

KIT SCIENTIFIC REPORTS 7562

# Nanosekunden-zeitaufgelöste Messungen der Plasmamembran- aufladung pflanzlicher Zellen

Bianca Flickinger



Bianca Flickinger

**Nanosekunden-zeitaufgelöste Messungen  
der Plasmamembranaufladung pflanzlicher Zellen**

**Karlsruhe Institute of Technology**  
**KIT SCIENTIFIC REPORTS 7562**

# **Nanosekunden-zeitaufgelöste Messungen der Plasmamembran- aufladung pflanzlicher Zellen**

von  
Bianca Flickinger

**Report-Nr. KIT-SR 7562**

Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie  
Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Tag der mündlichen Prüfung: 19. April 2010

### **Impressum**

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)  
KIT Scientific Publishing  
Straße am Forum 2  
D-76131 Karlsruhe  
[www.ksp.kit.edu](http://www.ksp.kit.edu)

KIT – Universität des Landes Baden-Württemberg und nationales  
Forschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft



Diese Veröffentlichung ist im Internet unter folgender Creative Commons-Lizenz  
publiziert: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/de/>

KIT Scientific Publishing 2010  
Print on Demand

ISSN 1869-9669  
ISBN 978-3-86644-554-3





# Nanosekunden-zeitaufgelöste Messungen der Plasmamembran- aufladung pflanzlicher Zellen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologin

Bianca Flickinger

aus

Pforzheim

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse  
Referent: Prof. Dr. Peter Nick  
Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. Manfred Thumm  
Tag der mündlichen Prüfung: 19. April 2010



## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Hochleistungsimpuls- und Mikrowellentechnik, KIT Campus Nord, unter der Anleitung von Dr. Wolfgang Frey im Zeitraum von Dezember 2006 – Januar 2010 erstellt und von der Helmholtz Gemeinschaft finanziert.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Frey für die Überlassung dieses höchst interessanten Themas an der Grenzfläche der Biologie zur Physik und der damit einhergegangenen Möglichkeit, Erfahrungen auch außerhalb meines Fachgebietes zu sammeln.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter Nick danke ich für die Betreuung meiner Arbeit an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften sowie die äußerst hilfreichen fachlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Manfred Thumm danke ich für die Übernahme des Korreferats und für die freundliche Aufnahme am Institut für Hochleistungsimpuls- und Mikrowellentechnik.

Bei Herrn Dr. Georg Müller bedanke ich mich für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen und für die Möglichkeit der Präsentation meiner Ergebnisse auf internationalen Tagungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Phys. Thomas Berghöfer für die experimentelle Unterstützung, die geduldige Erklärung physikalischer und elektrotechnischer Zusammenhänge, für die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen, wie auch für die Korrektur zahlreicher Manuskripte.

Für den reibungslosen Einstieg in die Elektrophysiologie danke ich Herrn Dr. Christian Eing. Danke auch für die angenehme und stets aufmunternde Atmosphäre in unserem Büro.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Lars Wegner, der mir freundlicherweise einige Daten zur Elektrophysiologie (s. Kapitel 3.1.4) zur Verfügung gestellt hat.



Meinen Kollegen Rüdiger Wüstner, Frank Zimmermann, Fabian Lang und Dr. Alfons Weisenburger möchte ich für zahlreiche schöne und unvergessene Momente danken. Ihr hattet stets ein offenes Ohr oder einen motivierenden Spruch für mich.

Des Weiteren gilt mein Dank Klaus Baumann und Harald Zimmermann sowie den Kollegen der mechanischen und elektrischen Werkstätten, ohne deren Einsatz manche Messung nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Rainer Knoblauch vom Landwirtschaftlichen Technologiezentrum Augustenberg (LTZ) danke ich für die Bereitstellung von Saatgut, Anzuchtmaterial und Know-how zur Anzucht der Tabakpflanzen.

Ein weiterer Dank geht an zwei wichtige Menschen, deren Freundschaft mich durch so manche kleine und große Krise getragen hat, Jutta und Jürgen Hofer.

Abschließend gilt mein unendlicher Dank meinen Eltern Rosemarie und Mario Flickinger und meiner Familie für ihren Glauben an mich und für den Rückhalt und die Unterstützung, die mir zu Teil wurde.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Motivation der Arbeit.....	1
1.2	Anwendung der Elektropermeabilisierung.....	2
1.3	Geschichte der Elektropermeabilisierung.....	3
1.4	Biologische Membranen.....	5
1.5	Transmembranpotential.....	8
1.6	Physikalische Beschreibung.....	10
1.6.1	Feld-Zelle-Wechselwirkung.....	10
1.6.2	Theoretisches Aufladeverhalten der Plasmamembran.....	11
1.6.3	Einfluss der Pulslänge.....	15
1.6.4	Theorien zur Erklärung des feldinduzierten Permeabilitätsanstiegs....	17
	Langpulsanregung.....	17
	Nicht-Poren-Modelle.....	18
	I) Theoretische Beschreibung der Instabilität einer Doppellipid-Membran	18
	II) Das Elektrodynamische-Instabilitäts-Modell	18
	III) Das Viskoelastische Modell	19
	IV) Phasen-Übergangsmodell	19
	V) Betrachtung einer planaren Doppellipidschicht als ein metastabiles System	19
	Poren-Modelle.....	20
	A) Das transiente-hydrophile-Poren-Modell	20
	B) Einfluss thermaler Fluktuationen auf die Porenbildung	20
	C) Bestimmung der Lebensdauer der Membran	20
	D) Bildung von zwei Porenarten	21
	E) Asymptotisches Modell der Elektroporation	22
	F) Modell für die Elektroporation einer einzelnen, sphärischen Zelle	23
	Kurzpulsanregung.....	23
	a) Intrazelluläre Elektroporation	23
	b) Supraelektroporation	24
	c) Molekular-Dynamische Simulationen	25
1.7	Ziel dieser Arbeit.....	26
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.1	Verwendete Organismen.....	27
2.1.1	Zellkultur.....	27
2.1.2	Pflanzen.....	27
2.2	Medien-, Versuchs- und Stammlösungen.....	27
2.2.1	Kulturmedien.....	28
2.2.2	Lösungen.....	29
	Lösungen zur Protoplastierung von Tabakmesophyllprotoplasten	29
	Lösungen zur Protoplastierung von BY-2 Tabakprotoplasten	30
	Lösungen für den Aufreinigungsgradienten	31
	Versuchslösungen zur Membranpotentialmessung	31
	Versuchslösungen zur Elektrophysiologie an BY-2 Protoplasten	32
	Sonstige Lösungen	32



2.2.3	Verwendete Farbstoffe.....	33
	Feldsensitiver Farbstoff ANNINE-6	33
	Feldsensitiver Farbstoff ANNINE-6plus	35
2.3	Methoden.....	36
2.3.1	Anzucht der Tabakpflanzen.....	36
2.3.2	Protoplastierung aus Tabakmesophyllprotoplasten.....	37
2.3.3	Etablierung einer BY-2 Plattenkultur.....	37
2.3.4	Etablierung einer BY-2 Suspensionskultur.....	37
2.3.5	Erhaltungskulturen der BY-2 Tabakzelllinie.....	38
2.3.6	Protoplastierung der BY-2 Tabakzelllinie.....	38
	Protoplastierungsprotokoll für die Membranpotentialmessungen	38
	Protoplastierungsprotokoll für die Patch-Clamp-Messungen	39
2.3.7	Diskontinuierlicher Saccharose-Mannitol-Gradient zur Aufreinigung der Protoplasten.....	39
2.3.8	Anfärben der BY-2 Tabakzelllinie mit ANNINE-6.....	40
2.3.9	Anfärben der BY-2 Tabakzelllinie mit ANNINE-6plus.....	40
2.3.10	Experimenteller Aufbau zu den Membranaufladungsversuchen.....	40
2.3.11	Membranaufladungsversuche mit Tabak-Protoplasten.....	43
2.3.12	Patch-Clamp-Technik.....	45
2.3.13	Experimenteller Aufbau zu den Patch-Clamp-Versuchen.....	47
2.3.14	Patch-Clamp-Versuche an Tabak-Protoplasten.....	48
2.3.15	Auswertung der Fluoreszenzbilder.....	50
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
3.1	Vorversuche zur systematischen Fehlerbetrachtung.....	52
3.1.1	Auswirkungen der Darstellung der theoretischen Ladezeitkonstanten auf das Aufladeverhalten biologischer Membranen.....	52
3.1.2	Transmembranpotentialmessungen.....	55
	<i>Vergleich ANNINE-6 und ANNINE-6plus</i>	55
	<i>Bleichverhalten des ANNINE-6 Fluoreszenzfarbstoffes</i>	57
	<i>Untersuchung zum Einfluss der Laserwellenlänge</i>	58
	<i>Untersuchung zum Einfluss der Laserenergie</i>	60
	<i>Vergleich Zellkultur – Pflanze</i>	61
	<i>Untersuchung zum Einfluss der Zellgröße</i>	62
3.1.3	Reproduzierbarkeit des Auswerteprogrammes.....	64
3.1.4	Patch-Clamp-Messungen.....	65
3.2	Messungen zur Membranaufladung.....	66
3.2.1	1 $\mu$ s-Leitung.....	67
	<i>Untersuchungen zur Feldstärkeabhängigkeit des Transmembranpotentials</i>	67
	<i>Zeitliche Entwicklung des Membranpotentials</i>	69
	<i>Untersuchungen zum Auflade- und Wiederaufladeverhalten</i>	72
	<i>Untersuchungen zur Winkelabhängigkeit des Transmembranpotentials</i>	74
	<i>Zeitliche Entwicklung des Transmembranpotentials in Abhängigkeit des     azimuthalen Winkels</i>	79
	<i>Steigerung der applizierten Feldstärke</i>	82
	<i>Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Membranspannung</i>	83



3.2.2	100 ns-Leitung.....	84
	<i>Zeitliche Entwicklung des Membranpotentials</i>	84
	<i>Zeitliche Entwicklung des Transmembranpotentials in Abhängigkeit des</i>	
	<i>azimuthalen Winkels</i>	86
3.3	Kalibrierung des ANNINE-6 Farbstoffes mittels der	
	Patch-Clamp-Technik.....	92
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	94
3.4.1	Vorversuche zur systematischen Fehlerbetrachtung.....	94
3.4.2	Messungen zur Membranaufladung.....	95
3.4.3	Kalibrierung des Farbstoffes ANNINE-6 mittels der	
	Patch-Clamp-Technik.....	96
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>97</b>
4.1	Vorversuche zur systematischen Fehlerbetrachtung.....	97
4.1.1	Auswirkungen der Darstellung der theoretischen Ladezeitkonstanten	
	auf das Aufladeverhalten biologischer Membranen.....	97
4.1.2	Transmembranpotentialmessungen.....	98
	<i>Vergleich ANNINE-6 und ANNINE-6plus</i>	98
	<i>Bleichverhalten des ANNINE-6 Fluoreszenzfarbstoffes</i>	99
	<i>Untersuchung zum Einfluss der Laserwellenlänge</i>	99
	<i>Untersuchung zum Einfluss der Laserenergie</i>	100
	<i>Vergleich Zellkultur – Pflanze</i>	100
	<i>Untersuchung zum Einfluss der Zellgröße</i>	100
4.1.3	Reproduzierbarkeit des Auswerteprogrammes.....	101
4.1.4	Patch-Clamp-Messungen.....	101
4.1.5	Zusammenfassung.....	101
4.2	Messungen zur Membranaufladung.....	102
4.2.1	Feldstärkeabhängigkeit des Membranpotentials.....	102
4.2.2	Zeitliche Entwicklung des Membranpotentials.....	104
4.2.3	Auflade- und Wiederaufladeverhalten der Plasmamembran.....	107
4.2.4	Winkelabhängigkeit des Membranpotentials.....	109
4.3	Diskussion der Theorien zur Erklärung des feldinduzierten	
	Permeabilitätsanstieges.....	117
4.3.1	Nicht-Poren-Modelle.....	117
4.3.2	Poren-Modelle.....	120
4.3.3	Zusammenfassung.....	123
4.4	Kalibrierung des ANNINE-6 Farbstoffes mittels der	
	Patch-Clamp-Technik.....	124
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick.....</b>	<b>127</b>
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	127
5.1.1	Vorversuche zur systematischen Fehlerbetrachtung.....	127
5.1.2	Messungen zur Membranaufladung.....	127
5.1.3	Diskussion der Theorien zur Erklärung des feldinduzierten	
	Permeabilitätsanstieges.....	131



5.1.4	Kalibrierung des Farbstoffes ANNINE-6 mittels der Patch-Clamp-Technik.....	131
5.2	Ausblick.....	132
<b>6.</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>133</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>135</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>144</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	144
8.2	Tabellenverzeichnis.....	149
<b>9.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>150</b>
9.1	Publikationen und Präsentationen.....	150



## Abkürzungsverzeichnis

2,4 D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
a	Zellradius
ANNINE	Annelated Hemicyanine
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BY-2	Bright Yellow 2
c	Konzentration des Ions
C	Kapazität
$C_M$	Membrankapazität
$C_s$	spezifische Membrankapazität
d	Membrandicke
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Elektrisches Potential
$\vec{E}$	Elektrisches Feld
$E_{ext}$	externe elektrische Feldstärke
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Etylenglycoltetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F	Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit eines externen elektrischen Feldes
$F_0$	Grundfluoreszenz (Ruhepotential)
$F/F_0$	Relative Fluoreszenzintensitätsänderung
FWHM	Full Width at Half Maximum
Gap	Mikroelektrodenanordnung
GFP	Green Fluorescent Protein
$G_s$	spezifische Membranleitfähigkeit
$I_E$	Entladestrom
$I_L$	Ladestrom
MDS	Molekulardynamische Simulation
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MS-Medium	Murashige-Skoog-Medium
ND-Filter	Neutraldichte-Filter



P	Permeabilität (Quotient aus der Diffusionskonstanten und der Membrandicke)
PLFM	Pulsed Laser Fluorescence Microscopy
R	Widerstand
$r_c$	kritischen Radius zur Porenbildung
RT	Raumtemperatur
t	Zeit nach Beginn des elektrischen Pulses
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
$V_c$	Kommandospannung
$V_M$	Transmembranpotential / Membranspannung
$V_{rest}$	Ruhepotential der Zelle
$Z_e$	Anzahl der übertragenen Elektronen (Äquivalentzahl)
$\alpha$	relativer Winkel bezogen auf die Richtung des elektrischen Feldes
$\Delta_a$	Leitfähigkeit des Außenmediums
$\Delta_H$	Leitfähigkeit der Teilchenschale
$\Delta t$	Zeit nach Beginn des elektrischen Pulses
$\Delta V_M$	Membranspannungsänderung
$\epsilon_0$	Permittivität des Vakuums = $8,8542 \cdot 10^{-12} \frac{As}{Vm}$
$\epsilon_r$	relative Permittivität
$\gamma$	Energieanstieg
$\Gamma$	Energie pro Flächeneinheit
$\kappa_a$	Leitfähigkeit extrazelluläres Medium (Versuchslösung)
$\kappa_i$	Leitfähigkeit intrazelluläres Medium (Cytoplasma)
$\kappa_M$	Leitfähigkeit der Membran
$\kappa_s$	Leitfähigkeit der Plasmamembran
$\lambda$	Anregungswellenlänge
$\rho$	relativer Volumenanteil der Teilchen in der Suspension
$\theta$	relativer Winkel bezogen auf die Richtung des elektrischen Feldes
$\tau$	Ladezeitkonstante



# 1. Einleitung

## 1.1 Motivation der Arbeit

Die Behandlung biologischer Zellen mit elektrischen Feldern führt zu einer Änderung des natürlichen Transmembranpotentials dieser Zellen. Bei Überschreiten einer kritischen Membranspannung zeigt die Membran eine erhöhte Permeabilität, die es Ionen und auch Makromolekülen erlaubt, die Membran zu passieren. Dieser Effekt wird bereits bei zahlreichen, zum Teil auch industriellen, Anwendungen ausgenutzt. Je nach Ziel der elektrischen Impulsbehandlung werden Feldstärken von wenigen V/cm bis zu mehreren kV/cm und Pulsdauern in der Größenordnung von ns bis s eingesetzt. Trotz zahlreicher Versuche und theoretischer Ansätze ist der Mechanismus der Elektropermeabilisierung bisher weitestgehend unverstanden.

Es existieren jedoch unterschiedliche Erklärungsversuche, die sich unterteilen lassen in:

- Lineare Theorien, die komplett deterministisch sind und den Permeabilitätsanstieg durch Elektrokompensation, die Entwicklung symmetrischer Wellen oder mit Hilfe von Phasenübergängen erklären und
- Nichtlineare Theorien, welche zur Erklärung Zwischenstadien wie Poren oder Membrandefekte verwenden.

Generell lässt sich sagen, dass nur wenige experimentelle Daten vorliegen, um die bestehenden theoretischen Ansätze zu untermauern bzw. auszuschließen. Ein besseres Verständnis der Membranaufladung und der Elektropermeabilisierung wird jedoch, vor allem im Hinblick auf die Optimierung bereits gängiger Anwendungen, wie auch zur Entwicklung neuer Methoden, dringend benötigt.

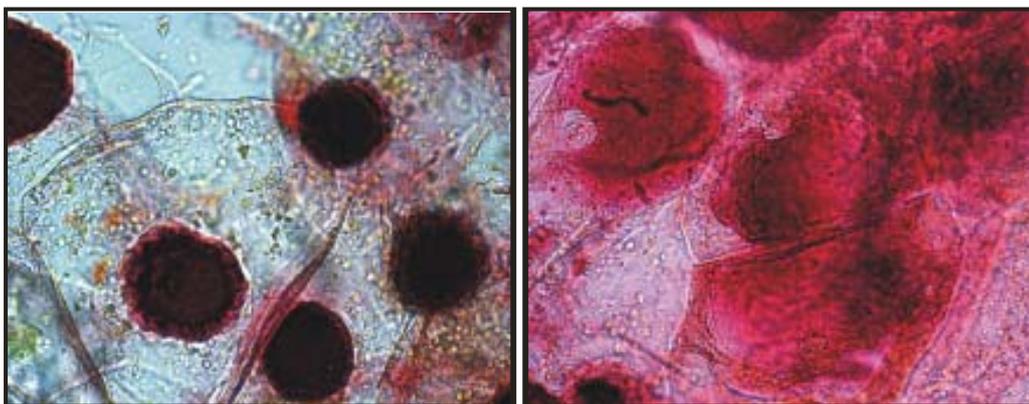
## 1.2 Anwendungen der Elektroporierung

Im biologischen Bereich ist die wohl bedeutendste Anwendung der Elektroporierung die Einbringung fremder DNA in die unterschiedlichsten Zelltypen. Für die Transfektion (Einschleusung von DNA) werden je nach Zelltyp Pulsdauern von 5 ms bei Säugerzellen (Phez et al. 2005) bis 5 s bei *Escherichia coli* und Feldstärken bis zu einigen kV/cm verwendet.

Auch Farbstoffe und Marker lassen sich auf diesem Weg in biologische Zellen einbringen. Fluoreszenzfarbstoffe, antikörper-markierte Nanopartikel ermöglichen so die spezifische Beobachtung intrazellulärer Strukturen und sind damit eine interessante Alternative zu GFP-Linien.

Die Elektroimpulsbehandlung wird auch oft zur Zellfusion eingesetzt, wenn zum Beispiel Riesenzellen oder Chimären, wie z.B. die sterile Tomoffel (Protoplastenfusion von Tomaten- und Kartoffelprotoplasten), erzeugt werden sollen (Melchers et al. 1978, Nicoloff 1995).

Industriell wird die Elektroporation bei der Gewinnung von Zellinhaltsstoffen sowie in der Lebensmittelverarbeitung genutzt. Gute Erfolge wurden bei der Extraktion von Zucker aus Zuckerrüben (Sack et al. 2005, Sack et al. 2006) und der Behandlung von Weinmais, siehe Abb. 1, erzielt (Sack et al. 2008).



**Abbildung 1:**

**Unbehandelte und behandelte Weintrauben der Sorte Lemberger, mikroskopische Aufnahme der Beerenhaut.**

Weitere Erfolge konnten bei der Ausbeute von Obst- und Gemüsesäften sowie Pflanzenölen (Guderjan et al. 2005, Vorobiev et al.) verzeichnet werden.

Die Behandlung von Fleischwaren führte zu einer Verringerung der benötigten Zeit zum Pökeln, Trocknen oder Marinieren (Töpfl et al. 2006). Des Weiteren wird die Elektroporation als schonende Methode zur Haltbarmachung von Milch und Säften eingesetzt (Töpfl et al. 2006).

Eine weitere interessante Anwendung ist der Einsatz elektrischer Felder zur Abtötung von Zellen (Sale 1967) zur Dekontamination von z.B. klinischen Abwässern (Rieder et al. 2008).

Medizinische Anwendungen verwenden die Elektroporation zur Einbringung von Medikamenten in befallene Zellen und Gewebe (Mir 2000, Gothelf et al. 2003), zur transdermalen Einbringung von Medikamenten (Prausnitz et al. 1993) und zur Gentherapie (Phez 2005).

Die Behandlung biologischer Zellen mit hohen Feldstärken und Pulsdauern unter 1  $\mu$ s findet ebenfalls bereits Anwendungen in verschiedenen Bereichen. Gute Ergebnisse mit Kurzpulsen wurden bei der Behandlung von Hauttumoren erzielt. Durch den Einsatz von Pulsdauern von 300 ns und Feldstärken von mehr als 20 kV/cm wurde eine Verkleinerung von Tumoren von bis zu 90 % oder sogar deren vollständiges Verschwinden erreicht (Beebe 2002, Nuccitelli et al. 2006).

Die Behandlung von mit Shiitakepilzen inokulierten Baumstämmen führte zu einer Verdoppelung des Ertrags (Tsukamoto 2003). Auch bei Pflanzen konnte ein wachstumssteigernder Effekt beobachtet werden (Eing et al. 2009).

### **1.3 Geschichte der Elektropermeabilisierung**

#### **1958**

Erste Experimente am Ranvier-Schnürring (Nervenzellen) führten zu der Beobachtung eines elektrischen Zusammenbruchs (Stämpfli 1958).

#### **1967**

Abtötung von biologischen Zellen durch gepulste elektrische Felder (Größenordnung: kV/cm). Es wurde postuliert, dass das Absterben der Zellen von der Feldstärke abhängt, wobei ein Membranpotential von bis zu 1 V erreicht werden kann (Hamilton 1967).

### **1972/73/74**

Experimente an roten Blutkörperchen und Vesikeln. Erreicht die Potentialdifferenz über der Membran einen kritischen Wert, kann es zu einem dielektrischen Zusammenbruch der Membran kommen (Neumann 1972, Crowley 1973, Zimmermann 1974).

### **1977/78**

Konzept der Membran-Poren-Bildung als Folge des dielektrischen Zusammenbruchs. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei kurzen Pulsen die Membran wieder regeneriert. Einführung des Begriffs der *Elektroporation* (Kinosita und Tsong 1977, Baker 1978).

### **1980**

Transport von Molekülen (Zucker, Farbstoffe, Ionen) durch die „Poren“ einer elektroporierten Membran (Zimmermann 1980).

### **1992**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Membranporen an elektroporierten Erythrocytenmembranen. Poren scheinen die Form eines invertierten Vulkans zu haben (Chang 1992). Diese Ergebnisse stellten sich später jedoch als Artefakte heraus.

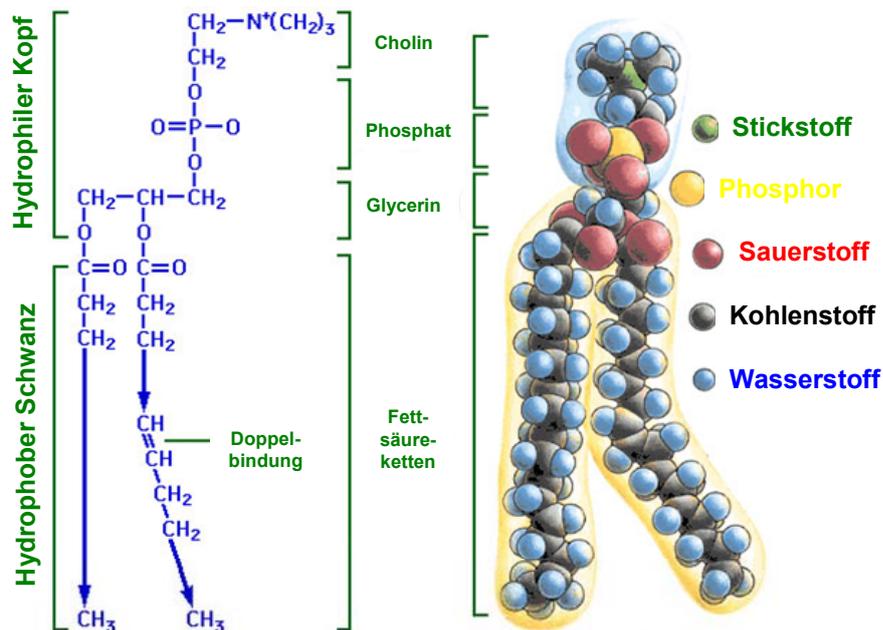
Der Einfluss verschiedener Parameter auf die Transfektionseffizienz wurde untersucht. Es wurde eine lineare Relation zwischen der Transfektionseffizienz und dem Produkt aus elektrischer Feldstärke und Pulslänge festgestellt (Sek 1992).

### **ab 2000**

Zahlreiche Studien mit unterschiedlichsten Ansätzen versuchen, die grundlegenden Mechanismen der Elektroporation zu entschlüsseln. Bis heute gelang es trotz experimenteller Befunde, theoretischer Modelle und molekulardynamischen Simulationen noch nicht, die Vorgänge an den biologischen Membranen während und nach Anlegen eines externen elektrischen Feldes vollständig zu verstehen.

## 1.4 Biologische Membranen

Biologische Membranen dienen nicht nur der Abgrenzung des Zell- bzw. Organellinhalts von dem sie umgebenden Medium, sondern auch dem Austausch von Nähr- und Abfallstoffen, der Perzeption von Umweltreizen, der Signaltransduktion und der Energiegewinnung. Prokaryotische Zellen besitzen nur ihre äußere Plasmamembran, während eukaryotische Zellen noch zusätzlich eine Vielzahl an inneren Membranen besitzen, die zu einer Kompartimentierung des Zellinneren führen. Die ca. 5 - 11 nm dünnen Membranen werden durch eine Doppelschicht gebildet, die vorwiegend aus Phospholipiden besteht. Die Lipidmoleküle besitzen eine hydrophile Kopfgruppe, an die ein oder zwei hydrophobe Kohlenwasserstoffketten gebunden sind. Durch diese Molekülstruktur besitzen die Lipidmoleküle amphipathische Eigenschaften, welche in wässriger Umgebung eine Anordnung der Lipidmoleküle zu einer Doppelschicht bewirken.



**Abbildung 2:**  
**Struktur eines Phospholipidmoleküls (Phosphatidylcholin)**  
 (www.faculty.ksu.edu.sa, bearbeitet).

Das häufigste in Membranen vorhandene Phospholipid ist das Phosphatidylcholin. Bei diesem Molekül wird der hydrophile Kopf durch Cholin gebildet, das über eine Phosphatgruppe an Glycerin gebunden ist (s. Abb.2).

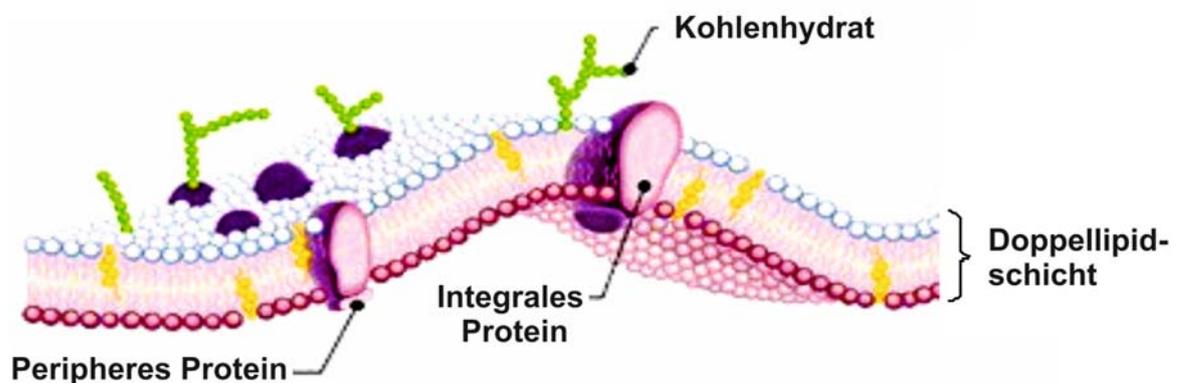
Die hydrophoben Kohlenwasserstoffschwänze sind über Esterbindungen mit dem Glycerin verbunden. Die Lipide bilden die Grundstruktur der Membran und wirken als Permeabilitätsbarriere. Alle weiteren Membranfunktionen werden durch Membranproteine vermittelt. Die vorhandenen Proteine sowie das Lipid-zu-Protein-Verhältnis sind sehr variabel und verleihen den Membranen ihre spezifische Funktionalität.

Generell unterscheidet man zwei Arten von Membranproteinen:

1. Periphere Membranproteine
2. Integrale Membranproteine.

Die peripheren Membranproteine sitzen der Membran nur oberflächlich auf und werden durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Lipidköpfen gehalten. Integrale Proteine durchziehen die Doppellipidschicht wie ein Tunnel. Man bezeichnet diese daher auch als *Transmembranproteine* (s. Abb. 3). Das allgemein anerkannte Fluid-Mosaic-Modell (Singer und Nicholson 1972) beschreibt die Membran als flüssig-kristalline Doppelschicht mit lateral frei beweglichen, integralen Proteinen. Auch die Lipidmoleküle sind auf Grund der Wärmebewegung innerhalb ihrer Schicht fortwährend in Bewegung. Ein so genannter Flip-Flop, bei dem ein Lipidmolekül von einer Einzelschicht in die andere wechselt, kommt jedoch nur äußerst selten vor. Wie „flüssig“ eine Membran bei konstanter Temperatur ist, hängt von der Lipid-Zusammensetzung, hauptsächlich vom Sättigungsgrad der Fettsäureketten, aber auch von der Kettenlänge ab. Doppelbindungen in den Fettsäureketten führen zu einer Änderung der typischen Zick-Zack-Struktur einer Kohlenwasserstoffkette, indem durch die Doppelbindung eine Art unbeweglicher Knick mit der einhergehenden Richtungsänderung der Kette erzwungen wird. Folglich besitzen ungesättigte Membranlipide einen höheren Platzbedarf, was zu potentiellen Störstellen in der Membran führt. Je mehr Lipidmoleküle mit ungesättigten Fettsäureketten in einer Membran enthalten sind, desto flüssiger ist die Membran. Die unterschiedlichen Lipidmoleküle einer Membran besitzen zudem unterschiedliche Phasenübergangstemperaturen, um vom kristallinen in den flüssig-kristallinen Zustand zu gelangen. Wird diese Temperatur überschritten, ändern sich die Bewegungseigenschaften dieser Lipide stark, was zu einer Oberflächenvergrößerung und einer damit einhergehenden Verringerung der Membrandicke führt.

Aus dieser Tatsache resultiert, dass in einer flüssig-kristallinen Membran auch immer kristalline Domänen zu finden sind. Dieser Effekt führte zu einer Weiterentwicklung des Fluid-Mosaic-Modells. Die so genannte Lipid-Raft-Hypothese (Simons und Ikonen 1997) postuliert keine gleichmäßige Verteilung von Lipiden und Membranproteinen, sondern die Bildung von Membran-Mikrodomänen unterschiedlichster Zusammensetzung. Die so genannten *Lipid-Rafts* bestehen hauptsächlich aus Sphingolipiden und Sterolen. Speziell bei BY-2 Tabakzellen werden diese Membran-Mikrodomänen aus dem Sphingolipid Glycosilceramid und den Sterolen Sigmasterol, Sitosterol und Cholesterol gebildet (Mongrand et al. 2004). Phospholipide sind kaum in diesen Membranbereichen zu finden.



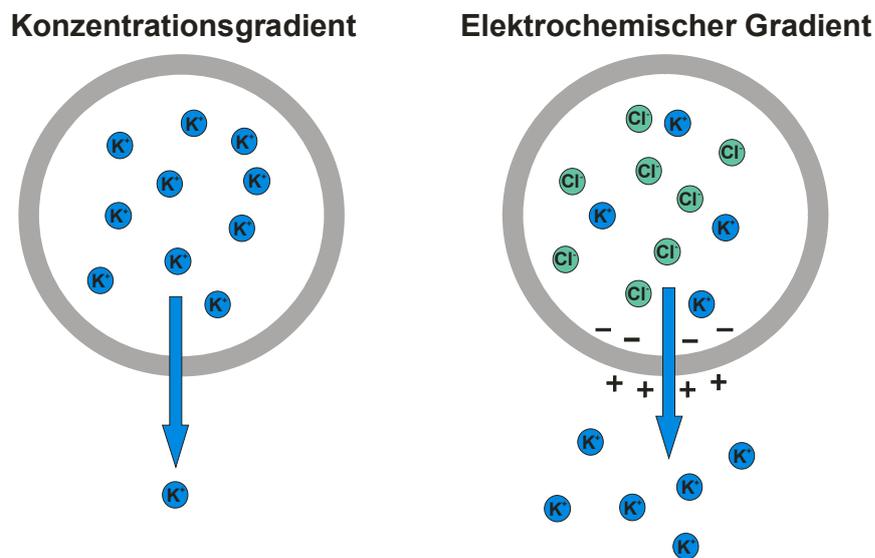
**Abbildung 3:**  
**Schematischer Aufbau einer biologischen Membran.**

Lipid-Rafts besitzen die Fähigkeit, bestimmte Lipide und Membranproteine einzubinden, während andere ausgeschlossen werden. Auf diese Art und Weise wird nicht nur die freie Diffusion von Membranproteinen vermieden, sondern es werden auch spezialisierte Membrandomänen geschaffen, in denen bestimmte Membranproteine „festgehalten“ werden. Morel et al. untersuchten die Proteinzusammensetzung der Lipid-Rafts an einer BY-2 Suspensionskultur und fanden vor allem Proteine die für Stressantworten, zellulären Transport und den Zellwandmetabolismus verantwortlich sind (Morel et al. 2006). Die Auswahl der eingebundenen Proteine scheint durch Modifikationen der Proteinstruktur ermöglicht zu werden. Biologische Membranen unterscheiden sich jedoch nicht nur durch ihren funktionsbedingten Aufbau, auch die beiden Einzelschichten derselben Membran unterscheiden sich voneinander. Das bedeutet, dass biologische Membranen asymmetrisch aufgebaut sind.

So findet sich z.B. das negativ geladene Phosphatidylserin lediglich in der inneren Seite der Doppellipidschicht (Devaux 1992), die oben beschriebenen Lipid-Rafts finden sich hingegen nur in der äußeren Schicht der Membran.

## 1.5 Transmembranpotential

Jede biologische Zelle besitzt ein natürliches Transmembranpotential. Bei Pflanzenzellen kann es, auf Grund der Aktivität der  $H^+$ -ATPase, zwischen -80 mV und -200 mV liegen und damit deutlich negativere Werte annehmen, als bei tierischen Zellen (Fromm und Lautner 2007). Aufgebaut wird das Transmembranpotential durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen im intra- und extrazellulären Medium, die zur Bildung eines elektrischen Potentials führen. Die Plasmamembran wirkt dabei als selektiv permeable Membran mit unterschiedlichen Durchlässigkeiten für die vorhandenen Ionen.



**Abbildung 4:**

**Der elektrochemische Gradient führt zum Aufbau des Transmembranpotentials.**

Die bedeutendsten Ionen, die am Aufbau des pflanzlichen Transmembranpotentials beteiligt sind, sind Kalium, Chlorid, Protonen und in geringerem Maße Calcium und Natrium. Vor allem Kalium trägt zum Aufbau der Potentialdifferenz bei.

Da im Zellinneren eine deutlich höhere Konzentration an z.B.  $K^+$  vorhanden ist, als im extrazellulären Medium, wird  $K^+$  dem Konzentrationsgefälle folgend durch die Plasmamembran nach außen diffundieren. Negative Ladungen verbleiben jedoch im Zellinneren, wodurch ein elektrisches Potentialgefälle aufgebaut wird, welches dem Konzentrationsgefälle entgegenwirkt (s. Abb. 4). Kalium-Ionen werden solange nach außen diffundieren, bis sich das Konzentrationsgefälle mit dem durch die Ladungstrennung aufgebauten elektrischen Potentialgefälle im Gleichgewicht befindet.

Dieser Zustand lässt sich mit der Nernst-Gleichung (1) beschreiben:

$$E = \frac{0,059V}{z_e} \log \frac{c_{innen}}{c_{außen}} \quad (1)$$

E = Elektrisches Potential

$z_e$  = Anzahl der übertragenen Elektronen (Äquivalentzahl)

c = Konzentration des Ions

Die Nernst-Gleichung betrachtet das Membranpotential jedoch nur für eine Ionenart. Bei einer biologischen Zelle wird das elektrische Potentialgefälle jedoch von vielen verschiedenen Ionen aufgebaut. Aus diesem Grund ist es sinnvoller, die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (2) zu verwenden:

$$E = \frac{0,059V}{z_e} \log \frac{P_{Kation1} \cdot [c_{Kation1\_außen}] + P_{Kation2} \cdot [c_{Kation2\_außen}] + P_{Anion1} \cdot [c_{Anion1\_innen}]}{P_{Kation1} \cdot [c_{Kation1\_innen}] + P_{Kation2} \cdot [c_{Kation2\_innen}] + P_{Anion1} \cdot [c_{Anion1\_außen}]}$$

E = Elektrisches Potential

$z_e$  = Anzahl der übertragenen Elektronen (Äquivalentzahl)

$c_i$  = Konzentration der i-ten Ionenart

$P_i$  = Permeabilität der i-ten Ionenart (Quotient aus der Diffusionskonstanten und der Membrandicke)

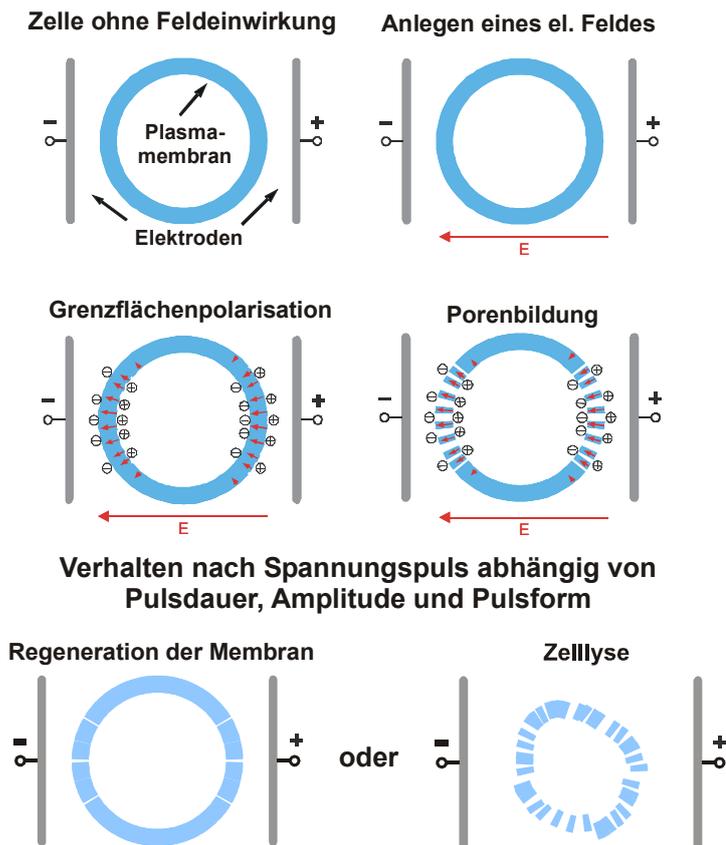
Mit dieser Gleichung lässt sich das Membranpotential unter Berücksichtigung mehrerer permeierender Ionen berechnen. Die erhöhte Permeabilität der Membran für Kaliumionen und der bestehende Konzentrationsgradient bewirken, dass Kaliumionen die Membran von innen nach außen passieren, wodurch das Zellinnere negativ geladen wird.

Auch die Kompartimente einer Zelle, wie z.B. die Vakuole, besitzen ein eigenes Membranpotential. Ändert sich das Membranpotential über einen längeren Zeitraum nicht wesentlich, spricht man vom *Ruhepotential*. Dem gegenüber gestellt sind die so genannten *Aktionspotentiale*, welche durch eine kurzzeitige Hyperpolarisation bzw. Depolarisation der Membran charakterisiert sind. Strömen Kationen aus der Zelle heraus oder Anionen in die Zelle hinein, wird die Plasmamembran hyperpolarisiert, d.h., die Membranspannung wird negativer. Durch den Einstrom von Kationen in die Zelle oder den Ausstrom von Anionen aus der Zelle verschiebt sich die Membranspannung in Richtung positiver Potentialdifferenz und die Plasmamembran wird somit depolarisiert.

## **1.6 Physikalische Beschreibung**

### **1.6.1 Feld-Zelle-Wechselwirkung**

Das Anlegen eines externen elektrischen Feldes an eine Zelle oder Zellsuspension führt zur Induktion elektrischer Dipole, die sich im elektrischen Feld orientieren. Ist die Pulslänge ausreichend lang gewählt, beginnen die Ionen im Behandlungspuffer entlang der elektrischen Feldlinien zu wandern, wobei die Ionen an der Grenzfläche Membran/Behandlungspuffer durch die Membran aufgehalten werden und diese polarisieren. Das natürliche Transmembranpotential (*Ruhepotential*) der Zelle wird auf diese Weise beeinflusst, da sich die Potentialdifferenz zwischen der inneren und äußeren Membranschicht verändert. Erreicht die Membranspannung einen bestimmten Wert, der von der Pulsdauer, Pulsform und der elektrischen Feldstärke abhängt, reagiert die Membran mit einem Permeabilitätsanstieg, der es Ionen und auch Makromolekülen wie z. B. DNA ermöglicht, die Plasmamembran zu passieren. Genau genommen ist der Permeabilitätsanstieg der Membran ein indirekter Feldeffekt, dem die direkte feldinduzierte Oberflächenpolarisation vorausgeht (Neumann und Boldt 1990). Nach Abschalten des elektrischen Feldes kann sich die Membran, vorausgesetzt die Behandlungsparameter sind entsprechend gewählt, wieder regenerieren (s. Abb. 5).



**Abbildung 5:**  
**Reaktion einer biologischen Zelle auf ein externes elektrisches Feld.**

Der Vorgang der Elektropermeabilisierung beinhaltet grundsätzlich folgende Schritte: Anlegen eines externen elektrischen Feldes, Membranaufladung, Strukturelle Neuordnung der Membran, Anstieg der Ionenleitfähigkeit und des molekularen Transports und eventuell die Regeneration der Membran.

### 1.6.2 Theoretisches Aufladeverhalten der Plasmamembran

Um das zeitliche Aufladeverhalten einer Membran in einem externen elektrischen Feld zu berechnen, werden in der Literatur üblicherweise zwei unterschiedliche Formeln für die Ladezeitkonstante  $\tau$  (Gowrishankar, Stewart und Weaver 2006, Schoenbach et al. 1997) verwendet. Bei näherer Betrachtung lässt sich jedoch erkennen, dass beide Ansätze auf der gleichen Ursprungsformel beruhen (Pauly und Schwann 1959).

Pauly und Schwann entwickelten 1959 ein Modell für das dielektrische Verhalten von Zellsuspensionen, welches auf der Maxwell-Gleichung (3) beruht.

$$\frac{\Delta - \Delta_a}{\Delta + 2\Delta_a} = \rho \frac{\Delta_H - \Delta_a}{\Delta_H + 2\Delta_a} \quad (3)$$

$\Delta_a$  = Leitfähigkeit des Außenmediums

$\rho$  = relativer Volumenanteil der Teilchen in der Suspension

$\Delta_H$  = Leitfähigkeit der Teilchenschale

Die Berechnung erfolgte für kugelförmige Teilchen mit einer Schale in einer Suspension. Um die Formel auf eine biologische Zelle anwenden zu können, wurden verschiedene Näherungsformeln beschrieben.

Mit den Annahmen, dass die Leitfähigkeit der Membran gering im Vergleich zum extra- und intrazellulären Medium ist, einer geringen Membrandicke (im Vergleich zum Zellradius) und einem geringen relativen Volumenanteil in der Suspension, lässt sich das Impedanzverhalten einer Suspension mit kugelförmigen Teilchen mit folgender Näherungsformel beschreiben:

$$\tau = aC_s \frac{\frac{1}{\kappa_i} + \frac{1-\rho}{1+\frac{1}{2}\rho} \frac{1}{2\kappa_a}}{1 + aG_s \left[ \frac{1}{\kappa_i} + \frac{1-\rho}{1+\frac{1}{2}\rho} \frac{1}{2\kappa_a} \right]} \quad (4)$$

$\tau$  = Ladezeitkonstante

$a$  = Zellradius

$C_s$  = spezifische Membrankapazität

$G_s$  = spezifische Membranleitfähigkeit

$\rho$  = relativer Volumenanteil der Teilchen in der Suspension

$\kappa_a$  = Leitfähigkeit extrazelluläres Medium (Versuchslösung)

$\kappa_i$  = Leitfähigkeit intrazelluläres Medium (Cytoplasma)

Die Annahme eines geringen Volumenanteils  $\rho$  ermöglicht die Vernachlässigung von  $\rho$  gegen 1 und führt zu folgender Formel:

$$\tau = aC_s \frac{\frac{1}{\kappa_i} + \frac{1}{2\kappa_a}}{1 + aG_s \left[ \frac{1}{\kappa_i} + \frac{1}{2\kappa_a} \right]} \quad (5)$$

Erweitert man diese Gleichung mit  $\left( \begin{array}{c} 1 \\ \frac{1}{\kappa_i} + \frac{1}{2\kappa_a} \\ 1 \\ \frac{1}{\kappa_i} + \frac{1}{2\kappa_a} \end{array} \right)$  und ersetzt  $G_s$  durch  $\frac{\kappa_M}{d}$ ,

kommt man auf folgende Vereinfachung:

$$\tau = \frac{aC_s}{\frac{2\kappa_a\kappa_i}{2\kappa_a + \kappa_i} + a \frac{\kappa_M}{d}} \quad (6)$$

$\kappa_M$  = Leitfähigkeit der Membran

$d$  = Membrandicke

welche konsistent ist mit der von Kotnik (Kotnik et al. 1998) und auch Weaver verwendeten Formel:

$$\tau = \frac{aC_s}{\frac{2\kappa_a\kappa_i}{2\kappa_a + \kappa_i} + \frac{a}{d}\kappa_M} \quad (7)$$

Schoenbach traf die Annahme, dass die Membranleitfähigkeit vernachlässigt werden kann ( $\kappa_M = 0$ ) und kam somit zu folgender Vereinfachung:

$$\tau = aC_s \left( \frac{1}{\kappa_i} + \frac{1}{2\kappa_a} \right) \quad (8)$$

Beide Ansätze wurden ausgehend von der gleichen Ursprungsformel hergeleitet und unterscheiden sich lediglich in der Vernachlässigung der Membranleitfähigkeit.

Ist die Ladezeitkonstante bekannt, lassen sich mit folgender Formel:

$$\Delta V_M = 1.5aE \sin(\alpha) \left[ 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right] \quad (9)$$

$V_M$  = Transmembranpotential / Membranspannung

$a$  = Zellradius

$E$  = externe elektrische Feldstärke

$\alpha$  = relativer Winkel bezogen auf die Richtung des elektrischen Feldes

$t$  = Zeit nach Beginn des elektrischen Pulses

$\tau$  = Ladezeitkonstante

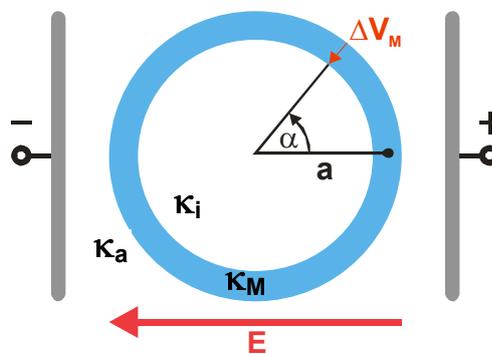


Abbildung 6:

Schema einer Zelle im externen elektrischen Feld zur Erklärung der in den Formeln verwendeten Variablen.

das zeitliche Aufladeverhalten einer Membran sowie die Potentialverteilung einer sphärischen Zelle bei Anlegen eines externen elektrischen Feldes berechnen (s. Abb. 6) (Cole 1928, Cole 1972).

### 1.6.3 Einfluss der Pulslänge

Der starke Einfluss der Pulsdauer auf die kritische Feldstärke konnte in einer Reihe von Experimenten gezeigt werden (Neumann 1989, Chernomordik 1992). Bei Anlegen einer hohen Feldstärke reicht schon eine kurze Pulsdauer aus, um die Membran zu porieren. Im Gegensatz dazu lässt sich bei Einsatz einer entsprechend langen Pulsdauer schon bei geringen Feldstärken die Porierung der Membran erreichen (s. Abb. 7).

