

**Malattransport am Tonoplasten der
halophytischen und C₃ – CAM-intermediären
Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum***

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Svetlana Epimashko

aus Minsk

Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Lüttge

Mitberichtersatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 5.05.04

Tag der mündlichen Prüfung: 1.07.04

Darmstadt 2004

D 17

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Lüttge und Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel im Rahmen des Graduiertenkollegs 340, Teilprojekt 6 in der Zeit von Juni 2000 bis April 2004 angefertigt.

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Ulrich Lüttge für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Dissertation, die Ermöglichung dieser Arbeit durch sein Engagement im Graduiertenkolleg 340 und das Interesse am Fortgang dieser Arbeit, sowie für zahlreiche wertvolle Ratschläge,

Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel für die Übernahme des Koreferates, die Einführung in der *Patch-clamp*-Technik, immerwährende Diskussionsbereitschaft und Unterstützung in jeder Hinsicht,

Frau Dr. Elke Fischer-Schliebs für das stete Interesse an den proteinbiochemischen Versuchen, ihre Diskussionsfreudigkeit in zahlreichen Sitzungen und die vielen Anregungen,

Herrn Prof. Dr. Rafael Ratajczak für Einführung in die Proteinbiochemie und immerwährende Diskussionsbereitschaft,

Frau Anna-Luise Christian für die Durchführung der Membranpräparationen und der Westernblottanalysen,

Tobias Meckel für die Einführung und technische Hilfe bei der Konfokalmikroskopie,

Herrn Dr. Detlef Kramer und Frau Regina Brandtner für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den mikroskopischen Versuchen,

den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Ulrich Lüttge und Prof. Dr. Gerhard Thiel für das freundschaftliche Arbeitsklima, besonders Ulrike Homann für ihre stete Hilfsbereitschaft bei den elektrophysiologischen Versuchen, Annette Hurst und Astrid Elter, die sich die Zeit genommen haben, diese Arbeit in aller Gründlichkeit zu lesen, sowie allen übrigen Mitglieder für viele anregende Gespräche und angenehme Stunden innerhalb und außerhalb des Labors,

den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 340 für die hochinteressanten wissenschaftlichen Unternehmungen,

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann, die mich jederzeit unterstützt und bestärkt haben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstandene Veröffentlichung:

Epimashko, S., Meckel, T., Fischer-Schliebs, E., Lüttge, U., Thiel, G. (2004):
Two functionally different vacuoles for static and dynamic
purposes in one plant mesophyll leaf cell. *Plant J.* 37, 294-300.

Veröffentlichungen in Vorbereitung:

Epimashko, S., Fischer-Schliebs, E., Christian, A-L., Thiel, G., Lüttge, U.:
Different types of tonoplasts correspond to the vacuoles with
acid or sodium chloride accumulation in the halophytic und facultative CAM plant
M. crystallinum.

1	Einleitung.....	1
1.1	Rolle des Malats im allgemeinen Metabolismus der Pflanzen und beim Crassulaceen Säurestoffwechsel.....	1
1.2	CAM bei <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	2
1.3	Malattransport am Tonoplasten.....	3
1.3.1	Tonoplastidäre Protonenpumpen	3
1.3.2	Tonoplastidärer Malattransporter.....	5
1.4	Die Vakuole als ein multifunktionelles Kompartiment beim CAM.....	8
1.5	Natrium- und Chloridtransport am Tonoplasten.....	10
1.6	Vakuoläre Transportsysteme unter Salzstress.....	11
1.7	Verhältnis zwischen der Salzspeicherung und der CAM-Induktion in <i>M. crystallinum</i>	12
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Pflanzenmaterial.....	14
2.2	Charakterisierung des Pflanzenmaterials.....	14
2.2.1	Herstellung von Blattpresssaft.....	14
2.2.2	Osmolaritätsbestimmung.....	15
2.2.3	Bestimmung des Malatgehaltes im Blattpresssaft.....	15
2.2.4	Bestimmung des Citratgehaltes im Blattpresssaft.....	16
2.2.5	Bestimmung der vakuolären pH-Wertes.....	17
2.3	Herstellung nativer Blattquerschnitte.....	17
2.4	Herstellung von Protoplasten und Vakuolenisolierung.....	17
2.5	Neutralrot-Färbung.....	18
2.6	BCECF-Färbung.....	21
2.7	Lysosensor-Färbung.....	21
2.8	Inhaltsstoffbestimmungen in sauren und neutralen Vakuolen.....	24
2.9	Versuche zur Erfassung der Dynamik des Vakuolenverhaltens innerhalb einer Mesophyllzelle.....	24
2.10	Versuchslösungen für die Färbung und für elektrophysiologische Messungen.....	24
2.11	Durchführung der elektrophysiologischen Messungen.....	25

