

En sammenligning av responser på kjemiske og mekaniske stimuli hos de to formene av den polymorfe ciliaten *Tetrahymena vorax*

Cand. Scient.-oppgave

Bjarne Hagen

2005

Program for generell fysiologi

Forord

Mange personer har støttet meg underveis i dette hovedfagsarbeidet. Først og fremst vil jeg takke mine veiledere, Olav Sand og Heidi Grønlien, for glimrende veiledning. De har begge vært veldig engasjerte og hjelpsomme i alle fasene av arbeidet. Jeg har lært utrolig mye av dere. Tusen Takk!

Takk til Kjell Fugeli og Trude Haug som begge har vært til stor hjelp underveis. Jeg vil også takke alle medstudenter og venner for oppmuntring og mange trivelige lag.

Oslo, mai 2005

Bjarne Hagen

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	3
1 Innledning	5
1.1 Generelt om ciliater	6
1.1.1 Ciliaters anatomi og fysiologi	6
1.2 Ciliaters elektrofysiologi	8
1.2.1 Passive elektrofysiologiske egenskaper.....	8
1.2.2 Aktive elektrofysiologiske egenskaper.....	9
1.2.3 Membranrektifisering	10
1.2.4 Membranpotensialet styrer cilieaktiviteten	11
1.2.5 Kontroll av ciliebevegelser	12
1.3 Tetrahymena`s anatomi og fysiologi	14
1.3.1 Mekanismer for næringsopptak og fordøyelse	14
1.3.2 Den polymorfe ciliaten <i>Tetrahymena vorax</i>	15
1.3.3 Transformering hos <i>T. vorax</i>	16
1.4 Kjemorepsjon hos ciliater	17
1.5 Bakgrunn for oppgaven	20
1.6 Problemstilling	22
2 Materialer og metoder	23
2.1 Forsøksdyrene	23
2.1.1 Dyrking av <i>T. vorax</i>	23
2.1.2 Overføring av ciliater til registreringsløsning	25
2.1.3 Induksjon av transformering.....	25
2.2 Metode for atferdsforsøk	26
2.2.1 Overføring til forsøkskammeret	26
2.2.2 Stimulering	27
2.2.3 Snuffrekvens og svømmehastighet	28
2.2.4 Testløsninger	28
2.2.5 Statistikk	29
2.3 Elektrofysiologisk metode	29
2.3.1 Immobilisering av ciliatene	29
2.3.2 Elektrofysiologisk registrering	30
2.3.3 Stimulering	31
2.3.4 Bestemmelse av hvilemembranpotensialet.....	33

3 Resultater	34
3.1 Kjemoresponser hos mikrostrom og makrostrom <i>T. vorax</i>	34
3.1.1 Atferdsresponser på L-cystein	34
3.1.2 Atferdsresponser på et filtrat av <i>T. thermophila</i> -kultur	37
3.1.3 Snufrekvens og svømmehastighet hos <i>T. vorax</i>	39
3.2 Elektrofysiologiske membranresponser på elektriske, kjemiske og mekaniske stimuli hos <i>T. vorax</i>	41
3.2.1 Responser på elektrisk stimulering	41
3.2.2 Elektrofysiologiske membranresponser på stimulering med L-cystein og <i>T. thermophila</i> -filtrat hos <i>T. vorax</i>	42
3.2.3 Elektrofysiologiske membranresponser på celle-celle kontakt	45
3.2.4 Membranresponser på mekanisk stimulering med glassnål	46
4 Diskusjon	49
4.1 Kjemoresponser hos mikrostrom og makrostrom <i>T. vorax</i>	49
4.1.1 Atferdsresponser på L-cystein	49
4.1.2 Atferdsresponser på et filtrat av <i>T. thermophila</i> -kultur	50
4.1.3 Snufrekvens og svømmehastighet hos <i>T. vorax</i>	50
4.1.4 Elektrofysiologiske membranresponser på stimulering med L-cystein og <i>T. thermophila</i> -filtrat hos <i>T. vorax</i>	53
4.2 Mekanisk stimulering av <i>T. vorax</i>	54
4.3 Konklusjon	56
Referanser	57

Sammendrag

De to formene av den polymorfe ciliaten *Tetrahymena vorax* er svært ulike med hensyn på morfologi, atferd og næringspreferanser. Den mikrostome formen lever av blant annet bakterier og råtnende biologisk materiale som taes opp ved en uspesifikk pinocytose. Den makrostome formen er et rovdyr, og lever av mindre ciliater som for eksempel *Tetrahymena thermophila*. Byttedyrene taes opp ved en selektiv og spesifikk fagocytose, og transformeringen fra mikrostom til makrostom form induseres av en kompleks forbindelse kalt stomatin som skilles ut av byttedyrene.

I dette hovedfagsarbeidet ble kjemoresponsen på L-cystein, et filtrat av *T. thermophila*-kultur og et filtrat av *T. vorax*-kultur sammenlignet for de to formene av *T. vorax*. Både den mikrostome og den makrostome formen ble tiltrukket av L-cystein og *T. thermophila*-filtratet, mens ingen av formene ble tiltrukket av *T. vorax*-filtratet. Det tyder på at makrostome celler er i stand til å selektere byttedyr ved hjelp av kjemoresepsjon.

Bevegelsesmønsteret til ciliater henger nøye sammen med membranpotensialet siden cilienes slagfrekvens og slagretning styres av ionestrømmer over membranen. Hos noen ciliatarter styres kjemokinese av endringer i membranpotensialet. Verken påsprøyting av byttedyrfiltratet eller L-cystein induerte elektrofysiologiske membranresponser hos den mikrostome formen. Det er ser derfor ikke ut til at kjemokinese hos *T. vorax* styres av ionestrømmer over membranen. Hos den makrostome formen induerte påsprøyting av registreringsløsning og byttedyrfiltratet på cellens forpart elektrofysiologiske membranresponser som enten skyldes mekanosensitivitet eller både mekanosensitivitet og kjemosensitivitet. Påsprøyting av byttedyrfiltratet og L-cystein på bakenden av makrostome celler induerte ingen membranresponser.

Siden påsprøyting foran på makrostome celler induerte membranresponser som kunne skyldes mekanoresepsjon, og siden påsprøyting foran på mikrostome celler ikke induerte slike responser, var det interessant å sammenligne de to formenes mekanosensitive egenskaper. Mekanisk stimulering i munnregionen på makrostome celler induerte en depolarisering, mens ingen membranresponser ble induert hos mikrostome celler uansett hvor på overflaten cellen ble stimulert. Dette kan tyde på at det under

transformeringen fra mikrostrom til makrostrom form kommer til uttrykk nye mekanosensitive kanaler i munnregionen.

Den makrostome formen av *T. vorax* depolariserte når munnapparatet kom i fysisk kontakt med mikro- eller makrostrom *T. vorax*- og *T. thermophila*-celler. Det var ingen klar forskjell i depolariseringen utløst av de ulike celletypene, og disse responsene gir derfor ikke grunnlag for seleksjon av byttedyr. Det er uklart om den elektrofysiologiske responsen på celleberøring er en ren mekanorespons, eller om aktivering av kjemoreseptorer også bidrar.

1 Innledning

Både encellede organismer og de enkelte spesialiserte cellene i flercellede organismer kommuniserer med omgivelsene via kjemiske signaler. For noen celler er ikke bare sansing av kjemiske stimuli, men også bevegelse mot eller bort fra kilden for det kjemiske signalet en nødvendig egenskap. En slik rettet bevegelse i en kjemisk gradient, kjemokinese, har vært studert for blant annet bakterier, ciliater og leukocytter.

Til tross for ciliaters tilsynelatende enkle livsform har mange arter meget komplisert atferd, for eksempel i forbindelse med næringsopptak. Ciliater kan på mange måter betraktes som frittlevende sanseceller der sansing av stimuli, behandling av informasjon og endring i motorikk ivaretas i én og samme celle. Ciliebevegelsen hos ciliater styres av ionestrømmer over membranen, og bevegelsesmønsteret til cellene henger derfor nøye sammen med membranpotensialet. En depolarisering fører til reversering av cilienes slagretning, mens en hyperpolarisering fører til at cilienes slagfrekvens øker. Dette danner grunnlaget for å forstå mekanismene bak ciliaters atferd, og gjør ciliater til gunstige modellorganismer for kjemokinesestudier.

Den polymorfe ciliaten *Tetrahymena vorax* kan eksistere i to ulike former, en mikrostom og en makrostom (Williams, 1961). Ved transformasjon fra den mikrostome- til den makrostome formen endres cellens form og størrelse radikalt. Spesielt munnapparatet blir mye større etter transformasjonen. I tillegg til ulik morfologi er disse to formene også svært forskjellige med hensyn på næring. Den mikrostome formen lever blant annet av bakterier og partikler av råtnende biologisk materiale som taes opp i cellen ved uspesifikk fagocytose (pinocytose). Den makrostome formen er en rovform som blant annet lever av mindre ciliater, for eksempel *Tetrahymena thermophila*, som taes opp ved en selektiv og spesifikk fagocytose (Grønlien *et al.*, 2002).

I dette hovedfagsarbeidet har jeg sammenlignet atferds- og membranresponser på kjemiske og mekaniske stimuli hos den mikrostome og makrostome formen av *T. vorax*.

1.1 Generelt om ciliater

Det er beskrevet over 8000 arter av ciliater. Felles for dem alle er at celleoverflaten er dekket av cilier i minst ett av stadiene i livssyklusen. De fleste ciliater benytter ciliene til både fødeopptak og bevegelse, men hos enkelte arter blir ciliene kun brukt som fødeorganeller. Et annet fellestrekk er at de er heterotrofe. Det er stor variasjon mellom artene i måten de tar opp næring på og føden de foretrekker. Hos noen polymorfe ciliater kan dette til og med variere innenfor en og samme art. Ciliater regnes for å være de mest spesialiserte og kompliserte av protozoene, og viser stor artsdiversitet i blant annet morfologi, fysiologi, utbredelse og levested. Dyrenes størrelse kan variere fra 10 μm , litt større enn en rød blodcelle hos menneske, til 4,5 mm. De fleste er frittlevende, og finnes i et stort utvalg av habitater som for eksempel havvann, brakkvann, innsjøer, elver, sølepytter, gjørme, og kloakk. Det finnes til og med ciliater som har spesialisert seg til å leve i den tynne vannfilmen som omgir jord- og sandpartikler. Det er også beskrevet mange symbiotiske arter, med både vertebrater og invertebrater som verter. Få av disse er rene parasitter, og bare én art er parasittisk på mennesket.

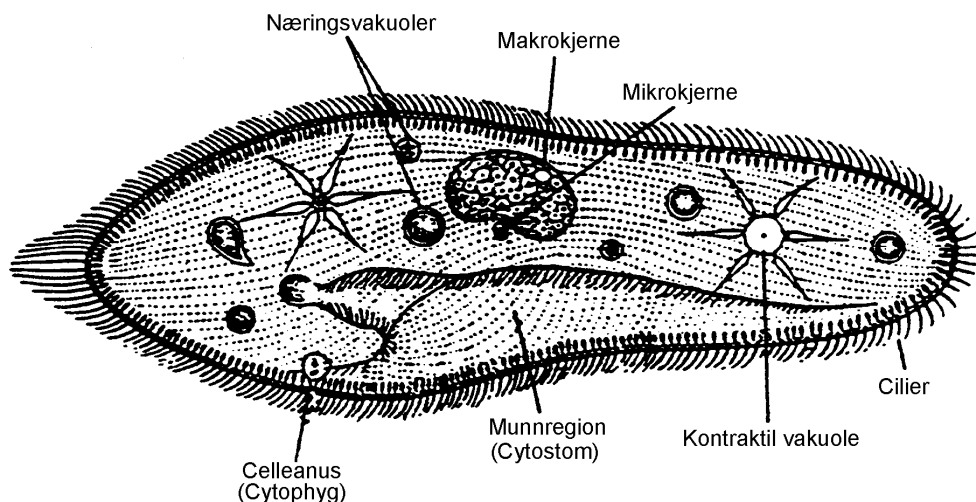
1.1.1 Ciliaters anatomi og fysiologi

Paramecium er den ciliatslekten som er best beskrevet i litteraturen. Den følgende generelle beskrivelsen av ciliatenes anatomi og fysiologi er i hovedsak basert på studier av denne slekten (Figur 1.1).

Det ytre laget av en ciliat kalles cortex og er med på å gi hver art sin karakteristiske form. En skisse av cortexstrukturen til en generalisert ciliat er vist på figur 1.2 A. Bare de viktigste av de elementene som er angitt på figuren, blir diskutert i det følgende. Det corticale laget er ca 1-4 μm tykt og består av to hovedkomponenter: 1) pellikulaen og 2) infraciliaturen, som er cilienes rotstruktur. Cellemembranen, som også omslutter ciliene, utgjør sammen med alveoli og ciliene de viktigste bestanddelene av pellikulaen. Alveoli er avflatede vesikler (alveoler) lokalisert like under plasmamembranen (Allen, 1971), og de er arrangert i et mosaikkliknende mønster unikt for hver art. Hos enkelte slekter inneholder vesiklene proteinplater (*Euplates*) eller kalsiumkarbonatplater (*Coleps*) som er med på å stabilisere cortex (Hausmann & Hülsmann, 2003). Alveolene spiller en viktig rolle i reguleringen av kalsiumnivået like under somamembranen. Alveolemembranen inneholder

Innledning

en Ca^{2+} -ATPase som pumper Ca^{2+} inn i alveolene når den cytosoliske konsentrasjonen av Ca^{2+} overskrider $1 \cdot 10^{-6}$ M (Stelly *et al.*, 1991). Et langsgående belte med mikrotubuli og et proteinlag (epiplasma) under alveolene regnes også med til pellicula. Begge komponentene hjelper til med å stabilisere membranen og er sannsynligvis viktige for cellens bestemte form.



Figur 1.1: Skisse av en ciliat av slekten *Paramecium*. Overflaten er ciliert. Ciliene står for bevegelse og generering av vannstrømmer inn mot munnregionen. Ciliaten har to kjerner, en makrokjerne som står for regulering av metabolismen, og en mikrokjerne som inngår i reproduksjon. *T. vorax* har kun makrokjerne. Det kan også eksistere to eller flere kontraktile vakuoler i cytosol.

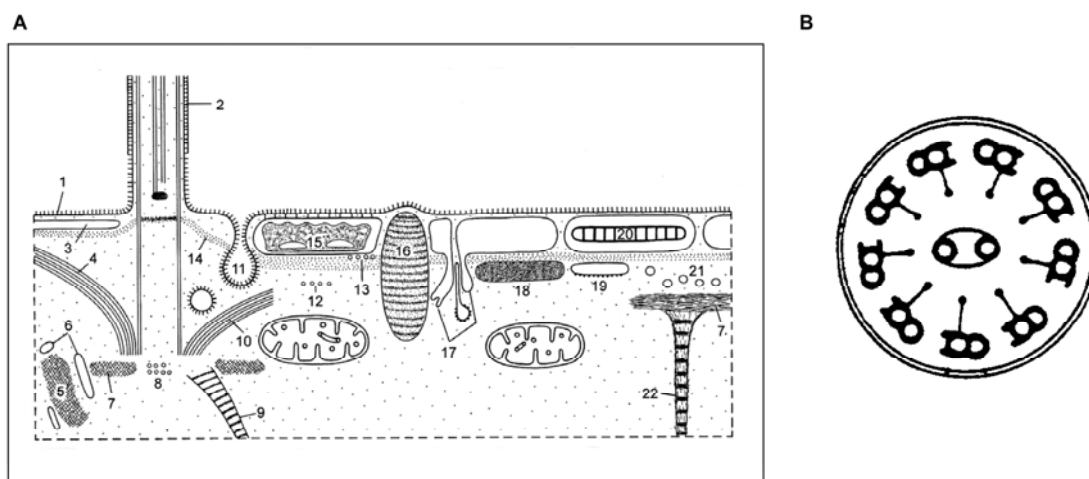
Under pellicula ligger infraciliaturen, som består av mikrotubuli og fibriller knyttet til cilienes basallegemer. Infraciliaturen bevares gjennom hele livssyklusen, selv om ciliatene kan gjennomgå stadier hvor cellene fullstendig mangler cilier.

I likhet med ciliene og flagellene til andre eukaryote celler er et cilium hos en ciliat en sylindrisk utbuktning av cellemembranen som omslutter elleve grupper av mikrotubuli (Figur 1.2 B). Ni av gruppene er perifere mikrotubulidubletter med dynein-ATPase-armer som står i kontakt med et sentralt par av mikrotubuli. Til sammen utgjør mikrotubuli og de assosierte proteinene aksonemet i et cilium. Når dynein-ATPase-armene i ciliat katalyserer hydrolyse av ATP, aktiveres en glidemekanisme mellom mikrotubuli i ciliene. De perifere mikrotubulidublettene er fast forankret nederst i aksonemet, og glidningen mellom dem gir derfor en bøyning av ciliat.

Ciliater har et bestemt sted på cellemembranen hvor mat samles og fagocytoses (cytostom), og et bestemt sted hvor residualmaterialet skilles ut (celleanus) (fig. 1.1). Spesialiserte membraner fører næringspartikler mot munnregionen der det dannes

Innledning

næringsvakuoler. Acidosomer forsurer næringsvakuolene før de fuserer med lysosomer (Fok *et al.*, 1985). I lysosomene brytes næringen ned (Allen, 1974) ved hjelp av hydrolytiske enzymer som har $pH_{optima} \approx 3$ (Hunseler *et al.*, 1988; Banno *et al.*, 1993). Plasmamembranen til ferskvannsciliater inneholder også utførselsporer for kontraktile vakuoler (Nanney, 1980). Ferskvannsciliater osmoregulerer ved hjelp av kontraktile vakuoler.



Figur 1.2: En generalisert representasjon av strukturene i cortex til ciliater. A: 1: Plasmamembran, 2: Perilemma (en membran som ligger utenpå plasmamembranen hos enkelte ciliater), 3: Alveoler, 4: Postciliære mikrotubuli, 5: Myoneme, 6: Endoplasmatisk retikulum, 7: Filamentlag, 8: Subkinetale mikrotubuli, 9: Kinetodesmal fiber, 10: Tverrgående mikrotubuli, 11: Parasomal sekk, 12 og 13: Langsgående mikrotubuli, 14: Epiplasm, 15: Kalsiumkarbonatplater i alveolene, 16: Sekretorisk organelle, 17: Mucocyst, 18: Polysakkaridplater, 19: Ru ER, 20: Proteinplater i alveolene, 21: vesikler, 22: Tverrstripet filamentbånd. B: Tverrsnitt av et cilium med det karakteristiske 9 + 2 mønsteret av mikrotubuli. Modifisert etter Hausmann & Hülsmann (2003).

1.2 Ciliaters elektrofysiologi

1.2.1 Passive elektrofysiologiske egenskaper

Ciliene hos *Paramecium* kan fjernes ved etanolbehandling (Ogura & Takahashi, 1976). Elektrofysiologiske registreringer fra decilierte individer viser at membranens kapasitans blir halvert etter en slik behandling. Hvis ciliene får vokse ut igjen, blir kapasitansen den samme som før decileringen (Dunlap, 1977; Machemer & Ogura, 1979). Siden membrankapasitansen er proporsjonal med membranens areal, viser dette at ciliemembranen utgjør omtrent 50 % av det totale arealet. Membranmotstanden endres derimot ikke ved decilering, noe som tyder på at lekkasjekanalene kun finnes i den

Innledning

somatiske membranen og at ciliemembranen har meget høy motstand (Machemer & Ogura, 1979).

Hvilemembranpotensialet er i standard registreringsløsning omlag -30 mV for både den mikrostome og den makrostome formen av *T. vorax* (Jansen & Sand, 1995). Bidraget fra Na^+/K^+ -pumpen utgjør cirka 10 mV (Connolly & Kerkut, 1984). Etter scanningbilder å dømme har den mikrostome formen av *T. vorax* tilsvarende cilietetthet som *Paramecium* (Berg, 1989), og ciliemembranen utgjør derfor sannsynligvis omtrent 50 % av den totale overflaten. Ciliemembranen hos den makrostome formen utgjør en vesentlig mindre del siden antall cilierader er det samme i de to formene av *T. vorax* (Williams, 1961).

I standard registreringsløsning er membranmotstanden til de mikrostome og makrostome cellene ca 350 M Ω og 200 M Ω , mens membrankapasitansen er henholdsvis ca 100 og 230 pF (Jansen & Sand, 1995).

1.2.2 Aktive elektrofysiologiske egenskaper

Spenningsstyrte ionekanaler hos ciliater er best studert hos slekten *Paramecium*. Naitoh og Eckert (1969) viste at depolariserende strøminjeksjoner i *Paramecium* førte til graderte, regenerative depolariseringer av membranen. De graderte responsene har ingen veldefinert terskelverdi for aktivering, og varierer i amplitude avhengig av stimulusstyrke. Den strøminduserte depolariseringen av membranen aktiverer spenningsavhengige Ca^{2+} -kanaler, og Ca^{2+} strømmer inn i cellen (Naitoh & Kaneko, 1972). Den inngående Ca^{2+} -strømmen depolariserer membranen ytterligere og fører til at flere Ca^{2+} -kanaler åpnes. Den Ca^{2+} -avhengige depolariseringen avsluttes ved at Ca^{2+} -kanalene inaktiveres av den økte konsentrasjonen av Ca^{2+} i cytosol (Brehm & Eckert, 1978), men også som en direkte konsekvens av depolariseringen (Hennessey & Kung, 1985). Den repolariserende fasen av spenningsresponsen skyldes aktivering av spenningsavhengige K^+ -kanaler og Ca^{2+} -avhengige K^+ -kanaler som åpner seg når den intracellulære Ca^{2+} -konsentrasjonen stiger (Satow & Kung, 1980a; Saimi *et al.*, 1983). Den resulterende K^+ -effluksen bidrar til repolarisering og etterhyperpolarisering (Oertel *et al.*, 1977; Satow & Kung, 1980b; Saimi *et al.*, 1983). Denne graderte, regenerative Ca^{2+} -responsen blir kalt en Ca^{2+} -spike. En grunn til at Ca^{2+} -spiken normalt er gradert, og ikke en alt-eller-intet-respons, er den langsomme aktiveringskinetikken til Ca^{2+} -kanalene. Tiden det tar for Ca^{2+} -strømmen å nå sin maksimalverdi er over tre ganger så lang som for Na^+ -strømmer i aksoner (Machemer,

Innledning

1988). Dette gjør det mulig for de spenningsstyrte K^+ -kanalene, som også har en langsom kinetikk, å motvirke depolariseringen.

Det er foreslått at de spenningsstyrte Ca^{2+} -kanalene sitter i membranen som omslutter ciliene. Ved decilierung av ciliatene med etanol forsvinner eksitabiliteten (Ogura & Takahashi, 1976), men kommer tilbake ved recilierung (Dunlap, 1977; Machemer & Ogura, 1979). Dette er en meget hensiktsmessig plassering av kanalene for å sikre en rask og presis kontroll av ciliebevegelsen. Ca^{2+} -kanalene er da plassert nærmest mulig aksonemet, som er målorganet for Ca^{2+} -spiken.