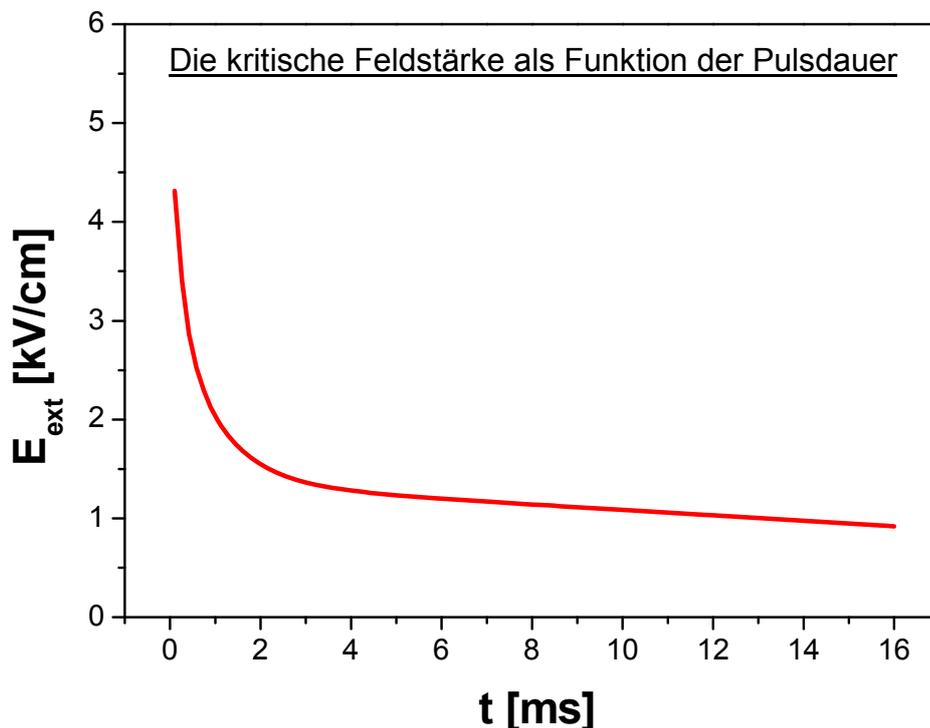


Abbildung 7:

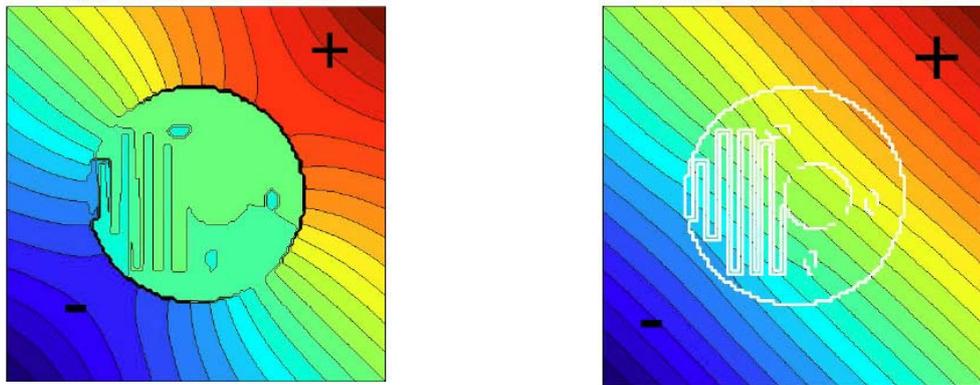
Kritische Feldstärke als Funktion der Pulsdauer (Angepasste Funktion an Daten aus Experimenten mit der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* von Neumann, 1992).

Der Einsatz eines theoretischen Modells bestätigte den starken Einfluss der Dauer des angelegten elektrischen Feldes auf das Verhalten biologischer Membranen (Stewart et al. 2004). Bei diesem Ansatz wurde eine sphärische Zelle mit einer

- passiven (unpermeabilisierten) Membran und
- einer aktiven (permeabilisierten) Membran

modelliert. An beiden Membranen wurde die Feldverteilung bei Pulsdauern von 100 ns und 10  $\mu$ s bei einer elektrischen Feldstärke von 1,0 kV/cm simuliert.

Die Simulation führte zu dem Ergebnis, dass in beiden Fällen die Pulsdauer einen starken Einfluss auf die Verteilung des elektrischen Feldes nimmt. Bei den Kurzpulsen ( $t < 1 \mu\text{s}$ ) drang das elektrische Feld in die Zelle ein, was bei Anlegen eines Langpulses ( $t > 1 \mu\text{s}$ ) nicht beobachtet werden konnte. Eine Erweiterung dieser Berechnung simulierte eine Zelle mit Mitochondrien, endoplasmatischem Reticulum und Zellkern (Gowrishankar et al. 2006). Diese Simulation führte zu dem gleichen Ergebnis. Abbildung 12 zeigt die Feldverteilung bei Applikation eines langen Pulses (links) und eines kurzen Pulses (rechts). Bei der linken Abbildung ist zu erkennen, dass das Feld nicht in die Zelle eindringt. Die rechte Abbildung hingegen zeigt deutlich das Eindringen des elektrischen Feldes in das Zellinnere und die Aufladung der zellinternen Strukturen (weiße Linien) (s. Abb. 8).



**Abbildung 8:**

**Einfluss der Pulsdauer auf die Feldverteilung (links:  $E = 1,1 \text{ kV/cm}$ ,  $t = 100 \mu\text{s}$ , rechts:  $E = 60 \text{ kV/cm}$ ,  $t = 60 \text{ ns}$ ) (entnommen aus Gowrishankar et al. 2006, bearbeitet).**

Die Pulsdauer nimmt einen starken Einfluss auf die Vorgänge an und in der Zelle. Beruhend auf der unterschiedlichen Feldverteilung lassen sich mit Kurzpulsen völlig andere Effekte erzielen, als bei der Applikation eines langen Pulses. Aus diesem Grund soll im weiteren Verlauf zwischen Kurz- und Langpulsanregung unterschieden werden und auf die unterschiedlichen Beobachtungen und Modelle eingegangen werden.

## 1.6.4 Theorien zur Erklärung des feldinduzierten Permeabilitätsanstiegs

### ***Langpulsanregung:***

Die grundlegenden Experimente für die Applikation eines langen Pulses wurden an einer planaren Doppellipidschicht durchgeführt. Beobachtet wurde folgendes Verhalten:

Irreversible Elektroporation:

- Der Membranzusammenbruch ist zufällig.
- Es gibt eine kritische Membranspannung, ab welcher der Zusammenbruch wahrscheinlicher wird.

Reversible Elektroporation:

- Die Membran kann erneut aufgeladen werden.
- Reversibles Verhalten für  $V_M < 1V$ , sonst Übergang zur irreversiblen Elektroporation.

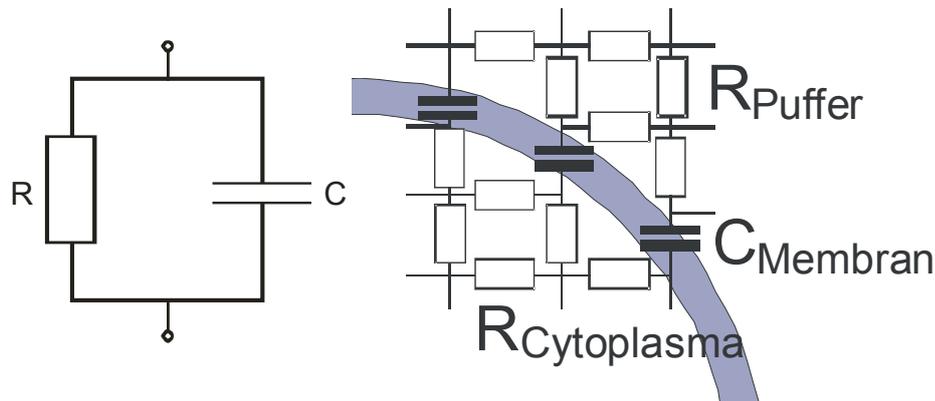
Diese Beobachtungen waren die Grundlage für alle folgenden Experimente, Theorien und Modelle. Ein häufiger experimenteller Ansatz basiert auf der Pulsapplikation in Gegenwart von fluoreszenten Farbstoffen in der extrazellulären Lösung. Es konnte beobachtet werden, dass die Farbstoffe, je nach Wahl der Parameter, die Membran am anodischen Pol der Zelle zuerst passieren. Auf diese Weise konnte nicht nur die Permeabilisierung der Membran gezeigt werden, sondern auch der deutlich asymmetrische Charakter, den die Elektropermeabilisierung aufweist (Tekle et al. 1994, Gabriel und Teissie 1997, Zaharoff 2008). Andere Ansätze zielten darauf ab, die elektrischen Eigenschaften der Membran zu messen (Huang 2003).

In der Literatur existieren viele unterschiedliche Ansätze, um die auftretende Permeabilitätsänderung der Membran als Reaktion auf ein externes elektrisches Feld zu erklären. Die verschiedenen Erklärungsversuche lassen sich einteilen in Modelle, in denen die entstehende Permeabilität der Membran durch Poren erklärt wird, sowie weitere Modelle, welche versuchen, das Verhalten der Membran ohne Porenbildung zu erklären.

Nicht-Poren-Modelle:

I) *Theoretische Beschreibung der Instabilität einer Doppellipid-Membran*  
(*elektromechanischer Kollaps*) (Crowley 1973)

Bei diesem Ansatz wird die Membran als ein Dielektrikum betrachtet, welches zwei leitfähige Lösungen voneinander trennt, so dass sich die Membran wie ein Dielektrikum in einem Kondensator mit parallel geschalteten Widerständen verhält (s. Abb. 9) (Crowley 1973).



**Abbildung 9:**  
**Ersatzschaltbild für eine biologische Membran.**

Der Zusammenbruch der Membran wird hervorgerufen durch einen elektro-mechanischen Kollaps auf Grund der durch das elektrische Feld erzeugten Kompression.

II) *Das Elektrodynamische-Instabilitäts-Modell*

(*Flüssigkeits-Schicht-Modell*) (Michael und O'Neill 1970, Taylor und Michael 1973)

Dieses Modell beschreibt die Membran als eine nichtleitende Lipidschicht, die zwei geladene, leitfähige Flüssigkeiten voneinander trennt. Bei einer planaren Doppellipidschicht finden sich zwei Arten von möglichen Störungen:

- 1) eine symmetrische Störung (bezogen auf die Mittelebene des Dielektrikums), bei der die Flächen des Dielektrikums in Antiphase oszillieren und
- 2) eine antisymmetrische Störung bzw. Welle, bei der die Flächen in Phase oszillieren.

Da eine planare Doppellipidschicht eine mittelmäßige Biegesteifigkeit besitzt, kann man die Annahme treffen, dass die Membran symmetrische Wellen (Verdrängungsmode) entwickelt. Die Bildung antisymmetrischer Wellen (Ausdehnungsmode) wird durch die große Elastizität der Membrankompression verhindert.

### *III) Das Viskoelastische Modell*

*(Wellen-Instabilität) (Steinchen et al. 1982, Maldarelli et al. 1980)*

Bei diesem Modell werden die viskoelastischen Eigenschaften der Membran berücksichtigt. Es wird angenommen, dass die Oberflächenspannung sowie die Viskosität der Membran die Lebensdauer erhöhen. Die Doppellipidschicht wird auf die zeitliche Entwicklung von symmetrischen Wellen hin untersucht.

### *IV) Phasen-Übergangsmodell (Sugar 1979)*

Eine Weiterentwicklung des Elektro-Kompressions-Modells (I) betrachtet die Phasenübergänge innerhalb der Membran mit Hilfe der statistischen Physik. Die Übergänge von einer geringen Fläche pro Lipidmolekül zu einer größeren Fläche pro Lipidmolekül entsprechen dem fest-flüssig Phasenübergang der Membran. Eine erhöhte Membranspannung  $V_M$  führt nach diesem Modell zu einem uneingeschränkten Anstieg der Fläche pro Molekül und damit zum Zerreißen der Membran.

### *V) Betrachtung einer planaren Doppellipidschicht als ein metastabiles System*

*(Volmer et al. 1939, Kramers 1940, Zeldovich 1942)*

Bei diesem Ansatz wird die Membran als metastabiles System betrachtet und es werden kinetische Studien von Phasenübergängen erster Ordnung behandelt. Die Elektropermeabilisierung wird als Bildung einer neuen Phase in Anwesenheit eines elektrischen Feldes betrachtet. Das Zerreißen der Membran wird als Phasenübergang zu einem stabileren Zustand (kinetische Theorie des Phasenübergangs) verstanden.

## *Poren-Modelle:*

### *A) Das transiente-hydrophile-Poren-Modell (Weaver 1996).*

Bei diesem Modell wird die freie Energie der Membran betrachtet. Eine ungestörte Membran besitzt eine Energie  $\Gamma$  pro Flächeneinheit. Aufgebrochene Membranen haben eine geringere freie Energie als intakte Membranen. Wenn eine runde Pore entsteht, gibt es einen Energieanstieg  $\gamma$  durch die Bildung eines kreisförmigen Rands (die Energie entlang des Kreisumfangs, die benötigt wird um eine Pore zu bilden  $\rightarrow$  Grenzenergie), aber es gibt auch eine Reduktion der Energie auf Grund des Verlustes des scheibenförmigen Ausschnitts in der Membranoberfläche.

### *B) Einfluss thermaler Fluktuationen auf die Porenbildung (Litster 1975, Taupin 1975)*

Litster und Taupin schlugen 1975 vor, dass thermische Fluktuationen eine Rolle in der Porenbildung spielen. Es folgte die Annahme, dass sich die entstandenen Poren eher mit Wasser, als mit Ionen füllen. Dadurch wird das Lipid in der Membran durch Wasser in der Pore ersetzt. Dieser Vorgang hat den Effekt, dass sich die Membrankapazität  $C_M$  ändert. Erreicht die Porengröße einen kritischen Radius  $r_c$ , so beginnt die Pore zu expandieren, bis sie ein Limit erreicht und die Membran zerreißt. Bei erhöhtem  $V_M$  steigt die Wahrscheinlichkeit, dass eine kritische Pore gebildet wird.

### *C) Bestimmung der Lebensdauer der Membran*

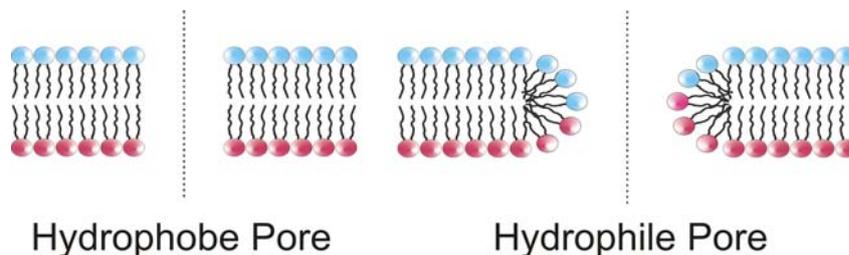
Zahlreiche Ansätze wurden entwickelt, um die Lebensdauer einer Membran zu bestimmen:

- Basierend auf dem Konzept, dass Poren mit Radii gebildet werden, die sich ändern, wenn Wassermoleküle und andere Moleküle sich durch die Pore bewegen (Barnett und Weaver 1991, Freeman et al. 1994, Pastushenko 1979).
- Andere einfachere Ansätze basierend auf der Bildungsrate von kritischen Poren (Weaver 1981).

- Betrachtung der Rolle von verschiedenen Porenrändern und Porenformen (Glaser et al. 1988, Miller 1981, Neumann et al. 1992, Petrov et al. 1980, Sokirko 1994, Weaver 1993).

*D) Bildung von zwei unterschiedlichen Porenarten (Glaser 1988, Weaver 1981, Weaver 1993)*

Es folgte die Idee, dass hydrophobe und hydrophile Poren gebildet werden können. Die Bildung hydrophober Poren ist energetisch günstiger für sehr kleine Radii. Hydrophobe Poren werden spontan durch laterale, thermische Fluktuationen der Lipidmoleküle gebildet. Wird ein kritischer Radius überschritten, wird die Neuordnung der Lipidmoleküle energetisch günstiger und es erfolgt eine Umlagerung zu einer hydrophilen Pore (s. Abb. 10). Folglich ist die Lebensdauer der hydrophoben Poren eher gering und liegt in der Größenordnung der Lipidfluktuationen.



**Abbildung 10:**

**Anordnung der Phospholipidmoleküle bei hydrophoben und hydrophilen Poren.**

Joshi et al. entwickelten ein Modell, welches durch Kopplung an die Smoluchowski-Gleichung Aussagen über die Dynamik der Porenpopulation treffen kann. Das Modell besagt, dass unter entsprechenden Bedingungen das Porenwachstum kontrolliert ist und dass die Membran nach dem elektrischen Puls in eine stabile Verteilung der Poren zurückkehrt (Joshi et al. 2001, Chen et al. 2006).

E) *Asymptotisches Modell der Elektroporation (Neu und Krassowska 1999)*

Ein weiteres Modell der Elektroporation, welches ebenfalls auf der Smoluchowski-Gleichung basiert, wurde von Neu und Krassowska entwickelt. In diesem Modell werden die mathematischen Formulierungen zu einer einfachen Differentialgleichung reduziert, die leicht numerisch zu lösen ist und die eine Näherung der Porendichte angibt (s. Abb.11).

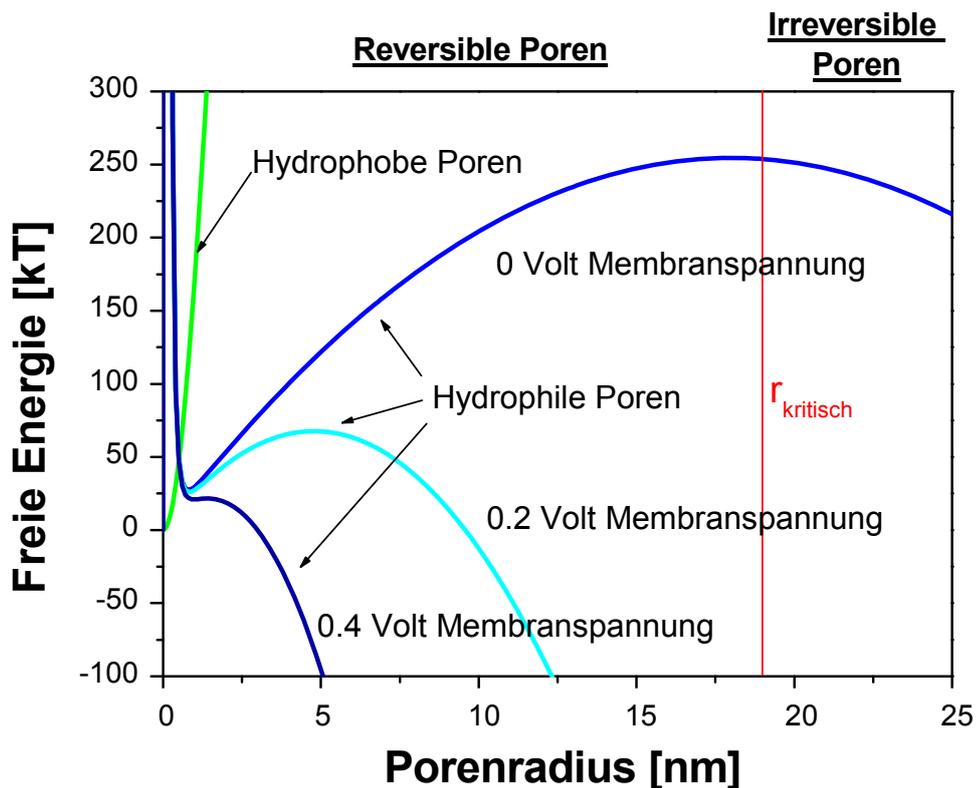


Abbildung 11:

Entwicklung der Porenradii in Abhängigkeit von der freien Energie bei verschiedenen Membranspannungen (entnommen aus Neu und Krassowska 1999, bearbeitet).

Die wichtigste Vereinfachung bei diesem Modell ist die Annahme, dass Poren nicht wachsen. Dies gilt jedoch nur für Nanosekundenpulse und hohe Feldstärken (Vasilkoski et al. 2006), nicht jedoch für lange Pulsdauern und geringere elektrische Felder (Smith und Weaver 2008). Aus diesem Grund entwickelten Krassowska und Filev das Modell weiter.

*F) Modell für die Elektroporation einer einzelnen, sphärischen Zelle (Krassowska und Filev 2007)*

Das erweiterte Modell ermöglicht die Bestimmung des Transmembranpotentials, die Anzahl der Poren und die Verteilung der Porenradii als Funktionen der Zeit und der Position auf der Plasmamembran. Bei diesem Ansatz handelt es sich um das zurzeit am weitesten entwickelte Modell.

***Kurzpulsanregung:***

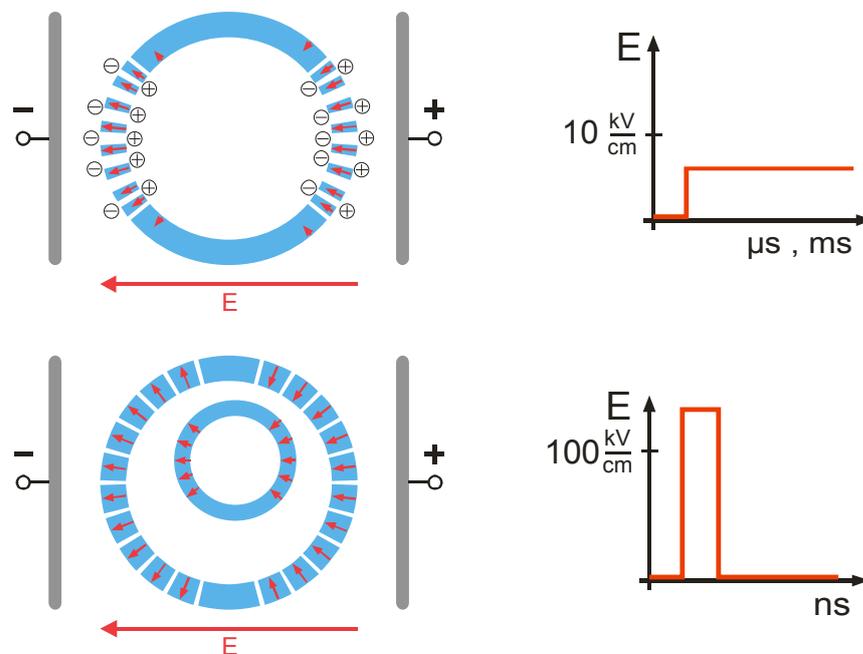
Bei der Applikation von hohen elektrischen Feldern mit Pulsdauern unter 1  $\mu$ s konnten mehrere interessante sekundäre Effekte beobachtet werden. Vernier konnte zeigen, dass die Applikation von Kurzpulsen bei hohen Feldstärken zur Freisetzung intrazellulären Calciums sowie zur Externalisierung von Phosphatidylserin führt (Vernier 2003, Vernier 2004, Vernier 2006). Ein weiterer beobachteter Effekt ist die Schädigung der DNA (Stacey et al. 2003) und die Induktion der Apoptose (Beebe 2002, Beebe 2003). Basierend auf den erzielten Ergebnissen wurde versucht, die Beeinflussung intrazellulärer Strukturen durch Kurzpulsanregung zu erklären.

*a) Intrazelluläre Elektroporation (Schoenbach et al. 2001, Beebe et al. 2003, Vernier et al. 2003)*

Diese Hypothese beruht auf experimentellen Befunden, die gezeigt haben, dass bei Anlegen von Kurzpulsen mit hohen Feldstärken keine signifikante Farbstoffaufnahme (z.B. Propidiumiodid) erfolgte, im Vergleich zu Experimenten mit Langpulsen. Der intrazelluläre Calciumspiegel stieg jedoch an. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass Kurzpulse mit hohen Feldstärken zur Aufladung interner Zellmembranen führen, nicht jedoch der Plasmamembran (s. Abb. 11). Das unterschiedliche Aufladeverhalten wurde mit den individuellen Ladezeitkonstanten erklärt. Organellen besitzen auf Grund ihrer geringen Größe eine geringere Ladezeit als die Plasmamembran. Smith und Weaver widerlegten diese Behauptung jedoch, da bei Kurzpulsen die Membranaufladung unabhängig von der Größe ist (Smith und Weaver 2008, Stewart et al. 2004, Stewart et al. 2005).

b) *Supraelektroporation (Stewart et al. 2004, Smith und Weaver 2008):*

Die Hypothese der Supraelektroporation ist eine Weiterentwicklung der intrazellulären Elektroporation. Bei Anlegen eines Kurzpulses dominiert die Porenbildung den Prozess der Porenvergrößerung deutlich. Das bedeutet, dass die Größe der Poren in der Plasmamembran lediglich zu gering ist, um Moleküle wie Propidiumiodid passieren zu lassen, während kleine Moleküle wie Calcium durchaus durch die porierten Membranen gelangen können (Vasilkoski et al. 2006). Durch Anlegen eines starken elektrischen Feldes mit einem Kurzpuls erfolgt die Porierung aller Membranen. Es werden jedoch nur sogenannte „Nanoporen“ mit einem mittleren Radius von ca. 0,8 nm gebildet (s. Abb. 12).



**Abbildung 12:**

**Vergleich zwischen herkömmlicher Elektroporation (oben) und Supraelektroporation (unten).**

Aktuelle molekulardynamische Simulationen sprechen ebenfalls für dieses Supraelektroporationsmodell (Vernier 2006, Tarek 2005).

c) *Molekulardynamische Simulationen (MD-Simulationen):*

Eine weitere Möglichkeit, die in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat, ist der Einsatz von molekulardynamischen Simulationen. Bei diesem Ansatz wird die Bewegung jedes einzelnen Moleküls verursacht durch ein elektrisches Feld berechnet, unter Berücksichtigung der molekularen Ausdehnung und der Bindungsdeformation. Die Berechnung erfolgt für ein gegebenes System. Das elektrostatische Potential über der Membran, während der Elektroporation, wird berechnet durch Integration der Poisson-Gleichung für die molekulare Ladungsdichte-Verteilung der Membran. MD-Simulationen sind computertechnisch sehr aufwändig und daher im modellierbaren Zeitbereich sowie der Anzahl der simulierten Moleküle begrenzt. Verschiedene Gruppen verwenden MD-Simulationen, um einen besseren Eindruck der Vorgänge während der Elektropermeabilisierung zu erhalten (Tielemann 2003, Tarek 2005, Vernier 2006).

Ein Ansatz, der von Tarek et al. modelliert wurde, deckt eine Zeitspanne von 10 ns ab und betrachtet, unter anderem, eine reine Doppellipidschicht bei Feldstärken von 5 MV/cm und 10 MV/cm.

Das Modell führte zu folgenden Ergebnissen:

- „*Finger*“ aus Wassermolekülen beginnen, von beiden Seiten der Membran, unabhängig von der Feldorientierung, in das hydrophobe Innere der Membran einzudringen (in allen Fällen).
- Bildung von Wasserkanälen, die die Membran durchziehen.
- Polare Lipidkopfgruppen wandern von der Membran-Wasser-Grenzfläche an die Innenseite der Doppellipidschicht und bilden hydrophile Poren, die die Wasserkanäle stabilisieren.
- Bei erhöhter Feldstärke wird die Bildung der „*Wasserfinger*“ und die Wanderung der Kopfgruppen beschleunigt.
- Das Abschalten des elektrischen Feldes ermöglichte es der Membran, sich zu regenerieren.

Dieser Ansatz liefert zahlreiche interessante Ergebnisse, berücksichtigt jedoch nicht die Anwesenheit von Ionen oder zellulären Organellen. Ein weiterer Punkt, der Beachtung finden sollte, ist die Tatsache, dass sich eine planare Doppellipidschicht deutlich von einer biologischen Zellmembran unterscheidet. Eine Plasmamembran besitzt eine räumlich geschlossene Struktur sowie ein Transmembranpotential, das durch zahlreiche Membranproteine aufrecht erhalten wird. Molekulardynamische Simulationen sind dennoch eine gute Methode, um experimentelle Ergebnisse und theoretische Modelle nachzuvollziehen.

## **1.7 Ziel dieser Arbeit**

In dieser Arbeit soll die Membranaufladung, als erster und entscheidender Schritt bei der Elektropermeabilisierung, betrachtet werden. Hierzu werden Membranspannungsänderungen mit Hilfe eines spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffes bei einer zeitlichen Auflösung von 5 ns mittels gepulster Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie (PLFM – Pulsed Laser Fluorescence Microscopy) gemessen. Besonderes Augenmerk soll hierbei auf die Verteilung der Membranspannung entlang der Membran gelegt werden. Das zeitliche Aufladeverhalten einer Membran soll untersucht und es soll geklärt werden, bei welchen Membranspannungen eine erhöhte Permeabilisierung der Membran einsetzt und an welcher Stelle der Membran diese beginnt. Ein weiterer zu untersuchender Punkt ist das Verhalten der Zelle sowie der Membranspannung auf Pulsfolgen unterschiedlicher Feldstärke. Die experimentell ermittelten Daten sollen im Hinblick auf die bestehenden theoretischen Modelle diskutiert werden und eine Bestätigung bzw. einen Ausschluss dieser Theorien ermöglichen. Weiterhin soll der spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6 für das verwendete pflanzliche Zellsystem *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 Wildtyp (BY-2) kalibriert werden, um die Gültigkeit der bislang für diesen Farbstoff verwendeten Umrechnungsmethode von relativen Fluoreszenzänderungen in Membranspannungsänderungen zu überprüfen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Verwendete Organismen**

#### **2.1.1 Zellkulturen**

*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 Wildtyp (BY-2) (Nagata et al. 1992). Bei der ausgewählten Laborzelllinie BY-2 handelt es sich um ein gut charakterisiertes pflanzliches Modellsystem der Biologie, dessen Vorteile für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente vor allem in ihrem kurzen Zellzyklus und der fehlenden störenden Autofluoreszenz des Chlorophylls liegen.

#### **2.1.2 Pflanzen**

*Nicotiana tabacum* L. cv. SR-1

*Nicotiana tabacum* L. cv. Badischer Geudertheimer

### **2.2 Medien, Versuchs- und Stammlösungen**

Alle für diese Arbeit benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) und Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande) bezogen. Sämtliche Enzyme zur Protoplastierung wurden ebenfalls bei Duchefa Biochemie B.V. bestellt. Der Laserfarbstoff Coumarin 47 wurde von Radiant Dyes Laser Accessoires GmbH (Wermelskirchen, Deutschland) bezogen und die beiden spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffe ANNINE-6 und ANNINE-6plus von der Firma Sensitive Dyes GbR (München, Deutschland). Die Medien und Puffer wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und nach Möglichkeit, sofern die Inhaltsstoffe es zuließen, bei 121°C für 15 min autoklaviert. Zur Sterilisierung der Vitamin- und Hormonstammlösung sowie der Patch-Clamp-Versuchslösungen wurde ein Spritzenfilter verwendet. Grundsätzlich wurde bei den Kulturmedien das Hormon immer nach dem Autoklavieren zupipettiert. Auch bei den Protoplastierungslösungen wurden die Enzyme immer frisch abgewogen und den Lösungen zugegeben. Die Osmolarität der Patch-Clamp-Versuchslösungen wurde mit Hilfe eines Osmometers (VAPRO 5520, Wescor) auf die angegebenen Werte eingestellt.

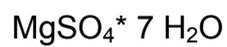
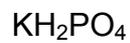
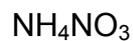
## 2.2.1 Kulturmedien

*Hormon-Stammlösung 5000x (1 g/l in Ethanol)*

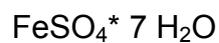
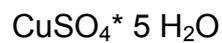
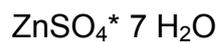
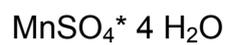
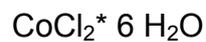
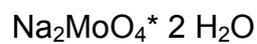
*Vitamin-Stammlösung 1000x (1 g/l in Wasser, Sterilfiltration)*

*Murashige-Skoog Medium (MS) für die BY-2 Plattenkultur:*

- Makroelemente:



- Mikroelemente:



- Hormon

2,4 D

- Vitamine

Thiamin

- Zusätze

Inositol

Saccharose

Wasser dest.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$

- Platten

Phytigel Agar

pH auf 5,8 einstellen

*Murashige-Skoog Medium (MS) für die BY-2 Suspensionskultur:*

- 1x MS Salze
- 30 g/l Saccharose
- 100 mg/l myo-Inositol
- 1 mg/l Thiamin
- 0,2 mg/l Hormon 2,4-D
- 255 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

pH 5 mit KOH einstellen

### **2.2.2 Lösungen**

*Lösungen zur Protoplastierung von SR-1 / Badischer Geudertheimer Tabakprotoplasten:*

Protoplastierungslösung I:

- 0,6 M Sorbitol
- 10 mM KCl

pH 5,8 mit Tris/MES

Autoklavieren

- 5 mg/ml BSA
- 5 mg/ml Macerozym
- 5 mg/ml Cellulase

Resuspensionspuffer:

- 0,6 M Sorbitol
- 10 mM KCl

pH 5,8 mit Tris/MES

*Lösungen zur Protoplastierung von BY-2 Tabakprotoplasten:*

Protoplastierungslösung II:

- 50 mM CaCl<sub>2</sub>
- 10 mM NaAcetat
- 0,25 M Mannitol

pH 5,8 mit MES

Autoklavieren

- 0,01% 2-MercaptoEtOH
- 1% Cellulase
- 0,5% Macerozym
- 0,1% Pektinase
- 0,5% BSA

Protoplastierungslösung III:

- 50 mM CaCl<sub>2</sub>
- 10 mM NaAcetat
- 0,25 M Mannitol

pH 5,8 mit MES

Autoklavieren

- 0,01% 2-MercaptoEtOH
- 2% Cellulase
- 1% Macerozym
- 0,2% Pektinase
- 1% BSA

Waschlösung:

- 50 mM CaCl<sub>2</sub>
- 10 mM NaAcetat
- 0,25 M Mannitol

pH 5,8 mit MES

Autoklavieren

- 0,01 % 2-MercaptoEtOH

MMM-Lösung:

- 15 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,1% (w/v) MES
- 0,5 M Mannitol

pH 5,8 mit KOH

W5-Lösung:

- 154 mM NaCl
- 125 mM CaCl<sub>2</sub>
- 5 mM KCl
- 5 mM Glucose

pH 5,8-6 mit MES

*Lösungen für den Aufreinigungsgradienten nach Albach (Albach 1999, Dissertation):*

Lösung I (Albach):

- 10 mM MES/Tris (pH 5,6)
- 431 mM Saccharose
- 1 mM KCl
- 1 mM CaCl<sub>2</sub>
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>

Lösung III (Albach):

- 0,5 mM MES/Tris (pH 5,6)
- 466 mM Mannitol
- 1 mM KCl
- 1 mM CaCl<sub>2</sub>
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>

Lösung II (Albach):

- 10 mM MES/Tris (pH 5,6)
- 284 mM Saccharose
- 183 mM Mannitol
- 1 mM KCl
- 1 mM CaCl<sub>2</sub>
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>

*Versuchslösungen zur Membranpotentialmessung:*

16 mS-Versuchslösung:

- 125 mM KCl
- 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 150 mM Sorbit
- 1 mM TRIS

pH 7,2

Elektrische Leitfähigkeit 16 mS/cm bei 20°C

*Versuchslösungen zur Elektrophysiologie an BY-2 Protoplasten:*

Badlösung und Pipettenlösung:

- 125 mM KCl
- 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 150 mM Mannit
- 1 mM TRIS

pH 7,2

Elektrische Leitfähigkeit 16 mS/cm bei 20°C.

Mit 1 M Mannitlösung auf 500 mOsm einstellen.

*Sonstige Lösungen:*

Lösung zum Ankeimen der Tabaksamen:

0,2 % KNO<sub>3</sub>

Lösungen für den Farbstofflaser:

Stammlösung:

- 1,4 g Coumarin 47
- 1,2 l Methanol

Oszillator: 450 ml Stammlösung

Vorverstärker: 300 ml Stammlösung + 150 ml Methanol

Hauptverstärker: 450 ml Stammlösung + 900 ml Methanol

## 2.2.3 Verwendete Farbstoffe

### Feldsensitiver Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6:

Bei ANNINE-6 (ANellated hemicyaNINE) handelt es sich um einen amphiphilen, feldsensitiven Fluoreszenzfarbstoff. Auf eine Änderung der Membranspannung reagiert der Farbstoff innerhalb von Pikosekunden mit einer Verschiebung seiner Anregungs- und Emissionsspektren und damit einer Änderung der beobachteten Fluoreszenzintensität. Das Molekül besteht aus einem Anilin als Elektronendonator und Pyridinium als Elektronenakzeptor, die durch 4 Benzolringe miteinander verbunden sind. Durch den phospholipidähnlichen Aufbau lagern sich die Farbstoffmoleküle in umgekehrter Orientierung zwischen die Phospholipidmoleküle der äußeren Schicht einer Doppellipidschicht (s. Abb. 13) (Hübner 2003).

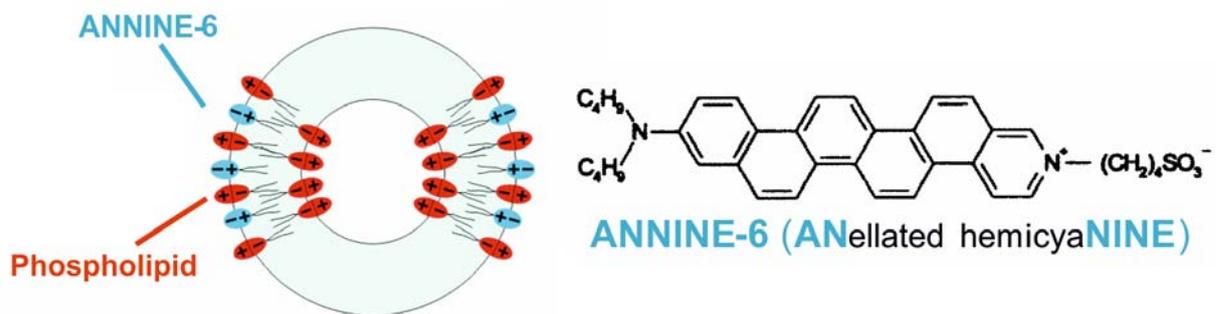
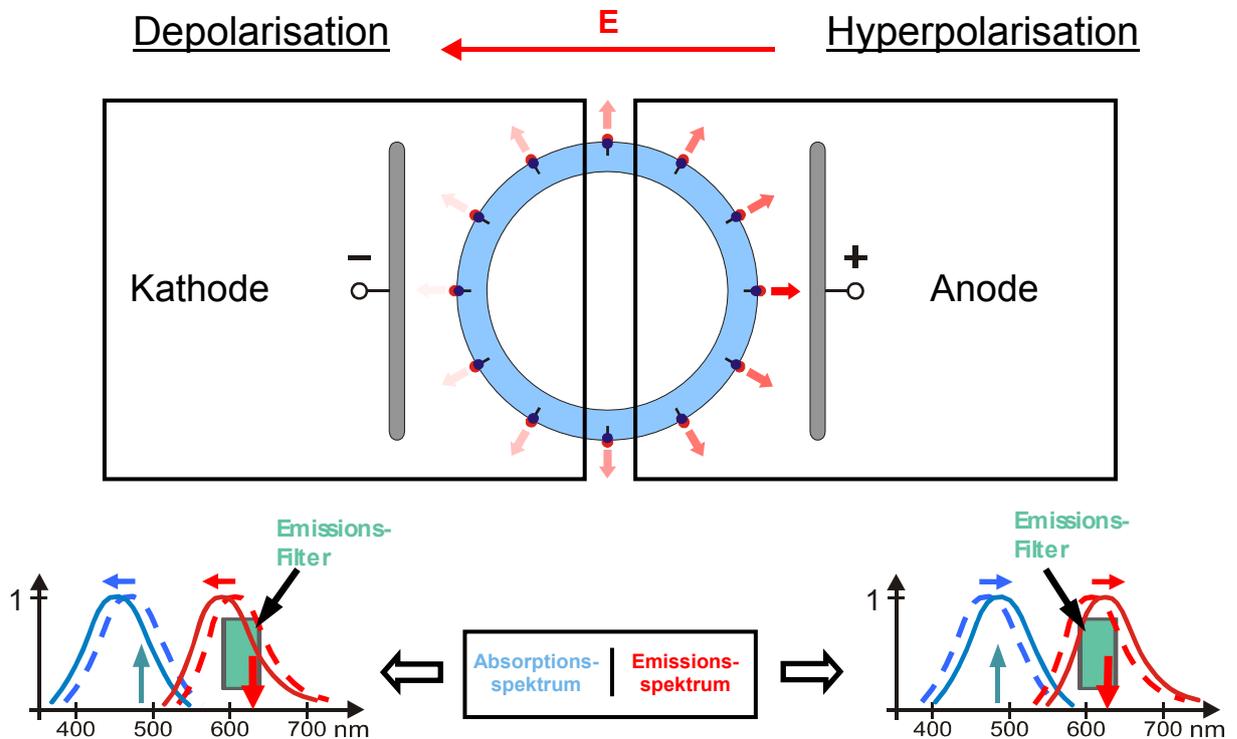


Abbildung 13:

Einlagerung der Farbstoffmoleküle in die äußere Lipidschicht der Membran und Molekülstruktur des spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffes ANNINE-6.

Wird die Membranspannung verändert, erfolgt eine Umverteilung der Ladungen innerhalb des Farbstoffmoleküls. Die daraus resultierende Verschiebung des Absorptions- und Emissionsspektrums wird, innerhalb eines bestimmten Wellenlängenbereichs, durch einen geeigneten Emissionsfilter als Änderung der beobachteten Fluoreszenzintensität sichtbar gemacht. Eine Erhöhung der Membranspannung (Hyperpolarisation) führt zu einer Verschiebung der Spektren zu höheren Wellenlängen und damit zu einer Intensitätszunahme, während die Verringerung (Depolarisation) der Membranspannung zu einer entsprechenden Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen und damit zu einer Intensitätsabnahme führt (s. Abb. 14).

Laut Kuhn et al. beruht die spannungsabhängige Fluoreszenzantwort des Farbstoffes auf einer Verschiebung der Energieniveaus des Moleküls auf Grund des molekularen Stark-Effekts (Elektrochromismus) (Kuhn 2003).



**Abbildung 14:**

**Schematische Darstellung der Reaktion des Farbstoffes auf ein angelegtes elektrisches Feld (feldinduzierte Verschiebung des Absorptions- und Emissionsspektrums).**

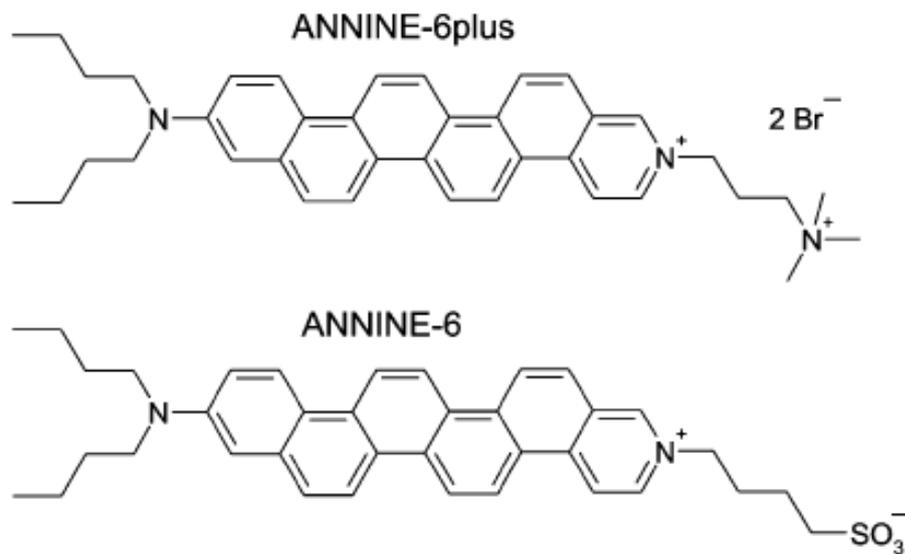
*Ansetzen des Fluoreszenzfarbstoffs ANNINE-6:*

Der Ansatz erfolgte unter der Sterilbank. Zur Herstellung einer Stammlösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml wurden 200 µl 20% Pluronic F-127 in DMSO in eine Glasphiole mit 0,2 mg ANNINE-6 pipettiert und 5 min in einem 30°C warmen Ultraschallbad inkubiert. Die Farbstofflösung wurde sorgfältig auf einem Vortexgerät gemischt und in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden, um auch den restlichen Farbstoff aus der Glasphiole zu lösen, 100 µl 20% Pluronic F-127 DMSO zupipettiert und erneut 5 min in einem 30°C warmen Ultraschallbad inkubiert. Die Farbstofflösung wurde erneut sorgfältig auf einem Vortexgerät gemischt und in das Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die Abtrennung von ungelöstem Farbstoff durch Zentrifugation bei 9800 g für 5 min.

Die Farbstofflösung wurde in 25 µl Aliquots aufgeteilt und im Dunkeln im Kühlschrank bis zur Verwendung aufbewahrt.

*Feldsensitiver Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6plus:*

Bei ANNINE-6plus handelt es sich um ein Derivat von ANNINE-6. Im Gegensatz zu ANNINE-6 weist es eine verbesserte Wasserlöslichkeit auf und zeigt laut Fromherz et al. denselben molekularen Stark-Effekt, wie ANNINE-6 (Fromherz et al. 2008).



**Abbildung 15:**

**Vergleich der Molekülstruktur der Fluoreszenzfarbstoffe ANNINE-6 und ANNINE-6plus (entnommen aus Fromherz et al. 2007).**

Die Unterschiede in den Wasserlöslichkeiten, benötigten Farbstoffkonzentrationen und Fluoreszenzintensitäten beruhen auf Unterschieden in der Molekülstruktur. Das Chromophor von ANNINE-6plus besitzt im Gegensatz zu ANNINE-6 eine zweifach positive Ladung und zwei negativ geladene Bromidionen als Gegenionen (s. Abb. 15).

### *Ansetzen des Fluoreszenzfarbstoffs ANNINE-6plus:*

Der Ansatz erfolgte unter der Sterilbank. Zur Herstellung einer Stammlösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml wurden 100 µl steriles Millipore-Wasser in eine Glasphiole mit 0,1 mg ANNINE-6plus pipettiert und 5 min in einem 30°C warmen Ultraschallbad inkubiert. Die Farbstofflösung wurde sorgfältig auf einem Vortexgerät gemischt und in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Farbstoffreste wurden durch Zugabe von 100 µl sterilem Millipore-Wasser herausgelöst und erneut 5 min in einem 30°C warmen Ultraschallbad inkubiert. Die Farbstofflösung wurde sorgfältig auf einem Vortexgerät gemischt und in das Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Abtrennung von ungelöstem Farbstoff durch Zentrifugation bei 9800 g für 5 min. Die Farbstofflösung wurde in 25 µl Aliquots aufgeteilt und im Dunkeln im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Anzucht der Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum* L. cv. SR-1**

#### **(Petite Havanna) und *Nicotiana tabacum* L. cv. Badischer Geudertheimer**

Die Anzucht der Tabakpflanzen erfolgte nach der ISTA-Methode „Keimfähigkeitstest für Tabak“ (ISTA - International Seed Testing Association). Hierzu wurde eine lichtdurchlässige Dose mit nebelfeuchtem Quarzsand (Firma Glaser, Körnung 0,3 mm - 0,8 mm, gewaschen und gegläht) zur Hälfte befüllt und mit in Wasser getränktem Filterpapier ausgelegt. Kleine Filterpapierkartons wurden in 0,2 %iger KNO<sub>3</sub>-Lösung getränkt und auf das Filterpapier in die Dose gestellt. Das Ausbringen der Tabaksamen auf die mit KNO<sub>3</sub> getränkten Filterpapierkartons erfolgte mit einem mit Wasser befeuchteten Stäbchen. Die Dose wurde mit einem Deckel verschlossen, um die Austrocknung des Keimbehälters zu vermeiden. Nach ca. 5 - 7 Tagen wurden die Keimlinge in eine Erde/Sand-Mischung mit dem Verhältnis 2:1 überführt und unter einer Pflanzenlampe (MegaMan Plantlamp, 15 W) weiter angezogen. Die zur Protoplastierung verwendeten Pflänzchen waren 5 Wochen alt und ca. 4 - 5 cm groß. Die Zahl der Plastochrone betrug zwischen 5 und 7.

### **2.3.2 Protoplastierung der BG-/SR1-Protoplasten aus Tabakmesophyllzellen**

Zur Protoplastierung wurden 5 Wochen alte Pflanzen verwendet. Hierzu wurde die untere Epidermis mehrerer Tabakblätter mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig abgezogen und die Blätter in der Protoplastierungslösung I im Brutschrank bei 25°C im Dunkeln auf einem Schüttler bei 100 Upm 1 h inkubiert. Grobe Blattrückstände wurden nach der Inkubation entfernt. Die Protoplastensuspension wurde in ein 15 ml Falcontube überführt, bei 100 g 5 min abzentrifugiert und das Protoplastenpellet in Resuspensionspuffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Die Aufbewahrung der Protoplasten erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

### **2.3.3 Etablierung einer BY-2 Plattenkultur**

Zur Etablierung der BY-2 Plattenkultur wurden sterile MS-Agar-Platten (mindestens 1 - 2 Tage alt) mit je 2 ml BY-2 Suspensionskultur angeimpft. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und im Dunkeln, bei 25°C im Brutschrank, in einer Kühlschrankbox inkubiert.

### **2.3.4 Etablierung einer BY-2 Suspensionskultur**

Zur Etablierung der BY-2 Suspensionskultur wurden 100 ml Erlenmeyerkolben mit je 30 ml sterilem MS-Medium mit einem BY-2 Zellkallus angeimpft. Der Ansatz erfolgte in zwei Chargen. Hierzu wurden die Kolben gründlich abgeflammt und die Aluminiumfolie mit einer sterilen Pinzette entfernt. Die BY-2 Zellkalli wurden mit einer ausgeglühten Impföse von der Agarplatte in den Kolben mit dem Flüssigmedium überführt. Die Kolben wurden erneut gründlich abgeflammt und mit Aluminiumfolie verschlossen. Die Inkubation der Suspensionskultur erfolgte auf einem Orbitalschüttler im Dunkeln bei 25°C und 160 Upm im Brutschrank.

### **2.3.5 Erhaltungskulturen der BY-2 Tabakzelllinie**

#### *Plattenkultur:*

Zur Erhaltung der BY-2 Plattenkultur wurden 5 kleine Zellkalli mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse auf eine sterile MS-Agar-Platte überführt. Der Ansatz erfolgte in zwei Chargen. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und im Dunkeln, bei 25°C im Brutschrank, in einer Kühlschranksbox inkubiert. Die Subkultivierung erfolgte alle 3 Wochen.

#### *Suspensionskultur:*

Zur Erhaltung der BY-2 Suspensionskultur wurden zwei 100 ml Erlenmeyerkolben mit je 30 ml sterilem MS-Medium mit Hilfe einer serologischen Pipette mit 2 ml BY-2 Suspensionskultur angeimpft. Die Inkubation der Suspensionskultur erfolgte auf einem Schüttler im Dunkeln, bei 25°C und 160 Upm im Brutschrank. Die Subkultivierung erfolgte wöchentlich.

