen in die Vakuole gebracht wurden, kam das künstliche Vakuolenmedium AVS zum Einsatz (vgl. 2.2.2). Die schonende Eigenschaft einer Perfusion mit diesem Medium kann man erkennen, wenn man die Relaxationsspektren von *V. utricularis* unter Kontrollbedingungen (unperfundiert) und nach Perfusion mit AVS betrachtet. Eine solche Messung ist beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt.

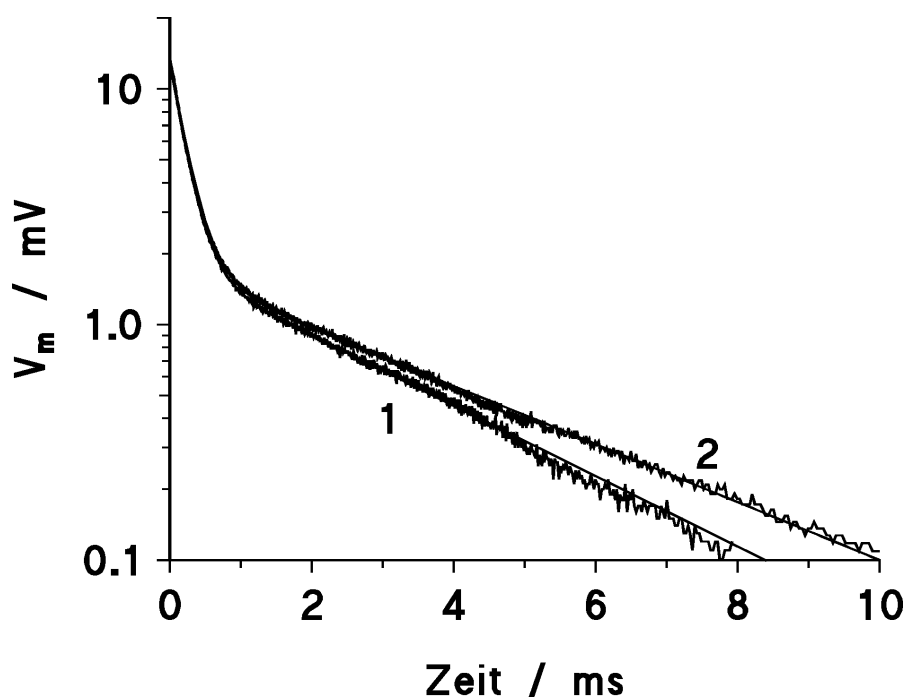


Abbildung 6: Ladungspulsrelaxationsspektren einer Zelle von *V. utricularis* in halblogarithmischer Auftragung. Umspült von ASW, wurde Kurve 1 ohne Perfusion 1.5 Stunden nach dem Einführen der Mikrokapillaren aufgenommen, während Kurve 2 nach einer zweistündigen Perfusion mit AVS aufgezeichnet wurde. Zellparameter: $A_z = 71 \text{ mm}^2$, $V_z = 51 \text{ mm}^3$, $P = 0.15 \text{ MPa}$.

Nach Auswertung der Ladungspulsrelaxationsspektren mit Hilfe von Gleichung 1 konnten die Zellparameter unter Standard- und unter Perfusionsbedingungen gut miteinander verglichen werden. Für die Kurven 1 (1.5 Stunden unter Standardbedingungen) und 2 (2 Stunden Perfusion mit AVS) in Abbildung 6 erhielt man folgende Werte:

	V1 / mV	τ_1 / μ s	V2 / mV	τ_2 / ms
Kurve1 (Kontrolle)	11.6	208	1.8	2.9
Kurve2 (Perfusion)	12.4	225	1.9	3.5

Der Vergleich der Parameter macht deutlich, dass es nach zweistündiger Perfusion der Vakuole mit einem künstlichen Vakuolenmedium, wie beispielsweise AVS, zu keiner erheblichen Beeinträchtigung der Membranparameter von *V. utricularis* kam. Erst nach einer Perfusionsdauer von mehr als fünf Stunden konnte ein Effekt dieser Prozedur auf die Membranparameter festgestellt werden. Dabei nahm die Zeitkonstante der schnellen Relaxation τ_1 durchschnittlich um weniger als 15 % zu, die der langsamen Komponente τ_2 um weniger als 30 %. Die flächenspezifische Leitfähigkeit der Gesamtmembranbarriere nahm bei dieser Langzeitperfusion um weniger als 25 % ab. Ähnliche Ergebnisse wie bei dieser Alge konnten bei mehr als 15 weiteren Zellen beobachtet werden. Die elektrischen Eigenschaften von zehn weiteren Algen (perfundiert und nicht perfundiert) sind im Appendix zusammengefasst (Tabelle 7).

Es handelt sich also bei der Mikroperfusion um ein durchaus schonendes Verfahren zur gezielten Manipulation des vakuolären Milieus einzelliger mariner Riesenalgen wie beispielweise *V. utricularis* oder *V. ventricosa*.

3.2 Der Einfluss des Turgordrucks auf das Ladungspulsrelaxationsspektrum

Experimente in der Vergangenheit zeigten, dass eine Voraussetzung für eine Betrachtung physiologischer Parameter von marinen Algen die Kontrolle und Erhaltung des Turgordrucks ist. Inwieweit dieser Zellinnendruck die Membranparameter von *V. utricularis* beeinflusst, kann man erkennen, wenn Perfusionsexperimente auf verschiedenen Druckstufen durchgeführt werden.

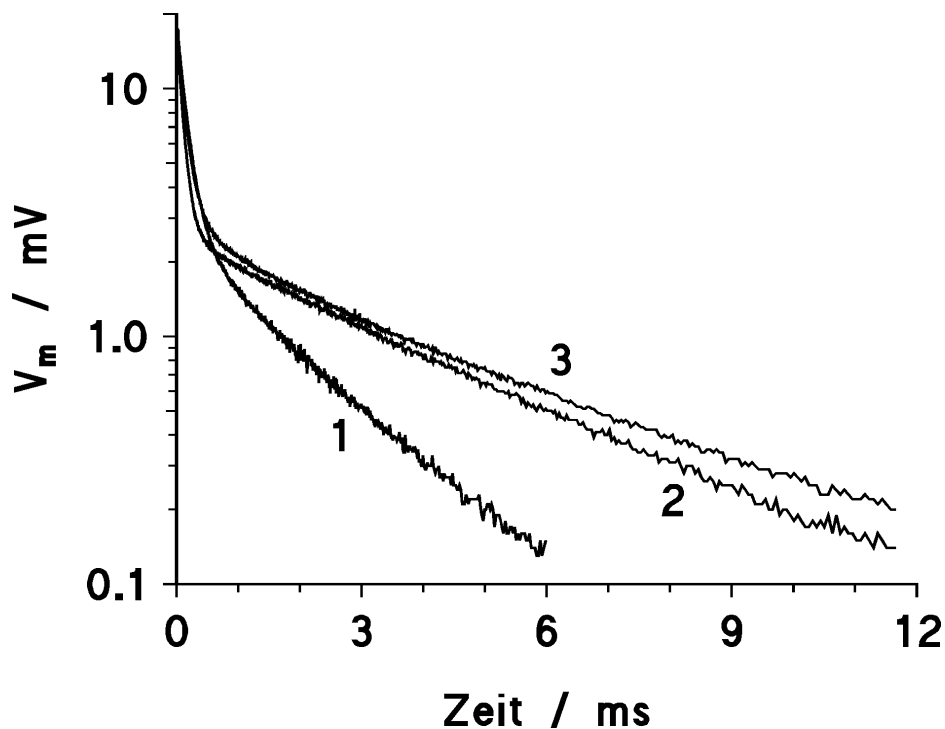


Abbildung 7: Halblogarithmische Auftragung von Ladungspulsrelaxationsspektren von *V. utricularis*, die bei unterschiedlichen Turgorstufen perfundiert wurden (Badmedium ASW, Perfusionsmedium AVS, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$). Die Kurven wurden aufgenommen bei 0.16 MPa (nativer Turgor; Kurve 1), 0.02 MPa (Kurve 2) und 0.32 MPa (Kurve 3). Zellparameter: $A_z = 77 \text{ mm}^2$, $V_z = 48 \text{ mm}^3$.

In Abbildung 7 sind die Relaxationsspektren einer Alge dargestellt, die bei verschiedenen Druckstufen mit AVS perfundiert wurde (Badmedium ASW, Perfusionsgeschwindigkeit 20 $\mu\text{l}/\text{min}$).

Deutlich ist zu erkennen, dass sich das Relaxationsspektrum von *V. utricularis* verändert, wenn der Turgor in der Zelle vermindert (Abbildung 7, Kurve 2) bzw. erhöht (Abbildung 7, Kurve 3) wird. Es kommt zu einem signifikanten Anstieg beider Zeitkonstanten, vor allem der Zeitkonstanten der langsamen Relaxation τ_2 . Ändert man mit Hilfe der Perfusionstechnik schrittweise den Turgor der Algen (zunächst Absenkung auf 0.0 MPa, dann Erhöhung des Drucks über den Ausgangsturgor auf 0.3 MPa), kann man die Druckabhängigkeit der Membranparameter deutlich machen (Abbildung 8A-C).

In Abbildung 8A und C kann man eine auffällige Parallelität der Druckeinwirkung auf den Membranwiderstand R_M und auf die langsame Relaxationskonstante τ_2 feststellen. Erhöhte man – ausgehend von 0.0 MPa – schrittweise den Innendruck der Alge, so nahmen beide Parameter bis zum Punkt des physiologischen Turgors (0.15 MPa) zunächst ab. Wurde der Druck dann über diesen Wert hinaus bis auf 0.3 MPa gesteigert, resultierte daraus eine signifikante Zunahme von R_m und τ_2 . Interessanterweise hing dabei das Verhältnis von Turgor und R_m bzw. τ_2 nicht von der Richtung der Druckänderung ab; Hysterese-Effekte konnten bei diesen Parametern nicht beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu ließ der Verlauf der schnellen Zeitkonstante τ_1 eine klare Abhängigkeit von der Richtung der Druckänderung erkennen (Abbildung 8B). Absenken des Turgors ausgehend vom physiologischen Wert von 0.15 MPa auf 0.02 MPa resultierte in einer starken Abnahme von τ_1 . Die darauffolgende Erhöhung des Drucks bis auf 0.3 MPa ließ τ_1 zwar wieder ansteigen, jedoch wurde der Wert unter physiologischem Zellinnendruck nicht erreicht. Erst das Überschreiten eines Drucks von 0.3 MPa erlaubte τ_1 -Werte zu messen, die bei physiologischem Turgor beobachtet wurden. Dieser Wert nahm sogar noch etwas zu, als der Druck wieder gesenkt wurde.

Die übrigen Membranparameter, wie die relativen Amplituden der schnellen und langsamen Relaxationen (a_1 und a_2), die Kapazität der Membran C_m , sowie das vakuoläre Ruhepotential V_{vo} , zeigten keine Abhängigkeit von einem durch Perfusion veränderten Turgor und blieben im Druckbereich von 0.0 bis 0.3 MPa nahezu konstant.

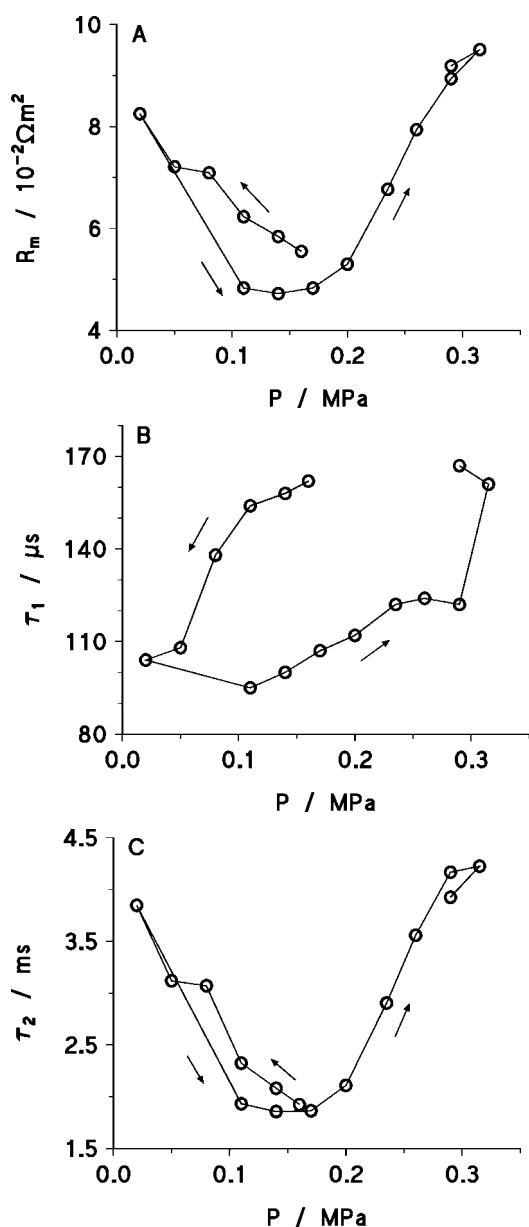


Abbildung 8: Die Abhängigkeit des flächenspezifischen Widerstands der Gesamtmembranbarriere (R_m , A) sowie der Zeitkonstanten der schnellen (τ_1 , B) und langsamen Relaxation (τ_2 , C) von *V. utricularis* vom Turgordruck, der während der Perfusion angelegt wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse von Ladungspulsrelaxationsmessungen an einer Alge. Der physiologische Turgor der Zelle lag bei 0.15 MPa. Die Messungen wurden ca. 90 Minuten nach Beginn der Perfusion mit AVS begonnen (Badmedium ASW, Perfusionsgeschwindigkeit 20 $\mu l/min$), danach wurde der Druck zunächst schrittweise auf 0.02 MPa abgesenkt, gefolgt von einer Erhöhung des Turgors auf 0.3 MPa. Die Auswertung der Spektren nach Gleichung 1 ergab τ_1 und τ_2 , der Widerstand der Gesamtmembran R_m errechnete sich nach den Gleichungen 2 und 3. Die Richtung der Druckänderung ist durch die Pfeile angegeben.

3.3 Auswirkungen von Nystatin und Amphotericin B auf das Ladungspulsrelaxationsspektrum: Zuordnung der Relaxationen zu den elektrischen Eigenschaften von Plasmalemma und Tonoplast

Eine zentrale Frage der Forschung an einzelligen marinen Algen der letzten Jahre war die Beschreibung der Barriereigenschaften der beiden Membranen, insbesondere des Tonoplasten. Mit der Motivation, die elektrischen Parameter der beiden Membranen getrennt darstellen zu können, wurden Experimente mit porenbildenden Antibiotika wie beispielsweise Nystatin und Amphotericin B durchgeführt. Dabei ging man von den bereits erwähnten Modellen, nämlich dem "Konzept der mobilen Ladungen" und dem "Zwei Membranen-Modell" (vgl. Einleitung) aus, ohne jedoch zunächst eine der beiden Hypothesen stichhaltig entkräften oder beweisen zu können.

Das antifungiale Antibiotikum Nystatin ($C_{47}H_{75}NO_{17}$) ist aufgrund seiner Eigenschaft, Kanäle in Membranen zu bilden, ohne diese passieren zu können, ein beispielsweise in der Patch-Clamp-Technik bekanntes Agens, um Membranen gezielt permeabilisieren zu können [Bakker, 1979; Cass, Finkelstein, & Krespi, 1970; Holz & Finkelstein, 1970; Kleinberg & Finkelstein, 1984; Opekarova & Tanner, 1994].

Experimente im Vorfeld zeigten, dass sich bei Applikation von 5 bis 50 μM Nystatin über das Standard-Badmedium ASW oder die Standard-Perfusionslösung AVS das Ladungspulsrelaxationsspektrum von *V. utricularis* sehr stark änderte. Sowohl τ_1 als auch τ_2 nahmen simultan rapide ab und konnten nach ca. 200 Minuten nicht mehr exakt bestimmt werden. Offensichtlich traten bei dieser Art der Applikation des porenbildenden Nystatins große Schädigungen am Plasmalemma wie auch am Tonoplasten auf. Es konnte vermutet werden, dass ein Einstrom von Chlorid (das im Badmedium und in der Vakuole in hoher Konzentration vorhanden ist) durch die Nystatin-Poren in das Zytoplasma zu letalen Effekten an den Algen führte (siehe dazu auch Spieß, 1996; Wyn Jones, Brady, & Speirs, 1978). Diese Beeinträchtigung des Zytoplasmas konnte dadurch verhindert werden, dass ein spezielles Zytoplasma-angepasstes

Medium entwickelt wurde (ACS, siehe Tabelle 5), in welchem das Nystatin über das Badmedium bzw. durch Perfusion appliziert werden konnte. ACS enthält nur 140 mM Cl⁻; deutlich weniger als in ASW bzw. AVS enthalten ist (600 mM bzw. 672 mM). Diese Reduzierung der Chlorid-Konzentration führte in der Konsequenz zu schon bekannten Effekten, nämlich einem Anstieg der Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 des Ladungspulsspektrums [Wang et al., 1991].

In der Tat überlebten die Zellen eine Nystatinbehandlung, wenn sie gleichzeitig mit ACS umspült wurden, oder ihnen dieses Medium intravakuolär perfundiert wurde. Unter diesen Bedingungen korrelierten die Effekte des Nystatins eindeutig mit der Membranseite, die mit diesem Agens konfrontiert wurde.

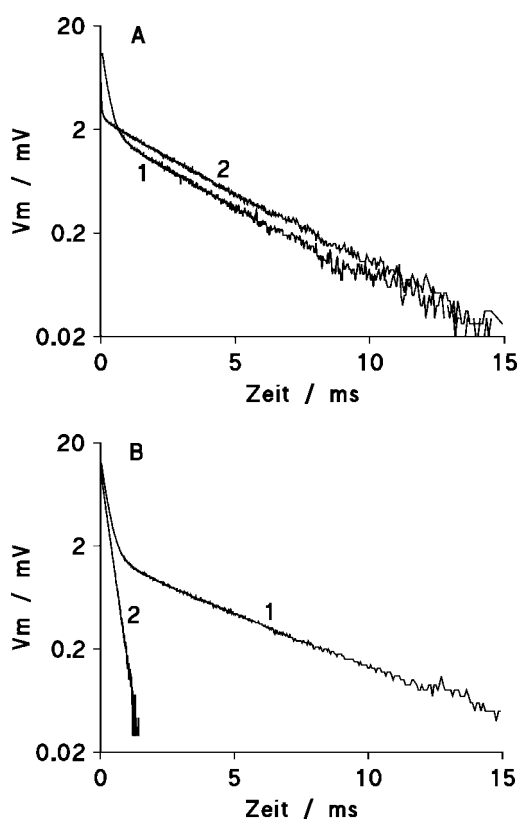


Abbildung 9: Auswirkung von 50 μ M Nystatin auf das Ladungspulsrelaxationspektrum von *V. utricularis* nach externer (A) und interner (B) Applikation des porenbildenden Antibiotikums. Die Kurven 1 stellen die Kontrollexperimente dar: (A) keine Perfusion, ASW im Badmedium; (B) Vakuolenperfusion mit AVS, ASW im Badmedium. Mit den Kurven 2 sind Ladungspulseexperimente gezeigt, die eine Stunde nach Austausch des Badmediums (A) und 30 Minuten nach Austausch der Perfusionslösung (B) gegen Nystatinhaltiges ACS aufgenommen wurden. Zellparameter: (A) $A_z = 100 \text{ mm}^2$, $V_z = 57 \text{ mm}^3$, $P = 0.15 \text{ MPa}$; (B) $A_z = 74 \text{ mm}^2$, $V_z = 48 \text{ mm}^3$, $P = 0.15 \text{ MPa}$. In Kurve 2(A) ist deutlich das Wegfallen der schnellen Relaxation zu sehen, während bei Kurve 2(B) die langsame Relaxation nicht mehr zu erkennen ist.

Nach externer Zugabe von 50 μM Nystatin zeigten alle Zellen von *V. utricularis* ($n = 26$) einen dramatischen Abfall der schnellen Zeitkonstante τ_1 (Abbildung 9A). Etwa eine Stunde nach Applikation konnte die schnelle Relaxation nicht mehr aufgelöst werden. Bemerkenswerterweise waren bei der Zeitkonstante der langsamen Relaxation τ_2 unter diesen Versuchsbedingungen über einen Zeitraum von mehreren Stunden keine signifikanten Änderungen zu beobachten (Abbildung 10A). Das entgegengesetzte Bild zeigte sich, wenn Nystatin in einer Konzentration von 50 μM mittels Mikroperfusion in die Vakuole gegeben wurde ($n = 30$). Hier nahm die Zeitkonstante der langsamen Relaxation τ_2 stark ab, bis nach etwa 30 Minuten diese Relaxation nicht mehr zu erkennen war (Abbildung 9B). Die schnelle Relaxation und τ_1 dagegen blieben während mehr als 5 Stunden Nystatin-Perfusion nahezu konstant (Abbildung 10B).

Eventuelle Effekte durch das in einer Konzentration von 0.5 bis 1 % vorliegende DMSO (Nystatin wird in einer DMSO-Stammlösung angesetzt) konnten durch Kontrollexperimente ausgeschlossen werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden mit dem verwandten Antibiotikum Amphotericin B gemacht. Dieses Agens war in seiner Wirkung jedoch weniger effektiv, das heißt die Effekte traten mit Verzögerung auf.

Bei der Betrachtung der aus Gleichung 3 resultierenden Tonoplastenparameter fiel die ungewöhnlich hohe flächenspezifische Kapazität und Leitfähigkeit dieser Membran auf. Diese Berechnung basierte auf der Annahme, dass die Oberfläche des Plasmalemmas und des Tonoplasten mit der geometrischen Fläche der Alge gleichzusetzen ist.

In Tabelle 7 (Appendix) sind beispielhaft für 10 unterschiedliche Zellen von *V. utricularis* die Messdaten und die errechneten Parameter zusammengefasst. Insgesamt wurden auf diese Art die Membranparameter von mehr als 170 Algen bestimmt.

