

Einfluß von Licht, Temperatur und Außenmedium auf das elektrische Verhalten von *Acetabularia crenulata**

DIETRICH GRADMANN

Institut für Biologie, Abteilung Biophysik, der Universität Tübingen

Eingegangen am 18. Juni 1970

The Effect of Light, Temperature, and External Medium upon the Electrical Behaviour of *Acetabularia crenulata*

Summary. 1. In sea water at 25°C cells of *Acetabularia crenulata* exhibit a resting potential (RP) of -170 mV between cytoplasm and external medium. At temperatures below 10°C, or upon addition of 10^{-3} m dinitrophenol in darkness, the cell shows a second steady potential (RP') of about -70 mV. Among the cations of sea water, i.e. K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , only K^+ was found to affect RP and RP'. If the ionic strength of the medium is reduced by addition of isotonic mannitol solution, RP decreases, while RP' is not influenced. RP' is explained as a potassium diffusion potential, while for the existence of RP an electrogenic chloride pump is inferred which is driven by ATP of the photo- or oxidative phosphorylation (system X). — 2. Starting from RP', the current-voltage relationship consists of two linear portions for inward (R_e) and outward current (R_u), respectively, merging at RP' (Fig. 3). Presumably they represent potassium conductances. For a given cell, the expression $RT/F \ln R_e/R_u$ yields a value which fits the RP' of the cell (Fig. 20). — 3. Starting from RP, a N-shaped current-voltage relationship was obtained for depolarisation (Fig. 3). The deviation from the potassium conductance is supposed to be due to the shunt of the potassium channel and the system X (voltage-dependent resistance). An electric circuit diagram was derived from voltage and current clamp experiments (Fig. 21); the elements of the circuit were tentatively analogized with cell functions. — 4. Action potentials of about 120 mV, lasting from 30 to 300 sec may arise spontaneously. They can be triggered by lowering the temperature or depolarisation (voltage clamp, current clamp, light-off — cf. Figs. 2,11). The mechanism of the action potential can be derived from the properties of the chloride pump. Action currents were recorded upon different depolarizing steps by voltage clamp to yield current-voltage curves at different times after stimulation (Fig. 13). — 5. Pulses of white light shift the potential off RP': light-on elicits a small depolarisation, light-off a large transient hyperpolarisation. The primary event of this response is a change of current (Fig. 19), the voltage change being its consequence. This result is interpreted on the basis of the circuit diagram.

* Dissertation der Math.-Nat. Fakultät der Universität Tübingen.

Abkürzungen: AP = Aktionspotential; RP = stabiles Potential bei ca. -170 mV; RP' = stabiles Potential bei ca. -70 mV.

Einleitung

Elektrophysiologische Grundphänomene der Zellmembran wie Genese des Ruhepotentials (RP) und Erregungsmechanismen differieren stark nach Art des Objekts. So strömt beim Aktionspotential (AP) während der Depolarisierung bei Nerven Na^+ in die Zelle, bei Characeen, den elektrophysiologisch bestuntersuchten botanischen Objekten, dagegen Cl^- aus der Zelle (Mullins, 1962). Da das Außenmedium für RP und AP einen entscheidenden Faktor darstellt, ist leicht zu verstehen, daß eine Süßwasseralge wie *Chara* oder *Nitella* nach anderen Mechanismen reagiert als eine Nervenzelle mit ionenreichem Außenmedium.

Ausgangspunkt für diese Arbeit war die Frage, ob marine Algen wegen des reichen Ionenangebots des Seewassers hinsichtlich der Erregung mehr den Nervenzellen entsprechen, oder ob sie sich ähnlich den systematisch nächstehenden Characeenzellen verhalten. Als Objekt hierfür schien die Meeressalge *Acetabularia crenulata* günstig. Durch ihre Einzelligkeit entfallen unkontrollierbare Einflüsse von außen auf die Zellmembran. Der dicke Stiel ermöglicht ein bequemes Einführen intracellulärer Elektroden. *A. crenulata* zeigt auch Erregungseigenschaften. Ruhepotential und Erregungen können durch Licht beeinflußt werden (Schilde, 1966, 1968). Nach heutigen Vorstellungen (vgl. Jeschke, 1970) hat bei grünen Pflanzen das Licht über Ionentransportmechanismen Einfluß auf die Membranspannung. Daher wird sich diese Arbeit weitgehend mit der Frage nach Zusammenhängen zwischen Licht, Ionen-transport und Membranspannung bei *A. crenulata* befassen.

Material und Methoden

1. Material

Die Anzucht der verwendeten *A. crenulata* erfolgte nach Hämmerling (1944) und Beth (1953). Obwohl diese Art empfindlicher ist als beispielsweise *A. mediterranea*, wurde sie gewählt, weil über sie von Schilde (1966, 1968) schon Untersuchungen vorlagen. Die verwendeten Zellen waren 5—8 cm lang, 0,3—0,8 mm dick und hatten noch keinen Hut ausgebildet. Um etwaige endorhythmische Einflüsse zu eliminieren, kamen die Algen mindestens 3 Tage vor Versuchsbeginn in Dauerlicht von 1500 Lux (Osram-L) bei 27°C.

2. Meßanordnung

Das Meßobjekt lag in einer Plexiglasküvette (Innenabmessungen $1 \times 1 \times 7$ cm) mit einem oben gelegenen Abfluß zur Wasserstrahlpumpe und einem unten gelegenen Zufluß für neues Medium, das aus einem hochgelegenen Vorratsgefäß zugeleitet werden konnte. Als Außenmedium diente — falls nicht anders angegeben — künstliches Seewasser nach Bentrup (1968). Es wurde aus Stammlösungen der Osmolarität 1,1 des natürlichen Seewassers hergestellt. Durch Abänderung der Anteile der verschiedenen Stammlösungen konnte so die Zusammensetzung des Außenmediums ohne Beeinflussung des osmotischen Werts einfach variiert werden. Für den Temperaturgleich neu zugeführten Mediums verlief die Zuleitung durch ein Temperatur-

bad (TB). Wie konduktometrische Messungen zeigten, brauchte das Medium bei offenem Hahn vom Vorrats- zum Versuchsgefäß etwa 1 min und wurde dort in 4 min zu 90% ausgetauscht. Ein Austausch des Mediums erfolgte je nach erforderlicher Vollständigkeit in 5–10 min. Die Temperatur im TB ließ sich mit einer Tauchkühler-Ultrathermostat-Kombination (Colora) über einen Außenkreislauf auf $\pm 1^\circ\text{C}$ genau einstellen und wurde mit einem elektrischen Temperaturmeßgerät (HSE) im Medium kontrolliert. Nur beim Mediumsaustausch konnten in den ersten 2 min Änderungen bis zu 5°C auftreten. Die Arbeits-Temperatur lag bei 25°C , falls nichts anderes angegeben.

Die Lichtquelle war ein Dia-Projektor mit einer 150 W-Quarzjodidlampe (Osram). Das optische System bestand aus einem 1:30/135 mm-Objektiv, dessen Frontlinse 10 cm unter dem Objekt lag, so daß hier bei voller Betriebsspannung (stabilisierte 220 V) 10^6 erg/cm² sec Weißlicht zu messen waren. Für normale Arbeitsbeleuchtung wurde der Projektor mit 110 V betrieben, und die Energieflußdichte mit einem 20%-Neutralglasfilter auf $1,5 \times 10^4$ erg/cm² sec reduziert. Für Versuche mit variabler Lichtintensität blieb durch konstant maximale Betriebsspannung (220 V) die Farbtemperatur unverändert, und die Intensität wurde durch Neutralgläser eingestellt. Mit einer Vorsatzlinse konnte das Licht enger gebündelt werden, so daß Intensitäten bis zu 4×10^6 erg/cm² sec zur Verfügung standen. Die Lichtmessung erfolgte mit einer geeichten Thermosäule (Kipp & Zonen).

Die Potentialmessungen wurden intracellulär mit Glasmikrocapillaren ausgeführt (mit 3 M KCl-Lösung gefüllt, Spitzendurchmesser etwa $1,5 \mu$, $R < 10^6 \Omega$). Ein chlorierter Silberdraht tauchte in die verdunkelte KCl-Lösung und war mit einem Impedanzwandler ($R_E: 10^{10} \Omega$) verbunden, so daß an dessen Ausgang mit einem Schreiber (Linseis Kompensationsschreiber) die Potentiale direkt als Spannung gegen die symmetrisch gebaute (Spitzendurchmesser etwa 100μ , Füllung mit 1% igem 3 M-KCl-Agar) indifferente Elektrode (an Erde) registriert werden konnten.

Messungen des Stroms zwischen Zellinnerem und AM wurden mit der Voltage-clamp-Methode nach der in Abb. 1 dargestellten Schaltung ausgeführt. Die Spannungsdifferenz ΔU zwischen dem Inneren der Zelle und AM wurde mit zwei FET-Operationsverstärkern I und II (QFT-5, $R_E = 10^{10} \Omega$) mit dem Faktor 10 verstärkt und bei V registriert. Die aus dem Vergleich mit einer von 0–2 V einstellbaren Testspannung (U_T) resultierende Summe bei Σ wurde mit einem weiteren Operationsverstärker III (SQ-10a) ohne Gegenkopplung verstärkt (geplant: OSPB/100, $U_{A\max} = \pm 100$ V, mit 100facher Verstärkung), so daß über eine weitere intracelluläre Mikroelektrode E_1 ($R: < 10^5 \Omega$) ein Strom floß, bis $10 \Delta U = -U_T$ wurde. Da der Eingangswiderstand von Operationsverstärker I groß war, floß I vollständig über die Zellgrenzschichten ins Außenmedium und konnte von dort über eine niederohmige Metallelektrode (E_4) gegen Erde bei A registriert werden. Wenn durch den Doppelschalter S_1, S_2 der Regelkreis unterbrochen war, verließ ΔU den durch U_T bestimmten Wert $-U_T/10$ und stellte sich auf das natürliche Potential ein, das als $10\Delta U$ aufgezeichnet wurde. Bei Current-clamp-Experimenten floß aus einer Spannungsquelle (± 120 V) ein konstanter, mit einem Potentiometer steuerbarer Strom durch einen Widerstand von $1 \text{ M}\Omega$, ein Amperemeter und Elektrode E_1 über Zellmembran und Medium zur Erde. Darauf eintretende Änderungen der Membranspannung wurden zwischen Elektroden E_2 und E_3 gemessen.

3. Lokalisierung der Elektrode

In der intakten Zelle liegen die Chloroplasten in dichtem Belag im peripheren Cytoplasma, so daß man die Spitze einer eingestochenen Elektrode nicht sehen kann. Wenn die Elektrode etwa $1/2$ Std in der Zelle ist, kann man um die Einstichstelle einen dichteren Chloroplastenbelag feststellen, der darauf schließen läßt, daß

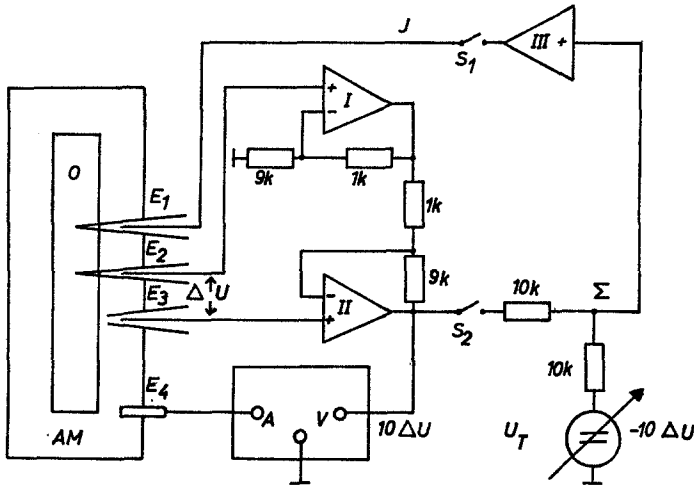


Abb. 1. Voltage-clamp-Versuchsanordnung. *A* Stromregistrierung; *AM* Außenmedium; E_1 stromzuführende Elektrode ($R = 20\text{--}100\text{ k}\Omega$); E_2 differente Elektrode; E_3 Vergleichselektrode; E_4 stromabführende Metallelektrode; *J* Voltage-clamp-Strom; *O* Meßobjekt; S_1 , S_2 Doppelschalter; *V* Spannungsregistrierung; ΔU Potentialdifferenz zwischen Zellinnerem und Außenmedium; $10\Delta U$ ΔU 10fach verstärkt; U_T ($-10\Delta U$) Testspannung, nach ihr stellt sich ΔU ein, wenn S_1 , S_2 geschlossen; Σ Summationspunkt; *I*, *II* FET-Operationsverstärker; *III* Operationsverstärker

wie bei *Nitella* (Nagai u. Tazawa, 1962) Cytoplasma die Elektrode umfließt. Durch Verletzung oder Plasmolyse kommt es vor, daß der Chloroplastenbelag infolge turbulenter Plasmaströmung inhomogen wird und stellenweise aufreißt, so daß Fenster entstehen, durch die man im Innern der Zelle die inserierte Elektroden spitze sehen kann, die tatsächlich mit Cytoplasma umgeben ist.