T. vorax genererer også Ca^{2+} -spikes (Berg, 1989; Jansen & Sand, 1995), men hvis Ca^{2+} i registreringsmediet erstattes med Ba^{2+} , dannes det aksjonspotensialer (Berg, 1989; Jansen & Sand, 1995). Ba^{2+} passerer lett gjennom spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler (Hille, 1992), og er i tillegg en velkjent K^+ -kanalblokker (Hille, 1992). Ba^{2+} reduserer den utgående K^+ -strømmen tilstrekkelig til at den inngående Ba^{2+} -strømmen gir en selvforsterkende depolarisering, og det genereres et alt-eller-intet aksjonspotensial når membranen når en bestemt terskelverdi. I 1995 viste Jansen at den maksimale stigeraten til den regenerative responsen hos *T. vorax* sank parallelt med økningen i celleoverflate som fant sted ved transformeringen fra mikrostome til makrostome celler. Dette betyr at antallet spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler må være omtrent det samme hos de to formene av *T. vorax*. Siden antall cilierader er det samme for de to morfologiske formene av *T. vorax* (Williams, 1961), støtter funnet til Jansen og Sand (1995) antagelsene om at Ca^{2+} -kanalene sitter i ciliene. Den inngående Ca^{2+} -strømmen er ikke forskjellig hos mikrostome og makrostome celler (Bruskeland & Sand, 1999). Dette støtter antagelsene om at Ca^{2+} -kanalene sitter i ciliene ytterligere.

Med unntak av et par arter er den graderte responsen felles for alle ciliatarter som har vært undersøkt elektrofysiologisk. Ciliaten *Bursaridium difficile* viser spontane alt-eller-intet aksjonspotensialer i standardisert registreringsmedium (Berg & Sand, 1994), og ciliaten *Stylonychia mytilus* kan stimuleres til å generere alt-eller-intet Ca^{2+} -aksjonspotensialer (dePeyer & Machemer, 1977).

1.2.3 Membranrektifisering

Membranrektifisering er definert som redusert membranmotstand når membranpotensialet avviker fra hvilemembranpotensialet. Ved depolarisering av membranen reduseres som

Innledning

regel membranmotstanden idet spenningsavhengige K^+ -kanaler og Ca^{2+} -aktiverte K^+ -kanaler åpnes. K^+ strømmer da ut av cellen i henhold til sin elektrokjemiske gradient. Dette fenomenet kalles *utgående rektifisering*. Denne utgående strømmen bremser den depolariserende fasen av den regenerative membranresponsen og akselererer den repolariserende fasen. Hyperpolarisering av membranen kan også føre til reduksjon av membranmotstanden på grunn av aktivering av ionekanaler. Dette kalles *inngående rektifisering* og forbindes som regel med kanaler som er permeable for K^+ eller både K^+ og Na^+ . Minst fem inngående strømmer aktiveres hos *Paramecium* ved hyperpolarisering av membranen. To forskjellige inngående K^+ -strømmer er analysert, en spenningsavhengig (Oertel *et al.*, 1978; Preston *et al.*, 1990a) og en Ca^{2+} -avhengig (Richard *et al.*, 1986; Preston *et al.*, 1990b). Det er dessuten beskrevet en Ca^{2+} -avhengig Na^+ -strøm (Saimi, 1986), en Ca^{2+} -avhengig Mg^{2+} -strøm (Preston, 1990) og en hyperpolariserings-avhengig Ca^{2+} -strøm (Saimi, 1986; Hennessey, 1987; Preston & Saimi, 1990).

Selv om membranrektifiseringen involverer åpning av spenningsstyrte ionekanaler, er den ikke en selvforsterkende, regenerativ respons på lignende måte som en Ca^{2+} -spike eller et aksjonspotensial. Åpningen av disse ionekanalene fører ikke til åpning av flere, og responsen kan derfor betraktes som en endring av passive egenskaper som følge av endret membranpotensial.

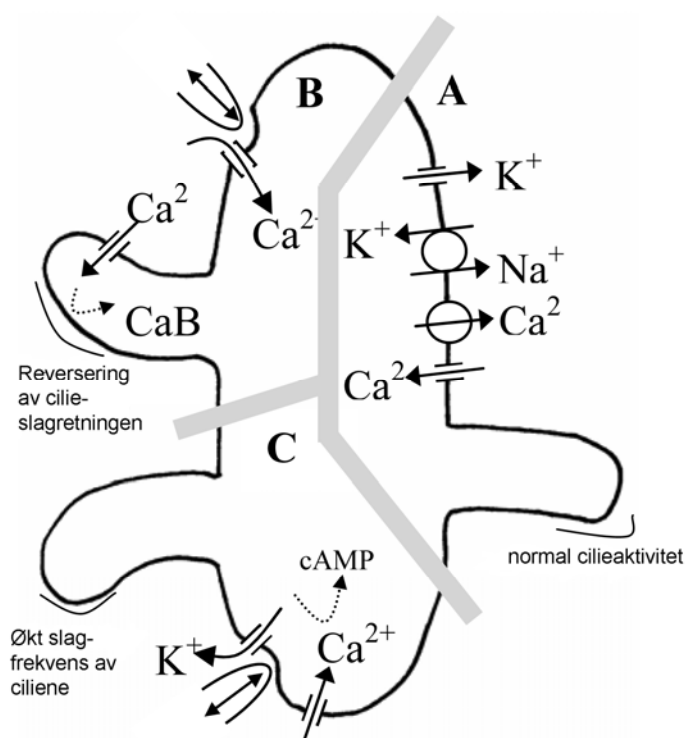
1.2.4 Membranpotensialet styrer cilieaktiviteten

Hos *Paramecium* er forandring av cilienes slagretning og slagfrekvens relatert til endring av membranpotensialet (Eckert, 1972; Machemer, 1974). En depolarisering av membranen fører til at ciliaten rygger, mens en hyperpolarisering er relatert til økt slagfrekvens. Den siste responsen er gradert. Det vil si at jo mer membranen hyperpolariseres, desto fortere svømmer ciliatene.

Ciliatenes svømmeatferd påvirkes av forskjellige ytre stimuli, som for eksempel berøring, lys og ulike kjemiske forbindelser. Mekanisk stimulering av *Paramecium* gir forskjellige responser avhengig av om cellen stimuleres i forenden eller bakenden (Figur 1.3). En unnvikelsesreaksjon observeres når *Parameciums* forende kolliderer med et hinder (Naitoh & Eckert, 1969). Mekanosensitive Ca^{2+} -kanaler åpnes da i forenden, og membranen depolariseres. Ciliene reverserer som følge av depolariseringen, og dyret rygger i en kort periode. Når *Paramecium* stimuleres mekanisk i bakenden, observeres en fluktreaksjon (Naitoh & Eckert, 1969). Ved aktivering av mekanosensitive K^+ -kanaler i

Innledning

membranen hyperpolariserer membran. Dette fører til at cilienes slagfrekvens øker og gir høyere svømmehastighet (Machemer, 1974; Machemer & Eckert, 1975). De mekanosensitive kanalene befinner seg mest sannsynlig i ciliatenes somamembran, siden mekanisk stimulering av decilierte celler også gir reseptorpotensialer (Ogura & Machemer, 1980).



Figur 1.3: Mekanisk stimulering av *Paramecium*. A: Ved hvilemembranpotensialet strømmer Ca²⁺ inn og K⁺ ut gjennom lekkasjekanaler i somamembranen. Konsentrasjonsgradienten opprettholdes av Ca²⁺- og Na⁺/K⁺ pumper, og cellen svømmer fremover med normal hastighet. B: Mekanisk stimulering foran på ciliaten fører til åpning av mekanosensitive Ca²⁺-kanaler i somamembranen, og membranen depolariseres. Som følge av depolariseringen aktiveres spenningsstyrte Ca²⁺-kanaler i ciliene. Ca²⁺ binder seg til aksonemale proteiner (CaBP) som resulterer i at cilienes slagretning reverseres. C: Mekanisk stimulering på bakenden av ciliaten fører til åpning av mekanosensitive K⁺-kanaler i somamembranen. Hyperpolariseringssensitive Ca²⁺-kanaler blir så aktivert, og økt intracellulært Ca²⁺-nivå aktiverer i sin tur adenylyl cyclase som produserer cAMP. Dette ender til slutt med at cilienes slagfrekvens øker. Modifisert etter Machemer & Teunis (1996).

1.2.5 Kontroll av ciliebevegelser

Det er hovedsakelig to mekanismer som styrer ciliebevegelsen hos ciliater. En Mg²⁺-avhengig mekanisme sørger for en kontinuerlig bevegelse av ciliene, mens en Ca²⁺-avhengig mekanisme styrer retningen og frekvensen til cilieslagene (Naitoh, 1974).

Innledning

Endring i permeabiliteten av ulike ioner i cellemembranen, danner grunnlaget for kontroll av ciliebevegelsen. I studier med detergent-permeabiliserte *Paramecium*-celler ble det vist at ciliereverseringen var Ca^{2+} -avhengig (Naitoh & Kaneko, 1972, 1973). I et slikt preparat står aksonemet i direkte kontakt med ioner og metabolitter i mediet, mens ciliene fortsatt fungerer normalt. Ionesammensetningen i cytosol er da den samme som i omgivelsene. I et medium med 10^{-7} M Ca^{2+} , som er den normale konsentrasjonen i cytosol, svømte de detergent-permeabiliserte *Paramecium*-cellene forover. Når Ca^{2+} -konsentrasjonen oversteg 10^{-6} M, reverserte cilieslagretningen og dyret svømte bakover. I den samme undersøkelsen ble det vist at i et medium med ATP og Ca^{2+} , men uten Mg^{2+} , slår ciliene hos detergentbehandlede celler én gang i reversert retning før de peker statistisk fremover. ATPasen som styrer dyneinaktiviteten er Mg^{2+} -avhengig, og bindingen mellom dynein og mikrotubuli kan ikke brytes før ATPasen har bundet til seg et Mg^{2+} -ion (Naitoh & Kaneko, 1972). De aksonemale reseptorene for Ca^{2+} er fremdeles ukjente. Det er mulig at de involverer det Ca^{2+} -bindende proteinet calmodulin (Walter & Schultz, 1981; Chan *et al.*, 1999), eller Ca^{2+} -avhengige enzymer som proteinkinaser (Bonini *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2002) som aktiverer en fosforylerings- og defosforyleringskaskade (Satir, 1998; Kim *et al.*, 2002). Det siste trinnet i en slik kaskade er trolig fosforylering eller defosforylering av den indre dyneinarmen i aksonemet (Satir, 1998). Dette resulterer i at cilieslagretningen reverseres.

Mye tyder på at den indre dyneinarmen i aksonemet også er involvert i Ca^{2+} -avhengig ciliereversering hos *Tetrahymena* (Hennessey *et al.*, 2002). Dette proteinet er fosforylert når dyret svømmer forover, og det defosforyleres ved depolarisering og ciliereversering (Deckman & Pennock, 2004).

Cilieslagretningen kan også moduleres av de sykliske nukleotidene cAMP og cGMP (Bonini & Nelson, 1988). Ved tilføring av cAMP til permeabilisert *Paramecium* svømmer cellene i en høyrevridd heliks, mens svømmemønsteret er venstrevridd for cGMP (Bonini & Nelson, 1988). Økt intracellulær konsentrasjon av cAMP og cGMP fører også til at *Paramecium* svømmer raskere (Nakaoka & Ooi, 1985; Bonini *et al.*, 1986). Under en hyperpolarisering av membranen øker konsentrasjonen av cAMP i cellen (Gustin *et al.*, 1983; Schultz *et al.*, 1984; Bonini *et al.*, 1986), og resulterer i økt slagfrekvens (Pech, 1995). Økningen i ciliens slagfrekvens skyldes indirekte en inngående Ca^{2+} -strøm gjennom hyperpolariseringsaktiverte Ca^{2+} -kanaler som er lokalisert i somamembranen (Preston *et al.*, 1992; Hennessey, 1987). Ca^{2+} -ioner i soma intereagerer ikke med Ca^{2+} -bindene proteiner i ciliet fordi de sannsynligvis er hindret i å strømme inn i ciliet på grunn

av begrenset diffusjon (dePeyer & Machemer, 1978). Økt Ca^{2+} -konsentrasjon i cytosol aktiverer adenylyl cyclase som så produserer cAMP (Hasegawa *et al.*, 1999). Fosforylering av en cAMP avhengig protein kinase (PKA) er et trinn i en fosforylerings- og defosforyleringskaskade som til slutt ender med fosforylering av den ytre dyneinarmen i aksonemet (Satir, 1998). Dette resulterer i at cilienes slagfrekvens øker.

1.3 Tetrahymena`s anatomi og fysiologi

Slekten *Tetrahymena* tilhører klassen Oligohymenofora. Navnet, som betyr fire slør, skyldes at munnregionen består av fire spesialiserte ”membraner” (én undulerende membran og tre membraneller) dannet av tettsittende cilier. Både *Tetrahymena* og *Paramecium* tilhører underklasse Hymenostomata.

Munnregionen hos *Tetrahymena* er lokalisert på siden av dyret nær den ene enden. Dette området defineres som ventralt anterior (Nanney, 1980). Et av hovedkjennetegnene til *Tetrahymena* er at en av meridianene har sitt utspring fra munnregionen (Frankel, 2000). Pellikulaen til *Tetrahymena* inneholder slimdannende sekretoriske vesikler som kalles mucocyster (Cole & Stuart, 1991).

1.3.1 Mekanismer for næringsopptak og fordøyelse

De ulike artene og morfologiske formene av *Tetrahymena* spiser et vidt spekter av næring, fra oppløste eller kolloide næringsemner til større organiske partikler, bakterier og andre protozoer. I alle tilfeller er hovedmekanismen for opptak fagocytose. Acidosomer er ennå ikke påvist hos *Tetrahymena*, men en rekke arbeider viser at forsuring av fagosomene er nødvendig for fusjonering med lysosomene (Weidner & Sibley, 1985). I tillegg til fagocytose i cytostomen, skjer det hos *Tetrahymena* pinocytose på spesifikke steder langs pellikulaen (Nilsson & van Deurs, 1983). Innbuktninger utover hele celleoverflaten (parasomale sekker), er setet for pinocytose. Mange næringsstoffer, som for eksempel glukose, aminosyrer og vitaminer, taes også opp ved passiv diffusjon eller aktiv transport langs hele pellikulaen (Florin-Christensen *et al.*, 1990).

Tetrahymena har en permanent cortikal celleanus lokalisert i bakenden, hvor uttømming (egesjon) av residualmaterialet finner sted. *Tetrahymena* osmoregulerer ved hjelp av kontraktile vakuoler, som kan tømmes i porer i membranen.

1.3.2 Den polymorfe ciliaten *Tetrahymena vorax*

Artsnavnet *vorax* betyr glupsk og kommer av *vorare* (lat.), som betyr å fortære. *T. vorax* har polymorf livssyklus og kan eksistere i to ulike former; mikrostom (liten munn), og makrostom (stor munn). Både i naturlige omgivelser og i laboratoriekulturer eksisterer *T. vorax* normalt i den mikrostome formen (Figur 1.4 A). Ute i naturen livnærer de mikrostome cellene seg på blant annet bakterier og råtnende organisk materiale som taes opp ved uspesifikk (konstitutiv) fagocytose. Dyrkningsmediet tilsettes som regel næring i form av kjøttkstraktet protosepton. Lengden på cellene, som avhenger av mediets sammensetning, kulturens alder og tetthet, varierer mellom 31 og 115 μm . *T. vorax* skiller seg fra de andre artene innen slekten ved at bakenden er trukket ut i en slags hale – mer eller mindre tydelig avhengig av næringsforholdene. Det finnes også en form med avrundet bakende (Corliss, 1953).

I nærvær av blant annet de mindre ciliatene *Tetrahymena pyriformis* og *Tetrahymena thermophila*, transformeres *T. vorax* til den makrostome formen (Figur 1.4 B).

Makrostome individer karakteriseres først og fremst av sin økte størrelse og det enorme munnapparatet. Lengden på cellene kan komme opp i 150 μm . Gjennomsnittlig størrelse er 75 - 110 μm . Den makrostome formen er en rovform som livnærer seg hovedsakelig på de ciliatene som utløser transformasjonen; *T. pyriformis* og *T. thermophila*. De makrostome cellene formerer seg ved vanlig celledeling så lenge byttedyrene er tilstede i mediet.

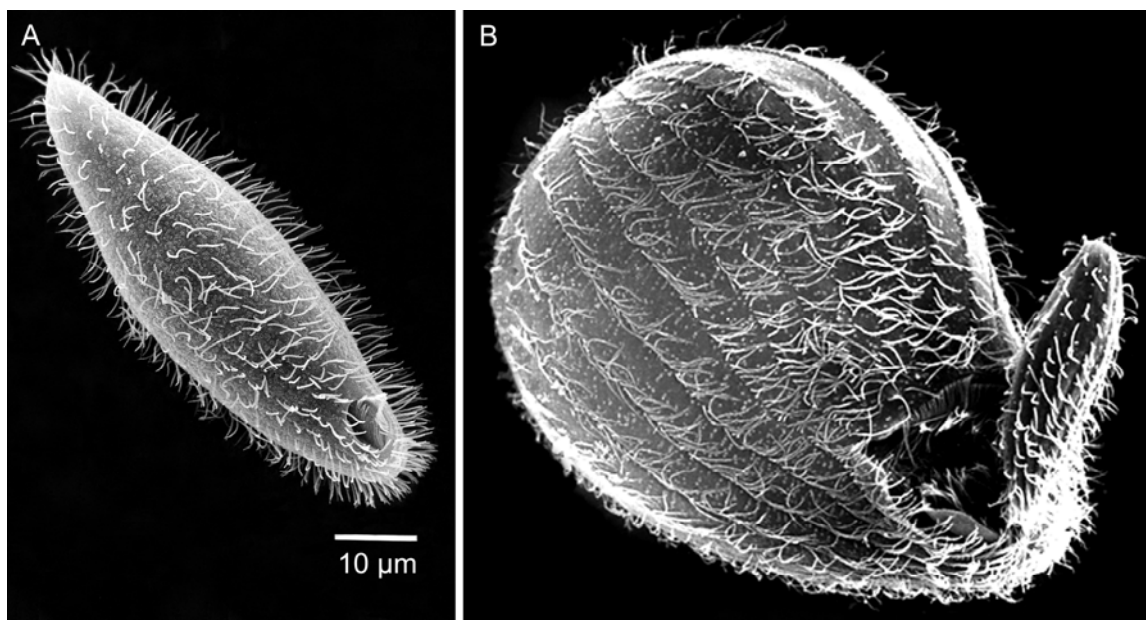
I motsetning til fødeopptaket hos de mikrostome cellene, som er uspesifikt, tar de makrostome cellene opp byttedyrene ved spesifikk og selektiv fagocytose (Grønlien *et al.*, 2002). Både mikrostome- og makrostome celler fanger latexkuler med en diameter på 30 μm . I motsetning til hos mikrostome celler, snøres ikke fagosomet med latexkulen av hos makrostome celler. Dette indikerer at mekanisk stimulering i seg selv ikke trigger fagocytosen hos makrostom *T. vorax* (Grønlien *et al.*, 2002).

Selv om de makrostome cellene også kan fange og fagocyttere små mikrostome celler, foretrekkes *T. thermophila* som byttedyr så lenge disse er tilstede i mediet. Dette tyder på at makrostome *T. vorax*-celler gjenkjenner *T. thermophila* ved fysisk kontakt, eller gjenkjenner et kjemisk signal *T. thermophila* sender ut (Grønlien *et al.*, 2002). I dette hovedfagsarbeidet ble det undersøkt nærmere hva byttedyrseleksjonen hos den makrostome formen skyldes.

Både den mikrostome- og den makrostome formen kan gå over til en cysteform hvis næringstilgangen er dårlig, men dette er ikke noe obligatorisk stadium hos livssyklusen til *T. vorax*. Cystene har en gelatinøs kapsel, og innenfor denne dannes det 2 –

Innledning

4 tomitter. Tomitter er et frittlevende stadium, uten fødeopptak, i noen ciliaters livssyklus. Like etter delingen er disse helt runde, med en diameter på 20 - 30 μm , men de utvikler seg raskt til mikrostome eller makrostome celler når forholdene bedres. Hvilecyste er ikke kjent hos *T. vorax* (Hausmann & Hülsmann, 2003).

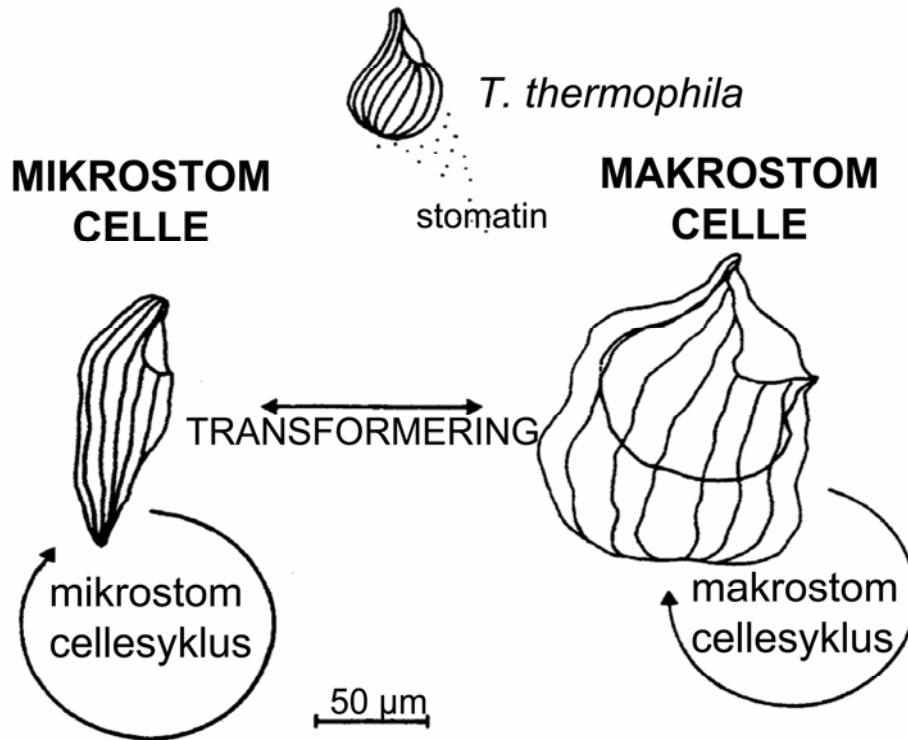


Figur 1.4: SEM-bilder av de to formene av *T. vorax*. A: Mikrostom form. B: Makrostom form. Et byttedyr er avbildet nær munnregionen til den makrostome formen.