### **2.3.6 Protoplastierung der BY-2 Tabakzelllinie (Plattenkultur)**

#### *Protoplastierungsprotokoll für die Membranpotentialmessungen:*

Zur Protoplastierung der Laborzelllinie wurden 3 Wochen alte Zellen der Plattenkultur verwendet. Hierzu wurden ca. 500 mg BY-2 Zellkalli (Frischgewicht) mit einer ausgeglühten Impföse in Protoplastierlösung II überführt und resuspendiert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 25°C, im Dunkeln, über Nacht. Die Suspension wurde in ein 15 ml Falcontube überführt und bei 100 g für 5 min ohne Bremse abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, aber ca. 1 ml Lösung stehen gelassen. Die Protoplasten wurden vorsichtig, durch leichtes Schwenken, resuspendiert, 5 ml Waschlösung zugegeben und erneut bei 100 g für 5 min ohne Bremse abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und ca. 1 ml zurückgelassen. Nach Zugabe von 1 ml W5 Lösung und sehr vorsichtigem Resuspendieren wurden weitere 5 ml W5 Lösung zugegeben und die Protoplasten erneut bei 100 g für 5 min ohne Bremse abzentrifugiert. Ein weiteres Mal wurde der Überstand verworfen und die Protoplasten in ca. 1 ml zurückgelassenem Überstand resuspendiert.

Nach Zugabe von 5 ml W5 Lösung wurden die Protoplasten 30 min im Kühlschrank inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte erneute Abnahme des Überstandes und Resuspendieren der Protoplasten in einem Rest der Lösung. Nach Zugabe von 5 ml MMM Lösung wurden die Protoplasten erneut abzentrifugiert. Nach diesem Schritt erfolgte die Aufreinigung der Protoplasten mit Hilfe eines diskontinuierlichen Saccharose-Mannitol-Gradienten (2.3.7).

#### *Protoplastierungsprotokoll für die Patch-Clamp-Messungen:*

Für dieses Protoplastierungsprotokoll wurden ebenfalls 3 Wochen alte BY-2 Zellen der Plattenkultur verwendet. Mit einer ausgeglühten Impföse wurden ca. 500 mg BY-2 Zellkalli (Frischgewicht) in Protoplastierungslösung III überführt und resuspendiert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 25°C im Dunkeln für 6 Stunden. Die Suspension wurde in ein 15 ml Falcontube überführt und bei 100 g für 5 min ohne Bremse abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Protoplasten wurden durch leichtes Schwenken mit 5 ml Waschlösung resuspendiert. Erneut wurde bei 100 g für 5 min ohne Bremse abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Protoplasten mit Hilfe eines diskontinuierlichen Saccharose-Mannitol-Gradienten.

#### **2.3.7 Diskontinuierlicher Saccharose-Mannitol-Gradient zur Aufreinigung der Protoplasten (Albach 1999, Dissertation)**

Die Protoplasten wurden vorsichtig in 5 ml Lösung I resuspendiert und mit 5 ml Lösung II überschichtet. Abschließend wurde der Gradient mit 2 ml Lösung III überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte mit einer Kühlzentrifuge bei 100 g für 10 min bei 4°C, ohne Bremse. Verwendet wurde ein Ausschwingrotor. Nach dem Zentrifugationsschritt befand sich die Protoplastenbande zwischen Lösung II und Lösung III und konnte mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 15 ml Falcontube überführt werden. Um die Protoplasten abtrennen zu können, wurden 5 ml W5-Lösung zupipettiert und bei 100 g, 5 min bei 4°C, ohne Bremse abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 2 ml 16 mS-Versuchslösung resuspendiert. Bis zur Verwendung wurden die Protoplasten im Kühlschrank aufbewahrt.

### **2.3.8 Anfärben der BY-2 Tabakzelllinie (Plattenkultur) mit ANNINE-6**

Zur Färbung der Protoplasten wurden 100 µl der aufgereinigten Protoplastensuspension mit 200 µl 16 mS-Versuchslösung verdünnt. Ein Eppendorfreaktionsgefäß mit 25 µl ANNINE-6-Stammlösung wurde im Wasserbad bei 30°C erwärmt, um die Farbstofflösung zu verflüssigen. Anschließend wurden die insgesamt 300 µl Protoplastensuspension zugegeben und sorgfältig resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 7 min bei RT im Dunkeln. Das Waschen der Protoplasten erfolgte durch Zentrifugation bei 100 g für 5 min, bei RT ohne Bremse und anschließendem Resuspendieren des Protoplastenpellets mit 300 µl 16 mS-Versuchslösung. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die Lagerung der Protoplasten erfolgte im Kühlschrank, im Dunkeln.

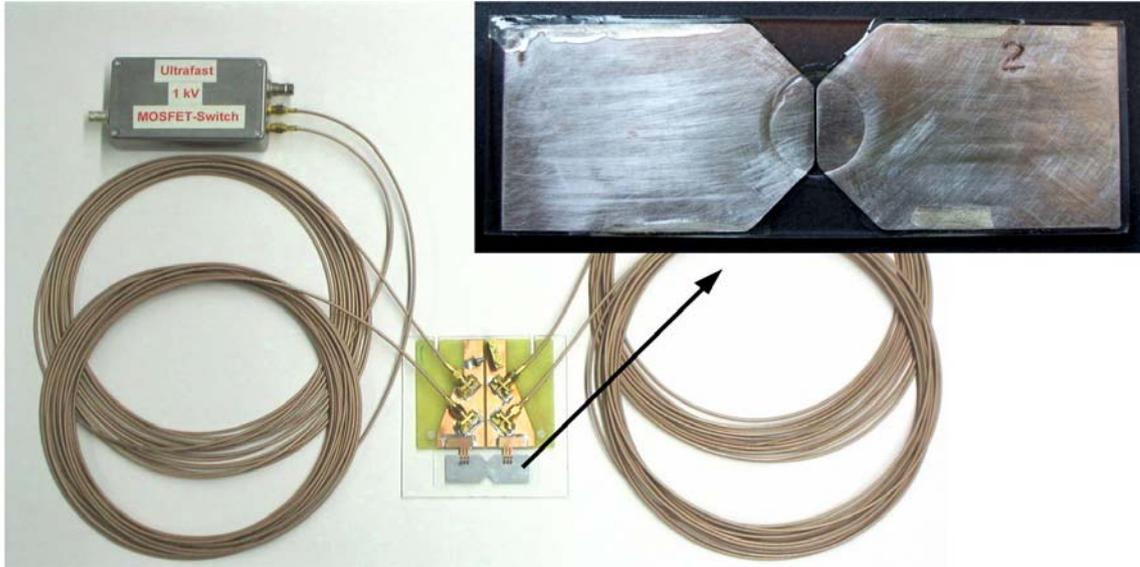
### **2.3.9 Anfärben der BY-2 Tabakzelllinie (Plattenkultur) mit ANNINE-6plus**

Zur Färbung der Protoplasten wurden zu 500 µl der aufgereinigten Protoplastensuspension 25 µl ANNINE-6plus-Stammlösung zupipettiert und sorgfältig resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 4 min bei RT im Dunkeln. Das Waschen der Protoplasten erfolgte durch Zentrifugation bei 100 g für 5 min, bei RT ohne Bremse und anschließendem Resuspendieren des Protoplastenpellets mit 500 µl 16 mS-Versuchslösung. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die Lagerung der Protoplasten erfolgte im Kühlschrank, im Dunkeln.

### **2.3.10 Experimenteller Aufbau zu den Membranaufladungsversuchen mit externer Feldapplikation**

Zur Herstellung einer Mikroelektrodenanordnung (Gap) wurden zwei Titan-Elektroden mit einem Elektrodenabstand von 300 µm und einer Elektrodenhöhe von 100 µm, auf einen Objektträger geklebt (s. Abb. 16). Die Klebefuge wurde unter 5 µm gehalten, um eine homogene Feldverteilung zu gewährleisten. Das externe elektrische Feld wurde durch Anlegen eines Spannungspulses an die Mikroelektrodenanordnung aufgebaut. Zur Generierung der Spannungspulse wurde ein am Mikroskop angebrachter Blumlein-Generator verwendet (s. Abb. 16, 17) (Blumlein 1941).

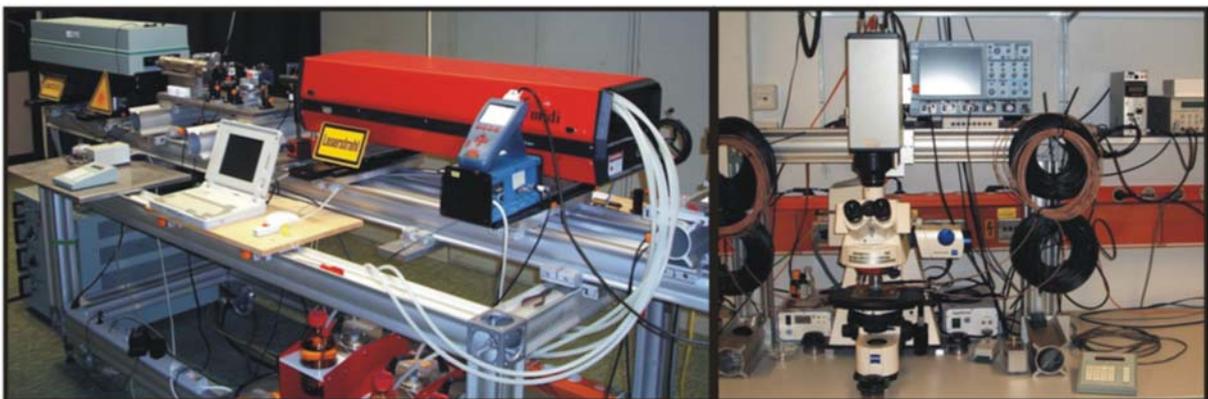
Durch Variation der Kabellänge der Blumleinleitung ( $50 \Omega$ ) war es möglich, die Pulslänge zu verändern. Für die durchgeführten Experimente wurden Rechteckpulse mit einer Pulsdauer von 100 ns und 1  $\mu$ s gewählt.



**Abbildung 16:**

**Pulsgenerator mit Blumlein-Leitungen und Mikroelektrodenanordnung mit einem Elektrodenabstand von 300  $\mu$ m zur Erzeugung des externen elektrischen Feldes.**

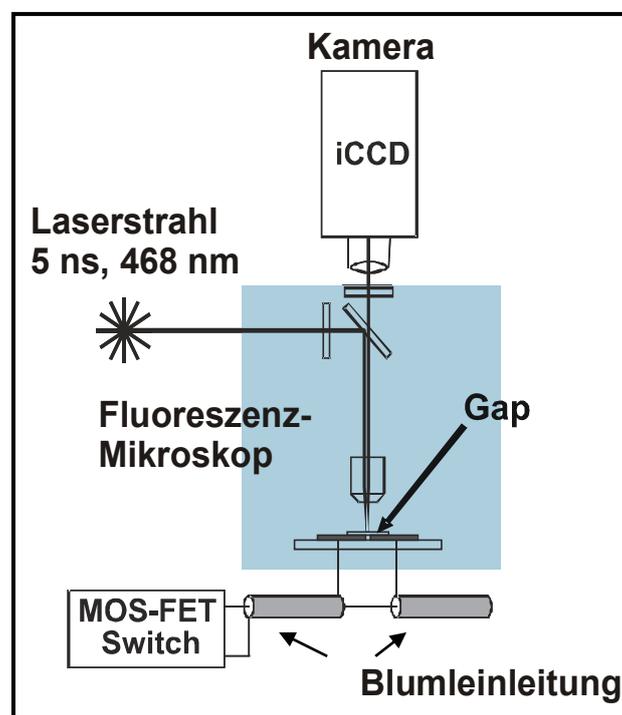
Zur Farbstoffanregung wurde ein Laserpuls verwendet, welcher durch einen computergesteuerten Farbstofflaser (DL-midi, Radiant Dyes Laser Accessoires GmbH, Wermelskirchen, Deutschland) erzeugt wurde (s. Abb. 17). Der Farbstofflaser wurde durch einen frequenzverdreifachten Nd:YAG Laser (PL7000, Continuum, Santa Clara, CA) gepumpt.



**Abbildung 17:**

**Lasersystem (links) und Fluoreszenzmikroskop mit Pulsgenerator, Oszilloskop und Steuerung (rechts).**

Als Laserfarbstoff wurde Coumarin 47 verwendet und eine Ausgangswellenlänge von 468 nm gewählt. Die Anregungswellenlänge wurde möglichst langwellig gewählt, da die Spannungssensitivität des Farbstoffs bei höheren Wellenlängen zunimmt, die Effizienz des Laserfarbstoffs jedoch bei Wellenlängen größer als 470 nm deutlich zurückgeht. Die Pulsdauer des Lasers betrug 5 ns (FWHM) und ermöglichte die hohe zeitliche Auflösung der durchgeführten Experimente. Mit Hilfe eines Lichtwellenleiters wurde der Laserpuls zum Fluoreszenz-Mikroskop (Axioplan2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) geleitet und auf die sich zwischen den Elektroden befindlichen Protoplasten schwach fokussiert.



**Abbildung 18:**

**Schematischer Aufbau des Setups zur zeitaufgelösten Messung der Membranspannungsänderung.**

Um die Anregung der Farbstoffmoleküle durch Streulicht zu vermeiden und die Fluoreszenz im Emissionsspektrum des Farbstoffs betrachten zu können, wurde ein Anregungs-/Emissionsfilter in Verbindung mit einem Strahlteiler verwendet.

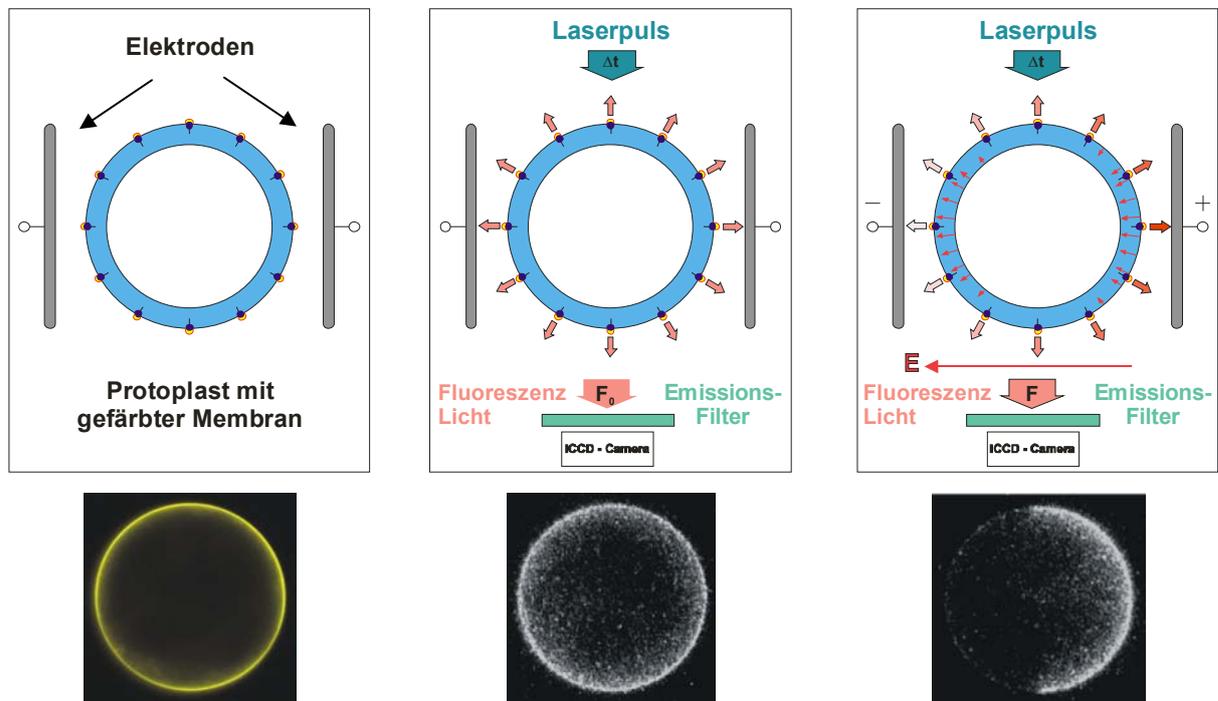
Der Anregungsfilter besitzt eine durchschnittliche Transmission von 75 % bei 450 - 490 nm, während der Emissionsfilter eine Transmission von mehr als 80 % im Bereich von 560 - 650 nm aufweist.

Das durch den Emissionsfilter transmittierte Fluoreszenzlicht wurde durch eine schnelle 12bit iCCD Kamera (Hochgeschwindigkeits-Bildverstärkerkamera, PCO DiCAM Pro, PCO AG, Kelheim, Deutschland) mit einer Auflösung von 1280x1024 Pixeln registriert. Die Belichtungszeit wurde für alle Versuche auf 20  $\mu$ s eingestellt. Die Synchronisation des Laser- und Spannungspulses erfolgte mit Hilfe eines schnellen Halbleiter MOSFET-Schalters (DE275-102N06A, IXYS RF, Fort Collins, CO) mit einer maximalen Sperrspannung von 1000 V. Bei Anlegen der maximalen Spannung an die Elektrodenanordnung (Elektrodenabstand 300  $\mu$ m) kann daher bei angepasster Last eine maximale Feldstärke von 33,3 kV/cm erreicht werden. Um die Pulsformen des Laser- und Spannungspulses aufzuzeichnen wurde ein digitales Oszilloskop mit einer Abtastrate von 1 GHz verwendet (WR6100A, LeCroy Corp., Chestnut Ridge, NY). Der Laser wurde im single-shot-Modus mit externer Triggerung betrieben. Die Triggerquelle (Laserpuls) wurde mit dem Spannungspuls synchronisiert. Die zeitliche Differenz zwischen dem Spannungs- und Laserpuls wurde mit Hilfe eines Delay-Generators (Four Channel digital delay/Pulse generator, Model 535, Stanford Research Systems, Inc.) eingestellt, wobei alle systematischen Verzögerungen in Betracht gezogen wurden.

### **2.3.11 Membranaufladungsversuche mit Tabak-Protoplasten**

Zur Durchführung der Membranaufladungsversuche wurde ein rundes Deckglas (11 mm) mit Hilfe von Druckluft gereinigt und mittig auf dem Spalt der Mikroelektrodenanordnung platziert. Anschließend wurden 10  $\mu$ l 16 mS-Versuchslösung an den spaltseitigen Deckglasrand pipettiert und mit einem fusselfreien Papiertuch durch den Elektrodenspalt gezogen. Mit einer abgeschnittenen Spitze wurden 7  $\mu$ l der gefärbten Protoplastensuspension vor den Spalt pipettiert und ebenfalls durch ein fusselfreies Tuch zwischen die Elektroden gezogen. Das Deckglas wurde mit Paraffinöl versiegelt, um eventuelle durch Verdunstung verursachte Protoplastenbewegung zu vermeiden. Die vorbereitete Mikroelektrodenanordnung (s. Abb. 16) wurde in die Aufnahme auf dem Mikroskoptisch geklemmt und mit Hilfe der beiden Klammern kontaktiert.

Die Protoplasten wurden mit 600-facher Vergrößerung beobachtet. Bei der Wahl der Protoplasten wurde auf eine homogene Färbung Wert gelegt.



**Abbildung 19:**

**Schema zur Messung von Membranspannungsänderungen mit Hilfe des spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffs ANNINE-6.**

Im Fluoreszenzlicht wurde auf die Membran eines gleichmässig gefärbten Protoplasten fokussiert (s. Abb. 19 links). Anschließend erfolgte die Aufnahme der Bilder (Anzahl abhängig von Versuch) mit Hilfe der Bildverstärkerkamera. Die ersten beiden Bilder wurden als Referenz ohne angelegtes elektrisches Feld aufgenommen. Diese als  $F_0$  bezeichnete Grundfluoreszenz repräsentiert das natürliche Transmembranpotential der Protoplasten (s. Abb. 19 Mitte). Das darauf folgende Bild wurde zu einem frei wählbaren Zeitpunkt  $t$  während des Anliegens des elektrischen Feldes aufgenommen. Dieses Bild zeigt die Verteilung der Fluoreszenzintensität  $F$  zum Zeitpunkt  $t$  in Abhängigkeit von der externen elektrischen Feldstärke  $E$  (s. Abb. 19 rechts). Anschließend wurde die Mikroelektrodenanordnung entfernt und mit 70% Ethanol und Druckluft gründlich gereinigt.

### 2.3.12 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 erstmals von Neher und Sakmann beschrieben (Neher und Sakmann 1976). Diese Technik ermöglicht es unter anderem, das elektrische Verhalten von einzelnen Membranproteinen zu beobachten.

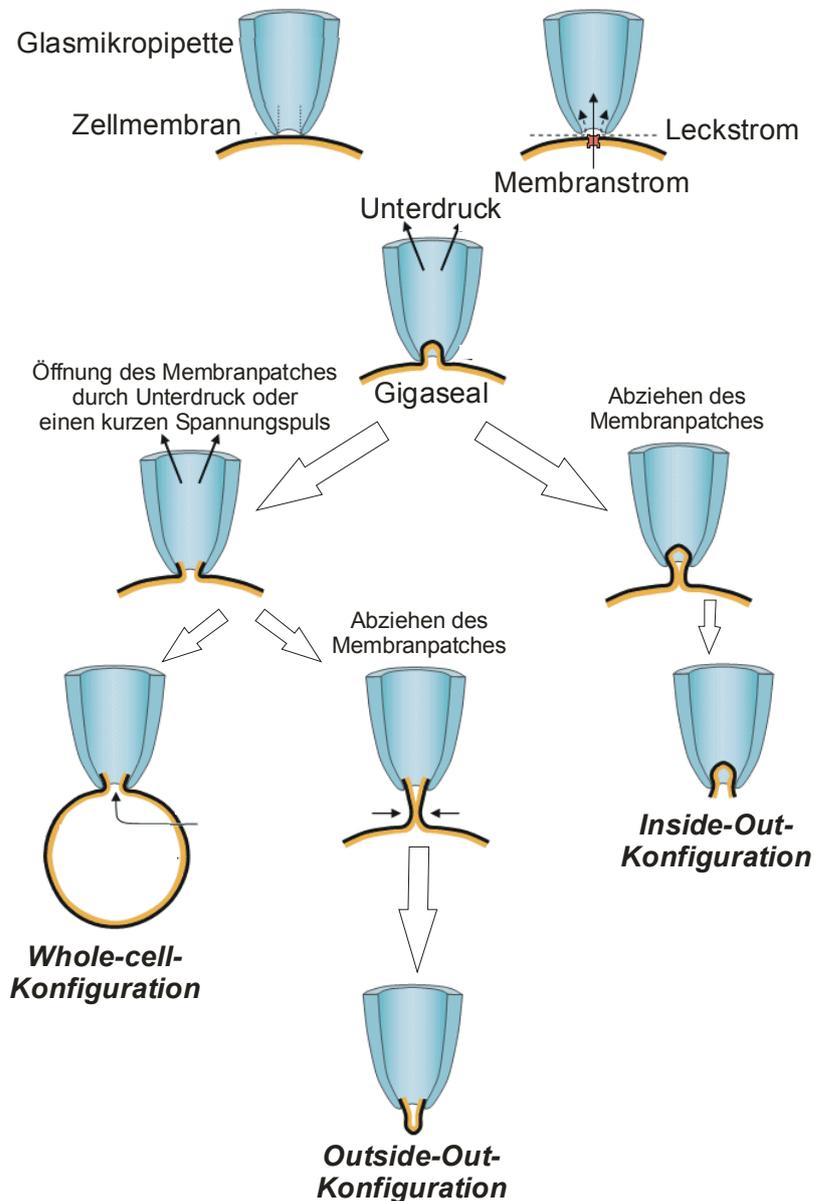


Abbildung 20: Schema zur Patch-Clamp-Technik und den möglichen Konfigurationen.

Das Aufsetzen einer Glasmikropipette (Messelektrode) mit sehr kleiner Pipettenöffnung (bis zu 1  $\mu\text{m}$ ) ermöglicht es den Strom, der durch einzelne Ionenkanäle durch die Zellmembran fließt, zu messen (Größenordnung: Picoampere). Um Leckströme vernachlässigen zu können, wird ein hoher Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Membran in der Größenordnung von 1 G $\Omega$  benötigt.

Man spricht daher auch von einem sogenannten *Gigaseal*. Die aufgesetzte Glasmikropipette (Messlektrode) dient nicht nur zur Messung der Ionenströme, sondern auch der Einstellung der Haltespannung (Spannung, auf der die Plasmamembran der Zelle gehalten wird). Eine zweite Elektrode (Badelektrode) wird in die Badlösung getaucht. Die Patchpipette wird an die Membran herangeführt und mit Hilfe eines leichten Unterdrucks der Kontakt hergestellt. Im Idealfall erhält man einen hohen Abdichtwiderstand. Das bedeutet, dass sich zwischen dem Inneren der Messelektrode und der Badlösung ein elektrischer Widerstand von mehreren Gigaohm aufbaut. Wird ein *Gigaseal* erreicht, befindet sich die Anordnung in der sogenannten *Cell-Attached-Konfiguration*. Der hohe Abdichtwiderstand führt dazu, dass ein Strom, der durch einen Ionenkanal innerhalb des Membranpatches fließt, auch durch die Glasmikropipette fließen muss.

Ausgehend von der *Cell-Attached-Konfiguration* lassen sich nun weitere Konfigurationen erreichen (s. Abb. 20):

- 1) Durch Anlegen von Unterdruck oder mit Hilfe von kurzen Spannungspulsen ist es möglich, den *Patch* zu öffnen. Bleibt der *Gigaseal* erhalten, befindet man sich nun in der *Whole-Cell-Konfiguration*, bei der die integrierten Ströme der gesamten Zellmembran gemessen werden.
- 2) Wird der *Patch* nicht geöffnet, sondern die Mikropipette abgelöst, löst sich auch der Membranteil innerhalb der Pipette mit ab. Das bedeutet, dass die innere Schicht der Membran nun in die Badlösung zeigt und die äußere Membranschicht in die Glaspipette. Diese Konfiguration wird als *Inside-Out* bezeichnet und ermöglicht das Verhalten der Ionenkanäle in Abhängigkeit der Cytosolzusammensetzung zu untersuchen.
- 3) Ausgehend von der *Whole-Cell-Konfiguration* (1) gelangt man in die *Outside-Out-Konfiguration*, indem man die Pipette nach Öffnen des Membranpatches langsam von der Zelle abzieht. Der *Patch* löst sich von der Membran ab und schließt sich über der Pipettenöffnung. Nun ist das Membranäußere der Badlösung zugewandt und das Membraninnere der Glasmikropipette. Diese Konfiguration ermöglicht, das Verhalten der Ionenkanäle in Abhängigkeit der extrazellulären Lösung zu untersuchen.

### **2.3.13 Experimenteller Aufbau zu den Patch-Clamp-Versuchen**

Für die Patch-Clamp-Messungen wurde ein Inverses Mikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) verwendet, welches auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgestellt wurde. Um den Aufbau elektrisch abzuschirmen, wurde ein Faraday-Käfig verwendet. Die Positionierung der Patchpipette erfolgte mittels eines Mikromanipulators (MP-285, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) mit Grob- und Feintrieb, an dem der Pipettenhalter und der Vorverstärker befestigt wurden. Die vom Vorverstärker gemessenen Signale wurden durch ein abgeschirmtes Kabel zum Patch-Clamp-Verstärker (EPC 10 USB, HEKA, Lambrecht, Deutschland) geleitet. Die Steuerung der angelegten Parameter bzw. der Protokolle, sowie die Verarbeitung der erhaltenen Daten, erfolgte am Computer mittels der HEKA-PatchMaster-Software. Um die Pulsformen des Laser- und Spannungspulses aufzuzeichnen, wurde dasselbe digitale Oszilloskop, wie für die Membranaufladungsversuche verwendet. Eine Mikroskopkamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) ermöglichte es, den Patchvorgang über einen Monitor zu beobachten. Die Steuerung der Kamera, sowie des Mikroskops erfolgte mittels der AxioVision Software Rel. 4.5 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland). Für den Bau der Messkammer wurde eine kleine Kunststoff-Petrischale ( $\varnothing = 35$  mm) verwendet. Mit einem heißen Spatel wurde in der Mitte der Schale ein kleines Quadrat herausgeschmolzen und von unten ein Deckglas über die Öffnung geklebt. Dieser Aufbau ermöglichte eine saubere optische Aufnahme der Protoplasten, was durch das Plastik hindurch nicht gewährleistet war. Um dem Mikromanipulator eine größere Bewegungsfreiheit zu ermöglichen, wurde auch am Rand der Petrischale ein kleines Stück herausgeschmolzen. Eine speziell angefertigte auf dem Kreuztisch montierte mikroskopbasierende Halterung ermöglichte das Fixieren der Messkammer unter dem Mikroskop. Als Badelektrode wurde ein chlorierter Silberdraht verwendet, welcher mit einer kleinen Klammer an der Messkammer fixiert wurde. Zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes und zur Aufnahme der Fluoreszenzintensitäten, wurden dasselbe Lasersystem und dieselbe Kamera verwendet, wie zur Messung der Membranspannung. Auch bei diesem Aufbau wurde die Triggerquelle (Laserpuls) mit dem Spannungspuls synchronisiert.

Die zeitliche Differenz zwischen dem Spannungs- und Laserpuls wurde ebenfalls mit Hilfe eines Delay-Generators (Four Channel digital delay/Pulse generator, Model 535, Stanford Research Systems, Inc.) eingestellt, wobei alle systematischen Verzögerungen in Betracht gezogen wurden. Zusätzlich musste der Patch-Clamp-Verstärker mit Hilfe der Steuerungssoftware noch auf externe Triggerung umgestellt werden.

### **2.3.14 Patch-Clamp-Versuche an Tabak-Protoplasten**

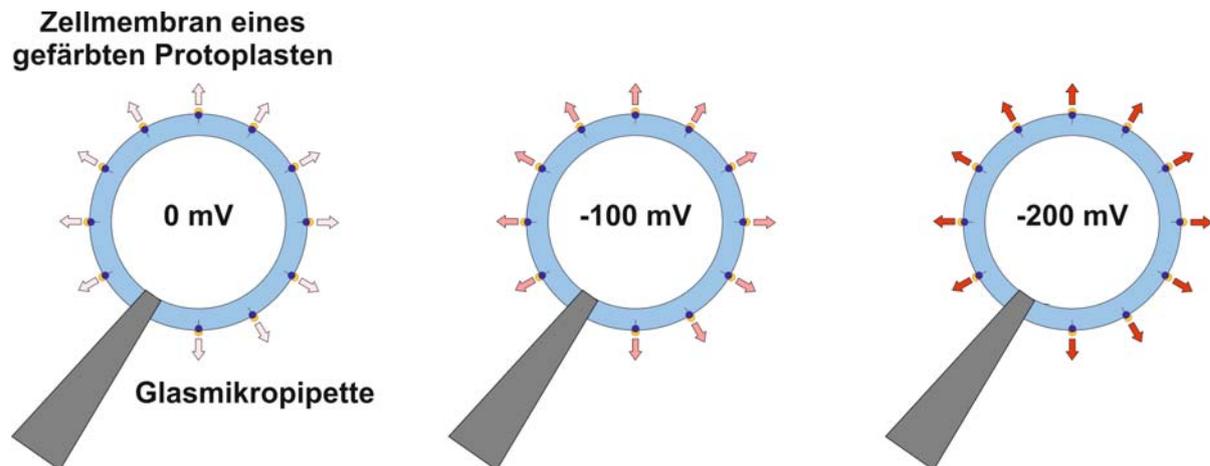
#### *Ziehen der Glasmikropipetten:*

Zum Ziehen der Glasmikropipetten wurden Kapillaren aus Borsilikatglas (1,5 – 1,8 x 100MM, Kimble, Vineland, NJ, USA) verwendet. Die Kapillaren wurden in ein vertikales Pipettenziehgerät (Modell PE-21, Narishige, Tokyo, Japan) eingespannt und in zwei Schritten ausgezogen. Die Mikropipetten wurden vor jedem Versuch frisch gezogen und mit Hilfe einer Mikroforge (CPM-2, Scientific Instruments Inc.) hitzepoliert. Dieser Schritt ist nötig, um einen glatten Rand an der Pipettenöffnung zu erzeugen.

#### *Patch-Clamp-Messung:*

Für die Messungen wurde eine Messkammer mit der Badlösung befüllt, die Badelektrode eingetaucht und mit einer Klammer an der Kammer befestigt. Danach wurden 10 µl gefärbte Protoplasten vorsichtig in die Mitte der Kammer pipettiert und gewartet, bis sich die Protoplasten abgesetzt hatten. Eine Glasmikropipette wurde mit sterilfiltrierter Pipettenlösung gefüllt und der mit Silberchlorid beschichtete Silberdraht in die Pipette eingeführt. Anschließend wurde die Pipette in den Pipettenhalter eingespannt. Nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurden die Spannungsoffsets abgeglichen und der Pipetten-Widerstand gemessen, der im Bereich von etwa 3 – 5 MΩ liegen sollte. Anschließend wurde ein vitaler Protoplast mit einem schön gefärbten Membranring in den Fokus gebracht und die Patchpipette mit Hilfe des Mikromanipulators an die Membran des Protoplasten angenähert. Durch die Verwendung eines Saugschlauches konnte ein geringer Unterdruck an die Pipette angelegt und der Protoplast vorsichtig angesaugt werden. Der Abdichtwiderstand wurde mit Hilfe der Software beobachtet.

Wurde ein Gigaseal erreicht, erfolgte der Versuch, von der *Cell-Attached-Konfiguration* in die *Whole-Cell-Konfiguration* zu gelangen. Das Durchbrechen des Membranpatches erfolgte durch Anlegen kurzer Spannungspulse und eventuell durch zusätzlichen leichten Unterdruck. Nach einer kurzen Wartezeit, um den Austausch von Cytoplasma und Pipettenlösung zu gewährleisten, erfolgte die Messung.



**Abbildung 21:**

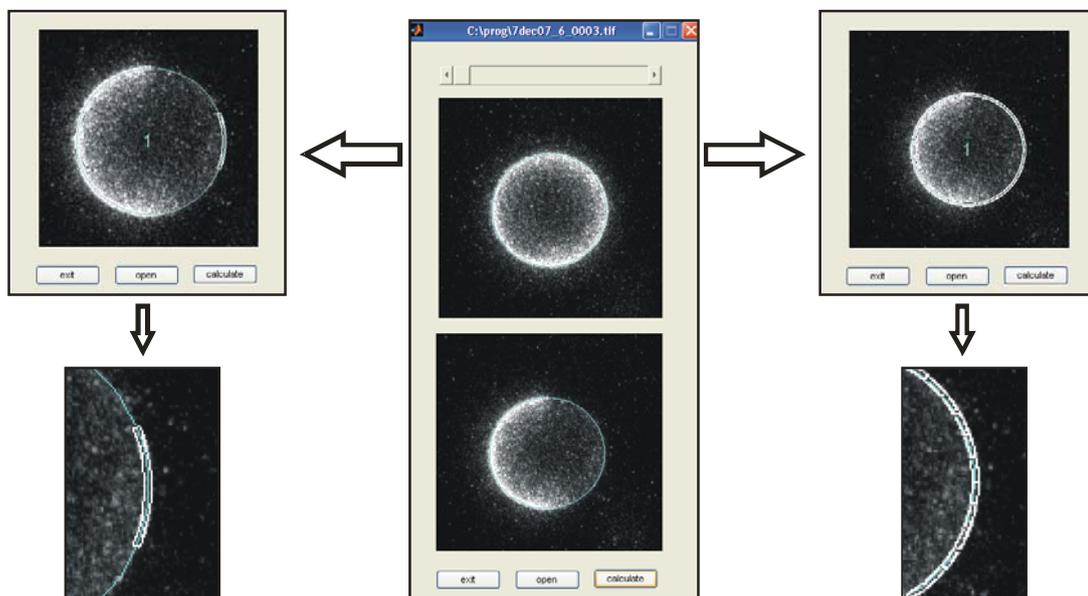
**Schema zur Kalibrierung des ANNINE-6 Farbstoffes in der Whole-Cell Konfiguration mittels der Patch-Clamp-Technik.**

Hierzu wurde eine Kommandospannung von 0 mV angelegt und ein Bild von der Fluoreszenzintensität aufgenommen. Angelegt wurden Rechteckpulse mit einer Pulsdauer von 10 ms. Die Aufnahme des Bildes erfolgte kurz (ca. 50  $\mu$ s) vor Ende des 10 ms-Spannungspulses, um eine vollständige Aufladung der Membran zu gewährleisten. Anschließend wurde eine Reihe von Spannungen im Bereich von -800 mV bis 800 mV angelegt und bei jeder Spannung ein Bild der Fluoreszenzintensitätsverteilung aufgenommen (s. Abb. 21).

### 2.3.15 Auswertung der Fluoreszenzbilder

Zur Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen wurde ein Bildanalyse-Programm verwendet, das auf der MATLAB Software (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) basiert. Nach Korrektur des Hintergrundes wurde die Fluoreszenzintensität  $F$ , integriert über eine bestimmte Fläche, durch die korrespondierende Fluoreszenzintensität  $F_0$  geteilt. Als Ergebnis erhält man die ortsabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung  $F/F_0$ .

**Auswertung der Polbereiche    Erstellen der Pixelmaske    Auswertung der azimuthalen Verteilung**



**Abbildung 22:**

**Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität durch die Auswertesoftware unter Verwendung verschiedener Pixelmasken.**

Die durchschnittliche Fluoreszenzintensitätsänderung an den Polen wurde unter Verwendung einer Pixelmaske, die der Kontur der Membran in einem Winkelbereich von  $\pm 22,5^\circ$  folgte, berechnet. Um die Maske zu erstellen, wurde ein Kreis mit Radius  $r$  über den Membranring einer Zelle mit Fluoreszenz  $F_0$  gelegt. Nach diesem Schritt wurden zwei kreisförmige Pixelmasken erstellt mit einer radialen Ausdehnung von  $dr = r \pm \Delta r$ , wobei  $\Delta r$  auf 3 Pixel gesetzt wurde (s. Abb. 22, Mitte).

Die relative Fluoreszenzintensität wurde innerhalb der zirkulären Masken in einem azimuthalen Winkelintervall von  $\Delta\theta = \pm \pi/8$ , bezogen auf die Pole der Zelle, gemittelt (s. Abb. 22 links). Auf diese Art und Weise erhält man die mittlere Fluoreszenzintensitätsänderung  $F/F_0(E, \Delta\theta, t)$  zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t$  am anodischen und kathodischen Pol, in Abhängigkeit von der angelegten Feldstärke  $E$ . Für die Auswertung der azimuthalen Verteilung der Membranspannungsänderung sowie der Patch-Clamp-Aufnahmen, wurde eine entsprechende Methode verwendet, jedoch erfolgte die Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität in Winkelsegmenten von  $\Delta\theta = 10^\circ$  entlang des Membranringes (s. Abb. 22 rechts). Die auf diesem Weg erhaltenen relativen Fluoreszenzänderungen wurden unter Verwendung einer an Blutegelneuronen erstellten Kalibrierkurve des spannungssensitiven Farbstoffs ANNINE-6 (Kuhn et al. 2003) in Membranspannungswerte umgerechnet. Die Weiterverarbeitung der gewonnenen Daten erfolgte mittels der OriginPro 8 Software (OriginLab Corporation).

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Vorversuche zur systematischen Fehlerbetrachtung**

Im Vorfeld zu den Messungen zur Membranaufladung durch externe elektrische Feldapplikation wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um systematische Fehler der Mess- und Auswertemethode ausschließen zu können. Hierzu erfolgte eine Variation der Anregungswellenlänge sowie der applizierten Laserenergie. Des Weiteren wurden die Fluoreszenzfarbstoffe auf ihre Sensitivität und ihr Bleichverhalten, sowie der Einfluss der verwendeten pflanzlichen Systeme auf die gemessene relative Fluoreszenzintensitätsänderung, untersucht. Zudem wurde die zur Auswertung verwendete Software auf systematische Einflüsse hin überprüft.

#### **3.1.1 Auswirkungen der Darstellung der theoretischen Ladezeitkonstanten auf das Aufladeverhalten biologischer Membranen**

Um den Einfluss der theoretischen Ladezeitkonstanten auf das Aufladeverhalten biologischer Membranen zu ermitteln, wurden die in der Literatur bekannten Formeln (Gowrishankar, Stewart und Weaver 2006, Schoenbach et al. 1997, s. a. Formel 7, 8, 9) zur Berechnung der Membranaufladung verwendet. Unter Berücksichtigung von für BY-2 Zellen experimentell ermittelten Werten (Sukhorukov et al. 2007) konnte die zeitliche Entwicklung der Membranspannung für BY-2 Zellen näherungsweise berechnet und der Vergleich der Ladezeitkonstanten ermöglicht werden. Die Formel nach Weaver berücksichtigt die Membrandicke sowie die Leitfähigkeit der Membran, wohingegen der Ansatz nach Schoenbach eine Membrandicke von 5 nm und eine vernachlässigbare Membranleitfähigkeit voraussetzt. Eine Variation der Membrandicke bei Formel (7) ermöglichte es, deren Einfluss auf das Aufladeverhalten zu ermitteln. Die Auswertung der berechneten Aufladekurven erlaubt es, den Zeitpunkt nach Beginn eines Spannungspulses, zu dem die Membranspannung einen stationären Zustand erreicht hat, zu bestimmen. Des Weiteren konnte der frühest mögliche Zeitpunkt der Farbstoffanregung, bei dem die Membranspannung nahezu den stationären Endwert erreicht hat, für die Durchführung der nachfolgenden Experimente bestimmt werden.

Die Berechnung der zeitlichen Membranspannungsverläufe (s. Abb. 23) erfolgte mit folgenden Parametern:

Zellradius  $a = 20 \mu\text{m}$

Externe Feldstärke  $E = 0,3 \text{ kV/cm}$  bzw.  $0,15 \text{ kV/cm}$

$\sin(\alpha) = 0$

Zeitpunkt nach Anlegen des Spannungspulses  $t = 1 - 2000 \text{ ns}$

Berechnung nach Weaver (Formel 9, 7) :

$$C_s = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{d} \quad \text{mit} \quad \epsilon_r = 5, \quad \epsilon_0 = 8,8542 \cdot 10^{-12} \frac{\text{As}}{\text{Vm}} \quad \text{und} \quad d = 10 \text{ nm} \text{ bzw. } 7,5 \text{ nm}$$

$\kappa_a = 16 \text{ mS/cm}$  (elektrische Leitfähigkeit der Versuchslösung)

$\kappa_i = 4 \text{ mS/cm}$  (Cytosolische Leitfähigkeit für BY-2 Zellen)

$\kappa_s = 5,2 \cdot d \text{ mS/cm}$  (Membranleitfähigkeit für BY-2 Zellen)

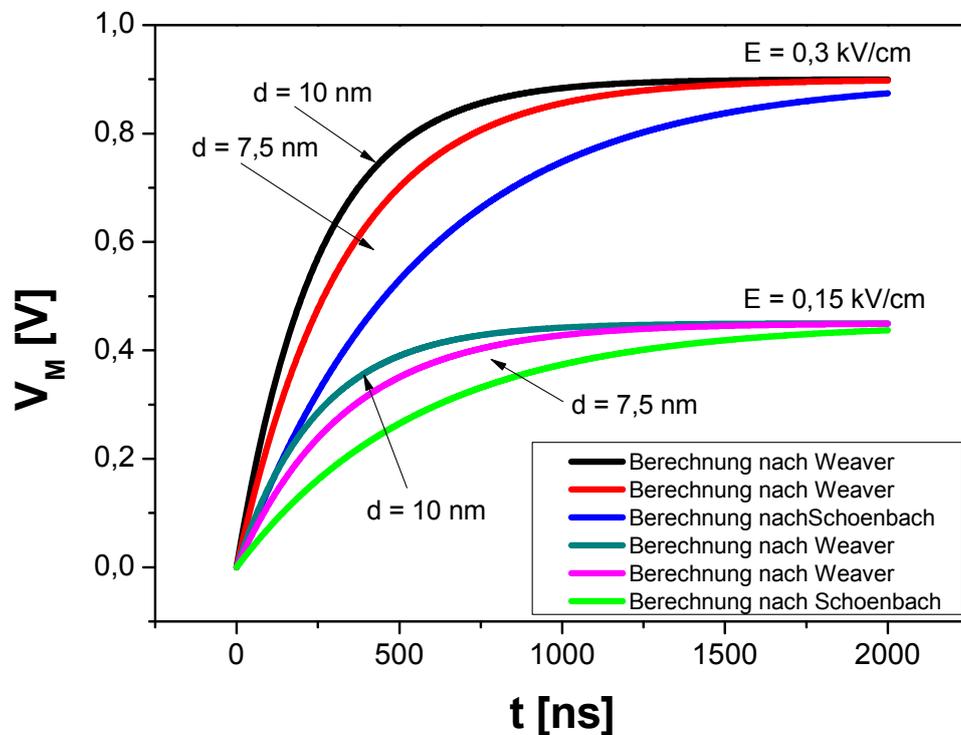
Berechnung nach Schoenbach (Formel 9, 8):

$$C_s = 0,01 \text{ F/m}^2$$

$\kappa_a = 16 \text{ mS/cm}$  (Leitfähigkeit der Versuchslösung)

$\kappa_i = 4 \text{ mS/cm}$  (Cytosolische Leitfähigkeit für BY-2 Zellen)

In Abbildung 23 ist der zeitliche Verlauf der Membranspannung aufgetragen. Gezeigt wird das zeitliche Aufladeverhalten in Abhängigkeit der verwendeten Ladezeitkonstanten, der Membrandicke und der Feldstärke.



**Abbildung 23:**

Vergleich des zeitlichen Aufladeverhaltens einer biologischen Membran nach Weaver (schwarze und rote Kurve, Gowrishankar, Stewart und Weaver 2006) und Schoenbach, (blaue Kurve, Schoenbach et al. 1997). Dargestellt ist die Membranspannung (V) in Abhängigkeit der Pulsdauer (ns), bei unterschiedlichen Membrandicken (schwarz, dunkelgrün = 10 nm, rot, rosa = 7,5 nm) und zwei unterschiedlichen Feldstärken ( $E = 0,3 \text{ kV/cm}$  → schwarze, rote und blaue Kurve,  $E = 0,15 \text{ kV/cm}$  → dunkelgrüne, rosa und hellgrüne Kurve).

Vergleicht man die mit Hilfe der beiden Formeln berechneten Kurven, lässt sich klar erkennen, dass eine Erhöhung der elektrischen Feldstärke zu einem steileren Anstieg der Aufladekurve führt (s. Abb. 23). Die verwendeten Ladezeitkonstanten haben einen Einfluss auf die Steilheit des Membranspannungsverlaufes und auf den Zeitpunkt des Erreichens des stationären Endwertes. Die Formel nach Schoenbach lässt eine deutlich langsamere Aufladung der Membran und damit ein späteres Erreichen des stationären Zustandes erkennen (s. Abb. 23, blaue Kurve).

Wie aus den dargestellten Kurvenverläufen ersichtlich ist, nimmt auch die Membrandicke einen starken Einfluss auf das zeitliche Aufladeverhalten.

Die Berechnungen zeigen, dass eine Erhöhung der Membrandicke ein früheres Erreichen des stationären Endwertes nach sich zieht (s. Abb. 23). Schoenbach vernachlässigt diesen Punkt bei seiner Formel. Die Kurven, die nach dem Ansatz von Weaver berechnet wurden, zeigen, in Abhängigkeit der angenommenen Membrandicke, einen deutlich steileren Verlauf und damit ein früheres Erreichen des stationären Endwertes.

### 3.1.2 Transmembranpotentialmessungen

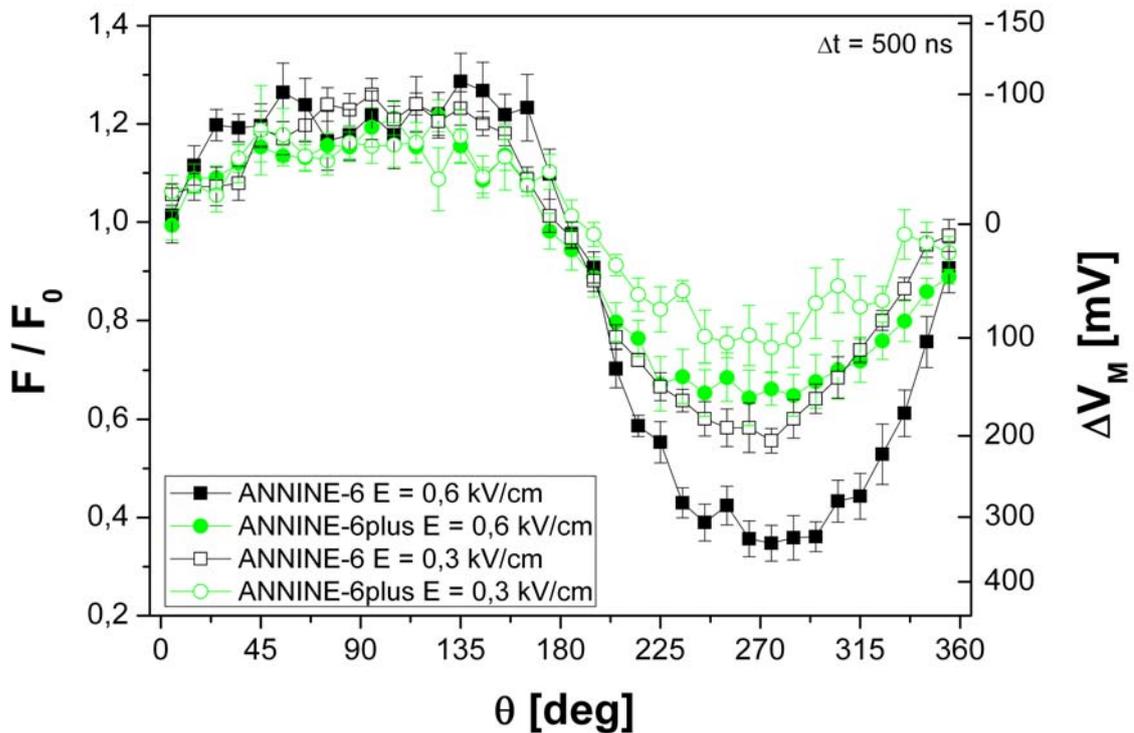
*Vergleich ANNINE-6 und ANNINE-6plus:*

Um die fluoreszenzmikroskopische Messung der Membranspannung von pflanzlichen Zellen unter Einfluss eines externen elektrischen Feldes mit Nanosekunden-Zeitauflösung zu ermöglichen, wurde die Zellmembran von BY-2 Tabakprotoplasten mit einem feldsensitiven Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Zur Ermittlung, welcher der beiden zur Verfügung stehenden feldsensitiven Farbstoffe (ANNINE-6 und ANNINE-6plus) die besseren Eigenschaften bezüglich der Membranfärbung pflanzlicher Zellen aufweist, erfolgten unterschiedliche Versuche mit gefärbten Protoplasten.