4. Reproduzierbarkeit

Von den etwa 1000 unter normalen Arbeitsbedingungen angestochenen Zellen zeigten ungefähr 300 nach einigen Minuten einen Betrag von $RP > 140\text{ mV}$ (innen negativ), das um weniger als $1\text{ mV}/30\text{ sec}$ schwankte; diese waren für den Großteil der Untersuchungen verwendbar. Bei einzelnen Zellen konnte während der Untersuchungen der elektrophysiologische Zustand innerhalb einiger Stunden sehr stark variieren, besonders im Hinblick auf die Erregbarkeit, so daß zunächst zwischen dem elektrischen Verhalten und einigen wichtigen physiologischen Bedingungen wie Entwicklungsstadium und Reinheitsgrad der Kultur keine Beziehung festgestellt wurde. Ausgewertet wurden nur Ergebnisse solcher Zellen, die während der Dauer der jeweiligen Versuche keine spontane Änderung des betreffenden elektrophysiologischen Zustandes zeigten, wobei als Kriterium diente, ob innerhalb der jeweils verlangten Genauigkeit am Anfang und am Ende einer Versuchsreihe die gleiche Empfindlichkeit gegenüber den variierten Parametern herrschte. Für mehrstündige Versuchsprogramme war diese Bedingung nur bei etwa 40 Zellen hin-

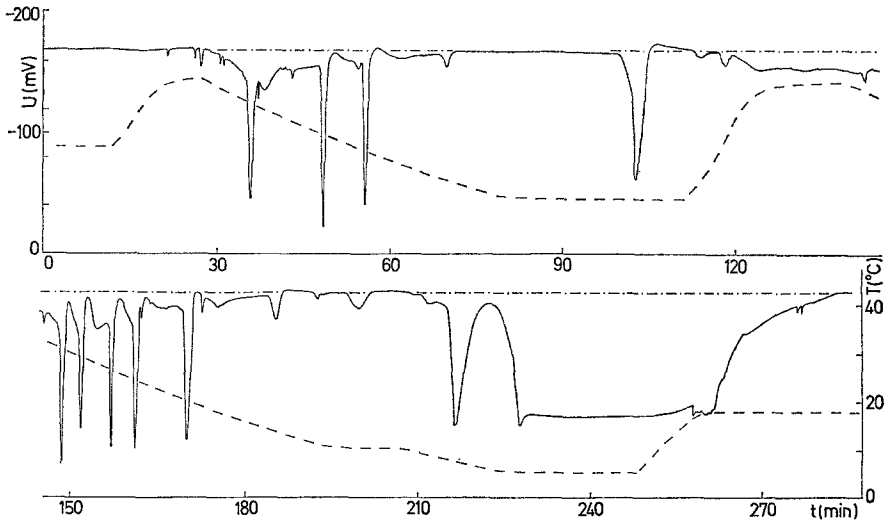


Abb. 2. Beispiel für Spannungsverlauf (durchgezogene Linie) auf variable Temperatur (gestrichelte Linie), aufgenommen an einer Zelle

reichend erfüllt, so daß zu bestimmten Untersuchungen nur einzelne einwandfreie Ergebnisse vorliegen. Diese wurden als repräsentativ für *A. crenulata* angesehen, wenn mindestens 3 andere Zellen qualitativ dasselbe Verhalten aufwiesen.

Ergebnisse

A. Gleichgewichtszustände

1. Das Ruhepotential

Wenn die gemessene Größe wie Spannung oder Strom sich nicht mehr ändert, nachdem das Meßobjekt auf den variierten Parameter reagiert hat, wollen wir von einem Gleichgewichtszustand sprechen. Unter normalen Arbeitsbedingungen ergaben Messungen an 79 verschiedenen Zellen ein mittleres RP von -169 ± 13 mV.

Temperatur. In Abb. 2 ist ein typischer Spannungsverlauf auf Temperaturänderungen aufgezeichnet. Aus Bereichen mit konstanter Temperatur, wo sich ein gleichbleibendes Potential eingestellt hat, wurde das jeweilige RP für verschiedene Temperaturen ermittelt. Nach der Goldmanschen oder Nernstschen Gleichung, die gewöhnlich auf das RP angewendet werden, ergäbe sich eine Proportionalität zwischen RP und T . Die Verteilung der Meßwerte von 10 verschiedenen Zellen weist aber zwischen 10 und 40°C eher die umgekehrte Tendenz auf. Für spätere Untersuchungen wird es wichtig, das RP bei Temperaturen $< 10^\circ\text{C}$ auf ein zweites stabiles Niveau RP' fällt. Messungen an 30 verschiedenen Zellen ergaben für $T < 10^\circ\text{C}$ ein mittleres RP' von -67 ± 13 mV. Die Extremwerte lagen bei -40 bzw. -100 mV.

Licht. Im Rahmen meiner Staatsexamensarbeit (vgl. Schilde, 1966) hatte ich ein Aktionsspektrum der Potentialerhöhung im Licht an *A. crenulata* aufgenommen. Es stimmt mit dem Absorptionsspektrum von Chlorophyll überein.

Außenmedium. Die Überführung aus dem Anzuchtmedium in das künstliche Seewasser zeigt keine Wirkung auf das R.P. Daher verwendeten wir für die Versuche statt des mit unbekanntem Bestandteilen versehenen Anzuchtmediums (Erdschreiber-Lösung) stets das wohldefinierte künstliche Seewasser. Ohne Na^+ im Medium bleibt R.P. unverändert. Es ist also gestattet, bei Veränderung anderer Kationen-Konzentrationen mit Na^+ zu kompensieren, ohne daß mit einer Wirkung des Na^+ -Konzentrationsunterschiedes auf R.P. gerechnet zu werden braucht. Unter diesen Voraussetzungen wurde der Einfluß der K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]$) auf R.P. bestimmt. Verzehnfachung des K^+ -Gehaltes ruft eine Positivierung des Potentials um 55 ± 12 mV hervor, was gut mit der Nernstschen Gleichung zu erklären ist, während geringere K^+ -Konzentrationen im Sinne der Nernstschen Gleichung zu kleine Abweichungen von R.P. liefern. Abwesenheit und 3fache Konzentration von Mg^{++} zeigen keine Wirkung auf R.P. Dasselbe scheint für Ca^{++} zu gelten.

Nach diesen Ergebnissen dürfte sich R.P. nicht wesentlich ändern, wenn nur eine der angeführten Kationenarten im Medium ist. Dies trifft tatsächlich für Na^+ , Mg^{++} und Cholin^+ zu; jedoch führt K^+ oder Ca^{++} in zu hohen Konzentrationen zum irreversiblen Zusammenbruch des Potentials. Gewöhnlich waren dem Medium 2 mM HCO_3^- zugesetzt. Auf HCO_3^- -Mangel konnte keine Veränderung im elektrischen Verhalten festgestellt werden.

Obwohl R.P. auf Verzehnfachung von $[\text{K}^+]_a$ so reagiert, als ob es ein reines K^+ -Diffusionspotential wäre, kann der hohe Betrag von etwa -170 mV nicht mit der Nernstschen Gleichung erklärt werden. Denn bei $[\text{K}^+]_a = 10$ mM des Seewassers müßte $[\text{K}^+]_i$ größer als 7 M sein, was allein aus Löslichkeitsgründen ausgeschlossen werden muß. Mit der flammenphotometrisch bestimmten $[\text{K}^+]$ des Protoplasten (500 mM) erhalten wir lediglich ein K^+ -Diffusionspotential von -97 mV. Wir müssen daher die Existenz eines aktiven Mechanismus fordern, der das Potential über das K^+ -Diffusionspotential auf $\text{R.P.} \approx -170$ mV hebt. Dieser müßte durch ATP-Entzug außer Kraft gesetzt werden, wenn ATP seine Energieversorgung bestreitet, und das Potential könnte höchstens gleich dem K^+ -Diffusionspotential werden. DNP (2-4-Dinitrophenol) entkoppelt die oxydative Phosphorylierung. Bei Zugabe von 10^{-3} M DNP in AM fällt das hohe R.P. tatsächlich um 75 ± 13 mV auf einen mittleren Betrag von etwa -95 mV, der als K^+ -Diffusionspotential möglich ist. Im Licht (Photophosphorylierung?) kann die Spannung wieder auf R.P.

steigen, fällt aber im Dunkeln sofort wieder auf den niedrigen Wert ab. Wird DNP ausgewaschen, steigt die Spannung auch im Dunkeln wieder von RP' auf RP. Die Spannung DNP-vergifteter Zellen zeigt keine Abhängigkeit mehr von der Elektrolytverdünnung.

Einfluß mehrerer Faktoren auf RP. Das Potential von Zellen, das durch niedrige Temperatur auf RP' gelegt wurde, kann durch starkes Weißlicht wieder auf RP gehoben werden. Von RP' aus haben Veränderungen von $[K^+]_a$ etwa dieselbe Wirkung wie von RP aus. Verdreifachung von $[K^+]_a$ ergibt eine Positivierung um 14 ± 6 mV, Verzehnfachung 32 ± 9 mV und Verdünnung keine signifikante Veränderung. — Sämtliche 6 Zellen, die Temperaturen unter 10°C und 10^{-4} M DNP gleichzeitig ausgesetzt wurden, zeigten nach einigen Minuten irreversibel das Potential 0. — 10^{-5} M 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethylharnstoff (DCMU) hatte keinen Einfluß auf RP, auch nicht auf die Lichtabhängigkeit von RP.

2. Strom-Spannungs-Charakteristik

Widerstand. Wenn RP durch Voltage-clamp um kleine Beträge ΔU geändert wird, stellt sich nach einem anfänglichen Spitzenstrom ΔI_0 in etlichen Sekunden eine konstante Stromänderung ΔI_∞ ein (vgl. Abb. 6). Hieraus können wir $R_0 = \Delta U / \Delta I_0$ und $R_\infty = \Delta U / \Delta I_\infty$ ermitteln. Messungen an 30 verschiedenen Zellen ergaben ein mittleres R_∞ von 4 ± 1 k Ω . Da eine *A. crenulata*-Zelle ungefähr 1 cm^2 Oberfläche hat, können unsere Ergebnisse in der üblichen Weise auf cm^2 bezogen verstanden werden. Übereinstimmung hiermit ergaben Current-clamp-Experimente (vgl. Abb. 7): Auf einen Stromimpuls ΔI springt die Spannung zunächst um ΔU_0 und stellt sich in etlichen Sekunden um ΔU_∞ verändert auf einen neuen Wert ein. Der aus 20 Experimenten ermittelte Widerstand $R_\infty = \Delta U_\infty / \Delta I$ war im Mittel etwa $0,5 \text{ k}\Omega$ kleiner als R_∞ aus Voltage-clamp-Experimenten.

Kennlinie bei $T < 10^\circ\text{C}$. Da wir bei $T < 10^\circ\text{C}$ ein passives K^+ -Diffusionssystem vorliegen haben, wollen wir zunächst diesen einfacheren Fall betrachten. Wie schon berichtet (Gradmann und Bentrup, 1970), erhalten wir aus Voltage-clamp-Experimenten bei $T < 10^\circ\text{C}$ für den Gleichgewichtszustand eine einfache Strom-Spannungs-Kennlinie, die aus 2 linearen Ästen (Widerstand für Ausstrom R_a und Widerstand für Einstrom R_e) besteht, die im näheren Bereich um RP' ineinander übergehen. Current-clamp-Experimente führen zu denselben Ergebnissen. Es wurde versucht eine Abhängigkeit der Strom-Spannungs-Kennlinie von $[K^+]_a$ bei $T < 10^\circ\text{C}$ zu finden. Die Reproduzierbarkeit des elektro-physiologischen Verhaltens einzelner Zellen schien durch das Versuchsprogramm stark beeinträchtigt, möglicherweise durch die mangelnde Temperaturkonstanz während des Mediaaustausches. Einige typisch

Tabelle. *Einfluß von $[K^+]_a$ auf RP' und Widerstand für Ein- bzw. Ausstrom. Ergebnisse von 4 Zellen*

RP' = stabiles Potential bei $T < 10^\circ C$; R = Widerstand, ermittelt durch Voltage-clamp; a = für Ausstrom; e = für Einstrom; $K_1 = 10 \text{ mM } K^+$ im AM; $K_3 = 30 \text{ mM } K^+$ im AM; $E = RT/F \ln R_e/R_a$.