1.3.3 Transformerings hos *T. vorax*

Transformeringsen av *T. vorax* induseres som nevnt av tilgangen på byttedyr (Figur 1.5). Det som direkte induserer transformeringen er en forbindelse som produseres av byttedyret. Forbindelsen har fått navnet stomatin og kan ekstraheres fra supernatanten etter sentrifugering av *T. thermophila*-kultur (Buhse, 1967b). Stomatin er et kompleks som består av jern og nukleinsyre-katabolittene hypoxanthin og uracil (Smith-Somerville *et al.*, 2000).

Ved transformering fra mikrostom til makrostom form erstattes munnregionen med en større cytostom (Buhse, 1966; Buhse *et al.*, 1970). Det aktiveres et unikt sett med gener under mikrostom-makrostom transformasjonen (Buhse, 1967a). Den mikrostome og den makrostome munnregionen har mange identiske morfologiske strukturer (Smith, 1982a, b), men den makrostome munnregionen har i tillegg 55 unike polypeptider (Gulliksen *et al.*, 1984).



Figur 1.5: Transformering hos *T. vorax*. Den polymorfe ciliaten *T. vorax* kan eksistere i to former; mikrostom og makrostom. Transformering fra mikrostom til makrostom form induseres av stoffet stomatatin, som skille ut av byttedyrene. Legg merke til at cellene deler seg i den makrostome formen så lenge byttedyrene er tilstede i mediet. Når disse er borte, transformeres *T. vorax* tilbake til mikrostom form igjen.

1.4 Kjemoresepsjon hos ciliater

Reversering av cilieslagene og modulering av svømmehastigheten danner grunnlaget for ciliaters adferd. Disse reaksjonene ble beskrevet av Jennings allerede i 1906, og ble betegnet som henholdsvis unnvikelses- og fluktreaksjoner. I tillegg til mekanisk stimulering kan blant annet også kjemiske stimuli og endret temperatur fremkalle slike responser. For at en ciliat skal kunne oppsøke næring eller unnvike toksiske stoffer, er den avhengig av å kunne sanse ulike kjemiske stimuli, for så å bevege seg mot eller bort fra kilden. Ciliatene gjør dette ved modulering av flukt- og unnvikelsesreaksjonen (Van Houten, 1978, 1979). En ciliats kjemosensoriske respons kalles kjemokinese, og er et resultat av forandringer i svømmehastighet (orthokinese) og snufrekvens (klinokinese) uten at retningen mot kilden for det kjemiske stimulus sanses direkte. Bevegelse mot eller fra kilden på grunnlag av en direkte retningsbestemmelse kalles kjemotaxis. Positiv kjemokinese fører til akkumulering av celler innenfor et område som for eksempel gir gode osmotiske forhold eller høy konsentrasjon av næring. Ved negativ kjemokinese beveger

Innledning

cellene seg vekk fra stimuluskilden. Kjemiske forbindelser som fremkaller slike responser kalles henholdsvis attraktanter og spredere.

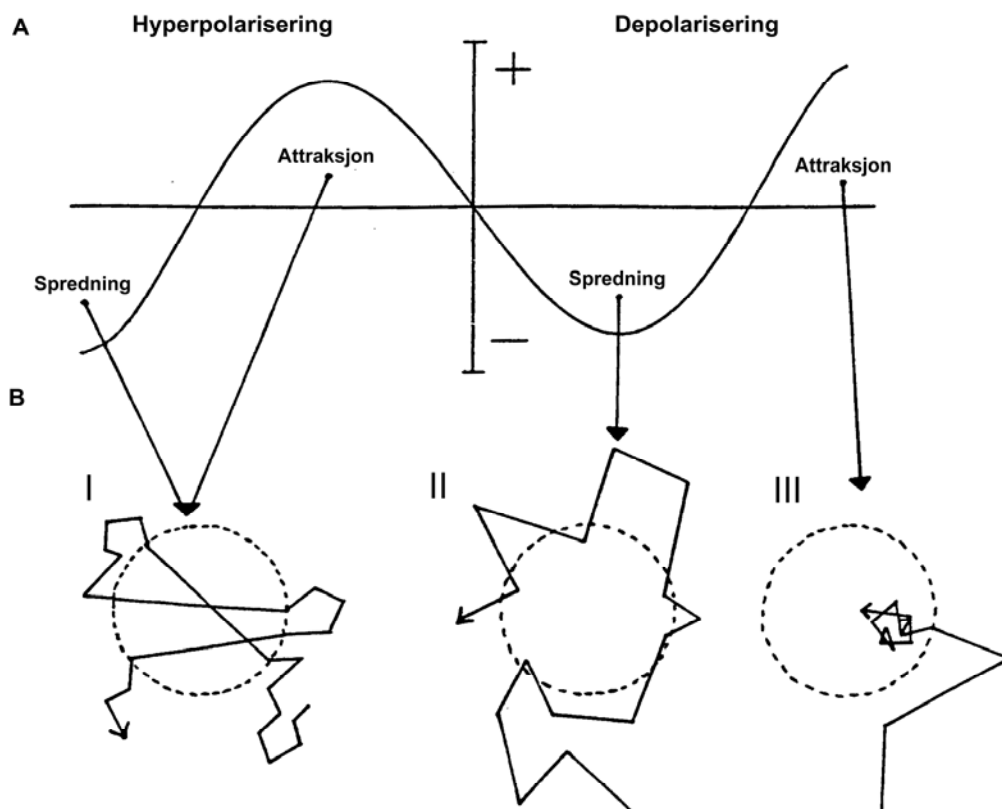
Siden flukt- og unnvikelsesreaksjonene er et resultat av henholdsvis hyperpolarisering og depolarisering av membranen, henger cellens adferd og membranpotensial nøye sammen. Van Houten (1978) har satt opp en modell for hvordan kjemokinese kan styres utelukkende av membranpotensialet hos *Paramecium* (Figur 1.6). Stoffe som gir en moderat hyperpolarisering er attraktanter. I det ciliatene svømmer inn i et område med en slik attraktant, reduseres snufrekvensen samtidig med at svømmehastigheten øker. Redusert snufrekvens reduserer sannsynligheten for at ciliatene skal forlate området, og hvis svømmehastigheten ikke øker vesentlig, vil atferdsforandringen føre til en akkumulering. Acetat, laktat, folat (Van Houten, 1979) og L-glutamat (Van Houten *et al.*, 2000) er eksempler på denne typen attraktant. Stoffe som gir en sterkere hyperpolarisering, fører til en mer markant økning av svømmehastigheten og ciliatene vil da forlate området så raskt at nettovirkningen blir spredning. OH^- er en slik spredning (Van Houten, 1979). En moderat depolarisering fører til en økning i frekvensen av unnvikelsesreaksjoner og en reduksjon i svømmehastighet. Økningen i snufrekvensen øker sannsynligheten for at ciliaten skal forlate området. Na^+ er en slik spredning (Van Houten, 1979). Hvis derimot frekvensen av snubevigelser blir svært høy, som ved en sterkere depolarisering, vil ciliatene få en vedvarende rotasjonsbevegelse og ikke være i stand til å forlate området. Ba^{2+} er et eksempel på en slik attraktant (Van Houten, 1979).

Det er ikke det absolutte membranpotensialet som styrer kjemokinesen, men selve forandringen i membranpotensialet. Ved positiv kjemokinese akkomoderer cellene etter en tid. Membranpotensialet, som er avhengig av det omgivende mediets sammensetning, stabiliseres på et nytt nivå. På tross av den endringen som er skjedd, går både cilieslagfrekvensen (Eckert & Machemer, 1975; Machemer, 1976), svømmehastighet og snufrekvens (Van Houten, 1978) tilbake til basalnivå. Hvis ciliaten beveger seg bort fra området igjen, utløses en ny atferdsrespons som avhenger av sammensetningen til det omgivende mediet.

Rønnevig (1992) fant at Van Houtens membranpotensialmodell for kjemokinese på *Paramecium* ikke gjaldt for *Tetrahymena vorax*. Når hun eksponerte *T. vorax* for protosepton, som er en sterk attraktant, depolariserte cellen. Protosepton inneholder en del uorganiske ioner, blant annet en forholdsvis høy konsentrasjon av Na^+ . I standard kulturmedium gir dette en konsentrasjon av Na^+ på 21 mM. En testløsning med 21 mM Na^+ uten de organiske bestanddelene i protosepton induiserte en tilsvarende depolarisering

Innledning

som protosepepton, men ga en spredning av ciliatene. Ved å tilsette 21 mM Na⁺ til bovint serum albumin (BSA), som er en svakt hyperpolariserende attraktant, reverserte den elektrofysiologiske responsen i forhold til BSA alene, mens atferdsresponsen på Na⁺ og BSA var uforandret. Det er altså ikke noen klar sammenheng mellom den elektrofysiologiske responsen på kjemiske stimuli og den registrerte forandringen i atferd for *T. vorax*.



Figur 1.6: Grafisk fremstilling av membranpotensialmodellen for kjemokinese hos *Paramecium*. A: X-aksen viser membranpotensialforandringene som attraktanter og spredere induserer. Y-aksen indikerer om kjemoresponsen er positiv (+) eller negativ (-). B: Atferd som korresponderer med de membranpotensialforandringene attraktantene og spredere forårsaker. I: En moderat hyperpolarisering gir en attraksjon ved at frekvensen av unnvikelsesreaksjonen reduseres samtidig med at hastigheten øker. En sterkere hyperpolarisering induserer en markant økning i svømmehastighet og resultatet blir en spredning. II) Stoffer som gir en moderat depolarisering fører til en økning i unnvikelsesreaksjonen og er en spredere. III) En sterkere depolarisering gir en akkumulering siden hastigheten reduseres mens snufrekvensen øker så mye at cellen vanskelig kan forlate området. Modifisert etter Van Houten (1978).

Ved hjelp av rene atferdsstudier er det blitt kartlagt mange attraktanter for både *Paramecium* og *Tetrahymena*. Naturlig nok er de mest effektive attraktantene forbindelser som er relatert til næring for ciliatene – protosepepton, diverse proteiner, peptider og aminosyrer. Bortsett fra Rønnevigs hovedfagsoppgave fra 1992 er det ikke publisert

Innledning

elektrofysiologiske studier relatert til kjemoattraksjon hos *Tetrahymena*. Det er derimot gjort en del arbeider på kjemosensorisk transduksjon og adaptering hos *Tetrahymena thermophila* i forbindelse med negativ kjemokinese. Atferdstudier har vist at intracellulære forbindelser som GTP (Francis & Hennessey, 1995), lysozyme (Kuruvilla *et al.*, 1997), ATP (Kim *et al.*, 1999) og oksidanten NBT (Francis & Hennessey, 1995) er effektive spredere ved mikromolare og nanomolare konsentrasjoner. Dette er forbindelser som ikke er toksiske for ciliatene, men som allikevel har en repulserende effekt på *T. thermophila*. Dette er hensiktsmessig, siden disse intracellulære forbindelsene indikerer celledød og varslers naboceller om en potensiell fare. Elektrofysiologiske studier har videre vist at lysozym (Kuruvilla & Hennessey, 1998), ATP og GTP (Kim *et al.*, 1999) depolariserer cellen. Reseptorpotensialene er ulike ved at lysozym- og GTP responsene er transiente, mens ATP responsen er varig. På grunn av de elektrofysiologiske ulikhetene og det faktum at hverken GTP- og ATP responsene eller lysozym- og GTP responsene kryssadapterer (Kim *et al.*, 1999; Kuruvilla & Hennessey, 1999), er det sannsynlig at de kjemosensoriske signalveiene for disse spredere er forskjellige. I tillegg er lysozymreseptoren (42-kDa) fra *T. thermophila* isolert. Polyklonale antistoffer til dette proteinet blokkerer lysozymresponsen, mens GTP- og ATP responsene er normale (Kuruvilla & Hennessey, 1998). Dette styrker teorien om at de tre spredere har ulike signalveier.

Man antar at de fleste attraktanter og spredere bindes til overflatereseptorer hos ciliater, men ingen kjemosensoriske signal-transduksjonsveier er kjente. Det er imidlertid foreslått en signal-transduksjonsvei for kjemoattraktanten glutamat hos *Paramecium* (Van Houten *et al.*, 2000). Glutamat bindes til en spesifikk membranreseptor og induserer en varig hyperpolarisering. Sannsynligvis skyldes hyperpolariseringen i første omgang økt K^+ -konduktans. Det ble foreslått at dette aktiverer en signalvei som går via adenylyl cyclase, cAMP og proteinkinase A. Til slutt aktiveres en Ca^{2+} -pumpe i cellemembranen, og utpumpingen av Ca^{2+} opprettholder hyperpolariseringen. Den varige hyperpolariseringen resulterer i økt svømmehastighet og redusert snuffrekvens.

1.5 Bakgrunn for oppgaven

Det viktigste målet med denne oppgaven var å studere responsen på et filtrat av *T. thermophila*-kultur hos den mikrostome og makrostome formen av *T. vorax*. Et slikt filtrat inneholder den komplekse blandingen av kjemiske stoffer som betegnes stomatin, og som

Innledning

induserer transformering fra mikro- til makrostom form hos *T. vorax*. Det var ikke urimelig å anta at kjemisk stimulering med så dramatiske morfologiske konsekvenser også kunne gi atferdsmessige og elektrofysiologiske responser forut for transformeringen. Siden betydningen av *T. thermophila* celler i omgivelsene er ulik for den mikrostome (induksjon av transformering) og den makrostome (tilgang på byttedyr) formen av *T. vorax*, var det heller ikke urimelig å anta at responsene kunne være forskjellige hos disse to formene. Det er tidligere vist at aminosyrer kan indusere kjemoattraksjon hos *T. thermophila* (Levandowsky *et al.*, 1984). For å ha et sammenligningsgrunnlag for vurderingen av responsene på filtratet, studerte jeg derfor også responsen på en utvalgt aminosyre. Etter å ha gjort pilotforsøk med tre tilfeldige aminosyrer, ble L-cystein valgt siden den ga tilsynelatende best attraksjon av *T. vorax* celler.

Som nevnt fant Rønnevig (1992) at depolariseringen ved stimulering med attraktanten protosepepton på mikrostome celler skyldtes løsnings Na^+ -innhold, mens Na^+ i seg selv ikke ga noen akkumulering av ciliatene. For å videre undersøke koplingen mellom kjemokinese og elektrofysiologi hos *T. vorax*, kunne det være gunstig å benytte en mindre kompleks testløsning. L-cystein var i så måte en gunstig forbindelse.

Som nevnt foretrekkes *T. thermophila* fremfor små mikrostome celler som byttedyr for den makrostome formen av *T. vorax* (Grønlien *et al.*, 2002). Jeg var derfor interessert i å undersøke hva byttedyrseleksjonen hos den makrostome formen av *T. vorax* kunne skyldes. Både gjenkjennelse av kjemiske signaler skilt ut fra byttedyret og signaler utløst av fysisk kontakt med byttedyret kunne være mulige forklaringer på seleksjonen. Kjemoresponsen på et filtrat av *T. thermophila*-kultur ble derfor sammenlignet med kjemoresponsen på et filtrat av *T. vorax*-kultur hos *T. vorax*. Det ble videre gjort elektrofysiologiske forsøk på makrostome celler der membranresponser på fysisk kontakt med *T. thermophila* ble sammenlignet med membranresponser på fysisk kontakt med *T. vorax*.

Under de elektrofysiologiske forsøkene der ciliatenes kjemorespons ble testet, kom det frem indisier om at de to formene av *T. vorax* var svært ulike med hensyn på mekanosensitivitet. Siden de mekanosensitive egenskapene til *T. vorax* ikke har vært undersøkt tidligere, ble også membranresponser på mekanisk stimulering hos mikrostome- og makrostome celler sammenlignet.

1.6 Problemstilling

1. Induserer filtratet av *T. thermophila*-kultur ulik kjemosensorisk respons hos mikro- og makrostome celler av *T. vorax*?
2. Induserer L-cystein ulik kjemosensorisk respons hos mikro- og makrostome celler av *T. vorax*?
3. Er det noen sammenhenger mellom kjemokinese og eventuelle elektrofysiologiske membranresponser på disse forbindelsene?
4. Skyldes den selektive fagocytosen hos den makrostome formen av *T. vorax*
 - a) kjemiske substanser frigjort fra byttedyret, eller
 - b) er seleksjonen avhengig av fysisk kontakt mellom *T. vorax* og byttedyret?
5. Er det noen ulikheter i mekanosensitivitet hos mikro- og makrostome celler av *T. vorax*?

2 Materialer og metoder

2.1 Forsøksdyrene

I denne hovedfagsoppgaven brukte jeg V₂ cellelinjen av *Tetrahymena vorax* som forsøksdyr. Denne cellelinjen ble isolert på slutten av 40-tallet (Corliss, 1953) og er den cellelinjen av *T. vorax* som er best beskrevet i litteraturen.

2.1.1 Dyrking av *T. vorax*

Dyrkningsmediet for *T. vorax* hadde følgende sammensetning (Plesner *et al.*, 1964):

MgSO ₄	$4,1 \cdot 10^{-3}$	M
MnCl ₂	$2,5 \cdot 10^{-6}$	”
ZnCl ₂	$3,6 \cdot 10^{-7}$	”
CaCl ₂	$3,4 \cdot 10^{-3}$	”
CuCl ₂	$2,9 \cdot 10^{-4}$	”
FeCl ₃	$2,0 \cdot 10^{-5}$	”
Proteosepepton	20	mg/ml
Gjærekstrakt	2	”
Penicillin	250	µg/ml
Streptomycin-sulfat	250	”

Mediet ble laget med utgangspunkt i tre stamløsninger og en jernkloridløsning.

Stamløsning 1:

MgSO ₄	$4,1 \cdot 10^{-3}$	M
MnCl ₂	$2,5 \cdot 10^{-6}$	”
ZnCl ₂	$3,6 \cdot 10^{-7}$	”

Stamløsning 2:

CaCl ₂	$3,4 \cdot 10^{-3}$	M
CuCl ₂	$2,9 \cdot 10^{-4}$	”

Materialer og metoder

Stamløsning 3:

Penicillin	250 mg/ml
Streptomycin-sulfat	250 ”

Jernkloridløsning:

FeCl ₃	100 mM
-------------------	--------

For å lage en liter jernfritt medium, ble 980 ml destillert vann tilsatt 10 ml av stamløsning 1 og 2 samt protosepepton og gjærekstrakt i pulverform. Protosepepton er et udefinert kjøtttekstrakt som fungerer som næring for *T. vorax*. I protosepepton finnes flere uorganiske ioner, deriblant ca $1 \cdot 10^{-3}$ mol Na⁺ /g (Rønnevig, 1992). Vekstmediet ble fordelt i porsjoner på 100 ml i 250 ml autoklaverbare erlenmeyerkolber, og autoklavert ved 120 °C i 2 timer. Jernløsningen ble filtrert gjennom et sterilfilter før 20 µl ble tilsatt hver av de autoklaverte erlenmeyerkolbene like før bruk. Dette hindrer at jernet felles ut under lagring. For å hindre bakterievekst ble 100 µl av stamløsning 3 tilsatt når vekstmediet skulle benyttes.

Dyrkingen av *T. vorax* foregikk i petriskåler med en diameter på 10 cm. Cellene ble holdt i kontinuerlig kultur ved å inokulere 10 ml vekstmedium med 1 ml cellekultur annenhver dag. De mikrostome cellene som ble benyttet i forsøkene, var tatt fra 2 døgn gamle kulturer. Transformeringen av mikrostome til makrostome celler ble også utført med celler fra 2 døgn gamle kulturer.

Vekst av mikrostome *T. vorax* kulturer kan deles inn i fire faser (Grelland, 1988): Forsinket fase, vekstfase, sen- og tidlig stasjonærfase. De første timene etter overføring til nytt vekstmedium, er celleantallet konstant eller reduseres litt. Dette kalles den forsinkede fasen (lag-fasen), og karakteriseres ved at cellene har relativt lite volum, er runde og lite aktive. I vekstfasen øker celleantallet eksponentielt, og cellenes volum og aktivitet øker i takt med kulturens vekst. I denne fasen får også cellene gradvis den karakteristiske avlange formen. Mot slutten av vekstfasen øker celleantallet med stadig synkende rate, til kulturen når et platå der celleantallet er konstant. Dette kalles stasjonærfasen og inntreffer ca to døgn etter overføring til nytt vekstmedium. Selv om celleantallet er konstant, øker cellevolumet tidlig i stasjonærfasen. Etter ca 5 døgn i vekstmedium får cellene igjen et lavere aktivitetsnivå, mindre volum og rundere form. Dette kalles sen stasjonærfase. Jeg valgte å

bruke to døgn gamle celler i forsøkene mine fordi cellene da var mest aktive og ga tydelige atferdsresponsers.

2.1.2 Overføring av ciliater til registreringsløsning

Både atferdsforsøkene og de elektrofysiologiske forsøkene ble utført i et standardisert registreringsmedium som bestod av:

CaCl ₂	1 mM
KCl	1 mM
NaCl	1 mM

Justert til pH 7,2 med 1 mM TRIS/ HCl.

Overføringen av ciliater fra dyrkningsmedium til registreringsmedium skjedde i flere trinn. Først ble 3 ml fra en to døgn gammel cellekultur tilsatt 2 ml registreringsløsning og sentrifugert forsiktig med en håndsentrifuge i 30 sekunder. Supernatanten ble så sugd av ved hjelp av en pipette koplet til en vannstrålepumpe. Deretter ble ciliatene resuspendert i registreringsmedium og vasket ytterligere to ganger. De nyvaskede ciliatene ble så suspendert i 3 ml registreringsløsning og overført til en petriskål med en diameter på 2,5 cm. Denne behandlingen førte initielt til svelling og redusert svømmeaktivitet hos cellene, men etter ca 30 minutter var form og aktivitet tilsynelatende normalisert. Forsøkene startet derfor ca 45 min etter overføringen av ciliatene.

2.1.3 Induksjon av transformering

For å indusere transformering hos *T. vorax* ble *T. thermophila* brukt som byttedyr. Dyrkningen av *T. thermophila* foregikk med identisk dyrkningsmedium og på samme måte som dyrkningen av *T. vorax*. Jansen (1995) fant at mindre enn 10 % av *T. vorax*-cellene transformerte ved tilsetning av byttedyr direkte i dyrkningsmediet. Hvis man i stedet lot transformeringen skje i registreringsløsningen, transformerte hele 80-90 % av cellene. Det er derfor sannsynlig at ciliatene primært gjennomgår transformasjon dersom det er nødvendig for å skaffe næring til videre formering. I sine forsøk blandet Jansen (1995) tette kulturer av de to artene sammen i et 1:1 forhold, og etter et døgn var 80-90 % av cellene transformert. Under atferdsforsøkene i mitt hovedfagsarbeid benyttet jeg denne metoden til induksjon av transformering.