Zum Vergleich der Farbstoffe wurden Fluoreszenzintensitätsverteilungen bei verschiedenen Feldstärken sowie nach mehrfacher Pulseexposition aufgenommen und mit Hilfe der Auswertesoftware die Fluoreszenzintensitätsänderung an den Zellpolen ( $\pm 22,5^\circ$ ) und für  $10^\circ$ -Winkelintervalle entlang der Membran (azimutal) berechnet.

Abbildung 24 zeigt die relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen von ANNINE-6 (schwarz) und ANNINE-6plus (grün) bei zwei Feldstärken. Die Fluoreszenzintensitätsänderungen sind in Abhängigkeit der Position auf der Membran, bezogen auf die Richtung des elektrischen Feldes ( $90^\circ$  = Hyperpolarisierter Pol,  $270^\circ$  = Depolarisierter Pol), dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Anlegen gleicher Feldstärke der Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6 deutlich höhere relative Fluoreszenzintensitätsänderungen aufweist, als ANNINE-6plus.

Bei höheren Feldstärken ist dieser Effekt vor allem am depolarisierten Pol ( $\theta = 270^\circ$ ) sehr gut zu erkennen (s. Abb. 24,  $270^\circ$ ). Laut Hersteller der beiden Fluoreszenzfarbstoffe sollte die Spannungsempfindlichkeit identisch sein.



**Abbildung 24:**

**Vergleich der winkelabhängigen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannungsänderung von ANNINE-6 (schwarz) und ANNINE-6plus (grün) bei externen Feldstärkewerten von 0,3 kV/cm (offenes Symbol) und 0,6 kV/cm (geschlossenes Symbol), gemessen an BY-2 Protoplasten.**

Während der Experimente konnten noch weitere wichtige Informationen zur Bewertung der Farbstoffe gesammelt werden. So zeigte ANNINE-6plus durch seine höhere Wasserlöslichkeit eine leichtere Handhabung. Zur Färbung der Protoplasten wurde eine geringere Farbstoffmenge benötigt und die mittlere beobachtete Grundfluoreszenzintensität war, im Vergleich zu ANNINE-6, deutlich erhöht. Allerdings zeigte ANNINE-6plus, im Gegensatz zu ANNINE-6, eine schon nach kurzer Zeit sichtbar werdende Membrangängigkeit. Die Inkorporation des Farbstoffes führt zu einem Verlust der Spannungsempfindlichkeit, da sich in diesem Fall die Emissionen außen- und innenliegender Farbstoffmoleküle aufheben.

### Bleichverhalten des ANNINE-6 Fluoreszenzfarbstoffes:

Mit Hilfe einer Bleichserie sollte die Stabilität des ANNINE-6 Fluoreszenzfarbstoffes unter mehrfacher Laserbelichtung überprüft und Informationen über dessen Bleichverhalten gesammelt werden. Hierfür wurden mehrere Laserpulse, ohne Anlegen eines elektrischen Feldes, auf einen mit ANNINE-6 gefärbten Protoplasten appliziert. Bei der Auswahl der Protoplasten wurde auf einen deutlich und homogen fluoreszierenden Membranring geachtet. Mit jedem Laserpuls wurde die Fluoreszenzintensitätsverteilung mit Hilfe der Bildverstärkerkamera aufgenommen. Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurden alle Aufnahmen auf die Fluoreszenzintensitäten des ersten Bildes normiert.

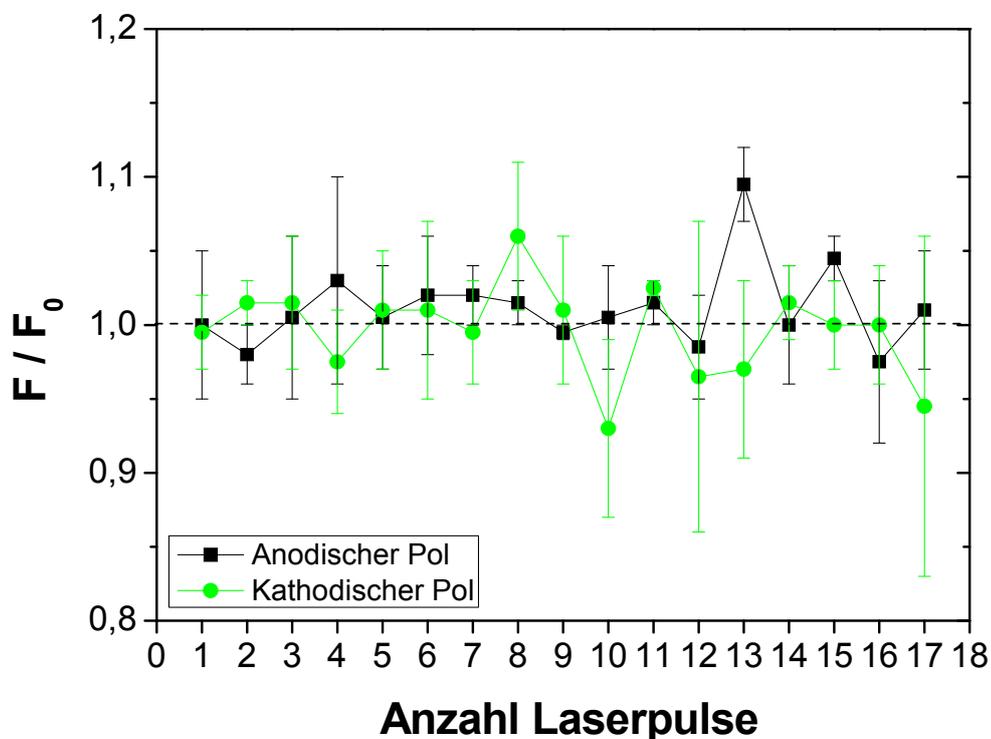


Abbildung 25:

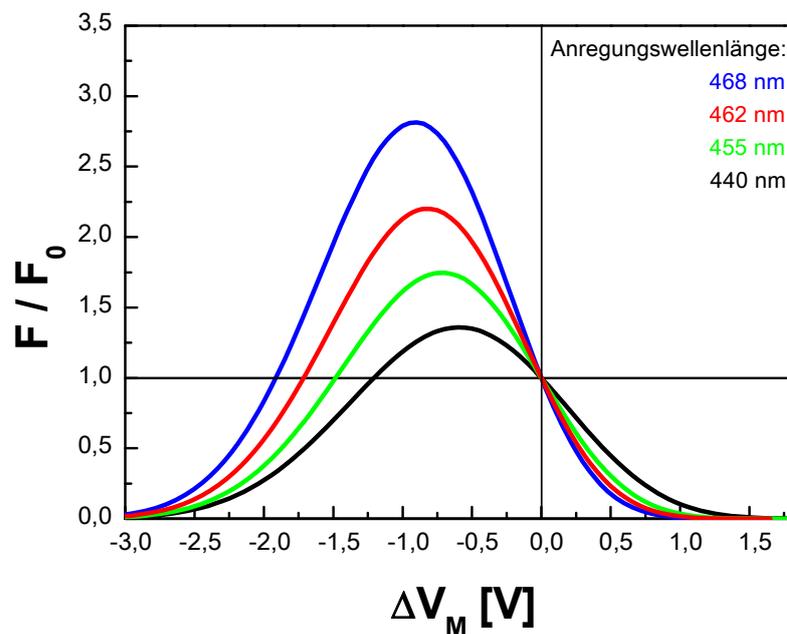
Normierte Fluoreszenzintensitätsänderungen am anodischen (schwarz) und kathodischen Pol (grün) in Abhängigkeit der Anzahl applizierter Laserpulse.

Da in diesem Fall nur die Fluoreszenzintensität von Bedeutung ist, wird die entsprechende Membranspannung nicht gezeigt. Abbildung 25 zeigt die relative Fluoreszenzintensitätsänderung an den beiden Zellpolen in Abhängigkeit der Anzahl applizierter Laserpulse. Die Datenpunkte zeigen auch bei mehrfacher Laserbelichtung keine signifikante Verringerung der Fluoreszenzintensitätsänderung.

Zu erkennen sind lediglich geringe Abweichungen, jedoch keine abnehmende Tendenz, die auf ein Bleichen des Farbstoffes hindeuten könnte. Im Mittel beträgt die relative Fluoreszenzänderung für den anodischen Pol 1,01 mit einer Abweichung (Standardabweichung des Mittelwertes) von 2,8 % und für den kathodischen Pol 1,00 mit einer Abweichung von 3,1 %.

*Untersuchung zum Einfluss der Laserwellenlänge:*

Zur Umrechnung der gemessenen relativen Fluoreszenzänderungen in Membranspannungen werden angepasste Spektralfunktionen des ANNINE-6 Farbstoffes verwendet. Für jede Anregungswellenlänge wird auf der Grundlage der spektralen Funktion ein Zusammenhang zwischen  $F/F_0$  und der Membranspannung hergestellt (s. Abb. 26). Wie Abbildung 26 zu entnehmen ist, ist die Sensitivität des Fluoreszenzfarbstoffes stark von der Anregungswellenlänge abhängig, sie steigt mit zunehmender Anregungswellenlänge ebenfalls an.

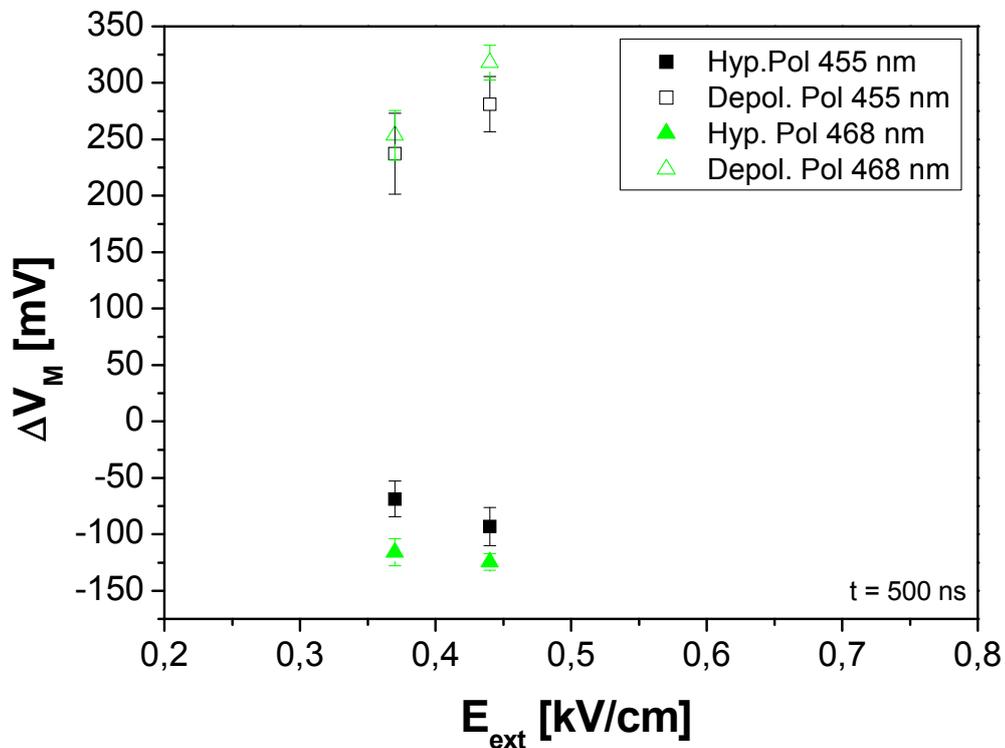


**Abbildung 26:**

**Kalibrierkurven für den Farbstoff ANNINE-6 bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenzintensitätsänderung gegen die Membranspannungsänderung in V.**

Die Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen führt zu großen Unterschieden in den gemessenen relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen.

Nach Rückrechnung der Fluoreszenzintensitäten mit der jeweils entsprechenden Kalibrierkurve erhält man vergleichbare Membranspannungswerte. Um die angepassten Funktionen der ANNINE-6 Spektren (Kuhn 2003) zu überprüfen, erfolgten Experimente bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen (468 nm und 455 nm) und Feldstärken. Die Messungen wurden an mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten durchgeführt. Die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen bei 455 nm und 468 nm Anregungswellenlänge wurden mit der jeweils entsprechenden Kalibrierkurve (s. Abb. 26) in Membranspannungsänderungen (s. Abb. 27) umgerechnet. Da für dieses Experiment lediglich die berechnete Membranspannung von Bedeutung ist, werden die zugehörigen relativen Fluoreszenzintensitäten nicht gezeigt. Die Berechnung erfolgte ausschließlich für die Polbereiche.



**Abbildung 27:**

**Relative Membranspannungsänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten bei zwei Anregungswellenlängen (455nm = schwarz, 468nm = grün) gemessen an den Zellpolen, in Abhängigkeit der externen elektrischen Feldstärke.**

Abbildung 27 zeigt die Änderung der Membranspannung in Abhängigkeit der elektrischen Feldstärke bei einer Anregungswellenlänge von 455 nm und 468 nm. Die ermittelten Werte zeigen eine gute Übereinstimmung.

### Untersuchung zum Einfluss der Laserenergie:

Um den Einfluss der applizierten Laserenergie auf die Fluoreszenzintensitätsänderungen zu überprüfen, erfolgten Messungen bei voller und bei abgeschwächter Laserenergie. Zur Abschwächung wurde ein Neutraleichtfilter (50%) verwendet. Da für dieses Experiment nur die Fluoreszenzintensitätsänderung von Bedeutung ist, wird die entsprechende Membranspannung nicht gezeigt.

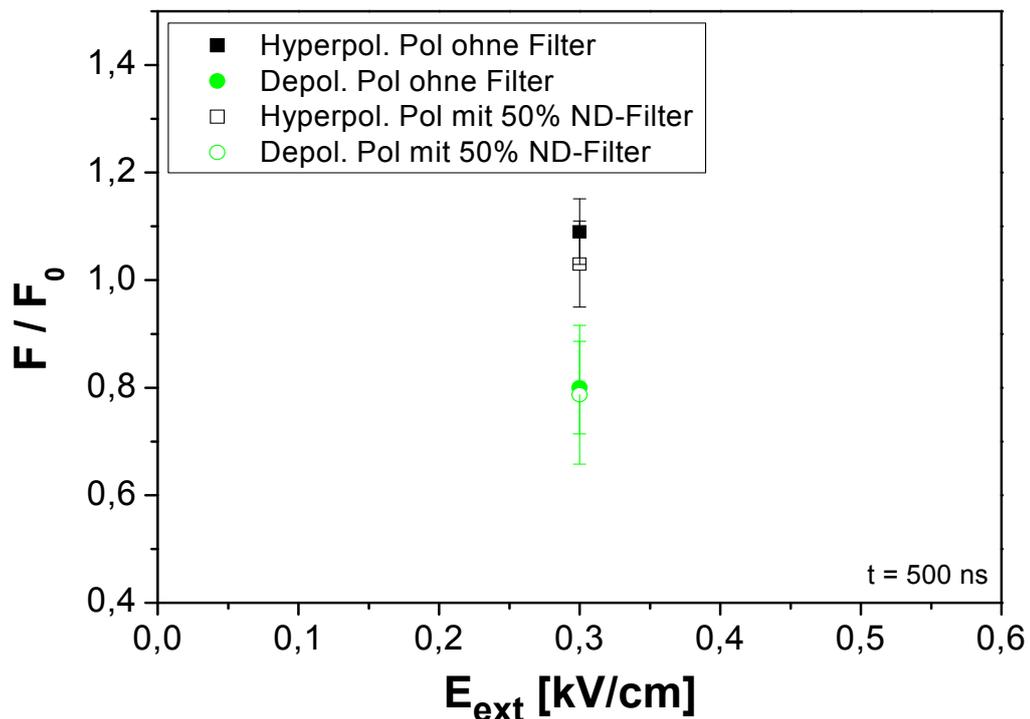


Abbildung 28:

Relative Fluoreszenzintensitätsänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten an den Zellpolen, bei einer Feldstärke von 0,3 kV/cm bei Farbstoffanregung mit voller Laserenergie (geschlossenes Symbol) und bei abgeschwächter Laserenergie (offenes Symbol).

Die Datenpunkte zeigen eine sehr gute Übereinstimmung (s. Abb. 28). Die Standardabweichung des Mittelwertes liegt auf der hyperpolarisierten Seite bei lediglich 4% und auf der depolarisierten Seite nur bei 0,9 %.

### Vergleich Zellkultur - Pflanze:

Ein weiterer Versuchsansatz sollte eventuelle Unterschiede des Aufladeverhaltens zwischen Protoplasten aus der Zellkultur und aus Blattmaterial aufzeigen.

Bei beiden Versuchsobjekten handelte es sich um *Nicotiana tabacum*.

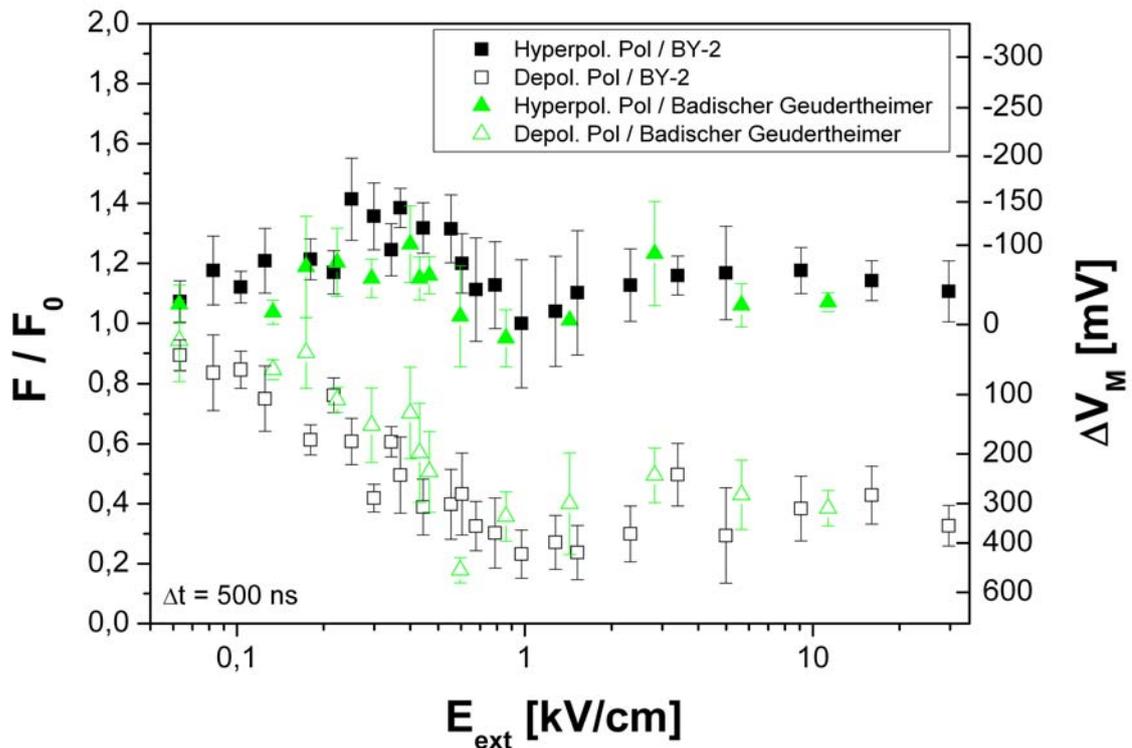


Abbildung 29:

Vergleich der Feldstärkeabhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen bzw. der Membranspannungsänderung von Protoplasten aus Zellkultur (schwarz) und Mesophyllprotoplasten aus Blattgewebe (grün), gemessen an den beiden Polen (Depolarisierter Pol = offenes Symbol, Hyperpolarisierter Pol = geschlossenes Symbol) und Einfluss der Chlorophyll-Autofluoreszenz auf die gemessene Fluoreszenzintensität.

Es war jedoch nicht klar, ob die beiden unterschiedlichen Systeme dieselben Reaktionen bei Anlegen eines elektrischen Feldes zeigen.

Des Weiteren ermöglichte dieser Ansatz, den Einfluss der Chlorophyllautofluoreszenz auf die Farbstoffantwort zu überprüfen. Für die Messungen wurden Protoplasten aus der BY-2 Zellkultur und Mesophyll-Protoplasten aus Tabakpflanzen (Badischer Geudertheimer) gewonnen und mit ANNINE-6 gefärbt.

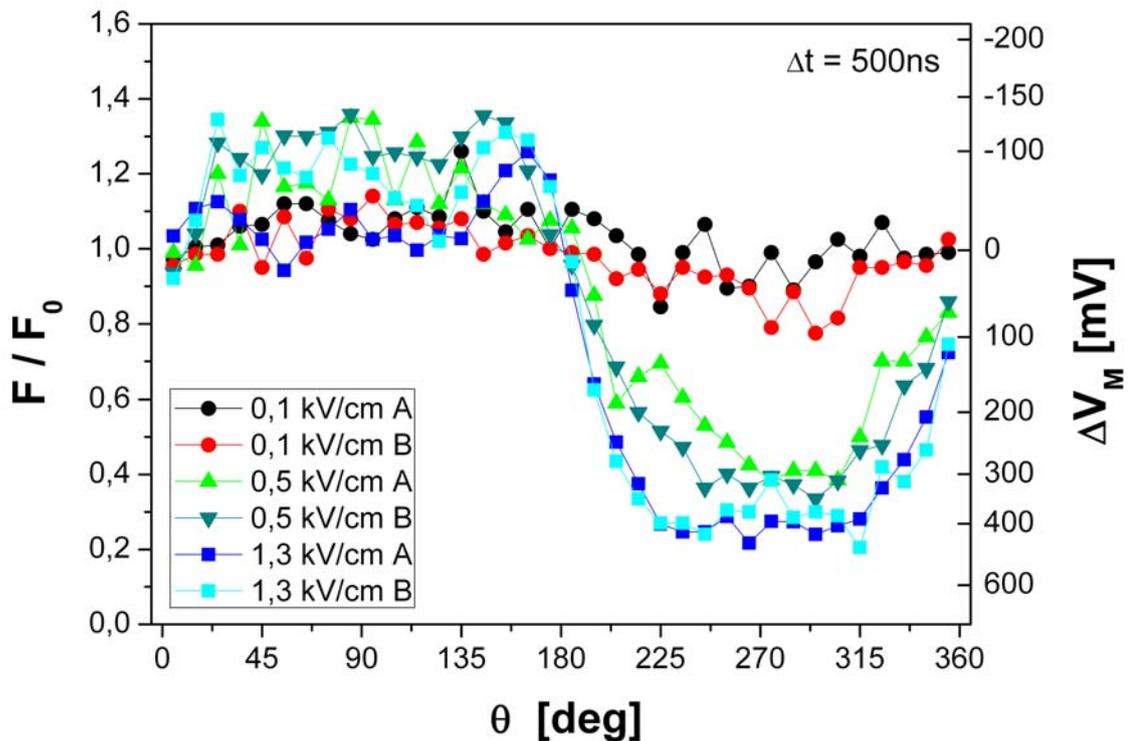
Angelegt wurden elektrische Felder im Bereich von 0,05 kV/cm bis 30,0 kV/cm. Die Auswertung der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung erfolgte für die Polbereiche. Die Kurvenverläufe (s. Abb. 29) zeigen die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung und der Membranspannungsänderung von der externen elektrischen Feldstärke, gemessen bei  $t = 500$  ns nach Beginn des elektrischen Feldpulses. Die schwarze Kurve zeigt die Fluoreszenzintensitätsänderung der Zellkultur (ohne Chlorophyll), die grüne Kurve stellt die Intensitätsänderung der Mesophyllprotoplasten (Pflanze, mit Chlorophyll) dar. Beide Kurven zeigen nicht nur vergleichbare Werte der relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen, sondern auch den gleichen Verlauf.

#### *Untersuchung zum Einfluss der Zellgröße :*

Um zu ermitteln, ob der Zelldurchmesser, im Rahmen der Schwankungen in der Zellgröße der verwendeten Protoplasten, einen entscheidenden Einfluss auf die Membranspannungsänderungen ausübt, erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzintensitätsänderungen bei verschiedenen Feldstärken mit gefärbten BY-2 Protoplasten zweier Größenbereiche:

- Größenbereich A: Durchmesser von 33 - 41  $\mu\text{m}$  (Mittelwert: 38  $\mu\text{m}$ )
- Größenbereich B: Durchmesser von 42 - 48  $\mu\text{m}$  (Mittelwert: 45  $\mu\text{m}$ )

Die in Abbildung 30 dargestellten Kurvenverläufe zeigen die relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen, sowie die Membranspannungsänderung, in Abhängigkeit des azimutalen Winkels für Protoplasten zweier Größenbereiche.



**Abbildung 30:**

**Einfluss der Protoplastengröße (A = 33-41  $\mu\text{m}$ , B = 42-48  $\mu\text{m}$ ) auf die winkelabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannungsänderung bei unterschiedlichen Feldstärken (0,1 kV/cm = schwarz, rot; 0,5 kV/cm = hell- / dunkelgrün; 1,3 kV/cm = hell- / dunkelblau).**

Die Datenpunkte der beiden Größenbereiche A und B zeigen für die drei gemessenen Feldstärken (0,1 kV/cm = schwarz / rot, 0,5 kV/cm = hell- / dunkelgrün und 1,3 kV/cm = hell- / dunkelblau) eine gute Übereinstimmung. Die Standardabweichung des Mittelwertes betrug für alle Feldstärken 3% und zeigt damit nur einen geringen Fehler.

### 3.1.3 Reproduzierbarkeit des Auswerteprogrammes

Um das Auswerteprogramm als Fehlerquelle auszuschließen, wurde die gleiche Messung mehrfach hintereinander und auch von unterschiedlichen Personen ausgewertet. Die Auswertung erfolgte entlang des Membranringes in 10° Intervallen.

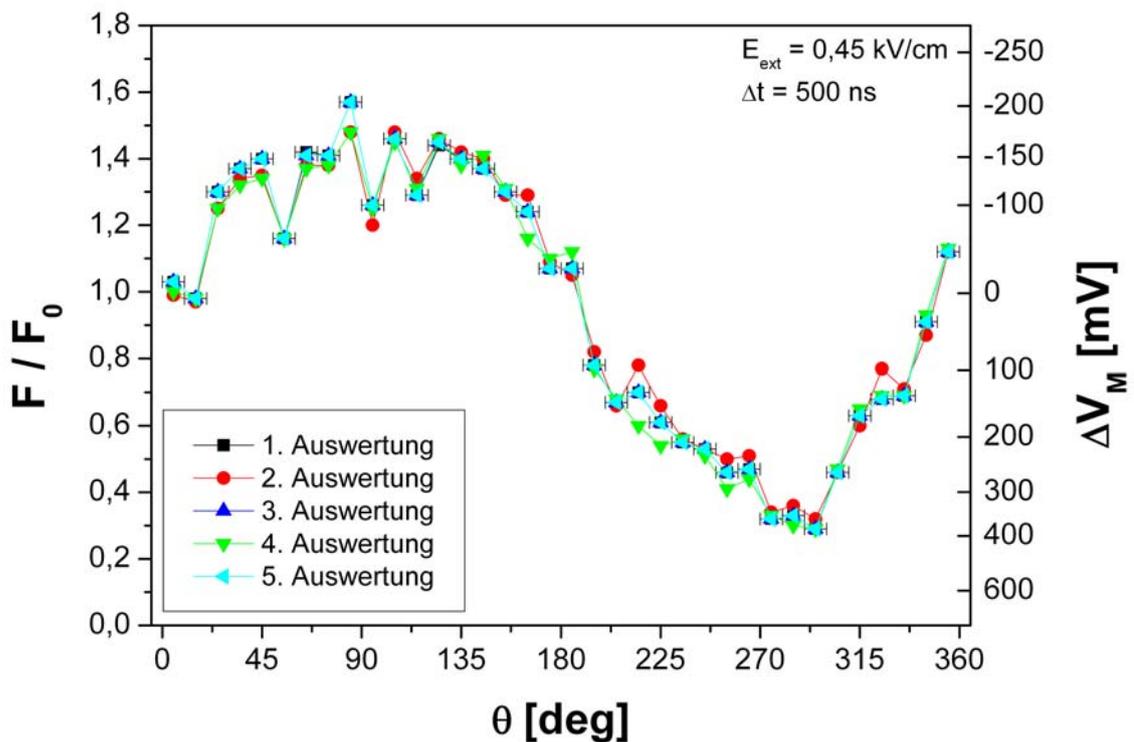


Abbildung 31:

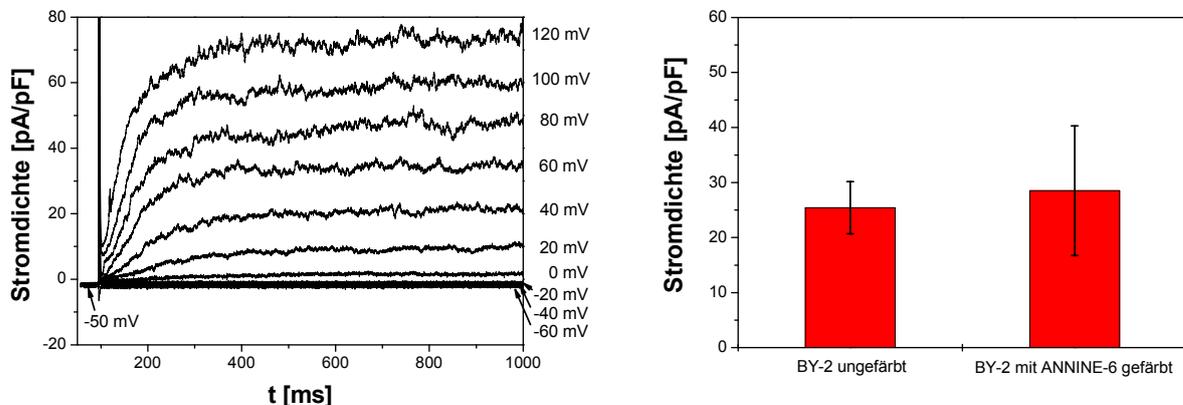
**Einfluss der Auswertemethode auf die winkelabhängige Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannungsänderung eines mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten. Die Auswertung der gleichen Messung erfolgte mehrfach und durch unterschiedliche Personen.**

Die in Abbildung 31 dargestellten Kurvenverläufe zeigen die winkelabhängige Fluoreszenzintensitäts- und Membranspannungsänderung nach mehrfacher Auswertung mit Hilfe des Auswerteprogrammes. Der Graph zeigt deutlich, dass die Kurven nahezu identisch sind.

### 3.1.4 Patch-Clamp-Messungen

*Vergleich der Elektrophysiologie gefärbter und ungefärbter Protoplasten:*

Mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes sollte überprüft werden, ob der Einbau des ANNINE-6 Farbstoffes in die äußere Schicht der Membran einen Einfluss auf das elektrophysiologische Verhalten des Protoplasten nimmt. Hierzu wurden gefärbte und ungefärbte Protoplasten mit der Patch-Clamp-Technik untersucht und die Stromantwort auf verschiedene Spannungspulse in der *Whole-Cell-Konfiguration* gemessen.



**Abbildung 32:**

**Links:** Gezeigt werden beispielhaft die Ströme über die Plasmamembran eines mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten, gemessen in der *Whole-Cell-Konfiguration*.

**Rechts:** Vergleich der Stromantworten ungefärbter und gefärbter BY-2 Protoplasten bei 120 mV. Die Statistik beinhalten jeweils 4 Messungen.

Pipettenmedium: 120 mM KCl, 2 mM Tris/Mes pH 7.2

Badmedium: 30 mM KCl, 40 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Mes/Tris pH 5,8

Die Lösungen wurden mit Mannitol auf eine Osmolarität von 475 mosmol/kg eingestellt.

**Die Daten wurden von Dr. Lars Wegner zur Verfügung gestellt.**

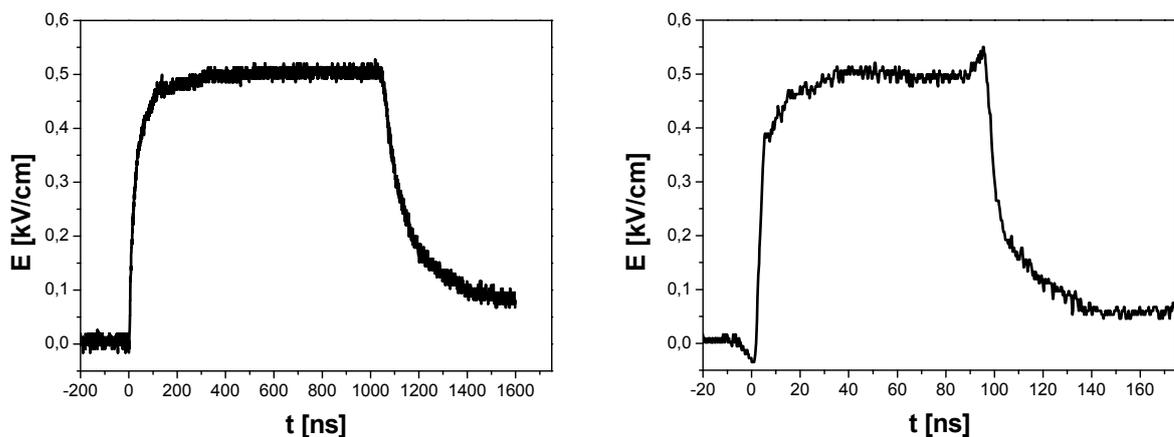
Abbildung 32 links zeigt die Stromantworten eines gefärbten BY-2 Protoplasten auf unterschiedliche Spannungspulse in Abhängigkeit der Pulsdauer. Die gemessenen Stromantworten sind hauptsächlich auf die Aktivität des Kaliumkanals NTORK1 zurückzuführen, bei dem es sich um einen Auswärtsgleichrichter handelt (Sano et al. 2007).

Bei den durchgeführten Versuchen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Stromantwort zwischen gefärbten und ungefärbten BY-2 Protoplasten (Van Duijn et al. 1993) festgestellt werden.

### 3.2 Messungen zur Membranaufladung

Zur Durchführung der Messungen wurden Blumlein-Leitungen unterschiedlicher Länge verwendet. Auf diese Art konnten Rechteckpulse mit einer Pulslänge von 1  $\mu\text{s}$  und 100 ns erzeugt werden.

Für die Messungen wurden ausschließlich mit ANNINE-6 gefärbte BY-2 Tabakprotoplasten verwendet. Bei den in dieser Arbeit dargestellten Fluoreszenzänderungen und den entsprechenden Transmembranspannungen ist zu beachten, dass alle Werte messbedingt relativ zum Ruhepotential der Zelle dargestellt sind.



**Abbildung 33:**

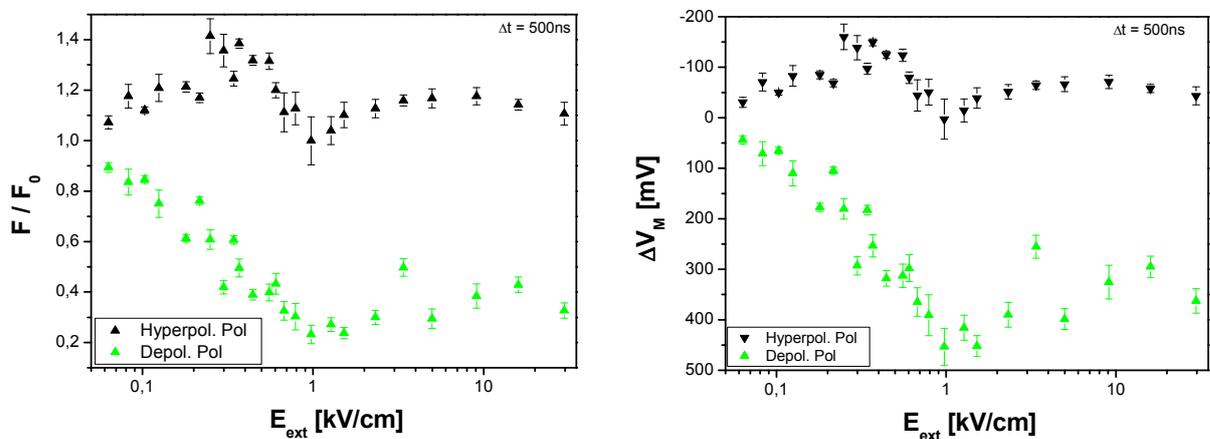
Gezeigt werden beispielhaft die, durch die verwendeten Leitungen, erzeugten Pulsformen bei einer eingestellten Feldstärkeamplitude von 0,5 kV/cm. Links = 1  $\mu\text{s}$ -Puls, rechts = 100 ns-Puls.

Abbildung 33 zeigt beispielhaft die Pulsform der, durch die verwendete 1  $\mu\text{s}$ - bzw. die 100ns-Pulsleitung, erzeugten Spannungspulse. Die Langpulsleitung generiert einen 1  $\mu\text{s}$ -Spannungspuls mit einer gemessenen Anstiegszeit  $T_{10:90}$  von 10% auf 90% der Pulsamplitude von 80 ns (s. Abb. 33 links). Die Kurzpulsleitung hingegen erzeugt einen 100 ns-Puls mit  $T_{10:90} = 10$  ns (s. Abb. 33 rechts).

### 3.2.1 1 $\mu$ s –Leitung

#### *Untersuchungen zur Feldstärkeabhängigkeit des Transmembranpotentials:*

Um die Feldstärkeabhängigkeit der Membranspannung zu ermitteln, wurde 500 ns nach Beginn des 1 $\mu$ s-Spannungspulses die Fluoreszenzänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten gemessen. Die Versuche wurden bei Feldstärken im Bereich von 0,05 kV/cm bis zu Werten von 30,0 kV/cm durchgeführt. Die Umrechnung der Fluoreszenzänderungen in Membranspannungsänderungen erfolgte mit Hilfe der Kalibrierkurve (s. Abb. 26).



**Abbildung 34:**

**Feldstärkeabhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten, gemessen 500 ns nach Beginn des Spannungspulses. Die Auswertung erfolgte für den hyperpolarisierten Pol (schwarz) und den depolarisierten Pol (grün).**

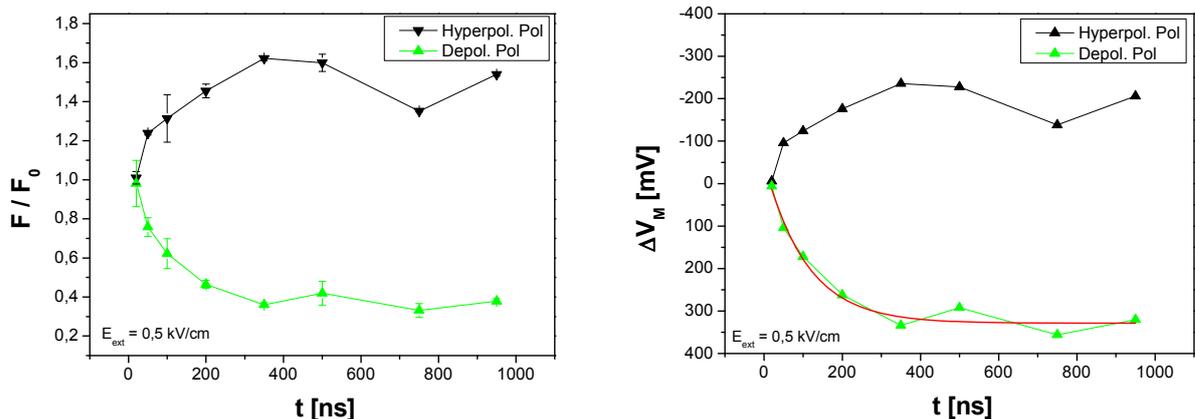
Die Abbildungen zeigen die relative Fluoreszenzintensitätsänderung (s. Abb. 34, links) bzw. die Membranspannungsänderung (s. Abb. 34, rechts) aufgetragen gegen die angelegte elektrische Feldstärke. Die gemessenen Daten zeigen an beiden Zellpolen eine näherungsweise exponentielle Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannung und dem angelegten externen, elektrischen Feld.

Die Asymmetrie des Aufladeverhaltens in Abhängigkeit der angelegten Feldstärke ist deutlich zu erkennen. Am depolarisierten Zellpol (grün) deutet der Kurvenverlauf auf eine anhaltende Aufladung der Membran bis zu einer applizierten äußeren Feldstärke von 1,0 kV/cm hin. Bei höheren Feldstärken zeigt die Fluoreszenz bzw. die Membranspannung ein Sättigungsverhalten. Die maximal erreichte Membranspannungsänderung beträgt am depolarisierten Zellpol 450 mV.

An der hyperpolarisierten Zellhemisphäre setzt die Sättigung der Fluoreszenz bzw. der Membranspannung bei weitaus geringeren Feldstärken ein. Die Aufladung findet an diesem Zellpol nur bis zu einer externen Feldstärke von 0,3 kV/cm statt, resultierend in einer maximalen Membranspannungsänderung von -150 mV. Anschließend lässt sich ein Rückgang der Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannung bis zu einer externen elektrischen Feldstärke von 1,0 kV/cm erkennen. Bei weiter ansteigender Feldstärke zeigt auch diese Kurve ein Sättigungsverhalten. Die einzelnen Datenpunkte stellen die Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen der pro Feldstärke durchgeführten 5 - 20 Messungen dar.

### Zeitliche Entwicklung des Membranpotentials:

Bei diesem Versuchsansatz wurde die Fluoreszenzintensität für zwei unterschiedliche Feldstärken und zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Spannungspulses aufgenommen. Diese Messungen wurden durchgeführt, um die zeitliche Entwicklung der Membranspannung in Abhängigkeit von der externen Feldstärke zu ermitteln. Die Messungen wurden für die Feldstärken 0,5 kV/cm und 1,0 kV/cm durchgeführt. Die Aufnahme der Fluoreszenzintensität erfolgte zu den Zeitpunkten 20 ns, 50 ns, 100 ns, 200 ns, 350 ns, 500 ns, 750 ns und 950 ns nach Beginn des 1µs Spannungspulses. Zur Umrechnung der relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen in Transmembranspannungsänderungen wurde die Kalibrierkurve (s. Abb. 26) verwendet.

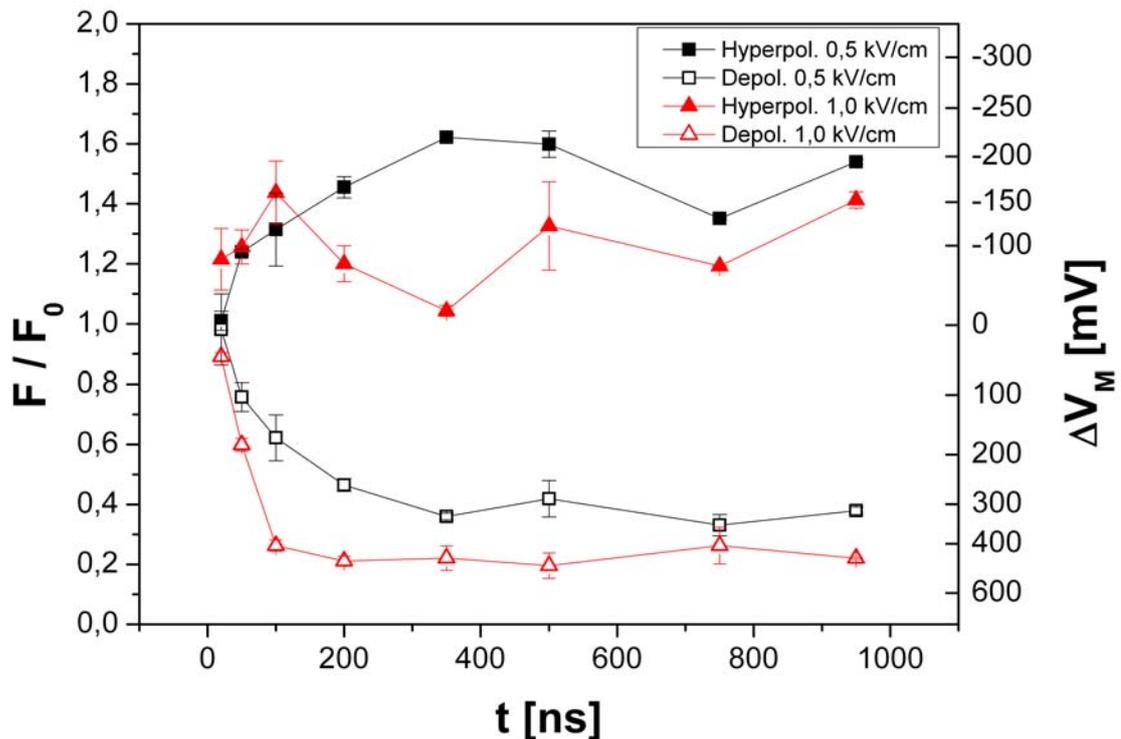


**Abbildung 35:**

**Zeitliche Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten, bei einer Feldstärke von 0,5 kV/cm. Die Auswertung erfolgte für den hyperpolarisierten Pol (schwarz) und den depolarisierten Pol (grün). An die Aufladekurve am depolarisierten Zellpol wurde eine e-Funktion angepasst (rote Kurve).**

Die dargestellten Graphen zeigen die relative Fluoreszenzintensität bzw. die Membranspannung (s. Abb. 35, 36) in Abhängigkeit der Zeit. Bei einer Feldstärke von 0,5 kV/cm (s. Abb. 35) zeigt sich für beide Zellpole ein exponentieller Anstieg bzw. Abfall der Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannung, sowie das Erreichen des stationären Endwertes zu einem Zeitpunkt von  $\Delta t = 350 \text{ ns}$ .

Am hyperpolarisierten Zellpol (schwarz) lässt der Kurvenverlauf zum Zeitpunkt  $\Delta t = 750$  ns einen leichten Rückgang mit nachfolgender Wiederaufladung erkennen. Abbildung 35 zeigt sehr schön den exponentiellen Anstieg der Membranspannung (s. Abb. 35 links, rote Kurve).



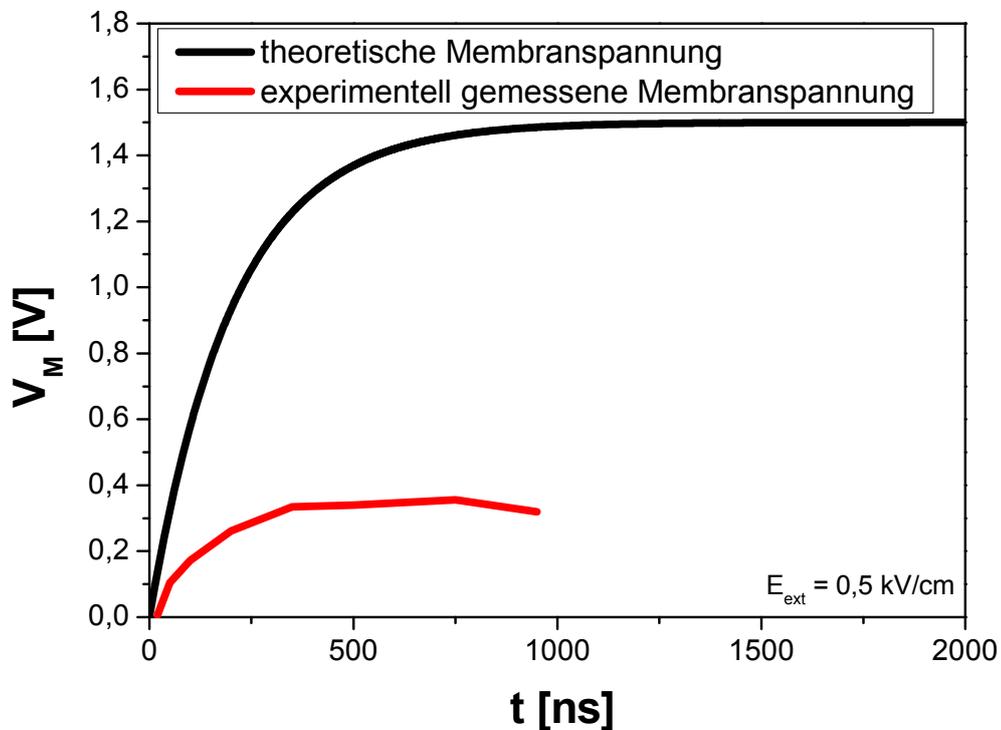
**Abbildung 36:**

**Vergleich der zeitlichen Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannungsänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten, bei einer Feldstärke von 0,5 kV/cm (schwarz) und 1,0 kV/cm (rot). Die Auswertung erfolgte für den hyperpolarisierten Pol (geschlossenes Symbol) und den depolarisierten Pol (offenes Symbol).**

Die Applikation einer höheren Feldstärke von 1,0 kV/cm führt zu einem deutlich steileren Anstieg der Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannung (s. Abb. 36). Der Kurvenverlauf deutet am depolarisierten Zellpol auf das Erreichen eines stationären Endwertes bei  $\Delta t = 200$  ns hin. Am hyperpolarisierten Zellpol hingegen lässt sich der auch schon für geringere Feldstärken detektierte Einbruch (s. Abb. 35, bei 750 ns, hyperpol. Pol) zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt erkennen.

Das Aufladeverhalten deutet auf einen deutlich stärkeren Rückgang der Fluoreszenzintensitätsänderung, verglichen mit dem Kurvenverlauf bei 0,5 kV/cm, und einem anschließenden erneuten Anstieg hin.

Vergleicht man die experimentell gemessene Ladekurve für 0,5 kV/cm mit der theoretisch berechneten Aufladung, lässt sich eine deutliche Abweichung in der erreichten Amplitude erkennen (s. Abb. 37).



