

## Reversibler dielektrischer Durchbruch von Zellmembranen in elektrostatischen Feldern

Reversible Dielectric Breakdown of Cell Membranes by Electrostatic Fields

Ulrich Zimmermann, Günter Pilwat und Friedrich Riemann

Institut für Physikalische Chemie, Kernforschungsanlage Jülich

(Z. Naturforsch. **29 c**, 304–305 [1974]; eingegangen am 18. Februar 1974)

Dielectric Breakdown, Biomembranes, Ghost-preparation

An Bakterien konnte in einer modifizierten Coulter Counter Apparatur nachgewiesen werden, daß Zellmembranen in hohen elektrischen Feldern (etwa  $10^3 - 10^4$  V/cm) leitend werden<sup>1, 2</sup>. Die Funktionsweise des Coulter Counters<sup>3</sup>, der normalerweise zur Zellzahl- und Zellvolumenbestimmung eingesetzt wird, beruht darauf, daß nichtleitende Teilchen, wie z. B. lebende Zellen, durch eine kleine Meßöffnung gesaugt werden, an der eine elektrische Spannung liegt. Das nichtleitende Teilchen verändert das elektrische Feld in der Meßöffnung. Die auftretende Spannungs- bzw. Stromänderung ist in erster Näherung dem Volumen des Teilchens proportional. Nach linearer Verstärkung, elektronischer Pulshöhenanalyse und geeigneter Eichung mit Partikeln bekannter Größe läßt sich die Volumenverteilung einer vorgegebenen Zellpopulation bestimmen. Da das elektrische Feld in der Meßöffnung aber sehr inhomogen

ist, hängt die Pulshöhe in erheblichem Maße vom Weg des Teilchens und von seiner Orientierung in der Meßöffnung ab. Die resultierenden Volumenverteilungen einer vorgegebenen Zellpopulation sind deshalb in der Regel stark verzerrt und entsprechen nicht der wahren Volumenverteilung. In dem von uns verwendeten Coulter Counter wird durch eine hydrodynamische Fokussierung des Zellsuspensionsstrahles erreicht, daß alle Teilchen auf dem gleichen Weg und unter der gleichen Orientierung die Meßöffnung passieren, so daß Störungen durch die Inhomogenität des Feldes ausgeschaltet werden können<sup>1</sup>. Da die wahre Volumenverteilung einer Zellpopulation unter diesen Bedingungen bestimmt werden kann, läßt sich der Einfluß der elektrischen Feldstärke in der Meßöffnung auf die Zellmembran, die unter normalen Bedingungen als Isolator funktioniert, untersuchen.

Mißt man dieselbe Latexpartikel-Verteilung (mittlerer Durchmesser  $1,857 \mu\text{m}$ ) bei verschiedenen Stromstärken in der Meßöffnung ( $\phi = 40 \mu\text{m}$ ), so sind die dem mittleren Partikelvolumen entsprechenden Pulshöhen (d. h. Kanalnummern) der Stromstärke proportional, wie es nach dem Ohmschen Gesetz zu erwarten ist (Abb. 1). Eine lineare Abhängigkeit vom Strom wird auch für jede andere Pulshöhe der Verteilung gefunden. Bei Rindererythrozyten wird dagegen, wie bei *E. coli*, bei einer charakteristischen Stromstärke, die vom betrachteten Volumen abhängt, ein scharfer Knickpunkt in der linearen Abhängigkeit beobachtet (Abb. 2). Die Ursache für den Knickpunkt ist, wie bei Bakterien ge-