Materialer og metoder

Før blandingen av *T. vorax* og *T. thermophila* ble 5 ml tett kultur av hver av artene sentrifugert hver for seg i 30 s med en håndsentrifuge. Supernatanten ble sugd av, og 5 ml registreringsløsning ble tilsatt hver av kulturene. Cellene ble så vasket ytterligere to ganger. Til slutt ble 2,5 ml av de nyvaskede *T. vorax* cellene blandet med 2,5 ml av de nyvaskede *T. thermophila* cellene i en petriskål med en diameter på 5 cm. Etter transformeringen ble kulturen med de makrostome cellene spunnet ned én gang og resuspendert i registreringsmedium.

Problemet med denne metoden var at kulturen med makrostome celler inneholdt en del byttedyr. Metoden ble derfor optimalisert i løpet av prosjektperioden, og til induksjon av transformering under de elektrofysiologiske forsøkene økte jeg forholdet mellom antall byttedyr og *T. vorax* celler til 100:1. Etter tre døgn fikk jeg da en tett kultur som inneholdt 100 % makrostome celler, og som var helt fri for byttedyr.

2.2 Metode for atferdsforsøk

Det er beskrevet flere metoder for kvantifisering av den kjemokinetiske virkningen av kjemiske stoffer på ciliater (Van Houten *et al.*, 1982; Rønnevig & Sand, 1992; Koppelhus *et al.*, 1994; Francis & Hennessey, 1995). I dette hovedfagsarbeidet har jeg benyttet den teknikken som først ble beskrevet av Rønnevig & Sand (1992). Denne enkle metoden går ut på å senke en lekkasjepipette med testløsning ned i et cellekammer, for så å telle antall celler som i løpet av en bestemt tid akkumulerer i et definert område rundt pipettespissen.

2.2.1 Overføring til forsøkskammeret

Atferdsforsøkene startet med at 60 ciliater i registreringsløsning ble overført til forsøkskammeret, som hadde et volum på 230 mm³ og et areal på 95 mm². Cellene ble samlet inn under et lysmikroskop ved hjelp av en glasspipette tilkopledd et munnstykke. Pipetten ble styrt for hånd, og én og én ciliat ble sugd forsiktig inn i pipetten. Pipettespissen ble så flyttet til forsøkskammeret og cellene ejsert med et svakt overtrykk. Kammeret inneholdt 0,2 ml væske, og ble lukket med et lag parafinolja over registreringsløsningen. Dette laget hindret fordampning av vann fra overflaten, og dermed konveksjonsstrømmer som ville ha økt utblandingen av testløsningene. Kammeret ble så plassert på objektbordet til et invertert lysmikroskop (Nikon Diaphot TMD) som var kopledd

til et videokamera (Jai videoguard system) og en videospiller (JVC, HR-S6953EU). Cilatene kunne observeres via en monitor, og atferden ble registrert på videobånd med en billedfrekvens på 25/s. Under atferdsforsøkene benyttet jeg et 4 x objektiv, og monitorskjermen tilsvarte da et areal på 2,84 mm² i forsøkskammeret.

2.2.2 Stimulering

For å eksponere forsøksdyrene for testløsningene ble det benyttet en stimuleringspipette. Denne ble laget ved at kapillærer av Na-glass med indre diameter på 1,5 mm ble trukket ut for hånd over en gassflamme. Den tynne enden ble varmet opp og formet som en krok. Glasspipetten ble så montert vertikalt og sentrert i en elektrisk varmeslynge av platinatråd. Ved hjelp av et lodd som ble heftet på kroken, ble pipetten trukket ut under visuell kontroll gjennom en binokularlupe. Etter hvert som glasset ble tynnere, ble varmen redusert. I bruddøyeblikket ble temperaturen holdt så lav som mulig, slik at loddets tyngde bare så vidt var i stand til å trekke ut glasset. På denne måten ble varmen i bruddøyeblikket tilnærmet konstant for hver pipette som ble laget, og diameteren til pipettespissen ble hovedsakelig bestemt av vekten på loddet. Stimuleringspipettene som ble brukt i atferdsforsøkene, hadde en spissdiameter på 25 µm og var 7 cm lange.

Både mikrostome og makrostome celler ble eksponert for L-cystein og filtrater av både *T. thermophila* og *T. vorax* kulturer. Stimuleringspipetten ble fylt helt opp med en testløsning og plassert i en pipetteholder som kunne styres av en manuell manipulator. Deretter ble pipettespissen senket ned i badet til rett over bunnen og sentrert på monitorskjermen. På grunn av det høye væsknivået i pipetten lakk testløsningen ut i skålen uten at pipetten var tilkopledd overtrykk, og ciliatenes adferd ble registrert i 15 min etter at pipetten var på plass. I løpet av denne perioden lakk ca 8 µl testløsning ut i kammeret.

Varigheten av observasjonsperioden ble fastsatt på grunnlag av pilotforsøk med tiltrekkende konsentrasjoner av L-cystein på mikrostome celler. Det viste seg at akkumuleringen av celler i området rundt spissen av pipetten nådde et stabilt, maksimalt nivå i løpet av 10-15 min. Tidsforløpet av akkumuleringen er beskrevet i mer detalj i resultatkapitlet.

For å kvantifisere den kjemokinetiske responsen på stimulering med testløsningene, ble antall celler som akkumulerte i et definert området rundt pipettespissen talt hvert tiende sekund i det 14. minuttet etter at stimuleringspipetten var plassert. Gjennomsnittet av disse

verdiene som prosent av antallet dyr i kammeret ble brukt som relativt mål på kjemoattraksjonen. Eksperimentet ble gjentatt 3 til 4 ganger for hver testløsning. Det definerte området rundt pipettespissen tilsvarte synsfeltet på monitorskjermen og utgjorde 3 % av det totale bunnarealet i cellekammeret.

2.2.3 Snufrekvens og svømmehastighet

Akkumulering av ciliater i nærheten av stimuleringspipetten kan skyldes ulike atferdsendringer. For eksempel vil reduksjon av svømmehastigheten føre til at ciliatenes opphold innenfor et begrenset området blir forlenget, mens økning av snufrekvensen reduserer sannsynligheten for at ciliatene forlater området. Ciliatenes snufrekvens og svømmehastighet under stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtratet ble derfor målt ved avspilling av sekvenser med stillbilder (25/s). Målingene ble gjort innenfor synsfeltet på monitorskjermen i løpet av det 14. minuttet etter at pipetten var senket ned. Ved måling av snufrekvensen ble hver celle fulgt i 10 sekunder, og antall vendinger med en retningsendring på mer enn 90 ° ble registrert. En retningsendring med en jevn bevegelse ble definert som én vending selv om vinkelen kunne bli mer enn 360 °. Hastigheten ble målt mellom to påfølgende vendinger. Hvis en ciliat kolliderte med en annen ciliat eller et annet hinder under målingene, ble målingen forkastet.

2.2.4 Testløsninger

For å lage filtrater av *T. thermophila*- og *T. vorax*-kulturer benyttet jeg en metode som er utviklet for å lage stomatinløsning til induksjon av transformeringen hos *T. vorax* (Grønlien *et al.*, 2002). Dette ble gjort ved at 40 ml av en tre døgn gammel cellekultur ble forsiktig spunnet ned og vasket med registreringsløsning tre ganger. Etter siste sentrifugering ble cellene suspendert i 20 ml registreringsløsning og inkubert ved romtemperatur i tre timer. For å fjerne cellene ble suspensjonen deretter sentrifugert med høy hastighet i 15 minutter, og supernatanten ble så filtrert gjennom et sterilfilter med en porediameter på 0,45 µm.

L-cysteinløsningene ble laget ved at L-cystein ble løst i registreringsløsning.

2.2.5 Statistikk

Alle tallverdier i denne oppgaven er oppgitt som middelværdi \pm s.d. i tabeller og tekst. I figurer der egenskaper til de to formene av *T. vorax* blir sammenlignet, har jeg imidlertid vist s.e.m. Ved analysene av atferdsresultatene brukte jeg student-t-test for å se om det var signifikante atferdsendringer ($P < 0,05$) under stimulering med testløsningene.

2.3 Elektrofysiologisk metode

2.3.1 Immobilisering av ciliatene

For å kunne foreta intracellulære registreringer av ciliater må cellen holdes fast, og dette kan gjøres på flere måter. Jeg benyttet en sugepipette for å immobilisere ciliatene under registreringene (Jonsson & Sand, 1987). Sugepipettene ble laget på samme måte som stimuleringspipettene. For å skåne cellene mest mulig under forsøkene, ble kanten av pipettespissen i tillegg forsiktig smeltet ved hjelp av en glødetråd. For de mikrostome cellene var 15 μm en passende diameter, mens 30 μm var passende for de makrostome.

De elektrofysiologiske forsøkene startet med at 0,5 ml vasket cellekultur ble overført til et registreringskammer med en indre diameter på 1,5 cm. Dette ble så plassert på objektbordet til et invertert mikroskop (Olympus IX71). Sugepipetten ble fylt med registreringsløsning og montert i en pipettebeholder som kunne tilkobles undertrykk ved hjelp av en magnetventil (Mecmann 4431). Undertrykket ble laget ved å sende trykkluft gjennom en vannstrålepumpe. Sugepipetten ble plassert sentralt i synsfeltet, og spissen senket ned mot bunnen av registreringskammeret, der det var høy celledetthet, ved hjelp av en hydraulisk mikromanipulator (Narishige MO-103). Denne muliggjorde vibrasjonsfrie bevegelser i tre dimensjoner, slik at jeg kunne finposisjonere pipetten i synsfeltet. Ved hjelp av manøvreringskruene på objektbordet kunne registreringskammeret beveges i alle retninger i planet, mens spissen av sugepipetten hele tiden befant seg sentralt i synsfeltet. Når en ciliat nærmet seg pipettespissen, ble magnetventilen åpnet ved hjelp av en manuell utløser. Ciliaten ble så sugd fast av undertrykket som ble koplet til, og kunne holdes fast til pipettespissen gjennom hele forsøket. Undertrykket, som ble målt med et vannmanometer, kunne kontrolleres ved å justere luftstrømmen gjennom vannstrålepumpen. Et passende undertrykk for å fange og holde en ciliat var 0,5 - 1 kPa.

Membranen til *T. vorax* er dekket med et slimlag som skilles ut fra mucocystene (Cole & Stuart, 1991). Slimet tettet som regel igjen fangstpipetten etter en registrering, og pipetten måtte derfor renses før fangst av en ny ciliat. Ved hjelp av en treveisventil kunne pipetten tilkoples overtrykk (ca 100 kPa), slik at den ble spylt ren og kunne brukes flere ganger.

2.3.2 Elektrofysiologisk registrering

For å oppnå elektrisk kontakt med cellens cytoplasma ble det benyttet penetrerende mikroelektroder. Utgangspunktet var kapillærer av borosilikat-glass med innlagt glassfiber og med en indre diameter på 0,60 mm. Glasskapillærene ble montert horisontalt i en elektrodetrekker (P-2000, Sutter instrument co.) med en CO₂-laser som varmekilde. P-2000 blir styrt av en mikroprosessor (Z-80) som regulerer varmeeffekten, trekraften og hastigheten på trekket. For at elektrodespissen ikke skal smelte igjen, må varmekilden være slått av i uttrekningsøyeblikket, og det ble derfor programmert inn en tidsforsinkelse mellom utkoblingen av CO₂-laseren og starten av trekket. En tidsforsinkelse på ca 1 s var passende for å lage elektroder til forsøkene i denne hovedfagsoppgaven.

Elektrodene ble fylt bakfra med en elektrolyttløsning som bestod av 4 M kaliumacetat justert til pH 7,2 med eddiksyre. Fiberen i elektroden sørget for at løsningen ble trukket helt ut i spissen av elektroden. Elektrodemotstanden var 30-60 MΩ. Glasselektroden ble tred inn på en sølvtråd og montert i en elektrodeholder. Ved hjelp av en hydraulisk mikromanipulator kunne elektroden, i likhet med fangstpipetten, beveges uten vibrasjoner i tre dimensjoner. Etter at en ciliat var fanget, senket jeg fangstpipetten ned mot bunnen og førte elektroden inntil membranen. Både fangstpipetten og bunnflaten i registreringskammeret ga cellen motstand mot elektroden og penetreringen skjedde i noen tilfeller i det elektroden ble skjøvet mot cellen. Vanligvis måtte jeg imidlertid benytte én av to alternative metoder for å penetrere cellen. En metode var å sende en kortvarig (100-200 ms), høyfrekvent, oscillerende strømpuls gjennom elektroden. Dette ble gjort ved å overstyre kompenseringen for elektrodekapasitansen. Det mest effektive var imidlertid å aktivere en ”krystallkanon” som var plassert i elektrodeholderen. Krystallkanonen inneholdt piezoelektriske krystaller som utvidet seg når de ble påført spenning, slik at elektroden ble ”skutt” gjennom membranen. Etter penetreringen var cellens innside i elektrisk kontakt med måleapparatet via elektrolyttløsningen og sølvtråden. Som jordingselektrode ble det benyttet en sølvtråd dekket med sølvklorid. Denne elektroden var

i elektrisk kontakt med registreringsløsningen via en agarbro, som var plassert i forsøkskammeret. En sluttet krets var dermed komplett og biologiske responser kunne registreres.

Sølvtråden i glasselektroden var koplet til en forforsterker (Biologic VF-180) med en inngangsmotstand større enn 100 G Ω . Den høye inngangsmotstanden sørget for at minimalt med strøm ble trukket fra forsøksdyret under registreringen. Forsterkeren var konstruert slik at man både kunne registrere membranpotensialet og sende strøm gjennom en og samme elektrode. Siden glassveggene til mikroelektroden kan akkumulere ladning, har elektrodene både ohmsk motstand og kapasitive egenskaper. Ved hjelp av justeringsenheter innbygget i forsterkeren var det mulig å kompensere for disse størrelsene. Registreringene viste derfor kun membrankapasitansen og membranmotstanden til forsøksdyret. Ulike ionesammensetninger i registreringsløsningen og i elektrolyttløsningen vil kunne skape et diffusjonspotensial ved elektrodespissen. Det oppstår da et potensial mellom mikroelektroden og referanseelektroden. En annen justeringsenhet innbygget i forsterkeren kunne nulle ut dette potensialet. Forsterkeren var videre koplet til en PC via en digital/analog omformer (Axon Digidata 1320 A). Programvarepakken PClamp 6.0 (Axon) ble benyttet både for å styre forsøkene, innhentede data (Clampex) og analysere registreringene (Clampfit).

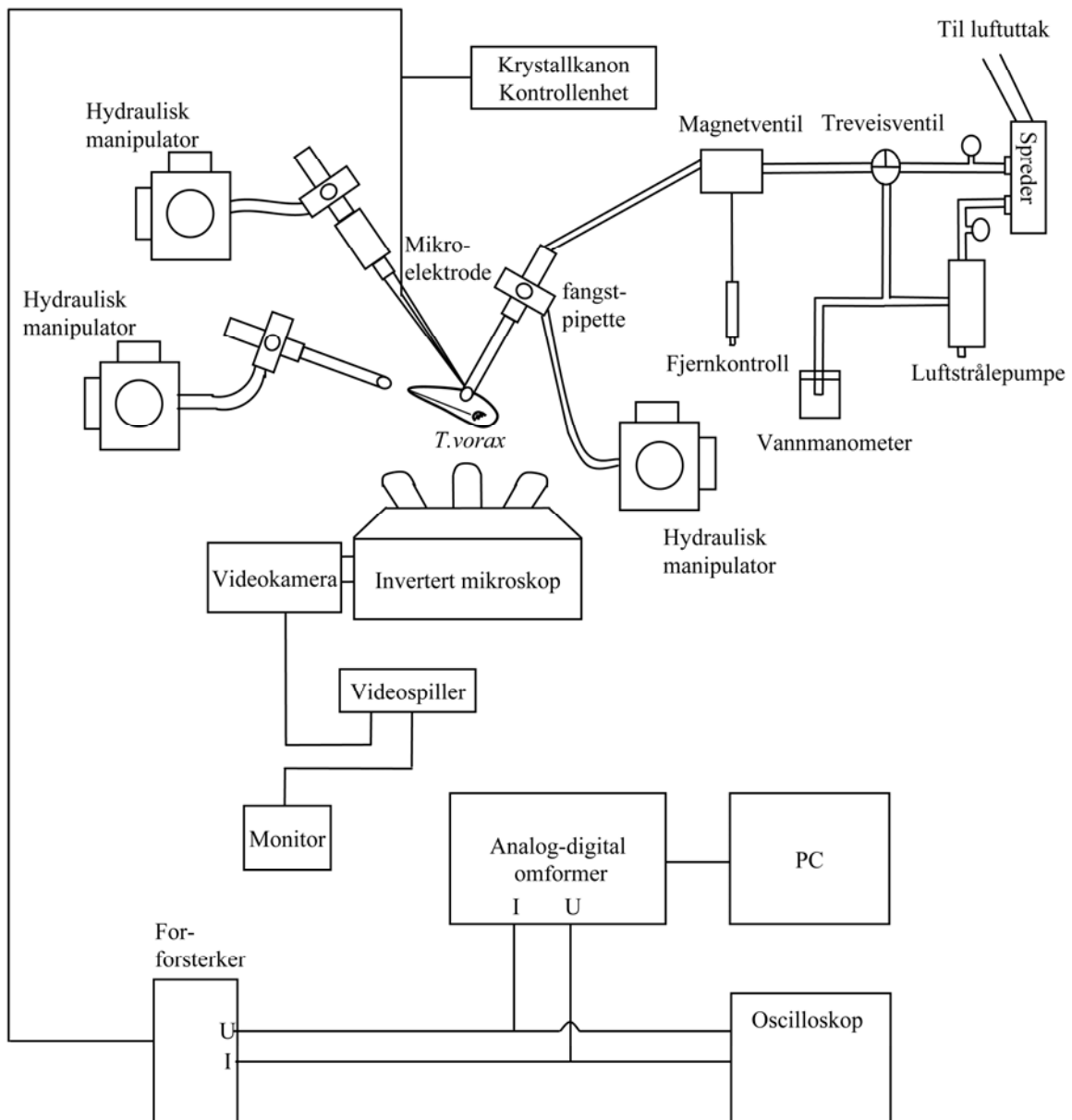
2.3.3 Stimulering

For å kartlegge ciliatenes membranegenskaper ble det injisert strømpulser av ulik amplitude og polaritet. Clampex styrte forforsterkerens strøminjeksjonsfunksjon, og tillot programmering av passende amplitude, polaritet, varighet og frekvens til strømpulsene. I Clampex var det også et eget oscilloskopvindu hvor registreringene ble visualisert.

For å studere ciliatenes membranegenskaper relatert til kjemorespons ble det benyttet påsprøytingspipetter, som ble laget på samme måte som fangstpipettene og pipettene benyttet i atferdsforsøkene. Påsprøytingspipettene hadde en spissdiameter på 10 μm , og kunne koples til et overtrykk ved hjelp av en magnetventil. Overtrykket kunne måles med et vannmanometer. Etter at en ciliats elektriske egenskaper var kartlagt, ble påsprøytingspipetten plassert omtrent 75 μm fra cellen ved hjelp av den hydrauliske mikromanipulatoren som er beskrevet tidligere. Overtrykket ble så koplet inn i 10 s, og cellen ble dusjet av testløsningen. Membranresponser på både 10 mM L-cystein og

Materialer og metoder

T. thermophila-filtratet ble studert hos mikrostome celler. Kontrollforsøk ble utført med en testløsning som var identisk med registreringsmediet. Ut fra kontrollforsøkene ble trykket og avstanden til påsprøytingspipetten regulert slik at jeg unngikk påsprøytingsartefakter. Påsprøyting av NaCl depolariserer cellen (Rønnevig, 1992) og ble derfor benyttet som kontroll av påsprøytingssystemet.



Figur 2.1: Oversikt over det eksperimentelle oppsettet. Alle komponentene som ble benyttet ved de intracellulære registreringene fra ciliatene, er tegnet inn. Den øverste delen av figuren viser utstyret som ble brukt ved immobilisering og stimulering av ciliatene. Den resterende delen angir de elektroniske komponentene som forsterket, lagret og synliggjorde de bioelektriske signalene.

For å studere ciliatenes membranegenskaper relatert til mekanosensitivitet ble det benyttet glassnåler (påsprøytingspipetter med smeltet spiss) med spissdiameter på ca 10 μm . Ved hjelp av en motorisert mikromanipulator (Mertzhaüser MS 314) kunne jeg berøre ciliaten med glassnålen.

2.3.4 Bestemmelse av hvilemembranpotensialet

Hvilemembranpotensialet ble målt i det mikroelektroden ble trukket ut av cellen. Mediet i skålen var koplet til jord via jordingselektroden. Membranpotensialet ble avlest som differansen mellom potensialet umiddelbart etter uttrekk og potensialverdien da elektroden var inne i cellen.

Tidligere forsøk har vist at hvilemembranpotensialet til begge formene av *T. vorax* er omtrent -30 mV (Jansen & Sand, 1995; Bruskeland & Sand, 1999). Membranskader knyttet til elektrodepenetreringen vil redusere membranpotensialet og membranmotstanden. Jeg forkastet derfor celler som hadde et grunnere hvilemembranpotensial enn -20 mV.

Den regenerative responsen på depolariserende strømpulser skyldes aktivering av spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler (Jansen & Sand, 1995). Celler som ikke viste slike responser, ble også forkastet.

3 Resultater

3.1 Kjemoresponser hos mikrostrom og makrostrom *T. vorax*

Det viktigste målet med denne oppgaven var å studere responsen på et filtrat av *T. thermophila*-kultur hos den mikrostrome og makrostrome formen av *T. vorax*. For å ha et sammenligningsgrunnlag for vurderingen av responsene på filtratet, studerte jeg også responsen på en utvalgt aminosyre.