2.12 Redoxpotentialmessungen.....	27
2.13 Partielle Trennung saurer und neutraler Vakuolen.....	28
2.14 Subzelluläre Fraktionierung.....	29
2.15 Proteinbestimmung.....	31
2.16 Konzentrierung und Denaturierung der Proteine.....	31
2.17 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	31
2.18 <i>Western blotting</i>	32
2.19 NBT-Immunfärbung.....	33
2.20 Bestimmung der V-ATPase- und V-PPase-Aktivitäten.....	34
2.21 Statistik.....	34
2.22 Chemikalien.....	35
3 Ergebnisse.....	36
3.1 Charakterisierung des Stoffwechsels untersuchter Pflanzen.....	36
3.2 Färbung mit Neutralrot.....	36
3.2.1 Neutralrotfärbung der Blattquerschnitte.....	36
3.2.2 Neutralrotfärbung der Vakuolenkompartimente innerhalb einer Zelle.....	39
3.2.3 Neutralrotfärbung der Protoplasten und isolierter Vakuolen.....	41
3.3 Neutralrot-BCECF-Doppelfärbung.....	43
3.4 Lysosensor-Färbung.....	44
3.4.1 Lysosensor-Färbung der Blattquerschnitte.....	44
3.4.2 Lysosensor-Färbung der Protoplasten und Vakuolen.....	46
3.5 Untersuchungen zur Identifizierung der vakuolären Inhaltsstoffe.....	48
3.6 Untersuchungen zur Erfassung der Dynamik zweier Vakuolentypen im Tagesgang innerhalb einer Mesophyllzelle.....	50
3.7 Elektrophysiologische Untersuchungen zum Malattransport.....	51
3.7.1 Elektrische Eigenschaften intakter Vakuolen.....	52
3.7.2 Identifizierung spannungsabhängiger Tonoplastenkanäle.....	57
3.7.2.1 Kinetische Eigenschaften der Tonoplastenkanäle.....	57
3.7.2.2 Selektivität der Tonoplastenkanäle.....	59
3.7.2.3 Untersuchungen zur Substratspezifität des Einwärtskanals.....	62
3.7.3 Nachweis der Malatkanalaktivität in der Membran neutraler Vakuolen.....	66
3.7.4 Regulation des Malatkanals.....	68