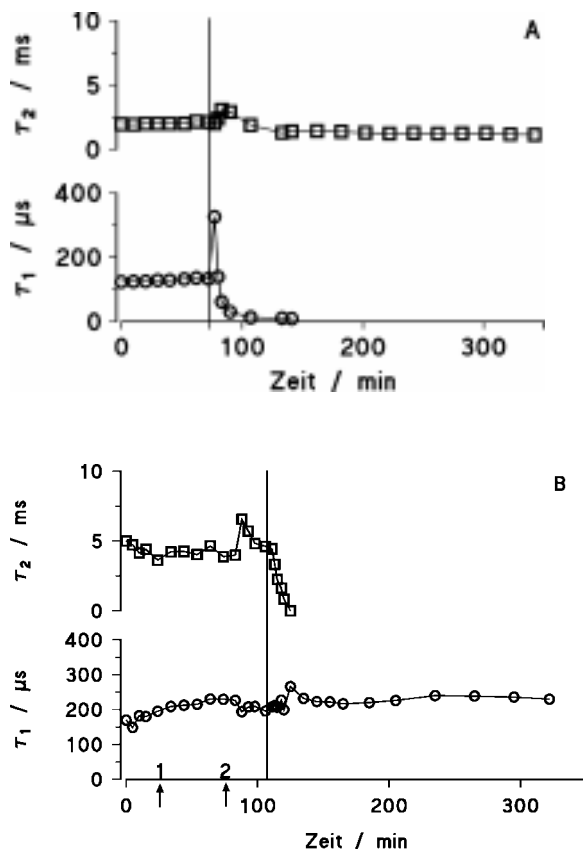


Abbildung 10: Zeitverlauf des Nystatin-Effekts bei *V. utricularis* auf die Zeitkonstanten der schnellen (τ_1) und langsamen (τ_2) Zeitkonstanten nach externer (A) und vakuolärer (B) Addition von 50 μM Nystatin. Die Daten wurden von Ladungspulsexperimenten übernommen, die an der in Abbildung 9 gezeigten Alge durchgeführt wurden. Die senkrechte Linie markiert den Wechsel des externen Mediums ASW (A) bzw. des Perfusionsmediums (B) zu Nystatin-haltigem ACS. In (B) markiert Pfeil 1 den Beginn der Perfusion mit AVS und Pfeil 2 den Wechsel zu ACS-Perfusion. Obwohl alle ein bis zwei Minuten Ladungspulsexperimente durch geführt wurden, ist hier, der übersichtlicheren Darstellung wegen, nur ein Teil der Messpunkte wiedergegeben.

experimente durch geführt wurden, ist hier, der übersichtlicheren Darstellung wegen, nur ein Teil der Messpunkte wiedergegeben.

Legt man allerdings zugrunde, dass die flächenspezifische Kapazität der biologischen Membranen vieler Zellarten eine vergleichbare Größe von 0.5 - 1.3 10^{-2}Fm^{-2} aufweist [Pauly, 1962; Benz & Janko, 1976; Pethig, 1979; Hille, 1992; Fuhr, Zimmermann, & Shirley, 1996; Zimmermann & Neil, 1996], folgt:

$$C_p \approx C_{tr}$$

$$A_{tr} = A_z (C_t / C_{tr}) \text{ und} \quad (\text{Gleichung 4})$$

$$G_{tr} = G_t (A_z / A_{tr}) \quad (\text{Gleichung 5})$$

Dabei gibt C_p die flächenspezifische Kapazität des Plasmalemmas und C_{tr} die reale flächenspezifische Kapazität des Tonoplasten an. Es errechneten sich daraus sich die reale Tonoplastenfläche A_{tr} von *V. utricularis* zu $493 \pm 162 \text{ mm}^2$ ($n = 10$, vgl. Tabelle 7 im Appendix) und der reale flächenspezifische Widerstand des Tonoplasten zu $R_{tr} = 26.6 \times 10^{-2} \pm 14.2 \times 10^{-2} \Omega\text{m}^2$ ($n = 10$, vgl. Tabelle 7 im Appendix).

4 Ergebnisse 2: *Ventricaria ventricosa*

4.1 Die Effekte von externem und vakuolärem Nystatin auf das Ladungspulsspektrum

Analog zu den Messungen an *V. utricularis* (s. oben, Wang et al., 1997a) und *Halicystis parvula* [Benz, Büchner, & Zimmermann, 1988] konnte vermutet werden, dass sich das biphasische Relaxationsspektrum nach Applikation eines Ladungspulses auch bei *V. ventricosa* mit Hilfe einer Summe von zwei Exponentialgleichungen (Gleichung 1) darstellen ließ.

Im Fall der in Abbildung 5 gezeigten Relaxation erhielt man nach Anpassung der Spektren nach Gleichung 1 folgende Relaxationsparameter (\pm Standardabweichung; Korrelationskoeffizient $r = 0.99865$):

$$V_1 = 11.2 \pm 0.3 \text{ mV}$$

$$\tau_1 = 256 \pm 4 \text{ } \mu\text{s}$$

$$V_2 = 1.52 \pm 0.01 \text{ mV}$$

$$\tau_2 = 3.75 \pm 0.02 \text{ ms}$$

Interessanterweise ließ sich die Kurvenanpassung des Spektrums in Abbildung 5 noch leicht verbessern (Korrelationskoeffizient $r = 0.99986$), wenn die Summe dreier exponentieller Verläufe zugrundegelegt wurde:

$$V_m(t) = V_1 \exp(-t/\tau_1) + V_2 \exp(-t/\tau_2) + V_3 \exp(-t/\tau_3)$$

Die folgenden Parameter resultierten aus dieser Berechnung:

$$V_1 = 12.3 \pm 0.3 \text{ mV}$$

$$\tau_1 = 219 \pm 6 \text{ } \mu\text{s}$$

$$V_2 = 1.21 \pm 0.06 \text{ mV}$$

$$\tau_2 = 4.11 \pm 0.07 \text{ ms}$$

und für die dritte, intermediäre Relaxation:

$$V_3 = 0.82 \pm 0.06 \text{ mV}$$

$$\tau_3 = 1.37 \pm 0.17 \text{ ms}$$

Allerdings konnte das Auftreten dieser dritten Relaxation nur in etwa 50% der nichtperfundierten Algen beobachtet werden, war also nicht klar reproduzierbar. Lediglich bei Anwesenheit von 50 μM Nystatin im Außenmedium trat diese regelmäßig auf.

In Tabelle 8 (siehe Appendix) sind für 10 unterschiedlich große, unperfundierte Zellen von *V. ventricosa* die Messdaten zusammengefasst; insgesamt wurden die Membranparameter von mehr als 90 nicht perfundierten Algen auf diese Art bestimmt.

Die reellen Werte für die flächenspezifische Leitfähigkeit G_{tr} und für die Tonoplastenoberfläche A_{tr} wurden analog zu *V. utricularis* (vgl. 3.3) mit Hilfe der Gleichungen 4 und 5 unter der Annahme berechnet, dass die reelle Kapazität des Tonoplasten mit der des Plasmalemma übereinstimmt ($C_{tr} \approx C_p$). Für 10 unterschiedlich große Zellen von *V. ventricosa* errechnete sich G_{tr} zu $0.09 \times 10^4 \pm 0.08 \text{ mSm}^{-2}$ und A_{tr} zu $3628 \pm 4029 \text{ mm}^2$ (vgl. Tabelle 8).

Um entscheiden zu können, welche Zellstrukturen für das Auftreten der schnellen, langsamen und intermediären Relaxationen verantwortlich sind, wurden – analog zu den Versuchen an *V. utricularis* - Experimente durchgeführt, bei welchen Ladungspulsspektren von Algen aufgenommen wurden, die extern und vakuolär mit dem porenbildenden Antibiotikum Nystatin konfrontiert wurden.

Da es durch den Einbau von Poren in das Plasmalemma bzw. den Tonoplast zu einem Ionenaustausch des externen bzw. des vakuolären Mediums mit dem Zytoplasma kam, war auch bei *V. ventricosa* die Verwendung einer Zytoplasma-analogen Lösung von entscheidender Bedeutung. Dieses

sog. ACS (vgl. Tabelle 5) enthielt nur 140 mM Chlorid, während im Badmedium und der Vakuolenlösung etwa 600 mM Chlorid enthalten waren. Die Diffusion einer solch hohen Konzentration von Cl⁻-Ionen durch die permeabilisierten Membranen in das Zytoplasma hätte die Alge in höchstem Maße geschädigt, bzw. lethale Effekte zur Folge gehabt. [Wyn Jones, Brady, & Speirs, 1978; Wang et al., 1997a].

Applikation von Chlorid-reduziertem Medium (ACS von der externen und vakuolären Seite) resultierte bei *V. ventricosa* in einer leichten Erhöhung der beiden Relaxationszeitkonstanten τ_1 und τ_2 .

Bei externer Zugabe von 50 μ M Nystatin in ACS erkannte man einen drastischen Abfall der schnellen Zeitkonstante τ_1 (Kurve 2 in Abbildung 11A und Abbildung 12A). Nach ca. 40 min konnte dieser Prozess nicht mehr aufgelöst werden (Abbildung 11A). Bemerkenswerterweise ließ sich bei der Zeitkonstante der langsamen Relaxation τ_2 über einen Zeitraum von mehr als einer Stunde keine signifikante Reaktion auf die externe Behandlung mit 50 μ M Nystatin feststellen (Abbildung 11A).

Nach Permeabilisierung des Plasmalemmas durch das porenbildende Antibiotikum Nystatin konnte man das Auftreten einer dritten Relaxation regelmäßig beobachten (Kurve 2 in Abbildung 11 A).

Das umgekehrte Ergebnis zeigte sich bei interner Perfusion mit 50 μ M Nystatin in Zytoplasma-analogen Medium ACS. Hier konnte man feststellen, dass die Zeitkonstante der langsamen Relaxation τ_2 schlagartig abnahm und diese nach ca. 30 min nicht mehr aufzulösen war (Abbildung 11B und Abbildung 12B). Die Zeitkonstante der schnellen Relaxation jedoch zeigte unter diesen experimentellen Bedingungen keine signifikante Änderung (Abbildung 11B und Abbildung 12B). Das Auftreten einer dritten, intermediären Relaxation konnte bei interner Perfusion mit Nystatin nicht beobachtet werden.

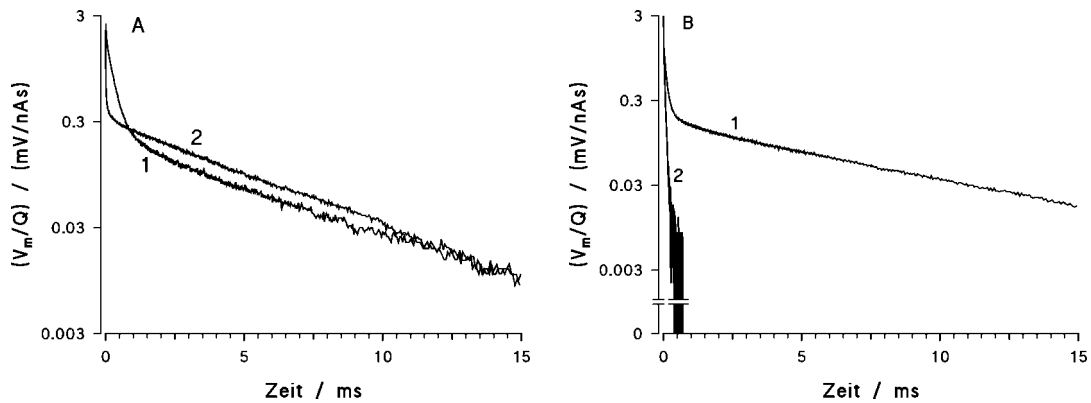


Abbildung 11: Typische Effekte porenbildender Antibiotika auf die Ladungspulsspektren von *V. ventricosa* bei externer (A) und vakuolärer (B) Zugabe von 50 μM Nystatin. (A): Ladungspulsspektren einer nichtperfundierten Zelle ($A_Z = 80 \text{ mm}^2$, $V_Z = 66 \text{ mm}^3$, $P = 0.23 \text{ MPa}$, $V_{vo} = +6.8 \text{ mV}$). Kurve 1: Kontrollmessung in ASW (injizierte Ladungsmenge $Q = 7.1 \text{ nAs}$); Kurve 2: Messung 48 min nach Austausch des Badmediums von ASW zu ACS mit 50 μM Nystatin ($Q = 8.14 \text{ nAs}$). (B): Ladungspulsspektren einer Zelle, die vakuolär perfundiert wurde (Badmedium: ASW, Perfusionsmedium AVS, $A_Z = 132.7 \text{ mm}^2$, $V_Z = 143.8 \text{ mm}^3$, $V_{vo} = -0.4 \text{ mV}$). Die Perfusion erfolgte bei einem Druck von $P = 0.12 \text{ MPa}$ und einer Geschwindigkeit von $20 \mu\text{l min}^{-1}$. Kurve 1: Kontrollmessung in ASW ($Q = 19.8 \text{ nAs}$) mit AVS-Perfusion; Kurve 2: Ladungspulsspektrum 100 min nach Änderung des Vakuolenmediums von AVS zu ACS mit 50 μM Nystatin ($Q = 9.48 \text{ nAs}$). Um den Effekt des Nystatins auf die Spektren vergleichen zu können, wurden diese auf die injizierte Ladungsmenge Q normiert.

Neben Nystatin als permeabilisierenden Agens wurden auch Experimente mit Amphotericin B in gleicher Konzentration durchgeführt. Dabei traten vergleichbare, ebenso Membran-abhängige Effekte wie oben geschildert auf, jedoch war diese Substanz in ihrer Wirkung langsamer und weniger effektiv.

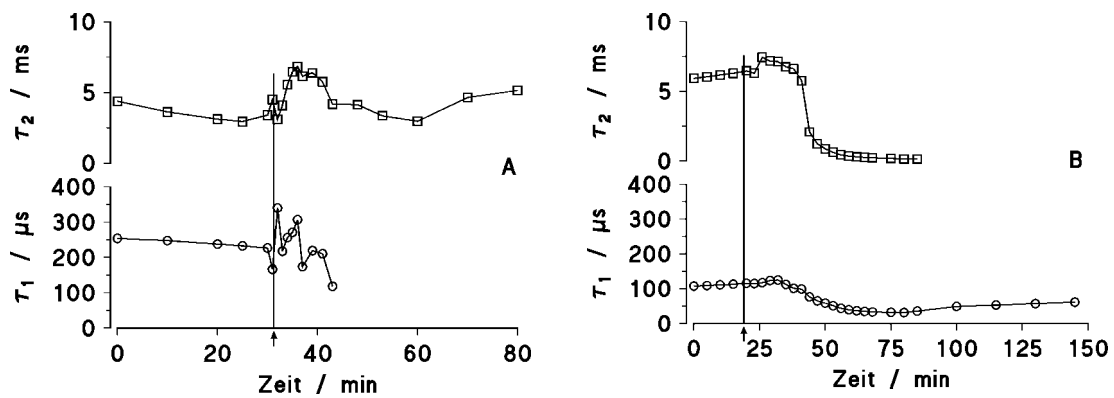


Abbildung 12: Zeitverlauf der Zeitkonstanten der schnellen (τ_1) und langsamen (τ_2) Relaxation von *V. ventricosa* nach externer (A) und vakuolärer (B) Zugabe von Nystatin. Zur Berechnung der Zeitkonstanten wurden die Daten von den entsprechenden Ladungspulsspektren wie z.B. in Abbildung 11 verwendet und nach Gleichung 1 ausgewertet. Mit den Pfeilen wurde der Zeitpunkt bezeichnet, zu dem das externe (A) und das vakuoläre (B) Medium gegen ACS plus 50 μM Nystatin getauscht wurden. Obwohl etwa alle zwei Minuten Ladungspulsexperimente durchgeführt wurden, ist hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ein Teil der Datenpunkte dargestellt.

Die hier gezeigten Effekte der porenbildenden Antibiotika und ihre spezifische, von der Seite der Applikation abhängige Wirkung auf die jeweiligen Membransysteme von *V. ventricosa* ließen den Schluss zu, dass die schnelle Relaxation vom Plasmalemma stammen musste, während die langsame (und intermediäre) Relaxation von den elektrischen Eigenschaften des Tonoplasten kamen. Diese Ergebnisse sprachen somit deutlich auch bei dieser Alge – wie schon bei *V. utricularis* - für das sog. "Zwei-Membranen Modell".

Durch diese Experimente war es nunmehr erstmalig möglich, Informationen über den Einfluss unterschiedlicher Bedingungen im Bad- und Perfusionsmedium auf Plasmalemma und Tonoplast an intakten Zellen von *V. ventricosa* zu erhalten. Die gleichzeitige Regulation des Turgors der Zellen

erlaubte es außerdem, einen für die Physiologie der Algen entscheidenden Parameter ständig zu kontrollieren.

4.2 Der Einfluss des externen pH-Wertes auf das Relaxationsspektrum

In Abbildung 13 ist der Vergleich der Relaxationsspektren einer Zelle von *V. ventricosa* bei natürlichem pH-Wert im externen Medium (pH 8.1) und nach schlagartiger Absenkung des pH-Wertes (pH 4.0) dargestellt.

Sowohl der Verlauf der schnellen, als auch der der langsamen Relaxation zeigte keine signifikante Reaktion auf die Änderung des externen pH-Wertes ($n = 7$).

Es konnte also interessanterweise im Gegensatz zu *V. utricularis* und *Halicystis parvula* [Zimmermann, Büchner, & Benz, 1982; Benz, Büchner, & Zimmermann, 1988; Wang, Benz, & Zimmermann, 1995] bei den untersuchten Algen der Gattung *V. ventricosa* keine Abhängigkeit der Membraneigenschaften von der externen Protonenkonzentration festgestellt werden.

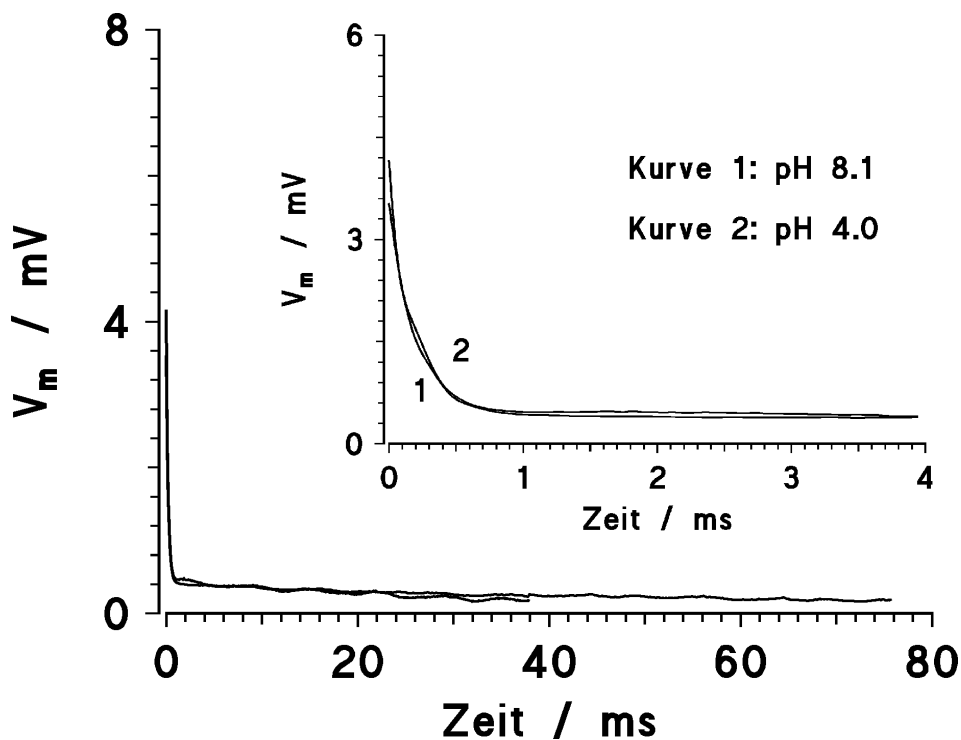


Abbildung 13: Relaxationsspektren von *V. ventricosa* bei Verminderung des pH-Wertes im Außenmedium (ASW) von pH 8.1 auf pH 4.0. Die Messung bei pH 4.0 wurde 15 min nach schlagartigem Wechsel des Badmediums aufgezeichnet. Im Inset ist der Verlauf der beiden Kurven vergrößert auf den vorderen Bereich der Relaxation (0 – 4 ms) zu sehen. Zellparameter: $A_z = 1680 \text{ mm}^2$, $V_z = 6440 \text{ mm}^3$, $P = 0.12 \text{ MPa}$, $V_{vo} = +12.0 \text{ mV}$

4.3 Die Abhängigkeit der Relaxationsspektren und der Leitfähigkeit des Plasmalemmas und des Tonoplasten von den Hauptionen im Außenmedium

V. ventricosa ist ebenso wie *V. utricularis* eine marine, also im Salzwasser heimische Alge. In diesem Zusammenhang war von großem Interesse, wie sich Variationen in der Konzentration der im Meerwasser hauptsächlich vorkommenden Ionen auf das Spektrum der Ladungspulsrelaxationen und auf

die Plasmalemmleitfähigkeit auswirkten. Bei diesen Ionen handelt es sich um Chlorid, Natrium und Kalium. Es wurden also ASW-Medien eingesetzt, bei welchen jeweils ein Hauption entfernt und zum Ausgleich der Osmolalität vollständig durch eine andere Substanz ersetzt wurde: Chlorid wurde durch MES^- , Natrium durch Cholin und Kalium durch Natrium substituiert (siehe dazu Tabelle 3).

4.3.1 Der Einfluss auf das Ladungspulsspektrum

Abbildung 14 zeigt beispielhaft für diese Versuchsreihe ($n = 12$) die Ladungspulsrelaxationsspektren einer Zelle von *V. ventricosa* vor (Kurve 1) und nach (Kurve 2) kompletter Entfernung von Chlorid aus dem Badmedium. In diesem sog. ASW / -Cl wurde stattdessen MES^- eingesetzt.