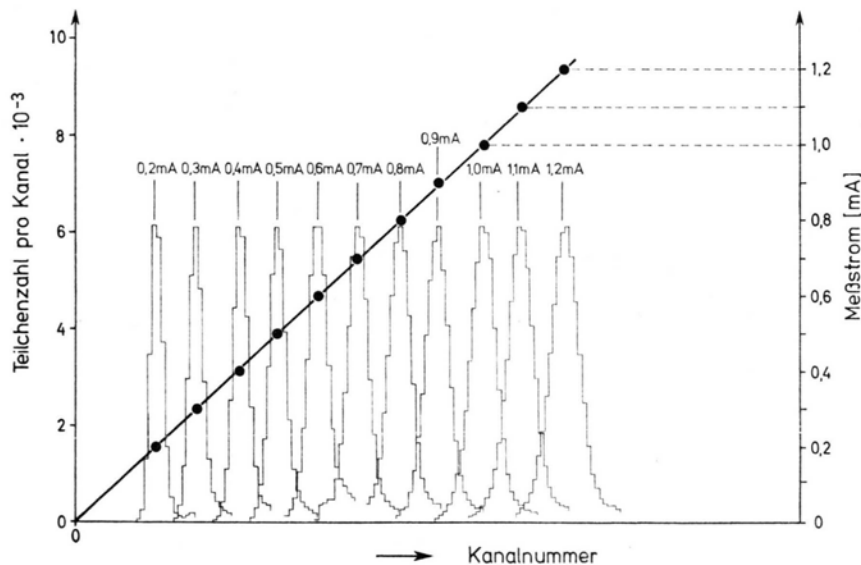


Abb. 1. Bei verschiedenen Stromstärken gemessene Volumenverteilungen von Latex-Partikeln (mittlerer  $\phi$   $1,857 \mu\text{m}$ , Weite der Meßöffnung  $40 \mu\text{m}$ ). Meßpunkte ●: Die dem mittleren Volumen der Verteilung entsprechenden Pulshöhen (Kanalnummern) in Abhängigkeit vom Meßstrom.

Sonderdruckanforderungen an Priv.-Doz. Dr. U. Zimmermann, Institut für Physikalische Chemie, Kernforschungsanlage Jülich, D-5170 Jülich, Postfach 365.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

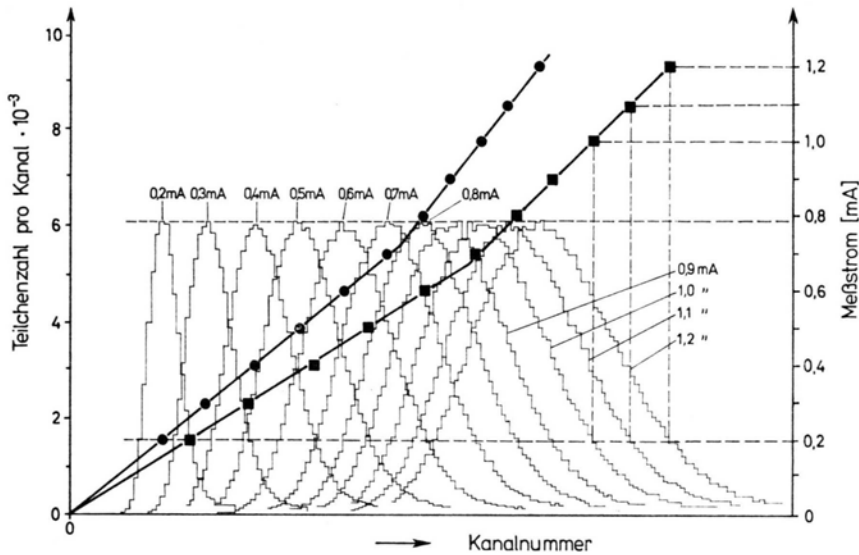


Abb. 2. Bei verschiedenen Stromstärken gemessene Volumenverteilungen von nativen Rindererythrozyten (häufigstes sphärisches Volumen  $27,3 \mu\text{m}^3$ ). Meßpunkte ●: Die häufigsten Pulshöhen (Kanalnummern) in Abhängigkeit vom Meßstrom. Meßpunkte ■: Die auf der Seite größerer Volumina viermal seltener auftretenden Pulshöhen (Kanalnummern) in Abhängigkeit vom Meßstrom.