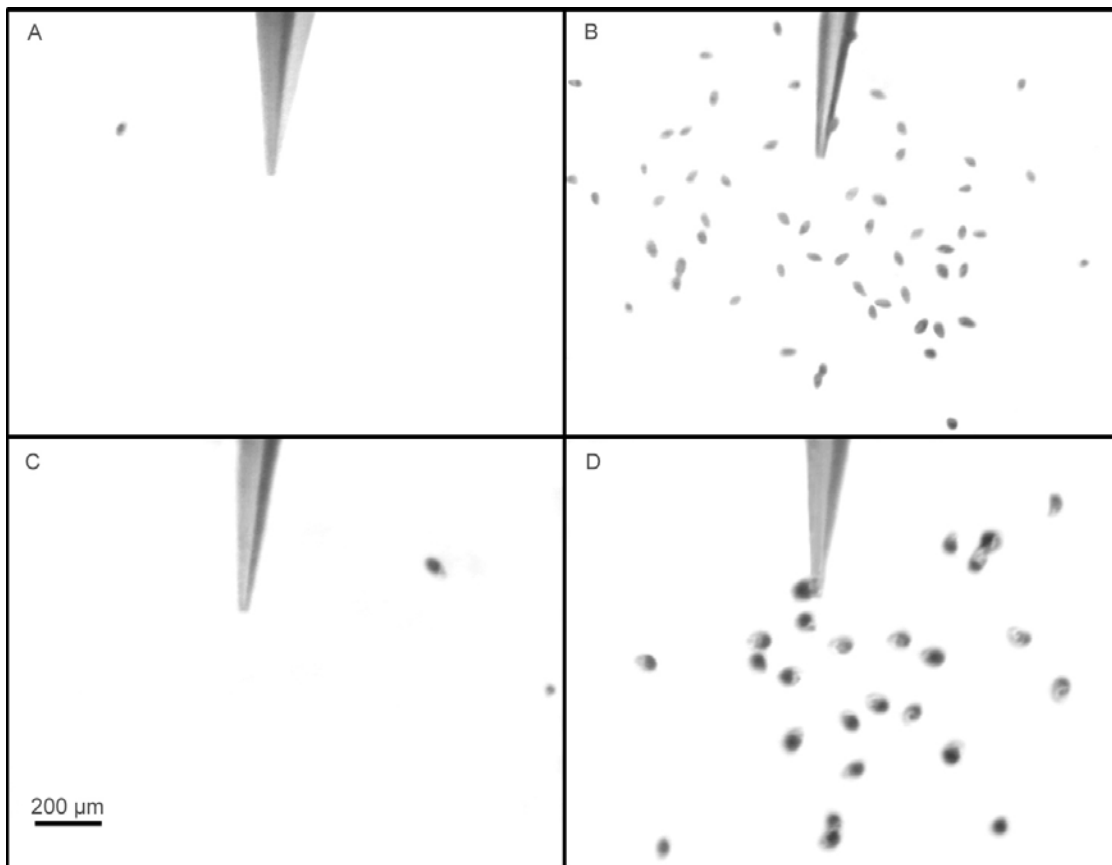
3.1.1 Atferdsresponser på L-cystein

Etter å ha gjort pilotforsøk med tre tilfeldige aminosyrer (L-cystein, L-leucin og L-lysin) og funnet at L-cystein var den som tilsynelatende ga best attraksjon av *T. vorax* celler, valgte jeg å teste den kjemokinetiske responsen på denne aminosyren. For å kvantifisere kjemoresponsen av de ulike testløsningene ble 60 celler overført til forsøkskammeret. Denne seleksjonen er imidlertid en relativt røff behandling av cellene (Hellung-Larsen, 2005). Cellene trives dessuten dårlig ved den lave celletettheten i testkammeret (60 celler per 200 μ l) (A. Løvlie, personlig meddelelse). Selv om cellene som ble benyttet til forsøkene tilsynelatende var i god form, kan det tenkes at ciliatenes svømmeaktivitet kunne variere noe fra forsøk til forsøk. Graden av attraksjon var derfor sannsynligvis ikke bare påvirket av testløsningens konsentrasjon, men også cellenes tilstand og mobilitet. Denne metoden var med andre ord ikke god nok til å undersøke kjemoresponsen kvantitativt. Jeg har derfor valgt å ikke studere sammenhengen mellom respons og konsentrasjonen av L-cystein i detalj.

Både den mikrostrome- og den makrostrome formen av *T. vorax* ble tiltrukket av L-cystein i konsentrasjonsområdet 1- 50 mM. Figur 3.1 viser eksempler på akkumulering av celler rundt en lekkasjepipette fylt med 20 mM og 1 mM L-cystein for henholdsvis mikro- og makrostrome celler etter 15 min stimulering. I nærheten av kontrollpipetter som inneholdt samme løsning som i cellekammeret (normal registreringsløsning), skjedde det ingen tilsvarende akkumulering av celler, og $0,7 \pm 0,2$ % ($n = 3$) av de mikrostrome cellene befant seg da i synsfeltet etter 15 min. For den makrostrome formen befant $2,9 \pm 1,0$ % ($n = 3$) av cellene seg i synsfeltet.

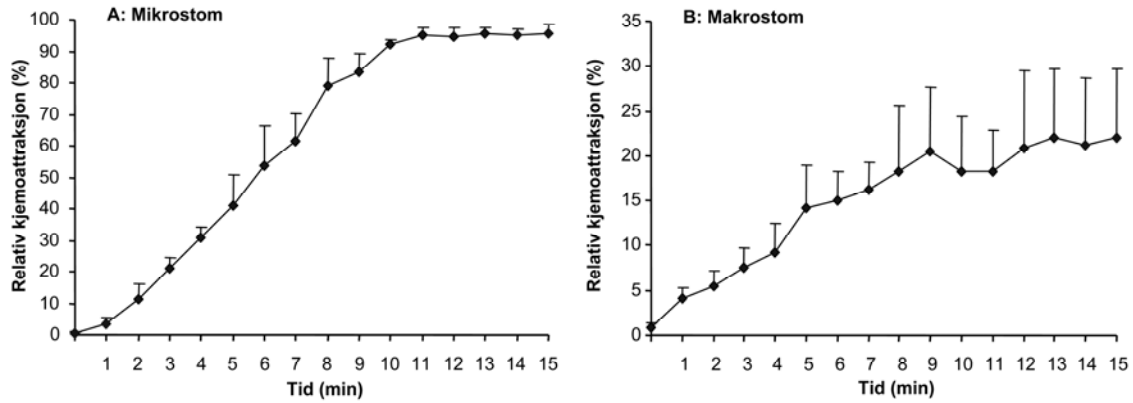
Resultater

Som nevnt i metode kapitlet økte celleantallet i synsfeltet jevnt de første åtte minuttene etter nedsenking av en lekkasjepipette fylt med tiltrekkende løsning. Deretter avtok økningen, og celleantallet var noenlunde konstant etter ti til femten minutters stimulering. Dette er vist på figur 3.2 ved stimulering med 20 mM L-cystein for mikrostome celler og med 1 mM L-cystein for makrostome celler. Hos den mikrostome formen ga L-cystein maksimal attraksjon ved 20 mM, og $95,1 \pm 2,3$ % ($n = 3$) av cellene var da akkumulert i synsfeltet etter 15 min eksponering (figur 3.4 A). For de makrostome cellene var attraksjonen maksimal for 1 mM L-cystein, og $20,8 \pm 14,2$ % ($n = 4$) av cellene befant seg da i synsfeltet etter 15 min (figur 3.4 B). Nivået av den maksimale kjemoattraksjonen var med andre ord ca 5 ganger høyere for mikrostome celler sammenlignet med makrostome celler.



Figur 3.1: Kjemokinetisk respons på L-cystein hos *T. vorax*. Bildene viser akkumulering av celler rundt en lekkasjepipette fylt med testløsning. A og C: Kontrollforsøk med henholdsvis mikro- og makrostome celler. Stimuleringspipetten var fylt med normal registreringsløsning (samme løsning som i kammeret). B: Kjemokinetisk respons på stimulering med 20 mM L-cystein hos mikrostome celler. D: Kjemokinetisk respons på stimulering med 1 mM L-cystein hos makrostome celler. Bildene ble tatt 15 min etter plassering av stimuleringspipetten.

Resultater



Figur 3.2: Tidsforløp for akkumulering av *T. vorax* celler under stimulering med L-cystein. A: Akkumulering av mikrostome celler i 3 parallelle forsøk med 20 mM L-cystein i stimuleringspipetten. B: Akkumulering av makrostome celler i 4 parallelle forsøk med 1 mM L-cystein i stimuleringspipetten. Den relative kjemoattraksjonen er definert som antall celler i synsfeltet (3 % av det totale bunnarealet) rundt spissen av stimuleringspipetten som prosent av antall celler (60) i kammeret. Celleakkumuleringen økte mest de 8-9 første minuttene etter nedsenking av stimuleringspipetten for både den mikro- og den makrostome formen. For begge formene avtok akkumuleringsraten de siste 6-7 minuttene av forsøkene. S.e.m. er indikert i figuren.

Stimuleringene med tiltrekkende konsentrasjoner av L-cystein ga relativt store endringer av osmolariteten rundt stimuleringspipetten, og det kan tenkes at ciliatenes atferd påvirkes av osmotiske variasjoner i omgivelsene. For å undersøke om den kjemokinetiske responsen på stimulering med L-cystein skyldtes osmotiske endringer, utførte jeg tilsvarende atferdsforsøk på mikrostome celler med 20 mM mannitol i lekkasjepipetten. Mannitol er et inert stoff som ikke påvirker membranreseptorer eller transporteres over cellemembranen, og brukes ofte til å justere løsnings osmolartitet uten å endre konsentrasjonen av biologisk aktive stoffer. Stimulering med 20 mM mannitol resulterte i at $1,43 \pm 0,8$ % ($n = 4$) av cellene befant seg i det definerte området etter 15 min. Dette er ikke en signifikant økning i forhold til kontrollforsøkene med normal registreringsløsning i pipetten. Det tyder på at de osmotiske endringene som oppstår rundt stimuleringspipetten ved stimulering med L-cystein, ikke kan forklare akkumuleringen av *T. vorax* ved stimulering med L-cystein.

Med økende konsentrasjoner av L-cystein reduseres løsnings pH. En løsning med 20 mM L-cystein hadde $\text{pH} = 6,2$, mens registreringsløsningen hadde $\text{pH} = 7,2$. Det ble derfor gjort atferdsforsøk for å kontrollere om redusert pH hadde tiltrekkende effekt på mikrostome celler av *T. vorax*. I disse forsøkene inneholdt lekkasjepipetten registreringsløsning med pH justert til 6,2, og $0,71 \pm 0,1$ % ($n = 3$) av cellene befant seg da i synsfeltet etter 15 min. En pH-senkning fra 7,2 til 6,2 har med andre ord ingen attraherende virkning i seg selv.

På grunn av at seleksjonen av celler forut for forsøkene og den lave celletettheten under forsøkene stresset cellene, ønsket jeg å verifisere de fraværende responsene på stimulering med 20 mM mannitol og registreringsløsning med pH = 6,2 i forsøk med dyr som var behandlet mer skånsomt. I stedet for å selektere celler manuelt ble derfor 0,5 ml av en vasket *T. vorax*-kultur overført til et cellekammer med bunnareal på 200 mm² og med et volum på 556 mm³. Celletettheten i denne kulturen var ca 500 celler per ml. Selv om stimulering med 10 mM L-cystein også i disse forsøkene ga en tydelig attraksjon, førte verken 20 mM mannitol eller registreringsløsning med pH = 6,2 til akkumulering av celler.

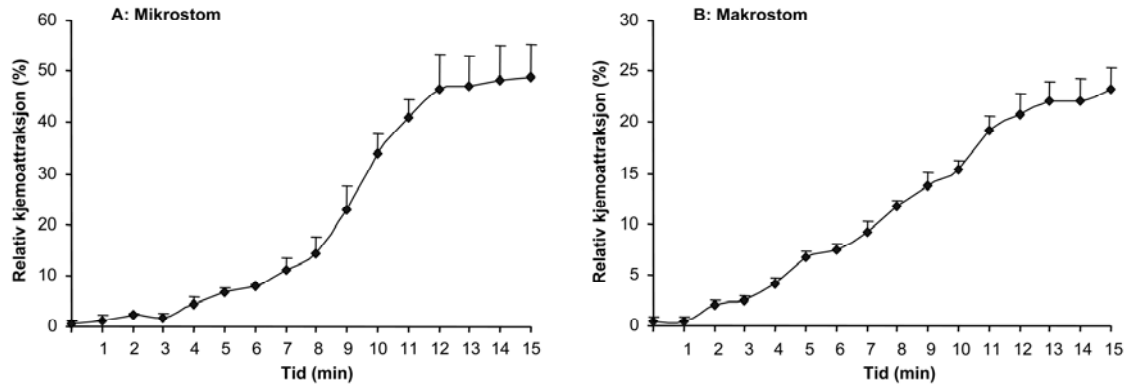
3.1.2 Atferdsrespons på et filtrat av *T. thermophila*-kultur

Som tidligere nevnt er *T. thermophila* byttedyr for den makrostome formen av *T. vorax*. Det vil derfor være gunstig om denne formen kan oppsøke næring ved å tiltrekkes av kjemiske stoffer utskilt av byttedyret. Den mikrostome formen spiser ikke *T. thermophila*, men transformeres til den makrostome formen i nærvær av denne arten. Siden de to formene forholder seg forskjellig til *T. thermophila*, var det interessant å sammenligne deres kjemokinetiske respons på filtrat av en *T. thermophila*-kultur.

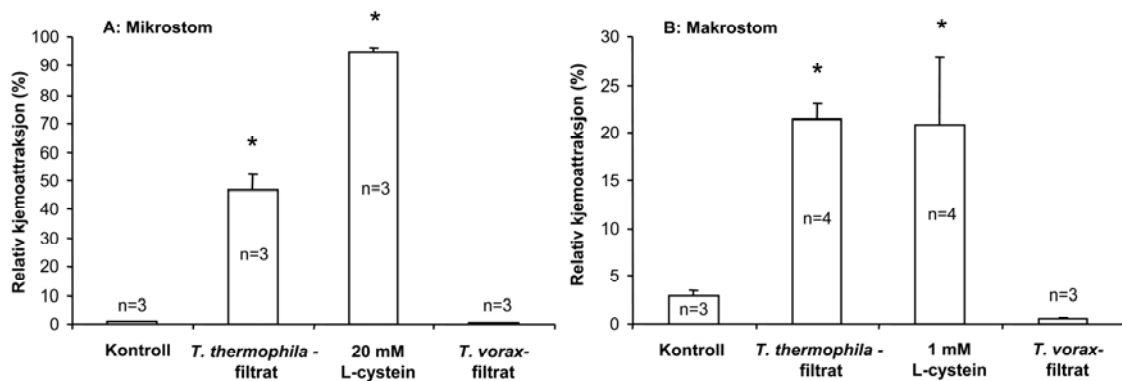
Både den mikrostome- og den makrostome formen av *T. vorax* ble tiltrukket av filtratet. På samme måte som for tiltrekkende konsentrasjoner av L-cystein økte celleantallet i synsfeltet jevnt de første åtte minuttene etter nedsenking av en lekkaksjepipette fylt med filtrat, for deretter å nå et forholdsvis stabilt nivå (figur 3.3). Etter 15 min eksponering med filtratet befant $46,6 \pm 10,0$ % ($n = 3$) av de mikrostome cellene og $21,5 \pm 3,3$ % ($n = 4$) av de makrostome cellene seg i synsfeltet (figur 3.3). Disse verdiene er signifikant forskjellig fra kontrollverdiene for begge formene.

Som nevnt i innledningen er fagocytoseprosessen hos den makrostome formen av *T. vorax* meget spesifikk og selektiv, i motsetning til næringsopptaket hos den mikrostome formen (Grønlien *et al.*, 2002). Den makrostome formen foretrekker *T. thermophila* som byttedyr fremfor mikrostome *T. vorax*-celler (Grønlien *et al.*, 2002). Seleksjonen kan blant annet skyldes kjemiske signaler skilt ut fra byttedyret. Det var derfor interessant å undersøke om *T. vorax* er i stand til å skille mellom stoffer skilt ut fra *T. thermophila* og stoffer skilt ut fra *T. vorax*. Den kjemokinetiske responsen på *T. thermophila*-filtratet ble derfor sammenlignet med den kjemokinetiske responsen på et filtrat av *T. vorax*-kultur.

Resultater



Figur 3.3: Tidsforløp for akkumulering av *T. vorax* celler under stimulering med et filtrat av *T. thermophila*-kultur. A: Akkumulering av mikrostome celler i 3 parallelle forsøk med *T. thermophila*-filtrat i stimuleringspipetten. B: Akkumulering av makrostome celler i 4 parallelle forsøk med *T. thermophila*-filtrat i stimuleringspipetten. Den relative kjemoattraksjonen er definert som antall celler i synsfeltet (3 % av det totale bunnarealet) rundt spissen av stimuleringspipetten som prosent av antall celler (60) i kammeret. Celleakkumuleringen økte mest de 10-11 første minuttene etter nedsenking av stimuleringspipetten for både den mikro- og den makrostome formen. S.e.m. er indikert i figuren.



Figur 3.4: Den kjemokinetiske responsen på ulike testløsninger hos *T. vorax*. Den relative kjemoattraksjonen er definert som antall celler i synsfeltet (ca 3 % av det totale bunnarealet) rundt spissen av stimuleringspipetten etter 15 min eksponering som prosent av antall celler (60) i kammeret. S.e.m. er indikert i figuren. A: Stimulering med et filtrat av *T. thermophila*-kultur førte til at 47 % av de mikrostome cellene akkumulerte i det definerte området. Denne verdien er ca halvparten av verdien for maksimal respons på L-cystein (95,1 %). Et filtrat av *T. vorax*-kultur hadde ingen kjemokinetisk effekt på mikrostome celler. Verdiene for responsene på *T. thermophila*-filtratet og 20 mM L-cystein er begge signifikant forskjellige fra kontrollverdien og verdien for responsen på *T. vorax*-filtratet hos mikrostome celler. B: Stimulering med et filtrat av *T. thermophila*-kultur førte til at 22 % av de makrostome cellene akkumulerte i det definerte området. Denne responsen er like kraftig som maksimal respons på L-cystein (21 %). Et filtrat av *T. vorax*-kultur hadde ingen kjemokinetisk effekt på makrostome celler sammenlignet med kontrollforsøkene. Verdiene for responsene på *T. thermophila*-filtratet og 20 mM L-cystein er begge signifikant forskjellige fra kontrollverdien og verdien for responsen på *T. vorax*-filtratet hos makrostome celler.

Resultater

Etter 15 min eksponering til et filtrat av *T. vorax*-kultur befant $0,4 \pm 0,08$ % ($n = 3$) av de mikrostome cellene og $0,6 \pm 0,3$ % ($n = 3$) av de makrostome cellene seg i synsfeltet. Stimulering med dette filtratet ga med andre ord ingen attraksjon sammenlignet med kontrollverdiene (figur 3.4).

Det var også nødvendig å verifisere den fraværende responsen på *T. vorax*-filtratet. Dette ble gjort på samme måte som for stimulering med 20 mM mannitol og registreringsløsning med PH = 6,2, slik det er beskrevet i 3.1.1. Disse forsøkene resulterte i at både mikrostom og makrostom *T. vorax* ble tiltrukket av *T. thermophila*-filtratet, mens ingen av de to formene akkumulerte rundt en lekkasjepipette fylt med *T. vorax*-filtratet.

3.1.3 Snufrekvens og svømmehastighet hos *T. vorax*

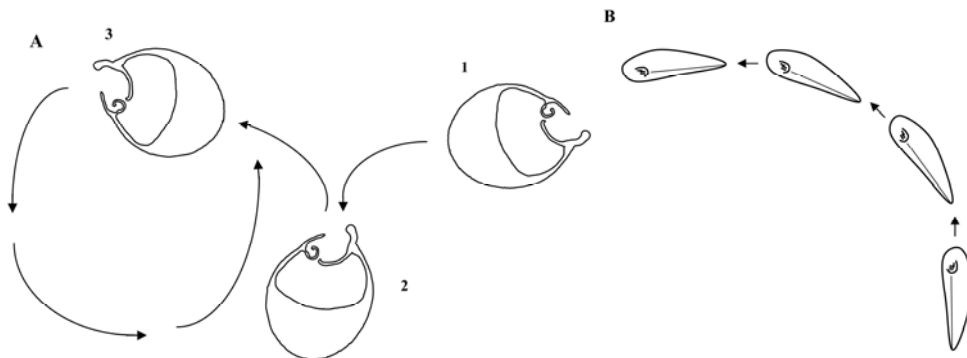
Som nevnt i metodekapittelet kan akkumulering av ciliater i et bestemt område skyldes endringer i f.eks. snufrekvens og svømmehastighet. For å undersøke om slike atferdsmekanismer var med på å forårsake attraksjon ved stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtrat, målte jeg cellenes snufrekvens og svømmehastighet under stimuleringen. Alle målingene av snufrekvens og svømmehastighet under stimulering med testløsningene ble gjort i synsfeltet rundt pipettespissen i det 14. min etter start av stimuleringen, da akkumuleringen av celler i dette området var maksimal.

Kontrollmålingene ble derimot gjort over et større tidsintervall, da det ikke var nok celler i synsfeltet i det 14. min til å få et tilfredsstillende utvalg. Jeg valgte å gjøre målingene på makrostome celler ved stimulering med 1 mM L-cystein siden denne konsentrasjonen ga maksimal respons på L-cystein. Maksimal respons på stimulering med L-cystein hos mikrostome celler var imidlertid så kraftig at celletettheten i synsfeltet var for høy til å gjøre målinger. Cellene kolliderte stadig med hverandre, noe som kunne virke inn på både snufrekvensen og svømmehastigheten. For mikrostome celler valgte jeg derfor å måle snufrekvens og svømmehastighet ved stimulering med 10 mM L-cystein.

I normalt registreringsmedium har de mikrostome cellene høyere hastighet og lavere snufrekvens enn de makrostome cellene. I kontrollforsøkene var snufrekvensen til de mikrostome cellene $0,13 \pm 0,16$ vendinger/s ($n = 30$), mens de makrostome snudde $0,23 \pm 0,11$ ganger/s ($n = 30$). Svømmehastigheten i kontrolløsningen var $209,9 \pm 95,4$ $\mu\text{m/s}$ ($n = 30$) for de mikrostome cellene og $95,0 \pm 51,8$ $\mu\text{m/s}$ ($n = 30$) for de makrostome cellene. Selve retningsendringen er svært forskjellig i de to formene (Figur 3.5). Den

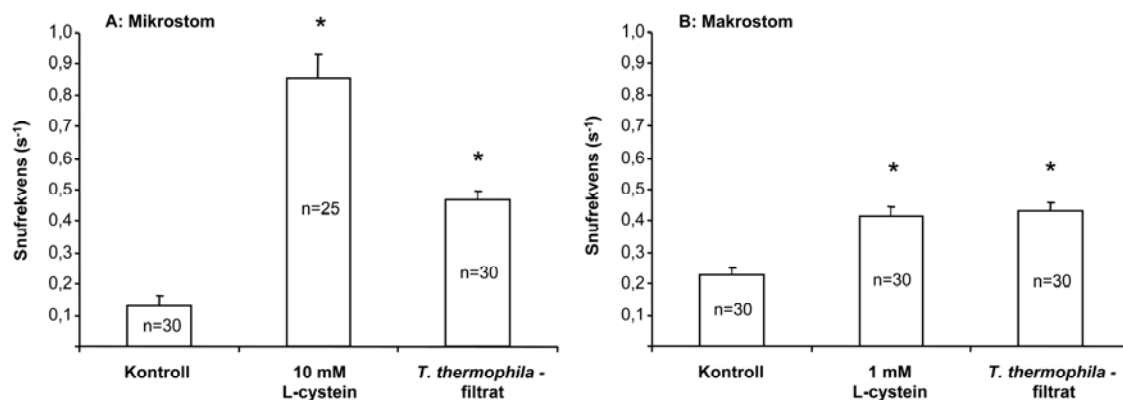
Resultater

makrostome formen vender som regel ved at den stopper opp og rygger en kort periode før den svømmer fremover i ny retning. Den mikrostome formen derimot svømmer kontinuerlig fremover og vender uten å rygge.