Ver- such Nr.	Gemessene Spannung		Widerstand				Errechnete Spannung	
			für Ausstrom		für Einstrom			
	$-RP'_{K_1}$ (mV)	$-RP'_{K_3}$ (mV)	R_{aK_1} (k Ω)	R_{aK_3} (k Ω)	R_{eK_1} (k Ω)	R_{eK_3} (k Ω)	$-E_{K_1}$ (mV)	$-E_{K_3}$ (mV)
1	90	78	1,0	1,0	43	17	90	68
2	82	65	1,1	1,2	25	13	74	57
3	71	56	1,3	1,3	20	9	63	46
4	53	40	0,6	0,6	4,3	1,5	47	22

erscheinende Ergebnisse seien dennoch in der Tabelle wiedergegeben. Die aus R_e und R_a errechnete Spannung $E_e = RT/F \times \ln R_e/R_a$ ist mit in die Tabelle aufgenommen und wird später diskutiert.

Kennlinie bei $25^\circ C$. In dem Strom-Spannungs-Diagramm Abb. 3, sind von 4 verschiedenen Zellen die Ruheströme bei verschiedenen fixierten Potentialen aufgetragen. Dabei zeigt sich, daß im Bereich um -170 mV R kleiner ist als in der Kälte und daß zwischen -140 und -80 mV eine negative Charakteristik auftreten kann. Diese scheint um so ausgeprägter, je höher RP ($I = 0$) liegt, gleichgültig, ob die Höhe von RP der natürlichen Streuung unterliegt oder künstlich durch Licht oder Temperatur variiert wurde. Weiter lesen wir aus dem Diagramm ab, daß belichtete Zellen eine steilere Charakteristik aufweisen als im Dunkeln gehaltene. Das bedeutet, daß der Widerstand durch Beleuchtung erniedrigt wird.

B. Übergangszustände

Soweit es sich nicht um Erregungen zu handeln scheint, soll hier für einige Fälle dargestellt werden, wie während und nach Änderung der Versuchsparameter sich die gemessenen Größen verhalten, bevor sie den Gleichgewichtszustand erreichen.

Temperaturänderung. Während eines Temperaturanstieges von 15 auf $35^\circ C$ innerhalb 20 min treten regelmäßig vorübergehende Depolarisierungen um einige mV auf. Wenn die höhere Temperatur erreicht ist, braucht das RP noch einige Minuten, um sich auf den neuen Wert einzustellen. Fällt die Temperatur wie bei Abb. 2 um etwa $0,5^\circ C/\text{min}$, wird der Verlauf von RP verdeckt durch das regelmäßige Auftreten charakteristischer Depolarisierungen, die wir später als APe näher kennenlernen

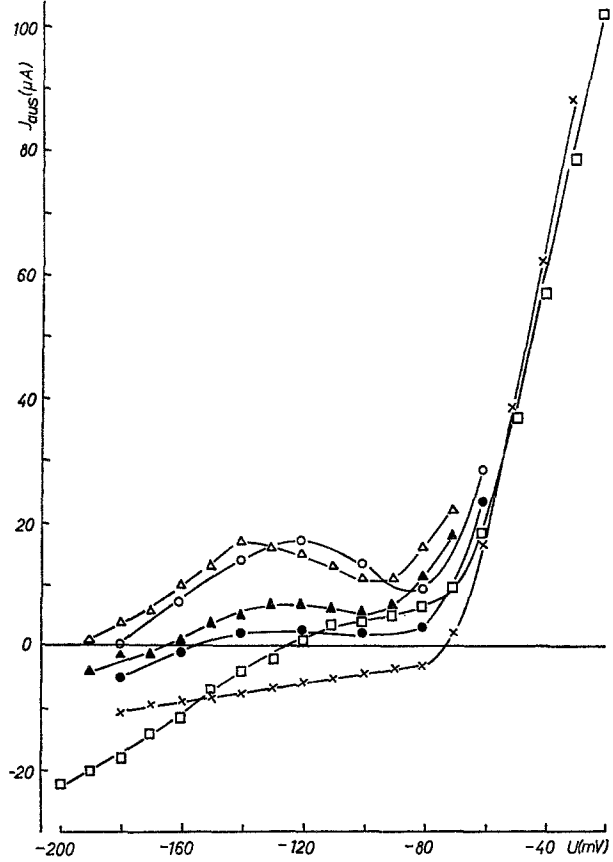


Abb. 3. Strom-Spannungs-Kennlinien im stationären Zustand von 4 Zellen aufgenommen durch Voltage-clamp. X Zelle 1, 7,5°C, $1,5 \times 10^4$ erg/cm² sec; □ Zelle 2, 25°C, $1,5 \times 10^4$ erg/cm² sec; ▲ Zelle 3, 25°C, Dunkel, △ Zelle 3; 25°C, 10^6 erg/cm² sec; ●, ○ Zelle 4, wie Zelle 3

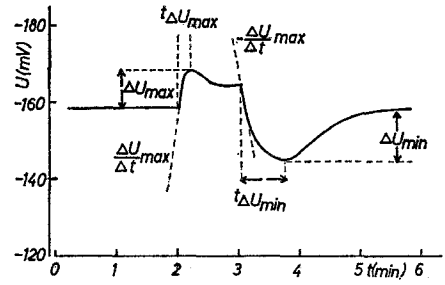


Abb. 4. Einige Größen zur Bestimmung der Wirkung rechteckiger Weißlichtimpulse auf den Spannungsverlauf, eingetragen in ein Beispiel

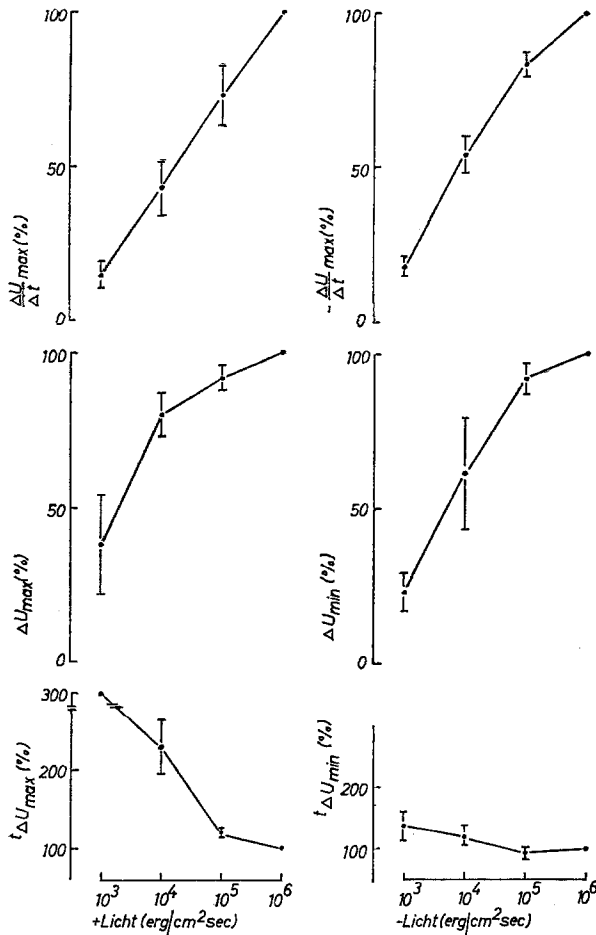


Abb. 5. Abhängigkeit der in Abb. 4 gekennzeichneten Größe von der Intensität der Lichtimpulse; Mittelwerte und Standardabweichung von 10 Zellen, in Prozent bezogen auf die jeweilige Reaktion bei $10^6 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec} = 100\%$

werden. Der Abfall von RP auf RP' bei genügend tiefer Temperatur kann der Depolarisierungsphase eines APs entsprechen. Der Restitutionsprozeß von RP' nach RP findet bei wieder steigender Temperatur erst bei etwa 18°C statt und dauert etwa 20 min (vgl. Abb. 2).

Lichtänderung. Beim Einschalten des Lichts findet nach einer kurz dauernden Depolarisierung (schneller photoelektrischer An-Effekt, vgl. Schilde, 1968) ein Potentialanstieg statt. Bevor das Potential sich auf einen höheren Wert einstellt, durchläuft es in der Regel ein Maximum,

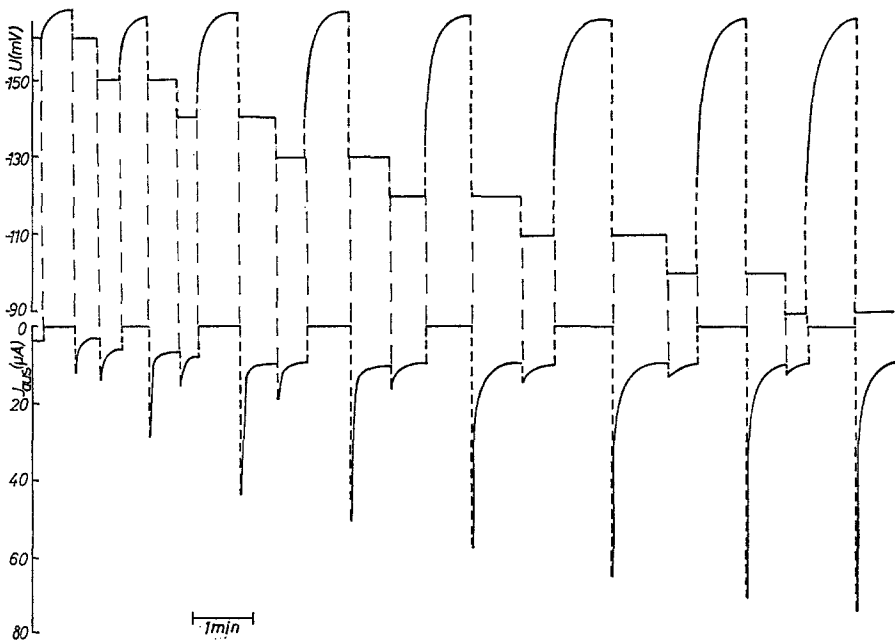


Abb. 6. Spannungs- und Stromverlauf eines Voltage-clamp-Versuchsprogramms an einer nichterregbaren Zelle. Dickgestrichelte Linien: Zeitlich nicht aufgelöste Spannungs- bzw. Stromänderungen. Dünngestrichelte Linien verbinden gleichzeitige Ereignisse

gelegentlich auch noch ein Minimum. Nach dem Abschalten des Lichts verläuft das Potential qualitativ entsprechend mit anderem Vorzeichen oder geht nach hinreichend starker Lichtdosis in ein AP über. Der Spannungsverlauf hängt von der Intensität der Lichtimpulse in folgenden Punkten (vgl. Abb. 4) ab.

Licht an: Der Spannungsanstieg wird steiler, das Spannungsmaximum liegt höher, das Spannungsmaximum erscheint früher.

Licht aus: Der Spannungsabfall wird steiler, das Spannungsminimum liegt tiefer, das Minimum erscheint etwa nach derselben Zeit.

Die quantitativen Ergebnisse von zehn auf diese Punkte hin untersuchten Zellen sind in Abb. 5 zusammengefaßt. Unter Voltage-clamp-Bedingungen sind vergleichbare Qualitäten für den Stromverlauf zu finden.