Im Gegensatz zur Absenkung des externen pH-Wertes (siehe oben) konnte man nach Entfernen des Chlorids im Außenmedium einen signifikanten Effekt auf das Ladungspulsrelaxationsspektrum erkennen. Dabei kam es zu einer Erhöhung der Zeitkonstante der schnellen Relaxation τ_1 um etwa das Doppelte. Die Zeitkonstante der langsamen Relaxation τ_2 blieb unbeeinflusst.

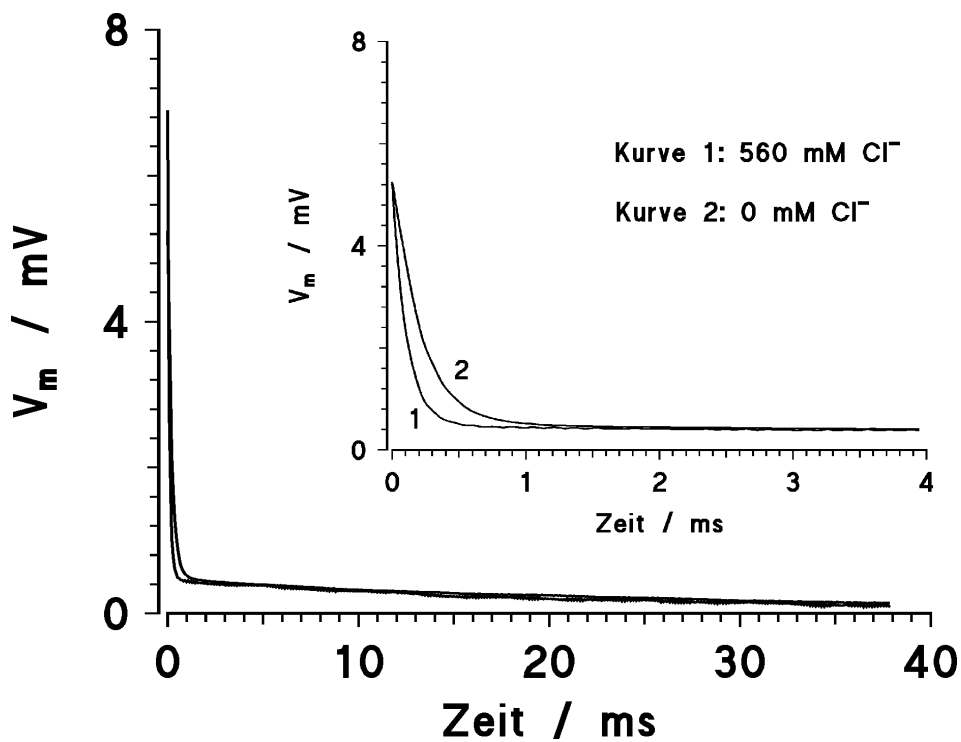


Abbildung 14: Einfluss der externen Chloridkonzentration auf das Ladungspulsrelaxationsspektrum von *V. ventricosa*. Zur Verdeutlichung der Effekte wurde der vordere Teil des Spektrums im Inset getrennt dargestellt. Kurve 1 zeigt das Relaxationsspektrum unter Kontrollbedingungen, d.h. in Anwesenheit von 560 mM Cl^- im Außenmedium. Kurve 2 wurde aufgenommen, nachdem dieselbe Zelle 15 min mit ASW / -Cl (vgl. Tabelle 3) umspült wurde, das kein Chlorid enthielt (0 mM Cl^-). Zellparameter: $A_z = 680 \text{ mm}^2$, $V_z = 1800 \text{ mm}^3$, $P = 0.15 \text{ MPa}$, $V_{vo} = +8.5 \text{ mV}$.

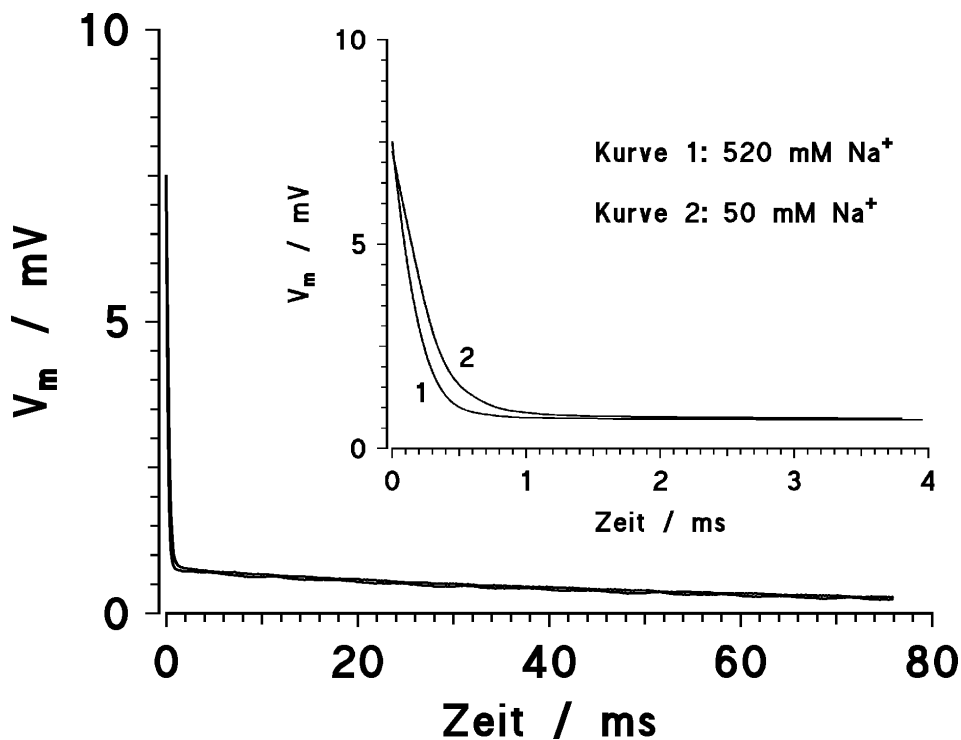


Abbildung 15: Änderung im Ladungspulsrelaxationsspektrum von *V. ventricosa* vor (Kurve 1) und 15 min nach (Kurve 2) Reduzierung der Natriumkonzentration im Außenmedium. Zur Verdeutlichung der Effekte wurde der vordere Teil des Spektrums im Inset getrennt dargestellt. Das Medium mit verminderter Natriumkonzentration (50 mM Na^+) wurde durch Mischen von Standard-ASW mit ASW / - Na hergestellt (vgl. Tabelle 3). Zellparameter: $A_z = 900 \text{ mm}^2$, $V_z = 2540 \text{ mm}^3$, $P = 0.22 \text{ MPa}$, $V_{vo} = +17 \text{ mV}$.

Die Verminderung der Natriumkonzentration im Badmedium ($n = 7$) von standardmäßig 520 mM auf 50 mM (Abbildung 15) resultierte in einer signifikanten, wenn auch nur geringen Zunahme der schnellen Relaxationskonstante τ_1 . Wie schon bei den Experimenten mit der externen Chlorid-Reduzierung (siehe oben) zu beobachten war, zeigte dagegen die dem Tonoplast zugeordnete langsame Relaxation keine Abhängigkeit von der externen Natriumkonzentration, d.h. die Zeitkonstante τ_2 veränderte sich nicht signifikant.

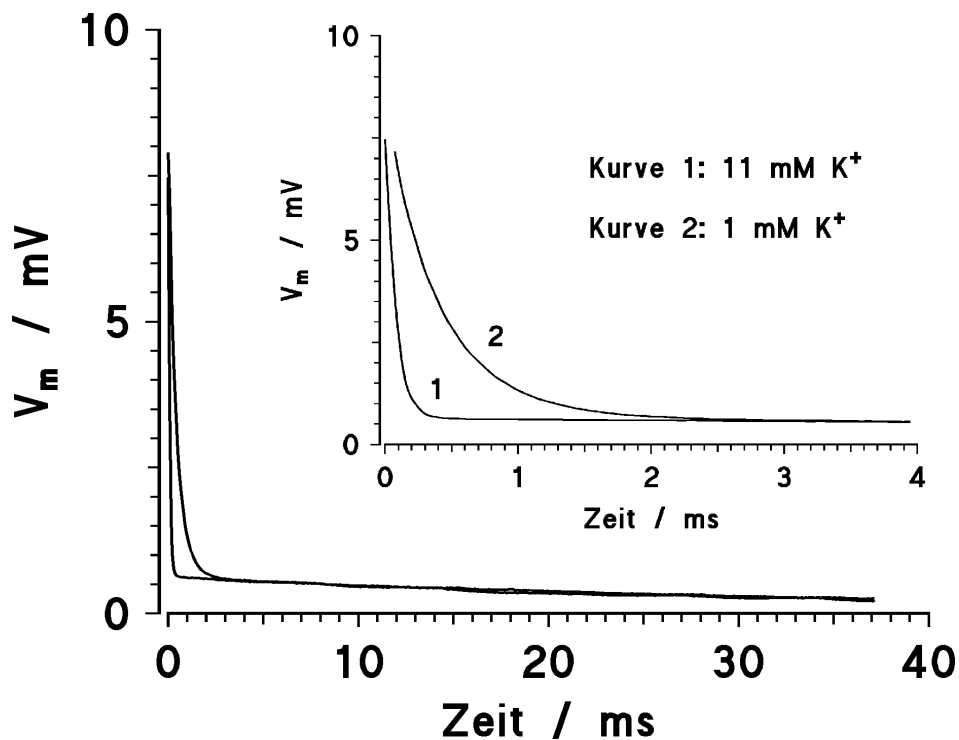


Abbildung 16: Einfluss der externen Kaliumkonzentration auf das Relaxationsspektrum von *V. ventricosa*. Die Kurven im Inset zeigen den Verlauf der Spektren im vorderen Bereich. Kurve 1 stellt eine Ladungspulsrelaxation unter Kontrollbedingungen dar, d.h. mit 11 mM Kalium im Badmedium; Kurve 2 wurde 15 min nach Ersetzen des ASW durch ein Kalium reduziertes Medium mit nur 1 mM K^+ aufgenommen. Zellparameter: $A_z = 400 \text{ mm}^2$, $V_z = 780 \text{ mm}^3$, $P = 0.2 \text{ MPa}$, $V_{vo} = +11 \text{ mV}$.

Deutlich stärker als dies bei den vorher gezeigten Hauptionen Chlorid und Natrium zu beobachten war, wirkte sich die Verminderung der externen Kaliumkonzentration auf das Spektrum des schnellen Spannungsabfalls von *V. ventricosa* aus. In Abbildung 16 ist dies stellvertretend für 16 Messungen dargestellt. Im Vergleich zu den Kontrollbedingungen mit 11 mM Kalium im Außenmedium nahm die Zeitkonstante der schnellen Relaxation τ_1 unter Kalium-Mangel (1 mM K^+) bei den untersuchten Zellen um etwa das dreifache zu. Die Zeitkonstante der langsamen Relaxation τ_2 blieb analog zu den obigen

Untersuchungen von der Reduzierung des Kalium im Badmedium unbeeinflusst.

4.3.2 Der Einfluss auf die Leitfähigkeit des Plasmalemmas

Das oben gezeigte Ergebnis, dass vor allem Kalium und in geringerem Maße auch Chlorid Einfluss auf die Physiologie von *V. ventricosa* haben, konnte zusätzlich durch die Betrachtung der Plasmalemmaleitfähigkeit in Abhängigkeit von den externen Hauptionen bestätigt werden.

Bei diesen Untersuchungen wurde die flächenspezifische Leitfähigkeit des Plasmalemmas, G_p , nach den Gleichungen 1 und 2 aus Ladungspulsrelaxationsspektren berechnet und in Abhängigkeit von der Konzentration von Natrium, Chlorid und Kalium aufgetragen. Zusätzlich sollte betrachtet werden, ob das Alter bzw. die Kultivierungsdauer der Algen einen Einfluss auf diese Parameter haben. Dazu wurde zwischen frisch gesammelten kleinen (also vermutlich jungen) und großen (älteren) sowie lange Zeit in Kultur gehaltenen Exemplaren unterschieden (siehe Material und Methoden 2.1.2).

In Abbildung 17 ist die Abhängigkeit der flächenspezifischen Plasmalemmaleitfähigkeit verschiedener Zellen von *V. ventricosa* von der externen Natriumkonzentration dargestellt. Um die Effekte an unterschiedlichen Zellen untereinander vergleichen zu können, wurde G_p auf die flächenspezifische Plasmalemmaleitfähigkeit unter Standardbedingungen G_p^* normiert.

An den frisch gesammelten kleinen und großen Zellen von *V. ventricosa* konnte kein signifikanter Einfluss der Natriumkonzentration im Badmedium auf die flächenspezifische Leitfähigkeit des Plasmalemmas festgestellt werden ($P > 0.3$ bzw. $P > 0.5$). Lediglich die lange Zeit kultivierten Algen zeigten eine schwache, aber signifikante ($P < 0.03$) Leitfähigkeitsänderung von 0.08% pro 1 mM $[Na^+]_e$.

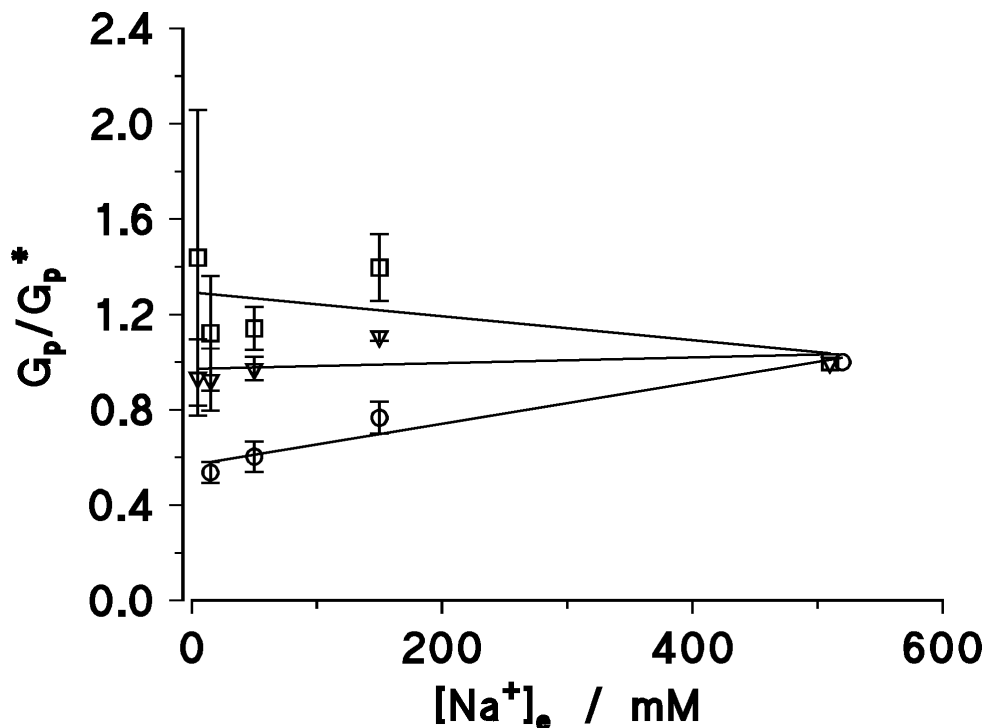


Abbildung 17: Änderung der flächenspezifischen Leitfähigkeit des Plasmalemmas G_p (normiert auf die Leitfähigkeit in ASW, G_p^*) von *V. ventricosa* bei Änderung der externen Natriumkonzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte (plus Standardabweichungen) von 5-8 unabhängigen Messungen an kultivierten Algen (Kreise), frischen großen (Quadrate) und frischen kleinen Zellen (Dreiecke). Die Geraden durch die Punkte sind das Ergebnis linearer Regressionen.

Deutlichere Effekte auf die flächenspezifische Leitfähigkeit des Plasmalemmas G_p konnte man bei Variation der externen Chloridkonzentration beobachten. Die Ergebnisse von 5 bis 9 Einzelexperimenten sind in Abbildung 18 zu sehen.

Im Gegensatz zu den Natrium-Versuchen war hier jedoch ein Einfluss der Größe (des Alters) oder der Kultivierungszeit nicht erkennbar. Aufgrund der durchgeführten linearen Regression ($P < 0.01$) errechnete sich die Änderung der Leitfähigkeit zu 0.1% pro 1 mM $[Cl^-]_e$.

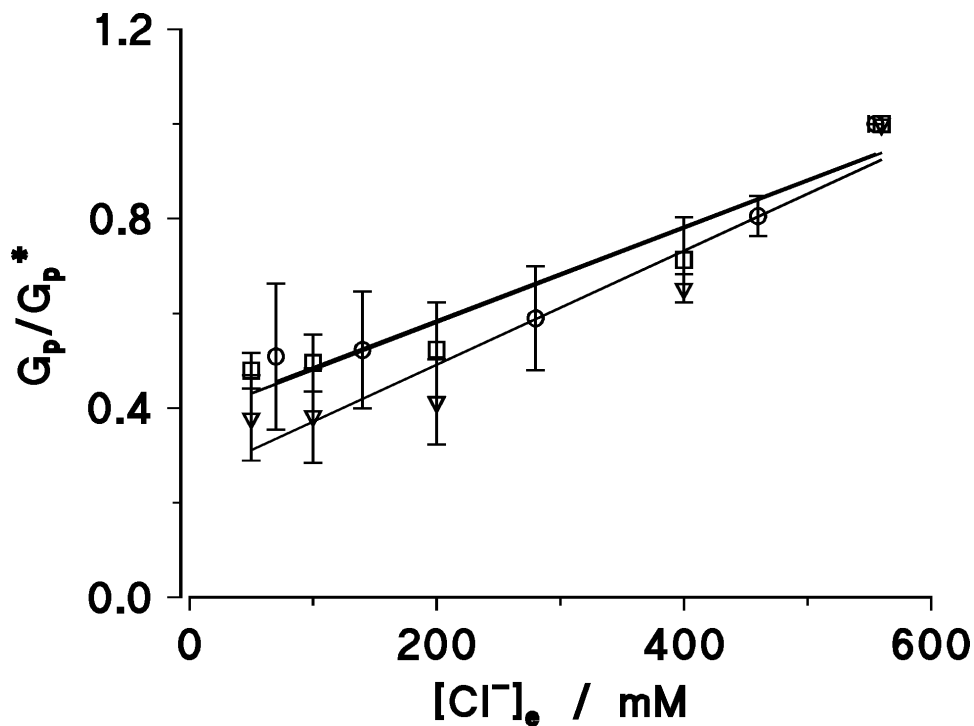


Abbildung 18: Auftragung der flächenspezifischen Plasmalemmleitfähigkeit G_p von *V. ventricosa* in Abhängigkeit der externen Chloridkonzentration in einer auf Standardbedingungen (G_p^* in ASW) normierten Darstellung. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte plus Standardabweichungen von 5-9 unabhängigen Experimenten. Die Kreise stellen kultivierte Zellen dar, die Quadrate und Dreiecke frisch gesammelte große und kleine Algen. Durch lineare Regression errechneten sich die dargestellten Geraden durch die Punkte.

Wie schon bei der Betrachtung der Ladungspulsspektren hatte die Variation der externen Kaliumkonzentration auch auf die flächenspezifische Leitfähigkeit G_p von *V. ventricosa* den deutlichsten Effekt aller untersuchten Hauptionen. Diese nahm um 7% pro 1 mM $[K^+]_e$ signifikant ($P < 0.0001$) zu, allerdings ohne dass ein Einfluss der Größe oder der Kultivierungsdauer der Zellen sichtbar wurde (siehe Abbildung 19).

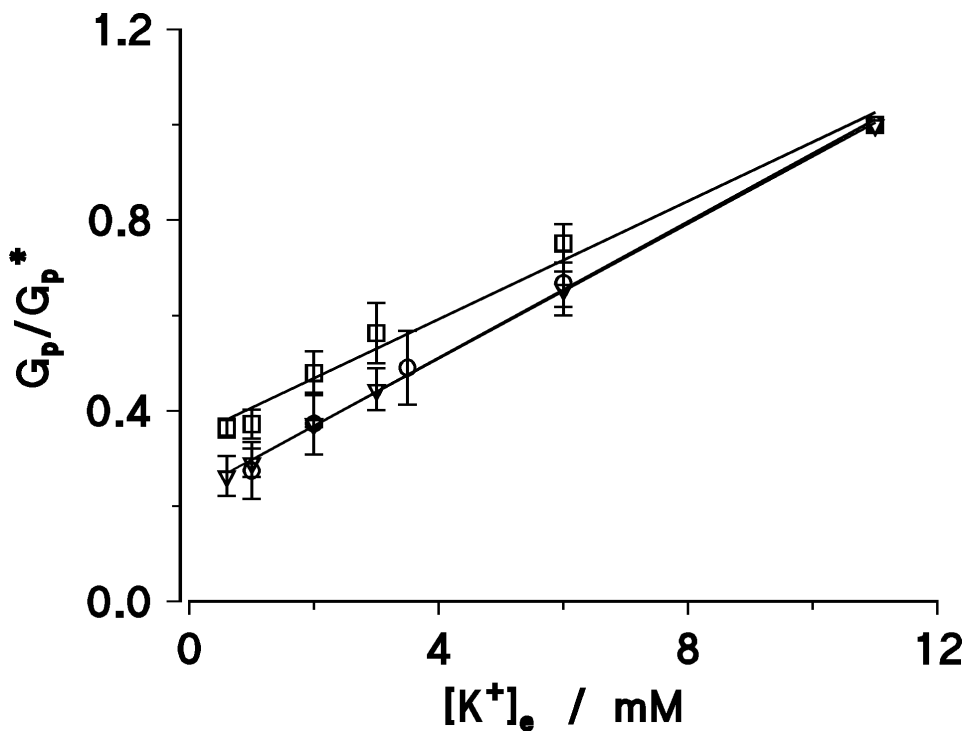


Abbildung 19: Abhängigkeit der flächenspezifischen Leitfähigkeit G_p des Plasmalemmas von *V. ventricosa* von der Kaliumkonzentration im Badmedium. Dargestellt sind die Mittelwerte (plus Standardabweichung) von 5-9 unabhängigen Experimenten normiert auf die Leitfähigkeit der jeweiligen Algen in ASW (G_p^*). Durch lineare Regression errechneten sich die eingezeichneten Geraden durch die Punkte. Die Symbole bezeichnen: Kreise: kultivierte Zellen, Quadrate: frisch gesammelte große Algen, Dreiecke: frische kleine Zellen.