**Abbildung 37:**

Vergleich der zeitlichen Entwicklung der theoretisch berechneten Membranspannung (Formel 9) (schwarz) und der experimentell gemessenen Membranspannung an mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten (rot), dargestellt für den depolarisierten Zellpol für eine Feldstärke von 0,5 kV/cm.

Die nach Formel 9 berechnete Aufladung (schwarze Kurve) erreicht Membranspannungswerte von ca. 1,5 V und erreicht den stationären Endwert nach ca. 750 ns. Der Kurvenverlauf der experimentell gemessenen Kurve (rote Kurve) zeigt lediglich eine Aufladung bis zu einer Membranspannung von ca. 0,4 V und erreicht den stationären Endwert wesentlich früher. Im Vergleich zur Theorie zeigen sich damit deutliche Abweichungen in der Amplitude und der Aufladegeschwindigkeit. Lediglich der vorhergesagte exponentielle Verlauf konnte bestätigt werden.

## Untersuchungen zum Auflade- und Wiederaufladeverhalten:

Um eine Aussage über das Auflade- und Wiederaufladeverhalten des pflanzlichen Plasmalemmas zu treffen, wurden gefärbte Protoplasten bei unterschiedlichen Feldstärken mehreren Spannungspulsen ausgesetzt und die Fluoreszenzantwort des Farbstoffes gemessen. Nach jeder Spannungsexposition erfolgte eine Aufnahme der Fluoreszenzintensität ohne Anliegen eines elektrischen Feldes. Zwischen den Aufnahmen erfolgte messtechnisch bedingt eine kurze Pause von ca. 2 Sekunden.

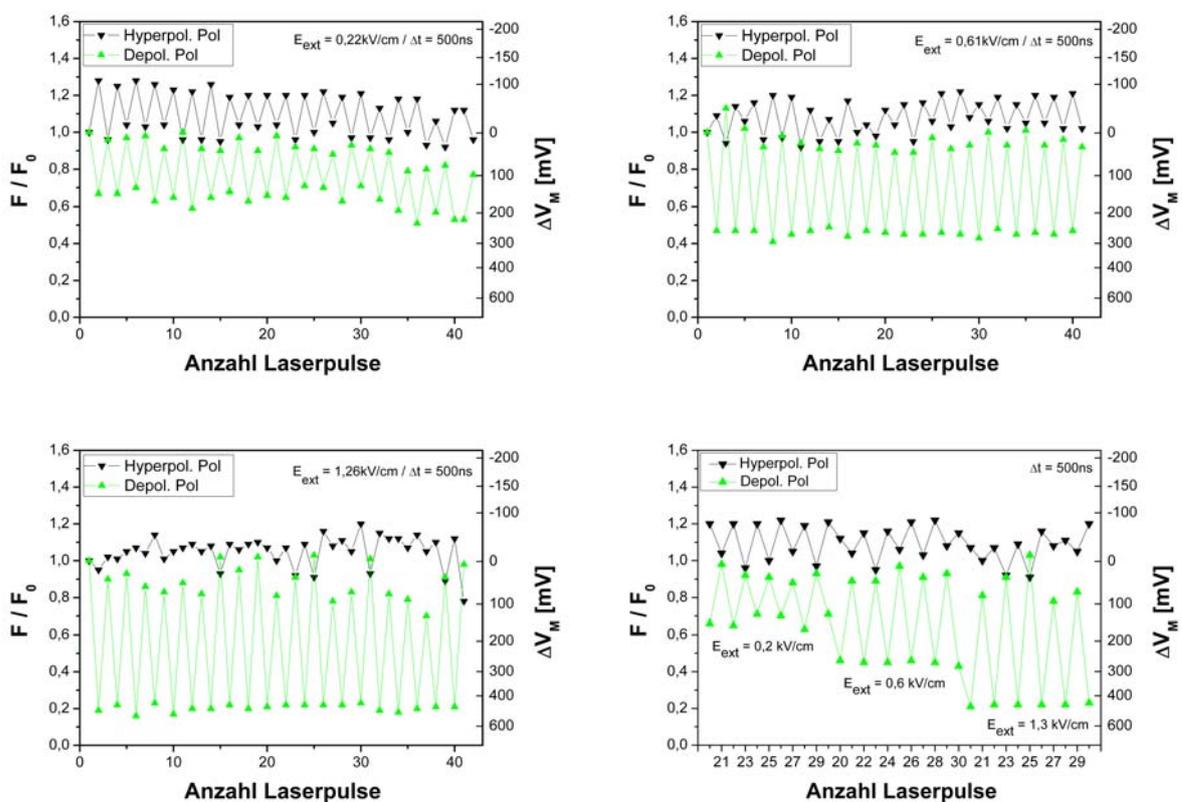


Abbildung 38:

Auflade- und Wiederaufladeverhalten von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten an den Zellpolen (Hyperpol. Pol = schwarz, Depol. Pol = grün) bei unterschiedlichen Feldstärken (links oben = 0,2 kV/cm; rechts oben = 0,6 kV/cm; links unten = 1,3 kV/cm). Dargestellt ist die Membranspannungsänderung in Abhängigkeit der Anzahl applizierter Laserpulse. Jeder geradezahlige Datenpunkt zeigt die Membranspannungsänderung bei Anliegen eines externen elektrischen Feldes, jeder ungeradezahlige Datenpunkt die Membranspannungsänderung ohne elektrisches Feld (Ruhepotential). Im Diagramm rechts unten ist eine Zusammenfassung der drei Feldstärken dargestellt.

In Abbildung 38 ist die Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. die Membranspannungsänderung bei unterschiedlichen Feldstärken (0,2 kV/cm, 0,6 kV/cm und 1,3 kV/cm) in Abhängigkeit der Anzahl applizierter Laserpulse dargestellt. Ausgewählt wurden die Daten der Laserpulse 20 – 30. Bei einem ungeradzahligen Laserpuls erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzintensität  $F_0$  ohne Anlegen eines elektrischen Feldes. Bei einem geradzahligen Laserpuls wurde die Fluoreszenzintensität während des Spannungspulses aufgezeichnet. Die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen wurden in Membranspannungsänderungen umgerechnet. Die Berechnungen erfolgten für die beiden Zellpole.

Abbildung 38 zeigt, dass sich die Membran innerhalb von 2 s nach Ende des elektrischen Feldpulses auf das Niveau der ungestörten natürlichen Membranspannung (Ruhepotential) entlädt. Die erneute Aufladung des Plasmalemmas auf gleiche Werte ist bereits nach wenigen Sekunden wieder möglich. Bei geringen Feldstärken ist die Amplitude der Membranspannung an beiden Polen nahezu identisch (s. Abb. 38, oben links).

Mit zunehmender Feldstärke zeigt jedoch die depolarisierte Seite der Protoplastenmembran im Vergleich zur hyperpolarisierten Seite eine deutlich größere Spannungsamplitude (s. Abb. 38, oben rechts).

Bei angelegten Feldstärken, die 1,0 kV/cm überschreiten, kommen die Auflade- und Wiederauflade-Prozesse der Membran am hyperpolarisierten Zellpol zum Erliegen (s. Abb. 38, unten links). An dem der Anode zugewandten Zellpol ist eine Sättigung der Fluoreszenz bzw. der Membranspannung zu beobachten. Am depolarisierten Zellpol hingegen sind die Lade- und Entladeprozesse noch deutlich zu erkennen (s. Abb. 38, unten links).

### Untersuchungen zur Winkelabhängigkeit des Transmembranpotentials:

Um Aussagen über die Winkelabhängigkeit des Membranpotentials, bezogen auf die Richtung des elektrischen Feldes, zu treffen, wurden die Versuche unter den gleichen Bedingungen, wie zur Ermittlung der Feldstärkeabhängigkeit, durchgeführt. Das heißt, dass 500 ns nach Beginn des  $1\mu\text{s}$ -Spannungspulses die Fluoreszenzänderung bei applizierten elektrischen Feldstärken von  $0,05\text{ kV/cm}$  bis zu  $30,0\text{ kV/cm}$  bestimmt wurde.

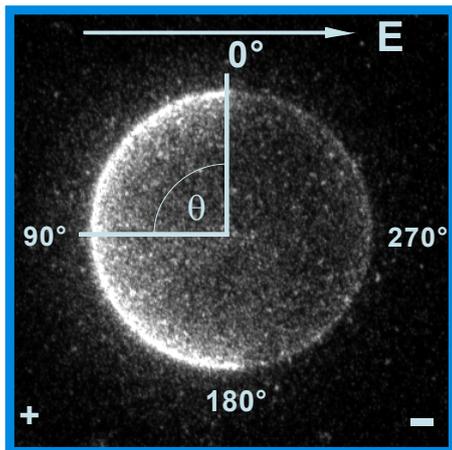


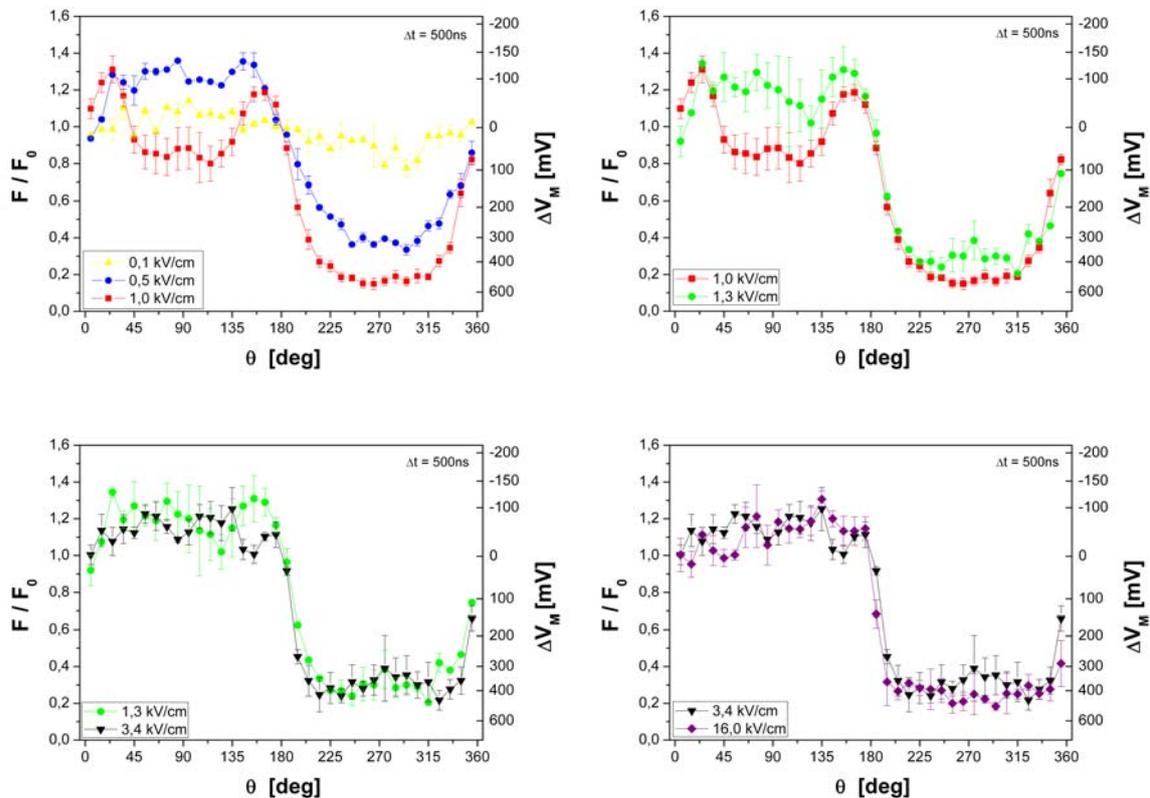
Abbildung 39:

Schema zur Auswertung der Winkelabhängigkeit. Das Bild zeigt einen mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten, aufgenommen mit Hilfe der iCCD-Kamera. Auf der linken Seite ist die anodische Zellhemisphäre zu erkennen, auf der rechten Seite die kathodische Zellhemisphäre.

Die Berechnung der Fluoreszenzintensitätsänderung durch das Auswerteprogramm erfolgte in  $10^\circ$  Intervallen entlang des Membranringes. Die hyperpolarisierte Zellhemisphäre umfasst den Winkelbereich von  $0^\circ - 180^\circ$ , mit dem Pol bei  $90^\circ$  und die depolarisierte Zellhemisphäre entsprechend von  $180^\circ - 360^\circ$ , mit dem Pol bei  $270^\circ$  (s. Abb. 39). Ist bei der Darstellung der Ergebnisse vom Äquator die Rede, sind mit dieser Bezeichnung die Winkelsegmente bei  $0^\circ$  und  $180^\circ$  gemeint. Abbildung 40 zeigt die gemittelten Kurvenverläufe für einige ausgewählte Feldstärken. Je nach Feldstärke wurden 5 - 20 Messungen durchgeführt. Es werden nur die Daten bei relevanten Feldstärken gezeigt. In Abbildung 40 ist die Winkelabhängigkeit der Fluoreszenzintensitäts- bzw. der Membranspannungsänderung bei unterschiedlichen Feldstärken dargestellt.

Bei einer externen Feldstärke von  $0,1\text{ kV/cm}$  (s. Abb. 40, oben links, gelbe Kurve) lässt sich auf der hyperpolarisierten Zellhemisphäre ( $0-180^\circ$ ) ein leichter Anstieg, mit einer maximalen Änderung von  $-50\text{ mV}$  am Pol und einem anschließenden Rückgang auf das Ruhepotential am Äquator (bei  $180^\circ$ ), erkennen.

Auf der depolarisierten Zellhemisphäre steigt die Membranspannung entsprechend um 50 - 100 mV bis hin zum depolarisierten Pol an, um dann ebenfalls auf die Werte des Ruhepotentials zurückzukehren.

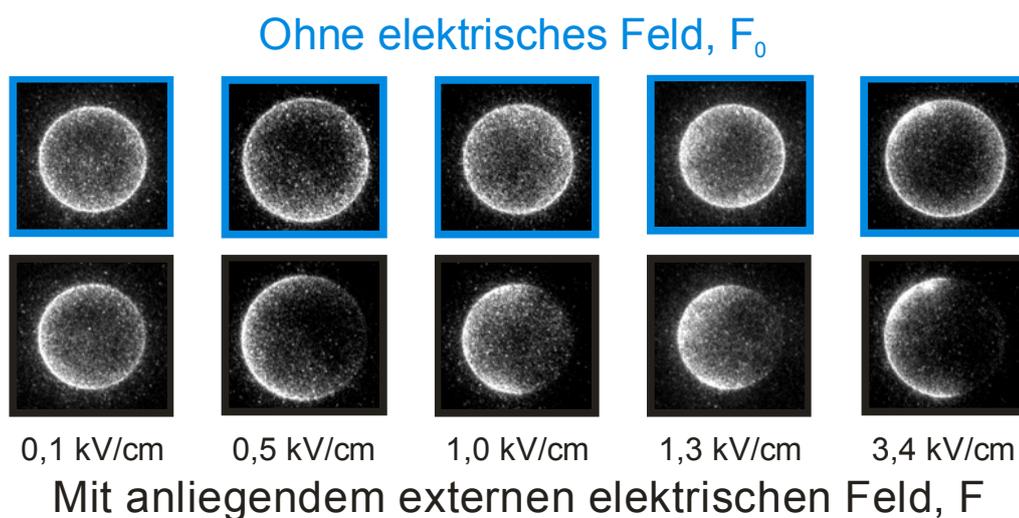


**Abbildung 40:**

**Azimutale Abhängigkeit der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten bei unterschiedlichen Feldstärken ( gelb = 0,1 kV/cm, blau = 0,5 kV/cm, rot = 1,0 kV/cm, grün = 1,3 kV/cm, schwarz = 3,4 kV/cm, lila = 16,0 kV/cm). Die hyperpolarisierte Zellhemisphäre umfasst den Winkelbereich von 0 – 180° (Zellpol bei 90°) und die depolarisierte Zellhemisphäre den Bereich von 180 – 360° (Zellpol bei 270°).**

Erhöht man die Feldstärke auf 0,5 kV/cm (s. Abb. 40, oben links, blaue Kurve) lässt sich eine stärkere Aufladung der Membran erkennen. Die Kurve zeigt zwar einen ähnlichen Verlauf wie bei 0,1 kV/cm (s. Abb. 40, oben links, gelbe Kurve), jedoch mit einer ausgeprägteren Amplitude. Des Weiteren lässt sich die, auch schon bei der Feldstärkeabhängigkeit ermittelte, Asymmetrie des Aufladeverhaltes erkennen. Der Kurvenverlauf zeigt einen Anstieg bis zu einem Winkel von 22,5° um dann bei einer Änderung der Membranspannung von ca. -150 mV ein Sättigungsverhalten zu zeigen. Erst bei einem Winkel von 157,5° zeigt sich die Verringerung der Membranspannungsänderung, die bei 180° den Wert 0 mV erreicht.

Auf der depolarisierten Zellseite ist ein deutlicher Anstieg mit einer maximalen Auslenkung von ca. 325 mV am Pol und dem folgenden Rückgang auf das Ruhepotential zu erkennen. Bei einer angelegten Feldstärke von 1,0 kV/cm (s. Abb. 40, oben, rote Kurve) zeigt sich ein anderes Aufladeverhalten. Wie auch bei einer Feldstärke von 0,5 kV/cm (s. Abb. 40, oben links, blaue Kurve) lässt sich ein Anstieg der Membranspannung bis zu  $\theta = 22,5^\circ$  beobachten, an den sich ein starker Einbruch der Membranspannung bis in den depolarisierten Bereich anschließt. Bei einem Winkel von  $67^\circ$  erreicht die Membranspannungsänderung ein lokales Minimum von ca. 75 mV. Bei Erreichen des hyperpolarisierten Zellpoles erfolgt ein leichter Anstieg auf 50 mV, gefolgt von einem weiteren Abfall der Membranspannungsänderung auf 75 mV bei  $112^\circ$ . Der weitere Kurvenverlauf lässt einen deutlichen Anstieg bis auf -100 mV bei  $157,5^\circ$  und dem folgenden typischen Abfall auf das Ruhepotential am Zelläquator ( $180^\circ$ ) erkennen.



**Abbildung 41:**

Ausgewählte Fluoreszenzaufnahmen von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten zu den in Abbildung 40 dargestellten Kurven. Die Abbildungen in der oberen Reihe zeigen die Grundfluoreszenz  $F_0$  ohne elektrisches Feld (blaue Kästen). In der unteren Reihe ist die Fluoreszenz F derselben Protoplasten bei anliegendem externen elektrischen Feld zu erkennen (schwarze Kästen). Auf der linken Bildseite befindet sich die Anode (hyperpolarisierte Zellhemisphäre), auf der rechten Seite entsprechend die Kathode (depolarisierte Zellhemisphäre). Der Betrag der angelegten Feldstärke steigt von links nach rechts an.

Auf der depolarisierten Zellhemisphäre zeigt sich eine Aufladung der Membran mit maximaler Amplitude am depolarisierten Pol von 550 mV und dem anschließenden Anstieg der Membranspannung bis zum Erreichen des Ruhepotentials bei 0°.

Mit weiter zunehmender Feldstärke konnte im Bereich des Polaritätswechsels am Äquator (0° und 180°) ebenfalls ein steilerer Anstieg bzw. Rückgang der Kurve verzeichnet werden. Der Kurvenverlauf bei einer Feldstärke von 1,3 kV/cm (s. Abb. 40, unten links, grüne Kurve) zeigt auf der hyperpolarisierten Seite dasselbe Verhalten wie bei einer Feldstärke von 0,5 kV/cm (s. Abb. 40, oben links, blaue Kurve). Das bedeutet, dass der beobachtete Spannungseinbruch an der Membran sich durch erneute Aufladung erholt hat und anschließend den bereits bei 0,5 kV/cm beobachteten flachen Kurvenverlauf zeigt. Auf der depolarisierten Zellhemisphäre hingegen lässt sich ein sehr steiler Anstieg bis auf maximal 450 mV (bei 212°) beobachten, der dem Verlauf bei 1,0 kV/cm folgt. Ab einem Winkel von 212° erfolgt ein stetiger Einbruch der Membranspannungsänderung, der am depolarisierten Zellpol ein Maximum bei 350 mV erreicht. Es folgt ein ebenso stetiger Abfall bis bei 325° erneut 450 mV erreicht werden um danach in einem steilen Abfall bei 360° den Wert des Ruhepotentials zu erreichen.

Bei einer angelegten Feldstärke von 3,4 kV/cm (s. Abb. 40, unten links, schwarze Kurve) zeigt sich ein mit der Kurve bei 1,3 kV/cm (s. Abb. 40, unten links, grüne Kurve) vergleichbarer Kurvenverlauf, jedoch mit größerer Flankensteilheit am Äquator. Wird die Feldstärke auf 16,0 kV/cm (s. Abb. 40, unten rechts, lila Kurve) gesteigert, ist auf der hyperpolarisierten Zellhemisphäre ein vergleichbarer Kurvenverlauf wie bei 1,3 kV/cm bzw. 3,4 kV/cm (s. Abb. 40, unten links, grüne bzw. schwarze Kurve) zu erkennen. Die Membranspannung steigt schnell auf einen Wert zwischen -100 und -150 mV an und verbleibt auf diesem Wert bis kurz vor Erreichens des Äquators, wo ein schneller Rückgang auf das Ruhepotential zu verzeichnen ist. An der depolarisierten Zellhemisphäre lässt der Kurvenverlauf eine Wiederaufladung des zuvor bei 1,3 kV/cm bzw. 3,4 kV/cm (s. Abb. 40, unten links, grüne bzw. schwarze Kurve) detektierten Spannungseinbruches erkennen. Der flache Kurvenverlauf, der auf eine erneute Aufladung hindeutet, ist gut zu erkennen. Die dargestellten Kurvenverläufe konnten für alle Zellen (je nach Feldstärke 5 - 20) reproduziert werden und sind somit statistisch abgesichert.

Abbildung 42 zeigt die Entwicklung der Membranspannung in Abhängigkeit der applizierten externen Feldstärke für verschiedene Winkelsegmente der depolarisierten Zellhemisphäre (s. Abb. 43).

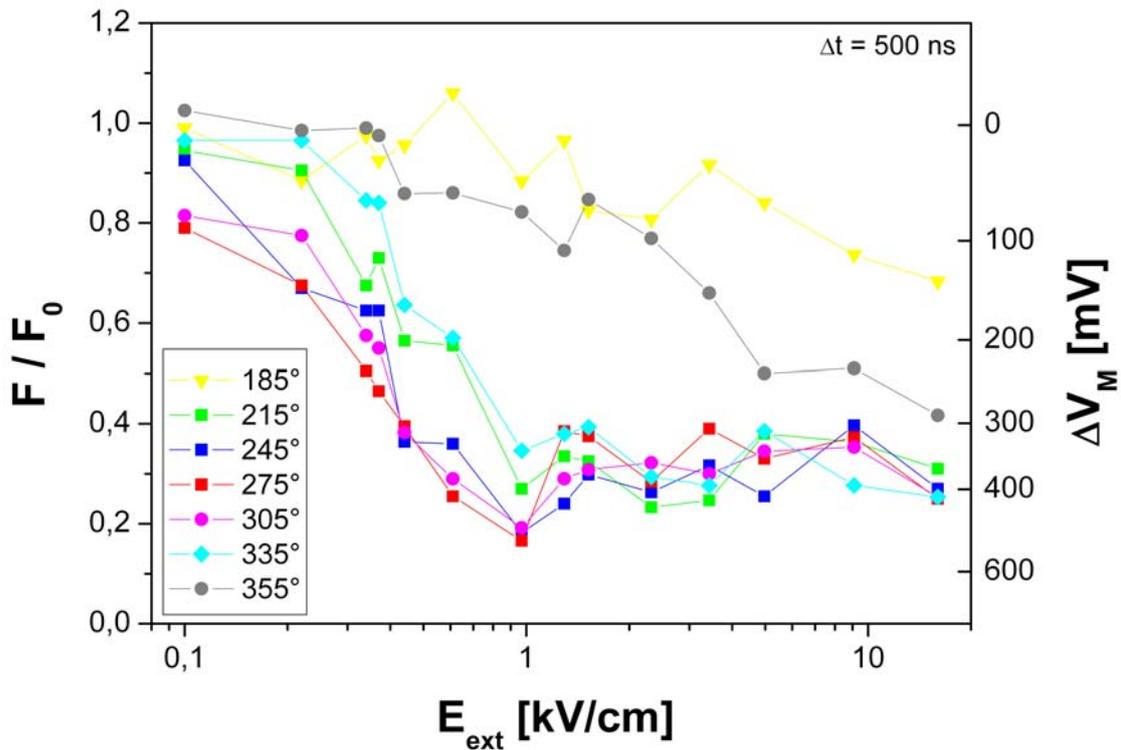
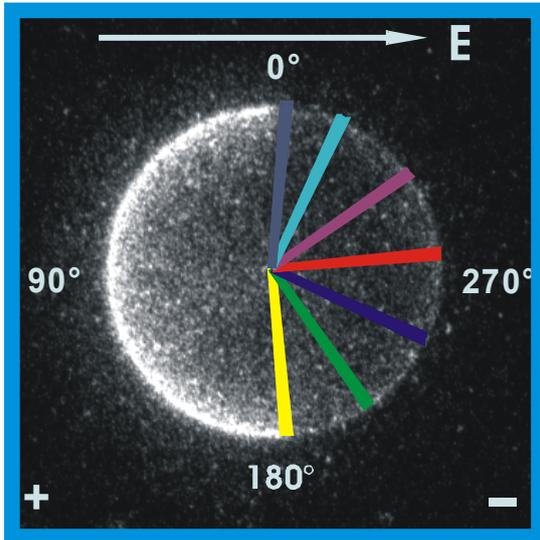


Abbildung 42:

Entwicklung der Membranspannung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten für unterschiedliche Winkelsegmente in Abhängigkeit der applizierten Feldstärke (gelb = 185°, grün = 215°, blau = 245°, rot = 275°, rosa = 305°, hellblau = 335°, grau = 355°; s. auch Abb. 43), dargestellt für die depolarisierte Zellhemisphäre.

Die Winkelsegmente mit demselben Winkelabstand zum Zellpol zeigen vergleichbare Kurvenverläufe. Die Winkelsegmente der Polregion (s. Abb. 43, blaue, rote und rosa Kurve) zeigen alle den gleichen Verlauf, der durch einen stetigen Anstieg bis zu ca. 1,0 kV/cm und einen nachfolgenden Rückgang gekennzeichnet ist.

Die beiden vom Pol entfernteren Winkelsegmente (s. Abb. 43, grüne und hellblaue Kurve) zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die Polwinkel, allerdings mit einer geringeren Amplitude.



**Abbildung 43:**

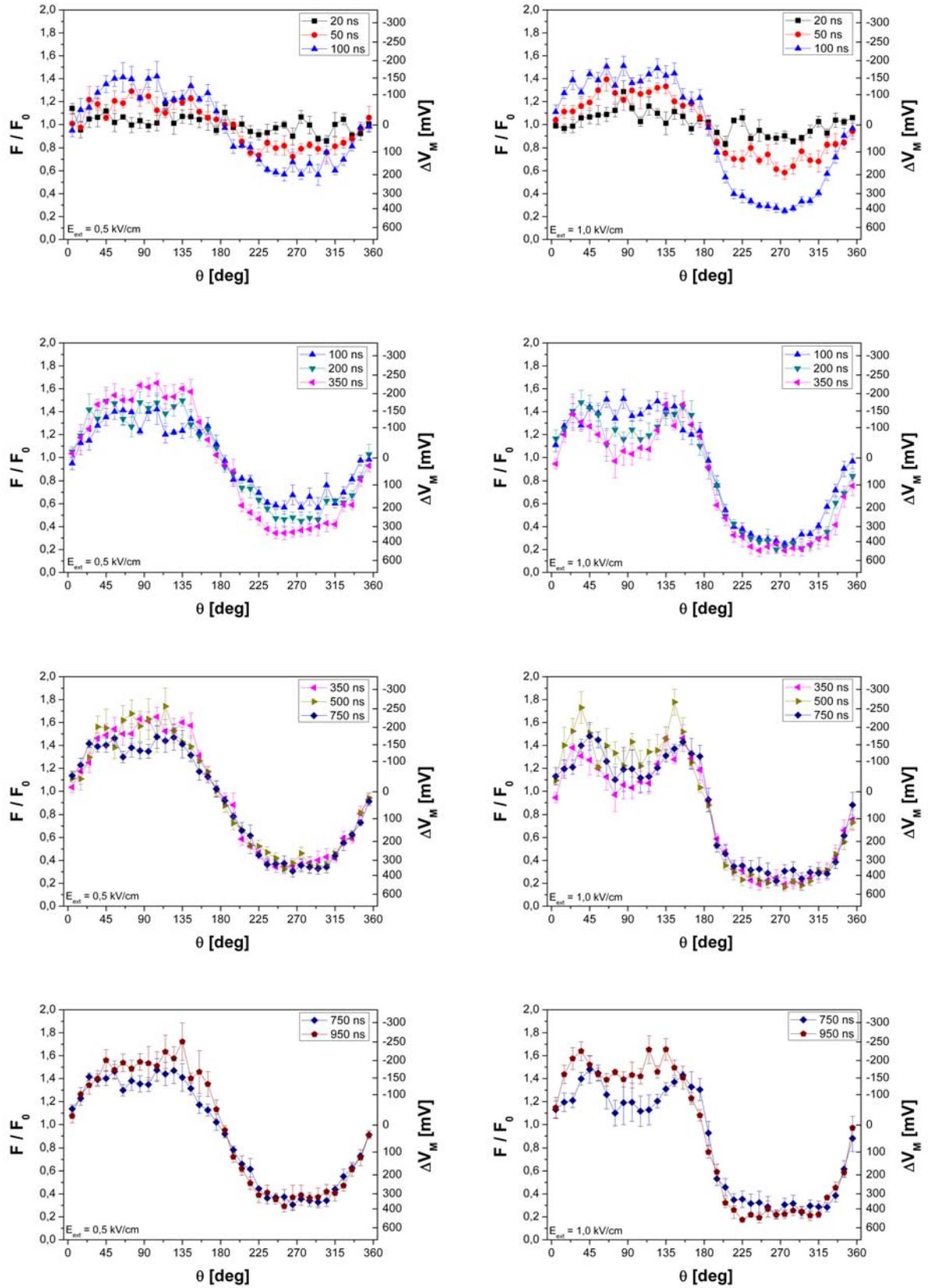
**Schema zur Darstellung der gezeigten azimuthalen Winkel. Das Bild zeigt einen mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten, aufgenommen mit Hilfe der iCCD-Kamera. Auf der linken Seite ist die anodische Zellhemisphäre zu erkennen, auf der rechten Seite die kathodische Zellhemisphäre. Die betrachteten Winkelsegmente sind in unterschiedlichen Farben dargestellt (gelb = 185°, grün = 215°, blau = 245°, rot = 275°, rosa = 305°, hellblau = 335°, grau = 355°; s. auch Abb. 42).**

Am Zelläquator (s. Abb. 43, gelbe und graue Kurve) findet erst ab höheren externen Feldstärken eine merkliche Aufladung statt.

Generell ist festzustellen, dass die Membranspannungsänderungen symmetrisch zum Zellpol sind.

*Zeitliche Entwicklung des Transmembranpotentials in Abhängigkeit des azimuthalen Winkels:*

Um den bei 1,0 kV/cm beobachteten azimuthalen Membranspannungsverlauf (s. Abb. 40, oben rechts, rote Kurve) näher zu untersuchen, wurde das zeitliche Aufladeverhalten für den kompletten Zellumfang gemessen. Als Vergleich erfolgte eine Messung bei 0,5 kV/cm. Dazu wurden Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn des 1µs -Spannungspulses (20 ns, 50 ns, 100 ns, 200 ns, 350 ns, 500 ns, 750 ns und 950 ns) für die Feldstärken 0,5 kV/cm und 1,0 kV/cm durchgeführt. Die Berechnung der Fluoreszenzintensitätsänderungen erfolgte in 10° Intervallen entlang des Membranringes. Zur Umrechnung in Membranspannungsänderungen wurde die entsprechende Kalibrierkurve für die Anregungswellenlänge  $\lambda = 468 \text{ nm}$  (s. Abb. 26, blaue Kurve) verwendet. Abbildung 44 zeigt den gemittelten Kurvenverlauf von 5 - 7 Messungen.



**Abbildung 44:**  
Zeitliche Entwicklung der azimuthalen Abhängigkeit der Membranspannungsänderung.

Abbildung 44 zeigt die zeitliche Entwicklung der azimuthalen Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eines 1  $\mu$ s-Spannungspulses (schwarz = 10 ns, rot = 50 ns, blau = 100 ns, grün = 200 ns, khaki = 500 ns, dunkelblau = 750 ns, braun = 950 ns) und bei unterschiedlichen Feldstärken (links = 0,5 kV/cm, rechts = 1,0 kV/cm). Die hyperpolarisierte Zellhemisphäre umfasst den Winkelbereich von 0 – 180° (Zellpol bei 90°) und die depolarisierte Zellhemisphäre den Bereich von 180 – 360° (Zellpol bei 270°).

Für eine geringe externe Feldstärke von 0,5 kV/cm zeigt sich das erwartete sinusförmige Aufladeverhalten. Erst 750 ns (s. Abb. 44, links, dunkelblaue Kurve) nach Pulsbeginn lässt sich ein Abflachen und Einbrechen des Kurvenverlaufs am hyperpolarisierten Zellpol erkennen.

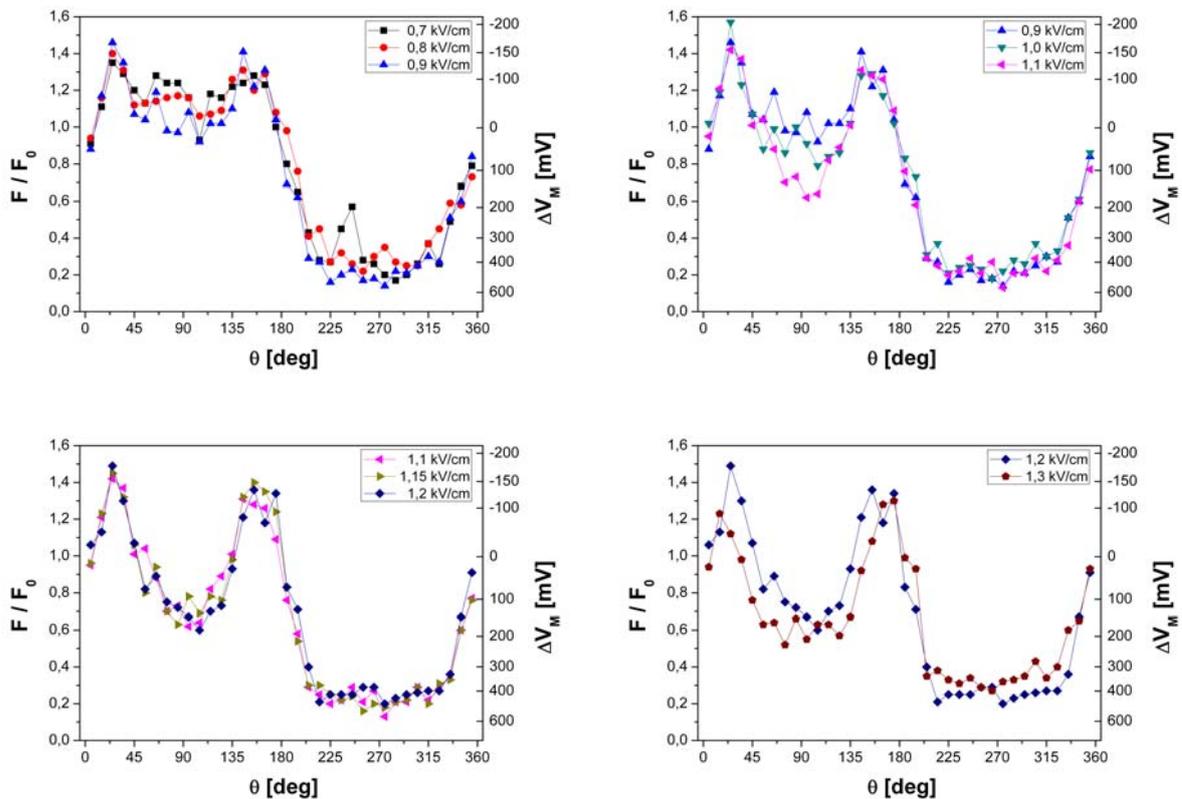
Wird eine höhere Feldstärke von 1,0 kV/cm angelegt, zeigt der Kurvenverlauf eine stetig zunehmende Aufladung bis zu 100 ns nach Beginn des 1  $\mu$ s-Spannungspulses (s. Abb. 44, rechts, hellblaue Kurve). Die Asymmetrie zwischen den beiden Zellhemisphären, wie auch das einsetzende Sättigungsverhalten am hyperpolarisierten Zellpol nach 100 ns, sind bereits zu erkennen.

Nach 200 ns ist der beginnende Rückgang der Membranspannung am hyperpolarisierten Zellpol deutlich zu erkennen (s. Abb. 44, rechts, grüne Kurve), wobei ein Minimum nach 350 ns erreicht wird (s. Abb. 44, rechts, rosa Kurve).

Gegen Ende des Spannungspulses kann am hyperpolarisierten Zellpol eine erneute Zunahme der Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannung beobachtet werden, die zu der typischen, an den Polen abgeflachten Kurvenform führt (s. Abb. 44, rechts, braune Kurve).

## Steigerung der applizierten Feldstärke

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Entwicklung des Spannungseinbruches (s. Abb. 40, oben rechts, rote Kurve, hyperpolarisierter Zellpol) bei demselben Protoplasten in Abhängigkeit der applizierten Feldstärke zu beobachten. Hierzu wurde ein gut gefärbter Protoplast ausgewählt und die Feldstärke in Schritten von 0,1 kV/cm im Bereich von 0,7 kV/cm – 1,3 kV/cm gesteigert.



**Abbildung 45:**

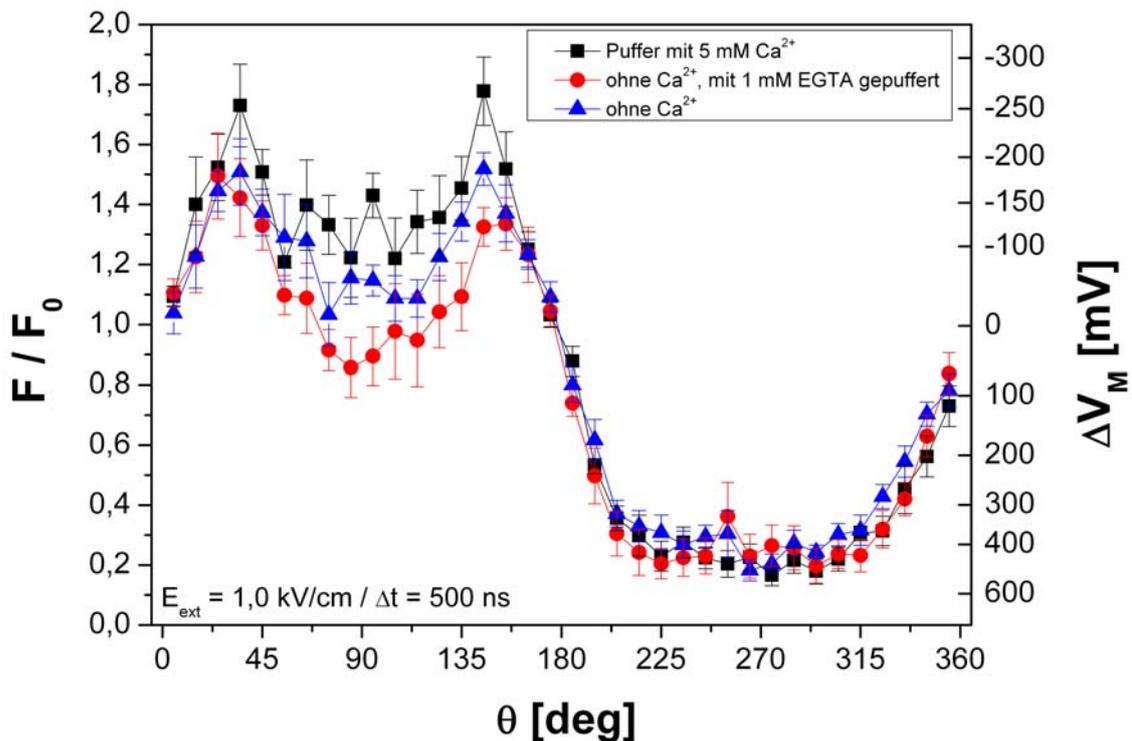
**Azimutale Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannungsänderung bei unterschiedlichen Feldstärken, gemessen 500 ns nach Pulsbeginn. (schwarz = 0,7 kV/cm, rot = 0,8 kV/cm, blau = 0,9 kV/cm, grün = 1,0 kV/cm, rosa = 1,1 kV/cm, khaki = 1,15 kV/cm, dunkelblau = 1,2 kV/cm, braun = 1,3 kV/cm). Die Messungen erfolgten an demselben Protoplasten.**

Bei jeder Pulsapplikation erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzintensität in der zeitlichen Mitte des elektrischen Feldpulses ( $t = 500$  ns). Abbildung 45 lässt den einsetzenden Spannungseinbruch bei 0,9 kV/cm deutlich erkennen (s. Abb. 45, oben links, hellblaue Kurve). Mit weiter ansteigender Feldstärke zeigt sich nicht nur eine Änderung der Amplitude, sondern auch eine Verbreiterung des Kurvenverlaufs.

Bei einer angelegten Feldstärke von 1,1 kV/cm (s. Abb. 45, oben rechts, rosa Kurve) scheint für einen 38  $\mu\text{m}$  großen Protoplasten das Minimum erreicht zu sein. Bei weiter ansteigenden Feldstärken ist keine Änderung der Membranspannung mehr zu erkennen. Der Rückgang der Membranspannung umfasst mit zunehmender Feldstärke einen größeren Winkelbereich (s. Abb. 45, unten rechts, braune Kurve).

### *Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Membranspannung*

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem bei 1,0 kV/cm beobachteten azimuthalen Spannungsverlauf (s. a. Abschnitt *“Untersuchungen zur Winkelabhängigkeit des Transmembranpotentials“*, Abb. 40, oben rechts, rote Kurve) um die Aktivierung spannungssensitiver Calciumkanäle handelt, erfolgten identische Versuche ohne Calcium im extrazellulären Medium.



**Abbildung 46:**

**Einfluss der Calciumkonzentration im extrazellulären Medium auf die azimuthale Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten bei einer Feldstärke von 1,0 kV/cm, gemessen 500 ns nach Pulsbeginn (schwarz = 16 mS-Versuchslösung, rot = ohne extrazell. Calcium mit 1 mM EGTA gepuffert, blau = ohne extrazell. Calcium).**

Als Behandlungspuffer wurde die 16 mS-Versuchslösung, einmal ohne Calcium angesetzt und einmal ohne Calcium und mit zusätzlich 1 mM EGTA, bei dem es sich um einen Calcium-Komplexbildner handelt, verwendet. Die Messungen erfolgten bei einer Feldstärke von 1,0 kV/cm in der Mitte des 1 $\mu$ s-Spannungspulses ( $t = 500$  ns). Die Berechnung der Fluoreszenzintensitätsänderung erfolgte in 10° Intervallen entlang des Membrumfangs. Abbildung 46 zeigt den gemittelten Kurvenverlauf von 5 - 7 Messungen. Die Kurvenverläufe zeigen, dass das Fehlen von extrazellulärem Calcium zu einer Vergrößerung des Spannungseinbruchs am hyperpolarisierten Zellpol führt. Auf der depolarisierten Zellhemisphäre hingegen scheint die Abwesenheit von Calcium, bei dieser Feldstärke, keinen Einfluss zu haben.

### 3.2.2 100 ns-Leitung

#### *Zeitliche Entwicklung der Membranspannung:*

Bei diesem Versuchsansatz sollte die zeitliche Entwicklung der Membranspannung in Reaktion auf einen Kurzpuls untersucht werden. Hierzu wurde die Fluoreszenzintensitätsänderung für eine Feldstärke von 0,5 kV/cm zu unterschiedlichen Zeitpunkten während eines 100 ns-Spannungspulses aufgenommen.

Die Aufnahme der Fluoreszenzintensitäten erfolgte zu den Zeitpunkten 10 ns, 15 ns, 20 ns, 35 ns, 50 ns, 75 ns und 90 ns. Die beiden verwendeten Pulsleitungen besitzen nicht nur unterschiedliche Pulslängen, sondern auch unterschiedliche Puls-Anstiegszeiten (s. Abb. 33). Abbildung 47 zeigt die zeitliche Entwicklung bei 0,5 kV/cm unter Verwendung der 100 ns-Leitung (Anstiegszeit  $T_{10:90} = 10$  ns, s. Abb. 33 rechts), sowie der 1  $\mu$ s-Pulsleitung (Anstiegszeit  $T_{10:90} = 80$  ns, s. Abb. 33 links).

Die zeitliche Entwicklung bei gleicher Feldstärke lässt erwartungsgemäß einen Unterschied im Aufladeverhalten in Abhängigkeit von der verwendeten Pulsleitung erkennen.

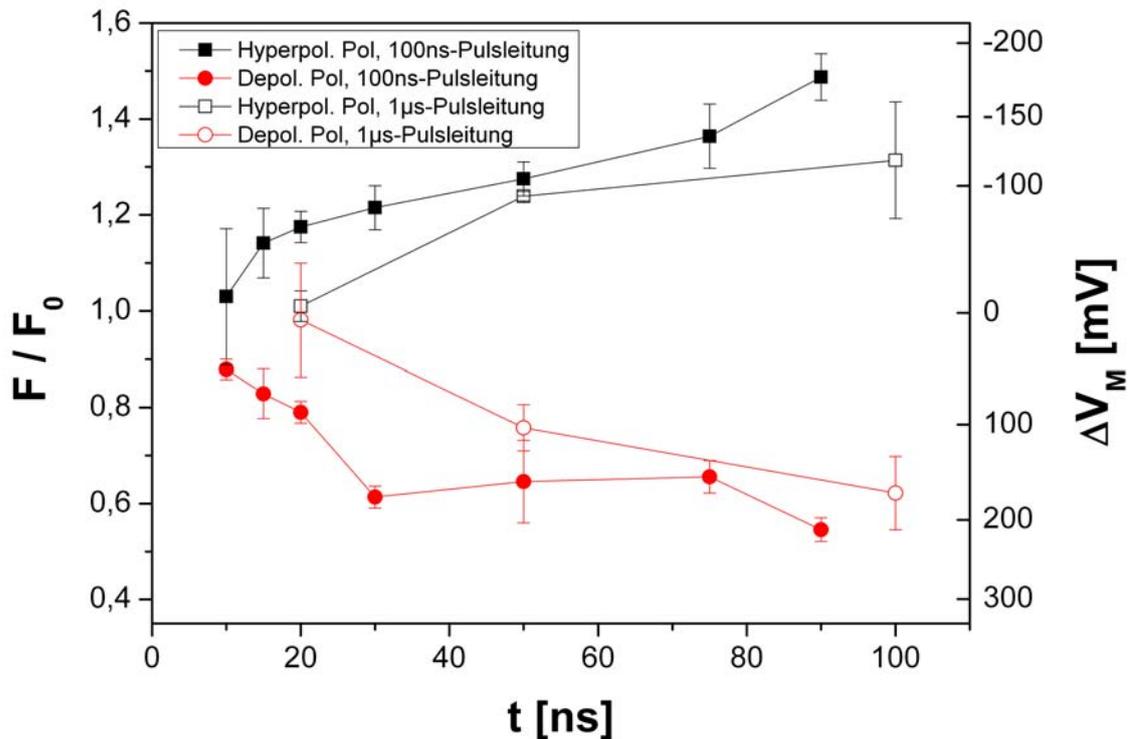


Abbildung 47:

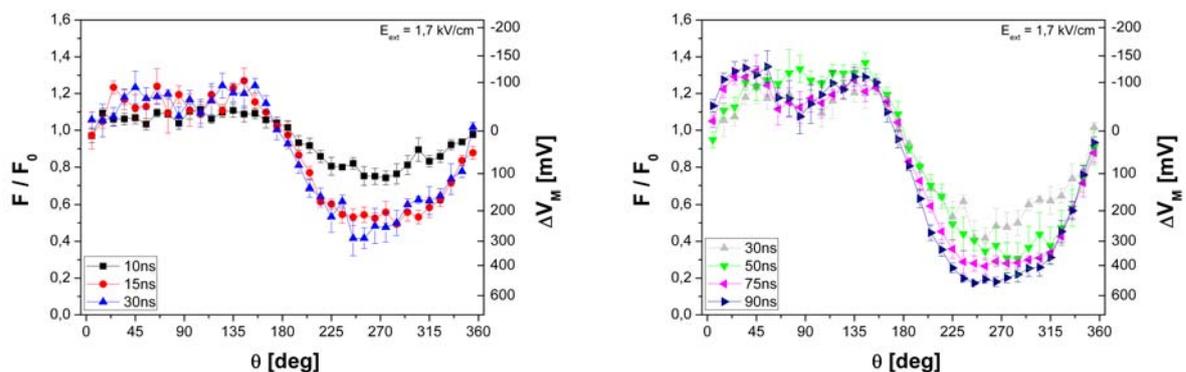
Zeitliche Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten, bei einer Feldstärke von 0,5 kV/cm. Die Auswertung erfolgte für den hyperpolarisierten Pol (schwarz) und den depolarisierten Pol (rot).

(Geschlossenes Symbol = 100 ns-Leitung, offenes Symbol = 1 μs-Pulsleitung).

Während bei Verwendung der Kurzpulsleitung bereits nach 20 ns eine merkliche Aufladung zu beobachten ist, lässt sich bei Einsatz der 1 μs-Leitung zum gleichen Zeitpunkt noch keine messbare Aufladung feststellen. Das Aufladeverhalten der Protoplasten bei Verwendung der 100 ns-Leitung zeigt, verglichen mit Abbildung 35, ebenfalls einen raschen exponentiellen Anstieg der Membranspannung. Allerdings ist bei Verwendung eines so kurzen Pulses ein stationärer Endwert nicht zu erreichen (s. Abb. 47).