Lichtimpulse und fallende Temperatur. Je niedriger die Temperatur, desto langsamer und später findet der Potentialanstieg im Licht statt, so daß der schnelle photoelektrische An-Effekt immer deutlicher wird,

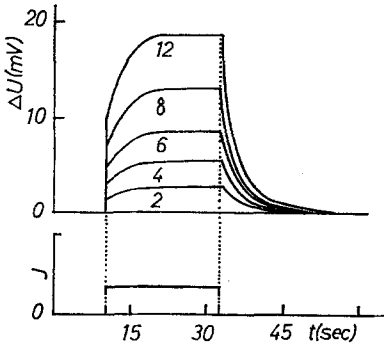


Abb. 7

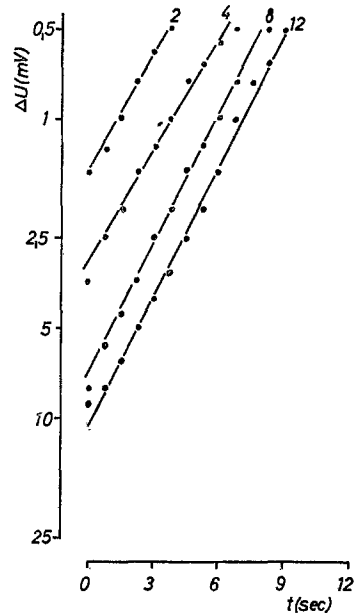


Abb. 8

Abb. 7. Current-clamp-Ergebnisse von einer Zelle. Spannungsänderung ΔU auf rechteckige hyperpolarisierende Stromimpulse verschiedener Intensität (Zahlen an Spannungsverläufen in μA)

Abb. 8. Langsame Spannungsänderung (nach dem Sprung) in der Zeit nach Anfang der hyperpolarisierenden Stromimpulse (Zahlen an den Kurven in μA bedeuten Zuordnung zu verschiedenen Intensitäten) in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Die Meßpunkte sind den Versuchen zu Abb. 7 entnommen; Ablesfehler: $\pm 0,2\text{mV}$

solange die Spannung nicht auf RP' gefallen ist; denn einige mV darunter erreicht diese Reaktion ihre Sättigung. Von RP' aus ist mit Licht nach entsprechend langer Präsentationszeit ein Potentialanstieg auf RP möglich. Wird das Licht vor dem Anstieg auf RP abgebrochen, kann von RP' aus ein vorübergehender, drastischer Potentialanstieg ΔU bis zu 70mV eintreten, der auch von RP aus regelmäßig als kleine Hyperpolarisierung zu beobachten ist. Dies hat Schilde (1968) als schnellen photoelektrischen Aus-Effekt bezeichnet. Bei der Darstellung der Erregungszustände werden wir ausführlicher darauf zurückkommen.

Current- und Voltage-clamp-Experimente. Von den zur Widerstandsbestimmung R_∞ erhaltenen Strom- und Spannungsverläufen auf Voltage- bzw. Current-clamp-Sprünge geben Abb. 6 und Abb. 7 je eine Versuchsreihe wieder. Der langsame Übergang von Strom bzw. Spannung auf den

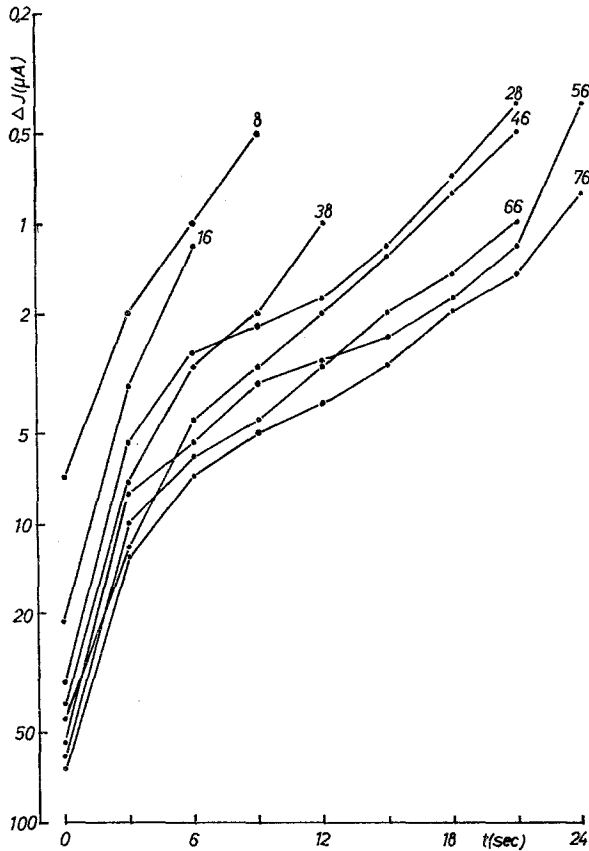


Abb. 9. Langsame Stromänderung (nach dem Sprung) in der Zeit nach depolarisierendem Voltage-clamp-Sprung in logarithmischem Maßstab aufgetragen (Zahlen an den Kurven in mV bedeuten Zuordnung zu verschiedener Depolarisierung). Die Meßpunkte sind den Versuchen zu Abb. 6 entnommen, Ablesefehler: $\pm 0,2 \mu\text{A}$

endgültigen Wert nach anfänglichem Sprung ist in logarithmischem Maßstab in Abb. 8 bzw. Abb. 9 und Abb. 10 übertragen. Hieraus können wir Zeitkonstanten τ ermitteln. $\Delta I/(t)$ läßt sich nicht durch Logarithmieren in eine Gerade überführen. Bei den hyperpolarisierenden Current-clamp-Experimenten zeigt sich eine Konstanz von R_0 , R_∞ und τ . Die an anderer Zelle (nicht erregbar) ermittelten Daten auf Voltage-clamp-Depolarisierung ergeben für R_0 eine geringe und für R_∞ eine starke Zunahme mit der Depolarisierung; „ τ_I “ steigt mit R_∞ und τ_U weist keine deutliche Tendenz auf. Andere Zellen lieferten qualitativ übereinstimmende Ergebnisse.

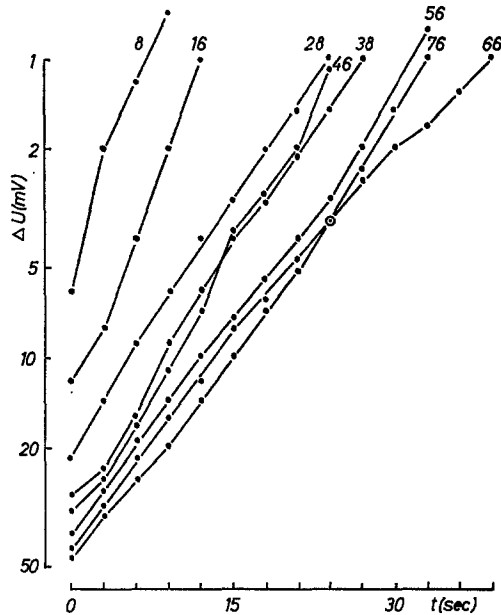


Abb. 10. Langsame Spannungsänderung (nach dem Sprung) in der Zeit nach Voltage-clamp-Ende in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Zahlen an den Kurven in mV bedeuten Zuordnung zu verschiedener Depolarisierung. Die Meßpunkte sind den Versuchen zu Abb. 6 entnommen, Ablesefehler: $\pm 0,2$ mV

C. Erregungszustände

1. Das Aktionspotential (AP)

Der Gesamtverlauf eines APs dauert von 20 sec bis zu mehreren Minuten, wobei die Depolarisierung auf etliche mV unter RP' stets den geringeren Zeitanteil benötigt gegenüber der Repolarisierungsphase. Eine Schulter bei RP' im S-förmigen Verlauf der Repolarisierung auf RP ist typisch. Die Erregbarkeit zu APen schwankt ohne ersichtlichen Grund von Zelle zu Zelle so stark, daß einerseits unter normalen Arbeitsbedingungen spontane Ape auftreten mit einer Frequenz, die von der Höhe der Schwelle und der Refraktärzeit bestimmt sein mag; andererseits konnten bei manchen Zellen überhaupt keine Ape ausgelöst werden. An Zellen, die vor und nach der Untersuchung etwa dieselbe Erregbarkeit zeigten, wurden die charakteristischen Qualitäten des APs durch Variation einiger Versuchsparameter untersucht.

Current-clamp. Depolarisierende Stromimpulse gewisser Intensität und Dauer können Ape nach dem Alles-oder-Nichts-Gesetz auslösen. An einer Zelle wurde die Rheobase zu $4,5 \mu A$ und die Chronaxie zu 27 sec

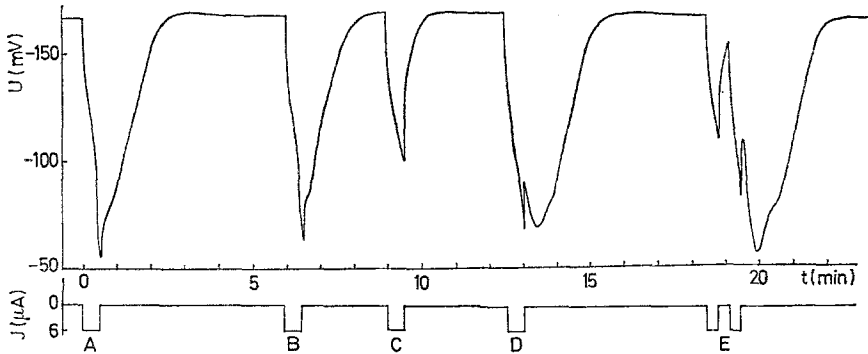


Abb. 11. Alles-oder-Nichts-Charakter, Refraktärzeit und Reizsummierung bei der Auslösbarkeit von APen durch depolarisierende Stromimpulse. Beispiel von einer Zelle. Näheres im Text

bestimmt. Neben diesem für APe typischen Alles-oder-Nichts-Verhalten finden wir auch Refraktärstadien und Reizsummierung. Aus Abb. 11 ersehen wir, daß 6 min nach einem durch $30 \text{ sec} \times 6 \mu\text{A}$ -Reiz (A) hervorgerufenen APe derselbe Reiz wieder auslösend wirkt (B), nicht jedoch schon nach 3 min (C). Das System befindet sich demnach in einem Refraktärstadium. 6 min nach einem weiteren auslösenden Reiz (D) vermuten wir das System im gleichen Zustand wie bei B. Ein schwächerer Reiz E ($20 \text{ sec} \times 6 \mu\text{A}$) löst hier noch kein AP aus. Wenn derselbe unterschwellige Reiz nach 20 sec Pause wiederholt wird (E), summiert er sich mit dem vorangegangenen Reiz offensichtlich zu einem überschwelligen Reiz.

Die Aufzeichnungen in Abb. 11 liefern auch einen Beleg für die Variabilität der Reizschwelle. Bei A und B wirken $6 \mu\text{A}$ so, daß das Abschalten des Stromimpulses nach 30 sec schon wieder in die Repolarisierungsphase fällt. Bei D ist mit $6 \mu\text{A}$ durch langsameren Reaktionsverlauf nach 30 sec der Scheitelwert des APs noch nicht erreicht. Der Stromänderung entsprechend springt die Spannung um einen gewissen Betrag zurück, fällt aber gemäß der Schwellenüberschreitung vollens auf den Scheitelwert des APs, von wo aus die Spannung in gewohnter Weise auf RP ansteigt. Der summierte Reiz bei E liegt offenbar sehr knapp über der Reizschwelle; denn vom Ende des Reizes bis zum Durchzünden der Reaktion finden wir eine Latenzzeit von etwa 5 sec (bei D viel kleiner), während der das Potential nach dem sofort induzierten Spannungssprung noch langsam um weitere 10 mV ansteigt, bevor es in den typischen Verlauf des APs einmündet.

Voltage-clamp. Aktionspotentiale lassen sich erwartungsgemäß auch durch einige Sekunden Depolarisierung mittels Voltage-clamp auslösen.