4.3.3 Der Einfluss auf die Leitfähigkeit des Tonoplasten

Bei sämtlichen hier gezeigten Untersuchungen wurde auch beobachtet, ob die Leitfähigkeit des Tonoplasten eine Abhängigkeit von der Variation der Hauptionen im Badmedium zeigte. Betrachtet wurden wiederum längere Zeit kultivierte, sowie frisch gesammelte große und kleine Zellen. Im Gegensatz zu den oben gezeigten Beobachtungen an der Plasmalemmaleitfähigkeit G_p (siehe

4.3.2) konnte jedoch weder bei externer Natrium-, Chlorid-, oder Kaliumabsenkung ein innerhalb der Genauigkeitsgrenzen signifikanter Effekt auf die flächenspezifische Leitfähigkeit des Tonoplasten G_t festgestellt werden (siehe dazu Abbildung 20A-C).

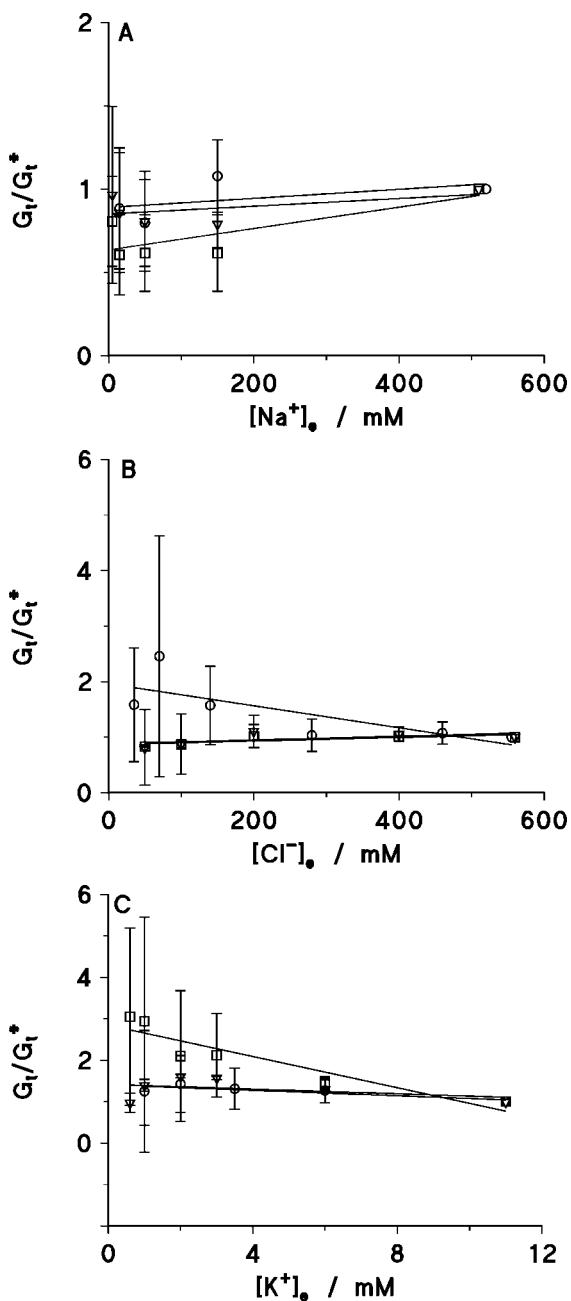


Abbildung 20: Abhängigkeit der flächenspezifischen Tonoplastenleitfähigkeit G_t von *V. ventricosa* von der externen Konzentration der Hauptionen Natrium (A), Chlorid (B) und Kalium (C). Die dargestellten Punkte repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 6 bis 9 unabhängigen Messungen, normiert auf die Leitfähigkeit unter Standardbedingungen G_t^* . Die Kreise stellen kultivierte Zellen dar, die Quadrate und Dreiecke frisch gesammelte große und kleine Algen, die nicht perfundiert wurden. Die Geraden durch die Punkte sind das Ergebnis linearer Regressionen.

4.4 Die Wirkung von Nystatin und der externen Ionen auf das Vakuolenpotential

Neben dem Einfluss auf die Zeitkonstanten der schnellen bzw. langsamen Relaxationen von *V. ventricosa* (vgl. 4.1) konnte nach Addition des porenbildenden Antibiotikums auch ein Effekt auf das vakuoläre Ruhemembranpotential V_{vo} beobachtet werden. Nach Davis [Davis, 1981] errechnet sich dieses aus der Summe der Potentiale über den Tonoplasten (V_{vc}) und über das Plasmalemma (V_{co}). Bei 13 untersuchten Zellen von *V. ventricosa* lag V_{vo} im Bereich von -5.1 bis $+18.0$ mV.

Die Antwort des Membranpotentials auf die externe oder vakuoläre Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Nystatin zeigte eine große Variabilität. Wie man jedoch Abbildung 21A entnehmen kann, kam es nach vakuolärer Perfusion mit diesem porenbildenden Antibiotikum in den ersten Minuten stets zu einem Abfall des Membranpotentials V_{vo} auf deutlich negative Werte von -15 mV bis sogar -68 mV ($n = 8$). Die externe Gabe von Nystatin (Abbildung 21B) führte dagegen generell zunächst zu einem Anstieg des Membranpotentials auf leicht positive Werte von -0.8 mV bis $+4.3$ mV ($n = 5$). In allen Fällen pendelte sich V_{vo} etwa 80 Minuten nach Addition von Nystatin auf Werte um 0 mV ein.

Offensichtlich repräsentierten diese so aufgenommen Membranpotentiale zum einen die Potentialdifferenz über dem Plasmalemma V_{co} (nach externer Nystatingabe; vgl. Abbildung 21B) und zum anderen die über dem Tonoplast V_{vc} (nach interner Nystatinperfusion; vgl. Abbildung 21A). Über einen möglichen Beitrag der Zellwand zum Plasmalemmapotential konnten hier keine Aussagen gemacht werden.

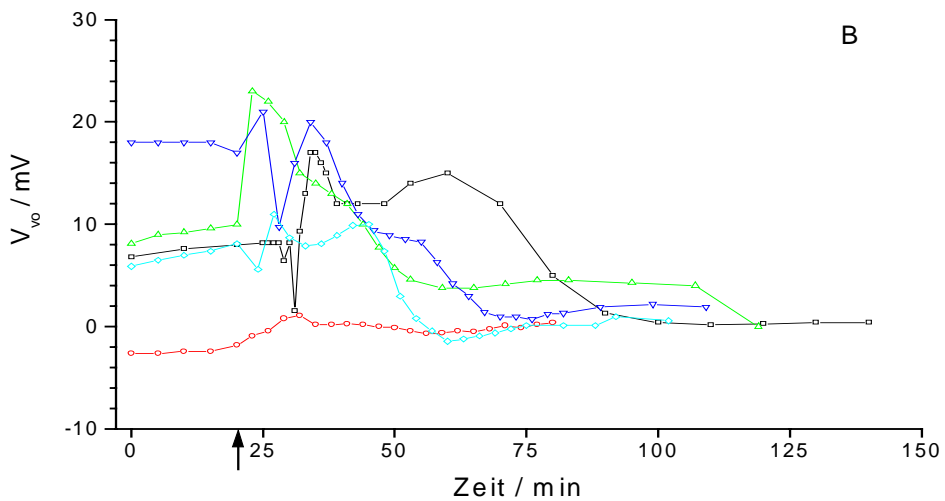
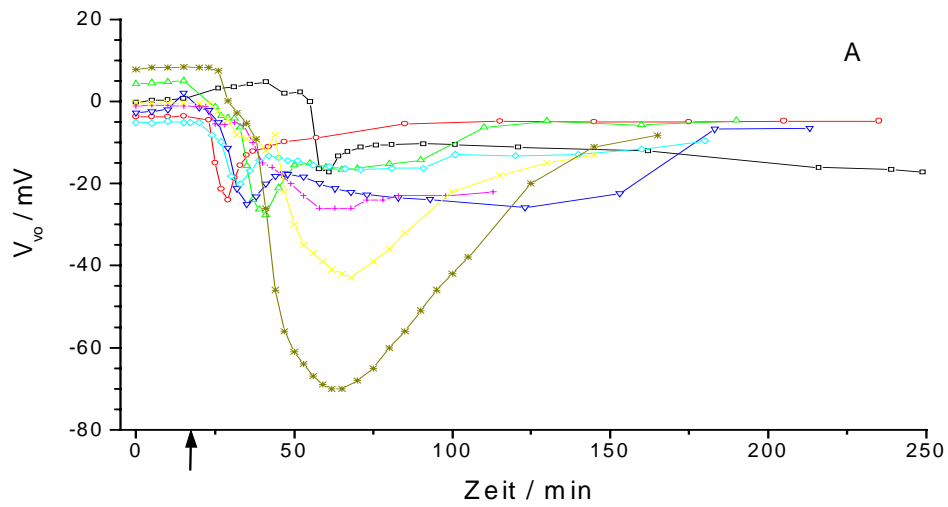


Abbildung 21: Änderungen des vakuolären Ruhepotentials V_{vo} von *V. ventricosa* nach vakuolärer (A) und externer (B) Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Nystatin in ACS. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Nystatin-Zugabe. Dargestellt ist der Verlauf von V_{vo} für 8 bzw. 5 verschiedene Zellen, die durch die unterschiedlichen Farben bzw. Symbole gekennzeichnet sind.

Eine Ursache, weshalb sich das Membranpotential in allen untersuchten Fällen Werten um 0 mV annähert, könnte sein, dass es durch die stark erhöhten Leitfähigkeiten des Plasmalemmas bzw. des Tonoplasten zu Änderungen der Ionenzusammensetzung des Zytoplasmas kommt. Unabhängig

davon scheint jedoch deutlich geworden zu sein, dass das Zytoplasma im Vergleich zum Außenmedium und zur Vakuole negativ geladen ist.

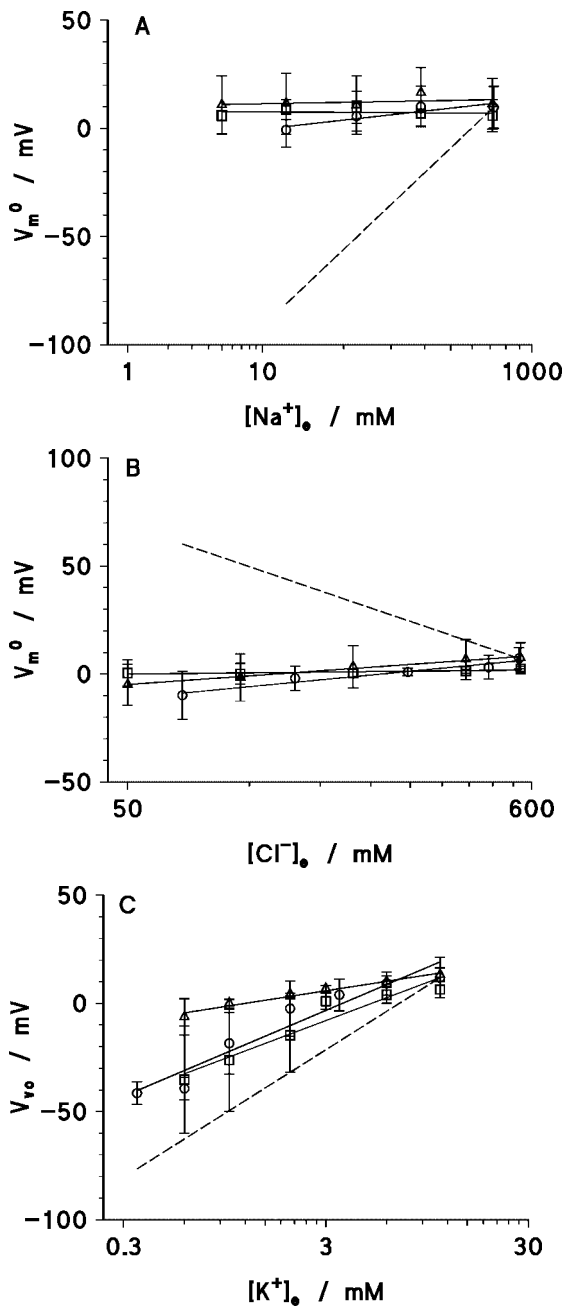


Abbildung 22: Abhängigkeit des Vakuolenpotentials von *V. ventricosa* von der Konzentration an Natrium (A), Chlorid (B) und Kalium (C) im Badmedium in einer halblogarithmischen Auftragung. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte plus Standardabweichungen von 5-9 unabhängigen Experimenten an unperfundierten Zellen. Die Kreise stellen kultivierte Algen dar, die Quadrate und Dreiecke frisch gesammelte große und kleine Algen. Durch lineare Regression errechneten sich die dargestellten Geraden durch die Punkte. Die unterbrochenen Linien zeigen die Verschiebung des Nernst'schen Gleichgewichtspotential E_N des jeweiligen Ions.

Parallel zu den in den Abschnitten 4.3.2 und 4.3.3 gezeigten Effekten der Variation der externen Hauptionenkonzentration auf die Plasmalemma- und

Tonoplastenleitfähigkeit wurde im Verlauf dieser Experimente auch stets das vakuoläre Ruhepotential V_{vo} aufgenommen. In Abbildung 22A-C ist dieser Effekt für verschiedene Zelltypen von *V. ventricosa* dargestellt.

Nach Analyse der Daten mittels linearer Regression konnte an kultivierten und frisch gesammelten Zellen von *V. ventricosa* keine Abhängigkeit des Membranpotentials von der externen Natriumkonzentration festgestellt werden ($P > 0.05$; Abbildung 22A). Ein leichter Effekt auf V_{vo} ließ sich bei Variation der Chloridkonzentration im Badmedium beobachten ($P < 0.03$; Abbildung 22B). Dagegen zeigte sich eine deutliche Hyperpolarisation des vakuolären Ruhepotentials, wenn die Konzentration an Kalium im Außenmedium gesenkt wurde ($P < 0.0005$; Abbildung 22C). Dies traf sowohl für kultivierte, als auch für frisch gesammelte Algen unterschiedlicher Größe zu.

Betrachtete man den Verlauf des theoretisch berechneten Nernst-Potentials (E_N) für die jeweiligen Ionen, wurde deutlich, dass - im Gegensatz zu der Natrium- und Chloridkonzentration - die Effekte bei Variation der Kaliumkonzentration auf V_{vo} eine deutliche Parallelität zu dem theoretischen Nernst-Potential für Kalium E_{NK^+} aufwies. Das Membranpotential änderte sich um etwa 40 mV pro Dekade der Kaliumkonzentration.

Vor dem Hintergrund, dass sich die passiven elektrischen Eigenschaften des Tonoplasten durch die externe Kaliumkonzentration nicht beeinflussen ließen (vgl. 4.3.3), repräsentierten die beobachteten Potentialeffekte wohl die Änderungen der über dem Plasmalemma anliegenden Potentialdifferenz. Diese wiederum wurde hauptsächlich durch ein Kalium-Diffusions-Potential aufgebaut.

4.5 Die Temperaturabhängigkeit der elektrischen Eigenschaften von Plasmalemma und Tonoplast

Zur Bestimmung der notwendigen Energiebarriere für die Plasmalemma- und Tonoplastenleitfähigkeit von *V. ventricosa* wurden Ladungspulsrelaxationen

bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen bei einer Mediumtemperatur (ASW) von 20°C mit den Mikrokapillaren angestochen und zunächst für einen Zeitraum von 60 bis 100 Minuten bei dieser Temperatur inkubiert. Innerhalb einer Zeitspanne von ca. 45 Minuten wurde daraufhin die Temperatur des Badmediums ASW zunächst linear auf 30°C erhöht und anschließend innerhalb von ca. 120 min linear auf 6°C abgesenkt. Die regelmäßige Aufnahme von Ladungspulsrelaxationsspektren diente dann zur Ermittlung der Temperaturabhängigkeit der Zellparameter.

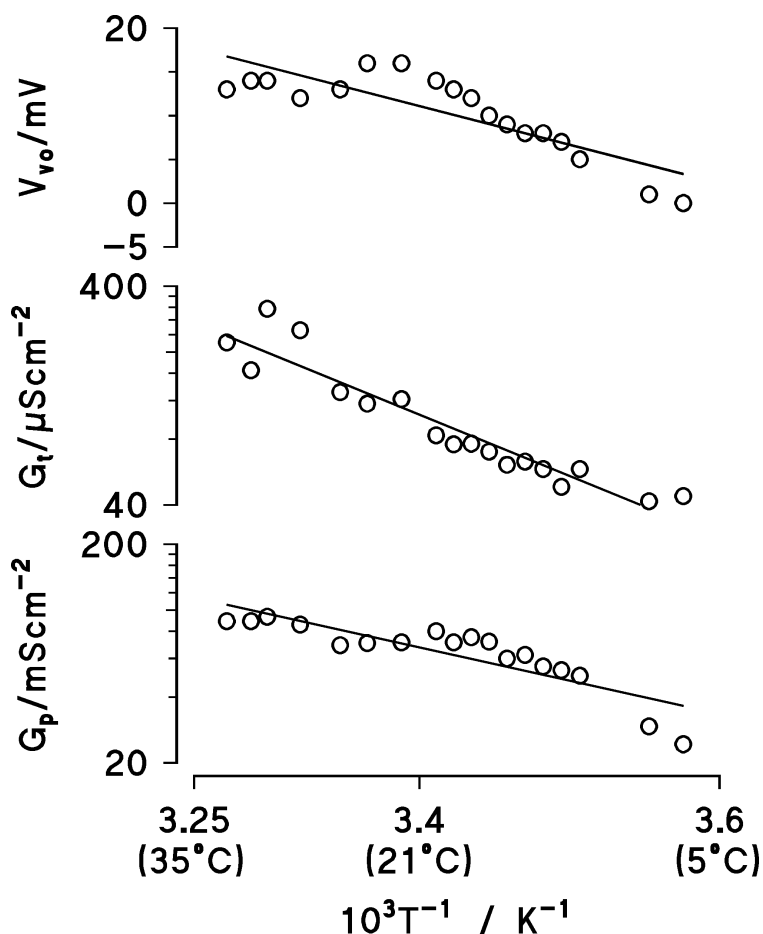


Abbildung 23: Arrhenius-Plots des vakuolären Ruhepotentials V_{vo} und der flächenspezifischen Plasmalemma- bzw. Tonoplastenleitfähigkeit (G_p bzw. G_t) einer Zelle von *V. ventricosa* in ASW. Zellparameter: $A_z = 940 \text{ mm}^2$, $V_z = 2600 \text{ mm}^3$, $P = 0.12 \text{ MPa}$. Die Daten wurden aus Ladungspulsrelaxationsexperimenten abgeleitet und nach den Gleichungen 1-3 analysiert. Die eingezeichneten Geraden errechneten sich aus linearen Regressionen.

Stellvertretend für diese Versuchsreihe ($n = 5$) sind in Abbildung 23 die Ergebnisse an einer Alge von *V. ventricosa* mittels Arrhenius-Plots dargestellt. Der zu Beginn des Experiments zu 0.12 MPa bestimmte Turgordruck

veränderte sich im Laufe des Experimentes nicht signifikant. Das Membranpotential, das unter Kontrollbedingungen (20°C) +16 mV betrug, wurde bei 35°C zu +13 mV und bei 6°C zu 0 mV bestimmt und zeigte somit eine leichte Abhängigkeit von der Temperatur des externen Mediums. Nach halblogarithmischer Auftragung der flächenspezifischen Leitfähigkeiten von Plasmalemma und Tonoplast ließen sich deren Aktivierungsenergien ΔE anhand der Steigung der Regressionsgeraden ermitteln. Sie betragen 29.3 kJ mol⁻¹ im Falle von G_p und 49.4 kJ mol⁻¹ im Falle von G_t . Nach Hille werden solche Werte erwartet, wenn es zu Diffusion von Ionen durch offene Kanäle in Zellmembranen kommt [Hille, 1992].

4.6 Hinweise auf Kalium- und Chlorid-Kanäle bzw. Carrier im Plasmalemma

Der Einsatz spezifischer Anionen- bzw. Kationenkanalblocker ermöglichte die Identifizierung und Charakterisierung der physiologischen Rolle der Ionenkanäle in der Zellmembran von *V. ventricosa*. Dabei wurde untersucht, inwieweit die Kaliumkanalblocker Tetraethylammoniumchlorid (TEA) und Bariumchlorid (BaCl₂), sowie der Chloridkanalblocker 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure (DIDS) die elektrophysiologischen Parameter der beiden Membransysteme beeinflussten.

Interessanterweise konnten bei Perfusion der untersuchten Blocker in die Vakuole der Zellen keinerlei Effekte auf die Ladungspulsrelaxationsspektren festgestellt werden. Dagegen führte die äußerliche Applikation dieser Substanzen in allen Fällen zu signifikanten Änderungen der aufgenommenen Spektren von *V. ventricosa*.

Zur Aufnahme von Referenzmessungen wurden die Algen zunächst in ASW inkubiert. Sollte anschließend der lichtempfindliche Cl⁻-Blocker DIDS untersucht werden, wurde die Apparatur zusätzlich verdunkelt, was jedoch, wie Kontrollexperimente zeigen konnten, zumindest bei der hier erforderlichen

Dauer keinen Effekt auf die Relaxationsspektren oder das Membranpotential V_{vo} hatte. Eine Stunde nach Anstich der Zelle mit den Mikroelektroden wurde das Standard-ASW-Medium im Bad durch ASW mit steigender Konzentration der jeweiligen Blocker ersetzt. Die Aufnahme der Ladungspulsmessungen begann direkt nach Applikation des neuen Mediums über einen Zeitraum von ca. 15 Minuten im Abstand von zwei bis fünf Minuten. Sowohl längere Zeit in Kultur gehaltene, als auch frisch gesammelte große und kleine Exemplare von *V. ventricosa* wurden auf diese Art untersucht.