Figur 3.5: Skjematisk fremstilling av vendingen til mikrostom og makrostom *T. vorax*. A: Den makrostome formen vender ved at den rygger en kort periode før den svømmer fremover i ny retning. Makrostome celler har også en tendens til å svømme i sirkel. B: Den mikrostome svømmer i stor grad kontinuerlig fremover og vender uten å rygge.

Ved stimulering med 10 mM L-cystein økte snufrekvensen til de mikrostome cellene fra $0,13 \pm 0,16$ vendinger/s i kontrollforsøkene til $0,86 \pm 0,37$ vendinger/s ($n = 25$) (figur 3.6 A). Snufrekvensen til makrostome celler stimulert med 1 mM L-cystein økte fra $0,23 \pm 0,11$ vendinger/s i kontrollen til $0,42 \pm 0,15$ vendinger/s ($n= 30$) ved stimulering med 1 mM L-cystein (figur 3.6 B).

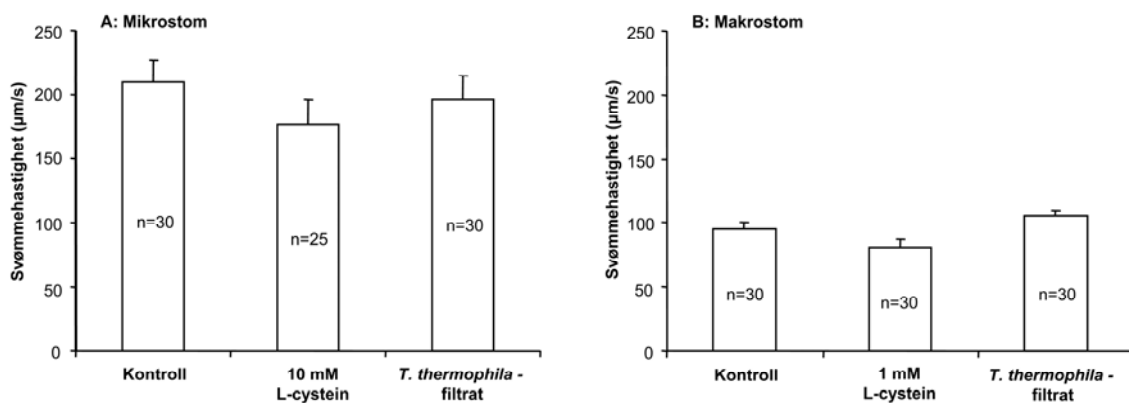


Figur 3.6: Snufrekvens hos *T. vorax* under stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtrat. A: Snufrekvensen hos mikrostome celler økte under stimulering med 10 mM L-cystein og *T. thermophila*-filtratet. Hos den mikrostome formen ble snufrekvensen målt for 30 celler (25 celler ved stimulering med 10 mM L-cystein) fordelt på 3 parallelle forsøk. Stjerne indikerer at snufrekvensen er signifikant økt sammenliknet med kontrollverdien. S.e.m. er indikert i figuren. B: Snufrekvensen hos makrostome celler økte under stimulering med 1 mM L-cystein og *T. thermophila*-filtratet. Hos den makrostome formen ble snufrekvensen målt for 30 celler fordelt på 3 parallelle forsøk. Stjerne indikerer at snufrekvensen er signifikant økt sammenliknet med kontrollverdien. S.e.m. er indikert i figuren.

Resultater

Ved stimulering med *T. thermophila*-filtratet økte snufrekvensen til $0,47 \pm 0,16$ vendinger/s ($n = 30$) for de mikrostome cellene og til $0,43 \pm 0,14$ vendinger/s ($n = 30$) for de makrostome cellene (figur 3.6).

L-cystein-løsningene og *T. thermophila*-filtratet ga imidlertid ingen signifikante endringer i svømmehastigheten for verken mikro- eller makrostome celler (figur 3.7). Under stimulering med L-cystein hadde de mikrostome cellene en hastighet på $177,3 \pm 95,8 \mu\text{m/s}$ ($n = 25$), mens de makrostome cellene hadde en hastighet på $80,9 \pm 71,8 \mu\text{m/s}$ ($n = 30$). Under stimulering med *T. thermophila*-filtratet var hastigheten $195,9 \pm 102,9 \mu\text{m/s}$ ($n = 30$) for de mikrostome cellene og $105,4 \pm 51,9 \mu\text{m/s}$ ($n = 30$) for de makrostome cellene.



Figur 3.7: Svømmehastighet hos *T. vorax* celler under stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtrat. Svømmehastigheten er generelt lavere for makrostome celler enn for mikrostome celler. A: Stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtratet ga ingen signifikante endringer i svømmehastigheten hos mikrostome celler. Svømmehastigheten hos den mikrostome formen ble målt for 30 celler (25 celler ved stimulering med 10 mM L-cystein) fordelt på 3 parallelle forsøk. S.e.m. er indikert i figuren. B: Stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtratet ga ingen signifikante endringer i svømmehastigheten hos makrostome celler. Svømmehastigheten hos den makrostome formen ble målt for 30 celler fordelt på 3 parallelle forsøk.

3.2 Elektrofysiologiske membranresponser på elektriske, kjemiske og mekaniske stimuli hos *T. vorax*

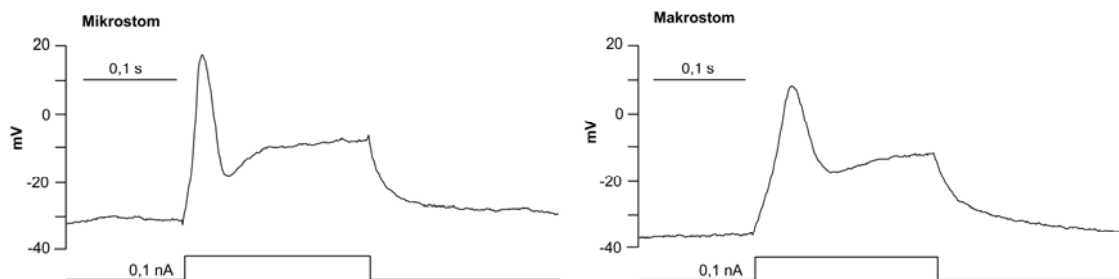
3.2.1 Responser på elektrisk stimulering

Som nevnt i metodekapittelet vil membranskader knyttet til elektrodepenetringen redusere membranpotensialet. Forkastningskriteriet for hvilemembranpotensialet ble satt

Resultater

på bakgrunn av tidligere studier (Jansen & Sand, 1995; Bruskeland & Sand, 1999). Celler som hadde et grunnere hvilemembranpotensial enn -20 mV ble forkastet. For de cellene der de elektrofysiologiske registreringene ble akseptert, var det gjennomsnittlige hvilemembranpotensialet til *T. vorax* $-30,5 \pm 3,8$ mV ($n = 64$) for mikrostome celler og $-30,4 \pm 7,0$ mV ($n = 96$) for makrostome celler.

Depolariserende strømpulser over en viss størrelse aktiverer spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler hos *T. vorax* (Jansen & Sand, 1995). Den regenerative responsen er gradert, og amplituden på spiken øker med økende stimulusstyrke. Stigeraten på spiken er lavere hos makrostome celler enn hos mikrostome celler. Det skyldes at tettheten av Ca^{2+} -kanaler er høyere hos mikrostome celler enn hos makrostome celler (Jansen & Sand, 1995). Figur 3.8 viser typiske Ca^{2+} -spikes induert av depolariserende strømpulser hos en mikrostom og en makrostom celle av *T. vorax*. I disse eksemplene er strømpulsene tilstrekkelig store til å gi Ca^{2+} -spikes med maksimal amplitude og stigerate. Jeg studerte ikke responser på elektrisk stimulering i detalj i denne oppgaven. Det er imidlertid viktig å være klar over at tilstrekkelig store depolariseringer induert av fysiologiske stimuli, som for eksempel kjemisk eller mekanisk påvirkning, også kan føre til aktivering av spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler og regenerative membranresponser.



Figur 3.8: Ca^{2+} -spikes induert av depolariserende strømpulser hos en mikrostom og en makrostom *T. vorax*. Depolariserende strømpulser over en hvis størrelse aktiverer spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler. Den regenerative responsen er gradert og amplituden på spiken øker med økende stimulusstyrke. Stigeraten på spiken er lavere hos makrostome celler enn hos mikrostome celler. Det skyldes at tettheten av Ca^{2+} -kanaler er høyere hos mikrostome celler enn hos makrostome celler.

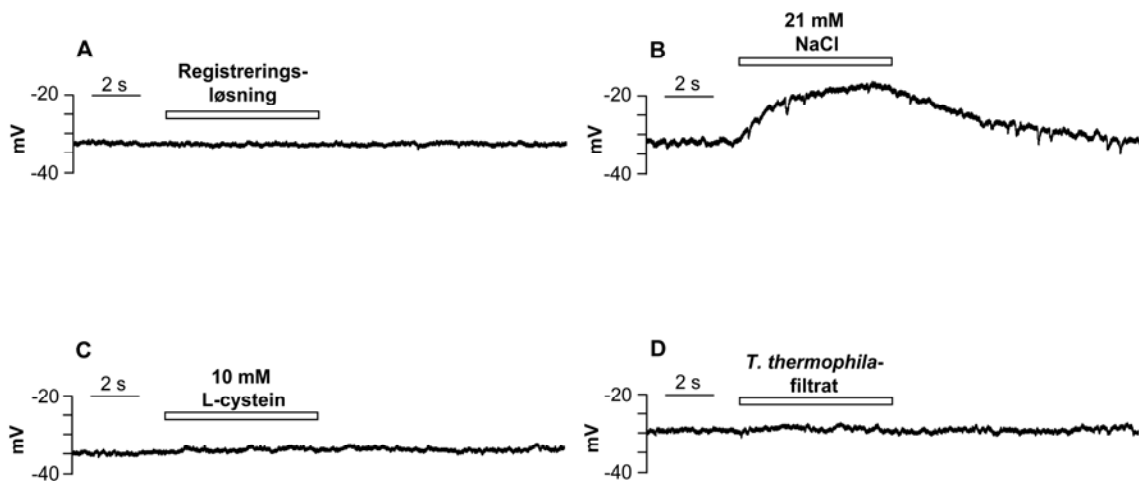
3.2.2 Elektrofysiologiske membranresponser på stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtrat hos *T. vorax*

Ciliaters bevegelsesmønster henger nøye sammen med membranpotensialet. En depolarisering fører til at cilienes slagretning reverseres, mens en hyperpolarisering gir økt

Resultater

svømmehastighet ved at cilienes slagfrekvens øker. Siden stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtrat ga akkumulering av *T. vorax*, var det interessant å undersøke eventuelle membranresponser på stimulering med disse forbindelsene. Siden stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtrat øker snufrekvensen hos *T. vorax*, var det ikke urimelig å forvente en depolarisering som respons på disse forbindelsene.

Figur 3.9 viser representative registreringer fra mikroostome celler ved stimulering med ulike testløsninger. For å kontrollere at påsprøytingsystemet virket, stimulerte jeg også med NaCl, som depolariserer cellen (Rønnevig, 1992). Gjennomsnittsverdien for depolariseringen av mikroostome celler stimulert med 21 mM NaCl var $11,6 \pm 2,2$ mV (n = 8). Det var ingen tydelig forskjell i depolariseringen avhengig av hvilken del av dyret som ble stimulert. Hverken L-cystein eller *T. thermophila*-filtrat, som begge er attraktanter for *T. vorax*, ga derimot elektrofysiologiske membranresponser hos mikroostome celler. Dette var tilfelle både når testløsningene ble sprøytet foran og bak på de mikroostome cellene.



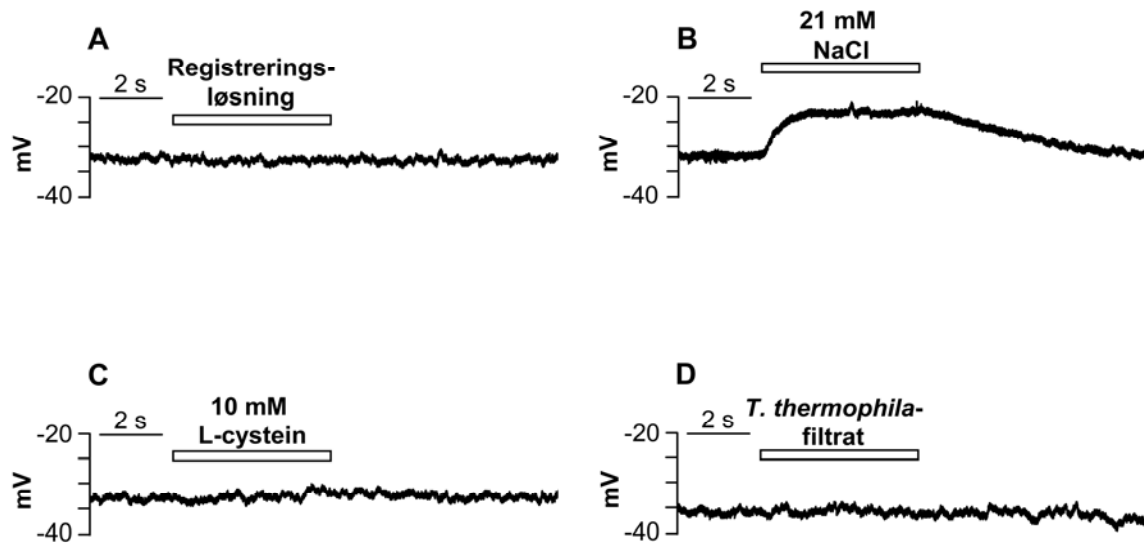
Figur 3.9: Registreringer fra mikroostome celler ved påsprøyting med ulike testløsninger.

A: Kontrollforsøk der stimuleringspipetten inneholdt samme løsning som i registreringskammeret. B: Stimulering med 21 mM NaCl depolariserte cellen med ca 15 mV. C: Stimulering med 10 mM L-cystein forårsaket ingen elektrofysiologiske membranresponser hos mikroostome celler. D: Stimulering med *T. thermophila*-filtrat forårsaket heller ingen elektrofysiologiske membranresponser hos mikroostome celler. Stimuleringsperioden er indikert med horisontal søyle.

Gjennomsnittsverdien for depolarisering ved påsprøyting av 21 mM NaCl var $12,3 \pm 1,9$ mV (n = 7) hos de makrostome cellene. Hos de makrostome cellene var det imidlertid ulike responser på L-cystein og *T. thermophila*-filtrat ved påsprøyting foran og bak. Figur 3.10 viser representative registreringer fra makrostome celler ved stimulering

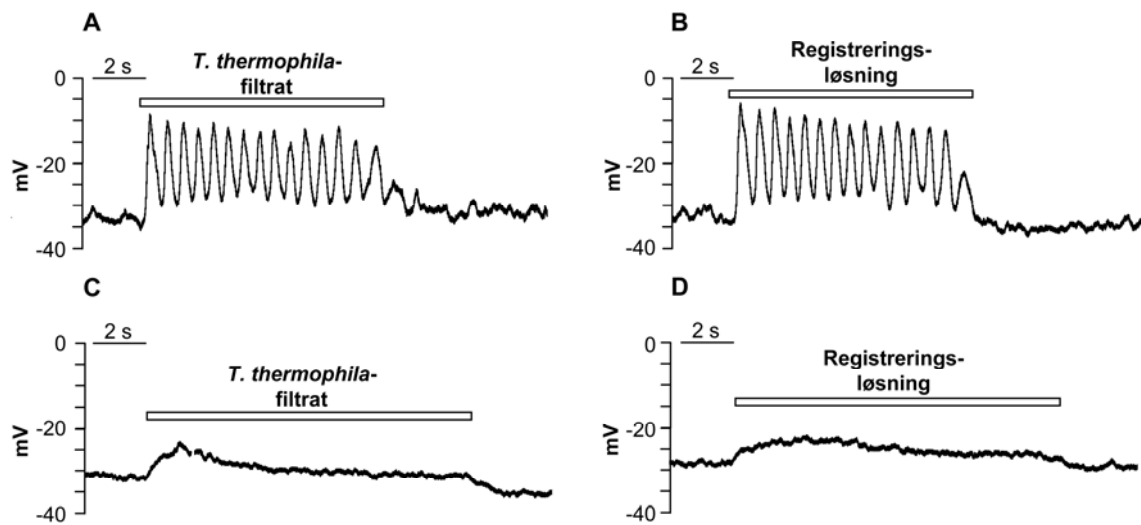
Resultater

med ulike testløsninger på cellens bakpart. Ved påsprøyting på bakparten av makrostome celler forårsaket verken L-cystein eller *T. thermophila*-filtrat elektrofysiologiske responser.



Figur 3.10: Registreringer fra makrostome celler ved påsprøyting med ulike testløsninger på cellens bakpart. A: Kontrollforsøk der stimuleringspipetten inneholdt samme løsning som i registreringskammeret. B: Stimulering med 21 mM NaCl depolariserte cellen med ca 9 mV. C: Påsprøyting med 10 mM L-cystein på bakparten av makrostome celler forårsaket ingen elektrofysiologiske membranresponser. D: Påsprøyting med *T. thermophila*-filtrat på bakparten av makrostome celler forårsaket heller ingen elektrofysiologiske membranresponser. Stimuleringsperioden er indikert med horisontal søyle.

Figur 3.11 viser typiske registreringer fra makrostome celler ved påsprøyting med *T. thermophila*-filtrat og registreringsløsning på cellens frontparti. Påsprøyting med *T. thermophila*-filtratet resulterte i membranresponser som varierte fra svake depolariseringer på ca 5 mV til kraftige oscillerende depolariseringer på ca 25 mV. Påsprøyting med registreringsløsning kunne også forårsake svake depolariseringer på ca 5 mV. Ved å øke påsprøytingstrykket var det imidlertid mulig å indusere samme type oscillerende membranresponser som ved påsprøyting med *T. thermophila*-filtratet. Det er derfor uklart om de depolariserende membranresponsene på L-cystein og *T. thermophila*-filtrat skyldes kjemosensitivitet. En alternativ forklaring er at disse responsene helt eller delvis er mekanoresponser utløst av påsprøytingens væskestrøm. Det er vanskelig å si om testløsningene har elektrofysiologisk effekt på makrostome celler. Det kan tenkes at det er kjemoreseptorer for L-cystein og *T. thermophila*-filtrat i munnregionen, og at aktivering av disse reseptorene fører til depolarisering. Ved påsprøyting foran er det imidlertid mulig at eventuelle membranresponser på kjemiske signaler bli kamuflert av relativt kraftige mekanoresponser.



Figur 3.11: Registreringer fra makrostome celler ved påsprøyting med *T. thermophila*-filtrat og registreringsløsning på cellens frontparti. A og B: Påsprøyting med *T. thermophila*-filtrat foran på makrostome celler resulterte i membranresponser som varierte fra svake depolariseringer på ca 5 mV til oscillerende depolariseringer på ca 25 mV. C: Påsprøyting med registreringsløsning kunne også forårsake svake depolariseringer på ca 5 mV. D: Ved å øke påsprøytingstrykket forårsaket påsprøyting med registreringsløsning oscillerende depolariseringer på ca 25 mV. Stimuleringsperioden er indikert med horisontal søyle.

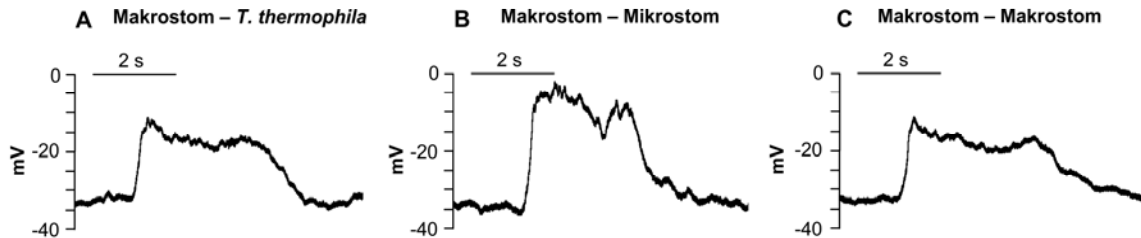
3.2.3 Elektrofysiologiske membranresponser på celle-celle kontakt

Atferdsforsøkene viste at *T. vorax* var i stand til å skille mellom filtrater av *T. thermophila*- og *T. vorax*-kulturer. Dette kan være en forklaring på hvordan makrostome celler er i stand til å selektere byttedyr. Det kan også tenkes at gjenkjennelsen av *T. thermophila*-celler er avhengig av fysisk kontakt. Membranresponser på berøring av *T. thermophila* og *T. vorax* i munnregionen hos makrostome celler ble derfor undersøkt og sammenlignet. Disse forsøkene ble gjort i cellekammer som inneholdt både *T. thermophila*, mikro- og makrostom *T. vorax*, og ved relativ høy celletetthet. Tilfeldige celleberøringer i munnregionen på forsøksdyret ble observert på en monitorskjerm, og cellens membranresponser ble registrert.

Figur 3.12 viser membranresponser på berøring av *T. thermophila* og *T. vorax* i munnregionen til makrostome celler. Membranresponsene på berøring av de ulike cellypene er relativt like, og det er lite sannsynlig at makrostome celler kan selektere byttedyr på bakgrunn av disse responsene. Gjennomsnittsverdien for depolariseringen induisert av berøring med *T. thermophila* var $22,4 \pm 3,6$ mV ($n = 5$), mens de tilsvarende verdiene for mikro- og makrostom *T. vorax* var henholdsvis $24,1 \pm 4,5$ mV ($n = 7$) og

Resultater

24,4 ± 3,2 mV (n = 4). Berøring andre steder på cellekroppen enn munnregionen ga ingen tydelig respons.



Figur 3.12: Membranresponser på berøring av *T. thermophila* og *T. vorax* i munnregionen til makrostome celler. A: Berøring av en mikrostom *T. vorax* i munnregionen til en makrostom *T. vorax* forårsaket ca 32 mV depolarisering av den makrostome cellen. B: Berøring av en *T. thermophila* i munnregionen hos en makrostom *T. vorax* induiserte ca 20 mV depolarisering av den makrostome cellen. C: Fysisk kontakt mellom to makrostome celler førte til ca 23 mV depolarisering.

Depolariseringene var så kraftige at de spenningsstyrte Ca^{2+} -kanalene i ciliene ble aktivert og cilienes slagretning reverserte. Dette kunne jeg observere ved at de makrostome cellene vrei seg på elektroden ved berøring av andre celler i munnregionen. Under atferdsforsøkene observerte jeg at makrostome celler som gikk i kultur med mikrostome celler og *T. thermophila*-celler, stadig berører andre celler i frontpartiet. I det berøringen skjer, rygger den makrostome cellen en kort periode samtidig som cellen den berører sitter festet til munnpartiet. Disse observasjonene stemmer bra overrens med den elektrofysiologiske membranresponsen.