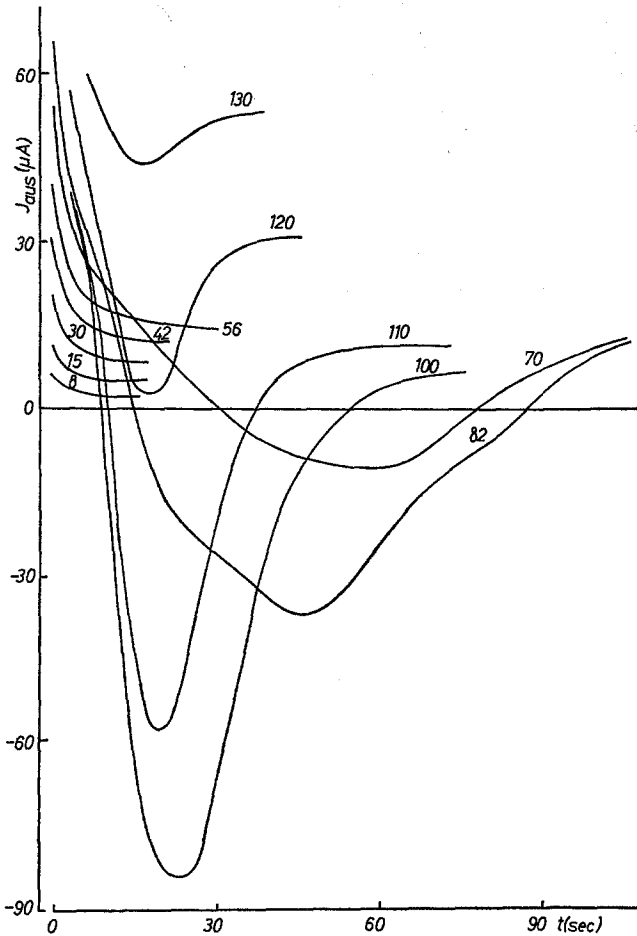


Abb. 12. Stromverläufe auf Voltage-clamp-Sprünge bei einer erregbaren Zelle. Zahlen an den Kurven in mV geben den Betrag der Depolarisierung durch Voltage-clamp-Sprung an

Belassen wir nach den depolarisierenden Voltage-clamp-Sprüngen die Spannung auf dem jeweiligen Betrag und verfolgen den Strom bis dieser sich nicht mehr ändert, bemerken wir bei hinreichender Depolarisierung dem AP entsprechende Aktionsströme (vgl. Abb. 12) AI wie beim Axon oder bei *Nitella*.

Temperatur. Oben haben wir während des Temperaturabfalles APe festgestellt (vgl. Abb. 2). Dabei fällt auf, daß mit sinkender Temperatur die APe länger dauern. Als Maß für die Dauer eines APs wählen wir die

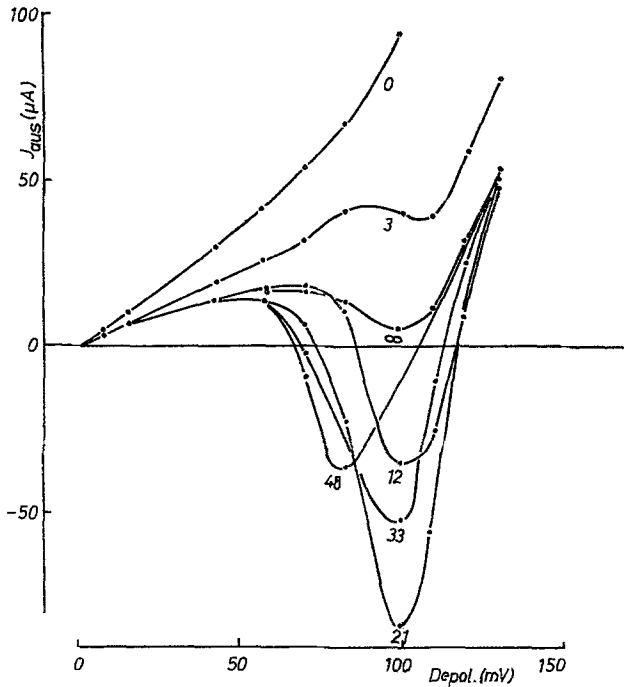


Abb. 13. I - U -Kurven zu verschiedenen Zeiten (Zahlen an den Kurven in sec) nach Voltage-clamp-Sprung; konstruiert aus den Ergebnissen zu Abb. 12

Zeit zwischen den beiden Durchgängen des Potentials durch die halbe Amplitude des APs. Aus den in Abb. 2 dargestellten Versuchen sind in Abb. 14 die Kehrwerte dieser Halbwertsbreiten gegen die Temperatur aufgetragen, wobei sich eine bemerkenswerte Linearität zeigt, ein Ergebnis, das qualitativ auch von anderen Zellen erhalten wurde.

Außenmedium. In sämtlichen benutzten Außenmedien zeigte *A. crenulata* APe, sogar wenn „ausschließlich“ Cholinchlorid angeboten war. Obwohl verschiedene Außenmedien die Stabilität von RP oft entscheidend beeinträchtigen, so daß APe oder ähnliche vorübergehende Depolarisierungen eintraten, lassen die stark divergierenden Ergebnisse noch keine Beziehung zwischen Außenmedium und Form oder Reizschwelle der APe erkennen.

Licht. Die Depolarisierung unter RP, die nach Abschalten des Lichts auftritt und kontinuierlich mit der vorher eingestrahlichten Lichtintensität und -dauer steigt, geht in ein AP über, wenn der vorher zugefügte Reiz einen kritischen Wert übersteigt. Der Auslösemechanismus für APe durch

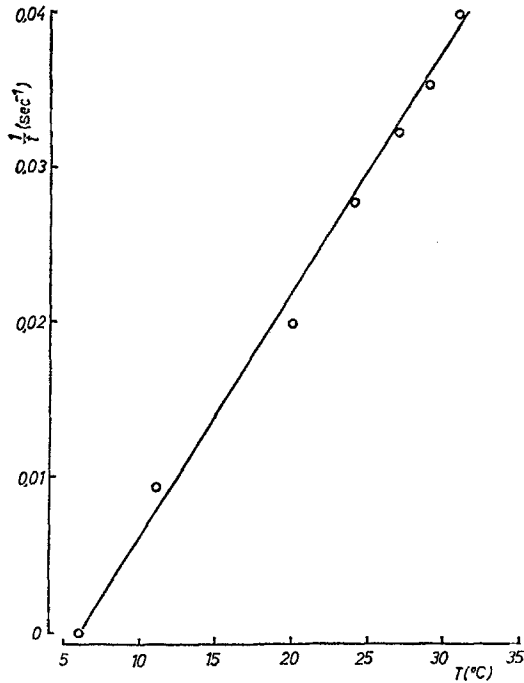


Abb. 14. Dauer von APen aus Abb. 2 als Kehrwert in sec^{-1} aufgetragen gegen die Temperatur, bei der sie stattfanden

Lichtreize verhält sich bezüglich Refraktärzeit und Reizsummierung parallel zu den Ergebnissen aus Current-clamp-Experimenten (Staats-examensarbeit Gradmann, unveröffentlicht), Kennzeichen für das AP als Alles-oder-Nichts-Reaktion ist die gleichbleibende Amplitude; dies gilt jedoch nicht für die Aktionsströme (AI), die durch Voltage-clamp-Experimente gewonnen werden. Die Abhängigkeit der Amplituden der AIs von der Dauer und Intensität des vorausgegangenen Lichtimpulses ist an einem Beispiel in Abb. 15 gezeigt.

2. Schneller photoelektrischer Effekt

Die von Schilde (1968) als schneller photoelektrischer Effekt beschriebene, kurzdauernde und grünlicht-empfindliche Depolarisierung auf Lichtblitze trennen wir auf in An- und Aus-Reaktion. Nach unseren Ergebnissen besteht die Licht-an-Reaktion in einer Depolarisierung, die bestehen bleibt (falls nicht der rot-blau-lichtabhängige Potentialanstieg einsetzt). Die Hyperpolarisierung auf Licht-aus (vgl. Abb. 19) ist dagegen vorübergehend und hat damit Erregungscharakter.

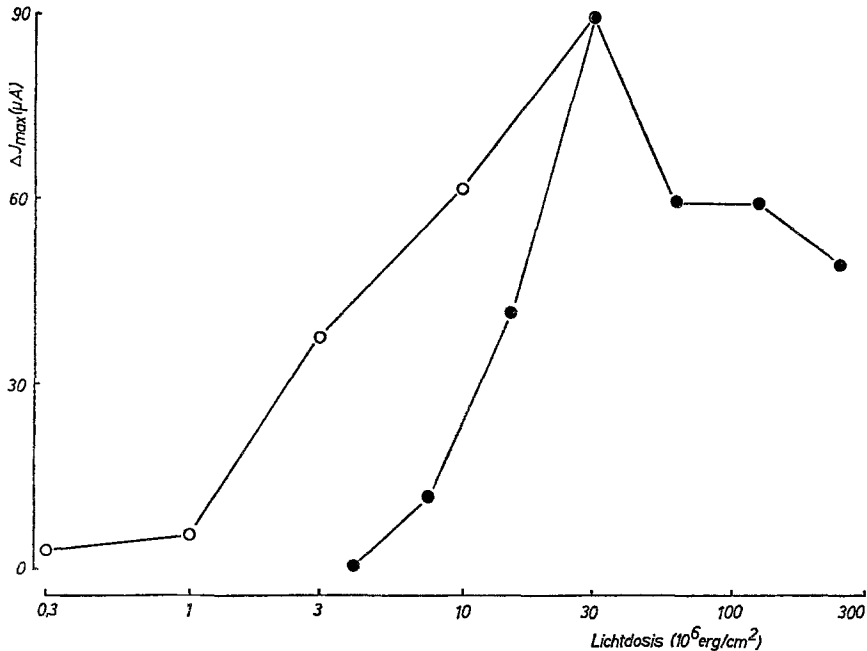


Abb. 15. Amplitude ΔI_{max} der ALe (Differenz zwischen stationärem Strom im Dunkel und den Strommaxima) in Abhängigkeit von der vorangegangenen Lichtdosis, aufgenommen an einer Zelle: $\circ-\circ$ Lichtintensität variiert, Dauer konstant = 30 sec. $\bullet-\bullet$ Dauer variiert, Intensität konstant = $10^6 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$. Voltage-clamp-Spannung konstant = $-120 \text{ mV} \cong \text{ca. } 50 \text{ mV}$ Depolarisierung

3. Reaktion auf Lichtimpulse bei $T < 10^\circ \text{C}$

Von RP' aus findet beim Einsetzen des Lichtimpulses eine geringe Depolarisierung statt in einer Zeit von $< 40 \mu \text{ sec}$ (Schilde, 1968). Dies konnte von unserem Registriergerät nicht mehr aufgelöst werden. Die Licht-aus-Reaktion erscheint in den Aufzeichnungen zunächst ebenfalls als nicht auflösbare schnelle Hyperpolarisierung. Wenn der Reiz jedoch nicht sehr stark war, kann der Spannungsanstieg wie in Abb. 16 oder Ab. 18 gegliedert erscheinen. Zunächst steigt zeitlich nicht auflösbar das Potential auf RP' ; darauf in S-förmigem Verlauf auf ein Maximum, das auf starke Reize schon nach $\frac{1}{2} \text{ sec}$ erreicht wird. Von hier aus fällt die Spannung in 10–300 sec in Richtung auf RP' in konvexem, konkavem oder nahezu linearem Verlauf. Wenn der Abfall bis etwa 5 mV über RP' abgelaufen ist, sinkt das Potential im typischen Fall beschleunigt, bevor es sich asymptotisch RP' nähert. Ein Vergleich zwischen dem Spannungsverlauf auf Ende eines Lichtimpulses in der Kälte (Abb. 16B) und

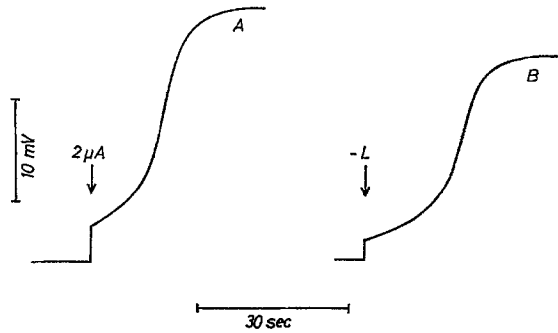


Abb. 16. Vergleich zwischen dem Spannungsverlauf bei 5°C auf A $2\ \mu\text{A}$ hyperpolarisierenden Strom und B Ende von $60\ \text{sec}$ $4 \times 10^6\ \text{erg/cm}^2\ \text{sec}$ Weißlicht