zeigt wurde, im dielektrischen Durchbruch der Zellmembran zu sehen. Die Stromlinien, die vor dem dielektrischen Durchbruch zunächst um die Zellen herum liefen, greifen nunmehr durch die leitende Membran und durch das leitende Zellinnere. Infolgedessen wird das Volumen des Teilchens unterbewertet. Da bei vorgegebener Feldstärke bzw. Stromstärke der Potentialabfall an den Zellmembranen von großen Zellen höher ist als an Membranen kleiner Zellen, brechen zunächst die größeren Zellen durch, wie in Abb. 2 für zwei Pulshöhen gezeigt wird, die den sphärischen Volumina  $27,3 \mu\text{m}^3$  bzw.  $35,6 \mu\text{m}^3$  entsprechen. Es kommt deshalb zu einer scheinbaren Verschiebung der Verteilung zu kleineren Volumina. Im folgenden prüften wir die Frage, wie weit die Zellmembran infolge des dielektrischen Durchbruches für Proteine aus dem Zellinnern und aus der Außenlösung durchlässig wird. Die Erythrozyten wurden in einer isotonen Lösung inkubiert und die Stromstärke in der Meßöffnung auf 1,2 mA erhöht, um auch kleinere Volumina durchzubrechen. Nach Passieren der Meßöffnung wurden die Zellen in einem Vorratsgefäß bei  $0^\circ\text{C}$  aufgefangen und nach bestimmten Zeiten vom Überstand abzentrifugiert. Die Zellen waren völlig farblos. Eine Bestimmung des Hämoglobingehaltes bei 398 nm in einem Spektralphotometer bestätigte den völligen Verlust an Hämoglobin.

Dieses Ergebnis zeigt zunächst einwandfrei, daß das in Abb. 2 beschriebene Phänomen auf einen dielektrischen Durchbruch der Zellmembran, und

nicht auf den sog. „punch through“-Effekt zurückzuführen ist, wie er an großen Algenzellen beobachtet wurde<sup>4</sup>. Die auf diese Weise erhaltenen „ghost“-Zellen wurden anschließend bei  $0^\circ\text{C}$  für eine Stunde in einer isotonen Lösung inkubiert, der Jod-131-albumin zugesetzt war. Nach einer weiteren einstündigen Inkubationszeit bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und nach mehrmaligem Waschen mit einer inaktiven Lösung die in den „ghost“-Zellen eingeschlossene Aktivität in einem Szintillationszähler gemessen. Unter diesen Bedingungen wurde etwa 30% der Aktivität der Außenlösung eingeschlossen. Die durch den dielektrischen Durchbruch hervorgerufene Veränderung in der Permeabilität der Membran scheint demnach reversibel zu sein. Diese Annahme wird ebenfalls durch den Nachweis bestätigt, daß derartige „ghost“-Zellen wieder das Phänomen des dielektrischen Durchbruchs im Unterschied zu Zellen zeigen, die sofort nach Passieren der Meßöffnung untersucht wurden. Die durch dielektrischen Durchbruch erhaltenen „ghost“-Zellen sind wesentlich homogener als die, die bisher nach der Hämolyse Methode gewonnen wurden. Trennung über einen Saccharosegradienten sowie über ein Saccharosekissen, wie sie von Passow<sup>5</sup> beschrieben wurde, zeigte, daß durch dielektrischen Durchbruch etwa 80% „ghost“-Zellen vom sog. Typ II erzeugt werden können.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 160) gefördert.

<sup>1</sup> U. Zimmermann, J. Schulz u. G. Pilwat, *Biophys. Journal* **13**, 1005 [1973].

<sup>2</sup> U. Zimmermann u. G. Pilwat, *Proceedings of the 9th International Congress of Biochemistry*, Stockholm 1–7 July, p. 260, 1973.

<sup>3</sup> H. E. Kubitschek, *Methods in Microbiology* (J. R. Norris u. D. W. Ribbons, ed.), p. 593, Academic Press Inc., New York 1969.

<sup>4</sup> H. G. L. Coster, *Biophys. Journal* **5**, 669 [1965].

<sup>5</sup> H. Bodemann u. H. Passow, *J. Membrane Biol.* **8**, 1 [1972].