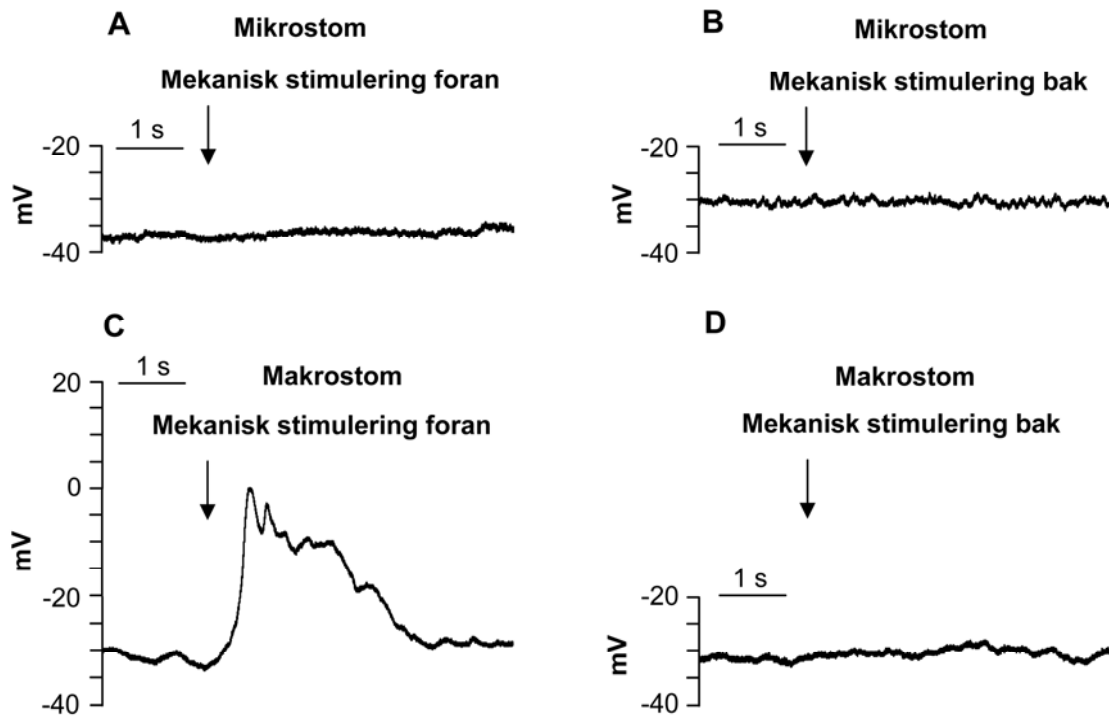
3.2.4 Membranresponser på mekanisk stimulering med glassnål

Membranresponsene på cellekontakt kan skyldes aktivering av spesifikke reseptorer på cellenes overflate, men de kan også være et resultat av aktivering av uspesifikke mekanoreseptorer. Påsprøyting foran på makrostome celler forårsaket membranresponser som kunne skyldes uspesifikk mekanoresepsjon. Påsprøyting foran på mikrostome celler forårsaket ikke slike responser, og det kan tyde på at de to formene er forskjellige med hensyn på mekanosensitivitet. Det var derfor interessant å sammenligne de mekanosensitive egenskapene til den mikrostome og den makrostome formen. Cellene ble stimulert mekanisk med en glassnål som var ca 10 μm bred i tuppen. Glassnålen ble ført

Resultater

inntil cellen ved hjelp av en motorisert mikromanipulator, mens membranpotensialet ble målt.

Figur 3.13 viser typiske registreringer fra henholdsvis mikro- og makrostome celler ved mekanisk stimulering foran og bak. Berøring i munnapparatet hos makrostome celler ga en depolarisering på $23,0 \pm 6,8$ mV (n = 6).



Figur 3.13: Membranresponser på mekanisk stimulering med en glassnål foran og bak på *T. vorax*. A og B: Mekanisk stimulering med en glassnål ga ingen elektrofysiologiske membranresponser hos mikrostrome celler. C: Mekanisk stimulering i munnregionen hos en makrostom celle førte til en depolarisering på ca 35 mV. D: Mekanisk stimulering bak på en makrostom celle ga ingen elektrofysiologiske membranresponser.

Denne responsen var ikke et rent reseptorpotensial siden depolariseringen var så kraftig at de spenningsstyrte Ca^{2+} -kanalene i ciliene ble aktivert. Mekanisk stimulering på cellens bakpart ga ingen membranrespons. Mekanisk stimulering av den mikrostrome formen ga ingen membranresponser. Dette tyder på at det blir uttrykt nye mekanoreseptorer under transformeringen.

Det ble gjort observasjoner som stemmer bra overens med de elektrofysiologiske membranresponsene på mekanisk stimulering. Når en makrostom celle kolliderer med forenden mot et hinder, observeres en unnvikelsesreaksjon (unnvikelsesreaksjon for

Resultater

Paramecium er beskrevet i 1.2.4). Mikrostome celler rygger derimot ikke ved kollisjon med forenden, men klenger seg langs kanten av hinderet.

4 Diskusjon

4.1 Kjemoresponser hos mikrostrom og makrostrom *T. vorax*

4.1.1 Atferdsresponser på L-cystein

Det er tidligere vist at *T. thermophila* attraheres av 1 mM L-cystein (Levandowsky *et al.*, 1984). Både den mikrostrome og den makrostrome formen av *T. vorax* ble tiltrukket av L-cystein i konsentrasjonsområdet 1-50 mM. Hos mikrostrome celler ga L-cystein maksimal attraksjon ved 20 mM, da 95 % av cellene akkumulerte i synsfeltet, mens den makrostrome formen viste maksimal attraksjon på L-cystein ved 1 mM, da 21 % av cellene akkumulerte i synsfeltet (se figur 3.4). Den mikrostrome formen viste med andre ord en sterkere attraksjon enn den makrostrome formen. Dette henger trolig sammen med at de to formene har ulike svømmemønstre. De mikrostrome cellene beveger seg med høyere hastighet og lavere initiell snufrekvens enn de makrostrome cellene, og dekker derfor et større område i en bestemt tidsperiode.

Som nevnt i resultatkapittelet påfører seleksjon av enkeltceller og den lave celletettheten i forsøkskammeret ciliatene fysisk stress (Hellung-Larsen, 2005; A. Løvlie, personlig meddelelse). Graden av attraksjon var derfor sannsynligvis ikke bare påvirket av testløsningens konsentrasjon, men også av cellenes tilstand og mobilitet. Jeg valgte derfor å ikke lage en dose-responskurve for L-cystein. For begge de to formene av *T. vorax* ga 0,1 mM L-cystein ingen attraksjon, mens det var en signifikant akkumulering av celler nær en pipette med 1 mM L-cystein. Det er derfor sannsynlig at de to formene har forholdsvis lik sensitivitet, selv om de viste maksimal respons ved ulike konsentrasjoner.

Det fysiske stresset som cellene ble påført ved fangst og overføring til testkammeret kunne vært redusert ved å øke seleksjonspipettens volum (Hellung-Larsen, 2005). Det hadde også vært gunstig å øke celletettheten i kammeret. En høyere celletetthet i utgangspunktet gjorde det imidlertid vanskelig å kvantifisere attraksjonen, siden celletettheten nær pipetten da ble for høy til at cellene kunne telles nøyaktig. Som et alternativ til å selektere 60 celler manuelt, som jeg gjorde i dette hovedfagsarbeidet, kunne det fysiske stresset av forsøksdyrene vært redusert ved å fortynne en kultur med en bestemt celletetthet. Grunnen til at jeg selekterte celler manuelt, var at jeg på det tidspunktet

atferdsforsøkene ble gjort, ikke hadde noen metode for induksjon av transformering som ga en kultur med 100 % makrostome celler helt fri for byttedyr. Siden jeg skulle undersøke den eventuelle kjemoresponsen på et filtrat av byttedyrene, var det nødvendig å selektere makrostome celler. For å kunne ha et likt sammenligningsgrunnlag for de to formene av *T. vorax* ble også de mikrostome cellene selektert manuelt.

L-cystein ble løst i normalt registreringsmedium, som har begrenset bufferkapasitet. De høyeste konsentrasjonene av L-cystein som ble testet, hadde derfor lavere pH enn registreringsmediet. En testløsning med 20 mM L-cystein hadde således pH = 6,2, mens registreringsløsningen hadde pH = 7,2. I tillegg var det en økt osmolaritet rundt pipettespissen under atferdsforsøkene. Verken stimulering med registreringsløsning justert til pH = 6,2 eller en testløsning med 20 mM mannitol ga akkumulering av *T. vorax*. Dette tyder på at den observerte tiltrekningen av *T. vorax* mot L-cystein ikke skyldtes pH- eller osmotiske endringer i mediet.

4.1.2 Atferdsresponsen på et filtrat av *T. thermophila*-kultur

Ved stimulering med et *T. thermophila*-filtrat var det heller ingen kvalitativ forskjell i den kjemokinetiske responsen hos de to formene av *T. vorax* (se figur 3.4). På samme måte som ved stimulering med L-cystein, var imidlertid attraksjonen kraftigere for den mikrostome formen enn for den makrostome formen (47 % av de mikrostome cellene og 21 % av de makrostome cellene akkumulerte i synsfeltet).

Et filtrat av *T. vorax*-kultur hadde ingen kjemokinetisk effekt på verken mikrostom eller makrostom *T. vorax* (se figur 3.4). Dette viser at makrostome celler er i stand til skille mellom utskilte stoffer fra *T. thermophila*-celler og mikrostome *T. vorax*-celler, og det kan være forklaringen på hvordan makrostome celler er i stand til å selektere byttedyr. Mikrostome celler kan også ha en fordel av å bli tiltrukket av *T. thermophila*-filtratet, fordi det vil være hensiktsmessig å kunne oppsøke områder med mye *T. thermophila* for deretter å øke næringstilgangen ved å transformeres.

4.1.3 Snufrekvens og svømmehastighet hos *T. vorax*

Som nevnt ovenfor er svømmemønsteret hos de to formene av *T. vorax* svært forskjellig. I kontrollforsøkene hadde de mikrostome cellene en hastighet på 210 $\mu\text{m/s}$, mens hastigheten for makrostome celler var 95 $\mu\text{m/s}$ (se tabell 4.1 og 4.2). Snufrekvensen i

Diskusjon

kontrollforsøkene var 0,13 vendinger/s for mikrostome og 0,23 vendinger/s for makrostome celler (se tabell 4.1 og 4.2). Verdiene for snufrekvensen til mikrostome celler avviker relativt mye fra verdiene i Rønnevig's hovedfagsoppgave fra 1992. Rønnevig målte en snufrekvens på 0,4 vendinger/s i kontrollforsøkene. Dette er nesten tre ganger høyere enn mine resultater. Jeg valgte å definere én vending som en retningsendring på 90 ° eller mer. Det kommer ikke frem i Rønnevig's oppgave hva hun definerte som en vending. Forklaringen på det store avviket kan være at hun opererte med en annen definisjon. Rønnevig opererte med to verdier for hastighet. Én der vendingene inngikk i målingen av gjennomsnittshastigheten, og én for celler som svømte rett over synsfeltet uten å endre retning. Hastigheten for den første gruppen var 130 $\mu\text{m/s}$, mens hastigheten for den siste gruppen var 260 $\mu\text{m/s}$. Under stimulering med testløsningene observerte jeg ingen celler som svømte rett over synsfeltet uten å endre retning, mens dette hovedsakelig var tilfelle under kontrollforsøkene. Hastigheten i kontrollforsøkene ble derfor målt ut fra den tiden cellene brukte på å passere synsfeltet, mens hastigheten under stimulering med testløsningene ble målt mellom to påfølgende vendinger. Selv om premisene for målingene i kontroll- og testforsøkene er ulike, har dette liten betydning siden akselerasjonstiden er svært lav. Cellenes store overflate i forhold til volumet gjør at friksjonskreftene som må overvinnes under svømmingen, er langt større enn den kraften som er nødvendig for å akselerere dyret etter en vending. For så små organismer virker med andre ord vann som en svært viskøs væske. Dette fører til at akselerasjonstiden blir neglisjerbar og hastigheten mellom vendingene er så å si konstant.

Snufrekvensen økte i forhold til kontrollforsøkene hos begge formene ved stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtratet, mens det ikke var signifikante endringer i svømmehastigheten (se tabell 4.1 og 4.2). Snufrekvensen økte mer hos den mikrostome formen enn hos den makrostome formen ved stimulering med testløsningene. Dette kan ha en sammenheng med at den mikrostome formen viser sterkere attraksjon enn den makrostome formen. I de tidligere forsøkene til Rønnevig (1992) var atferdsresponsene på stimulering med attraktantene protosepton og BSA også en økning i snufrekvensen, men i tillegg ble også hastigheten redusert.

I alle tidligere studier som er publisert i forbindelse med kjemorespons hos *Paramecium*, er akkumulering og repulsjon assosiert med endringer i snufrekvens og svømmehastighet. Dette har også i stor grad vært tilfelle for *Tetrahymena*, men Leick (1988) og Hellung-Larsen *et al.* (1990) konkluderte med at attraksjonen av *T. thermophila* og *T. pyriformis* ved stimulering med PDGF og fibroblast-vekstfaktor ikke var et resultat

Diskusjon

av moduleringer av snufrekvens og svømmehastighet. De foreslo derimot at kjemoresponsen på disse forbindelsene hos *T. thermophila* og *T. pyriformis* er retningsbasert. En retningsbasert kjemorespons kalles som nevnt kjemotaxis. På grunnlag av forsøkene i mitt hovedfagsarbeid og studiene til Rønnevig (1992) er det ikke mulig å si om kjemoresponsen hos *T. vorax* er retningsbasert. Den observerte attraksjonen kan imidlertid forklares bare med den økte snufrekvensen nær pipettespissen, og responsen skyldes derfor mest sannsynlig kjemokinese.

Tabell 4.1: Oversikt over middelverdiene for snufrekvens og svømmehastighet hos mikrostore celler.

	Snufrekvens (vendinger/s)	Svømmehastighet ($\mu\text{m/s}$)
Kontroll	0,13 \pm 0,16 (n = 30)	209,9 \pm 95,4 (n = 30)
10 mM L-cystein	0,86 \pm 0,37 (n = 25)	177,3 \pm 95,8 (n = 25)
<i>T. thermophila</i>- filtrat	0,47 \pm 0,16 (n = 30)	195,9 \pm 102,9 (n = 30)

Tabell 4.2: Oversikt over middelverdiene for snufrekvens og svømmehastighet hos makrostore celler.

	Snufrekvens (vendinger/s)	Svømmehastighet ($\mu\text{m/s}$)
Kontroll	0,23 \pm 0,11 (n = 30)	95,0 \pm 51,8 (n = 30)
1 mM L-cystein	0,42 \pm 0,15 (n = 30)	80,9 \pm 71,8 (n = 30)
<i>T. thermophila</i>- filtrat	0,43 \pm 0,14 (n = 30)	105,4 \pm 51,9 (n = 30)

4.1.4 Elektrofysiologiske membranresponser på stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtrat hos *T. vorax*

Rønnevig (1992) fant at Van Houtens (1978) membranpotensialmodell for kjemokinese hos *Paramecium* ikke gjaldt for *T. vorax*. Når hun eksponerte *T. vorax* med protosepepton, som er en sterk attraktant, depolariserte cellen. Depolariseringen skyldtes imidlertid ikke de attraherende komponentene i protosepepton, men Na^+ som protosepepton inneholder en del av. Na^+ alene gir ingen attraksjon, men derimot en spredning av ciliatene. Ved å tilsette Na^+ til BSA, som er en hyperpolariserende attraktant, reverseres den elektrofysiologiske responsen. Atferdsresponsen på en løsning med både Na^+ og BSA var imidlertid den samme som atferdsresponsen på BSA alene.

Heller ikke mine resultater tilsier at det er en nødvendig sammenheng mellom kjemorespons og elektrofysiologisk respons hos ciliater. Verken L-cystein eller *T. thermophila*-filtratet forårsaket elektrofysiologiske membranresponser hos den mikrostome formen (se figur 3.9). Dette stemmer dårlig overens med Van Houtens modell, der grunnlaget for kjemokinesen er endringer i membranpotensialet. Mine data stemmer derimot bra overens med Rønnevigs resultater, som viser at en attraktant ikke nødvendigvis inducerer membranpotensialendringer hos *T. vorax*.

L-cystein og *T. thermophila*-filtratet induserte heller ingen membranresponser ved påsprøyting bak på makrostome celler (se figur 3.10). Ved påsprøyting foran på makrostome celler forårsaket *T. thermophila*-filtrat elektrofysiologiske responser som varierte fra svake depolariseringer på ca 5 mV til kraftige oscillerende depolariseringer (se figur 3.11). Siden jeg kunne indusere samme type oscillerende membranresponser ved å øke påsprøytingstrykket i kontrollforsøk med normal registreringsløsning i stimuleringspipetten, er det uklart om membranresponsen på *T. thermophila*-filtratet skyldtes kjemosensitivitet. Det er mulig disse responsene helt eller delvis er mekanoresponser utløst av påsprøytingens væskestrøm. Det kan tenkes at det i munnregionen er kjemoreseptorer for bestemte komponenter i *T. thermophila*-filtratet, og at aktivering av disse reseptorene fører til depolarisering. Ved påsprøyting foran er det imidlertid mulig at eventuelle membranresponser på kjemiske signaler blir kamuflert av relativt kraftige mekanoresponser.

I alle tidligere studier på dette området er det vist en sammenheng mellom kjemokinetiske og elektrofysiologiske responser hos ciliater. Disse studiene er hovedsaklig gjort på *Paramecium*, *T. thermophila* og *T. pyriformis*. Det er derfor mulig at mekanismene som ligger til grunn for kjemokinese hos *T. vorax* skiller seg fra mekanismene hos andre

ciliatarter. Som nevnt i innledningen er mekanismen som styrer cilieverseringen Ca^{2+} -avhengig (Naitoh & Kaneko, 1972; Naitoh, 1974). Siden snufrekvensen til *T. vorax* øker ved stimulering med L-cystein og *T. thermophila*-filtratet, er det rimelig å anta at signalveien for disse forbindelsene er Ca^{2+} -avhengig. Da disse forbindelsene ikke induserer membrandepolariseringer, må en økning i cytosolisk Ca^{2+} -nivå i så fall skyldes Ca^{2+} -frigjøring fra intracellulære lagre. Det er imidlertid også mulig å modulere en Ca^{2+} -avhengig mekanisme ved å påvirke systemets Ca^{2+} -sensitivitet, uten at Ca^{2+} -konsentrasjonen endres. De aksonemale reseptorene for Ca^{2+} er ikke kjent, men Ca^{2+} -bindende proteiner som calmodulin (CAM) (Walter & Schultz, 1981; Chan *et al.*, 1999) og Ca^{2+} -avhengige proteinkinaser (Kim *et al.*, 2002) er sannsynligvis involvert. Guanylyl cyclase i ciliene reguleres av Ca^{2+} /CAM, og en cGMP avhengig proteinkinase (PKG) fosforylerer ulike proteiner i ciliene (Bonini *et al.*, 1991). Signalveiene for L-cystein og de attraherende komponentene i *T. thermophila*-filtratet involverer derfor muligens en kaskade av fosforyleringer og defosforyleringer av ulike proteiner i ciliene. Det siste trinnet i en slik kaskade kan tenkes å være fosforylering eller defosforylering av den indre armen i aksonemet, som kontrollerer retningen på cilieslagene (Satir, 1998). Muligens er den indre dyneinarmen involvert i Ca^{2+} -avhengig cilieversering hos *Tetrahymena* (Hennessey *et al.*, 2002). Dette proteinet er fosforylert når dyret svømmer forover og defosforyleres ved cilieversering (Deckman & Pennock, 2004).

Kjemokiner hos pattedyr har spesifikke cysteinstrukturer som man antar er essensielle i reseptorinteraksjonen (Rossi & Zlotnik, 2000). Reseptorene for disse kjemokinene er G-proteinkoblede og har 7 transmembrane domener (Rossi & Zlotnik, 2000). G-proteiner er sannsynligvis involvert i mekanotransduksjon hos *Stentor* (Marino *et al.*, 2001), men det finnes få andre bevis for heterotrimere G-proteiner hos ciliater. En mulig hypotese for signaltransduksjonsmekanismen for L-cystein hos *T. vorax* kan involvere G-proteinkoblede reseptorer som så aktiverer en fosforylerings- og defosforyleringskaskade. Denne hypotesen bør undersøkes i fremtidige forsøk der kjemoattraksjonen hos celler eksponert for spesifikke blokkere av G-proteinkoplet signaltransduksjon sammenlignes med normale dyr.

4.2 Mekanisk stimulering av *T. vorax*

Mekanisk stimulering av bakparten til en makrostom *T. vorax* ga ingen membranrespons, mens derimot munnregionen var meget følsom for mekaniske stimuli. Berøring med en

Diskusjon

glassnål i munnapparatet hos makrostome celler induserte en depolarisering på omtrent 23 mV (se figur 3.13). Responsen var ikke et rent reseptorpotensial siden depolariseringen var så kraftig at de spenningsstyrte Ca^{2+} -kanalene i ciliene ble aktivert. Hos *Paramecium* gir mekanisk stimulering en gradert respons der depolariseringen øker med økt stimulusstyrke (Naitoh & Eckert, 1969). Reseptorpotensialet som oppstår ved mekanisk stimulering foran på *Paramecium*-celler, skyldes åpning av mekanosensitive Ca^{2+} -kanaler (Naitoh & Eckert, 1969). Når stimulusstyrken når et visst nivå, aktiveres spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler. De mekanosensitive kanalene befinner seg mest sannsynlig i ciliatenes somamembran, siden mekanisk stimulering av decilierte celler også gir reseptorpotensialer (Ogura & Machemer, 1980). For å isolere reseptorpotensialet ved mekanisk stimulering av *T. vorax* kunne jeg ha registrert membranresponser fra decilierte celler, men det er uklart om ciliene i munnapparatet lar seg fjerne ved tradisjonelle decilieringsmetoder. Mekanisk stimulering foran på ciliaten *Stylonychia* induserer også en depolarisering og reversering av cilienes slagretning (dePeyer & Machemer, 1978). Mekanisk stimulering av den mikrostome formen av *T. vorax* ga derimot ingen membranresponser, uavhengig av hvor på overflaten cellen ble stimulert (se figur 3.13). Dette tyder på at det blir uttrykt nye mekanosensitive reseptorer under transformeringen. Som nevnt i innledningen uttrykkes 55 unike polypeptider i den makrostome munnregionen (Gulliksen *et al.*, 1984), og det er sannsynlig at noen av disse utgjør mekanoreseptorer. Når det gjelder respons på mekanisk stimulering av cellenes bakpart, er det tydeligvis forskjeller mellom ulike ciliarter, siden slik stimulering gir hyperpolarisering hos *Paramecium* (Naitoh & Eckert, 1969) og *Stylonychia* (dePeyer & Machemer, 1978).