Die zweiphasischen Relaxationsspektren nach Applikation des Ladungspulses wurden nach Gleichung 1 angepasst und die jeweiligen Plasmalemmaleitfähigkeiten nach Gleichung 2 errechnet. Nichtlineare Regressionsanalyse der Daten zeigte, dass sich diese Änderungen der flächenspezifischen Plasmalemmaleitfähigkeit G_p (normiert auf die Werte unter Standardbedingungen G_p^*) gut mittels einer Langmuir- bzw. Michaelis-Menten-Funktion (in Analogie zu einer Enzymkinetik) beschreiben ließen:

$$G_p/G_p^* = I_{\max}c / (IC_{50}+c) \quad (\text{Gleichung 6})$$

Dabei gibt I_{\max} die maximale Hemmung des Blockers unter Sättigungsbedingungen an, c ist die Konzentration des Blockers und IC_{50} die Konzentration des Blockers, bei der eine 50%ige Hemmung beobachtet werden kann.

Neben den anorganischen Substanzen Cäsium und Barium (siehe unten) ist das organische Tetraethylammonium (TEA) ein wichtiger spezifischer Blocker für Kaliumkanäle. An Nervenzellen bewirkt TEA auf diese Art und Weise z.B. eine Verlängerung der abfallenden Phase von Aktionspotentialen [Hille, 1992]. Wie Untersuchungen an Axonen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* gezeigt haben, besteht ein nicht unbedeutender Unterschied in der Wirkung von intern im Vergleich zu extern appliziertem TEA. Beispielsweise ist

die inhibierende Wirkung von $[\text{TEA}]_e$ im Gegensatz zu $[\text{TEA}]_i$; nur wenig vom Membranpotential und der herrschen Kalium-Konzentration abhängig [Koppenhöfer & Vogel, 1969; Armstrong & Hille, 1972]. Von diesen Autoren wird die hemmende Wirkung von TEA mit einem physikalischen Eindringen und damit einem Verstopfen der Kalium-Kanäle beschrieben.

Bei schrittweiser Erhöhung der Konzentration des K^+ -Kanalblockers TEA im Badmedium (5 bis 100 mM) erfolgte eine entsprechende Abnahme der Zeitkonstanten der schnellen Relaxation, während die langsame, dem Tonoplasten zugerechnete, Relaxation unverändert blieb. In Abbildung 24 ist dargestellt, welchen Effekt dieser Kanalblocker auf die flächenspezifische Leitfähigkeit des Plasmalemmas hat.

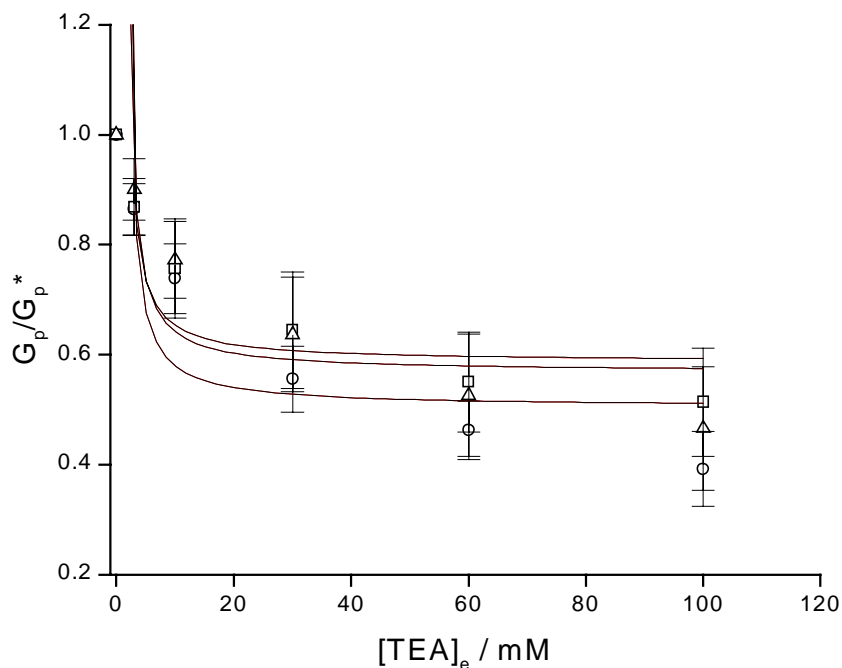


Abbildung 24: Auftragung der flächenspezifischen Plasmalemmaleitfähigkeit G_p (normiert auf den unter Standardbedingungen gemessenen Wert, G_p^*) als Funktion der TEA-Konzentration im Badmedium. Mit unterschiedlichen Symbolen sind Messungen an kultivierten Zellen von *V. ventricosa* (Kreise), sowie an frisch gesammelten großen (Quadrate) und kleinen (Dreiecke) Algen dargestellt ($n = 9$). Eine Stunde nach Einführen der Mikroelektroden wurde das TEA in das externe

Medium zugegeben. In Abständen von zwei bis fünf Minuten wurden fünf bis sieben Ladungspulsmessungen durchgeführt, danach die TEA-Konzentration im Außenmedium erhöht. Die Analyse der Relaxationsspektren erfolgte nach Gleichung 1; die Berechnung der Plasmalemmaleitfähigkeit G_p nach Gleichung 2. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert (\pm Standardabweichung) von drei unabhängigen Messungen pro TEA-Konzentrationsstufe dar und wurden nach Gleichung 6 im Stil einer Langmuir-/Michaelis-Menten-Kinetik angepasst (durchgezogene Kurve; Korrelationskoeffizient $r = 0.3$).

Deutlich ist zu erkennen, dass die flächenspezifische Plasmalemmaleitfähigkeit G_p aller untersuchten Zellen abnahm, wenn TEA in steigender Konzentration über das Badmedium appliziert wurde. Ein solcher Effekt tritt auf, wenn K^+ -Kanäle im Plasmalemma vorliegen. Etwa 30 Minuten nach Entfernen des blockierenden Agens aus dem Außenmedium konnte keine Auswirkung auf G_p mehr beobachtet werden; es handelte sich also um eine reversible Hemmung.

Nachdem die Auswirkungen von $[TEA]_e$ sowohl bei kultivierten, als auch bei frisch gesammelten Zellen sehr ähnlich waren, wurden die Daten zusammengefasst und nach Gleichung 6 ausgewertet. Der IC_{50} -Wert lag zwischen 6.9 und 13.9 mM, im Durchschnitt bei 11.5 ± 2.5 mM ($n = 9$). Für die maximale Hemmung bei Sättigung I_{max} wurden Werte von 35 bis 55 % berechnet, durchschnittlich 45 ± 8 % ($n = 9$).

Ein ähnlicher inhibierender Effekt auf die flächenspezifische Leitfähigkeit G_p ließ sich erkennen, wenn dem Badmedium $BaCl_2$ in Konzentrationen von 0.05 bis 4.0 mM zugesetzt wurde.

Im Vergleich zu TEA genügten weitaus geringere Konzentrationen des Schwermetallsalzes, um eine entsprechende Hemmung von G_p hervorzurufen; Konzentrationen von mehr als 5.0 mM $[BaCl_2]_e$ führten bei *V. ventricosa* zu letalen Vergiftungserscheinungen. Wie schon bei TEA, handelte es sich auch bei Barium um eine komplett reversible Hemmung der Plasmalemmaleitfähigkeit, da sich spätestens eine Stunde nach Wechsel zu $BaCl_2$ -freiem ASW G_p wieder auf das Niveau der Kontrollmessungen eingestellt hatte.

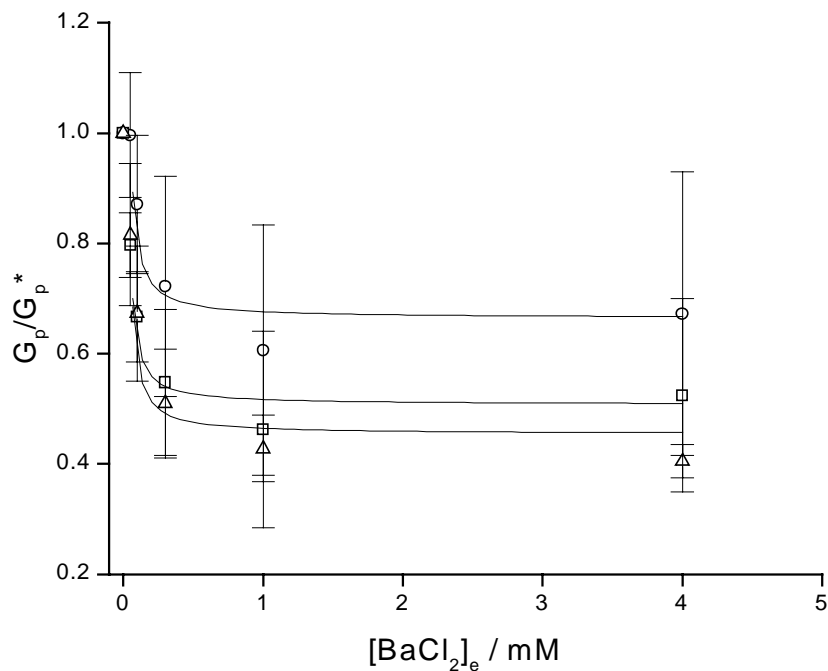


Abbildung 25: Auftragung der flächenspezifischen Plasmalemmaleitfähigkeit G_p (normiert auf den unter Standardbedingungen gemessenen Wert, G_p^*) als Funktion der $BaCl_2$ -Konzentration im Badmedium. Mit unterschiedlichen Symbolen sind Messungen an kultivierten Zellen von *V. ventricosa* (Kreise), sowie an frisch gesammelten großen (Quadrate) und kleinen (Dreiecke) Algen dargestellt ($n = 10$). Die Durchführung der Experimente und die Analyse der Daten erfolgte analog zu den in Abbildung 24 beschriebenen Experimenten (Korrelationskoeffizient der Kurvenanpassung $r = 0.3$).

In Abbildung 25 ist der Effekt von externem Barium in verschiedenen Konzentrationen auf die normierte flächenspezifische Leitfähigkeit des Plasmalemmas von *V. ventricosa* dargestellt. Im Gegensatz zu TEA zeigte sich bei Verwendung von $BaCl_2$ als Kaliumkanalblocker bei kultivierten und frisch gesammelten Algen ein Unterschied bei der Antwort von G_p auf $[BaCl_2]_e$. Eine Größenabhängigkeit ließ sich jedoch innerhalb der Gruppe der frischen Algen nicht feststellen.

Die Analyse der Daten nach Gleichung 6 ergab für die kultivierten Algen eine halbmaximale Hemmung bei $IC_{50} = 0.17 \pm 0.11$ mM und ein I_{max} von 33 ± 21.6 % ($n = 3$). Bei den frischen Zellen errechnete sich IC_{50} zu 0.2 ± 0.06 mM und I_{max} zu 51 ± 11.4 % ($n = 7$). Wie an den Standardabweichungen zu sehen ist, kam es auch bei Barium-Hemmung zu großen Schwankungen bei den Parametern. (Dieses Problem wird später noch ausführlicher betrachtet werden.)

Die Auswirkungen einer Hemmung von Anionen-(Chlorid-)kanälen an *V. ventricosa* sollte durch die Verwendung des spezifischen Blockers DIDS untersucht werden. Die Bindung dieses Blockers an die Außenseite der Zellmembran erfolgt in der Regel kovalent und irreversibel an Lysingruppen. Dabei kann der Anionentransport in humanen Erythrozyten maximal um 95 – 98% blockiert werden [Cabantchik & Rothstein, 1972; Shami, Rothstein, & Knauf, 1978; Passow et al., 1982]. Weiterhin ist bekannt, dass auch die Anionentransportsysteme vieler anderer Zellsysteme spezifisch durch DIDS gehemmt werden können [Lin, 1981; Keifer, Franceschi, & Lucas, 1982; Hedrich & Kurkdjian, 1988; Cabantchik & Greger, 1992]. Auch an *V. utricularis* wurde die Wirkung von DIDS im Badmedium auf die elektrischen Parameter dieser Grünalge bereits ausführlich untersucht [Spieß et al., 1993; Wang, 1992]. Dabei konnte festgestellt werden, dass DIDS nur auf die schnelle Relaxationszeitkonstante τ_1 eine Wirkung zeigte, während die langsame Relaxation nicht beeinflusst wurde. Die schnelle Relaxation von *V. utricularis* wurde hingegen durch $[DIDS]_e$ um das 2- bis 5-fache verlangsamt [Wang, 1992].

Wie schon bei den Experimenten mit externem TEA und Barium zu sehen war, hatte auch die Applikation von DIDS zum Badmedium bei *V. ventricosa* nur Auswirkungen auf die schnelle Relaxation des Ladungspulsspektrums. Dieser Effekt war jedoch nur teilweise reversibel, wie Experimente eine Stunde nach Wegnahme des Blockers aus dem Badmedium zeigten. Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Plasmalemmaleitfähigkeiten wurde DIDS dem

Badmedium (ASW) in Konzentrationen von 0.02 mM bis 0.5 mM zugesetzt. Konzentrationen von mehr als 0.5 mM DIDS waren letal für die Algen.

In Abbildung 26 ist der Effekt von $[DIDS]_e$ auf die flächenspezifische Leitfähigkeit des Plasmalemmas kultivierter sowie frisch gesammelter *V. ventricosa* unterschiedlicher Größe dargestellt. Man erkennt auch bei Verwendung dieses Anionenkanalinhibitors eine deutliche Abnahme von G_p mit steigenden DIDS-Konzentrationen. Analyse der Daten nach Gleichung 6 zeigte – vergleichbar mit den Effekten bei $[Ba^{2+}]_e$ – signifikante Unterschiede der maximalen Hemmung I_{max} bei den kultivierten und frischen Zellen. Für die längere Zeit kultivierten Zellen wurde I_{max} zu $13 \pm 7 \%$ bestimmt ($n = 3$); bei den frischen Algen ergab sich ein Wert von $I_{max} = 35 \pm 12 \%$ ($n = 6$). Dagegen waren die Werte für IC_{50} für beide Zelltypen durchaus vergleichbar: 0.02 ± 0.01 mM für die kultivierten Zellen ($n = 3$) bzw. 0.06 ± 0.03 für die frischen Algen ($n = 6$). Auch bei den Auswirkungen von $[DIDS]_e$ auf G_p kam es, wie die Standardabweichungen zeigten, zu deutlichen Schwankungen der Werte.

Eine mögliche Erklärung der auffälligen Streuung der I_{max} -Daten bei den verschiedenen Zellen ist, dass der Beitrag der Kalium- bzw. Chloridkanäle zum Plasmalempotential von Zelle zu Zelle variiert, die algebraische Summe der Kanäle zur Gesamtleitfähigkeit jedoch bei allen Zellen die gleiche ist. Diese Überlegung wurde durch Experimente bestärkt, bei denen Zellen von *V. ventricosa* nach Durchführung von Kontrollmessungen zunächst mit 100 mM $[TEA]_e$ behandelt wurden. Nach Wegnahme des Kaliumkanal-Blockers und ausreichendem Waschen mit ASW applizierte man bei derselben Zelle 0.5 mM $[DIDS]_e$ in das Badmedium. Die errechneten I_{max} Werte bei TEA- und DIDS-Inhibition der Kanäle bei 15 kultivierten und frisch gesammelten *V. ventricosa* sind in Tabelle 6 dargestellt.

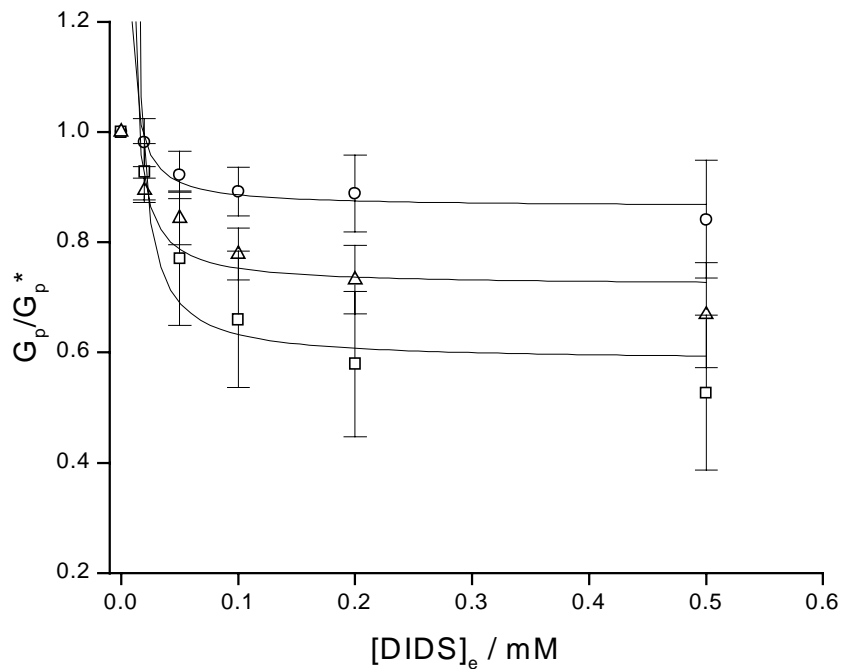


Abbildung 26: Auftragung der flächenspezifischen Plasmalemmaleitfähigkeit G_p (normiert auf den unter Standardbedingungen gemessenen Wert, G_p^*) als Funktion der DIDS-Konzentration im Badmedium. Mit unterschiedlichen Symbolen sind Messungen an kultivierten Zellen von *V. ventricosa* (Kreise), sowie an frisch gesammelten großen (Quadrate) und kleinen (Dreiecke) Algen dargestellt ($n = 9$). Die Durchführung der Experimente und die Analyse der Daten erfolgte analog zu den in Abbildung 24 beschriebenen Experimenten (Korrelationskoeffizient der Kurvenanpassung $r = 0.5$).

Obwohl bei den 15 einzelnen Zellen die Auswirkung der Kalium- bzw. Chloridkanalblocker durchaus unterschiedlich ausgeprägt war ($I_{(TEA)} = 57 \pm 15$ % und $I_{(DIDS)} = 37 \pm 15$ %), war die algebraische Summe dieser ($\Sigma_i = I_{(TEA)} + I_{(DIDS)}$) nahezu gleich (93 ± 14 %).

Tabelle 6: Berechnung der an 15 Zellen von *V. ventricosa* experimentell bestimmten Hemmung I der spezifischen Plasmalemmleitfähigkeit durch die Kanalblocker TEA und DIDS.

Zelle	I [%]		
	TEA	DIDS	Σ
1	26	60	86
2	52	24	76
3	47	19	66
4	30	73	103
5	51	37	88
6	44	52	96
7	62	27	89
8	62	26	88
9	68	33	101
10	80	27	107
11	71	42	113
12	77	29	106
13	54	22	76
14	72	35	107
15	55	44	99
Mittelwert \pm SD	57 \pm 15	37 \pm 15	93 \pm 14

Prozentuale Hemmung I der Plasmalemmleitfähigkeit G_p von *V. ventricosa* in Anwesenheit von 100 mM TEA bzw. 0.5 mM DIDS im Badmedium. Durch Ladungspulsmessungen im Kontrollmedium ASW wurde nach Gleichungen 1 und 2 die maximale Leitfähigkeit $G_{p,max}$ bestimmt. Daraufhin wurde das Außenmedium durch ASW mit 100 mM TEA ersetzt, was dann nach Analyse der Daten zu $G_{p,min(TEA)}$ führte. Einer 30 minütigen Inkubation in Standard-ASW folgte die Applikation von ASW mit 0.5 mM DIDS, woraus sich $G_{p,min(DIDS)}$ errechnete. $I_{(TEA)}$ und $I_{(DIDS)}$ konnten nach $I = (G_{p,max} - G_{p,min}) / G_{p,max}$ berechnet werden; die komplette Hemmung Σ_i aus der Summe $I_{(TEA)} + I_{(DIDS)}$.

Durch diese Experimente erhält die oben getroffene Schlussfolgerung Unterstützung, dass die Leitfähigkeit des Plasmalemmas von *V. ventricosa* fast ausschließlich durch Kalium- und Chloridkanäle bestimmt wird, wobei hauptsächlich die Kaliumkanäle diese Leitfähigkeit dominieren.

5 Diskussion

5.1 Die kombinierte Ladungspuls-/Mikroperfusionstechnik ermöglicht eine gezielte Manipulation und exakte Aufzeichnung wichtiger Membranparameter mariner Rieselalgen

Die hier vorgestellten Ergebnisse der Arbeiten an *V. utricularis* und *V. ventricosa* machen deutlich, dass eine Perfusion der Vakuole einzelliger mariner Rieselalgen unter Beibehaltung des physiologischen Turgordrucks viele experimentelle Möglichkeiten eröffnet, um Einblicke in die elektrischen Parameter und Transportvorgänge der Membransysteme dieser Algen zu erhalten.

Neben der Applikation von Ladungspulsen erlaubt diese Apparatur zusätzlich die unabhängige Einstellung sowohl des benötigten Turgordrucks (bis zu 0.4 MPa) als auch der Fließgeschwindigkeit der vakuolären Perfusion. Durch Integration der für die Ladungspulsmethode erforderlichen zwei Mikroelektroden in die beiden Perfusionskapillaren konnte dabei die Verletzung der Alge durch das Einführen der Kapillaren minimiert werden. Die schonende Eigenschaft der Messmethode kann an zwei Aspekten erkannt werden: Zum einen zeigten die durch Ladungspulsrelaxationsspektren erhaltenen Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 vor bzw. während der Perfusion keine relevanten Unterschiede. Zum anderen stimmen die Änderungen der flächenspezifischen Leitfähigkeit der Gesamtmembran mit dem Turgor, die hier durch Perfusion auf unterschiedlichen Druckstufen hervorgerufen wurden (vgl. Abbildung 8A), gut mit Messungen überein, die an unperfundierten *V. utricularis* erhalten wurden [Zimmermann & Steudle, 1974].