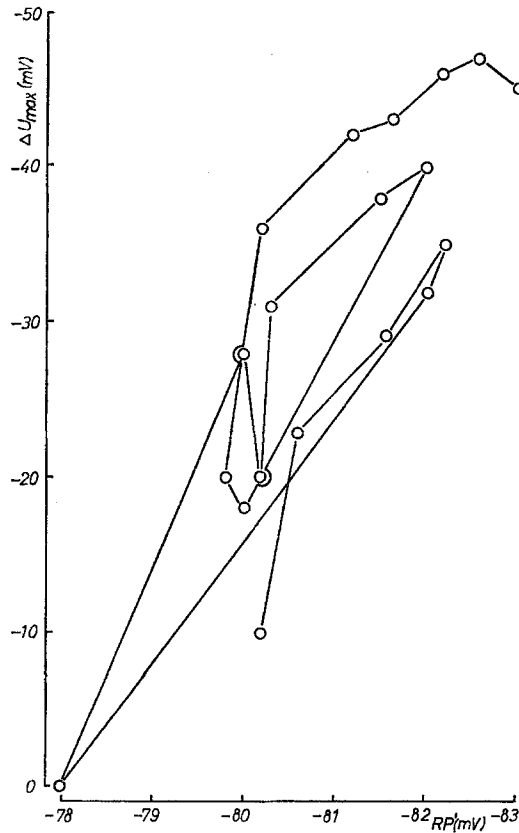


Abb. 17. Spannungsreaktion auf Licht-aus in der Kälte, gemessen als Differenz ΔU_{max} zwischen RP' und dem eintretenden Spannungsgipfel, in Abhängigkeit von RP' vor dem Lichtimpuls (alle $3\ \text{min}\ 20\ \text{sec}$ $10^6\ \text{erg/cm}^2\ \text{sec}$). Linien verbinden Messungen von aufeinanderfolgenden Versuchen an einer Zelle. $T = 5^{\circ}\text{C}$

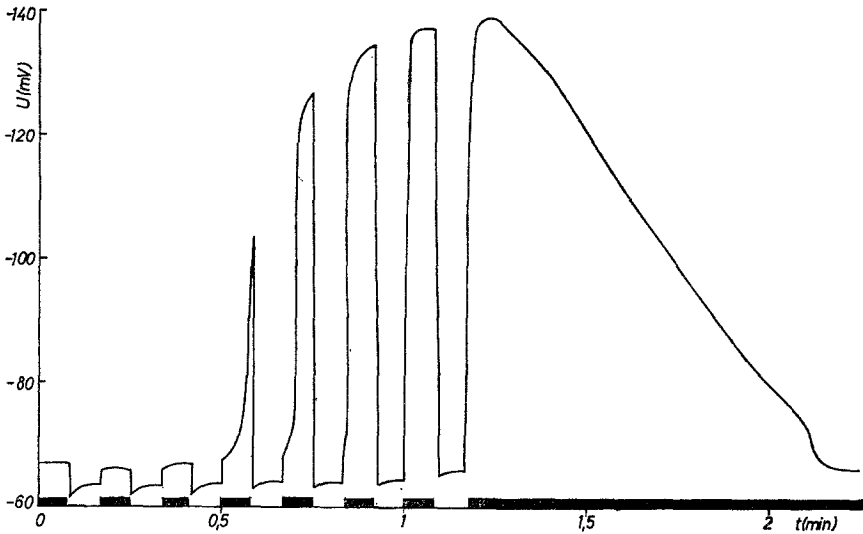


Abb. 18. Beispiel für Spannungsverlauf bei $T < 10^{\circ}\text{C}$ auf intermittierende Beleuchtung (alternierend 5 sec $4 \times 10 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ Weißlicht und 5 sec Dunkel)

dem Spannungsverlauf auf Einsetzen eines hyperpolarisierenden Stroms (Abb. 16A) ebenfalls von RP' aus zeigt qualitative Übereinstimmung.

Es fiel auf, daß auf eine Folge gleicher Lichtimpulse die Reaktion — gemessen als Spannungsdifferenz ΔU_{max} zwischen RP' und dem Spannungsgipfel — unterschiedlich ausfällt. RP' ist kleinen Schwankungen unbekannter Herkunft unterworfen. Ein Vergleich zwischen dem RP' vor dem Lichtimpuls und der Größe des darauf folgenden ΔU_{max} (Abb. 17) zeigt eine deutliche Korrelation: Je höher RP' liegt, desto größer werden Spannungsmaxima nach Lichtimpulsen.

Entsprechend dem Aktionsspektrum des schnellen photoelektrischen Effekts (Schilde, 1968) war in der Kälte mit den zur Verfügung stehenden monochromatischen Lichtenergien auf Blaulicht (450 nm) und Rotlicht (650 nm) überhaupt keine Reaktion festzustellen, weder auf Licht-an, noch auf Licht-aus. Mit Grünlicht (550 nm) dagegen waren beide Reaktionen zu finden. Die Größe der Depolarisierung auf Licht steigt in unserem Arbeitsbereich mit der Intensität. Die Dosis-Effekt-Kurven für die Aus-Reaktion haben typischen S-förmigen Verlauf. Die Ergebnisse von einer Zelle, deren RP' am besten konstant blieb, sind nach unseren Befunden (vgl. Abb. 17) am repräsentativsten.

Lichtimpulse, die allein keine auffallende Aus-Reaktion bewirken, können, wenn sie in hinreichend kurzem Abstand wiederholt werden, zu einer deutlichen Reaktion führen. (Abb. 18). In Übereinstimmung mit anderen Ergebnissen wird die An-Reaktion sehr drastisch, wenn die

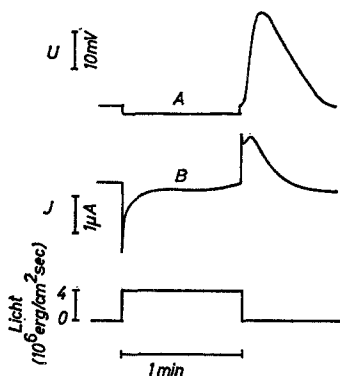


Abb. 19. Gegenüberstellung von Strom- und Spannungsreaktion auf Lichtimpulse bei $T < 10^\circ\text{C}$. *A* freilaufende Spannung; *B* Stromverlauf bei festgehaltener Spannung ($U = \text{RP}'$). Beide Versuche wurden an einer Zelle unmittelbar hintereinander durchgeführt

Spannung vor Lichtbeginn hoch über RP' liegt, was wir bei $T < 10^\circ\text{C}$ in der Folge von Licht-aus-Reaktionen erreichen können.

Halten wir, wie schon berichtet (Gradmann und Bentrup, 1970), durch Voltage-clamp die Spannung auf RP' und verfolgen den Stromverlauf auf starke Lichtimpulse in der Kälte (Abb. 19), so fällt auf, daß die Stromänderung auf Licht-aus relativ klein ist verglichen mit dem drastischen Anstieg der freilaufenden Spannung. Ferner sehen wir aus Abb. 19, daß der Stromanstieg dem Spannungsanstieg vorausgeht. Eine vorläufige Auswertung ergab, daß $\int I dt$ während des Lichts $+$ $\int I dt$ nach Licht-aus ungefähr 0 ergibt.

Die Stromänderung auf Lichtimpulse hängt wiederum von der eingestellten Spannung ab. Wenn wir als Maß für die Stromänderung ΔI auf Licht-an bzw. -aus die Differenz zwischen der Stromstärke vor der Lichtänderung und dem Strommaximum bzw. -minimum wählen, erhalten wir für ΔI bei -140 mV etwa 5mal größere Werte als bei -70 mV.

Diskussion

A. Gleichgewichts- und Übergangszustände

1. Ruhepotential

Wenn wir *A. crenulata* mit gut untersuchten Objekten der Elektrophysiologie vergleichen wollen, empfiehlt es sich, ihr elektrophysiologisches Verhalten auf der Basis der Goldmanschen Gleichung

$$E = - \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{Na}^+} [\text{Na}^+]_i + P_{\text{K}^+} [\text{K}^+]_i + P_{\text{Cl}^-} [\text{Cl}^-]_a}{P_{\text{Na}^+} [\text{Na}^+]_a + P_{\text{K}^+} [\text{K}^+]_a + P_{\text{Cl}^-} [\text{Cl}^-]_i}$$

zu betrachten. Nehmen wir zunächst ihre Gültigkeit an, dann bedeutet die Unabhängigkeit des RP's von Konzentrationsänderungen der im künstlichen Seewasser enthaltenen Kationen außer K^+ , daß gegenüber der Permeabilität von K^+ die Permeabilität der anderen Kationen vernachlässigt werden darf. Berücksichtigen wir ferner die bevorzugte Kationenpermeabilität von Biomembranen gegenüber der Permeabilität für Anionen, vereinfacht sich die Goldmansche zur Nernstschen Gleichung.

$$E = - \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_i}{[K^+]_a} .$$

Es überrascht zunächst, daß Ca^{++} -Mangel keine Wirkung auf die Spannung zeigt. *Acetabularia* hat aber in der Zellwand Kalk inkrustiert, so daß ein vorübergehender Ca^{++} -Mangel wegen der Ca^{++} -Reserven nicht in Erscheinung tritt.

Wie wir gesehen haben (vgl. S. 328), ist aber RP mit -170 mV als reines K^+ -Diffusionspotential unmöglich, wohl aber RP' mit etwa -70 mV. Liegt der für das Zustandekommen des hohen RP geforderte aktive elektrogene Transport wie im Modell Abb. 21 parallel zur Kalium-Batterie E_{K^+} , macht sich deren Veränderung (beispielsweise durch Änderung von $[K^+]_a$) an unserem Meßpunkt nicht voll bemerkbar. Daß die Spannungsänderungen auf Änderung der K^+ -Konzentration im Außenmedium nicht quantitativ der Nernstschen Gleichung folgen, mag auch daran liegen, daß ein Mediumaustausch in der Zellwand nie vollständig gelingt.

Die Existenz eines ATP-betriebenen aktiven elektrogenen Transports (System X) erlaubt uns die Versuche mit DNP wie folgt zu interpretieren: Bei Zugabe von DNP sinkt RP auf RP', weil für den Betrieb des Systems X kein ATP aus der oxydativen Phosphorylierung mehr zur Verfügung steht, aus der es normalerweise seine Energie bezieht. Nach einiger Zeit vermag die Zelle im Licht jedoch System X wieder in Betrieb zu setzen mit ATP aus der Photophosphorylierung. Die Spannung steigt dann von RP' auf RP. Wird nun verdunkelt, fällt auch die Photophosphorylierung als Energiequelle fort, so daß die Spannung erneut auf RP' fällt. Wäscht man nun DNP aus, setzt wieder oxydative Phosphorylierung ein, ATP betreibt System X und die Spannung steigt von RP' auf RP auch im Dunkeln.

Aktiver elektrogener Cl⁻-Transport. Ein H^+ -Aus-Transport, wie ihn Kitasato (1968) auf Grund einer Abhängigkeit des RP vom pH im Außenmedium bei *Nitella* diskutiert, kommt für *A. crenulata* nicht in Betracht, da hier RP unabhängig vom pH zwischen 4 und 9 ist. Nur die Konzentrationen von K^+ und Cl^- im Außenmedium scheinen Einfluß auf RP zu haben, so daß wir auch von einer HCO_3^- -Pumpe (vgl. Hope,

1965) absehen können, falls nicht die Kalkinkrusten in der Zellwand den wahren Sachverhalt verschleiern. Durch Vergiften des Systems X fällt auch die Cl^- -Wirksamkeit fort, so daß wir in System X ein Cl^- -Transportsystem annehmen können. Da RP von *A. crenulata* und damit unser Cl^- -Transportsystem X lichtempfindlich ist, denken wir zunächst an den bekannten lichtabhängigen Cl^- -Ein-Transport bei *Nitella* (MacRobbie, 1965). Dieser ist an Photosystem II gekoppelt. Bei *A. crenulata* hat aber DCMU bis zu 10^{-5} M keine Wirkung auf RP und System X scheint somit ATP-betrieben, so daß wir für *A. crenulata* auch jenen Mechanismus ausschließen müssen. Bei *Elodea* fand Jeschke (1967) einen von der Photophosphorylierung abhängigen Cl^- -Ein-Transport; er zeigte aber später (Jeschke, 1970) daß dort die lichtabhängigen Potentialänderungen auf anderem Wege zustandekommen.

Nach den eben genannten Überlegungen schließen wir bei *A. crenulata* auf einen ATP-betriebenen, aktiven, elektrogenen Cl^- -Transport. Ein hypothetisches Modell (System X), aus dem ein Netto-Transport negativer Ladungen in Form von Cl^- und damit eine Erhöhung der Membranspannung resultiert könnte so funktionieren: Cl^- im Außenmedium wird von X gebunden und passiert als Komplex XCl^- die Zellwand. X können wir uns positiv geladen vorstellen. Im Innern der Zelle wird XCl^- durch ATP zu instabilem X^*Cl^- aktiviert, so daß sich Cl^- von X^* trennt. X^* wird von der Membran zu X inaktiviert, das außen wieder zur Cl^- -Aufnahme zur Verfügung steht. Bestimmungen des ATP-Gehalts und der Cl^- -Flüsse wären wichtig.