*Zeitliche Entwicklung des Transmembranpotentials in Abhängigkeit des azimuthalen Winkels:*

Um das zeitliche Aufladeverhalten der Plasmamembran bei einer Pulslänge von 100 ns sowie das generelle Verhalten des Plasmalemma bei Nanosekundenpulseexposition näher zu untersuchen, wurden Versuche zu unterschiedlichen Messzeitpunkten nach Beginn eines 100 ns-Spannungspulses (10 ns, 15 ns, 30 ns, 50 ns, 75 ns und 90 ns) und bei jeweils unterschiedlichen Feldstärken (1,7 kV/cm, 4,0 kV/cm, 16,7 kV/cm und 31,0 kV/cm) durchgeführt. Die Berechnung der Fluoreszenzintensitätsänderungen erfolgte, wie auch bei der 1µs-Leitung, in 10° Intervallen entlang des Membranringes. Zur Umrechnung in Membranspannungsänderungen wurde die entsprechende Kalibrierkurve (s. Abb. 26, blaue Kurve) verwendet. Die Abbildungen 48 - 52 zeigen den gemittelten Kurvenverlauf von 5 - 8 Messungen. Die zeitliche Entwicklung der Membranspannung in Folge eines 100 ns-Pulses mit einer Feldstärke von 1,7 kV/cm (s. Abb. 48) lässt 10 Nanosekunden nach Beginn des Spannungspulses eine geringe Änderung der Membranspannung auf der hyperpolarisierten Seite erkennen (s. Abb. 48, schwarze Kurve). Auf der depolarisierten Seite ist hingegen bereits eine Änderung von ca. 100 mV zu erkennen.



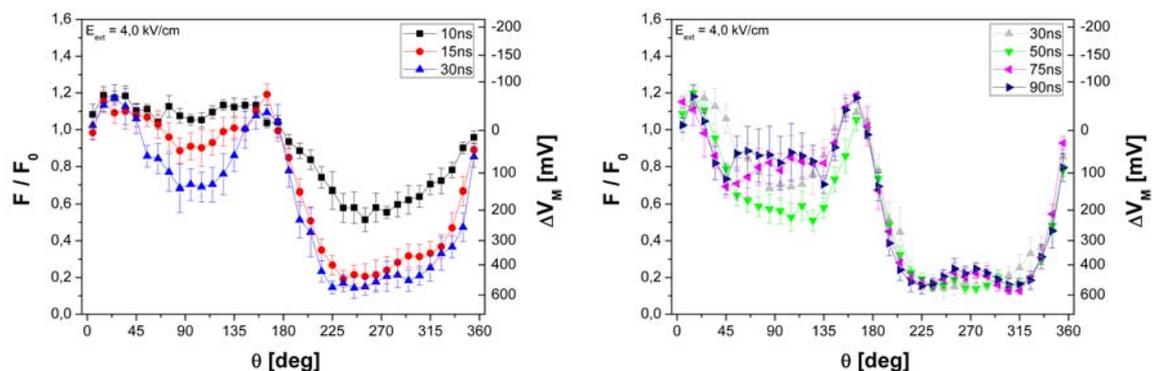
**Abbildung 48:**

**Zeitliche Entwicklung der azimuthalen Abhängigkeit der Membranspannungsänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eines 100 ns Spannungspulses ( $E = 1,7 \text{ kV/cm}$ ) (schwarz = 10 ns, rot = 15 ns, blau = 30 ns, grün = 50 ns, rosa = 75 ns, dunkelblau = 90 ns). Die hyperpolarisierte Zellhemisphäre umfasst den Winkelbereich von 0 – 180° (Zellpol bei 90°) und die depolarisierte Zellhemisphäre den Bereich von 180 – 360° (Zellpol bei 270°).**

Auf der hyperpolarisierten Zellhemisphäre zeigt sich mit zunehmendem  $\Delta t$  ein langsamer Anstieg der Membranspannungsänderung auf Werte bis - 150 mV, wobei ab 75 ns (s. Abb. 48, rosa Kurve) der typische Rückgang der Membranspannung an der Polregion zu erkennen ist. Auf der depolarisierten Zellseite zeigt sich der zu erwartende sinusförmige Verlauf, der mit zunehmendem  $\Delta t$  steiler wird und eine größere Amplitude bis maximal 500 mV aufweist.

Betrachtet man die zeitliche Entwicklung bei einer höheren Feldstärke (4,0 kV/cm, s. Abb. 49), so sind bereits Abweichungen vom zu erwarteten Kurvenverlauf zu erkennen.

Lediglich 10 Nanosekunden nach Beginn des Spannungspulses lässt sich der erwartete Kurvenverlauf mit annähernd sinusförmiger Form beobachten (s. Abb. 49, schwarze Kurve). Bis zur halben Pulslänge zeigen die Kurven auf der hyperpolarisierten Seite einen Spannungsrückgang bis auf 250 mV (s. Abb. 49, grüne Kurve) und somit eine Depolarisation, die ab einer Zeit  $\Delta t = 75$  ns (s. Abb. 49, rosa Kurve) auf 100 mV abnimmt und einen deutlich flacheren Verlauf an der Polregion zeigt.

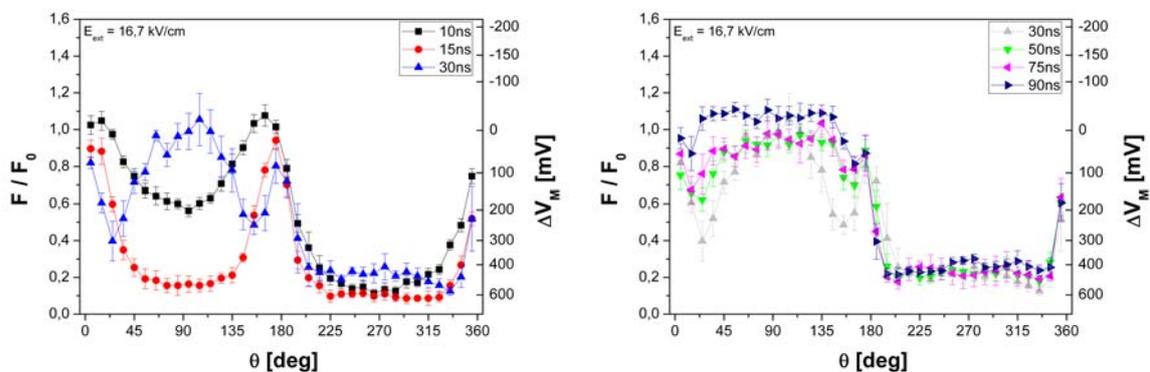


**Abbildung 49:**

**Zeitliche Entwicklung der azimutalen Abhängigkeit der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eines 100 ns Spannungspulses ( $E = 4,0$  kV/cm) (schwarz = 10 ns, rot = 15 ns, blau = 30 ns, grün = 50 ns, rosa = 75 ns, dunkelblau = 90 ns). Die hyperpolarisierte Zellhemisphäre umfasst den Winkelbereich von  $0 - 180^\circ$  (Zellpol bei  $90^\circ$ ) und die depolarisierte Zellhemisphäre den Bereich von  $180 - 360^\circ$  (Zellpol bei  $270^\circ$ ).**

Auf der depolarisierten Zellseite steigt die Membranspannungsänderung ebenfalls bis zur Pulsmitte auf einen Wert von 550 mV an (s. Abb. 49, grüne Kurve). Betrachtet man die Kurven 75 ns (s. Abb. 49, rosa Kurve) nach Pulsbeginn, ist auch auf der depolarisierten Seite ein Einbruch auf 450 mV an der Polregion zu erkennen.

Eine weitere Erhöhung auf eine Feldstärke von 16,7 kV/cm zeigt eine zeitliche Verschiebung, wie auch eine Verstärkung des bei 4,0 kV/cm (s. Abb. 49) beobachteten Verhaltens. An der hyperpolarisierten Zellhemisphäre lässt sich direkt nach 10 ns eine sinusförmige Depolarisation auf Werte von 200 mV erkennen (s. Abb. 50, schwarze Kurve). Dieser Einbruch der Membranspannung wird nach weiteren 5 ns deutlich steiler, steigt auf Werte von 550 mV an und beginnt größere Winkelbereiche zu umfassen (s. Abb. 50, rote Kurve). Nach 30 Nanosekunden zeigt der Kurvenverlauf eine am Zellpol beginnende Wiederaufladung der Membran, auf das Niveau des Ruhepotentials hin (s. Abb. 50, blaue Kurve). Mit weiter fortschreitender Pulsdauer beginnt die Wiederaufladung der Membran immer größere Winkelbereiche zu umfassen (s. Abb. 50, grüne bzw. rosa Kurve). Nach 90 ns zeigt sich ein stark abgeflachter Kurvenverlauf bei ca. -50 mV und damit das erwartete hyperpolarisierte Verhalten (s. Abb. 50, dunkelblaue Kurve).



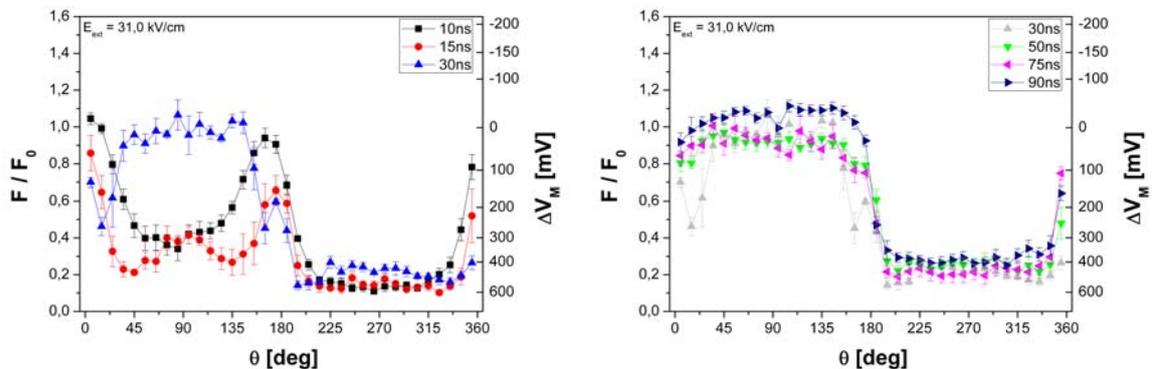
**Abbildung 50:**

**Zeitliche Entwicklung der azimutalen Abhängigkeit der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eines 100 ns Spannungspulses ( $E = 16,7$  kV/cm) (schwarz = 10 ns, rot = 15 ns, blau = 30 ns, grün = 50 ns, rosa = 75 ns, dunkelblau = 90 ns). Die hyperpolarisierte Zellhemisphäre umfasst den Winkelbereich von  $0 - 180^\circ$  (Zellpol bei  $90^\circ$ ) und die depolarisierte Zellhemisphäre den Bereich von  $180 - 360^\circ$  (Zellpol bei  $270^\circ$ ).**

Auf der depolarisierten Zellseite zeigt sich der zu erwartende sinusförmige Kurvenverlauf. Das beginnende Abflachen der Sinusform ist bereits nach 15 ns zu erkennen (s. Abb. 50, rote Kurve). Zu späteren Zeitpunkten des Spannungspulses ist lediglich ein stark abgeflachter Kurvenverlauf zu erkennen (s. Abb. 50, grüne, rosa oder dunkelblaue Kurve).

Bei Anlegen eines externen elektrischen Feldes von 31,0 kV/cm lässt sich auf der hyperpolarisierten Zellseite 10 ns nach Pulsbeginn eine sinusförmige Depolarisation auf Werte von 350 mV erkennen (s. Abb. 51, schwarze Kurve). Bereits nach 15 ns ist die auch schon zuvor bei 16 kV/cm (s. Abb. 50, blaue Kurve, 30 ns) beobachtete Wiederaufladung, beginnend am Zellpol, zu erkennen (s. Abb. 51, rote Kurve).

Nach 30 ns beginnt die Wiederaufladung der Membran einen größeren Winkelbereich zu umfassen und erreicht bereits den Wert des Ruhepotentials (s. Abb. 51, blaue Kurve). Mit weiter fortschreitender Pulsdauer zeigt sich ein stark abgeflachter Kurvenverlauf bei ca. -50 mV und damit das erwartete hyperpolarisierte Verhalten (s. Abb. 51, dunkelblaue Kurve).



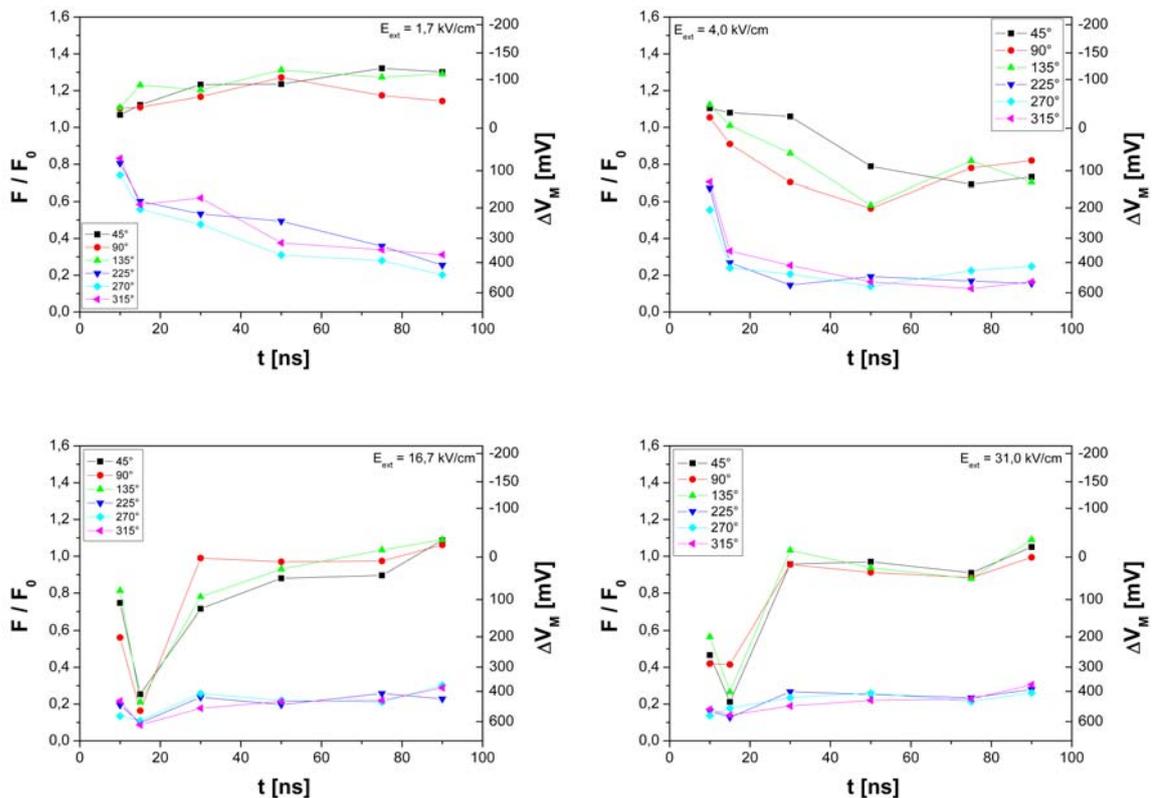
**Abbildung 51:**

**Zeitliche Entwicklung der azimuthalen Abhängigkeit der Membranspannungsänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eines 100 ns Spannungspulses ( $E = 31,0$  kV/cm) (schwarz = 10 ns, rot = 15 ns, blau = 30 ns, grün = 50 ns, rosa = 75 ns, dunkelblau = 90 ns). Die hyperpolarisierte Zellhemisphäre umfasst den Winkelbereich von  $0 - 180^\circ$  (Zellpol bei  $90^\circ$ ) und die depolarisierte Zellhemisphäre den Bereich von  $180 - 360^\circ$  (Zellpol bei  $270^\circ$ ).**

An der depolarisierten Zellseite zeigt sich der zu erwartende sinusförmige Kurvenverlauf, der bereits nach 15 ns eine stark abgeflachte Form annimmt (s. Abb. 51, rote Kurve).

Mit zunehmender Feldeinwirkung ist außer einer zunehmenden Steilheit des Spannungswechsels am Äquator keine wesentliche Veränderung des Kurvenverlaufes zu erkennen (s. Abb. 51, dunkelblaue Kurve). Lediglich eine Verringerung der Membranspannungsänderung von maximal 600 mV nach 10 ns (s. Abb. 51, schwarze Kurve) auf minimal 400 mV nach 90 ns (s. Abb. 51, dunkelblaue Kurve) konnte beobachtet werden.

Abbildung 52 zeigt die zeitliche Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung für unterschiedliche azimutale Winkel auf beiden Zellhemisphären. Bei einer Feldstärke von 1,7 kV/cm ist erneut das asymmetrische Aufladeverhalten sehr gut zu erkennen. Die stärkste Aufladung tritt an den beiden Zellpolen (s. Abb. 52, oben links, rote und hellblaue Kurve).



**Abbildung 52:**

Zeitliche Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensität von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten für ausgewählte Winkel zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eines 100 ns Spannungspulses (schwarz = 45°, rot = 90°, grün = 135°, blau = 225°, hellblau = 270°, rosa = 315°) und bei unterschiedlichen Feldstärken (links oben = 1,7 kV/cm rechts oben = 4,0 kV/cm, links unten = 16,7 kV/cm, rechts unten = 31,0 kV/cm).

Für eine Feldstärke von 4,0 kV/cm lässt sich für die depolarisierte Zellhemisphäre ein steil verlaufender Kurvenanstieg erkennen, welcher bereits nach 30 ns in Sättigung geht (s. Abb. 52, oben rechts, rosa und hell- und dunkelblaue Kurve). Die hyperpolarisierte Zellhemisphäre zeigt, dass der Spannungseinbruch der bei der azimutalen Darstellung dieser Daten beobachtet werden konnte (s. Abb. 49), sein Minimum nach 50 ns am hyperpolarisierten Zellpol erreicht. Mit weiter zunehmender Zeit ist die Wiederaufladung am Zellpol zu erkennen (s. Abb. 52, oben rechts, rote Kurve).

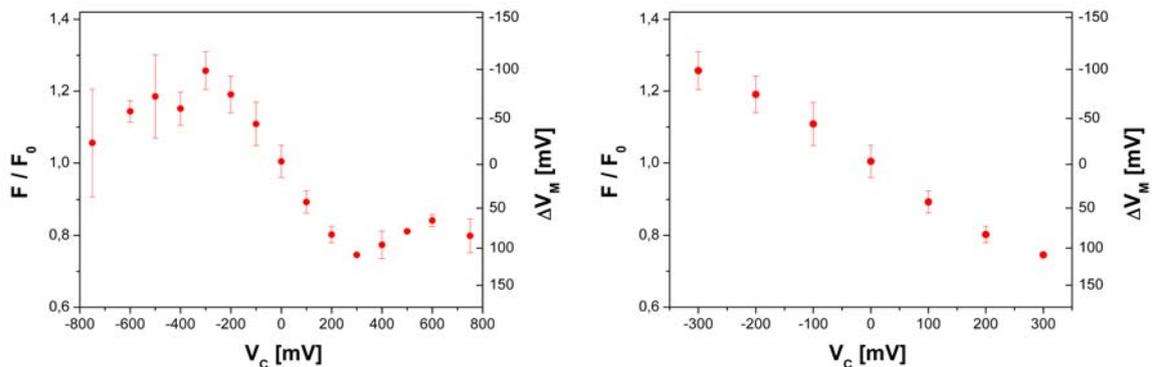
Eine Erhöhung der Feldstärke auf 16,0 kV/cm lässt die Aufladung an der depolarisierten Zellhemisphäre bereits nach 15 ns in Sättigung gehen. An der hyperpolarisierten Zellhemisphäre erreicht hingegen der Membranspannungseinbruch bereits nach 15 ns ein Minimum. Es folgt eine ebenso schnelle Wiederaufladung die nach 30 ns wieder auf Werte im Bereich des Ruhepotentials (s. Abb. 52, unten links) führt.

Für eine Feldstärke von 31,0 kV/cm lässt sich der tendenziell selbe Kurvenverlauf wie für eine Feldstärke von 16,0 kV/cm (s. Abb. 52, unten links) erkennen.

Für die depolarisierte Zellhemisphäre kann ein Sättigungsverhalten bereits nach 10 ns beobachtet werden (s. Abb. 52, unten rechts, rosa und hell- und dunkelblaue Kurve). Bei den beiden, den hyperpolarisierten Zellpol flankierenden Winkel ( $45^\circ$  und  $135^\circ$ ), erreicht der Membranspannungseinbruch ebenfalls nach 15 ns ein Minimum. Anschließend ist eine schnelle Wiederaufladung zu erkennen, die nach 30 ns wieder Werte im Bereich des Ruhepotentials erreicht (s. Abb. 52, unten rechts). Am hyperpolarisierten Zellpol hingegen ist nach 15 ns bereits die beginnende Wiederaufladung des Spannungseinbruchs der Membran zu erkennen (s. Abb. 52, unten rechts, rote Kurve).

### 3.3 Kalibrierung des Farbstoffes ANNINE-6 mittels der Patch-Clamp-Technik

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik wurde der feldsensitive Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6 für BY-2 Protoplasten kalibriert. Ein gut gefärbter Protoplast wurde ausgewählt und die Membran nach Erreichen der *Whole-Cell-Konfiguration* auf unterschiedliche Membranspannungen geklemmt ( $V_C$  = Kommandospannung). Verwendet wurden Spannungspulse mit einer Pulsdauer von 10 ms. Bei jeder angelegten Spannung wurde die Fluoreszenzintensität 50  $\mu$ s vor Ende des Spannungspulses aufgenommen und die Bilddaten in Fluoreszenzintensitätsänderungen umgerechnet.

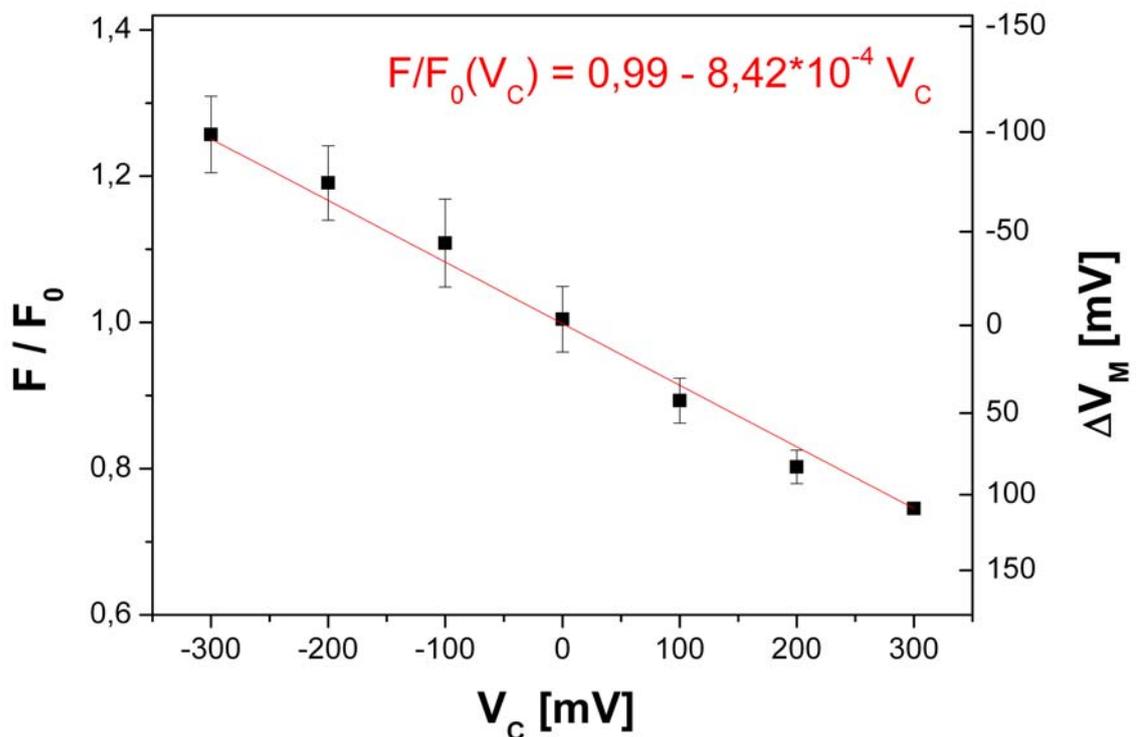


**Abbildung 53:**

Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der aus diesen resultierenden Membranspannungsänderung nach der bisher verwendeten Kalibrierkurve (s. Abb. 26) in Abhängigkeit der angelegten Membranspannung (Kommandospannung  $V_C$ ). Die Messungen erfolgten an ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten in der *Whole-Cell-Konfiguration*.

Die gemessenen Daten zeigen in einem Spannungsbereich von 300 mV bis -300 mV ein lineares Verhalten. Bei Spannungen, die über die genannten Werte hinausgehen, zeigt sich ein Sättigungsverhalten (s. Abb. 53 rechts).

Die Abbildungen 53, rechts und 54 zeigen den linearen Bereich in einem größeren Maßstab.



**Abbildung 54:**

Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der aus diesen resultierenden Membranspannungsänderung nach der bisher verwendeten Kalibrierkurve (s. Abb. 26) in Abhängigkeit der angelegten Membranspannung (Kommandospannung  $V_C$ ). Die Messungen erfolgten an ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten in der *Whole-Cell-Konfiguration*. Die rote Gerade zeigt eine lineare Regression der Messwerte.

In Abbildung 54 wurde eine lineare Regression der Messdaten durchgeführt, wodurch sich folgende Geradengleichung ergibt:

$$F/F_0(V_C) = 0,99 - 8,42 \cdot 10^{-4} V_C \quad (10)$$

$F/F_0$  = Relative Fluoreszenzintensitätsänderung

$V_C$  = Kommandospannung (an die Membran angelegte Spannung)

Dieser Gleichung ist ein Y-Achsenabschnitt von 0,99 und eine Steigung von  $-8,42 \cdot 10^{-4}$  zu entnehmen. Die berechnete Steigung ist hierbei ein Maß für die Spannungssensitivität des ANNINE-6 Farbstoffes unter den gegebenen Messbedingungen und liegt bei einer Fluoreszenzintensitätsänderung von 8,42 % pro 100 mV.

## 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

### 3.4.1 Vorversuche zur systematischen Fehlerbetrachtung

- Das zeitliche Aufladeverhalten einer Membran wurde, unter Verwendung zweier in der Literatur angegebener Ladezeitkonstanten, berechnet. Die Berechnung nach Weaver (Gowrishankar, Stewart und Weaver 2006) berücksichtigt die Membrandicke und die Leitfähigkeit der Membran und zeigt ein steileres Anstiegsverhalten sowie ein früheres Erreichen des stationären Endwertes, verglichen mit der Berechnung nach Schoenbach (Schoenbach et al. 1997).
- Der spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6 zeigt bei gleichen Behandlungsparametern deutlich höhere Fluoreszenzintensitätsänderungen als ANNINE-6plus. Auch nach mehrfacher Laserbelichtung ist keine Verringerung der Fluoreszenzintensitätsänderung zu beobachten.
- Unterschiedliche Anregungswellenlängen zeigen nach Rückrechnung mit der entsprechenden Kalibrierkurve übereinstimmende Werte.
- Eine Abschwächung der zur Farbstoffanregung verwendeten Laserenergie führte zu keiner Verringerung der Fluoreszenzantwort.
- Die gemessenen Kurvenverläufe für Protoplasten aus Zellkultur und Mesophyllprotoplasten sind vergleichbar.
- Messungen mit Protoplasten unterschiedlicher Größenbereiche zeigen eine gute Übereinstimmung der ermittelten Fluoreszenzintensitätsänderungen.
- Systematische Einflüsse der verwendeten Auswertemethode sind zu vernachlässigen.
- Die Stromantworten von ungefärbten und mit ANNINE-6 gefärbten Protoplasten zeigen keine Unterschiede.

### 3.4.2 Messungen zur Membranaufladung

- Die Feldstärkeabhängigkeit der Membranspannung zeigt ein nahezu exponentielles Verhalten.
- Für die beiden Zellpole ist ein asymmetrisches Aufladeverhalten zu beobachten (depolarisierte Zellhemisphäre: Aufladung bis zu  $E_{\text{ext}} = 1,0 \text{ kV/cm}$  und  $\Delta V_M = 450 \text{ mV}$  / hyperpolarisierte Zellhemisphäre: Aufladung bis zu  $E_{\text{ext}} = 0,3 \text{ kV/cm}$  und  $\Delta V_M = -150 \text{ mV}$ )
- Das experimentell bestimmte zeitliche Aufladeverhalten der Membran zeigt einen exponentiellen Kurvenverlauf. Erhöhung der externen Feldstärke führt zu einem steileren Anstieg und einem früheren Erreichen des stationären Endwertes.
- Die experimentell gemessenen Membranspannungswerte zeigen starke Abweichungen von den theoretisch berechneten Werten und sind ungefähr um einen Faktor 4 geringer.
- Das pflanzliche Plasmalemma entlädt sich nach Ende des elektrischen Feldpulses innerhalb von 2 s auf das Niveau des Ruhepotentials und lässt sich anschließend erneut auf identische Werte aufladen.
- Die Membranspannungsverteilung zeigt eine starke Abhängigkeit von der Position auf der Membran, bezogen auf die Richtung des elektrischen Feldes.
- Für Feldstärken unter  $0,3 \text{ kV/cm}$  zeigt sich ein nahezu sinusförmiger Kurvenverlauf.
- Werden die Feldstärken von  $0,3 \text{ kV/cm}$  und  $1,0 \text{ kV/cm}$  überschritten, ist eine deutliche Abflachung der Kurvenverläufe zu erkennen.
- Für beide Zellpole konnte ein Spannungsrückgang mit nachfolgender Wiederaufladung beobachtet werden. Bei Kurzpulsen und höheren Feldstärken lässt sich dieses Verhalten bereits zu früheren Zeitpunkten beobachten.
- Das Fehlen von extrazellulärem Calcium führt zu einer Verstärkung des Spannungsrückganges.
- Bei gleicher Feldstärke und unterschiedlichen Pulsleitungen ( $1 \mu\text{s}$  und  $100 \text{ ns}$  Pulsdauer) lässt sich ein Unterschied im Aufladeverhalten erkennen.

### 3.4.3 Kalibrierung des Farbstoffes ANNINE-6 mittels der Patch-Clamp-Technik

- Die gemessenen Daten zeigen in einem Spannungsbereich von -300 mV bis 300 mV ein lineares Verhalten.
- Eine lineare Regression der Messdaten führte zu folgender Geradengleichung:

$$F/F_0 (V_C) = 0,99 - 8,42 \cdot 10^{-4} V_C$$

woraus sich eine Spannungssensitivität des ANNINE-6 Farbstoffes von 8,42 % pro 100 mV ergibt.

## 4. Diskussion

### 4.1 Vorversuche zur systematischen Fehlerbetrachtung

#### 4.1.1 Auswirkungen der Darstellung der theoretischen Ladezeitkonstanten auf das Aufladeverhalten biologischer Membranen

Die beiden in der Literatur am häufigsten verwendeten Formeln zur Beschreibung der Ladezeitkonstanten biologischer Membranen (Gowrishankar, Stewart und Weaver 2006, Schoenbach et al. 1997, s. a. Formel 7, 8, 9) wurden unter Verwendung von für BY-2 Zellen typischen Werten zur Berechnung des Membranaufladeverhaltens verwendet und die resultierenden Kurvenverläufe verglichen (s. Abb. 23). Schoenbach (Formel 8) vernachlässigt bei der von ihm verwendeten Ladezeitkonstanten einen Einfluss der Dicke der Doppellipidschicht sowie die Fähigkeit der Membran, gezielt Ionen und andere Moleküle zu transportieren. Die Berechnungen nach Weaver (Formel 7) berücksichtigen diese beiden Punkte. Die berechneten Kurvenverläufe lassen den Einfluss der Membrandicke deutlich erkennen. Eine dickere Membran lädt sich schneller auf und erreicht damit früher einen stationären Endwert. Der Ansatz nach Schoenbach et al. basiert auf der Annahme einer Membrandicke von 5 nm. Aktuelle Messungen zeigen jedoch, dass eine typische BY-2 Plasmamembran eine durchschnittliche Dicke von 7,5 nm besitzt (Mongrand et al. 2004). Auch die Vernachlässigung der Membranleitfähigkeit, die durch Transporter und Ionenkanäle gegeben ist, führt zu einem langsameren Aufladeverhalten. Die theoretische Beschreibung der Ladezeitkonstanten nach Schoenbach et al. ist damit für eine Berechnung der zeitlichen Entwicklung der Membranspannung für das Plasmalemma einer BY-2 Zelle ungeeignet. Die Ladezeitkonstante nach Weaver (Formel 7) berücksichtigt die Membranleitfähigkeit und die Membrandicke. Im Vergleich zu den nach Schoenbach berechneten Kurven zeigt sich mit zunehmender Membrandicke ein deutlich steilerer Kurvenverlauf verbunden mit einem früheren Erreichen des stationären Endwertes. Die Verwendung von Weavers Formel zur Berechnung der Ladezeitkonstanten erlaubt, unter Verwendung von Formel (9), zumindest eine näherungsweise Beschreibung der Aufladeprozesse einer Membran.

Es ist zu berücksichtigen, dass die verwendeten Formeln (7), (8) und (9) lediglich auf Feldstärkebereiche anwendbar sind, welche noch keinen signifikanten, durch Porenbildung verursachten, Permeabilitätsanstieg der Membran verursachen. Um dies zu kompensieren müsste eine feldstärkeabhängige Membranpermeabilität verwendet werden. Beruhend auf dieser Tatsache und der Berechnung des Aufladeverhaltens mit den typischen Werten für BY-2 Tabakzellen wurde der frühest mögliche Zeitpunkt zur Messung der Membranspannung unter der Voraussetzung des Erreichens des stationären Wertes unter Einfluss eines externen elektrischen Feldes ermittelt. Theoretisch liegt ein Erreichen des stationären Endwertes etwa 750 ns nach Pulsbeginn vor (s. Abb. 23, schwarze Kurve). Aufgrund der bereits beschriebenen Mängel der verwendeten Formeln wurde daher, angelehnt an die theoretischen Berechnungen, für die nachfolgenden Messungen der Zeitpunkt  $t = 500$  ns gewählt.

#### **4.1.2 Transmembranpotentialmessungen**

##### *Vergleich ANNINE-6 und ANNINE-6plus*

Um die Vor- und Nachteile der beiden zur Verfügung stehenden feldsensitiven Fluoreszenzfarbstoffe ANNINE-6 und ANNINE-6plus zu ermitteln, wurden Messungen nach mehrfacher Pulsexposition sowie bei unterschiedlichen Feldstärken durchgeführt und die Änderung der Fluoreszenzintensität an den Zellpolen sowie die azimutale Membranspannungsabhängigkeit bestimmt. Das wasserlösliche ANNINE-6plus erlaubte eine leichtere Handhabung und eine Verringerung der eingesetzten Farbstoffkonzentration bei erhöhter mittlerer Grundfluoreszenzintensität. Während den Versuchen konnte jedoch eine schon nach kurzer Zeit auftretende Inkorporation des ANNINE-6plus Farbstoffes durch die gefärbten Protoplasten beobachtet werden. Bei ANNINE-6 konnte hingegen im Meßzeitraum von üblicherweise 3 Stunden keine Membrangängigkeit festgestellt werden. Der Vergleich der beiden Farbstoffe zeigt, dass ANNINE-6 unter gleichen Randbedingungen eine deutlich höhere Fluoreszenzintensitätsänderung als Reaktion auf ein äußeres elektrisches Feld im Vergleich zu Annine-6plus aufweist (s. Abb. 24).

Da laut Hersteller die beiden Fluoreszenzfarbstoffe identische Spannungssensitivitäten besitzen sollen, sind die gemessenen Unterschiede nur durch die frühe Farbstoffinkorporation von ANNINE-6plus und dem damit einhergehenden Verlust der Spannungssensitivität zu erklären. Auf Grund der geringen Membrangängigkeit und der erhöhten Fluoreszenzintensitätsänderung des ANNINE-6 Fluoreszenzfarbstoffes erfolgten alle weiteren Messungen mit ANNINE-6.

#### *Bleichverhalten des ANNINE-6 Fluoreszenzfarbstoffes*

Um Informationen über das Bleichverhalten des ANNINE-6 Farbstoffes zu erhalten, wurden mehrere Laserpulse, ohne Anlegen eines elektrischen Feldes, auf einen mit ANNINE-6 gefärbten Protoplasten appliziert. Dabei wurden Bestrahlungsstärken von  $5 \text{ MW/cm}^2$  verwendet (Frey et al. 2004). Mit jedem Laserpuls wurde die Fluoreszenzintensitätsverteilung mit Hilfe der Bildverstärkerkamera aufgenommen. Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurden alle Aufnahmen auf die Fluoreszenzintensitätsverteilung des ersten Bildes normiert. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass der Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6 im für die Experimente benötigten zeitlichen Rahmen stabil ist und für die in den Experimenten verwendete Anzahl von Laserpulsen kein Bleichverhalten zeigt (s. Abb. 25). Die mittlere Schwankung von  $F/F_0$  von Laserpuls zu Laserpuls betrug weniger als 3 %.

#### *Untersuchung zum Einfluss der Laserwellenlänge*

Zur Überprüfung der zur Berechnung der Kalibrierkurve verwendeten Spektralfunktionen des ANNINE-6 Farbstoffes erfolgten Experimente bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen (468 nm und 455 nm) und elektrischen Feldstärken. Die Berechnung der Membranspannungsänderung mit Hilfe der stark von der verwendeten Anregungswellenlänge abhängigen Kalibrierkurven (s. Abb. 26) führte im Rahmen der Messgenauigkeit zu übereinstimmenden Ergebnissen (s. Abb. 27). Dies zeigt die Validität der in dieser Arbeit verwendeten Spektralfunktionen des Farbstoffes, mit deren Hilfe die relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen in Membranspannungsänderungen umgerechnet wurden.

### *Untersuchung zum Einfluss der Laserenergie*

Um den Einfluss der Laserenergie auf die relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen zu überprüfen, wurden Messungen bei voller und bei um 50 % abgeschwächter Laserenergie durchgeführt und die jeweils erhaltenen relativen Intensitätsänderungen in Spannungsänderungen umgerechnet. Die Datenpunkte zeigen hierbei eine sehr gute Übereinstimmung (s. Abb. 28). Folglich werden durch den applizierten Laserpuls auch bei abgeschwächter Energie alle Farbstoffmoleküle angeregt. Die systembedingten Schwankungen der applizierten Laserenergie im Bereich von +/- 10% üben somit keinen entscheidenden Einfluss auf die Messungen und die daraus abgeleiteten Membranspannungsänderungen aus.

### *Vergleich Zellkultur und Pflanze*

Durch Experimente an Protoplasten aus Zellkultur und aus Blattmaterial sollte ermittelt werden, ob die beiden unterschiedlichen Systeme auch unterschiedliche Reaktionen auf ein appliziertes externes elektrisches Feld zeigen. Des Weiteren konnte der Einfluss der Chlorophyllautofluoreszenz überprüft werden. Beide Kurven zeigen vergleichbare Amplituden und einen annähernd identischen Verlauf (s. Abb. 29). Die Daten zeigen, dass zwischen aus der Zellkultur und aus Blattgewebe gewonnenen Protoplasten keine Unterschiede im Aufladeverhalten zu erkennen sind. Auch die Autofluoreszenz des Chlorophylls hat im betrachteten Emissionswellenlängenbereich keinen Einfluss auf die Farbstoffantwort.

### *Untersuchung zum Einfluss der Zellgröße*

Für Protoplasten unterschiedlicher Größenbereiche wurde bei unterschiedlichen Feldstärken die relative Fluoreszenzintensität in  $10^\circ$  Intervallen gemessen und miteinander verglichen. Gewählt wurden Protoplasten in einem Größenbereich von 33 - 41  $\mu\text{m}$  (Mittelwert: 38  $\mu\text{m}$ ) und mit einem Durchmesser von 42 - 48  $\mu\text{m}$  (Mittelwert: 45  $\mu\text{m}$ ). Die Feldstärkeabhängigkeiten der beiden untersuchten Größenbereiche zeigen die gleichen Verläufe mit nur vernachlässigbaren Abweichungen (s. Abb. 30).

Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass die Größe der Zellen, zumindest für die in diesem Experiment auftretenden Größenunterschiede, keinen entscheidenden Einfluss auf die azimutale Abhängigkeit der Transmembranspannung ausübt. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die beiden Größenbereiche recht nahe beieinander liegen. Stärkere Größenunterschiede können durchaus zu unterschiedlichen azimutalen Abhängigkeiten führen.

#### **4.1.3 Reproduzierbarkeit des Auswerteprogrammes**

Um das Auswerteprogramm als Fehlerquelle auszuschließen, wurde die gleiche Messung mehrfach hintereinander sowie von verschiedenen Personen ausgewertet. Die Auswertung erfolgte entlang des Membranringes in 10° Intervallen. Wie Abbildung 31 zu entnehmen ist, zeigen alle Kurven einen nahezu identischen Verlauf. Ein durch das Auswerteprogramm verursachter systematischer Fehler kann somit ausgeschlossen werden.

#### **4.1.4 Patch-Clamp-Messungen**

Für diesen Versuchsansatz wurde die Stromantwort auf unterschiedliche Spannungspulse von mit ANNINE-6 gefärbten und ungefärbten BY-2 Protoplasten, mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik, gemessen und bewertet. Die Ergebnisse zeigen, dass der Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes in die äußere Schale der Doppel-lipidschicht keinen Einfluss auf das membranphysiologische Verhalten der Zelle nimmt. Die Stromantworten von gefärbten BY-2 Protoplasten (s. Abb. 32) zeigen eine gute Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten ungefärbter BY-2 Protoplasten (Van Duijn et al. 1993).

#### **4.1.5 Zusammenfassung**

Zusammenfassend lässt sich aus den durch die Vorversuche gewonnenen Erkenntnissen schlussfolgern, dass der durch diese Einflüsse maximal verursachte systematische Fehler 5 % beträgt und somit weitestgehend vernachlässigt werden kann.

## 4.2 Messungen zur Membranaufladung

### 4.2.1 Feldstärkeabhängigkeit des Membranpotentials

Zur Versuchsdurchführung wurde 500 ns nach Auslösen des 1 $\mu$ s-Spannungspulses die Fluoreszenzintensitätsänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten gemessen. Die Versuche wurden bei Feldstärken im Bereich von 0,05 kV/cm bis zu Werten von 30,0 kV/cm durchgeführt. Die Berechnung der Fluoreszenzintensitätsänderungen erfolgte für die Region der beiden Zellpole. Zur Umrechnung der relativen Fluoreszenzintensitäten in Membranspannungsänderungen wurde die Kalibrierkurve (s. Abb. 26) verwendet. Die Messungen zeigen an beiden Zellpolen eine annähernd exponentielle Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannung und dem angelegten externen, elektrischen Feld, sowie ein anschließendes Sättigungsverhalten (s. Abb. 34). Diese Daten bestätigen erstmals experimentell die Aussage von Neumann (Neumann 1992), ebenso wie die theoretischen Berechnungen nach Melikov et al. 2001 und Krassowska und Filev 2007, dass Porenbildung nicht spontan ab einer bestimmten kritischen Feldstärke einsetzt, sondern direkt durch eine Änderung des Ruhepotentials verursacht wird und erst ab einer bestimmten Membranspannung verstärkte Porenbildung zu beobachten ist. Würde die Bildung von Poren erst ab einem bestimmten Membranspannungswert einsetzen, wäre eine lineare Feldstärkeabhängigkeit zu erkennen, welche dann direkt in eine Sättigung übergeht. Dieses Verhalten spricht für eine anhaltende Membranaufladung mit bereits geringer Porenbildung, bis ein Membranspannungswert erreicht wird, ab dem verstärkte Porenbildung einsetzt. Der Permeabilitätsanstieg der porierten Membranregionen verhindert die weitere Aufladung der Membran durch den Ionenfluss, und damit Ladungsaustausch, durch die gebildeten Poren. Die Begrenzung der Membranaufladung stellt sich durch die Sättigung der Fluoreszenzantwort dar. Des Weiteren lässt das Aufladeverhalten der BY-2 Plasmamembran ein stark asymmetrisches Verhalten erkennen. Ein ähnliches Verhalten konnte bereits 1989 für Tabak-Mesophyllprotoplasten gezeigt werden (Mehrle et al. 1989). In diesem Ansatz wurden Protoplasten in Gegenwart des Farbstoffs Neutralrot mit einem 50  $\mu$ s Rechteckpuls behandelt.

Die Ergebnisse zeigten das Eindringen des Farbstoffes zuerst am anodischen Pol bei einer Feldstärke von 0,5 kV/cm. Bei höheren Feldstärken drang der Farbstoff entlang der gesamten Membran ein, jedoch verstärkt am anodischen Zellpol. Die in dieser Arbeit gemessenen Daten liegen zwar in einem anderen zeitlichen Rahmen ( $t = 500 \text{ ns}$ ), decken sich jedoch in dieser Hinsicht mit Mehrle's Beobachtung. Am depolarisierten Zellpol findet eine anhaltende Aufladung der Membran bis zu einer applizierten Feldstärke von ungefähr 1,0 kV/cm statt. Am hyperpolarisierten Zellpol setzt die Porenbildung und damit die Sättigung der Fluoreszenzintensitätsänderung bei weitaus geringeren Feldstärken ein. Eine Aufladung findet an diesem Zellpol nur bis zu einer externen Feldstärke von 0,3 kV/cm statt (s. Abb. 34 links). Die beobachtete Asymmetrie konnte auch für tierische Zellen bestätigt werden. Theoretische (Mason 1999, Krassowska and Filev 2007) und experimentelle Ansätze (Tekle et al. 1990, Phez et al. 2005) zeigten, dass die Porenbildung auch bei Säugerzellen zuerst am anodischen Pol einsetzt. Bei pflanzlichen Zellen ist dieser Effekt deutlicher zu erkennen, was durch das, im Vergleich zu tierischen Zellen, deutlich negativere Ruhepotential erklärt werden kann. Auf Grund der Aktivität der pflanzlichen  $\text{H}^+$ -ATPase liegt das Ruhepotential bei Pflanzen im Bereich zwischen -80 mV und -200 mV (Fromm und Lautner 2007). Mit Hilfe der gemessenen maximalen Membranspannungsänderungen  $\Delta V_M$  (s. Abb. 34 rechts) lässt sich der Membranspannungswert, ab dem die Porenbildungsdynamik die weitere Aufladung der Membran begrenzt, berechnen durch:

$$V_M = V_{\text{rest}} + \Delta V_M \quad (11)$$

**$V_M$  = tatsächliche Membranspannung ab der verstärkte Porenbildung einsetzt**

**$V_{\text{rest}}$  = Ruhepotential der Zelle**

**$\Delta V_M$  = gemessene Membranspannung (relativ zum Ruhepotential) ab der verstärkte Porenbildung einsetzt**

Mit der Annahme, dass der Wert des Ruhepotentials für BY-2 Protoplasten -150 mV beträgt und den gemessenen Membranspannungsänderungen von -150 mV am hyperpolarisierten Zellpol sowie 450 mV am depolarisierten Pol, lässt sich der Membranspannungswert, auf den sich die Membran aufladen lässt, bevor die verstärkt einsetzende Porenbildung die weitere Aufladung begrenzt, berechnen.

Diese Aussagen sind für die gegebenen Versuchsbedingungen, wie z.B. Behandlungspuffer und Pulslänge, gültig. Bei BY-2 Protoplasten ist folglich eine Aufladung der Membran auf Werte von  $|V_M|$  von ungefähr 300 mV möglich, bis ein Sättigungsverhalten auftritt. Dieser Wert liegt deutlich unter dem in der Literatur beschriebenen Wert von 1 V. Der in dieser Arbeit ermittelte Schwellenwert zur verstärkten Porenbildung deckt sich mit experimentellen Ergebnissen, bei dem der zur Porenbildung benötigte Membranspannungswert ebenfalls ermittelt wurde. Die Autoren beobachteten die Farbstoffaufnahme in CHO-Zellen (Gabriel and Teissie 1997, Teissie and Rols 1993) und kamen zu dem Ergebnis, dass der Membranspannungswert, ab dem Porenbildung einsetzt, für tierische Zellen in einem Bereich von  $|V_M| = 200 - 250$  mV und damit ebenfalls weit unter dem weitgehend akzeptierten Membranspannungswert von 1 V liegt. Es ist an dieser Stelle festzuhalten, dass es sich bei dem Wert von 1 V um einen aus phänomenologischen Ergebnissen über Formel (7) - (9) rückgerechneten Wert handelt, beruhend auf Experimenten zur Keimabtötung (Hamilton 1967).

#### **4.2.2 Zeitliche Entwicklung des Membranpotentials**

Zur Bestimmung des Aufladeverhaltens einer Zellmembran wurde die Fluoreszenzintensität für Feldstärken von 0,5 kV/cm und 1,0 kV/cm zu verschiedenen Zeitpunkten während eines 1  $\mu$ s- bzw. 100 ns-Spannungspulses aufgenommen. Für die applizierte Feldstärke von 0,5 kV/cm konnte der, durch Formel (9) vorhergesagte exponentielle Anstieg der Membranspannung erstmals experimentell mit einer zeitlichen Auflösung von wenigen Nanosekunden bestätigt werden. Der beobachtete Kurvenverlauf (s. Abb. 35, 36, 47; 0,5 kV/cm) deckt sich nicht nur mit der theoretischen Betrachtung, sondern im prinzipiellen Verlauf auch mit einer 1993 veröffentlichten experimentellen Arbeit zum Aufladeverhalten im Mikrosekundenbereich. Hibino et al. beobachteten die zeitliche Entwicklung der Membranspannung an mit RH292 (spannungssensitiver Fluoreszenzfarbstoff) gefärbten Seeigelleiern in einem zeitlichen Rahmen von 1  $\mu$ s bis 25  $\mu$ s nach Pulsapplikation und einer Feldstärke von 0,1 kV/cm (Hibino et al. 1993).

Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Kurvenverlauf (s. Abb. 35, 0,5 kV/cm) zeigt nach 750 ns einen starken Rückgang der Membranspannung auf der hyperpolarisierten Seite. Hibino et al. konnte diesen Einbruch bei einer Feldstärke von 0,1 kV/cm auf Grund der geringeren zeitlichen Auflösung nicht beobachten.