3.7.4.1 Untersuchungen zur Abhängigkeit des Malatskanals vom vakuolären pH-Wert.....	68
3.7.4.2 Untersuchungen zur Abhängigkeit des Malatskanals von der vakuolären Kalziumkonzentration.....	71
3.7.2.3 Wirkung SH-modifizierender Reagenzien auf den Malatkanal.....	71
3.8 Redoxpotentialmessungen im Blattpresssaft.....	76
3.9 Proteinbiochemische Charakterisierung des Tonoplasten.....	79
3.9.1 Identifizierung des Na ⁺ -H ⁺ -Antiporters.....	79
3.9.1.1 AtNHX1-Immunmarkierung in Membranen partiell getrennter nativer Vakuolen.....	79
3.9.1.2 AtNHX1-Immunmarkierung in Membranpräparaten der Saccharosedichtegradienten.....	81
3.9.2 Nachweis zweier Populationen von Tonoplastenmembranen im Blattgewebe.....	83
3.9.2.1 VM23-Immunmarkierung	83
3.9.2.2 V-ATPase-Immunmarkierung	85
3.9.2.3 Untersuchungen zur Aktivität der V-ATPase	88
3.9.2.4 V-PPase-Immunmarkierung.....	89
3.9.2.5 Untersuchungen zur Aktivität der V-PPase.....	91
4 Diskussion	93
4.1 Zwei Vakuolentypen im Blattgewebe von <i>M. crystallinum</i>	93
4.1.1 Separate Sequestrierung von NaCl in neutralen Vakuolen und von organischen Säuren in sauren Vakuolen beim Salzstress-CAM.....	94
4.1.2 Speicherfunktion saurer und neutraler Vakuolen und Aktivität der tonoplastidären Transportproteine.....	94
4.1.3 Osmotische Balance zwischen Säure- und NaCl-speichernden Vakuolen während der CAM-bedingten Malatfluktuationen in einer Zelle.....	96
4.2 Regulation des Malatkanals.....	97
4.2.1 Saurer Vakuoleninhalt und Redoxregulation des Malatkanals.....	100
4.2.2 Regulation des Malatkanals in C ₃ -Pflanzen.....	101
4.2.3 Regulation des Malatkanals beim Salzstress-CAM.....	101
4.3 Tonoplasten unterschiedlicher Dichte und Vakuolen mit Malat- oder Salzakkumulation.....	102

	4.4 Diurnale Malatfluktuationen und konstante NaCl-Sequestrierung.....	107
5	Zusammenfassung.....	112
6	Literaturverzeichnis.....	113

<i>Aqua bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
AtNHX1	Na ⁺ -H ⁺ -Antiporter von <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase
AS	auswärts rektifizierender Strom
BCECF	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6-)-Carboxyfluorescein
BCECF-AM	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6-)-Carboxyfluorescein-Acetoxymethylester
Brij 58	Eicosethylenglykol-Hexadecylether
BSA	Rinderserumalbumin
BTP	1,3-Bis-[Tris-(2-Hydroxymethyl)-Aminomethan]-Propan
BTPH ⁺	1,3-Bis-[Tris-(2-Hydroxymethyl)-Aminomethan]-Propan (protoniert)
C ₃	C ₃ -Photosynthese
CAM	Crassulaceen Säurestoffwechsel
ChCl	Cholin-Chlorid
CL	Citratlyase
CLIC	<i>chloride intracellular channel</i>
cyt	cytoplasmisch
DMSO	Dimethylsulphoxid
DTT	Dithiothreitol
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure); Ellman's Reagenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-Bis-(p-Aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
E _{Nernst}	Nernstpotential
ER	endoplasmatisches Retikulum
E _{red}	Redoxpotential
ES	einwärts rektifizierender Strom
FV-Kanal	<i>fast-activating vacuole channel</i>
g	Gravitationsbeschleunigung
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
h	Stunde

HCF II	Kaliumhexacyanoferrat II
HCF III	Kaliumhexacyanoferrat III
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N´-(2-Ethansulfonsäure)
HL	Hochlicht
I	Strom
IDPase	Inositol-Diphosphatase
I _{inst}	instantaner Strom
IgG	Immunglobulin G
I _{stat}	stationärer Strom
I/V-Kurve	Strom-Spannungs-Kennlinie
I _{zt}	zeitaktivierender Strom
kDa	Kilodalton
LDH	Lactat-Dehydrogenase
L-MDH	L-Malat-Dehydrogenase
LS	Lysosensor
Me	Mercaptoethanol
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
Mal	Malat
MIP	<i>major intrinsic protein</i>
min	Minute
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NEM	N-Ethylmaleimid
NBT	p-Nitroblautetrazolium-Chlorid
NR	Neutralrot
OAA	Oxalacetat
PEG	Polyethylenglykol 4000
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvatcarboxylase
PCMBS	p-Chloromercuriphenylsulfonsäure
P _i	anorganisches Phosphat
pK	Dissoziationskonstante