Wie von diesen Autoren mit Hilfe von osmotischen Experimenten gezeigt werden konnte, näherte sich R_m in einem Druckbereich von 0.05 bis 0.2 MPa einem Minimumwert von etwa $5 \times 10^{-2} \Omega m^2$ an. Diese Daten stimmen gut mit den hier gezeigten Ergebnissen überein. Erhöhte man den Zellinnendruck durch osmotische Änderung des Badmediums (also nicht durch Perfusion) ließ

sich ein Maximum des flächenspezifischem Membranwiderstands R_m von etwa $20 \times 10^{-2} \Omega m^2$ in einem Druckbereich von 0.15 bis 0.35 MPa feststellen. Bei höheren Turgorwerten nahm R_m wieder ab. Wurde der Turgor dagegen mittels Perfusion erhöht, konnte ein maximaler Membranwiderstand nur bis 0.3 MPa aufgelöst werden. Hierbei spielt sicherlich eine Rolle, dass unter Perfusionsbedingungen der osmotische Druck des externen und vakuolären Mediums konstant gehalten wird.

Die durchgeführten Ladungspulsmessungen an *V. utricularis* und *V. ventricosa* ergaben, dass sich die Relaxationsspektren beider Spezies immer mit einer Addition einer schnellen (τ_1) und langsamen (τ_2) Relaxationszeitkonstante beschreiben ließen. Schon zuvor wurde dies an verschiedenen marinen Algen beobachtet und publiziert [Benz, Büchner, & Zimmermann, 1988; Benz & Zimmermann, 1983; Wang et al., 1991; Zimmermann, Büchner, & Benz, 1982]. Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Spezies errechneten sich folgende Relaxationszeitkonstanten (vgl. hierzu auch Tabelle 7 und Tabelle 8 im Appendix):

	$\tau_1 \pm SD / \mu s$	$\tau_2 \pm SD / ms$
<i>V. utricularis</i> (n = 10)	139 ± 35	1.9 ± 0.8
<i>V. ventricosa</i> (n = 10)	168 ± 99	29 ± 28

(Die vor allem bei *V. ventricosa* auffällig hohe Standardabweichung ist in der Wahl unterschiedlich großer Zellen begründet, die Volumina von 14 bis 3870 mm^3 aufwiesen.)

Eine dritte, intermediäre Relaxation mit einer Zeitkonstante τ_3 von etwa 1 ms konnte in manchen Fällen – allerdings nicht reproduzierbar – bei beiden Gattungen beobachtet werden.

5.2 Das "Zwei-Membranen Modell": die beiden Relaxationen des Ladungspulsrelaxationsspektrums stammen von den passiven elektrischen Eigenschaften des Plasmalemmas und des Tonoplasten

Eine klare Antwort auf die Frage, ob das biphasische Relaxationsspektrum von *V. utricularis* und *V. ventricosa* seinen Ursprung in den sog. RC-Eigenschaften (R – Widerstand, C – Kapazität) der beiden Membranen hat ("Zwei-Membranen Modell"), oder aber nach dem "Modell der mobilen Ladungen" nur die elektrischen Eigenschaften des Plasmalemmas einschließlich mobiler Ladungen eines Membranproteins repräsentiert, konnte erstmals in Folge der Experimente mit dem membranporenbildenden Antibiotikum Nystatin gegeben werden.

Nachdem dieses Agens (wie auch in schwächerem Maße das verwandte Amphotericin B) abhängig von der Seite der Applikation ausschließlich entweder die schnelle oder aber die langsame Relaxation beeinflusste, konnte das "Zwei-Membranen Modell" bestätigt werden. Es ist daher gerechtfertigt, die schnelle exponentielle Relaxation von *V. utricularis* und *V. ventricosa* den elektrischen Eigenschaften des Plasmalemmas zuzuordnen, während der Ursprung der langsamen Relaxation in den RC-Eigenschaften des Tonoplasten zu suchen ist.

Die Tatsache, dass eine dritte, intermediäre Relaxation niemals nach vakuolärer, sondern nur nach externer Zugabe der Antibiotika zu beobachten war, spricht für eine Lokalisierung im Tonoplast. Möglicherweise resultierten diese Relaxationen aus noch unbekanntem leitenden Elementen (wie beispielsweise mobile Ladungen eines elektrogenen Systems) oder aber aus Kabeleigenschaften des offensichtlich schwammartig-gefalteten Tonoplasten (siehe dazu weiter unten).

5.3 Die Tonoplastenoberfläche ist durch Faltung stark vergrößert; der flächenspezifische Widerstand des Tonoplasten ist hoch

Die Berechnung der elektrischen Eigenschaften der beiden Membransysteme nach den Gleichungen 2 und 3 setzt voraus, dass die Fläche des Plasmalemmas mit der geometrischen Oberfläche der Alge gleichgesetzt wird. Diese Annahme erscheint vernünftig, da an dieser Membran der hydrostatische Druckgradient anliegen muss, der so die Zellwand zu stabilisieren vermag [Hastings & Gutknecht, 1974; Wendler & Zimmermann, 1978].

Die flächenspezifischen Kapazitäten und Leitfähigkeiten beider Membranen errechneten sich für *V. utricularis* und *V. ventricosa* zu folgenden Mittelwerten (jeweils $n = 10$, vgl. Tabelle 7 und Tabelle 8 im Appendix):

	$C_p / 10^{-2} \text{Fm}^{-2}$	$G_p / 10^{-4} \text{mSm}^{-2}$	$C_t / 10^{-2} \text{Fm}^{-2}$	$G_t / 10^{-4} \text{mSm}^{-2}$
<i>V. utricularis</i>	0.77	5.3	6.2	2.8
<i>V. ventricosa</i>	0.82	5.9	7.1	0.67

Es fällt auf, dass die Werte für die flächenspezifische Kapazität C_t des Tonoplasten nicht mit aus der Literatur bekannten Werte für die Kapazität biologischer Membranen mit glatter Oberfläche von etwa 0.5 bis $1.3 \times 10^{-2} \text{Fm}^{-2}$ [Arnold & Zimmermann, 1988; Cole, 1968; Fuhr, Zimmermann, & Shirley, 1996; Hille, 1992; Pauly, 1962; Pethig, 1979; Walker, 1976] übereinstimmen. Während die ermittelten flächenspezifischen Plasmalemmakapazitäten C_p gut in Einklang mit den Literaturwerten zu bringen waren, waren die Werte für die flächenspezifischen Tonoplastenkapazitäten offensichtlich um ca. einen Faktor 9 zu groß.

Einerseits könnte dieser Anstieg der Tonoplastenkapazität mit einer (stark) erhöhten Konzentration von mobilen Ladungen innerhalb des Tonoplasten erklärt werden. Andererseits lässt sich eine Erhöhung der flächenspezifischen

Kapazität auch durch eine vergrößerte Oberfläche dieser Membran erreichen. Dazu müsste angenommen werden, dass die Oberfläche des Tonoplasten nicht planar anliegt, sondern mehrfach gefaltet ist und somit eine schwammartige Struktur mit vielen Einstülpungen aufweist. Nach Gleichung 4 müsste eine um etwa das neunfache größere Tonoplastenoberfläche (im Vergleich zur Zelloberfläche) angenommen werden, um die Daten zu erklären. Eine derartige Oberflächenvergrößerung, die dann zu einer Kapazitätserhöhung führt, ist in der Literatur für das Plasmalemma mehrfach beschrieben worden [Arnold & Zimmermann, 1988; Clausen & Dixon, 1986; Fuhr, Zimmermann, & Shirley, 1996; Kanno & Loewenstein, 1963; Kottra & Fromter, 1984]. Daher erscheint eine Vergrößerung des Tonoplasten zunächst nicht unwahrscheinlich, da auf diese Art auch ein Stoffaustausch zwischen der Vakuole und dem Zytoplasma erleichtert wird.

Erste Hinweise für einen solchen schwammartigen Aufbau der Vakuole wurden am Beispiel von *V. ventricosa* präsentiert [Shihira-Ishikawa & Nawata, 1992]. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser Autoren zeigten vakuoläre Einstülpungen. Allerdings kann man das Auftreten von Artefakten nicht mit letzter Sicherheit ausschließen, da es während der Fixierung zu einem Druckverlust gekommen sein könnte. Ein damit verbundenes Schrumpfen der großen Zentralvakuole könnte dann zu einer Einfaltung des Tonoplasten führen.

Eigene elektronenmikroskopische Untersuchungen an *V. utricularis* konnten die Hypothese einer mehrfach gefalteten Vakuolenmembran jedoch untermauern. Dabei wurde während des gesamten Fixierungsprozesses der Turgor der Alge mit Hilfe der Mikroperfusionsanlage erhalten, um eine artifizielle Ablösung des Plasmalemmas von der Zellwand zu verhindern, und eine damit verbundene Faltung des Tonoplasten auszuschließen. In Abbildung 27 ist eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Membranbereichs von *V. utricularis* sowie eine verdeutlichende Schemazeichnung zu sehen.

Man erkennt, dass der Tonoplast die Chloroplasten, Mitochondrien und Zellkerne umschließt, was in einer starken Flächenzunahme dieser Membran resultiert. Zum jetzigen Zeitpunkt konnten wir allerdings noch nicht feststellen, ob diese Faltung die hohen flächenspezifischen Kapazitäten des Tonoplasten

vollständig erklärt, oder ob zusätzliche mobile Ladungen eines elektrogenen Carriersystems in Betracht gezogen werden müssen.

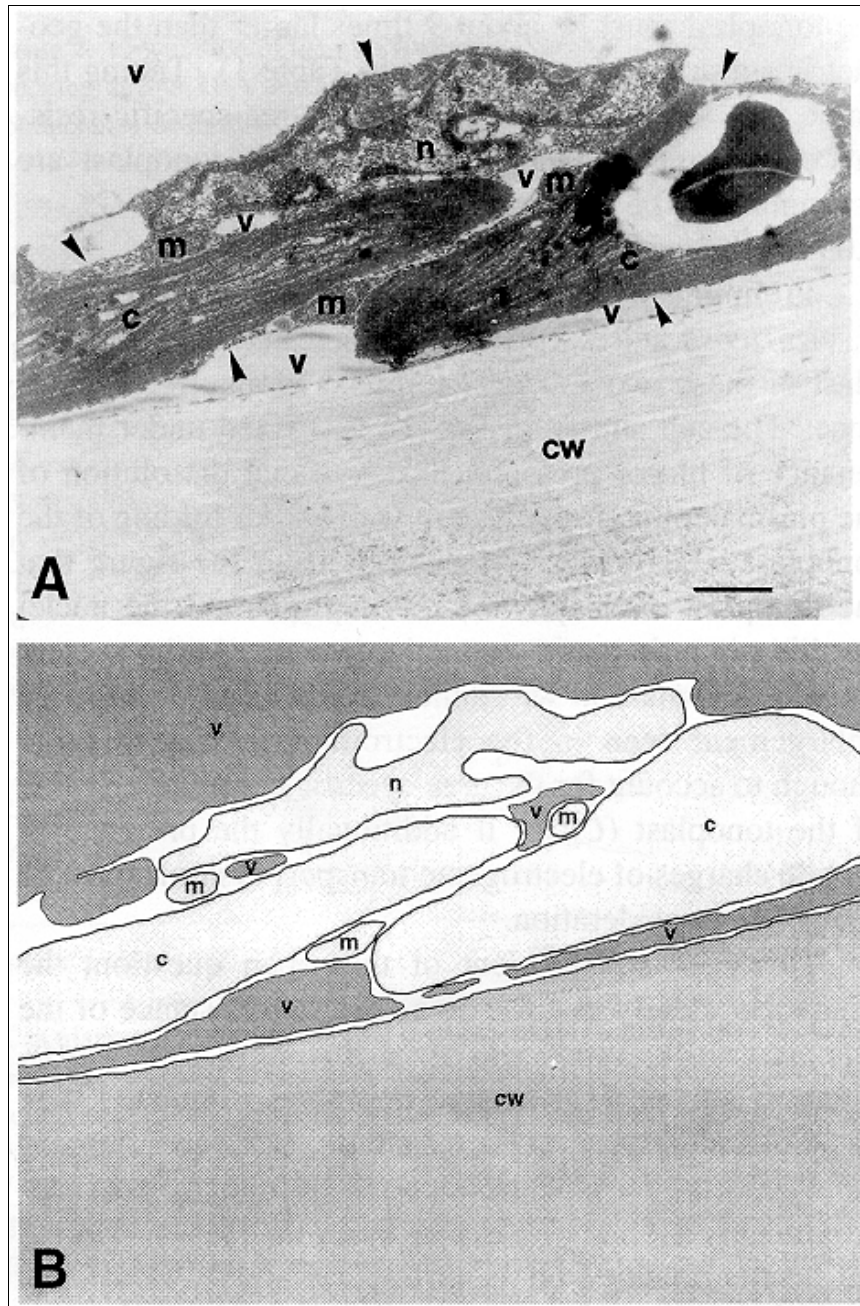


Abbildung 27: (A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *V. utricularis*. Die Alge wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur in ASW fixiert, das 2% Glutardialdehyd, 35 mM Cacodylat und 1% Tannin enthielt. Die Osmolalität der Fixierungslösung wurde dabei der des Kulturmediums angepasst.

Lichtmikroskopische Untersuchungen während der Fixierung, sowie Ladungspulseexperimente und Turgormessungen konnten zeigen, dass die Turgeszenz der Zelle während des Prozesses erhalten blieb. Daraufhin wurden die Zellen mit ASW plus 35 mM Cacodylat (Osmolalität wie oben) gewaschen und bei 4°C nachfixiert. Dazu wurde die Alge für eine Stunde in einer ASW/Cacodylat-Lösung inkubiert, der 1% OsO₄ zugegeben wurde. Mittels eines Gradientenmischers (Model 380, Instrumentation Specialties, CO, USA) wurden die fixierten Algen dann mit Ethanol kontinuierlich entwässert (16 ml/h für 24 h). Die Proben wurden in niedrigviskosem Epoxidharz [Spurr, 1969] eingebettet und nach Polymerisation mittels eines Microtoms (MT-700, Ultra, Tuscon, AZ, USA) in 60 bis 90 nm dicke Sektionen geschnitten, die im Transmissionselektronenmikroskop (EM 900, Zeiss, Oberkochen) betrachtet werden konnten. Man erkennt, dass Zellkern (*n*), Mitochondrien (*m*) und Chloroplasten (*c*) von einer Zytoplasmaschicht (weiße Fläche) umgeben sind. Die Vakuole (*v*) wird vom Tonoplast begrenzt (schwarze Pfeile). Die Zellwand (*cw*) ist im unteren Bereich zu erkennen. Skalierungsbalken: 1.1 µm. (B) Schematische Zeichnung von Abbildung 27A.

Wenn wir jedoch annehmen, dass die offensichtliche Erhöhung der flächenspezifischen Tonoplastenkapazität C_t nur auf der Membranfaltung des Tonoplasten beruht (das heißt, dass der reelle Wert für die flächenspezifische Kapazität des Tonoplasten C_{tr} eine ähnliche Größenordnung wie der des Plasmalemmas C_p hat) errechnen sich die flächenspezifischen Widerstände R_{tr} bzw. Leitfähigkeiten G_{tr} und die reelle Tonoplastenoberfläche A_{tr} von *V. utricularis* und *V. ventricosa* zu folgenden Mittelwerten:

	$R_{tr} / 10^{-2} \Omega m^2$	$G_{tr} / 10^{-4} mSm^{-2}$	A_{tr} / mm^2
<i>V. utricularis</i>	26.6	0.38	493
<i>V. ventricosa</i>	110	0.091	3628

Unabhängig von der endgültigen Klärung des Ursprungs der hohen flächenspezifischen Tonoplastenkapazität C_t zeigen diese Daten jedoch

deutlich, dass der flächenspezifische Widerstand des Tonoplasten von *V. utricularis* und im speziellen der von *V. ventricosa* ähnliche Werte erreicht wie in höheren Pflanzen. Die hier für R_{tr} berechneten Werte liegen nahe an den Widerständen, die an isolierten Vakuolen höherer Pflanzen (etwa $1 \Omega m^2$) gemessen wurden [Weiser & Bentrup, 1994].

Es erscheint daher nach Zusammenfassung dieser Daten von *V. utricularis* und *V. ventricosa* deutlich, dass der Tonoplast mariner Algen offensichtlich nicht so hochleitend ist, wie in der Vergangenheit von einigen Autoren bei Mikroelektrodenexperimenten generell angenommen wurde [Beilby, 1989a]. Er muss vielmehr einen höheren flächenspezifischen Widerstand als das Plasmalemma aufweisen, was im Widerspruch zur gängigen Lehrmeinung steht, wonach der Tonoplast mariner Riesenalgen leitender als das Plasmalemma sei [Beilby, 1989a; Coster & Smith, 1977; Findlay & Hope, 1976; Lainson & Field, 1976; Smith, 1983; Spanswick, 1972; Spanswick & Costerton, 1967; Wang et al., 1991]. Eine Neu-Interpretation der so erhaltenen Daten vor dem Hintergrund des hohen flächenspezifischen Tonoplastenwiderstandes scheint daher unumgänglich.

5.4 Die Faltung des Tonoplasten könnte eine Rolle bei dem für die Turgorregulation benötigten Turgorsensor spielen

Die Flächenvergrößerung der Tonoplastenoberfläche durch tubuläre Ausstülpung erscheint zunächst physikalisch plausibel. Bei einer sphärischen, von einer planaren Membran umgebenen Zelle nimmt das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen mit zunehmendem Volumen ab, so dass der auf die Einheitsfläche bezogene reduzierte Stoff und Wasserfluss durch die Faltung kompensiert werden kann. Die Fähigkeit, Wasser und Ionen möglichst schnell auszutauschen, ist unter anderem die Voraussetzung für osmoregulatorische Prozesse.

Sollte die Funktion der vergrößerten Tonoplastenoberfläche jedoch ausschließlich darin bestehen, den Stoffaustausch zwischen der Vakuole und dem Zytosol zu erleichtern, stellt sich die Frage, weshalb das Plasmalemma (für das bezüglich eines Stoffaustausches zwischen Zytoplasma und dem Meerwasser die gleichen Überlegungen gelten sollten) keine in das Zytosol hineinreichenden fingerartigen Ausstülpungen aufweist. Die Flächenvergrößerung des Tonoplasten muss daher noch weitere Gründe haben.

Eine Hypothese ist, dass man in den tubulären Ausstülpungen des Tonoplasten den von vielen Arbeitsgruppen seit langem gesuchten Turgorsensor finden kann. Bereits ohne über die Morphologie der Algen genauere Daten zu haben, wurde in der Vergangenheit die Möglichkeit der Lokalisation dieses Sensors in der vakuolären Membran postuliert [Coster & Zimmermann, 1976]. Es wird vermutet, dass eine osmotisch bedingte Turgoränderung zunächst eine Formveränderung der Tonoplastenausstülpungen verursacht, die dann ihrerseits auf druck- und spannungsabhängige Transportproteine wirken. Technisch gesehen könnte man diese Ausstülpungen mit einer Membran vergleichen, die druck- und spannungsabhängige Widerstände enthält (wie sie beispielsweise für den Druckwandler einer Druckmesssonde benutzt wird).

Denkbar ist auch, dass es durch druckinduzierte Dehnung der Membran zu einem Kontakt zwischen dem Tonoplasten und dem Plasmalemma oder den Zellorganellen kommt, so dass über dadurch induzierte elektrische Feldeffekte gleichzeitig im Tonoplasten wie im Plasmalemma (und den Organellen) Signale für die Turgorregulation ausgelöst werden.

Von tierischen Zellen ist bekannt [Zimmermann & Neil, 1996], dass sie auf osmotischen Stress mit einer sehr schnellen Flächenveränderung durch Einbau bzw. Abbau von intrazellulärem membranösem Material reagieren. Diese Flächenveränderungen führen zu deutlichen Änderungen in der spezifischen Membrankapazität und in der Membranpermeabilität für Ionen. Das gesamte Zytoplasma von *V. utricularis* oder *V. ventricosa* weist eine Dicke von nur ca. 7 – 10 µm auf, und die Tonoplastenausstülpungen sind aufgrund der bisherigen

elektronenmikroskopischen Untersuchungen weniger als 1 μm vom Plasmalemma getrennt. Eine relativ geringe Flächenänderung würde daher für den geschilderten Effekt genügen.

5.5 Die physiologischen Unterschiede zwischen *V. utricularis* und *V. ventricosa* bestätigen die taxonomische Trennung der Gattungen

Sowohl bei *V. utricularis* als auch bei *V. ventricosa* traten nach Applikation eines Ladungspulses typische biphasische Relaxationsspektren auf, die nach dem sog. "Zwei-Membranen Modell" interpretiert werden konnten. Man hatte also somit eine leistungsfähige Technik zur Verfügung, um die Merkmale in der Physiologie beider Spezies miteinander vergleichen zu können. In Übereinstimmung mit dem "Zwei-Membranen Modell" konnte bei beiden Spezies festgestellt werden, dass Änderungen in der externen Kalium- oder Chloridkonzentration, sowie externe Zugabe von Ionenkanalinhibitoren ausschließlich Auswirkungen auf die schnelle (dem Plasmalemma zugeordnete) Relaxation zeigten. Sowohl die langsame, als auch die in manchen Fällen auftretende intermediäre Relaxation, blieben bei derartigen Änderungen unbeeinflusst.

Allerdings zeigte sich, dass Kalium bei *V. ventricosa* das die Plasmalemmaleitfähigkeit beherrschende Ion ist, während diese bei *V. utricularis* und *H. parvula* hauptsächlich von Chlorid dominiert wird [Graves & Gutknecht, 1977b; Graves & Gutknecht, 1977a; Spieß et al., 1993; Wang et al., 1991]. So konnte man bei *Ventricaria* nach Senkung der Kalium-Konzentration im Außenmedium, aber auch bei externer Applikation von K^+ -Kanal Inhibitoren wie TEA oder Barium, eine deutliche Verminderung der Plasmalemmaleitfähigkeit um bis zu 80 % beobachten. Dagegen war Chlorid in nur geringem Umfang an der Ausbildung der Plasmalemmaleitfähigkeit beteiligt. Erhöhte der Entzug von Chlorid oder dessen Substitution durch MES^- im Badmedium bei *Valonia* und

Halicystis die Zeitkonstante der schnellen Relaxation um etwa das zehnfache, so konnte bei *Ventricaria* lediglich eine Verdopplung von τ_1 verzeichnet werden.