K⁺-Gleichrichter. Die bei 25°C durch Voltage-clamp aufgenommenen N-förmigen U-I-Kennlinien erscheinen zunächst kompliziert. Bei niedriger Temperatur vereinfachen sich die Verhältnisse durch Ausschaltung des Systems X und wir erhalten relativ einfache Gleichrichterkennlinien. Wie schon mitgeteilt (Gradmann und Bentrup, 1970), ist diese Gleichrichtung so zu deuten, daß bei selektiver K^+ -Permeabilität der Membran ihre Leitfähigkeit proportional zu ihrem K^+ -Gehalt ist, und dieser wiederum ist bei genügend hoher Spannung proportional zu $[\text{K}^+]$ auf der jeweils anodischen Seite der Membran. Danach müßte das Verhältnis $[\text{K}^+]_i/[\text{K}^+]_a$ gleich sein dem Verhältnis g_a/g_e zwischen den Leitfähigkeiten für Ausstrom ($g_a=1/R_a$) und für Einstrom ($g_e=1/R_e$). Danach müßte ein aus R_e und R_a errechnetes $E_r = RT/F \ln R_e/R_a = RT/F \ln [\text{K}^+]_i/[\text{K}^+]_a = \text{RP}'$ sein. Ein Vergleich zwischen dem gemessenen RP' und dem errechneten E_r von Ergebnissen verschiedener Zellen zeigt gute Übereinstimmung (Abb. 20). Nach dieser Vorstellung müßte Erhöhung der K^+ -Konzentration außen nicht nur eine Depolarisierung hervorrufen, sondern auch einen entsprechend verringerten Widerstand für Einstrom. Die Ergebnisse in der Tabelle bestätigen dies.

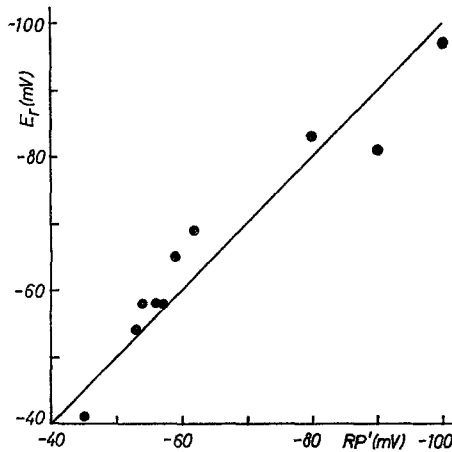


Abb. 20. Korrelation zwischen $E_r = RT/F \times \ln R_o/R_u$ und RP' bei verschiedenen Zellen. Näheres im Text

Negativer Widerstand. Bei 25°C haben wir als Abweichung von der Kennlinie bei $T < 10^\circ\text{C}$ wegen des Ladungstransport-Systems X nicht nur eine höhere Ruhespannung zu erwarten, sondern auch eine erhöhte Leitfähigkeit, in dem Maße wie System X in Tätigkeit ist. Wir können annehmen, künstliche Depolarisierung wirke dem Ladungstransport-System X entgegen. Das besagt, daß bei zunehmender Depolarisierung durch sinkende Leitfähigkeit von X die Kennlinie bei 25°C sich der Kennlinie bei $T < 10^\circ\text{C}$ nähert, wie wir es in unseren Ergebnissen (Abb. 3) bestätigt finden. Die gedachte Strom-Spannungs-Kennlinie von System X würde also mit zunehmender Positivierung gegen die Abszisse fallen, so daß $\frac{dU}{dI} < 0$ wird. Dies bedeutet einen negativen differentiellen Widerstand. Die N-förmige Kennlinie des Gesamtsystems weist einen solchen Bereich negativen Widerstands auf (vgl. Abb. 3). Durch Parallelschaltung des diskutierten K^+ -Systems mit einem negativen Widerstand erhalten wir ein System mit N-förmiger Kennlinie. Die Aktivität des Systems X drückt sich dann nicht nur in der Höhe von RP aus, sondern auch darin, ob in der Kennlinie $\frac{dU}{dI}$ große und über ∞ hinaus negative Werte annimmt. Diese Beziehung zwischen negativem Widerstand und Höhe von RP haben wir in den Ergebnissen tatsächlich gefunden.

Ersatzschaltbild. Wir können die bis jetzt diskutierten Ergebnisse in ein Ersatzschaltbild (Abb. 21) fassen. $E_{\text{K}^+} = RT/F \ln [\text{K}^+]_i/[\text{K}^+]_a$ habe den inneren Widerstand R_{K^+} , wobei $R_{\text{K}^+}_i/R_{\text{K}^+}_a = [\text{K}^+]_i/[\text{K}^+]_a$ ist. Bei niedrigen Temperaturen sei die Phosphorylierung gehemmt, das entspricht

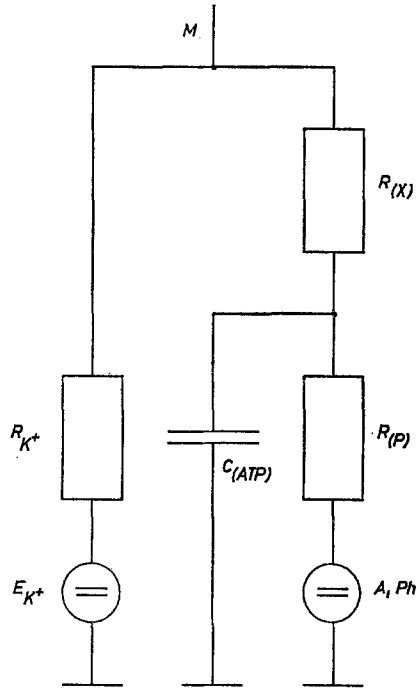


Abb. 21. Ersatzschaltbild zum elektrischen Verhalten von *A. crenulata*. E_{K^+} Kalium-Diffusionspotential; R_{K^+} Widerstand für K^+ -Einstrom $= k[K^+]_o$, für K^+ -Ausstrom $= k[K^+]_i$; $R_{(X)} \triangleq$ Widerstand des Systems X (steigt mit Depolarisierung); $C_{(ATP)} \triangleq$ ATP-Pool; $R_{(P)} \triangleq$ Phosphorylierung (abhängig von Licht und Temperatur); $A, Ph \triangleq$ Atmung und Photosynthese; M Meßpunkt

einem großen Widerstand $R_{(P)}$, so daß der Gleichgewichtszustand in der Kälte nur durch E_{K^+} und R_{K^+} bestimmt ist. Bei 25°C findet Phosphorylierung statt, das bedeutet $R_{(P)}$ wird klein und Atmung bzw. Photosynthese, die mit der Batterie A, Ph zu analogisieren sind, heben über Phosphorylierung ($R_{(P)}$) und das System X ($R_{(X)}$) die Spannung bei dem Meßpunkt M auf R_P . ATP liegt in einem Pool vor, der mit einer Kapazität $C_{(ATP)}$ analog ist.

Da diese Ersatzschaltung auf kleine Voltage- bzw. Current-clamp-Sprünge qualitativ genau wie *A. crenulata* reagiert, können wir nach unseren Ergebnissen bei bekanntem R_{K^+} aus R_0 leicht $R_{(X)}$ ermitteln und bei bekanntem R_{K^+} und $R_{(X)}$ erhalten wir $R_{(P)}$ aus R_∞ . Die Zeitkonstante liefert uns $C_{(ATP)}$, wenn schließlich R_{K^+} , $R_{(X)}$ und $R_{(P)}$ bekannt sind. Aus bekanntem E_{K^+} , dem gemessenen R_P bei M und den Widerständen läßt sich für Batterie A, Ph eine Spannung bestimmen. Die zur Datierung der Schaltelemente ermittelten Ergebnisse variierten stark

von Zelle zu Zelle. An einem einzelnen Exemplar konnte nie das gesamte Programm durchgeführt werden. Wir können jedoch aus den Ergebnissen von vielen Zellen mutmaßlich eine Datierung des ganzen Systems vornehmen. Die einzelnen Elemente können danach im Ruhezustand beispielsweise folgende Abmessungen bekommen: $E_{K^+} = -70$ mV; $R_{K^+} = 10$ k Ω ; $R_{K^+} = 0,7$ k Ω ; $R_{(X)} = 1,5$ k Ω ; $R_{(P)} = 4$ k Ω ; $C_{ATP} = 1$ mF; $E_{A, Ph} = -225$ mV. Da unser Gesamtsystem jedoch eine nichtlineare Kennlinie haben soll, muß mindestens ein nichtlineares Element enthalten sein. Die Kennlinie von R_{K^+} besteht aus zwei linearen Ästen (vgl. Abb. 3); Photosynthese, Atmung und Phosphorylierung sind nicht im Plasmalemma lokalisiert und daher zunächst unabhängig von der dort herrschenden Spannung, das bedeutet, daß A, Ph und $R_{(P)}$ ebenfalls konstant sind. Dann muß $R_{(X)}$ das nichtlineare Element sein. Wie oben dargelegt, nimmt sein Widerstand mit steigender Depolarisierung zu, beispielsweise von 1,5 k Ω bei RP = -170 mV über ca. 100 k Ω bei einer Voltage-clamp-Spannung um -80 mV bis einige -k Ω bei Spannungen unter RP', wo aber R_{K^+} klein wird, so daß der Gesamtwiderstand im steady-state wieder positive Werte annimmt. Da sich $R_{(X)}$ nach dem Voltage-clamp-Sprung auch in der Zeit ändern muß, bekommen wir für den Stromverlauf im logarithmischen Maßstab (Abb. 9) keine Gerade, wenn nicht mehr C_{ATP} allein den Zeitverlauf bei konstanten Widerständen bestimmt. Die Zeitkonstante $\tau = R \times C$ wird bei konstantem $C_{(ATP)}$ durch $R_{(P)} (R_{(X)} + R_{K^+}) / (R_{(P)} + R_{(X)} + R_{K^+})$ bestimmt, so daß, wie festgestellt, nicht nur $R_{\infty} = R_{K^+} (R_{(X)} + R_{(P)}) / (R_{(X)} + R_{(P)} + R_{K^+})$ mit der Depolarisierung wegen $R_{(X)}$ steigt, sondern auch τ .

Wirkung von Rot- und Blaulicht. Die im Modell summarisch betrachtete oxydative und Photophosphorylierung müssen wir etwas spezifizieren. Viele Autoren diskutierten Wirkungsweisen der Photosynthese auf die Membranspannung grüner Zellen. Slayman (1965) fand bei *Neurospora* eine Abhängigkeit der Membranspannung von der Atmung. Über die Verhältnisse bei *A. crenulata* können wir uns nach den dargelegten Ergebnissen folgendes Bild machen.

Die Rot- und Blaulicht-empfindliche Reaktion der Spannung auf rechteckige Lichtimpulse läßt sich als Überlagerung zweier Vorgänge verstehen, wobei auf Licht der eine Vorgang eine Spannungserhöhung mit schnellerem und der andere eine Spannungserniedrigung mit langsamerem und intensitätsabhängigem Zeitverlauf darstellt. Für Licht aus gilt Entsprechendes umgekehrt. Die Ergebnisse mit DNP besagen, daß das System X sowohl mit Energie aus der oxydativen Phosphorylierung als auch aus der Photophosphorylierung betrieben wird, und daß der Energiefluß aus der einen Quelle den aus der anderen hemmt, möglicherweise derart, daß der erhöhte ADP-Verbrauch durch Licht gesteigerter

Photophosphorylierung einen Mangel an ADP für die oxydative Phosphorylierung und somit deren Hemmung bewirkt. Dann sind die Diagramme in Abb. 5 wie folgt zu interpretieren. $\Delta U/\Delta t_{\max}$ nach Beginn des Lichtimpulses ist nur ein Maß für die induzierte Photophosphorylierung ($\sim \ln I + I_0$, wobei I die eingestrahlte Intensität bedeutet, und I_0 die Gerade in eine Ursprungsgerade überführt.), da die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung erst als Folge einsetzt. ΔU_{\max} und Zeitpunkt $t_{\Delta U_{\max}}$ des folgenden Gipfels resultieren aus der Summe steigender Photophosphorylierung und fallender oxydativer Phosphorylierung, wobei deren im Licht fallende Zeitkonstante ($R_{(P)} \times C_{ATP}$) mit zunehmender Intensität den Gipfel ΔU_{\max} zeitlich vorrücken läßt. Setzt beim Abschalten des Lichts die Photophosphorylierung aus, gibt $-\Delta U/\Delta t_{\max}$ und ΔU_{\min} ein Maß für die stattgefundene Hemmung von oxydativer Phosphorylierung im Licht. Die Konstanz von $t_{\Delta U_{\min}}$ (immer im Dunkeln bestimmt) im Gegensatz zu $t_{\Delta U_{\max}}$ (bei verschiedener Lichtintensität bestimmt) stellt eine Kontrolle zur Lichtabhängigkeit der Zeitkonstanten dar. In unserem Ersatzschaltbild bedeutet gesteigerte Phosphorylierung, daß $R_{(P)}$ sinkt. Daraus resultiert eine Verringerung des Gesamtwiderstandes und eine Erhöhung der Spannung bei M , was durch Belichtung auch bei *A. crenulata* eintritt (vgl. Abb. 3).