P-ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase am Plasmalemma
PP _i	Pyrophosphat
PSV	<i>protein storage vacuole</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RT	Raumtemperatur
RubisCO	Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH-	Sulfhydryl-
SV-Kanal	<i>slow-activating vacuole channel</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TIP	<i>tonoplast intrinsic protein</i>
Tricin	N-[2-Hydroxy-1,1-Bis-(Hydroxymethyl)-Ethyl]-Glycin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vak	vakuolär
V-ATPase	vakuoläre Adenosin-5'-Triphosphatase
V _{komm}	Kommandospannung
V _m	Membranspannung
VM23	23-kDa membranintegrales Protein aus Vakuolen von <i>Raphanus sativus</i>
V-PPase	vakuoläre Pyrophosphatase
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

1 Einleitung

1.1 Rolle des Malats im allgemeinen Metabolismus der Pflanzen und beim Crassulaceen Säurestoffwechsel

Malat (das Anion der Äpfelsäure; $pK_{a1} = 3,4$; $pK_{a2} = 5,1$) ist ein wichtiges Intermediat in vielen biochemischen Reaktionen im Stoffwechsel der Pflanzen, wie im Zitronen- bzw. Glyoxylsäure-Zyklus und bei der Synthese der C_4 -Aminosäuren. Auch in der Zellhomeostase spielt Malat eine wichtige Rolle. Der biochemische pH-Stat-Mechanismus im Cytosol beruht auf Reaktionen, bei denen die Äpfelsäure bei hohem pH gebildet bzw. bei niedrigem pH decarboxyliert wird (Davies, 1986; Martinoia und Rentsch, 1994). Die Balance der Ladungen bei einer ungleichen Aufnahme von Kationen gegenüber Anionen oder umgekehrt wird durch die Synthese und die Degradation von Malat aufrechterhalten (Martinoia und Rentsch, 1994). Außerdem sind die Malatdehydrogenasen im Cytosol, am Plasmalemma und in der Matrix von Chloroplasten und Mitochondrien am Austausch von Reduktionsäquivalenten zwischen den Zellkompartimenten beteiligt (Martinoia und Rentsch, 1994). Dadurch erfolgt die Regulation der Redoxreaktionen in vielen metabolischen Prozessen innerhalb der Zelle, im Apoplast (bei der Bildung der sekundären Zellwand) und im Gewebe (durch den Transport von NADH von den Mesophyllzellen zur Bündelscheide in C_4 -Pflanzen). Die Akkumulierung der Äpfelsäure in der Vakuole kann zu einer Erhöhung der Zellosmolarität führen, da zwei Mole der Äpfelsäure beim Verbrauch eines Mols Hexosen gebildet werden können (Lüttge, 1988). Dies nutzen Pflanzen, um das Wasserpotential des Zellsaftes gegenüber dem Außenmedium zu erniedrigen und damit die Wasseraufnahme in die Zellen zu ermöglichen. Die Rolle des Malats als Osmotikum ist nicht nur bei Wassermangel von Bedeutung, sondern auch bei hydroaktiven Stomatabewegungen (Martinoia und Rentsch, 1994). Dabei wird Turgor-bedingtes Öffnen und Schließen der stomatären Pore, durch den Kaliumtransport am Plasmalemma zusammen mit der Umwandlung des Gegenions Malats in den Stomatazellen erreicht.

Pflanzen mit C_3 -Photosynthese zeigen oft eine signifikante Malatspeicherung in Form von Malatsalzen (z.B. Kaliummalat) (Martinoia und Rentsch, 1994). Dabei kann der Malatgehalt im Tag-Nacht-Rhythmus in diesen Pflanzen schwanken. Am Tag wird Malat während lichtinduzierter Stickstoffassimilationsvorgänge für den Ladungs- und Aziditätsausgleich gebildet, bzw. als Reservestoff für die nächtliche Atmung gespeichert (Lüttge, 1987; Martinoia und Rentsch, 1994; Lüttge et al., 2000). Einen besonderen Fall der Malatakkumulation findet man bei den Pflanzen mit Crassulaceen Säurestoffwechsel