Den makrostome formen av *T. vorax* depolariserte også når mikro- eller makrostom *T. vorax*- og *T. thermophila*-celler berørte munnapparatet. Berøring av en *T. thermophila*-celle i munnregionen ga en depolarisering på 22 mV, mens cellen depolariserte med 23 mV og 24 mV ved berøring av henholdsvis mikrostom og makrostom *T. vorax* (se figur 3.12). Det var med andre ord ingen tydelig forskjell i depolariseringene utløst av de ulike cellene, og det er derfor lite sannsynlig at den makrostome formen kan selekttere byttedyr på bakgrunn av disse responsene. I likhet med responsene på mekanisk stimulering med glassnål var depolariseringene så kraftige at de spenningsstyrte Ca^{2+} -kanalene i ciliene ble aktivert og cilienes slagretning reverserte. Det er derfor mulig at den elektrofysiologiske responsen på celleberøring er en ren mekanorespons, mens en eventuell aktivering av kjemoreseptorer ikke påvirker membranpotensialet. Man kan heller ikke utelukke at en

moderat elektrofysiologisk respons på kjemiske stimuli maskeres av en mer uttalt mekanorespons.

4.3 Konklusjon

Både mikro- og makrostome celler av *T. vorax* tiltrekkes av L-cystein og et filtrat av *T. thermophila*-kultur, men tiltrekkes ikke av et filtrat av *T. vorax*-kultur.

Verken L-cystein eller *T. thermophila*-filtrat induserer elektrofysiologiske membranresponser hos mikrostome *T. vorax*-celler. Påsprøyting av registreringsløsning og *T. thermophila*-filtrat foran på makrostome *T. vorax*-celler induserer depolariserende membranresponser som enten skyldes mekanosensitivitet eller både mekano- og kjemosensitivitet. Påsprøyting av L-cystein og *T. thermophila*-filtrat på bakenden av makrostome celler induserer ingen membranresponser. Mine data viser således ingen klar sammenheng mellom elektrofysiologiske responser og kjemokinese hos *T. vorax*. Dette støtter konklusjonen til Rønnevig (1992) om at van Houtens (1978) modell for sammenhengen mellom elektrofysiologiske responser og kjemokinese ikke har gyldighet for *T. vorax*.

Mekanisk stimulering av den mikrostome formen av *T. vorax* gir ingen membranresponser, uavhengig av hvor på overflaten cellen blir stimulert, mens munnregionen til makrostome *T. vorax*-celler er meget følsom for mekaniske stimuli. Under transformeringen fra mikro- til makrostom *T. vorax* uttrykkes det derfor funksjonelle mekanoreseptorer i cellens munnapparat.

Den makrostome formen av *T. vorax* depolariserer når munnapparatet berøres av mikro- eller makrostom *T. vorax*- og *T. thermophila*-celler. Det er ingen klar forskjell i depolarisering utløst av de ulike celletypene, og disse responsene gir derfor ikke grunnlag for seleksjon av byttedyr. Det er uklart om den elektrofysiologiske responsen på celleberøring er en ren mekanorespons, eller om aktivering av kjemoreseptorer også bidrar.

Referanser

- ALLEN, R. D. (1971). Fine structure of membranous and microfibrillar systems in the cortex of *Paramecium caudatum*. *J Cell Biol* **49**, 1-20.
- ALLEN, R. D. (1974). Food vacuole membrane growth with microtubule-associated membrane transport in *Paramecium*. *J Cell Biol* **63**, 904-922.
- BANNO, Y., OKANO, Y., FURUKAWA, K., TIEDTKE, A., KOBATA, A. & NOZAWA, Y. (1993). Processing and secretion of lysosomal acid α -glucosidase in *Tetrahymena* wild type and secretion-deficient mutant cells. *J Euk Microbiol* **40**, 515-520.
- BERG, T. O. (1989). En elektrofysiologisk undersøkelse av ciliatene *Tetrahymena vorax* og *Bursaridium difficile*. Hovedfagsoppgave, pp. 65. Universitetet i Oslo.
- BERG, T. O. & SAND, O. (1994). Spontaneous all-or-nothing action potentials in the ciliate *Bursaridium difficile*. *J Euk Microbiol* **41**, 13-17.
- BONINI, N. M., EVANS, T. C., MIGLIETTA, L. A. P. & NELSON, D. L. (1991). The regulation of ciliary motility in *Paramecium* by Ca^{2+} and cyclic nucleotides. *Adv Sec Mess Phosphoprot Res* **23**, 227-272.
- BONINI, N. M., GUSTIN, M. C. & NELSON, D. L. (1986). Regulation of ciliary motility by membrane potential in *Paramecium*: A role for cyclic AMP. *Cell Motil Cytoskeleton* **6**, 256-272.
- BONINI, N. M. & NELSON, D. L. (1988). Differential regulation of *Paramecium* ciliary motility by cAMP and cGMP. *J Cell Biol* **106**, 1615-1623.
- BREHM, P. & ECKERT, R. (1978). Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* **202**, 1203-1206.
- BRUSKELAND, G. E. & SAND, O. (1999). Membrane currents in the microstome and macrostome forms of *Tetrahymena vorax*. *Acta Physiol Scand* **165**, A46.
- BUHSE, H. E. (1966). Oral morphogenesis during transformation from microstome to macrostome and macrostome to microstome in *Tetrahymena vorax* strain V2 type S¹. *Trans Am Microsc Soc* **85**, 305-313.
- BUHSE, H. E. (1967a). Studies on the initiation and execution of microstome -> macrostome transformation in *Tetrahymena vorax*. *Trans Am Microsc Soc* **86**, 65-66.
- BUHSE, H. E. (1967b). Microstome-macrostome transformation in *Tetrahymena vorax* strain V2 type S induced by a transforming principle, stomatin. *J Protozool* **14**, 608-613.

Referanser

- BUHSE, H. E., CORLISS, J. O. & HOLSEN, R. C. (1970). *Tetrahymena vorax*: Analysis of stomatogenesis by scanning electron and light microscopy. *Trans Am Microsc Soc* **89**, 328-336.
- CHAN, C. W., SAIMI, Y. & KUNG, C. (1999). A new multigene family encoding calcium-dependent calmodulin-binding membrane proteins of *Paramecium tetraulia*. *Gene* **231**, 21-32.
- COLE, E. S. & STUART, K. R. (1991). Biochemical and cytological evidence for an overabundance of mucocysts in the *bcd* pattern mutant of *Tetrahymena thermophila*. *J Protozool* **38**, 536-546.
- CONNOLLY, J. G. & KERKUT, G. A. (1984). An electrogenic component in the membrane potential of *Tetrahymena*. *Comp Biochem Physiol* **77A**, 335-344.
- CORLISS, J. O. (1953). Microstome and macrostome form of *Tetrahymena vorax*. *Parasitology* **43**, 49-87.
- DECKMAN, C. M. & PENNOCK, D. G. (2004). Dephosphorylation of inner arm 1 is associated with ciliary reversals in *Tetrahymena thermophila*. *Cell Motil Cytoskeleton* **57**, 73-83.
- DEPEYER, J. E. & MACHEMER, H. (1977). Membrane excitability in *Stylonychia*: Properties of the two-peak regenerative Ca-response. *J Comp Physiol* **121**, 15-32.
- DEPEYER, J. E. & MACHEMER, H. (1978). Hyperpolarizing and depolarizing mechanoreceptor potentials in *Stylonychia*. *J Comp Physiol* **127**, 255-266.
- DUNLAP, K. (1977). Localization of calcium channels in *Paramecium caudatum*. *J Physiol* **271**, 119-133.
- ECKERT, R. (1972). Bioelectric control of ciliary activity. *Science* **176**, 473-481.
- ECKERT, R. & MACHEMER, H. (1975). Regulation of ciliary beating by the surface membrane. In *Molecules and Cell Movement*. eds. INOUË, S. S., STEPHENS, R. E., pp. 151-164. Raven, New York.
- FLORIN-CHRISTENSEN, J., FLORIN-CHRISTENSEN, M., TIEDTKE, A. & RASMUSSEN, L. (1990). The role of secreted acid-hydrolases in the utilization of complex nutrients by tetrahymena. *Microbial Ecology* **19**, 311-316.
- FOK, A. K., UENO, M. S. & AZADA, E. A. (1985). Rapid and sensitive assays for phagosomal acidification in *Paramecium* and *Tetrahymena*. *Euro J Cell Biol* **38**, 306-311.
- FRANCIS, J. T. & HENNESSEY, T. M. (1995). Chemorepellents in *Paramecium* and *Tetrahymena*. *J Eukaryot Microbiol* **42**, 78-83.

- FRANKEL, J. (2000). Cell biology of *Tetrahymena thermophila*. In *Methods in Cell Biology*, vol; **62**. *Tetrahymena thermophila*. ed. ASAI, D. J. & FORNEY, J., pp. 28-128. Academic Press, London.
- GRELLAND, E. M. (1988). Different growth phenotypes of *Tetrahymena vorax* V2. 2. Kinetics of macrostomes differentiation. *Eur J Protistol* **24**, 52-59.
- GRØNLIEN, H. K., BERG, T. & LØVLIE, A. M. (2002). In the polymorphic ciliate *Tetrahymena vorax*, the non-selective phagocytosis seen in microstomes changes to a highly selective process in macrostomes. *J Exp Biol* **205**, 2089-2097.
- GULLIKSEN, O. M., LØVLIE, A. & KVAMMEN, L. (1984). Different polypeptides in two homologous cellular structures: The microstomal and macrostomal oral apparatus of *Tetrahymena vorax*. *Dev Biol* **103**, 511-516.
- GUSTIN, M. C., BONINI, N. M. & NELSON, D. L. (1983). Membrane potential regulation of cAMP: Control mechanism for swimming behavior in the ciliate *Paramecium*. *Soc Neurosci Abstr* **9**, 167.
- HASEGAWA, K., KIKUCHI, H., ISHIZAKI, S., TAMURA, A., TSUKAHARA, Y., NAKAOKA, Y., IWAI, E. & SATO, T. (1999). Simple fluctuation of Ca⁺⁺ elicits the complex circadian dynamics of cyclic AMP and cyclic GMP in *Paramecium*. *J Cell Sci* **112**.
- HAUSMANN, K. & HÜLSMANN, N. (2003). *Protistology*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Berlin.
- HELLUNG-LARSEN, P. (2005). Cloning of *Tetrahymena* cells in a chemically defined medium is possible in the presence of surfactants or at reduced temperature. *J Biotechnol* **115**, 167-177.
- HELLUNG-LARSEN, P., LEICK, V., TOMMERUP, N. & KRONBORG, D. (1990). Chemotaxis in *Tetrahymena*. *Europ J Protistol* **25**, 229-233.
- HENNESSEY, T. M. (1987). A novel calcium current is activated by hyperpolarization in *Paramecium tetraurelia*. *Soc Neurosci Abstr* **13**, 108.
- HENNESSEY, T. M., KIM, D. Y., OBERSKI, D. J., HARD, R., RANKIN, S. A. & PENNOCK, D. G. (2002). Inner arm dynein 1 is essential for Ca⁺⁺-dependent ciliary reversals in *Tetrahymena thermophila*. *Cell Motil Cytoskel* **53**, 281-288.
- HENNESSEY, T. M. & KUNG, C. (1985). Slow inactivation of the calcium current of *Paramecium* is dependent on voltage and not internal calcium. *J Physiol* **365**, 165-179.
- HILLE, B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- HUNSELER, P., TIEDTKE, A. & VON FIGURA, K. (1988). Biosynthesis of secreted B-hexosaminidase in *Tetrahymena thermophila*. A comparison of wild type with a secretory mutant. *Biochem J* **252**, 837-842.

Referanser

- JANSEN, A. K. (1995). En sammenligning av de elektriske membranegenskapene til den mikrostome og den makrostome formen av den polymorfe ciliaten *Tetrahymena vorax*. Hovedfagsoppgave, pp. 56. Universitetet i Oslo.
- JANSEN, A. K. & SAND, O. (1995). Electrical membrane properties of the microstome and the macrostome forms of *Tetrahymena vorax*. *Acta Physiol Scand* **155**, 29A.
- JENNINGS, H. S. (1906). *Behavior of the lower organisms*. Columbia Univ. Press, New York.
- JONSSON, L. & SAND, O. (1987). Electrophysiological recordings from ciliates. In *Chronobiotechnology & Chronobiological Engineering*. ed. SCHEVING, L. E., HALBERG, F. & EHERT, C. F., pp. 432-434. Martinus Nihhoff Publishers, Dordrecht.
- KIM, K., SON, M., PETERSON, J. B. & NELSON, D. L. (2002). Ca²⁺-binding proteins of cilia and infraciliary lattice of *Paramecium tetraurelia*: their phosphorylation by purified endogenous Ca²⁺-dependent protein kinases. *J Cell Sci* **115**, 1973-1984.
- KIM, M. Y., KURUVILLA, H. G., RAGHU, S. & HENNESSEY, T. M. (1999). ATP reception and chemosensory adaptation in *Tetrahymena thermophila*. *J Exp Biol* **202**, 407-416.
- KOPPELHUS, U., HELLUNG-LARSEN, P. & LEICK, V. (1994). Physiological parameters affecting the chemosensory response of *Tetrahymena*. *Biol Bull* **187**, 1-7.
- KURUVILLA, H. G. & HENNESSEY, T. M. (1998). Purification and characterization of a novel chemorepellent receptor from *Tetrahymena thermophila*. *J Memb Biol* **162**, 51-57.
- KURUVILLA, H. G. & HENNESSEY, T. M. (1999). Chemosensory responses of *Tetrahymena thermophila* to CB2, a 24-amino-acid fragment of lysozyme. *J Comp Physiol* **184A**, 529-534.
- KURUVILLA, H. G., KIM, M. Y. & HENNESSEY, T. M. (1997). Chemosensory adaptation to lysozyme and GTP involves independently regulated receptors in *Tetrahymena thermophila*. *J Euk Microbiol* **44**, 263-268.
- LEICK, V. (1988). Gliding *Tetrahymena thermophila*: oriented chemokinesis in a ciliate. *Eur J Protistol* **23**, 354-360.
- LEVANDOWSKY, M., CHENG, T., KEHR, A., KIM, J., GARDNER, L., SILVERN, L., TSANG, L., LAI, G., CHUNG, C. & PRAKASH, E. (1984). Chemosensory responses to amino acids and certain amines by the ciliate *Tetrahymena*: A flat capillary assay. *Biol Bull* **167**, 322-330.
- MACHEMER, H. (1974). Frequency and directional responses of cilia to membrane potential changes in *Paramecium*. *J Comp Physiol* **92**, 293-316.

- MACHEMER, H. (1976). Interactions of membrane potential and cations in regulation of ciliary activity in *Paramecium*. *J Exp Biol* **65**, 427-448.
- MACHEMER, H. (1988). Motor control of cilia. In *Paramecium*. ed. GÖRTZ, H. D., pp. 217-235. Springer-Verlag, Berlin.
- MACHEMER, H. & ECKERT, R. (1975). Ciliary frequency and orientational responses to clamped voltage steps in *Paramecium*. *J Comp Physiol* **104**, 247-260.
- MACHEMER, H. & OGURA, A. (1979). Ionic conductances of membranes in ciliated and deciliated *Paramecium*. *J Physiol* **296**, 49-60.
- MACHEMER, H. & TEUNIS, P. (1996). Sensory-motor coupling and motor responses. In *Ciliates, Cells as Organisms*. ed. HAUSMANN, K. & BRADBURY, P. C., pp. 379-402. Gustav Fisher Verlag, New York.
- MARINO, M., SHERMAN, T. G. & WOOD, D. C. (2001). Partial cloning of putative G-proteins modulating mechanotransduction in the ciliate *Stentor*. *J Eukar Microbiol* **48**, 527-536.
- NAITOH, Y. (1974). Bioelectric basis of behavior in protozoa. *Am Zool* **14**, 883-893.
- NAITOH, Y. & ECKERT, R. (1969). Ionic mechanisms controlling behavioral responses of *Paramecium* to mechanical stimulation. *Science* **164**, 963-965.
- NAITOH, Y. & KANEKO, H. (1972). Reactivated triton-extracted models of *Paramecium*: Modification of ciliary movement by calcium ions. *Science* **176**, 523-524.
- NAITOH, Y. & KANEKO, H. (1973). Control of ciliary activities by adenosinetriphosphate and divalent cations in triton-extracted models of *Paramecium caudatum*. *J Exp Biol* **58**, 657-676.
- NAKAOKA, Y. & OOI, H. (1985). Regulation of ciliary reversal in triton-extracted *Paramecium* by calcium and cyclic adenosine monophosphate. *J Cell Sci* **77**, 185-195.
- NANNEY, D. L. (1980). *Experimental Ciliatology*. Wiley-Interscience Publication, New York.
- NILSSON, J. R. & VAN DEURS, B. (1983). Coated pits with pinocytosis in Tetrahymena. *J Cell Sci* **63**, 209-222.
- OERTEL, D., SCHEIN, S. J. & KUNG, C. (1977). Separation of membrane currents using a *Paramecium* mutant. *NATURE* **268**, 120-124.
- OERTEL, D., SCHEIN, S. J. & KUNG, C. (1978). A potassium conductance activated by hyperpolarization in *Paramecium*. *Journal of Membrane Biology* **43**, 169-185.
- OGURA, A. & MACHEMER, H. (1980). Distribution of mechanoreceptor channels in the *Paramecium* surface membrane. *J Comp Physiol* **135**, 233-242.

Referanser

- OGURA, A. & TAKAHASHI, K. (1976). Artificial deciliation causes loss of calcium-dependent responses in *Paramecium*. *Nature* **264**, 170-172.
- PECH, L. L. (1995). Regulation of ciliary motility in *Paramecium* by cAMP and cGMP. *Comp Biochem Physiol* **111A**, 31-37.
- PLESNER, P., RASMUSSEN, L. & ZEUTHEN, E. (1964). Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena*. In *Synchrony in Cell Division and Growth*. ed. ZEUTHEN, E., pp. 544-563. Interscience, New York.
- PRESTON, R. R. (1990). A magnesium current in *Paramecium*. *Science* **250**, 285-288.
- PRESTON, R. R. & SAIMI, Y. (1990). A hyperpolarization-activated calcium current that is inhibited by barium in *Paramecium tetraurelia*. *Biophys J* **57**, 519.
- PRESTON, R. R., SAIMI, Y. & KUNG, C. (1990a). Evidence for two K⁺ currents activated upon hyperpolarization of *Paramecium tetraurelia*. *J Memb Biol* **115**, 41-50.
- PRESTON, R. R., SAIMI, Y. & KUNG, C. (1992). Calcium-dependant inactivation of the calcium current activated upon hyperpolarization of *Paramecium tetraurelia*. *J Gen Physiol* **100**, 253-268.
- PRESTON, R. R., WALLEN-FRIEDMAN, M. A., SAIMI, Y. & KUNG, C. (1990b). Calmodulin defects cause the loss of Ca²⁺-dependent K⁺ current in two pantophobic mutants of *Paramecium tetraurelia*. *J Memb Biol* **115**, 51-60.
- RICHARD, E. A., SAIMI, Y. & KUNG, C. (1986). A mutation that increases a novel calcium-activated potassium conductance of *Paramecium tetraurelia*. *J Memb Biol* **91**, 173-181.
- ROSSI, D. & ZLOTNIK, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Ann Rev Immuno* **18**, 217-243.
- RØNNEVIG, A. K. (1992). Atferds- og elektrofysiologisk respons hos ciliaten *Tetrahymena vorax* på ulike stimuli. Hovedfagsoppgave, pp. 56. Universitetet i Oslo.
- RØNNEVIG, A. K. & SAND, O. (1992). Changes of the membrane potential is not the dominating factor for chemokinesis in *Tetrahymena vorax*. *Eur J Neurosci Suppl* **5**, 147.
- SAIMI, Y. (1986). Calcium-dependent sodium currents in *Paramecium*: Mutational manipulations and effects of hyper- and depolarization. *J Memb Biol* **92**, 227-236.
- SAIMI, Y., HINRICHSSEN, R. D., FORTE, M. & KUNG, C. (1983). Mutant analysis shows that the Ca²⁺-induced K⁺ current shuts off one type of the excitation in *Paramecium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 5112-5116.
- SATIR, P. (1998). Mechanisms of ciliary motility: an update. *Eur J Protistol* **34**, 267-272.

Referanser

- SATOW, Y. & KUNG, C. (1980a). Ca-induced K⁺-outward current in *Paramecium tetraurelia*. *J Exp Biol* **88**, 293-303.
- SATOW, Y. & KUNG, C. (1980b). Membrane currents of pawn mutants of the *pwA* group in *Paramecium tetraurelia*. *J Exp Biol* **84**, 57-71.
- SCHULTZ, J. E., GRÜNEMUND, R., HIRSCHHAUSEN, R. v. & SCHÖNEFELD, U. (1984). Ionic regulation of cyclic AMP levels in *Paramecium tetraurelia* in vivo. *FEBS Lett* **167**, 113-116.
- SMITH, H. E. (1982a). Oral apparatus in the carnivorous macrostomal form of *Tetrahymena vorax*. *J Protozool* **29**, 616-627.
- SMITH, H. E. (1982b). Oral apparatus structure in the microstomal form of *Tetrahymena vorax*. *Trans Am Microsc Soc* **101**, 36-58.
- SMITH-SOMERVILLE, H. E., HARDMAN, J. K., TIMKOVICH, R., RAY, W. J., ROSE, K. E., RYALS, P. E., GIBBONS, S. H. & BUHSE, H. E., JR. (2000). A complex of iron and nucleic acid catabolites is a signal that triggers differentiation in a freshwater protozoan. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 7325-7330.
- STELLY, N., MAUGER, J.-P., CLARET, M. & ADOUTTE, A. (1991). Cortical alveoli of *Paramecium*: A vast submembranous calcium storage compartment. *J Cell Biol* **113**, 103-112.
- VAN HOUTEN, J. (1978). Two mechanisms of chemotaxis in *Paramecium*. *J Comp Physiol* **127**, 167-174.
- VAN HOUTEN, J. (1979). Membrane potential changes during chemokinesis in *Paramecium*. *Science* **204**, 1100-1103.
- VAN HOUTEN, J., MARTEL, E. & KASCH, T. (1982). Kinetic analysis of chemokinesis of *Paramecium*. *J Protozool* **29**, 226-230.
- VAN HOUTEN, J. L., YANG, W. Q. & BERGERON, A. (2000). Chemosensory signal transduction in *paramecium*. *J Nutr* **130**, 946S-949S.
- WALTER, M. F. & SCHULTZ, J. (1981). Calcium receptor protein calmodulin isolated from cilia and cells of *Paramecium tetraurelia*. *Eur J Cell Biol* **24**, 97-100.
- WEIDNER, E. & SIBLEY, D. (1985). Phagocytized intracellular microsporidian blocks phagosome acidification and phagosome-lysosome fusion. *J Protozool* **32**, 311-317.
- WILLIAMS, N. E. (1961). Polymorphism in *Tetrahymena vorax*. *J Protozool* **8**, 403-410.