Vergleicht man das Aufladeverhalten unter Verwendung der Kurz- und der Langpulsleitung (s. Abb. 40, 48 bis 51), lassen sich Unterschiede in den Kurvenverläufen erkennen (s. Abb. 47). Diese sind durch die unterschiedlichen Anstiegszeiten der Spannungspulse zu erklären. Die Kurzpulsleitung erreicht bereits nach 10 ns die maximale Spannungsamplitude. Eine Aufladung der Membran erfolgt somit deutlich schneller als mit der Langpulsleitung, welche erst nach 80 ns die maximale Spannungsamplitude erreicht. Auf Grund der verwendeten Pulslänge von 100 ns wird bei der Kurzpulsleitung der stationäre Endwert der Membranspannung nicht erreicht. Bei Einsatz der 1 $\mu$ s-Pulsleitung wird hingegen ein stationärer Wert nach 350 ns erreicht (s. Abb. 47). Die Anstiegszeit der verwendeten Pulsleitungen nimmt folglich einen starken Einfluss auf die, bei gleicher Feldstärke und Zeit, erreichbare Membranspannung. Wird die angelegte Feldstärke auf 1,0 kV/cm erhöht, weicht das Aufladeverhalten der Membran vom exponentiellen Verlauf ab. Der Anstieg ist für beide Zellpole sehr viel steiler. Wie Abbildung 36 zeigt, ist auch der Übergang in die Sättigung keine langsame Annäherung, sondern vielmehr ein schneller Übergang von der Aufladephase in die stationäre Phase. Eine mögliche Erklärung für das beobachtete schnellere Ansteigen der Membranspannung ist der Einfluss der Cytoplasmaleitfähigkeit auf die Ladezeitkonstante der Plasmamembran (s. Formel 8). Aktuelle, aus Rotationsspektren abgeleitete Daten ergeben eine Cytoplasmaleitfähigkeit für BY-2 Zellen von 4 mS/cm (Sukhorukov et al. 2007). Mit dieser im Vergleich geringen Leitfähigkeit lässt sich der beobachtete schnellere Anstieg der Membranspannung jedoch nicht beschreiben. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf eine höhere Leitfähigkeit des Cytoplasmas, im Bereich der bisher angenommenen 7 - 10 mS/cm hin. Der zuvor beschriebene Membranspannungsrückgang am hyperpolarisierten Zellpol ist auch bei dieser Feldstärke deutlich zu erkennen (s. Abb. 35, 0,5 kV/cm bei 750 ns und 1,0 kV/cm bei 350 ns). Allerdings wird das Minimum zu einem früheren Zeitpunkt (350 ns nach Pulsbeginn), als bei geringeren Feldstärken beobachtet, erreicht. Worauf dieser erstmals beobachtete Membranspannungseinbruch beruht, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Mögliche Erklärungen hierfür werden im Abschnitt 4.2.4 diskutiert. Ein Vergleich der experimentell bestimmten Daten mit der theoretisch berechneten Aufladekurve nach Formel (9) ergab deutliche Unterschiede in der Amplitude der erreichbaren Membranspannung. Der theoretische stationäre Endwert der Membranspannung ist um einen Faktor 4 größer, als der gemessene maximale Wert der Membranspannung (s. Abb. 37). Eine elektrische Feldstärke von 0,5 kV/cm führt zu einem theoretischen stationären Endwert von ca. 1,5 V, der experimentell ermittelte Wert liegt dagegen bei 0,3 - 0,4 V. Die Unterschiede in der Amplitude lassen sich durch erneute Betrachtung von Formel (9) erklären. Wie schon beschrieben, zeigt dieser theoretische Ansatz nur dann Gültigkeit, solange es sich um eine ungestörte Membran mit vernachlässigbarer Leitfähigkeit handelt. Generell wird man eine vollständig nichtleitende Membran bei keiner biologischen Zelle finden. Folglich ist diese Formel lediglich näherungsweise auf Feldstärkebereiche anwendbar, bei denen noch keine signifikante Porenbildung einsetzt. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 diskutiert, konnten theoretische Berechnungen, die besagen, dass jede Membranspannung  $> 0$  mV zu einer Permeabilisierung der Membran führen kann (Melikov et al. 2001, Krassowska und Filev 2007), in dieser Arbeit experimentell bestätigt werden. Begründend auf den Ergebnissen, dass auch schon vor Erreichen des Schwellenwertes für die verstärkte Porenbildung vereinzelt Poren gebildet werden und erst nach Erreichen der kritischen Membranspannung verstärkt Porenbildung einsetzt sowie dem geringen erreichbaren Absolutwert der Membranspannung sind bereits bei geringen Abweichungen vom Ruhepotential die Voraussetzungen zur Anwendung der Formeln (7) - (9) nicht mehr gegeben.

### 4.2.3 Auflade- und Wiederaufladeverhalten der Plasmamembran

Um eine Aussage über das Auflade- und Wiederaufladeverhalten des Plasmalemmas zu treffen, wurden erstmals Protoplasten bei unterschiedlichen Feldstärken mehreren, aufeinander folgenden Spannungspulsen ausgesetzt und die Fluoreszenzantwort des Farbstoffes gemessen. Die Messungen zeigen, dass sich bereits innerhalb von 2 s, dem zeitlichen Abstand zwischen zwei Fluoreszenzbildaufnahmen, nach Ende des elektrischen Feldpulses die Membran auf das Niveau der natürlichen Transmembranspannung (Ruhepotential) entlädt. Im direkten Anschluss ist eine erneute Aufladung der Membran auf identische Membranspannungswerte möglich (s. Abb. 38). Bei einer geringen elektrischen Feldstärke von 0,2 kV/cm ist der verursachte Membranspannungshub an beiden Zellpolen identisch (s. Abb. 38, oben links). Bei dieser Feldstärke ist noch keine Porenbildung zu beobachten. Die Membran lässt sich ohne Schaden zu nehmen aufladen, entladen und erneut aufladen. Eine Erhöhung der Feldstärke auf 0,6 kV/cm lässt an den beiden Polen einen Unterschied in der Spannungsamplitude erkennen, welcher sich durch die bereits angeführte Asymmetrie bedingt durch das stark negative Ruhepotential erklären lässt (s. Abb. 38, oben rechts). Bei dieser Feldstärke ist die kritische Membranspannung am hyperpolarisierten Zellpol bereits überschritten, wohingegen am depolarisierten Zellpol weiterhin eine Aufladung möglich ist. Wie zu erwarten begrenzt die Porenbildung am anodischen Pol einen weiteren Anstieg der Membranspannung. Auch bei dieser Feldstärke lässt sich die Membran, trotz Porenbildung am hyperpolarisierten Pol, mehrfach entladen und erneut aufladen. Diese Beobachtungen erlauben die Schlussfolgerung, dass die Membranregeneration ein sehr schneller Prozess ist, der sofort nach Beendigung der Feldexposition einsetzt. Eine Feldstärke von 1,3 kV/cm führt an beiden Polen zu einer Begrenzung der Membranaufladung durch Porenbildung (s. Abb. 38 unten links). Die Auflade- und Wiederauflade-Prozesse der Membran kommen am hyperpolarisierten Zellpol zum Erliegen. Der Kurvenverlauf deutet auf eine bleibende Erhöhung der Permeabilität auf der hyperpolarisierten Seite hin. Am depolarisierten Zellpol wird die Membranaufladung zwar durch die Porenbildung begrenzt, dennoch sind die Lade- und Entladevorgänge deutlich zu erkennen. Die bei diesem Experiment erzielten Ergebnisse weisen auf einen Einfluss der gebildeten Porenart auf das Regenerationsverhalten der Membran hin.

Bei geringem Überschreiten der (in den Experimenten zur Feldstärkeabhängigkeit ermittelten) kritischen Feldstärken zum Einsatz der Porenbildung, lassen sich die Lade- und Entladevorgänge dennoch deutlich erkennen. Das am hyperpolarisierten Zellpol bei 0,6 kV/cm und an der depolarisierten Zellhemisphäre bei 1,3 kV/cm beobachtete Verhalten (gleichmäßige Auf- und Entladung) während der Pulseexposition zeigt Eigenschaften, die auf Porenbildungsprozesse und nur geringes Porenwachstum schließen lassen. Die Kurvenverläufe deuten auf eine schnelle Porenbildung hin und nach Feldbehandlung auf eine schnelle Regeneration der Membran. Bei 1,3 kV/cm findet am hyperpolarisierten Pol neben Porenbildungsprozessen auch verstärkt Porenwachstum statt. Die gebildeten Poren beginnen zu expandieren. Die Ergebnisse dieser Versuche deuten darauf hin, dass das pflanzliche Plasmalemma zwar die Fähigkeit zu einer äußerst schnellen Regeneration besitzt, die Dauer der Regeneration aber stark davon abhängt, ob Porenbildung oder Porenwachstum dominiert. Bei gleicher Feldstärke scheint am depolarisierten Zellpol verstärkt Porenbildung aufzutreten, während am hyperpolarisierten Zellpol bereits Porenwachstum zur Bildung größerer Poren führt.

#### 4.2.4 Winkelabhängigkeit des Membranpotentials

Um Aussagen über die Winkelabhängigkeit des Membranpotentials, bezogen auf die Richtung des elektrischen Feldes, zu treffen, wurde unter Verwendung der 1  $\mu$ s- und der 100 ns-Pulsleitung, die Fluoreszenzänderung bei applizierten elektrischen Feldstärken von 0,05 kV/cm bis zu 31,0 kV/cm bestimmt. Die Berechnung der Fluoreszenzintensitätsänderungen durch das Auswerteprogramm erfolgte in 10° Intervallen entlang des Membranringes. Bei Feldstärkebereichen unter 0,3 kV/cm lässt sich der erwartete sinusförmige Kurvenverlauf, wie er durch Formel (9) vorhergesagt wird, deutlich erkennen (s. Abb. 40, oben links). Nach dieser Formel ist die Membranpotentialverteilung der Zelle abhängig von der relativen Richtung des elektrischen Feldes, was zu einer maximalen Membranspannung an den Polen führt (Weaver 1991). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen ebenfalls die maximale Auslenkung an den beiden Zellpolen. Der durch Formel (9) beschriebene azimutale Verlauf ist jedoch nur für eine unporierte Membran gültig. Die gemessenen Kurvenverläufe der Membranspannung bei ansteigender Feldstärke zeigen starke Abweichungen von der vorhergesagten Form. Bei Feldstärken über 0,3 kV/cm ist am hyperpolarisierten Zellpol ein deutliches Abflachen des Kurvenverlaufs bzw. die Bildung eines Plateaus bei einer maximalen Membranspannungsänderung von -150 mV zu erkennen (s. Abb. 40, oben links). Die Porenbildung setzt am anodischen Zellpol ein. Bei ansteigender Feldstärke erreicht, ausgehend vom anodischen Zellpol, ein immer größerer Winkelbereich die zur verstärkten Porenbildung benötigte Membranspannung, was zu einer immer stärker werdenden Abflachung des ursprünglichen Kurvenverlaufs führt. Aus der in Abbildung 47 dargestellten Kurve bei 0,5 kV/cm lässt sich sehr schön die fast vollständige Porierung der hyperpolarisierten Zellhemisphäre erkennen (s. Abb. 40, oben links). Auf der depolarisierten Zellhemisphäre hingegen lädt sich die Membran weiterhin auf. Noch immer ist der erwartete sinusförmige Kurvenverlauf, jedoch mit einer deutlichen Verbreiterung und zunehmender Amplitude (Feldstärkeabhängigkeit), zu erkennen. Wird die Feldstärke auf 1,0 kV/cm gesteigert, ist am hyperpolarisierten Zellpol ein deutlicher Spannungseinbruch zu erkennen. Am depolarisierten Zellpol findet weiterhin Aufladung statt. Erst ab Feldstärken über 1,0 kV/cm lässt sich auch am depolarisierten Zellpol eine beginnende Abflachung erkennen, die mit zunehmender Feldstärke ebenfalls einen immer größeren Winkelbereich umfasst.

Eine applizierte Feldstärke von 1,3 kV/cm führt zu einem Membranspannungseinbruch an der Polregion der depolarisierten Zellhemisphäre, wie er schon bei 1,0 kV/cm für die hyperpolarisierte Zellhemisphäre beobachtet werden konnte (s. Abb. 40, oben rechts). Betrachtet man die zeitliche Entwicklung der azimuthalen Verteilung der Membranspannung bei einer Feldstärke von 0,5 kV/cm, ist mit zunehmender Feldeinwirkung eine fortschreitende Aufladung der Membran zu beobachten, bis nach 750 ns die verstärkt einsetzende Porenbildung am hyperpolarisierten Zellpol zu einem Spannungseinbruch führt (s. Abb. 44, unten links). Wird die Feldstärke auf 1,0 kV/cm erhöht, lässt sich der beginnende Spannungseinbruch bereits nach 200 ns erkennen, nach 500 ns erreicht dieser dann ein Maximum (s. Abb. 44, rechts). Mit weiter fortschreitender Pulsdauer ist eine Wiederaufladung der Membran zu beobachten. Dieses Verhalten konnte durch die Experimente mit der Kurzpulsleitung bestätigt werden. Bei einer Feldstärke von 1,7 kV/cm lässt sich auf der hyperpolarisierten Zellhemisphäre bereits nach 15 ns die durch Porenbildung verursachte Abflachung des Kurvenverlaufs erkennen. Nach 75 ns ist der Einbruch am Zellpol deutlich zu sehen. Auf der depolarisierten Zellhemisphäre lässt sich der mit der Zeit in der Amplitude zunehmende sinusförmige Verlauf erkennen. Da am depolarisierten Zellpol, trotz Überschreitens der 1,0 kV/cm Grenze, die zur verstärkten Porenbildung nötige Membranspannung nach 90 ns noch nicht erreicht ist, lässt sich noch keine Porenbildung erkennen (s. Abb. 48). Für die Feldstärken von 4,0 kV/cm bis 31,0 kV/cm lässt sich tendenziell die gleiche, zeitlich verschobene, azimuthale Abhängigkeit der Membranspannung erkennen. Dieses Verhalten lässt nicht nur auf eine Feldstärkeabhängigkeit des gemessenen Membranspannungseinbruches an den Zellpolen schließen, sondern auch auf eine zeitliche Abhängigkeit. Mit ansteigender Feldstärke verschiebt sich der Spannungseinbruch, wie auch die nachfolgende Wiederaufladung, zu früheren Zeitpunkten. Ein ähnliches azimuthales Verhalten konnte auch von Hibino et al. beobachtet werden (Hibino et al. 1993). Die Gruppe untersuchte die zeitliche Entwicklung der Membranspannung an mit RH292 (spannungssensitiver Fluoreszenzfarbstoff) gefärbten Seeigeleiern und beobachtete die azimuthale Verteilung der Fluoreszenzintensität bei einer Feldstärke von 0,4 kV/cm, zu den Zeitpunkten 500 ns, 1  $\mu$ s, 2  $\mu$ s, 5  $\mu$ s, 50  $\mu$ s, 250  $\mu$ s und 1 ms während eines 1ms-Spannungspulses. Die azimuthalen Kurvenverläufe zeigen ein ähnliches Verhalten, wie die in dieser Arbeit gemessenen Daten.

Unterschiede zeigen sich in der Asymmetrie und den nach 1 ms gleichzeitig beobachteten Spannungseinbrüchen an den Zellpolen. Die Unterschiede lassen sich durch die Zellgröße, die applizierte Feldstärke und Pulsdauer sowie durch das jeweilige Ruhepotential der Zellen erklären. Seeigeleier besitzen einen Durchmesser von ca. 100  $\mu\text{m}$  und sind im Vergleich zu den in diesen Versuchen verwendeten Tabakprotoplasten somit mehr als doppelt so groß. Für BY-2 Protoplasten wäre ein ähnlicher Verlauf somit bei einer Feldstärke von ca. 0,9 kV/cm oder höher zu erwarten. Vergleicht man die Kurvenverläufe für Tabakprotoplasten bei 1,0 kV/cm und für Seeigeleier bei 0,4 kV/cm zu einem Zeitpunkt  $t = 500 \text{ ns}$ , ist tatsächlich ein ähnlicher Verlauf zu erkennen. Der Membranspannungsrückgang an den Zellpolen ist bei den Tabakprotoplasten jedoch sehr viel ausgeprägter (s. Abb. 44 rechts). Die in den durchgeführten Experimenten ermittelten Daten unterstreichen nicht nur die ebenfalls experimentelle Beobachtung von Hibino et al., sondern auch die Vorhersagen des theoretischen *Modells für die Elektroporation einer einzelnen, sphärischen Zelle* (Krassowska und Filev 2007, s. a. Modell F). Das von Krassowska beschriebene Porenmodell erlaubt es, das Transmembranpotential, die Anzahl der Poren und die Verteilung der Porenradii als Funktionen der Zeit und der Position auf der Zelloberfläche zu bestimmen (Krassowska 2007). Nach diesem Modell setzt die Porenbildung zuerst am anodischen Pol ein, gefolgt vom kathodischen Zellpol. Die durch die Porenbildung erhöhte Membranleitfähigkeit führt zu Abweichungen von dem durch Formel (9) vorhergesagten sinusförmigen Kurvenverlauf an den porierten Membranbereichen in Form von großen Membranspannungsrückgängen an den Polregionen. Aus Krassowskas Modell resultiert ein solcher Einbruch symmetrisch an beiden Zellpolen 1,43  $\mu\text{s}$  nach dem Einsetzen des elektrischen Pulses. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen dieses Verhalten abhängig von der angelegten Feldstärke in Bereichen von 10 ns bei 31 kV/cm bis zu 750 ns bei 0,5 kV/cm. Allerdings lässt sich der Spannungseinbruch zunächst nur auf der hyperpolarisierten Seite erkennen und erst bei höheren Feldstärken auch am depolarisierten Zellpol (s. Abb. 40, oben links und unten rechts). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit ein dem Membranspannungsrückgang folgender Wiederaufladeprozess gefolgt von einer Abflachung des Kurvenverlaufes an beiden Zellpolen beobachtet werden (s. Abb. 40, unten rechts). Dieses Verhalten kann von dem angeführten theoretischen Porenmodell nicht erklärt werden.

Die Vorhersagen des Modells zeigen lediglich eine Abflachung der azimuthalen Membranspannungsverteilung an den Polregionen, jedoch keine erneute Aufladung. Mögliche Ursachen der Unterschiede zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und dem theoretischen Modell sind die verwendeten Zellgrößen sowie unterschiedliche Ruhepotentiale. Die Berechnungen basieren auf einer Zellgröße von 100  $\mu\text{m}$ , wohingegen die durchschnittliche Protoplastengröße bei 40  $\mu\text{m}$  lag. Je kleiner eine Zelle, desto höher muss das externe elektrische Feld sein, um den gleichen Effekt zu erzielen. Des Weiteren wurde für die Berechnungen ein Ruhepotential von -80 mV angenommen, was für eine Pflanzenzelle zu gering ist. Das für BY-2 Protoplasten typische Membranpotential liegt im Bereich von -150 mV. Der starke Einfluss, den das Ruhepotential auf das Aufladeverhalten der Plasmamembran nimmt, konnte bereits in den Experimenten zur Feldstärkeabhängigkeit gezeigt werden. Die gemessenen Daten lassen deutlich erkennen, dass die Aufladung der Membran und die Bildung von Poren stark von der Position auf der Zelle, bezogen auf die Richtung des elektrischen Feldes, abhängt und bestätigen damit größtenteils die theoretischen Ansätze (Weaver 1991, Krassowska 2007). Die beobachteten Membranspannungseinbrüche an den Zellpolen lassen sich durch den, verstärkt an den Zellpolen stattfindenden Ionenfluss durch die gebildeten Poren erklären und entsprechen ebenfalls dem durch Krassowskas Modell vorhergesagten Kurvenverlauf. Die nachfolgende Wiederaufladung der Membran kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht durch bestehende Modelle erklärt werden. Nach dem Porenmodell (Krassowska and Filev 2007) sollte die Porierung der Membran mit ansteigender Feldstärke bzw. fortschreitender Feldeinwirkung zunehmen und damit ein Wiederaufladen der Membran verhindern. Mit dem jetzigen Stand der Wissenschaft ist eine Erklärung der beobachteten Effekte nur teilweise möglich.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen erstmals mit hoher zeitlicher Auflösung die Membranspannungsentwicklung einer Pflanzenzelle in Reaktion auf ein elektrisches Feld. Für die gemessenen, azimuthalen Membranspannungsverläufe gibt es die nachfolgend diskutierten Erklärungsansätze. Die beobachteten Spannungseinbrüche, wie auch die nachfolgende Wiederaufladung sprechen für einen kurzzeitigen Ionenfluss durch die Membran, der zu einer vorübergehenden Änderung der Membranspannung führt. Kurzzeitige Ionenflüsse durch die Plasmamembran sind für Pflanzenzellen nichts Ungewöhnliches.

Gesteuert werden solche Ionenströme durch eine Proteinfamilie, welche Ionenkanäle durch die Membran bilden. Ionenkanäle werden auf unterschiedliche Arten gesteuert. Die für diese Arbeit bedeutenden Kanäle werden durch die Membranspannung kontrolliert. Das Erreichen einer bestimmten Membranspannung führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Kanalöffnung. Durch das Anlegen eines externen elektrischen Feldes kann die induzierte Änderung der Membranspannung zu einer Aktivierung von spannungsgesteuerten Ionenkanälen führen. Zahlreiche Veröffentlichungen berichten von hyperpolarisationsgesteuerten, wie auch depolarisationsgesteuerten Calciumkanälen, die in einer Vielzahl von Pflanzenzellen gefunden wurden (White 2000, Kiegle et al. 2000, Gelli and Blumwald 1997, White 2009) und dort die, für physiologische Funktionen benötigte, Hyper- bzw. Depolarisation der Plasmamembran steuern. Für *Arabidopsis thaliana* konnte bereits mittels der Patch-Clamp-Technik die Koexistenz beider Calciumkanäle gezeigt werden (Miedema et al. 2009). Die Aktivierung eines solchen Calciumkanals führt zu einem Calciumeinfluss, welcher die beobachtete Depolarisation der Membran bei 1,0 kV/cm (s. Abb. 40, rote Kurve) erklären kann. Die beobachtete Hyperpolarisation bei 1,3 kV/cm (s. Abb. 40, grüne Kurve) ist jedoch nicht durch einen Calciumfluss durch die Membran zu erklären. Es gilt außerdem zu berücksichtigen, dass die Kanäle bei Membranspannungen von  $> -150$  mV (hyperpolarisationsaktiviert) bzw.  $< 80$  mV (depolarisationsaktiviert) eine Aktivierung zeigen (Miedema et al. 2009). Beide Membranspannungen decken sich nicht mit den Bereichen, in denen die Spannungseinbrüche beobachtet wurden ( $-300$  mV und  $300$  mV). Auch der Zeitraum zwischen Stimulus und Kanalöffnung, der aktuell auf  $2-3$   $\mu$ s geschätzt wird (Doyle 2004, Maconochie et al. 1995), ist um ein Vielfaches zu langsam, um das beobachtete Verhalten zu erklären. Die erneute Aufladung der Membran lässt vermuten, dass durch das Anlegen von höheren Feldstärken die Struktur der Calciumkanäle beschädigt und in ihrer Funktion beeinträchtigt wird. Auf eine Verbindung zwischen Pulsapplikation und Kanalaktivierung lassen auch die folgenden beiden aktuellen Arbeiten schließen. Zangh und Fan konnten 2009 zeigen, dass das Aktin-Cytoskelett in den Schließzellen von *Vicia faba* an der Kontrolle der Kanalöffnung von hyperpolarisationsaktivierten Calciumkanälen beteiligt ist. Die Stabilisierung des Cytoskeletts führte zur Schließung der Kanäle, Destabilisierung zu deren Öffnung (Zangh et al. 2009).

Eine weitere aktuelle Arbeit konnte den Einfluss von Kurzpulsen auf das Cytoskelett pflanzlicher Zellen zeigen (Berghöfer et al. 2009). Verschiedene BY-2-GFP-Markern Linien wurden einem elektrischen Feld der Stärke  $E = 33,0 \text{ kV/cm}$  und einer Pulslänge von  $10 \text{ ns}$  ausgesetzt. Beobachtet wurde eine feldinduzierte Destabilisierung des Cytoskeletts. Die Ergebnisse dieser beiden aktuellen Veröffentlichungen lassen einen Zusammenhang zwischen Kanalaktivierung und Feldbehandlung vermuten. Möglicherweise bewirkt die Pulsapplikation eine Destabilisierung des Cytoskeletts, welche zu einer schnellen Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle führt. Der Einfluss solcher Kanäle kann jedoch nach Experimenten in calciumfreiem Behandlungspuffer praktisch ausgeschlossen werden. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass je weniger Calcium im extrazellulären Raum vorhanden ist, desto stärker ist der beobachtete Spannungseinbruch (s. Abb. 46). Daraus ist zu schließen, dass dieser Einbruch mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durch die Aktivierung von Calciumkanälen verursacht wird. Die Aktivität anderer Ionenkanäle kann anhand dieser Ergebnisse natürlich nicht ausgeschlossen werden. Allerdings lassen die Kurvenverläufe einen weiteren interessanten Punkt erkennen. Calcium spielt eine wichtige Rolle für die Membranstabilität. Durch Anlagerung der Calciumionen an die Kopfgruppen der Phospholipide (vor allem an die Phosphatgruppe), wie auch durch die Anlagerung an Membranproteine, wird die Plasmamembran stabilisiert. Das beobachtete Verhalten deutet darauf hin, dass es sich bei dem beobachteten Spannungseinbruch um eine Störung der Membranintegrität handelt, welche durch die fehlende calciumunterstützte Membranstabilisierung noch verstärkt wird. Dieser Ansatz deckt sich mit aktuellen molekulardynamische Simulationen, welche zeigen, dass bei Anwesenheit eines elektrischen Feldes die Membranintegrität in den ersten  $15 - 20 \text{ ns}$  stark gestört wird und sich die Membran währenddessen in einem unstabilen und ungeordneten Zustand befindet, der sich nach kurzer Zeit wieder stabilisiert (Vernier 2009). Dieser Ansatz erklärt, unter Berücksichtigung des asymmetrischen Aufladeverhaltens, den ungewöhnlichen Membranspannungsverlauf auf der Anodenseite. Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass die Applikation von Kurzpulsen mit hohen Feldstärken in den ersten Nanosekunden nach Pulsbeginn nur die Membranintegrität der anodischen Zellhemisphäre stört, und nicht die der kompletten Membran. Da die azimuthalen Membranspannungsabhängigkeiten bei allen Feldstärken zudem reproduzierbar sind, ist eine zufällige Störung der Membran unwahrscheinlich.

In diesem Fall müssten größere Schwankungen im gemessenen Membranspannungsverlauf auftreten, die nicht reproduzierbar sind. Weiterhin ist zu beachten, dass die Spannungseinbrüche bei geringeren Feldstärken mit einem zeitlichen Versatz von bis zu 750 ns nach Pulsbeginn zu beobachten sind. In diesem zeitlichen Rahmen befindet sich die Membran bereits wieder in einem stabilen Zustand. Eine weitere Möglichkeit, die beobachteten Kurvenverläufe zu erklären, sind systematische Effekte des Fluoreszenzfarbstoffs ANNINE-6, welche die Messungen beeinflussen könnten. ANNINE-6 wird in die äußere Schale der Doppellipidschicht zwischen die Phospholipide eingebaut. Die Fluoreszenzantwort des spannungsempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffes hängt von der lokalen elektrischen Feldstärke am Chromophor des Farbstoffmoleküls ab. Dieses elektrische Feld setzt sich zusammen aus dem Eigenfeld der Dipole der angrenzenden Phospholipidkopfgruppen (Solvatochromismus) und einem Beitrag durch das externe elektrische Feld (Elektrochromismus, linearer molekularer Stark Effekt).

Kuhn et al. konnten zeigen, dass die Fluoreszenzantwort von ANNINE-6 in einem Spannungsbereich von  $|\Delta V_M| < 180$  mV allein auf dem linearen molekularen Stark-Effekt beruht (Kuhn and Fromherz 2003, Kuhn et al. 2004). Eine molekulardynamische Simulation konnte für hohe Feldstärken über der Membran von ca. 0,5 V/nm zeigen, dass eine Rotation der Phospholipidkopfgruppen am hyperpolarisierten Zellpol stattfindet (Hu et al. 2006). Dieser Effekt hätte einen Einfluss auf das elektrische Feld in der Umgebung des ANNINE-6 Chromophors und könnte somit zu der beobachteten Fluoreszenzintensitätsminderung führen. Das elektrische Dipolmoment der ANNINE-6 Kopfgruppe liegt in der Größenordnung von ca. 15 Debye (Fromherz 1995) und ist damit um einiges größer, als das Dipolmoment der Phospholipidkopfgruppen mit 1,5 Debye (Yang et al. 2008). Die Dipole der Farbstoffmoleküle sind in der Membran gegensätzlich zu den Dipolen der Phospholipidmoleküle orientiert. Mit der Annahme, dass der ungewöhnliche Fluoreszenzintensitätsrückgang (s. Abb. 49 - 51) durch eine Drehung der Kopfgruppen verursacht wird, müsste eine Änderung der Fluoreszenzintensität verstärkt am depolarisierten Zellpol zu erkennen sein, da auf Grund der Richtung des elektrischen Feldes eine Drehung lediglich auf der Kathodenseite auftreten dürfte. Ein solches Verhalten konnte allerdings selbst bei Feldstärken bis zu 30,0 kV/cm nicht beobachtet werden.

Weiterhin spricht gegen diese Annahme, dass die einwirkende Kraft, die zur Drehung der Kopfgruppen führt, am Zelläquator ( $0^\circ$  und  $180^\circ$ ) am größten sein müsste, da die Richtung des elektrischen Feldes hier senkrecht zum Dipolmoment der Kopfgruppen steht. In diesem Fall dürfte es auf Grund einer Kopfgruppene Drehung bei hohen elektrischen Feldstärken nicht zu dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten steilen Fluoreszenzintensitätsübergang zwischen hyper- und depolarisierter Zellhemisphäre kommen. Stattdessen wäre ein kontinuierlicher Übergang der Fluoreszenzintensitätsänderung am Zelläquator zu erwarten. Zudem zeigen molekulardynamische Simulationen, dass die in dieser Arbeit applizierten Feldstärken lediglich eine Drehung der Kopfgruppen von  $1 - 2^\circ$  bewirken würden, zumal die thermische Bewegung der Phospholipidkopfgruppen ohne Feldeinwirkung bereits sehr stark ist (Vernier 2009). Für die in dieser Arbeit applizierten Feldstärken ist damit ein solvatochromatischer Beitrag zur Fluoreszenzantwort unwahrscheinlich. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz betrachtet die Ströme durch die Poren. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes bestimmt der Ladestrom  $I_L$  das Verhalten der Membranspannung. Die Membran beginnt sich aufzuladen, wobei bereits erste Poren gebildet werden. Der Entladestrom  $I_E$ , der teilweise durch die Poren fließt, wird zu diesem Zeitpunkt noch vom Ladestrom überlagert. Ab einer Membranspannung von  $\pm 300$  mV setzt verstärkte Porenbildung ein. Diese Entwicklung führt dazu, dass der Entladestrom zunimmt und schließlich den Ladestrom dominiert. Die Poren wachsen, jedoch beginnen kleinere Poren nach kurzer Zeit wieder zu schrumpfen und sich zu verschließen. Die verbleibenden Poren erreichen einen Gleichgewichtszustand. An diesem Punkt ist es durchaus denkbar, dass der Ladestrom  $I_L$  erneut zunimmt, was die beobachtete Wiederaufladung der Membran erklärt. Die unterschiedlichen Ausprägungen der beobachteten Spannungseinbrüche an den beiden Zellpolen lassen sich durch die unterschiedliche Verteilung der Porengrößen erklären. Laut Krassowskas Modell bildet ein 1 ms-Spannungspuls von 40 kV/m bei einer 100  $\mu\text{m}$  großen Zelle schätzungsweise 341 000 Poren, von denen 97,8 % klein und 2,2 % groß sind, wobei am hyperpolarisierten Zellpol mehr, aber kleinere Poren und am depolarisierten Zellpol weniger aber größere Poren gebildet werden (Krassowska et al. 2007).

### 4.3 Diskussion der Theorien zur Erklärung des feldinduzierten Permeabilitätsanstieges

Im Folgenden soll kurz auf die unterschiedlichen Theorien zur Erklärung des feldinduzierten Permeabilitätsanstieges des Plasmalemmas eingegangen und auf ihre Anwendbarkeit, bezogen auf die in dieser Arbeit erzielten experimentellen Befunde sowie die in der Literatur bereits beschriebenen Ergebnisse eingegangen werden.

#### 4.3.1 Nicht-Poren-Modelle

Bei der *theoretischen Beschreibung der Instabilität einer Doppellipid-Membran (elektromechanischer Kollaps, Crowley 1973)* (s.a. Einleitung Modell I) wird der Zusammenbruch der Membran durch eine felderzeugte Kompression verursacht. Das Modell gilt für eine planare bimolekulare Lipidmembran mit einer Dicke von 4 nm – 7 nm. Vorhergesagt wird ein Zerreißen der Membran für eine bestimmte Membranspannung, wobei die Kompression der Membran proportional zum Quadrat der angelegten Spannung ist. Die durch die Membrankompression ausgelöste Verringerung der Membrandicke hat einen Anstieg der Membrankapazität  $C_M$  zur Folge, was in Experimenten jedoch nicht gemessen werden konnte (Weaver et al. 1996). Laut diesem Modell zerreißt die Membran nur für suprakritische Spannungen. Experimente belegen jedoch, dass das Zerreißen der Membran ein stochastischer Vorgang ist, der auch bei geringeren Spannungen stattfinden kann (Abidor et al. 1979). Das Modell besagt, dass das Verhalten der Membran nur von der externen Feldstärke bzw. der hierdurch verursachten Membranspannung  $V_M$  abhängt. Es ist jedoch experimentell bewiesen, dass das Zerreißen der Membran auch maßgeblich von der Pulsdauer beeinflusst wird (Neumann 1992). Des Weiteren betrachtet dieses Modell den Fall einer planaren Membran und vernachlässigt die Komplexität einer Zellmembran, die durch ihre geschlossene Struktur und unterschiedliche Molekülzusammensetzung andere Eigenschaften aufweist. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sprechen ebenfalls gegen dieses Modell. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei hohen Membranspannungen eine Wiederaufladung der Membran möglich ist (s. 4.2.3).

Dieses Ergebnis spricht deutlich gegen die Aussage dieses Modells, dass die Membran für eine bestimmte Spannung zerreißt. Kapitel 4.2.2 bestätigt, dass auch die Pulsdauer einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Membranspannung nimmt. Das Modell trifft die Vorhersage, dass eine Phosphatidylmembran bei einer Membranspannung von 118 mV und eine Cholesterolmembran bei 234 mV zerreißt. Wie den Ergebnissen dieser Arbeit zu entnehmen ist, findet erst ab einer Membranspannung von  $\pm 300$  mV ein Permeabilitätsanstieg der Membran statt (s. 4.2.1). Dieses Modell ist somit nicht in der Lage, die experimentellen Beobachtungen zu beschreiben.

Das *Phasen-Übergangsmodell* (Sugar, 1979, s. a. Einleitung Modell IV) besagt einen feldinduzierten Phasenübergang, welcher zu einer erhöhten Membranpermeabilität führt. Betrachtet wird eine planare Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin-Membran (DPPC-Membran) bei 20 °C. Bei einer Membranspannung von 0 mV – 140 mV befindet sich die Membran in der Gel-Phase und damit in dichter Molekülpackung. Bei 140 mV findet ein Phasenübergang erster Ordnung statt. Bei einer Membranspannung über 140 mV befindet sich die Membran in der flüssig-kristallinen Phase, wodurch ein Anstieg der Fläche pro Molekül von 17 % verursacht wird. Mit steigender Spannung wird die Membran immer flüssiger, bis die Membran bei einer Membranspannung von 240 mV zerreißt. Die berechnete kritische Membranspannung sinkt mit ansteigender Temperatur. Dieses Modell liefert ebenfalls keine Erklärung für das stochastische Verhalten des Membranzusammenbruchs (Weaver 1996, Abidor et al. 1979). Vorhergesagt wird eine Abhängigkeit der Membranspannung, wobei eine erhöhte Membranspannung zu einem uneingeschränkten Anstieg der Fläche pro Molekül und damit zum Zerreißen der Membran führt. Es ist jedoch experimentell bewiesen, dass das Zerreißen der Membran auch maßgeblich von der Pulsdauer beeinflusst wird (Neumann 1992). Es konnte gezeigt werden, dass auch bei hohen Membranspannungen eine Wiederaufladung der Membran möglich ist (s. 4.2.3). Dieses Ergebnis spricht deutlich gegen die Aussage dieses Modells, dass die Membran bei einer bestimmten Spannung zerreißt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen ebenfalls für eine zeitliche- (s. 4.2.2), wie auch für eine azimutale Abhängigkeit (s. 4.2.4) welche durch die Betrachtung einer planaren Membran nicht beschrieben werden kann. Das Modell trifft die Vorhersage, dass eine DPPC-Membran bei einer Membranspannung von 240 mV zerreißt.

Wie schon im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, findet ein Permeabilitätsanstieg erst ab einer Membranspannung von  $\pm 300$  mV statt (s. 4.2.1).

Das *Elektrodynamische-Instabilitäts-Modell* (*Flüssigkeits-Schicht-Modell*, Michael und O'Neill 1970, Taylor und Michael 1973) (s.a. Einleitung Modell II) sowie das *Viskoelastische Modell* (*Wellen-Instabilität*, Steinchen et al. 1982, Maldarelli et al. 1980) (s.a. Einleitung Modell III) betrachten zwei parallele nichtleitende Lipidschichten zwischen zwei leitenden Flüssigkeiten. Bei diesen beiden Ansätzen wird eine symmetrische, inkompressible und ungeladene Lipidschicht, mit einer Dicke von 10 nm – 100 nm angenommen. Beide Modelle, wie auch die *Betrachtung einer planaren Doppellipidschicht als ein metastabiles System*, Volmer et al. 1939, Kramers 1940, Zeldovich 1942, s. a. Einleitung Modell V), liefern keine Erklärung für das stochastische Verhalten des Membranzusammenbruchs (Abidor et al. 1979). Die starke Abhängigkeit der Membranlebensdauer von der an diese angelegte Spannung (Weaver 1996) wird ebenfalls vernachlässigt. Alle Modelle betrachten den einfachsten Fall einer planaren Membran und berücksichtigen nicht die Komplexität einer Zellmembran. Auch hier spricht die beobachtete Wiederaufladung gegen die Annahme, dass die Membran bei einem bestimmten Wert zerreißt (s. 4.2.3). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine Feldstärke- (s. 4.2.1), eine zeitliche (s. 4.2.2), wie auch für eine azimutale Abhängigkeit (s. 4.2.4) die durch die oben genannten Modelle nicht beschrieben werden kann.

### 4.3.2 Poren-Modelle

Bei den Porenmodellen gibt es lediglich eine grundlegende Theorie. Nach dieser führt das Anlegen eines externen elektrischen Feldes zu einer Aufladung der Membran, bis ein kritischer Membranspannungswert erreicht wird. An diesem Punkt findet eine strukturelle Neuordnung der Membran statt, die zur Bildung von Poren führt. Der Fluss von Ionen und Makromolekülen durch die gebildeten Poren ermöglicht den beobachteten Permeabilitätsanstieg der Membran. Nach Beendigung der Feldexposition ist die Membran, in Abhängigkeit der gewählten Parameter (Pulsdauer, Pulsform und Feldstärke), in der Lage, sich zu regenerieren. Bei den nachfolgend aufgeführten Modellen handelt es sich jeweils um Weiterentwicklungen bereits gegebener Ansätze. Modell B (*Einfluss thermaler Fluktuationen auf die Porenbildung*, Litster 1975, Taupin 1975, s. a. Einleitung Modell B) beschreibt den ersten Ansatz, der auch Erklärungen für die in den Experimenten zur Wiederaufladung (s. 4.2.3) bestätigte reversible Elektroporation liefert. Es folgte die Idee der Bildung unterschiedlicher Porenarten (*Bildung von zwei Porenarten*, Glaser 1988, Weaver 1981, Weaver 1993, s. a. Modell D), welche ebenfalls Ansätze zur Erklärung experimenteller Beobachtungen, wie z.B. der reversiblen und irreversiblen Elektropermeabilisierung, lieferte. Neuere Modelle, basierend auf der Smoluchowski-Gleichung, ermöglichten es, Aussagen über die Dynamik der Porenpopulation bzw. eine Näherung der Porendichte zu treffen (Neu und Krassowska 1999, Joshi et al. 2001, Chen et al. 2006).

DeBruin und Krassowska verwendeten 1999 eines dieser Modelle (*Asymptotisches Modell der Elektroporation*, Neu und Krassowska 1999, s. a. Einleitung Modell E), um eine Anzahl an Vorhersagen zu treffen, welche sich mit experimentellen Ergebnissen decken:

- ein schneller Anstieg der Porendichte innerhalb der ersten Mikrosekunden nach dem angelegten Puls,
- eine Sättigung der Membranspannung infolge der durch die Poren erhöhte Leitfähigkeit und
- eine Regenerationszeit der Membran von 20 s (DeBruin und Krassowska, 1999).

Es folgte eine Erweiterung des Modells, welches die Bestimmung des Transmembranpotentials, die Anzahl der Poren und die Verteilung der Porenradii als Funktionen der Zeit und der Position auf der Plasmamembran ermöglicht (*Modell für die Elektroporation einer einzelnen, sphärischen Zelle*, Krassowska und Filev 2007, s. a. Modell F). Es ist anzumerken, dass es sich bei diesem Modell um die aktuellste theoretische Beschreibung der Vorgänge an der Membran als Reaktion auf ein externes elektrisches Feldes handelt. Für eine externe Feldstärke von 0,4 kV/cm, einer Pulsdauer von 1 ms und einem Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  der modellierten Zelle, wurden unter Verwendung des erweiterten Modells folgende Reaktionen der Plasmamembran auf die Pulsapplikation beschrieben:

- Bildung von 341 000 Poren, von denen 97,8 % kleine Poren ( $r \approx 1 \text{ nm}$ ) und 2,2 % große Poren ( $r \approx 22,8 \pm 18,7 \text{ nm}$ ) sind.
- Die höchste Porendichte findet sich an den Polen.
- Die größten Poren finden sich an den Grenzbereichen (definiert als die Winkel bei  $45^\circ$ ,  $135^\circ$ ,  $225^\circ$  und  $315^\circ$ , s. a. Abb. 38 und 42).
- An der Anode finden sich mehr, aber kleine Poren.
- An der Kathode finden sich weniger, aber größere Poren.

Es gilt festzuhalten, dass anhand dieser Arbeit die Bildung von Poren nicht nachgewiesen werden kann. Allerdings konnten die durch Krassowska und Filev theoretisch berechneten Abhängigkeiten experimentell belegt werden. Hierbei sind der azimutale, der zeitliche sowie der phänomenologische Verlauf der Membranspannung zu nennen. Im Umkehrschluss sprechen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse dafür, dass ein Porenmodell als wahrscheinlichstes Modell für den feldinduzierten Permeabilitätsanstieg in Frage kommt. Die einzelnen Abhängigkeiten sollen nun im Folgenden diskutiert werden. Die theoretischen Berechnungen nach Krassowska und Filev besagen, dass Porenbildung nicht spontan ab einer bestimmten kritischen Feldstärke einsetzt, sondern direkt durch eine Änderung des Ruhepotentials verursacht wird und erst ab einer bestimmten Membranspannung (1 V) verstärkte Porenbildung zu beobachten ist. Die Experimente zur Feldstärkeabhängigkeit (s. 4.2.1) bestätigen diese Aussage, allerdings liegt die ermittelte Einsatzspannung zur verstärkten Porenbildung bei  $\pm 300 \text{ mV}$ .

Das Modell zeigt den Einfluss eines von Null abweichenden Ruhepotentials auf die Porenentwicklung. Laut Modell beginnt die Porenbildung am hyperpolarisierten Zellpol. Die Daten zur Feldstärkeabhängigkeit, zur Wiederaufladung und zur azimutalen Abhängigkeit bestätigen diese Annahme. Durch das stark negative Ruhepotential der Tabakprotoplasten ist die zu erkennende Asymmetrie allerdings sehr viel stärker ausgeprägt, als in Krassowskas Berechnungen. Die azimutalen Membranspannungsverläufe decken sich gut mit den theoretisch berechneten Kurven, die ebenfalls eine zu Beginn des Spannungspulses sinusförmige Winkelabhängigkeit zeigen. Die durch die Porenbildung erhöhte Membranleitfähigkeit führt zu Abweichungen von dem durch Formel (9) vorhergesagten sinusförmigen Kurvenverlauf an den porierten Membranbereichen in Form von großen Membranspannungsrückgängen an den Polregionen. Aus Krassowskas Modell resultiert ein solcher Einbruch, symmetrisch an beiden Zellpolen, 1,43  $\mu$ s nach dem Einsetzen des elektrischen Pulses. Die Messungen der vorliegenden Arbeit zeigen dieses Verhalten abhängig von der angelegten Feldstärke in Bereichen von 10 ns bei 31,0 kV/cm bis zu 750 ns bei 0,5 kV/cm. Allerdings lässt sich der Spannungseinbruch zunächst nur auf der hyperpolarisierten Seite erkennen und erst bei höheren Feldstärken auch am depolarisierten Zellpol (s. Abb. 40, oben links und unten rechts). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit ein dem Membranspannungsrückgang folgender Wiederaufladeprozess gefolgt von einer Abflachung des Kurvenverlaufes an beiden Zellpolen beobachtet werden (s. Abb. 40, unten rechts). Dieses Verhalten kann von dem angeführten theoretischen Porenmodell nicht erklärt werden. Die Vorhersagen des Modells zeigen lediglich eine Abflachung der azimutalen Membranspannungsverteilung an den Polregionen, jedoch keine erneute Aufladung.

### 4.3.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Theorie zwei Ansätze existieren:

#### 1. Lineare Theorien

Die linearen Theorien stimmen nicht mit den experimentellen Beobachtungen überein. All die vorgestellten Nicht-Poren-Modelle sind außerstande, das stochastische Verhalten des Membranzusammenbruchs, die reversible Elektropermeabilisierung, geschweige denn die starke Abhängigkeit der Lebensdauer der Membran von der Membranspannung  $V_M$ , zu erklären. Des Weiteren verwenden diese Modelle planare Membranen als Basis für ihre Berechnungen. Die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse lassen sich mit den theoretischen Ansätzen dieser Gruppen nicht erklären.

#### 2. Nichtlineare Theorien

Die Nichtlinearen Theorien erklären erfolgreich die stochastische Natur, die unterschiedlichen Abhängigkeiten, wie auch die Reversibilität der Elektroporation. Sie erklären jedoch nicht, wie das Feld mit der Membran interagiert und die eingebrachte elektrische Energie zur Bildung von Poren führt. Ein großer Mangel dieser Theorien ist, dass sie in ihren Grundannahmen nicht nachprüfbar sind, da sie zur Erklärung die Existenz von Membrandefekten bzw. Poren voraussetzen.

Es lässt sich festhalten, dass die in dieser Arbeit erzielten experimentellen Befunde zum Großteil durch das derzeit aktuellste Porenmodell *Modell für die Elektroporation einer einzelnen, sphärischen Zelle*, (Krassowska und Filev 2007, s. a. Modell F) plausibel erklärt werden können.

#### 4.4 Kalibrierung von ANNINE-6 mittels der Patch-Clamp-Technik

Die Messungen der Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzintensitätsänderungen zeigen ein lineares Verhalten im Spannungsbereich von -300 mV bis 300 mV. Bei Spannungen außerhalb des genannten Bereiches tritt ein Sättigungsverhalten auf (s. Abb. 53). Die bei den Experimenten zur Feldstärkeabhängigkeit ermittelte kritische Membranspannung von  $|V_M| = 300$  mV wird von den Messungen bestätigt. Allerdings ergeben sich nach Umrechnung der relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen in Membranspannungsänderungen mittels der Kalibrierkurve des Farbstoffs (s. Abb. 26), wesentlich geringere Spannungswerte verglichen mit der applizierten Membranspannung  $V_C$ . So wird z.B. bei einer Kommandospannung von 300 mV nach Umrechnung der zugehörigen relativen Fluoreszenzintensitätsänderung nur eine Membranspannung von ca. 160 mV erreicht. Dies deutet auf eine geringere Spannungssensitivität des Farbstoffs ANNINE-6 hin, als bislang angenommen. Der lineare Teil der aus den Patch-Clamp Messungen erhaltenen Kalibrierkurve lässt sich anhand einer linearen Regression beschreiben durch:

$$F/F_0(V_C) = 0,99 - 8,42 \cdot 10^{-4} V_C \quad (10)$$

$F/F_0$  = Relative Fluoreszenzintensitätsänderung

$V_C$  = Kommandospannung (an die Membran angelegte Spannung)

Hieraus ergibt sich eine Sensitivität des Farbstoffs von  $8,42 \cdot 10^{-4}$  bzw. eine Änderung der Fluoreszenzintensität um 8,42 % pro 100 mV Membranspannungsänderung. In der Literatur wird für den ANNINE-6 Farbstoff bei gleicher Anregungswellenlänge eine Sensitivität von 20,8 % pro 100 mV angegeben (Kuhn et al. 2003). Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Spannungssensitivitäten sollen im Folgenden diskutiert werden. Bei den Kalibrationsmessungen ließen sich relative Fluoreszenzintensitätsänderungen im Bereich von 0,75 und 1,3 erreichen. Bei den Experimenten in der Mikroelektrodenanordnung mit externer Feldapplikation konnten jedoch relative Intensitätsänderungen in einem Bereich von 0,1 bis 1,9 gemessen werden. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in den erreichbaren Fluoreszenzintensitätsänderungen ist die Länge der applizierten Spannungspulse.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, hat die Pulsdauer einen starken Einfluss auf das Verhalten der Membran und den Porenbildungsprozess. In den Experimenten mit externer Feldapplikation wurden Pulsängen von 100 ns und 1  $\mu$ s verwendet. Für die Kalibrierung des Fluoreszenzfarbstoffes ANNINE-6 wurden Pulsängen von 10 ms verwendet. Auf Grund des hohen Pipettenwiderstandes der Patchpipette von etwa 5 M $\Omega$  waren kürzere Pulsauern nicht möglich, da andernfalls die Aufladung der Membran auf den gewünschten Endwert nicht gewährleistet war. Bei den Patch-Clamp-Experimenten wird die Membran auf einer definierten Kommandospannung  $V_C$  gehalten. Dies bedeutet jedoch auch, dass in einem zeitlichen Rahmen von 10 ms starke Porenbildung verbunden mit anhaltendem Porenwachstum auftritt. Die gemessene Sättigung der Fluoreszenzintensität könnte somit durch den zunehmenden Ionenfluss durch die gebildeten Poren und der damit verbundenen Verhinderung einer weiteren Membranaufladung erklärt werden. Zudem erlaubt die starke Porierung der Membran den Übergang von ANNINE-6-Molekülen von der äußeren in die innere Lipidschicht. Da sich die Fluoreszenzantworten von innen- und außenliegenden Farbstoffmolekülen aufheben, führt dies zu einem Verlust bzw. einer Verringerung der Spannungssensitivität. Eine weitere Möglichkeit, welche die Verringerung der beobachteten Fluoreszenzintensitätsänderungen erklären könnte, liegt in der Kalibrationsmethode selbst begründet. Der Protoplast wird bei dieser Technik in der Whole-Cell-Konfiguration (s. Abb. 20) gehalten. Energetisch betrachtet ist es für die beiden Enden der geöffneten Membran günstiger, sich neu anzuordnen, analog zur Bildung einer hydrophilen Pore (s. Abb. 10). Die ANNINE-6 Moleküle können folglich nicht nur feldgetrieben über die beiden Enden in die innere Lipidschicht gelangen (elektrophoretisch), sondern auch durch die thermisch verursachte Bewegung der Lipidmoleküle. Vernier konnte 2006 mit Hilfe von MD-Simulationen die Wanderung von Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Lipidschicht an den Rändern der gebildeten Poren zeigen (Vernier 2006). Betrachtet man nun die ANNINE-6 Moleküle als Analogon zu Phosphatidylserin, so wäre durchaus eine Wanderung, auch unabhängig von Porenbildung, entlang der geöffneten Membran in der Whole-Cell-Konfiguration denkbar und eine damit einhergehende Sensitivitätsverringernng.