2. Das Aktionspotential

Das Aktionspotential von *A. crenulata* stimmt in folgenden typischen Qualitäten mit dem von Nerven- und *Nitellazellen* überein. Vorübergehende Positivierung mit Alles-oder-Nichts-Charakter, Auslösbarkeit durch Depolarisierung mit Voltage- oder Current-clamp, Refraktärstadium, Reizsummierung und der Parallelen in den Aktionsströmen unter Voltage-clamp. Über die Fortleitung des APs liegen noch keine sicheren Ergebnisse vor. Auffallend ist die lange Dauer des Aktionspotentials von *A. crenulata*, wodurch eine zeitliche Analyse des Erregungsvorgangs vielleicht auch in biochemischer Hinsicht erleichtert würde. Daß bei *A. crenulata* Aktionspotentiale in Na^+ -freiem Außenmedium, ja sogar in „reiner“ Cholinchloridlösung unverändert ablaufen, bedeutet, daß während der Depolarisierung kein Einstrom von Kationen wie Na^+ bei Nervenzellen stattfindet, sondern ein Ausstrom von Anionen, wahrscheinlich Cl^- wie bei *Nitella* (Mullins, 1962). Als Ladungsträger für den anschließenden Ausstrom kommt weniger ein K^+ -Ausstrom wie bei Nerven oder *Nitella* in Frage; angesichts des aktiven Cl^- -Transports müssen wir eher einen Einstrom von Cl^- vermuten, zumal die Repolarisierung von RP' aus (bis RP' ist K^+ -Ausfluß wahrscheinlich, da R_{K^+} klein ist für $U < \text{RP}'$) beim Aktionspotential im sigmoiden Verlauf prinzipiell nicht zu unterscheiden ist von anderen Übergängen RP' nach RP , die wir als Cl^- -Transport erklären.

Da die Repolarisierung wesentlich länger dauert als die Depolarisierung, können wir das in Abb. 14 benutzte Maß für die Geschwindigkeit der APe ($1/t$, wobei t die Zeit zwischen den beiden Durchgängen der Spannung durch die halbe Amplitude des APs bedeutet) als Geschwindigkeit der Repolarisierung betrachten. Ihre lineare Temperaturabhängigkeit bedeutet, daß der Repolarisierungsprozeß eine pseudomolekulare Reaktion ist, was auch daraus hervorgeht, daß der langsame Teil der Repolarisierung nach depolarisierendem Voltage-clamp sich durch Logarithmieren gut in eine Gerade überführen läßt (Abb. 10).

Obwohl es noch nicht gelungen ist, die Spannungs- und Zeitabhängigkeit von System X so zu bestimmen, daß unser Ersatzschaltbild bei entsprechender Datierung von $R_{(X)}$ auch die Erregungsphänomene von *A. crenulata* simuliert, können wir uns qualitativ anhand unserer bisherigen Einsichten eine hypothetische Vorstellung vom Funktionsmechanismus des Aktionspotentials bei *A. crenulata* machen. Gelangt die Spannung durch Licht-aus, Current-clamp, Voltage-clamp oder spontan in den Bereich negativen Widerstandes, wo Spannungserniedrigung und Widerstandsvergrößerung sich gegenseitig steigern, fällt die Spannung beschleunigt und der Widerstand von System X kann über ∞ hinaus negative Werte annehmen, so daß die Spannung unter RP' gelangt. Dann setzt gemäß der K^+ -Kennlinie aber ein starker Ausstrom ein, bis die Spannung wieder auf RP' zu liegen kommt, von wo aus das ATP-betriebene System X die Spannung allmählich wieder auf RP hebt. Da die negative Charakteristik der Kennlinie nach Abb. 3 erst bei etwa $2/3$ der Repolarisierung wieder einsetzt, ist zunächst keine Neuerregung möglich.

Die Amplitude der Aktionsströme hängt in derselben Weise vom Grad der Depolarisierung ab, ob sie durch Voltage-clamp-Sprünge oder durch Abschalten des Lichts ausgelöst werden. Die Amplituden der Aktionsströme gehorchen nicht dem Alles-oder-Nichts-Gesetz. Wenn die Aktionsströme durch Abschalten des Lichts ausgelöst werden, steigt ihre Amplitude kontinuierlich mit der vorher eingestrahelten Lichtintensität (Abb. 15). Die Abhängigkeit ihrer Amplitude von der Dauer der vorangegangenen Lichtimpulse (bei konstanter Intensität) (Abb. 15) deckt sich in unserem Beispiel hinsichtlich des Maximums bei 30 sec gut mit dem Spannungsverlauf auf Licht-an, so daß wiederum der Grad der Depolarisierung zum Tragen kommt.

3. Wirkung des Lichts bei $T < 10^\circ C$

Da nach Abb. 19 die Stromänderung bei festgehaltenem RP' auf Licht-aus schneller eintritt als die Potentialänderung bei freilaufender Spannung, und da die Potentialänderung auf kleine hyperpolarisierende Stromimpulse dieselbe Verzögerung aufweist (Abb. 16), schließen wir,

daß die elektrische Primärreaktion auf Licht-aus in einer Stromänderung besteht und die Spannungsreaktion eine Sekundärreaktion darstellt.

Für die Interpretation der schnellen Grünlicht-empfindlichen Spannungsänderungen, die von RP' aus besonders deutlich werden, bietet sich folgende Möglichkeit an. Grünlicht bewirkt über ein noch nicht bestimmtes Pigment (Cytochrom?) im System X einen als Depolarisierung zu verfolgenden Einstrom (Ausstrom von Cl⁻), der reversibel mit dem ATP-Speicher gekoppelt ist. ATP-Synthese durch Inversion von Pumpen ist möglich (Lew et al., 1970). Beim Abschalten des Lichts wird der Speicher über System X entladen und es findet ein Ausstrom statt (Cl⁻-Einstrom), der als Hyperpolarisierung in Erscheinung tritt. Die K⁺-Gleichrichterkennlinie erklärt die Diskrepanz zwischen der kleinen Depolarisierung auf Einstrom und der vergleichsweise großen Hyperpolarisierung auf Ausstrom. Entsprechend der K⁺-Kennlinie, die im Bereich kleiner Hyperpolarisierung in den steileren Ast für Ausstrom übergeht wird auch der Spannungsabfall nach dem Gipfel auf Licht-aus ab einigen mV über RP' steiler.

Intermittierende Beleuchtung zeigt nicht nur in der Summierbarkeit der Reize die Speichereigenschaften unseres Gesamtsystems (Abb. 18), sondern auch bei genügenden Intensitäten die tatsächliche Umkehr des Richtungssinns von System X, so daß selbst von Spannungen aus, die wesentlich über RP' liegen, sofortiger Abfall auf eine Spannung einige mV unter RP' stattfindet. Die Spannungsabhängigkeit des Widerstandes von System X zeigt sich diesmal darin, daß unter Voltage-clamp die Stromamplituden auf Lichtimpulse bei höherer Voltage-clamp-Spannung größer werden entsprechend sinkendem Widerstand. Die auffällige Abhängigkeit der Spannungsreaktion auf Licht-aus von der Höhe des RP' (Abb. 17) scheint ebenfalls erklärbar durch die Spannungsabhängigkeit von System X.

Diese Arbeit wurde durch die großzügige Förderung von Herrn Prof. Dr. E. Bünning über die Deutsche Forschungsgemeinschaft ermöglicht. Herrn Doz. Dr. F. W. Bentrup, Herrn Prof. Dr. D. Varjú und Herrn Dr. U.-P. Hansen danke ich besonders für viele Stunden fruchtbaren Gesprächs. Für die hervorragende Beratung in elektronischen Fragen sei Herrn U. Tietze gedankt. Herrn Dr. K. Zetsche danke ich für die freundliche Überlassung des Materials. Frl. M. Rau sei für technische Assistenz gedankt.

Nachtrag

In einer eben erschienenen Arbeit von Saddler (1970) über die Ionenverhältnisse bei *A. mediterranea* finden wir Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, soweit sie sich mit dieser Arbeit überschneiden. Der K⁺-Gehalt des Protoplasten wurde dort zu 450 ± 50 mM bestimmt (bei uns 500 mM). Es zeigte sich ein auffallend starker Cl⁻-Einstrom, wie für unseren aktiven elektrogenen Transport postuliert. Dort wird ebenfalls ein mittleres Ruhepotential von -170 mV angegeben und dem Cytoplasma zugeschrieben, das die Elektrodenspitze umgibt.

Literatur

- Bentrup, F. W.: Die Morphogenese pflanzlicher Zellen im elektrischen Feld. Z. Pflanzenphysiol. **59**, 309—339 (1968).
- Beth, K.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Lichtes auf die Formbildung von kernhaltigen und kernlosen *Acetabularia*-Zellen. Z. Naturforsch. 8b, **334—342** (1953).
- Briggs, G. E.: Membrane potential differences in *Chara australis*. Proc. roy. Soc. B **58**, 573—577 (1962).
- Goldman, D.: Axon behavior and the structure of its membrane. Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **71**, 799—807 (1967).
- Gradmann, D., Bentrup, F. W.: Light-induced membrane potential changes and rectification in *Acetabularia*. Naturwissenschaften **57**, 46—47 (1970).
- Hämmerling, J.: Zur Lebensweise, Fortpflanzung und Entwicklung verschiedener Dasycladaceen. Arch. Protistenk. **97**, 7—56 (1944).
- Hope, A. B.: Effects of bicarbonate ions on electrical properties. Aust. J. biol. Sci. **18**, 789—801 (1965).
- Jeschke, W. D.: Die cyclische und die nichtcyclische Photophosphorylierung als Energiequellen der lichtabhängigen Chloridaufnahme bei *Elodea*. Planta (Berl.) **73**, 161—174 (1967).
- Lichtabhängige Veränderungen des Membranpotentials bei Blattzellen von *Elodea densa*. Z. Pflanzenphysiol. **62**, 153—172 (1970).
- Kitasato, H.: The influence of H⁺ on the membrane potential and ion fluxes of *Nitella*. J. gen. Physiol. **52**, 60—87 (1968).
- Lew, V. L., Glynn, I. M., Ellory, J. C.: ATP-net synthesis by reversal of Na⁺ pump. Nature (Lond.) **225**, 865—866 (1970).
- MacRobbie, E. A. C.: The nature of coupling between light energy and active ion transport in *Nitella translucens*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **94**, 64—73 (1965).
- Mullins, L. J.: Efflux of chloride ions during action potential of *Nitella*. Nature (Lond.) **196**, 986—987 (1962).
- Nagai, R., Tazawa, M.: Changes in resting potential and ion absorption by light in a single plant cell. Plant a. Cell Physiol. **3**, 323—339 (1962).
- Saddler, H. D. W.: The ionic relations of *Acetabularia mediterranea*. J. exp. Bot. **21**, 345—359 (1970).
- Schilde, C.: Zur Wirkung des Lichtes auf das Ruhepotential der grünen Pflanzenzelle. Planta (Berl.) **71**, 184—188 (1966).
- Schnelle photoelektrische Effekte der Alge *Acetabularia*. Z. Naturforsch. **23b**, 1369—1376 (1968).
- Slayman, C. L.: Electrical properties of *Neurospora crassa*. II. Respiration and the intracellular potential. J. gen. Physiol. **49**, 93—116 (1965).

D. Gradmann
Institut f. Biologie der Universität
D-7400 Tübingen
Auf der Morgenstelle 1