Weiterhin resultierte die Addition des Anionenkanalblockers DIDS bei *Ventricaria* in einer Abnahme der Leitfähigkeit des Plasmalemmas um nur 16% (bei kultivierten Algen) bis zu 47 % (im Falle von frisch gesammelten Zellen). Die maximale Hemmung I_{\max} wurde für diese Spezies zu 13 bis 35 % bestimmt. Im Unterschied dazu resultierten analoge Untersuchungen an *Valonia* in einer maximalen Inhibition von mehr als 80 % [Spieß et al., 1993].

Ein unterschiedliches Bild zwischen *V. utricularis* bzw. *H. parvula* und *V. ventricosa* zeigte sich auch in der Reaktion auf Veränderungen des pH-Wertes im Badmedium. Absenkung des externen pH von 8.1 auf 4.0 hatte bei den ersten beiden Spezies dramatische Auswirkungen auf die Zeitkonstanten der schnellen und langsamen Relaxation [Benz, Büchner, & Zimmermann, 1988; Wang, Benz, & Zimmermann, 1995; Zimmermann, Büchner, & Benz, 1982]. Hier konnte eine Zunahme von τ_1 und τ_2 um das fünf- bis zehnfache beobachtet werden. Im Gegensatz dazu blieb das Absenken des pH-Wertes bei *Ventricaria* ohne signifikante Auswirkungen auf das Relaxationsspektrum dieser Alge.

Die hier vorgestellten Unterschiede in den elektrophysiologischen Parametern bei *V. ventricosa* und *V. utricularis* bestärken daher neben den schon erwähnten Unterschieden im Teilungsmechanismus die 1988 vorgenommene Neu-Klassifizierung und taxonomische Trennung dieser beiden Spezies [Olsen & West, 1988].

5.6 Der Einfluss der Hauptionen im Außenmedium auf die Plasmalemmaleitfähigkeit von *V. ventricosa* zeigt individuelle Variationen

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Substitutions- und Inhibierungsexperimente konnten zeigen, dass die Plasmalemmaleitfähigkeit von *Ventricaria* hauptsächlich von der externen Kaliumkonzentration dominiert

wird. Jedoch kann ein gewisser Einfluss der übrigen Ionen – vor allem des Chlorids – nicht außer Acht gelassen werden. Insbesondere die Experimente mit den Ionenkanalblockern TEA, Barium und DIDS machten deutlich, dass die Antwort der Leitfähigkeit des Plasmalemmas auf diese Agenzien von Zelle zu Zelle – zum Teil auch in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer oder der Größe bzw. dem Alter der Algen – einer großen Variabilität unterworfen war.

Individuelle physiologische Unterschiede fielen dabei besonders bei Konfrontation der Zelle mit den Ionenkanalblockern TEA und DIDS auf. Hier ließen sich deutliche Unterschiede in der Antwort der Plasmalemmaleitfähigkeit zwischen den älteren, längere Zeit in Kultur gehaltenen und den frisch gesammelten Exemplaren von *Ventricaria* zeigen. Insbesondere I_{\max} war großen Schwankungen unterworfen. Untersuchte man dagegen an ein und derselben Alge die inhibierende Wirkung von TEA und DIDS nacheinander, so konnte man erkennen, dass der Beitrag der Kalium- bzw. Chloridkanäle zur Plasmalemmaleitfähigkeit zwar individuell unterschiedlich ausgeprägt war, sich diese Kanäle in der Summe jedoch stets zu etwa 90 % blockieren ließen.

Auch aufgrund der nicht unerheblichen Standardabweichungen bei den Experimenten, ist es innerhalb dieser Studie jedoch nicht gelungen, einen klaren Zusammenhang zwischen dem Alter, der Größe oder der Kultivierungsdauer und der Physiologie von *V. ventricosa* herzustellen, wie man ihn für andere Zellwand- und Zellmembranparameter an mariner Riesenalgen gefunden hat [Steudle, Zimmermann, & Lelkes, 1977; Zimmermann, 1978; Zimmermann & Steudle, 1974; Zimmermann & Steudle, 1978].

5.7 Das Zytoplasma von *V. ventricosa* ist negativ geladen

Interessante Erkenntnisse in Bezug auf die elektrischen Eigenschaften des Zytoplasmas konnten mit Hilfe der Experimente mit dem porenbildenden Antibiotikum Nystatin erarbeitet werden. Dabei betrachtete man die Änderung

der Potentialdifferenz, die nach Addition des Antibiotikums von der externen sowie der vakuolären Seite aufgezeichnet wurden.

Bei Permeabilisierung des Plasmalemmas durch Applikation des Antibiotikums über das Badmedium wurden in Einzelfällen Werte bis zu -68 mV gemessen. Die Änderungen der Potentialdifferenz waren dabei von Zelle zu Zelle einer großen Variabilität unterworfen, vermutlich weil es zu unterschiedlich ausgeprägtem Austausch von Ionen zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten durch den permeabilisierten Tonoplast bzw. das Zytoplasma kam.

Trotzdem ließen sich durch die Entwicklung des Potentials, die unmittelbar nach Applikation des Nystatins zu beobachten war, die Arbeiten und Hypothesen von Davis [Davis, 1981] und Gutknecht [Gutknecht, 1966; Gutknecht, 1967] bestätigen, die ebenfalls von einem relativ zum externen Medium negativ geladenen Zytoplasma sprachen. Dabei gelang es Davis, V_{vc} und V_{co} direkt in erwachsenen Zellen von *Ventricaria* zu messen, indem er auf geschickte Art und Weise die Elektroden Spitze durch die Vakuole in das gegenüberliegende Zytoplasma bewegte und dort platzierte. Gutknecht dagegen benutzte junge *Ventricaria*-Aplanosporen, die fast vollständig aus Zytoplasma bestehen, und subtrahierte das an ihnen gemessene V_{co} von dem an erwachsenen Algen ermittelten V_{vo} . Beide Autoren erarbeiteten, dass die Zytoplasmaschicht ein stark negatives Potential von etwa -70 mV relativ zum Außenmedium aufweist. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Arbeiten von Lainson und Field, die ein ungeladenes Zytoplasma propagieren [Lainson & Field, 1976].

In diesem Zusammenhang sollte jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass über einen möglichen Beitrag der Zellwand zum Aufbau der Potentialdifferenz noch keine Daten vorliegen, ein gewisser Einfluss der Zellwand jedoch vermutet werden kann [Hope & Walker, 1961].

5.8 Ausblick

Ein detaillierterer Einblick in die morphologischen und physiologischen Parameter mariner Riesenalgen würde helfen, hier aufgestellte Hypothesen und Modelle zu überprüfen.

Von großem Interesse sind dabei weitere strukturelle Untersuchungen zur Faltung des Tonoplasten im Zusammenhang mit der Osmoregulation der Alge. In der Vergangenheit erwies sich das große Volumen der Algen als hinderlich bei der Fixierung der Zelle; es verhinderte so auch eine Schockgefrierung der Algen (wie sie für die sog. Gefrierbruchätzung notwendig wäre). In der Konsequenz konnte die trilaminare Membranstruktur des Tonoplasten noch nicht scharf dargestellt werden.

Vor diesem Hintergrund wäre es sicherlich vorteilhaft, das Einbettungsmedium "Spurr", das zu unscharfen Abbildungen der Membranen führen kann [Nagl, 1981], durch geeignetere Substanzen zu ersetzen. Problematisch dabei ist, dass das beispielsweise besser geeignete Einbettungsmedium "Epon" nicht in die Zelle eindringen kann. Daher wird daran gedacht, die Alge nach der Entwässerung zu zerschneiden und somit das "Epon" an alle Membranstrukturen gelangen zu lassen.

Weiterhin ließe sich die Kontrastierung der Strukturen gewiss dadurch verbessern, dass die notwendigen Agenzien nicht nur über das Badmedium, sondern auch mit Hilfe der Mikroperfusionsapparatur direkt von innen an den Tonoplasten gebracht werden können. Der Zusatz von Goldpartikeln zum Perfusat, die an den Tonoplasten adhären, würde die tubulären Ausstülpungen der Vakuolenmembran zusätzlich kontrastieren.

Der Vergleich der beispielweise mittels dreidimensionaler Bilder vermessenen geometrischen Fläche des Tonoplasten mit den aus elektrischen Messungen erhaltenen Daten könnte dann Aufschluss darüber geben, ob die extrem hohe spezifische Kapazität des Tonoplasten ausschließlich auf die Flächenvergrößerung zurückgeht, oder ob mobile Ladungen eines elektrogenen Transportsystems mit involviert sind.

Der Einsatz von Nystatin und Ionenkanalblockern unter nicht-stationären Turgorbedingungen hätte zum Ziel, den Einfluss der Ionentransportprozesse auf die Turgorregulation mariner Algen zu verstehen. Dabei ist zur Lokalisierung eines Turgorsensors von besonderem Interesse, ob diese Regulationsprozesse vom Tonoplasten oder vom Plasmalemma (oder gleichzeitig von beiden Membranen) ausgehen. Erste Experimente auf diesem Gebiet [Heidecker, Ryser, Wegner, Zimmermann, unveröffentlichte Daten] ergaben eine deutliche Reaktion der Tonoplastenleitfähigkeit während der Turgorregulation. Dies bestärkt die Vermutung, den Turgorsensor im Tonoplast zu suchen. Zusätzlich zur Ladungspulsmethode würde dabei ein Einsatz der sog. "Voltage-Clamp" Methode weitere Informationen über die Spannungsabhängigkeit der Membranparameter liefern.

Eine exakte Charakterisierung der an der Turgorregulation beteiligten Proteine sollte darüber hinaus auf molekularer Ebene erfolgen. Ein wichtiger Schritt hierzu ist das Anlegen einer cDNA-Bank bzw. einer genomischen Bibliothek für *V. utricularis* und *V. ventricosa*.

In der Vergangenheit scheiterten solche Versuche an der erheblichen Kontamination der Algen durch Fremdorganismen wie Bakterien oder Diatomeen, so dass die Herkunft der isolierten mRNA nicht eindeutig geklärt werden konnte. Dieses Problem ist inzwischen durch die Anzucht axenischer Kulturen aus regenerierten *Valonia*-Protoplasten gelöst worden. Über diese axenischen Kulturen kann absolut reines Material bereitgestellt werden, wenn auch zur Zeit nur in kleinen Mengen. Allerdings dürfte sich in diesem Zusammenhang positiv auf die mRNA- bzw. DNA-Ausbeute pro Zelle auswirken, dass *Valonia* ein vielkerniger Organismus ist.

Eine cDNA-Bibliothek von *V. utricularis* kann dann nach Sequenzen durchsucht werden, die eine Homologie mit bekannten Sequenzen pflanzlicher Membrantransportproteine aufweisen. Beispielsweise zeigt der in "Patch-Clamp" Untersuchungen an *Valonia*-Protoplasten beobachtete Anionenkanal VAC1 [Heidecker, Wegner, & Zimmermann, 1999] hinsichtlich der Spannungsabhängigkeit und der Leitfähigkeit des Schaltverhaltens Übereinstimmungen mit

Chlorid-Kanälen des CLC-Typs, die in tierischen Zellen weit verbreitet sind [Jentsch et al., 1999]. Eine Suche nach Kanälen dieses Typs erscheint daher sinnvoll.

6 Zusammenfassung

Die kombinierte Mikroperfusions-/Ladungspulstechnik an einzelligen marinen Riesenalgen ermöglicht die getrennte Darstellung der elektrischen Eigenschaften von Plasmalemma und Tonoplast durch gezielte Manipulation des vakuolären und externen Mediums. Dabei kann der für die Physiologie der Zellen wichtige hydrostatische Innendruck (Turgor) ständig kontrolliert werden.

Die Applikation eines Ladungspulses resultierte bei *Valonia utricularis* und *Ventricaria ventricosa* in einer biphasischen Relaxation des Gesamtmembranpotentials, die durch die Summe zweier Exponentialfunktionen beschrieben werden konnte. Die Zeitkonstanten dieser beiden Relaxationen lagen dabei im Bereich von 0.1 ms und 1 ms (*V. utricularis*), bzw. 0.1 ms und 10 ms (*V. ventricosa*). Addition von Nystatin (einem membranimpermeablen und porenbildenden Antibiotikum) zu der vakuolären Perfusionslösung führte bei beiden Spezies zu einem Verschwinden der langsamen Relaxation des Spektrums, während über das Badmedium (extern) dotiertes Nystatin die Zeitkonstante der schnellen Komponente dramatisch verringerte. Die jeweils andere Relaxation blieb dabei unbeeinflusst. Folglich muss die schnelle Relaxation den RC-Eigenschaften des Plasmalemmas und die langsame den Eigenschaften des Tonoplasten zugeordnet werden. Dies ist ein klarer Beweis für das sog. "Zwei-Membranen Modell". In Übereinstimmung damit beeinflussten externe Ionentauschexperimente sowie externe Zugabe von Kanal/Carrier-Inhibitoren wie TEA (Tetraethylammonium), Ba^{2+} und DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure), nur die schnelle Relaxation des Ladungspulsspektrums, nicht aber die langsame. Dagegen hatte die Zugabe dieser Inhibitoren zu der vakuolären Perfusionslösung keinen signifikanten Einfluss auf das Relaxationspektrum der marinen Algen.

Bei der Berechnung der passiven Membranparameter fiel eine ungewöhnlich hohe flächenspezifische Kapazität des Tonoplasten auf, die nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit einer etwa 9-fachen Oberflächenvergrößerung erklärt werden konnte. Diese resultierte aus

tubulären Ausstülpungen des Tonoplasten, die in das Zytosol hineinreichen. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass - entgegen der Lehrmeinung - der Widerstand des Tonoplasten mariner Algen hoch ist (0.3 bis 1.1 Ωm^2) und somit Werte aufweist, die mit Messungen an Vakuolen höherer Pflanzen vergleichbar sind. Darüber hinaus ergaben Nystatin-Experimente, dass das Zytoplasma von *V. ventricosa* stark negativ geladen ist (bis zu -70 mV).

Neben vielen Gemeinsamkeiten existieren auch klare Unterschiede in der Physiologie dieser Algen. Während bei *V. ventricosa* die Plasmalemma-leitfähigkeit durch Kalium dominiert wurde, war das Plasmalemma von *V. utricularis* deutlich permeabler für Chlorid als für Kalium. Variation des externen pH-Wertes wirkte sich nur bei *V. utricularis*, nicht aber bei *V. ventricosa*, im Relaxationsspektrum in einer drastischen Erhöhung der schnellen Zeitkonstante aus.

Für die Analyse turgorgesteuerter Membrantransportprozesse an marinen Algen bedeuten diese Arbeiten einen methodischen Durchbruch, so dass die vollständige Aufklärung der biophysikalischen Prozesse, die mit der Turgorregulation assoziiert werden, unmittelbar bevorsteht.

7 Summary

The integrated perfusion/charge-pulse technique allows the separated determination of the electrical properties of the tonoplast and the plasmalemma of giant-celled marine algae with exact manipulation of the vacuolar and external solution. The hydrostatic pressure in the cells (the so-called turgor-pressure), which is one of the most important parameters for the physiology of the cell, can easily be regulated during the experiments.

The charge-pulse relaxation spectrum of *Valonia utricularis* and *Ventricaria ventricosa* showed a biphasic shape that could be described by the sum of two exponential decays. The time constants of the two relaxations were calculated to be around 0.1 ms and 1 ms (*V. utricularis*), and 0.1 ms and 10 ms (*V. ventricosa*), respectively. Addition of nystatin (a membrane-impermeable and pore-forming antibiotic) to the vacuolar perfusion-solution of both species resulted in the disappearance of the slow exponential of the spectrum, whereas the presence of nystatin in the bath decreased dramatically the time constant of the fast component. The other relaxation remained unaffected. Consequently, the fast relaxation process must be assigned to the RC-properties of the plasmalemma and the slow one to those of the tonoplast. This is a clear proof for the so-called "two-membrane model". Consistent with this, external variation of the major ions as well as external addition of channel/carrier inhibitors like TEA (tetraethylammonium), Ba^{2+} and DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) affected only the fast relaxation, but not the slow one. In contrast, addition of these blockers to the vacuolar perfusion solution showed no measurable effect on the charge-pulse relaxation spectrum of the marine algae.

Calculating the individual passive electrical parameters of the membranes, an unusually high area-specific capacitance of the tonoplast was detected. According to electronmicroscopic studies this could be explained by a approximately 9-fold enlargement of the tonoplast surface showing tubular "fingers" invading the cytoplasm. Above that it could be demonstrated that the area-specific resistance of the tonoplast of *V. utricularis* and *V. ventricosa* is

high (0.3 to 1.1 Ωm^2) and thus comparable with data observed on vacuoles of higher plants. Furthermore, the nystatin-studies indicated that the cytoplasm is negatively charged (up to -70 mV).

Although they have a lot in common, the two species exhibit some clear differences in their physiology. With *V. ventricosa*, the conductance of the plasmalemma was dominated by K^+ , whereas the plasmalemma of *V. utricularis* was more permeable to Cl^- than to K^+ . Variation of the external pH had a significant effect on the charge-pulse relaxation spectrum only of *V. utricularis* but not of *V. ventricosa*.

The presented studies can be seen as a technical breakthrough in the analysis of turgor-regulated transport processes of marine algae. A complete elucidation of the biophysical properties which contribute to the turgorregulation can now be achieved.

8 Appendix

In den folgenden Tabelle 7 und Tabelle 8 sind für jeweils 10 verschiedene Algen von *V. utricularis* und *V. ventricosa* die aus Ladungspulsmessungen erhaltenen elektrischen Membranparameter dargestellt.

Die Ladungspulsmessungen (ASW im Badmedium) wurden bei *V. utricularis* (Tabelle 7) an unperfundierten (Zellen 1 bis 5) und perfundierten Algen durchgeführt (Zellen 6 bis 10; Perfusion mit AVS, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$). Für *V. ventricosa* sind nur unperfundierte Algen dargestellt (Tabelle 8). Zur Auswertung der Daten wurde an die Ladungspulsspektren die Summe zweier Exponentialfunktionen angepasst (Gleichung 1). Aus diesem sog. "least-square-fit" konnten so die Zeitkonstanten und Anfangsamplituden der schnellen (τ_1 und V_1) und langsamen Relaxation (τ_2 und V_2) bestimmt werden. A_Z bezeichnet die Oberfläche der Alge, V_Z das Volumen, P_0 den Turgordruck, V_{vo} das vakuoläre Ruhepotential und Q die injizierte Ladungsmenge. Die flächenspezifischen Kapazitäten, Widerstände und Leitfähigkeiten von Plasmalemma (C_p , R_p und G_p) und Tonoplast (C_t , R_t und G_t) wurden unter der Annahme $A_p = A_t = A_Z$ nach den Gleichungen 2 und 3 berechnet. Der tatsächliche flächenspezifische Widerstand des Tonoplasten (R_{tr}) und dessen reale Fläche (A_{tr}) errechneten sich unter der Annahme $C_p \approx C_{tr}$ nach den Gleichungen 4 und 5. Weitere Details finden sich im Text.

Tabelle 7: Elektrische Eigenschaften des Plasmalemmas und des Tonoplasten unperfundierter (Zellen 1 bis 5) und perfundierter (Zellen 6-10) Zellen von *V. utricularis*.

Tabelle 8: Elektrische Eigenschaften des Plasmalemmas und des Tonoplasten unperfundierter Zellen von *V. ventricosa*.