Um den Einfluss der Pulsdauer auf die Fluoreszenzantwort des Farbstoffes zu überprüfen, erfolgten Versuche mit externer Feldapplikation in der Mikroelektrodenanordnung mit einer Pulslänge von 10 ms und Feldstärken, die zu vergleichbaren Membranspannungen wie bei der Patch-Clamp-Methode führen sollten. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Protoplasten durch diese vergleichbar lange Feldeinwirkung zerstört werden und Messungen der relativen Fluoreszenzänderungen im Millisekundenbereich somit nicht durchgeführt werden konnten. Die Anwendung der mittels der Patch-Clamp-Technik ermittelten Kalibrierkurve zur Umrechnung der gemessenen Fluoreszenzintensitätsänderungen würde zu einer Änderung der Amplituden der ermittelten Membranspannungsabhängigkeiten führen. Der prinzipielle Verlauf der Membranspannung bliebe weitestgehend erhalten. Da die Kalibrierkurve jedoch nur einen Bereich der relativen Fluoreszenzänderungen zwischen 0,75 und 1,25 abdeckt, ist es nicht möglich, die bei externer Feldapplikation gemessenen weitaus größeren relativen Fluoreszenzänderungen hiermit umzurechnen. Des Weiteren legten die oben angeführten Fehlerquellen bei der Kalibration nahe, in dieser Arbeit für die Umrechnung der Fluoreszenzintensitätsänderungen weiterhin die Kalibrierkurve nach Kuhn zu verwenden (Kuhn 2003).

## **5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick**

Mit Hilfe der gepulsten Laser-Fluoreszenzmikroskopie und der Verwendung des schnellen spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffes ANNINE-6 konnten erstmals feldinduzierte Änderungen der Membranspannung bei Pflanzenzellen mit einer zeitlichen Auflösung von 5 ns gemessen und mittels einer Kalibrierkurve in Membranspannungsänderungen umgerechnet werden. Die Messungen erfolgten an aus der Zellkultur *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 Wildtyp (BY-2) gewonnenen Protoplasten.

### **5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

#### **5.1.1 Vorversuche zur systematischen Fehlerbetrachtung**

- Zusammenfassend lässt sich anhand der Ergebnisse der Vorversuche schlussfolgern, dass der durch diese Einflüsse maximal verursachte systematische Fehler 5 % beträgt und somit weitestgehend vernachlässigt werden kann.

#### **5.1.2 Messungen zur Membranaufladung**

- Die Feldstärkeabhängigkeit des Membranpotentials zeigt eine annähernd exponentielle Korrelation zwischen der Membranspannung und dem angelegten externen, elektrischen Feld und bestätigt damit erstmals experimentell, dass Porenbildung nicht ab einer bestimmten kritischen Feldstärke einsetzt, sondern bereits eine geringe Änderung des Ruhepotentials zur Bildung vereinzelter Poren führt.
- Für BY-2 Protoplasten konnte eine asymmetrische Feldstärkeabhängigkeit, beruhend auf dem stark negativen Ruhepotential der pflanzlichen Zelle, gezeigt werden.

- Mit Hilfe dieser Ergebnisse war es möglich, die kritische Membranspannung für den verstärkten Einsatz der Porenbildung auf  $|V_M| = 300 \text{ mV}$  zu bestimmen und damit den in der Literatur angegebenen Wert von 1 V zu korrigieren.
- Die Messungen zur zeitlichen Entwicklung des Transmembranpotentials konnten den exponentiellen Kurvenverlauf für eine unporierte Membran bei geringeren Feldstärken bestätigen. Höhere Feldstärken führten zu steileren Anstiegen. Erstmals konnte zudem ein signifikanter Membranspannungsrückgang im Bereich der Zellpole mit anschließender erneuter Zunahme der Membranspannung beobachtet werden.
- Die Daten zeigten ebenfalls starke Abweichungen der erreichbaren Amplitude zwischen der gemessenen und der theoretisch berechneten zeitlichen Entwicklung der Membranspannung, beruhend auf der unzureichenden Möglichkeit der theoretischen Modelle, die tatsächlichen Vorgänge an der Membran zu beschreiben.
- Bereits bei geringen Abweichungen vom Ruhepotential sind die Voraussetzungen zur Anwendung der Formeln (7) - (9) nicht mehr gegeben.
- Der Einfluss der Anstiegszeit der verwendeten Pulsleitungen auf das Membranaufladeverhalten konnte in weiteren Experimenten zur zeitlichen Entwicklung des Membranpotentials gezeigt werden.
- Die schnelle Regenerationsfähigkeit des Plasmalemmas konnte in den Experimenten zur Wiederaufladung gezeigt werden.
- Durch die Messungen zur azimuthalen Abhängigkeit konnte größtenteils das theoretische Porenmodell nach Krassowska und Filev (*Modell für die Elektroporation einer einzelnen, sphärischen Zelle*, Krassowska und Filev 2007, s. a. Modell F) bestätigt werden. Des Weiteren konnte die starke azimuthale Abhängigkeit der Membranspannung gezeigt werden.
- Die Messungen bestätigen die Annahme der stärksten Aufladung an den Zellpolen (Weaver 1991).
- Die beobachteten Spannungseinbrüche an den Zellpolen zeigen eine starke Abhängigkeit von der Zeit nach Pulsbeginn und der applizierten Feldstärke.

- Die Beteiligung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen als Ursache für den Spannungseinbruch und die nachfolgende Wiederaufladung konnte durch weitere Experimente ausgeschlossen werden.
- Ein feldinduzierter ungeordneter Zustand der Membran, wie er durch aktuelle molekulardynamische Simulationen vorhergesagt wird, kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Mit ansteigender applizierter Feldstärke, ist der Rückgang der Membranspannung zu früheren Zeitpunkten, während des Spannungspulses, reproduzierbar zu beobachten.
- Ein systematischer Effekt des Fluoreszenzfarbstoffs ANNINE-6 verursacht durch Drehung der Farbstoff-Kopfgruppen, konnte ausgeschlossen werden. Eine Kopfgruppene Drehung würde nicht zum beobachteten steilen Fluoreszenzintensitätsübergang zwischen hyper- und depolarisierter Zellhemisphäre führen, sondern in diesem Fall wäre ein kontinuierlicher Übergang der Fluoreszenzintensität am Zelläquator zu erwarten. Ein solvatochromatischer Beitrag zur Fluoreszenzantwort ist unwahrscheinlich.
- Eine denkbare Erklärung für das Verhalten der Membranspannung ist die Betrachtung des Ladestroms  $I_L$  und des Entladestroms  $I_E$ . Zu Beginn eines Spannungspulses bestimmt der Ladestrom  $I_L$  maßgeblich den zeitlichen Verlauf der Membranspannung. Sobald die verstärkte Bildung von Poren, ab einer Membranspannung von  $\pm 300$  mV einsetzt, nimmt der Entladestrom  $I_E$  durch die Membran zu und übersteigt den Ladestrom. Anschließend erreicht die Porenbildung einen Gleichgewichtszustand, ab dem es durchaus denkbar ist, dass der im zeitlichen Verlauf der Aufladung mittlerweile gestiegene Ladestrom  $I_L$  erneut dominiert,  $I_L > I_E$ , was die beobachtete Wiederaufladung der Membran erklären würde.
- Die unterschiedlichen Ausprägungen der beobachteten Spannungseinbrüche an den beiden Zellpolen lassen sich durch die unterschiedliche Verteilung der Porengrößen erklären (Krassowska et al. 2007).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse schlüssig und konsistent sind.

Beobachtetes Verhalten unter Verwendung der Kurz- und Langpulsleitung:

Anodische Zellhemisphäre

Langpulsleitung	Kurzpulsleitung
<b>Anhaltende Hyperpolarisierung</b>	---
<b>Beginnende Depolarisierung und Vergrößerung des Spannungseinbruches</b>	
<b>Am Zellpol beginnende Wiederaufladung der Membran, die mit zunehmender Pulseinwirkung immer größere Winkelbereiche umfasst</b>	
<b>Komplett flacher Kurvenverlauf bei Membranspannungsänderungen im Bereich von 0 mV bis -150 mV (geringe Hyperpolarisation der Membran)</b>	

Tabelle 1:

Einfluss von Lang- und Kurzpulsapplikation auf die Membranspannung an der hyperpolarisierten Zellhemisphäre (Anodische Zellhemisphäre, 0° - 180°).

Kathodische Zellhemisphäre

Langpulsleitung	Kurzpulsleitung
<b>Beginnende Depolarisierung mit ansteigender Amplitude, immer größere Winkelbereiche umfassend</b>	
<b>Spannungseinbruch am depolarisierten Zellpol, der sich mit zunehmender Pulseinwirkung auf einen größer werdenden Winkelbereich ausdehnt</b>	
<b>Wiederaufladung der Membran, beginnend am Zellpol</b>	
<b>Komplett flacher Kurvenverlauf bei Membranspannungsänderungen im Bereich von 400 mV bis 450 mV</b>	

Tabelle 2:

Einfluss von Lang- und Kurzpulsapplikation auf die Membranspannung an der depolarisierten Zellhemisphäre (Kathodische Zellhemisphäre, 180° - 360°).

### **5.1.3 Diskussion der Theorien zur Erklärung des feldinduzierten Permeabilitätsanstieges**

- Die unterschiedlichen Nicht-Poren-Modelle lassen sich mit den in dieser Arbeit ermittelten experimentellen Daten ausschliessen.
- Bei den Porenmodellen lassen sich die in dieser Arbeit erzielten experimentellen Befunde zum Großteil durch das *Modell für die Elektroporation einer einzelnen, sphärischen Zelle*, (Krassowska und Filev 2007, s. a. Modell F) plausibel erklären.

### **5.1.4 Kalibrierung des Farbstoffes ANNINE-6 mittels der Patch-Clamp-Technik**

- Die Versuche zur Kalibrierung des Farbstoffes ANNINE-6 an BY-2 Protoplasten zeigen, dass die Patch-Clamp-Technik mit dem aktuell zur Verfügung stehenden Messaufbau zu große Fehlerquellen für die Kalibrierung des Farbstoffes besitzt.

## 5.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind Stand der Forschung und können mit dem derzeitigen Wissenstand nur teilweise erklärt werden.

In Zukunft sollen jedoch weitere Ideen und Ansätze verfolgt werden:

- Der beobachtete Einfluss von Kurzpulsen auf das Cytoskelett pflanzlicher Zellen (Berghöfer et al. 2009) lässt auf eine wichtige Rolle des Cytoskeletts bei der Porenbildung schließen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Cytoskelett einen zusätzlichen Einfluss auf die Porenbildung ausübt und eventuell für sekundäre Porenprozesse verantwortlich sein könnte.
- Die feldinduzierte Auflösung des Cytoskeletts führt zu einer Trennung der Verbindungen zwischen Plasmamembran und Cytoskelett, wodurch die strukturelle Integrität der Plasmamembran beeinflusst wird. Ob das Cytoskelett ebenfalls einen Einfluss auf die in dieser Arbeit ermittelten Membranspannungsentwicklungen, vor allem auf die beobachteten Spannungseinbrüche an den Zellpolen hat, soll durch Versuche mit aktinstabilisierten GFP-BY-2-Linien geklärt werden.
- Der Einsatz von künstlichen Vesikeln soll die Membranspannungsmessungen an Membranen mit Ruhepotential = 0 mV ermöglichen, um den Einfluss des Ruhepotentials auf die beobachtete Asymmetrie nachzuweisen.
- Zur Kalibrierung des ANNINE-6 Farbstoffs mittels der Patch-Clamp-Technik existiert der Ansatz, den Zugangswiderstand der Pipette durch Einbringen eines sehr dünnen leitfähigen Drahtes (z.B. Silberdraht oder Kohlenstofffaser) in die Patchpipette zu verringern. Dies würde eine deutlich schnellere Aufladung der Membran ermöglichen, so dass kürzere Pulse verwendet werden könnten. Gleichzeitig würden Membranschädigungen durch zu lange Pulse verringert und die Kalibrieremethode somit näher an die experimentell verwendeten Parameter gebracht werden.

## 6. Abstract

For the first time, electric-field-induced changes in the membrane potential of plant cells could be measured with a time resolution of 5 nanoseconds. To achieve this resolution, a pulsed-laser-fluorescence-microscopy set up and the fast voltage-sensitive fluorescent dye ANNINE-6 have been used. The obtained relative fluorescence intensity changes  $F/F_0$  have been converted to transmembrane potential values  $\Delta V_M$  using a calibration curve of the voltage-sensitive dye. The measurements have been performed on protoplasts prepared from the cell line *Nicotiana tabacum L. cv. Bright Yellow 2 (BY-2)*.

The field strength dependence of the protoplast's transmembrane potential change  $\Delta V_M$  exhibits an exponential correlation between the membrane voltage shift and the applied external field strength. This result confirms the assumption, that even a small deviation from the natural resting potential will lead to the formation of isolated pores. A strong asymmetric saturation characteristic of the membrane charging process caused by the high resting potential of the plasmalemma has been measured. The results allow the calculation of the critical transmembrane potential where increased pore formation limits a further charging of the membrane to  $|V_M|= 300$  mV.

The temporal development of the membrane voltage showed the predicted exponential progression of an undisturbed membrane. An increase of the applied electric field strength leads to a steep rise. For the first time, a significant decrease of the membrane voltage followed by a recharging process could be detected at the pole regions of the cell. The measurements show strong deviations from the theoretically predicted amplitude due to deficiencies of the theoretical models in describing a real biological membrane.

The influence of the pulse rise time on the membrane charging has been shown by the usage of two Blumlein-lines with different rise times and pulse lengths.

Further experiments demonstrated the fast membrane regeneration after pulse exposition and the strong azimuthal dependence of the membrane voltage.

The maximum value of the membrane potential shift has been observed at the cell poles, as predicted by Weaver (Weaver 1991).

The measured decrease of the membrane voltage at the cell poles strongly depends on the time after the onset of the pulse and the value of the applied electric field strength. An increase of the applied field strength leads to a temporal shift of the voltage drop.

This behaviour might be attributed to a fast charge transfer through the membrane by the activation of voltage-gated calcium channels, but measurements without presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  could not approve this assumption.

A field induced disturbance of the membrane and a systematic error of the fluorescent dye could be excluded on the basis of the observed time- and field strength dependencies and the good reproducibility of the measurements.

Another approach to explain the decrease of the membrane voltage is the ratio between the charge and discharge current. An increased pore formation would lead to a dominant discharge current resulting the observed voltage drop. If the pore formation processes reaches a steady-state, an increase of the charging current would be possible. This process could explain the detected recharging behaviour.

The different characteristics of the membrane voltage decrease at both cell poles could be explained by individual pore size distributions, as predicted by Krassowska (Krassowska et al. 2007).

The results obtained in this work can not be explained by non-pore models, but are in good agreement with predictions by a recent pore model of Krassowska and Filev (Krassowska und Filev 2007).

Patch-clamp-experiments using ANNINE-6 stained BY-2 protoplasts resulted a linear correlation between the relative fluorescence intensity change of the cell and the applied membrane voltage in the range of -300 mV to 300 mV. However, the range of the relative fluorescence intensity changes caused by external electric field application to the membrane significantly differs from the results obtained by patch-clamp measurements. This discrepancy is ascribed to systematic effects caused by the significantly longer voltage pulses which were inevitable in the patch-clamp experiments.

## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

**Abidor IG, Arakelyan VB, Chemomordik LV, Chizmadzhev YA, Pastushenko VF, Tarasevich MR** (1979) Electric breakdown of bilayer membranes: 1. The main experimental facts and their qualitative discussion, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 6:37-52

**Albach G** (1999) Dissertation: Die Bedeutung tonoplastenständiger Ca<sup>2+</sup>-Transporter für die zytoplasmatische Signalübertragung und Ca<sup>2+</sup>-Homöostase bei *Zea mays* L.-Koleoptilen

**Baker PF, Knight DE** (1978) A high-voltage technique for gaining rapid access to the interior of secretory cells. *J. Physiol.* 284: 30-31

**Barnett A, Weaver JC** (1991) Electroporation: a unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and rupture, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 25: 163-182

**Beebe SJ, Fox PM, Rec LJ, Somers K, Stark RH, Schoenbach KH** (2002) Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Transactions on Plasma Science* 30:286-292

**Beebe SJ, Fox PM, Rec LJ, Willis EL, Schoenbach KH** (2003) Nanosecond high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *FASEB J* 17:1493-1495

**Berghöfer T, Eing C, Flickinger B, Hohenberger P, Wegner LH, Frey W, Nick P** (2009) Nanosecond electric pulses trigger actin responses in plant cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25;387(3):590-5

**Blumlein AD** (1941) Improvements in or relating to apparatus for generating electrical impulses. UK Patent 589127

**Chang DC** (1992) Structure and dynamics of electric field-induced membrane pores as revealed by rapid-freezing electron microscopy, in DC Chang, BM Chassy, JA Saunders and AE Sowers (eds.) *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Academic Press, pp. 9-27

**Chen C, Smye SW, Robinson MP, Evans JA** (2006) Membrane electroporation theories: a review. *Med. Biol. Eng. Comput.* 44: 5-14

**Chernomordik LV** (1992) Electropores in lipid bilayers and cell membranes. Chang DC, Chassy B M, Saunders J A, Sowers A E, *Guide to electroporation and electrofusion*, S 63-76, NY, Academic Press

**Cole KS** (1928) Electric impedance of suspensions of spheres. *The Journal of General Physiology*

**Cole KS** (1972) *Membranes, ions and impulses.* University of California Press Berkeley, pp 569

- Crowley JM** (1973) Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability, *Biophys. J.*, 13: 711-724
- DeBruin KA, Krassowska W** (1999) Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential. *Biophys. J.* 77(3):1213-24
- DeBruin KA, Krassowska W** (1999) Modeling electroporation in a single cell. II. Effects of ionic concentrations. *Biophys. J.* 77(3):1225-33
- Devaux PF** (1992) Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:417–439, pmid:1525472
- Doyle DA** (2004) Structural changes during ion channel gating. *Trends in Neurosciences* 27:6
- Eing CJ, Bonnet S, Pacher M, Puchta H, Frey W** (2009), Effects of Nanosecond Pulsed Electric Field Exposition on *Arabidopsis thaliana*. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* Vol. 16, No.5
- Freeman SA, Wang MA, Weaver JC** (1994) Theory of electroporation for a planar bilayer membrane: predictions of the fractional aqueous area, change in capacitance and pore-pore separation. *Biophys. J.*, 67:42-56
- Frey W, Baumung K, Kolb JF, Chen N, White J, Morrison MA, Beebe SJ, Schoenbach KH** (2004) Real-time imaging of the membrane charging of mammalian cells exposed to nanosecond pulsed electric fields. *The IEEE International Power Modulator Conference 2004*
- Fromherz P** (1995) Monopole-Dipole model for symmetrical solvatochromism of hemicyanine dyes. *J. Phys. Chem.* 99:7188-7192
- Fromherz P, Hübener G, Kuhn B, Hinner MJ** (2008) ANNINE-6plus, a voltage-sensitive dye with good solubility, strong membrane binding and high sensitivity. *Eur. Biophys. J.* 37(4):509-14
- Fromm J, Lautner S** (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell and Environment* 30:249-257
- Gabriel B, Teissie J** (1997) Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophysical Journal* 73:2630-2637
- Glaser RW, Leikin SL, Chemomordik LV, Pastushenko VF, Sokirko A** (1988) Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores, *Biochim. Biophys. Acta.*, 940:275-287
- Gelli A, Blumwald E** (1997) Hyperpolarization-activated  $Ca^{2+}$ -permeable channels in the plasma membrane of tomato cells. *J. Mem. Biol.* 155:34-45

**Gothelf A, Mir LM, Gehl J** (2003) Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer treat Rev* 29:371-387

**Gowrishankar TR, Stewart DA, Weaver JC** (2006) Model of a confined spherical cell in uniform and heterogeneous applied electric fields. *Bioelectrochemistry* 68:181-190

**Gowrishankar TR, Esser AT, Vasilkoski Z, Smith KC, Weaver JC** (2006) Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles. *Biochem. Biophys. Res. Co* 341: 1266-1276

**Guderjan M, Töpfl S, Angersbach A, Knorr D** (2005) Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Journal of Food Engineering* Volume 67, Issue 3, April 2005, Pages 281-287

**Hamilton WA and Sale AJH** (1967) Effects of high electric fields on microorganisms: II. Killing of bacteria and yeasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 148  
**Hibino M, Itoh H, Kinoshita K** (1993) Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys. J.* 64:1789-1800

**Hu Q, Shridhara V, Joshi RP, Kolb JF, Schoenbach KH** (2006) Molecular dynamics analysis of high electric pulse effects on bilayer membranes containing DPPC and DPPS. *IEEE Transactions on Plasma Science* 34:4

**Huang Y, Sekhon NS, Borninski J, Chen N, Rubinsky B** (2003) Instantaneous, quantitative single cell viability assessment by electrical evaluation of cell membrane integrity with microfabricated devices. *Sensors Actuat. A.* 105:31-39

**Hübner G, Lambacher A, Fromherz P** (2003) Anellated Hemicyanine Dyes with large symmetrical solvatochromism of absorption and fluorescence. *J. Phys. Chem.* 107:7896 -7902

**Joshi RP, Aly R, Schoenbach KH, Hjalmarson HP** (2001) Self-consistent simulations of electroporation dynamics in biological cells subjected to ultrashort pulses. *Phys. Rev. E* 64: 011913-1-011913-10

**Kiegle E, Gilliam M, Haselhoff J, Tester M** (2000) Hyperpolarisation-activated calcium currents found only on cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. *The Plant Journal* 21(2): 225-229

**Kinosita K, Tsong TY**, Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 471 (1977) 227-242

**Kotnik T, Miklavcic D, Slivnik T** (1998) Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields – a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45: 3-16

**Kramers HA** (1940) Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions, *Physica*, 7 : 284-302.

- Krassowska W, Filev PD** (2007) Modeling Electroporation in a Single Cell. *Biophysical Journal* 92:404-417
- Kuhn B, Fromherz P** (2003) Annelated hemicyanine dyes in a neuron membrane: Molecular Stark effect and optical voltage recording. *Phys. Chem.* 107:7903-7913
- Kuhn B, Fromherz P, Denk W** (2004) High sensitivity of Stark-shift voltage-sensing dyes by one- or two-photon excitation near the red spectral edge. *Biophysical Journal* 87: 631-639
- Litster JD** (1975) Stability of lipid bilayers and red blood cell membranes. *Phys. Lett.*, 53A : 193- 194
- Maconochie DJ, Fletcher GH, Steinbach JH** (1995) The conductance of the muscle nicotinic receptor channel changes rapidly upon Gatin. *Biophysical Journal* 68:483-490
- Maldarelli C, Jain R, Ruckenstein E** (1980) *J. Colloid. Interface.Sci.*, 72:118-125
- Mehrle W, Hampp R, Zimmermann U** (1989) Electric pulse induced membrane permeabilisation. Spatial orientation and kinetics of solute efflux in freely suspended and dielectrophoretically aligned plant mesophyll protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 978:267-275
- Melchers G** (1976) Unconventional methods in plant breeding. *Basic Life Science* 1-7, 8: 455-67
- Melikov KC, Frolov VA, Ahcherbakov A, Samsoov AV, Chizmadzhev YA** (2001) Voltage-induced nonconductive and metastable pores in unmodified lipid bilayers. *Biophysical Journal* 80:1829-1836
- Michael DH, O'Neill ME** (1970) Electrohydrodynamic instability in plane layers of fluid. *J. Fluid Mech.* 41: 571-580
- Miedema H, Demidchik V, Véry AA, Bothwell JHF, Brownlee C, Davies JM** (2008) Two voltage-dependent calcium channels co-exist in the apical plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *New Phytologist* 179: 378–385
- Miller IR** (1981) Structural and energetic aspects of charge transport in lipid layers and biological membranes, in ed. G. Milazzo *Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Vol. 4, Wiley, New York, pp. 161-224
- Mir LM** (2000) Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilisation. *Bioelectrochemistry* 53: 1-10
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde J-P, Hartmann M-A, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule J-J** (2004) Lipid rafts in higher plant cells. *Journal of Biological Chemistry* 279:36277-36286

**Nagata T, Nemoto Y, Hasezava S** (1992) Tobacco BY-2 cell line as the “Hela” cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132: 1–30

**Neher E, Sakmann B** (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260 (5554):799-802

**Neu JC, Krassowska W** (1999) Asymptotic model of electroporation. *Phys. Rev. E* 59: 3471-3482

**Neumann E, Rosenbeck K** (1972) Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes, *J. Membr. Biol.*, 10: 279-290

**Neumann E, Boldt E** (1989) Membrane electroporation: biophysical and biotechnical aspects, in M.J. Allen, Cleary S.F. and F.M. Hawdridge, teds. *Charge and Field Effects in Biosystems II*

**Neumann E, Boldt E** (1990) Membrane electroporation: the dye method to determine the cell membrane conductivity. *Prog. Clin. Biol. Res.* ;343:69-83.

**Neumann E** (1992) Membrane electroporation and direct gene transfer. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 28: 247-267

**Neumann E, Sprafke A, Boldt E, Wolf H** (1992) Biophysical digression on membrane electroporation, in DC. Chang, B.M. Chassy, J.A. Saunders and A.E. Sowers feds.) *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Academic Press, pp. 77-90

**Nicoloff Jac A** (1995) *Animal cell electroporation and electrofusion protopcols.* Humana Totowa, NJ

**Nuccitelli R, Pliquett U, Chen X, Ford W, James Swanson R, Beebe SJ, Kolb JF, Schoenbach KH** (2006) Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343(2):351-60

**Pastushenko VF, Chizmadzhev A, Arakelyan VB** (1979) Electric breakdown of bilayer membranes: II. Calculation of the membrane lifetime in the steady-state diffusion approximation. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 6:53-62

**Pauly H, Schwan HP** (1959) Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale. *Z. Naturforschung* 14b, 125-131

**Petrov AG, Mitov MD Dershanski AI** (1980) Edge energy and pore stability in bilayer lipid membranes, in L. Bata (ed.) *Advances in Liquid Crystal Research and Applications*, Pergamon, Oxford, pp. 695-737

**Phez E, Faurie C, Golzio M, Teissié J, Rols MP** (2005) New insights in the visualization of membrane permeabilization and DNA/membrane interaction of cells submitted to electric pulses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1724:248-254

**Prausnitz MR, Bose VG, Langer R, Weaver JC** (1993) Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance trans-dermal drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10504-10508

**Rieder A, Schwartz T, Schön-Hözl K, Marten SM, Süß J, Gusbeth C, Kohnen W, Swoboda W, Obst U, Frey W** (2008) Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field (PEF) treatment of clinical wastewater. *Journal of Applied Microbiology* 105:2035-2045

**Sack M, Schultheiss C, Bluhm H** (2005) Triggered Marx generators for the industrial-scale electroporation of sugar beets. *Industry Applications. IEEE Transactions on Plasmascience* 41(3):707- 714

**Sack M, Bluhm H** (2006) Electroporation of slices of sugar beets with rectangular pulses. *Plasma Science, ICOPS 2006, IEEE Conference Record – Abstracts*, pp 438-438

**Sack M, Eing C, Stängle R, Wolf A, Müller G, Sigler J, Stukenbrock L** (2008) On the electroporation of mash for the production of red wine., *ICOPS 2008, Proceedings of the IEEE 35th International Conference on Plasma Science*

**Sale AJH, Hamilton WA** (1967) Effects of high fields on microorganisms: I. killing of bacteria and yeasts. *Biochim. Biophys. Acta* 148:781788

**Sano T, Becker D, Ivashikina N, Wegner LH, Zimmermann U, Roelfsema M Rob G, Nagata T, Hedrich R** (2007), Plant cells must pass a  $K^+$  threshold to re-enter the cell cycle. *The Plant Journal* 50, 401-413

**Schoenbach KH, Peterkin FE, Alden RW, Beebe SJ** (1997) The effect of pulsed electric fields on biological cells: Experiments and Applications. *IEEE Transactions on Plasma Science Vol 25. No. 2*

**Schoenbach KH, Beebe SJ, Buescher SE** (2001) Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* 22:440–448

**Sek WH** (1992) Effects of pulse length and strength on electroporation efficiency. *Animal cell electroporation and electrofusion protocols. Humana Press, Totowa, NJ*

**Simons K, Ikonen E** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572

**Singer SJ, Nicolson GL** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731

**Smith KC, Weaver JC** (2008) Active mechanisms are needed to describe cell responses to submicrosecond, megavolt-per-meter pulses: Cell models for ultrashort pulses. *Biophysical Journal* 95:1547-1563

**Sokirko AV** (1994) Distribution of the electric field in an axially symmetric pore, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 33, pp. 25-30

**Stämpfli R** (1958) Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a Ranvier node, *An. Acad. Brasil. Ciens.*, 30, (1958) 57-63

**Steinchen A, Gallez D, Sanfeld A** (1982) *J. Colloid. Interface. Sci.*,85 :5-12.

**Stewart DA, Gowrishankar TR, Weaver JC** (2004) Transport lattice approach to describing cell electroporation: use of a local asymptotic model. *IEEE T. Plasma Sci.* 32: 1696-1708

**Stewart DA, Gowrishankar TR, Smith KC, Weaver JC** (2005) Cylindrical cell membranes in uniform applied electric fields: validation of a transport lattice method. *IEEE T. Biomed. Eng.* 52:1643–1653

**Sugar IP** (1979), A theory of the electric field-induced phase transition of phospholipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, 556:72-85.

**Sukhorukov VL, Endter JM, Zimmermann D, Shirakashi R, Fehrmann S, Kiesel M, Reuss R, Becker D, Hedrich R, Bamberg E, Roitsch Th, Zimmermann U** (2007) Mechanisms of electrically mediated cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients in aequorin-transformed tobacco cells. *Biophysical Journal* 93: 3324–3337

**Tarek M** (2005) Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 88:4045–4053.

**Taupin C, Dvolaitzky M and Sauterey C** (1975) Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles. *Biochem.* 14 (1975) 4771- 4775.

**Taylor, Michael** (1973) On making holes in a sheet of fluid. *J. Fluid Mech.*, 58 (1973) 625-639.

**Teissie J, Rols MP** (1993) An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophysical Journal* 65:409-413

**Tekle E, Astumian RD, Chock PB** (1994) Selective and asymmetric molecular transport across electroporated cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11512-11516

**Tieleman DP, Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ** (2003) Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields. *J. Am. Chem. Soc.* 125:6382–6383.

**Toepfl, S, Heinz V, Knorr D** (2006) Pulsed Electric Fields (PEF) Processing of Meat. IUFoST World Congress, 13th World Congress of Food Science & Technology, DOI: 10.1051/IUFoST:20060591

**Toepfl S, Jaeger H, Heinz V, Knorr D** (2006) Neues Verfahren zur Haltbarmachung von Milch. *Deutsche Molkerei Zeitung*, 127:24-28

**Tsukamoto S, Maeda T, Ikeda M, Akiyama H** (2003) Application of pulsed power to mushroom culturing”, 14<sup>th</sup> IEEE International Pulsed Power Conference, 2003, Digest of Technical Papers, Vol. 2, pp. 1116-1119

**Van Duijn B, Ypey DL, Libbenga KR** (1993) Whole-cell K<sup>+</sup> currents across the plasmamembrane of tobacco protoplasts from cell-suspension cultures. *Plant Physiol.* 101:81-88

**Vasilkoski Z, Esser AT, Gowrishankar TR, Weaver JC** (2006) Membrane electroporation: the absolute rate equation and nanosecond time scale pore creation. *Phys. Rev. E* 74

**Vernier PT, Sun YH, Marcu L, Salemi S, Craft CM, Gundersen MA** (2003) Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 310:286–295.

**Vernier PT, Sun YH, Marcu L, Craft CM, Gundersen MA** (2004) Nanoelectropulse-induced phosphatidylserine translocation. *Biophys. J.* 86:4040–4048.

**Vernier PT, Ziegler MJ, Sun YH, Chang WV, Gundersen MA, Tieleman DP** (2006) Nanopore formation and phosphatidylserine externalization in a phospholipid bilayer at high transmembranepotential. *J. Am. Chem. Soc.* 128:6288–6289

**Volmer M** (1939), in T. Steinkopf (ed.), *Kinetik der Phasenbildung*. Dresden, p.387.

**Vorobiev E, Jemai A B, Bouzrara H, Lebovka N, Bazhal M** Pulsed electric field-assisted Extraction of Juice from Food Plants, *Novel Food Processing Technologies*, Edited by Barbosa-Canovas G V, Tapia MS, Pilor Cano M.

**Weaver JC, Mintzer RA** (1981) Decreased bilayer stability due to transmembrane potentials, *Phys. Lett.*, 86A: 57-59

**Weaver JC** (1993) Electroporation: A dramatic, non-thermal electric field phenomenon, in M. Blank (ed.) *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*, San Francisco Press, San Francisco pp. 95

**Weaver JC, Chizmadzhev YA** (1996) Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41:135-160

**White PJ** (2000) Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 171-189

**White PJ** (2009) Depolarization-activated calcium channels shape the calcium signatures induced by low-temperature stress *New Phytologist* 183: 6–8

**Yang Y, Mayer LM, Wickremasinghe NS, Hafner JH** (2008) Probing the lipid membrane dipole potential by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 95:5193-5199.

**Zaharoff DA, Henshaw JW, Mossop B, Yuan F** (2008) Mechanistic analysis of electroporation-induced cellular uptake of macromolecules. *Exp. Biol. Med.* 233:94 -10

**Zeldovich JB** (1942) To the theory of new phase formation. Cavitation. *J. Exp. Theor. Phys.*, 12: 53-62 (in Russian)

**Zhang W, Fan LM** (2009) Actin dynamics regulates voltage-dependent calcium-permeable channels of the *Vicia faba* guard cell plasma membrane. *J. Integr. Plant Biol.* 2009 Oct; 51(10):912-21.

**Zimmermann U, Vienken J and Pilwat G** (1980) Development of drug carrier systems: electrical field induced effects in cell membranes, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 7 (1980) 553-574



## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Unbehandelte und behandelte Weintrauben der Sorte Lemberger, mikroskopische Aufnahme der Beerenhaut.	S. 2
Abbildung 2	Struktur eines Phospholipidmoleküls.	S. 5
Abbildung 3	Aufbau einer biologischen Membran.	S. 7
Abbildung 4	Der elektrochemische Gradient führt zum Aufbau des Transmembranpotentials.	S. 8
Abbildung 5	Reaktion einer biologischen Zelle auf ein externes elektrisches Feld.	S. 11
Abbildung 6	Schema einer Zelle zur Erklärung der in den Formeln verwendeten Variablen.	S. 14
Abbildung 7	Kritische Feldstärke als Funktion der Pulsdauer.	S. 15
Abbildung 8	Einfluss der Pulsdauer auf die Feldverteilung.	S. 16
Abbildung 9	Ersatzschaltbild für eine biologische Membran.	S. 18
Abbildung 10	Schema der möglichen Porenarten.	S. 21
Abbildung 11	Entwicklung der Porenradii in Abhängigkeit der freien Energie.	S. 22

Abbildung 12	Vergleich Herkömmliche Elektroporation (oben) und Supraelektroporation (unten).	S. 24
Abbildung 13	Einlagerung der Farbstoffmoleküle in die äußere Lipidschicht der Membran und Molekülstruktur des membranspannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffes.	S. 33
Abbildung 14	Schematische Darstellung der Reaktion des Farbstoffes auf ein angelegtes elektrisches Feld.	S. 34
Abbildung 15	Vergleich der Molekülstruktur der Fluoreszenzfarbstoffe ANNINE-6 und ANNINE-6plus.	S. 35
Abbildung 16	Pulsgenerator und Mikroelektrodenanordnung.	S. 41
Abbildung 17	Lasersystem und Fluoreszenzmikroskop mit Pulsgenerator, Oszilloskop und Steuerung.	S. 41
Abbildung 18	Schematischer Aufbau des Setups.	S. 42
Abbildung 19	Schema zur Membranpotentialmessung mit Hilfe des spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffes ANNINE-6.	S. 44
Abbildung 20	Schema zur Patch-Clamp-Technik und den möglichen Konfigurationen.	S. 45
Abbildung 21	Schema zur Kalibrierung des ANNINE-6 Farbstoffes mittels der Patch-Clamp-Technik.	S. 49
Abbildung 22	Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität durch das Auswerteprogramm unter Verwendung verschiedener Pixelmasken.	S. 50
Abbildung 23	Vergleich des zeitlichen Aufladeverhaltens einer biologischen Membran nach Weaver und Schoenbach.	S. 54
Abbildung 24	Vergleich der winkelabhängigen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannungsänderung von ANNINE-6 und ANNINE-6plus.	S. 56

Abbildung 25	Normierte Fluoreszenzintensitätsänderungen am anodischen und kathodischen Pol in Abhängigkeit der Anzahl applizierter Laserpulse von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten.	S. 57
Abbildung 26	Kalibrierkurven für den ANNINE-6 Farbstoff bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen.	S. 58
Abbildung 27	Relative Membranspannungsänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten bei zwei Anregungswellenlängen.	S. 59
Abbildung 28	Relative Fluoreszenzintensitätsänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten an den Zellpolen bei Farbstoffanregung mit voller Laserenergie und bei abgeschwächter Laserenergie.	S. 60
Abbildung 29	Vergleich der Feldstärkeabhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitätsänderungen von Protoplasten aus Zellkultur und Mesophyllprotoplasten aus Blattgewebe.	S. 61
Abbildung 30	Einfluss der Protoplastengröße auf die winkelabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannungsänderung bei unterschiedlichen Feldstärken.	S. 63
Abbildung 31	Einfluss der Auswertemethode auf die winkelabhängige Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannungsänderung eines mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten.	S. 64
Abbildung 32	Stromantwort eines mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten ( <i>Whole-Cell-Konfiguration</i> ) Vergleich der Stromantworten ungefärbter und gefärbter BY-2 Protoplasten bei + 120 mV.	S. 65
Abbildung 33	Gezeigt werden beispielhaft die, durch die verwendeten Leitungen, erzeugten Pulsformen bei einer eingestellten Feldstärkeamplitude von 0,5 kV/cm.	S. 66
Abbildung 34	Feldstärkeabhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten.	S. 67

Abbildung 35	Zeitliche Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannungsänderung von gefärbten BY-2 Protoplasten, bei einer Feldstärke von 0,5 kV/cm.	S. 69
Abbildung 36	Vergleich der zeitlichen Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensität von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten, bei 0,5 kV/cm und 1,0 kV/cm.	S. 70
Abbildung 37	Vergleich der zeitlichen Entwicklung der theoretisch berechneten Membranspannung und der experimentell gemessenen Membranspannung.	S. 71
Abbildung 38	Auflade- und Wiederaufladeverhalten von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten an den Zellpolen.	S. 72
Abbildung 39	Schema zur Auswertung der Winkelabhängigkeit.	S. 74
Abbildung 40	Azimuthale Abhängigkeit der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten bei unterschiedlichen Feldstärken.	S. 75
Abbildung 41	Ausgewählte Fluoreszenzaufnahmen von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten zu den in Abbildung 39 dargestellten Kurven.	S. 76
Abbildung 42	Entwicklung der Membranspannung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten für unterschiedliche Winkelsegmente in Abhängigkeit der applizierten Feldstärke.	S. 78
Abbildung 43	Schema zur Darstellung der gezeigten azimuthalen Winkel.	S. 79
Abbildung 44	Zeitliche Entwicklung der azimuthalen Abhängigkeit der Membranspannungsänderung.	S. 80

Abbildung 45	Azimuthale Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität bzw. der Membranspannungsänderung bei unterschiedlichen Feldstärken, gemessen 500 ns nach Pulsbeginn.	S. 82
Abbildung 46	Einfluss der Calciumkonzentration im extrazellulären Medium auf die azimuthale Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung von gefärbten BY-2 Protoplasten.	S. 83
Abbildung 47	Zeitliche Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten, bei einer Feldstärke von 0,5 kV/cm.	S. 85
Abbildung 48	Zeitliche Entwicklung der azimuthalen Abhängigkeit der Membranspannungsänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eine 100ns Spannungspulses ( $E = 1,7\text{kV/cm}$ ).	S. 86
Abbildung 49	Zeitliche Entwicklung der azimuthalen Abhängigkeit der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eines 100ns Spannungspulses ( $E = 4,0\text{ kV/cm}$ ).	S. 87
Abbildung 50	Zeitliche Entwicklung der azimuthalen Abhängigkeit der Membranspannungsänderung von ANNINE-6-gefärbten BY-2 Protoplasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eine 100ns Spannungspulses ( $E = 16,7\text{ kV/cm}$ ).	S. 88
Abbildung 51	Zeitliche Entwicklung der azimuthalen Abhängigkeit der Membranspannungsänderung von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eine 100ns Spannungspulses ( $E = 31,0\text{ kV/cm}$ ).	S. 89
Abbildung 52	Zeitliche Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensität von mit ANNINE-6 gefärbten BY-2 Protoplasten für ausgewählte Winkel zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn eine 100ns Spannungspulses.	S. 90
Abbildung 53	Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensitätsänderung in Abhängigkeit der angelegten Membranspannung (Kommandospannung $V_C$ ).	S. 92
Abbildung 54	Lineare Regression der Meßwerte der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung in Abhängigkeit der angelegten Membranspannung (Kommandospannung $V_C$ ).	S. 93

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einfluss von Lang- und Kurzpulsapplikation auf die Membranspannung an der hyperpolarisierten Zellhemisphäre (Anodische Zellhemisphäre, 0 -180 °).	S. 130
Tabelle 2	Einfluss von Lang- und Kurzpulsapplikation auf die Membranspannung an der depolarisierten Zellhemisphäre (Kathodische Zellhemisphäre, 180 -360 °).	S. 130

## 9. Anhang

### 9.1 Publikationen und Präsentationen

#### Publikationen

**Berghöfer T, Eing C, Flickinger B, Hohenberger P, Wegner LH, Frey W, Nick P** (2009) Nanosecond electric pulses trigger actin responses in plant cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25;387(3):590-5

**Flickinger B, Berghöfer T, Hohenberger P, Eing C, Frey W** (2010) Transmembrane Potential Measurements on Plant Cells using the Voltage-sensitive Dye ANNINE-6. *Protoplasma* März 2010

#### Vorträge

**Berghöfer T, Eing C, Flickinger B, Gusbeth C, Schneider S, Sträßner R, Frey W** Pulsed Laser Fluorescence Microscopy as a tool for transmembrane-potential recordings of biological cells. 2<sup>nd</sup> Euro-Asian Pulsed Power Conference, Vilnius, LT, September 22-26, 2008

**Berghöfer T, Eing C, Flickinger B, Gusbeth C, Sträßner R, Frey W, Schneider S** Transmembrane potential measurements on mammalian cells using the voltage sensitive dye ANNINE-6. 35<sup>th</sup> IEEE Int. Conf. on Plasma Science (ICOPS), Karlsruhe, Juni 15-19, 2008

**Frey W, Sack M, Gusbeth C, Berghöfer T, Eing C, Flickinger B** Untersuchungen zur Wechselwirkung gepulster elektrischer Felder mit biologischen Zellen. Frühjahrstagung DPG der Fachverbände Plasmaphysik, Kurzzeitphysik und Extraterrestrische Physik, Greifswald, März 30 - April 2, 2009

**Frey W, Berghöfer T, Flickinger B** Detection of the onset of pore formation by nanosecond-time-resolution pulsed laser fluorescence microscopy measurements on plant cell protoplasts. 17<sup>th</sup> Int. Pulsed Power conf., Washington, D.C., Juni 28 - Juli 2, 2009

## **Poster-Präsentationen**

### **Flickinger B, Berghöfer T, Eing C, Gusbeth C, Sträßner R, Frey W**

Transmembrane potential measurements on plant cells using the voltage sensitive dye ANNINE-6. 35<sup>th</sup> IEEE Int. Conf. on Plasma Science (ICOPS), Karlsruhe, Juni 15-19, 2008

### **Flickinger B, Berghöfer T, Eing C, Frey W**

Transmembrane potential measurements on plant cells using the voltage sensitive dye ANNINE-6. Junior Scientist Conference 'Science and Technology for the future', Wien, A, September 15-18, 2008

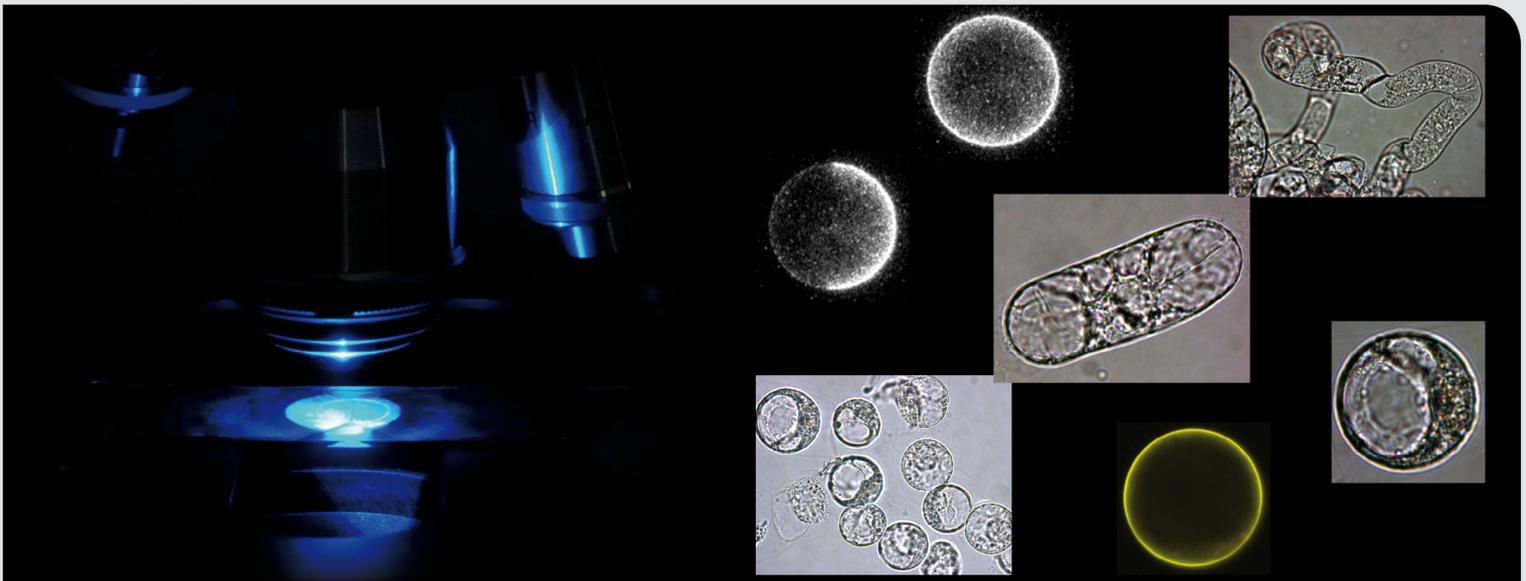
### **Flickinger B, Berghöfer T, Eing C, Frey W**

Transmembrane potential measurements on plant cells using the voltage sensitive fluorescence dye ANNINE-6. Joint Meeting of the bioelectromagnetics Society the European BioElectromagnetics Association, Davos, Schweiz, Juni 14 – 19 2009

### **Berghöfer T, Eing C, Flickinger B, Schneider S, Frey W**

Pulsed Laser Fluorescence Microscopy as a tool for transmembrane-potential recordings of mammalian cells. Joint Meeting of the bioelectromagnetics Society the European BioElectromagnetics Association, Davos, Schweiz, Juni 14 – 19 2009





Zur Untersuchung der Plasmamembranaufladung pflanzlicher Zellen wurden Protoplasten der Zelllinie *Nicotiana tabaccum* L. cv. Bright Yellow 2 mit dem spannungsensitiven Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6 gefärbt. Durch Anlegen eines externen elektrischen Feldes konnte die Membranaufladung, in Form von Membranspannungsänderungen, mit einer zeitlichen Auflösung von 5 ns mittels gepulster Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie gemessen werden. Die experimentell ermittelten Daten werden in dieser Arbeit vorgestellt und im Hinblick auf die bestehenden theoretischen Modelle zur Erklärung des feldinduzierten Permeabilitätsanstiegs einer Membran diskutiert.

ISSN 1869-9669  
ISBN 978-3-86644-554-3