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Differentialverstärker
ACS	Artificial Cytoplasmic Sap; künstliches Zytoplasma-analoges Medium
A_p	Plasmalemmaoberfläche
ASW	Artificial Sea Water; künstliches Meerwasser
ASW / -Cl	künstliches Meerwasser, Chlorid-reduziert/frei
ASW / -K	künstliches Meerwasser, Kalium-reduziert/frei
ASW / -Na	künstliches Meerwasser, Natrium-reduziert/frei
A_t	Tonoplastenoberfläche
A_{tr}	reale Tonoplastenoberfläche
AVS	Artificial Vacuolar Sap; künstliches Perfusionsmedium
A_z	Zelloberfläche
C	Algenzelle
C_p	flächenspezifische Kapazität des Plasmalemmas
C_t	flächenspezifische Kapazität des Tonoplasten
C_{tr}	reale Tonoplastenkapazität
D	Diode
D1, 2, 3	Turgordruckanzeigen
DO1, DO2	digitales Speicheroszilloskop
E_{NX}	theoretisches Nernstpotential für das Ion X
G_p	flächenspezifische Leitfähigkeit des Plasmalemmas
G_p^*	flächenspezifische Plasmalemmaleitfähigkeit unter Standardbedingungen
G_t	flächenspezifische Leitfähigkeit des Tonoplasten
G_{tr}	reale Tonoplastenleitfähigkeit
G_t^*	flächenspezifische Tonoplastenleitfähigkeit unter Standardbedingungen
I	inhibierende Wirkung eines Blockers in %
IC50	Konzentration eines Blockers, die zu einer halbmaximalen Hemmung führt
I_{max}	maximale Inhibition eines Blockers in %
MC	Messkammer

NSW	Natural Sea Water; original Mittelmeerwasser
O	Auslass des Badmediums
P	Turgordruck
P1, P2	Einlass-, Auslasspipette
PC, PC1, 2, 3	Druckkammer
PE	Potentialelektrode
PG	Pulsgenerator
PP	Perfusionspumpe
PR	Druckminderer
PT1, 2, 3	Druckwandler
PW	Platindraht; Stromelektrode
Q	Ladungsmenge
R	Widerstand
RE1, RE2	Referenzelektrode der Strom- bzw. Potentialmessung
R_m	Gesamtmembranwiderstand
R_p	flächenspezifischer Widerstand des Plasmalemmas
R_t	flächenspezifischer Widerstand des Tonoplasten
R_{tr}	realer Tonoplastenwiderstand
Rz	Widerstand des Zytoplasmas
S	Einlass Badmedium
SY	Spritze mit Perfusionsmedium
τ_1	Zeitkonstante der schnellen Relaxation
τ_2	Zeitkonstante der langsamen Relaxation
τ_3	Zeitkonstante der intermediären Relaxation
V1, V2	Sperrventile
V_{co}	Plasmalemmapotential
V_m	Relaxation des Gesamtmembranpotentials
V_{vc}	Tonoplastenpotential
V_{vo}	vakuoläres Ruhepotential
V_z	Zellvolumen

10 Literatur

- Armstrong, C. M., Hille, B. 1972. The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. *J. Gen. Physiol* **59**:388-400
- Arnold, W. M., Zimmermann, U. 1988. Electro-Rotation: Development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles. *J. of Electrostatics* **21**:151-191
- Bakker, E. P. 1979. Ionophore antibiotics. *In: Antibiotics, Volume V, Part 1.* Hahn, F.E., editor. pp. 67-97. Springer-Verlag, New York
- Beilby, M. J. 1989. Electrophysiology of giant algal cells. *Methods in Enzymology* **174**:403-443
- Bentrup, F. W., Gogarten-Boekels, M., Hoffmann, B., Gogarten, J. P., Baumann, C. 1986. ATP-dependent acidification and tonoplast hyperpolarisation in isolated vacuoles from green suspension cells of *Chenopodium rubrum* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**:2431-2433
- Bentrup, F. W., Hoffmann, B., Gogarten-Boekels, M., Gogarten, J. P., Baumann, C. 1985. A patch clamp study of tonoplast electrical properties in vacuoles isolated from *Chenopodium rubrum* suspension cells. *Z. Naturforsch.* **40c**:886-890
- Benz, R., Büchner, K. H., Zimmermann, U. 1988. Mobile charges in the cell membrane of *Halicystis parvula*. *Planta* **174**:479-487
- Benz, R., Janko, K. 1976. Voltage induced capacitance relaxation of lipid bilayer membranes. Effect of membrane composition. *Biochim. Biophys. Acta* **455**:721-738

- Benz, R., Zimmermann, U. 1983. Evidence for the presence of mobile charges in the cell membrane of *Valonia utricularis*. *Biophys. J.* **43**:13-26
- Bisson, M. A., Kirst, G. O. 1995. Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in *Acetabularia*. *Naturwissenschaften* **82**:461-471
- Blinks, L. R. 1934. Protoplasmic potentials in *Halicystis*. IV. Vacuolar perfusion with artificial sap and sea-water. *J. Gen. Physiol* **18**:409
- Cabantchik, Z. I., Greger, R. 1992. Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. *Am. J. Physiol* **262**:C803-C827
- Cabantchik, Z. I., Rothstein, A. 1972. The nature of the membrane sites controlling anion permeability of human red blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives. *J. Membrane Biol.* **10**:311-330
- Cass, A., Finkelstein, A., Krespi, V. 1970. The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics Nystatin and Amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* **56**:100-124
- Clausen, C., Dixon, T. E. 1986. Membrane electrical parameters in turtle bladder measured using impedance-analysis techniques. *J. Membrane Biol.* **92**:9-19
- Cole, K. S. 1968. Membranes, ions and impulses. pp. 12-59. University of California Press, Berkeley, California
- Coster, H. G., Smith, J. R. 1977. Low-frequency impedance of *Chara corallina*: Simultaneous measurements of the separate plasmalemma and tonoplast capacitance and conductance. *Aust. J. Plant Physiol.* **4**:667-674
- Coster, H. G., Zimmermann, U. 1976. Transduction of turgor pressure by cell membrane compression. *Z. Naturforsch.* **31**:461-463

- Davis, R. F. 1981. Electrical properties of the plasmalemma and tonoplast in *Ventricaria ventricosa*. *Plant Physiol.* **67**:825-831
- Fagerberg, W. R. 1983. A quantitative study of daily variation in the cellular ultrastructure of palisade chlorenchyma from sunflower *Helianthus annuus* leaves. *Ann. Bot.* **52**:117-126
- Fagerberg, W. R. 1984. Cytological changes in palisade cells of developing sunflower *Helianthus annuus* cultivar mammoth leaves. *Protoplasma* **119**:21-31
- Findlay, G. P., Hope, A. B. 1976. Electrical properties of plant cells: methods and findings. *In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Transport in Plants II.* U. Lüttge and M.G. Pittman, editors. pp. 53-92. Springer-Verlag, New York
- Findlay, G. P., Hope, A. B., Pitman, M. G., Smith, F. A., Walker, N. A. 1971. Ionic relations of marine algae; part 3; *Chaetomorpha darwinii* membrane: electrical properties and chloride fluxes. *Aust. J. Biol. Sci.* **24**:731-745
- Findlay, G. P., Hope, A. B., Pitman, M. G., Smith, F. A., Walker, N. A. 1978. Ionic relations of the marine alga *Valoniopsis pachynema*. *Aust. J. Plant Physiol.* **5**:675-686
- Fott, A. 1956. Algenkunde. Second edition. Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Fuhr, G., Zimmermann, U., Shirley, S. G. 1996. Cell motion in time-varying fields: Principles and potential. *In: Electromanipulation of Cells.* U. Zimmermann and G. A. Neil, editors. pp. 259-328. CRC Press, Boca Raton, Florida

- Graves, J. S., Gutknecht, J. 1977a. Chloride transport and the membrane potential in the marina alga *Halicystis parvula*. *J. Membrane Biol.* **36**:65-81
- Graves, J. S., Gutknecht, J. 1977b. Current-voltage relationships and voltage sensitivity of the Cl-pump in *Halicystis parvula*. *J. Membrane Biol.* **36**:83-91
- Gutknecht, J. 1966. Sodium, potassium and chloride transport and membrane potentials in *Valonia ventricosa*. *Biological Bulletin* **130**:331-334
- Gutknecht, J. 1967. Ion fluxes and short-circuit current in internally perfused cells of *Valonia ventricosa*. *J. Gen. Physiol.* **50**:1821-1834
- Gutknecht, J. 1968. Permeability of *Valonia* to water and solutes: apparent absence of aqueous membrane pores. *Biochim. Biophys. Acta* **163**:20-29
- Hastings, D. F., Gutknecht, J. 1974. Turgor pressure regulation: Modulation of active potassium transport by hydrostatic pressure gradients. In: Membrane Transport in Plants. U. Zimmermann and J. Dainty, editors. pp. 79-83. Springer-Verlag, New York
- Hedrich, R., Kurkdjian, A. 1988. Characterization of an anion-permeable channel from sugar beet vacuoles: effect of inhibitors. *EMBO J.* **7**:3661-3666
- Heidecker, M., Wegner, L. H., Zimmermann, U. 1999. A Patch-Clamp Study of Ion Channels in Protoplasts Prepared from the Marine Alga *Valonia utricularis*. *J. Membrane Biol.* **172**:235-247
- Hille, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. Second edition. Sinauer, Sunderland

- Holz, R., Finkelstein, A. 1970. The water and nonelectrolyte permeability induced by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* **56**:125-145
- Hope, A. B., Walker N. A. 1961. Ionic relations of cells of *Chara australis* R. BR. IV. Membrane potential differences and resistances. *Aust. J. Biol. Sciences* **14**: 26-44
- Hori, T., Enomoto, S. 1978. Electron microscope observation on the nuclear division in *Valonia ventricosa* (*Chlorophyceae, Siphonocladales*). *Phycologia* **17**:133-142
- Jentsch, T. J., Friedrich, T., Schriever, A., Yamada, H. 1999. The CLC chloride channel family. *Pfl. Arch. Eur. J. Phys.* **437**: 783-795
- Kanno, Y., Loewenstein, W. R. 1963. A study of the nucleus and cell membranes of oocytes with an intra-cellular electrode. *Exp. Cell Res.* **31**:149-166
- Keifer, D. W., Franceschi, V. R., Lucas, W. J. 1982. Plasmalemma chloride transport in *Chara corallina*: inhibition by 4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonic acid stilbene. *Plant Physiol.* **70**:1327-1334
- Kleinberg, M. E., Finkelstein, A. 1984. Single-length and double-length channels formed by nystatin in lipid bilayer membranes. *J. Membrane Biol.* **80**:257-269
- Koppenhöfer, E., Vogel, W. 1969. Wirkung von Tetrodotoxin und Tetraäthylammoniumchlorid an der Innenseite der Schnürringmembran von *Xenopus laevis*. *Pflügers Arch.* **313**:361-380
- Kotra, G., Fromter, E. 1984. Rapid determination of intraepithelial resistance barriers by alternating current spectroscopy. II. Test of model circuits and quantification of results. *Pflügers Arch.* **402**:421-432

- La Claire II, J. W. 1982. Cytomorphological aspects of wound healing in selected *Siphonocladales* (*Chlorophyceae*). *J. Phycol.* **18**:379-384
- Lainson, R., Field, C. D. 1976. Electrical properties of *Valonia ventricosa*. *J. Membrane Biol.* **29**:81-94
- Lin, W. 1981. Inhibition of anion transport in corn root protoplasts. *Plant Physiol.* **68**:435-438
- Menzel, D. 1988. How do giant plant cells cope with injury? The wound response in siphonous green algae. *Protoplasma* **144**:73-91
- Nagl, W. 1981. Elektronenmikroskopische Laborpraxis. Springer Verlag, New York
- Nawata, T., Kikuyama, M., Shihira-Ishikawa, I. 1993. Behaviour of protoplasm for survival in injured cells of *Valonia ventricosa*: Involvement of turgor pressure. *Protoplasma* **176**:547-554
- Nicolai, E., Preston, R. D. 1952. Cell wall studies in *Chlorophyceae*. *Proc. Roy. Soc. , sect. B* **140**:244-274
- Olsen, J. L., West, J. A. 1988. *Ventricaria* (*Siphonocladales-Cladophorales* complex, *Chlorophyta*), a new genus for *Valonia ventricosa*. *Phycologia* **27**:103-108
- Opekarova, M., Tanner, W. 1994. Nystatin changes the properties of transporters for arginine and sugars. An *in vitro* study. *FEBS Lett.* **350**:46-50
- Passow, H., Fasold, H., Jennings, M. L., Lepke, S. 1982. The study of the anion transport protein ("band 3 protein") in the red cell membrane by means of tritiated 4,4'-diisothiocyano-dihydrostilbene-2,2'-disulfonic acid ($^3\text{H}_2\text{DIDS}$). *In: Chloridetransport in biological membranes*. Academic Press, London, New York

- Pauly, H. 1962. Electrical properties of the cytoplasmic membrane and the cytoplasm of the bacteria and of protoplasts. *Inst. Electr. -Electron. Eng. Trans. Biomed. Eng.* **BME-9**:93-95
- Pethig, R. 1979. Dielectric and electronic properties of biological materials. pp. 15-243. John Wiley & Sons, New York
- Pickar, A. D., Benz, R. 1978. Transport of oppositely charged lipophilic probe ions in lipid bilayer membranes having various structures. *J. Membrane Biol.* **44**:353-376
- Preston, R. D. 1974. The wounding reaction in species of *Boergesenia* and *Valonia*. *Phycologia* **11**:119-124
- Ray, P. M., Green, P. B., Cleland, R. E. 1972. Role of turgor in plant cell growth. *Nature* **239**:163-164
- Ryser, C., Wang, J., Mimietz, S., Zimmermann, U. 1999. Determination of the individual electrical and transport properties of the plasmalemma and the tonoplast of the giant marine alga *Ventricaria ventricosa* by means of the integrated perfusion/charge-pulse technique: evidence for a multifolded tonoplast. *J. Membrane Biol.* **168**:183-197
- Schussnig, B. 1954. Der Kernphasenwechsel von *Valonia utricularis*. *Planta* **28**:43-59
- Shami, Y., Rothstein, A., Knauf, P. A. 1978. Identification of the Cl⁻ transport site of human red blood cells by a kinetic analysis of the inhibitory effects of a chemical probe. *Biochim. Biophys. Acta* **508**:357-363
- Shihira-Ishikawa, I., Nawata, T. 1992. The structure and physiological properties of the cytoplasm in intact *Valonia* cell. *Jpn. J. Phycol.* **40**:151-159
- Smith, J. R. 1983. The tonoplast impedance of *Chara*. *J. Exp. Botany* **34**:120-129

- Spanswick, R. M. 1972. Electrical coupling between cells of higher plants: A direct demonstration of intercellular communication. *Planta* **102**:215-227
- Spanswick, R. M., Costerton, J. W. F. 1967. Plasmodesmata in *Nitella translucens*: Structure and electrical resistance. *J. Cell Sci.* **2**:451-464
- Spieß, I. 1996. Untersuchungen an perfundierten turgeszenten Algenzellen von *Valonia utricularis*: Elektrophysiologische Messungen zur Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von Plasmalemma und Tonoplasten. Dissertation, Würzburg.
- Spieß, I., Wang, J., Benz, R., Zimmermann, U. 1993. Characterization of the chloride carrier in the plasmalemma of the alga *Valonia utricularis*: the inhibition by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**:93-101
- Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**:31-43
- Steudle, E., Zimmermann, U. 1971. Zellturgor und selektiver Ionentransport bei *Chaetomorpha linum*. *Z. Naturforsch.* **26b**:1276-1282
- Steudle, E., Zimmermann, U., Lelkes, P. I. 1977. Volume and pressure effects on the potassium fluxes of *Valonia utricularis*. In: Transmembrane Ionic Exchanges In Plants. M. Thellier, A. Monnier, M. Demarty and J. Dainty, editors. pp. 123-132. CNRS, Paris
- Strasburger, E., Noll, F. Schenk A., Schimper A. F. W. 1996. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 33. Auflage. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Tazawa, M. 1964. Studies of *Nitella* having artificial cell sap. I. Replacement of the cell sap with artificial solutions. *Plant Cell Physiol.* **5**:161-169

- Tazawa, M., Kikuyama, M., Shimmen, T. 1976. Electrical characteristics and cytoplasmic streaming of *Characeae* cells lacking tonoplast. *Cell Struct. Funct.* **1**:165-176
- Tazawa, M., Shimmen, T., Mimura, T. 1987. Membrane control in the *Characeae*. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* **38**: 95-117
- Tomos, D., Pritchard, J. 1994. Biophysical and biochemical control of cell expansion in roots and leaves. *J. Exp. Botany* **45**:1721-1731
- Van den Hoek, V. 1984. The systematics of the *Cladophorales*. Systematics of the Green Algae **27**:157-178
- Walker, N. A. 1976. Membrane transport: theoretical background. *In*: Encyclopedia of Plant Physiology, New series. Transport in Plants II. U. Lüttge and M. G. Pittman, editors. pp. 36-52. Springer-Verlag, New York
- Wang, J. 1992. Nachweis und Charakterisierung eines Chloridtransportcarriers im Plasmalemma von *Valonia utricularis* mit Hilfe der Ladungspuls-, Voltage-Clamp- und Impedanzmethode und Anioneninhibitoren. Dissertation, Würzburg
- Wang, J., Benz, R., Zimmermann, U. 1995. Effects of light and inhibitors of ATP-synthesis on the chloride carrier of the alga *Valonia utricularis*: is the carrier a chloride pump? *Biochim. Biophys. Acta* **1233**:185-197
- Wang, J., Spieß, I., Ryser, C., Zimmermann, U. 1997a. Separate determination of the electrical properties of the tonoplast and the plasmalemma of the giant-celled alga *Valonia utricularis*: vacuolar perfusion of turgescient cells with nystatin and other agents. *J. Membrane Biol.* **157**:311-321
- Wang, J., Sukhorukov, V. L., Djuzenova, C. S., Zimmermann, U., Müller, T., Fuhr, G. 1997b. Electrorotational spectra of protoplast generated from the giant marine alga *Valonia utricularis*. *Protoplasma* **196**:123-134

- Wang, J., Wehner, G., Benz, R., Zimmermann, U. 1991. Influence of external chloride concentration on the kinetics of mobile charges in the cell membrane of *Valonia utricularis*: Evidence for the existence of a chloride carrier. *Biophys. J.* **59**:235-248
- Wang, J., Zimmermann, U., Benz, R. 1993. The voltage-dependent step of the chloride transporter of *Valonia utricularis* encounters a Nernst-Planck and not an Eyring type of potential energy barrier. *Biophys. J.* **64**:1004-1016
- Weiser, T., Bentrup, F. 1994. The chaotropic anions thiocyanat and nitrate inhibit the electric current through the tonoplast ATPase of isolated vacuoles from suspension cells of *Chenopodium rubrum*. *Physiol. Plantarum* **91**:17-22
- Wendler, S., Zimmermann, U. 1978. Compartement analysis of plant cells by means of turgor pressure relaxation: I. Theoretical considerations. *J. Membrane Biol.* **85**:121-132
- Wendler, S., Zimmermann, U., Bentrup, F. W. 1983. Relationship between cell turgor pressure, electrical membrane potential and chloride efflux in *Acetabularia mediterranea*. *J. Membrane Biol.* **72**:75-84
- Wyn Jones, R. G., Brady, C. J., Speirs, J. 1978. Ionic and osmotic relations in plant cells. *In: Recent Advances in the Biochemistry of Cereals*. D. L. Laidman and R. G. Wyn Jones, editors. pp. 63-103, Academic Press, London, New York
- Zimmermann, U. 1978. Physics of turgor- and osmoregulation. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* **29**:121-148
- Zimmermann, U., Benz, R. 1980. Dependence of the electrical breakdown voltage of mobile charges in algal membranes: influence of pH and turgor pressure. *J. Membrane Biol.* **53**:33-43

Zimmermann, U., Büchner, K. H., Benz, R. 1982. Transport properties of mobile charges in algal membranes. *J. Membrane Biol.* **67**:197

Zimmermann, U., Neil, G. A. 1996. Electromanipulation of cells. CRC Press, Boca Raton, Florida

Zimmermann, U., Steudle, E. 1974. The pressure-dependence of the hydraulic conductivity, the membrane resistance and membrane potential during turgor pressure regulation in *Valonia utricularis*. *J. Membrane Biol.* **16**:331-352

Zimmermann, U., Steudle, E. 1978. Physical aspects of water relations. *Advances in Botanical Research* **6**:45-117

11 Publikationen

Klöck, G., Pfeffermann, A., Ryser, C., Gröhn, P., Kuttler, B., Hahn, H.J., Zimmermann, U. 1997. Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. *Biomaterials* **18**:707-713

Wang, J., Spieß, I., Ryser, C., Zimmermann, U. 1997a. Separate determination of the electrical properties of the tonoplast and the plasmalemma of the giant-celled alga *Valonia utricularis*: vacuolar perfusion of turgescent cells with nystatin and other agents. *J. Membrane Biol.* **157**:311-321

Ryser, C., Wang, J., Mimietz, S., Zimmermann, U. 1999. Determination of the individual electrical and transport properties of the plasmalemma and the tonoplast of the giant marine alga *Ventricaria ventricosa* by means of the integrated perfusion/charge-pulse technique: Evidence for a multifolded tonoplast. *J. Membrane Biol.* **168**:183-197

12 Danke!

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Zimmermann am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg angefertigt. Herrn Prof. Zimmermann danke ich sehr für die Überlassung des spannenden Themas, sowie für die Bereitstellung der notwendigen Geräte und Hilfsmittel. Nicht zuletzt möchte ich auch die häufigen und fruchtbaren Diskussionen erwähnen, die sehr zum Fortgang dieser Arbeit beitrugen.

Bei Herrn Prof. Dr. Gimmler bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Zweit-Gutachtens.

Herr Prof. Dr. Benz hat mir durch seine fachliche wie räumliche Nachbarschaft in so mancher Unterhaltung viele interessante Aspekte aufgezeigt. Dafür möchte ich mich sehr bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Krohne und Frau Dipl. Biol. Saskia Mimietz bedanke ich mich sehr für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Ein besonders herzliches *Dankeschön* geht an das "Valonia" Laborteam: Dr. Lars Wegner, Saskia Mimietz, Martin Heidecker, Karl-Andrè Binder sowie Dr. Jianning Wang und Dr. Ingo Spieß. Sowohl ihre fachliche Unterstützung, als auch die herzliche Atmosphäre waren immer vorbildlich! Den mutigen "Ischia-Tauchern" Nicole Wistuba und Hans-Jürgen Wagner *mille grazie* für die Beschaffung der Algen in 1997.

Bei Marcus Behringer, Albert Gessner, Willi Bauer und Thomas Igerst, den Kollegen der feinmechanischen und elektronischen Werkstätten, möchte ich mich ganz besonders bedanken. Ihre guten Ideen und ständige Hilfsbereitschaft bei so manchen Problemen haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Zimmermann und Prof. Benz danke ich für das freundschaftliche Klima. Nicht nur unsere Mensagänge ("*... pünktlich heute?*") werden mir sicherlich fehlen!

Bei Dunja bedanke ich mich ganz herzlich für ihre große Unterstützung in allen Lebenslagen!

Last but not least möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützten und mir die Chance gaben, das Studium und die Promotion zu absolvieren. Nicht nur biologisch betrachtet, wäre ohne sie all dies überhaupt nicht möglich gewesen!

13 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Christoph Ryser
Geburtsdatum	29. November 1969
Geburtsort	Baden-Baden
Staatsangehörigkeit	Schweizer

Schulbildung:

1976 bis 1980	Grundschule Baden-Oos
1980 bis 1989	Gymnasium Hohenbaden, Baden-Baden
Mai 1989	Abitur und Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Hohenbaden, Baden-Baden

Hochschulausbildung:

1989 bis 1995	Studium der Biologie an der Bayerischen Julius- Maximilians-Universität Würzburg
September 1995	Diplom Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. U. Zimmermann. Thema: "Immobilisierung von Zellen: Charakterisierung von Alginaten"
Ab Dezember 1995	Promotion am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. U. Zimmermann

14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegeben Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Würzburg, den

Christoph Ryser