(CAM) (Osmond, 1978; Lüttge, 1987). CAM-Pflanzen speichern während der Nacht CO_2 und Reduktionsäquivalente in Form von Äpfelsäure. Am Tag halten die CAM-Pflanzen ihre Stomata geschlossen, um große Wasserverluste durch die Transpiration bei einem sehr niedrigen Wasserpotential in der Luft zu vermeiden. In dieser Zeit wird das nachts gespeicherte Malat decarboxyliert und das daraus entstandene CO_2 im Laufe des konventionellen photosynthetischen Kohlenstoffzyklus verbraucht. Die nächtliche CO_2 -Aufnahme, beträchtliche diurnale Schwankungen der Konzentration titrierbarer Säuren und des Malatgehalts sind daher Evidenzen für den CAM-Stoffwechselweg. Eine erhöhte zelluläre CO_2 -Konzentration im Blattmesophyll während der Decarboxylierung des Malats am Tag bei geschlossenen Stomata könnte eine Bedeutung für die Depression der Oxygenase-Aktivität der RubisCO haben. Jedoch steigt auch der Partialdruck des Sauerstoffes, der am Tag während der photochemischen Reaktionen gebildet wird, bis zu 42 % an, was die Photorespiration sehr wahrscheinlich macht (Cushman und Borland, 2002). Deswegen besteht der Hauptvorteil des CAM bei terrestrischen Pflanzen im Vergleich zu denen mit C_3 - und C_4 -Photosynthesemodi in einem mehrfach effizienteren Wasserverbrauch (Osmond, 1978; Lüttge, 1988). Aus diesen Gründen ist der CAM-Zyklus unter den Pflanzen in heißen ariden Gebieten sehr verbreitet, wobei mehr als 7 % der höheren Pflanzen aus unterschiedlichen Taxa diesen Photosynthesemodus ausüben (Osmond, 1978; Lüttge, 1988).

1.2 CAM bei *Mesembryanthemum crystallinum*

Eine besonders plastische Anpassung der Pflanzen an wechselnde Umweltbedingungen stellt der fakultative und induzierbare CAM bei *Mesembryanthemum crystallinum* dar. Im mediterranen Klima mit einer saisonalen Wasserverfügbarkeit nutzt *M. crystallinum* bei einer ausreichenden Wasserversorgung im Frühjahr den C_3 -Photosynthesemodus, um eine maximale Wachstumsrate zu erreichen. Nach dem Einsetzen der Trockenperiode wechselt *M. crystallinum* zum CAM (Winter und Smith, 1996; Adams et al., 1998). Obwohl die CAM-Induktion beim Übergang zum generativen Stadium genetisch vorprogrammiert und irreversibel ist, können Stress-Faktoren, wie z.B. Wassermangel, hohe Lichtintensität, Wurzelunterkühlung oder Salinität den Übergang zum CAM auch bei den jüngeren Pflanzen auslösen (Lüttge, 1993; Winter und Smith, 1996; Broetto et al., 2002). Die pH-Schwankungen im 24-Stunden-Zyklus in CAM-Pflanzen von *M. crystallinum* können mehr als zwei Einheiten im sauren Bereich betragen (Cushman und Borland, 2002). Dies deutet darauf hin, dass während der nächtlichen CO_2 -Fixierung mehr als 100 mM titrierbare

Protonen in Form von Äpfel- (30-50 mM) und Citronensäure (10-20 mM) sowie von anderen α -Oxo-Säuren (Oxalacetat, α -Oxoglutarat und Pyruvat; in Konzentrationen ca. drei Ordnungen niedriger als die ersten beiden Säuren) akkumuliert werden. Der Anstieg und die Schwankung des Malats beim CAM ist mit den variablen Aktivitäts- oder (und) Expressionsraten der Proteine, die am Malatmetabolismus beteiligt sind, verbunden. Das Enzym für die nächtliche CO_2 -Fixierung, eine CAM-spezifische Isoform der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC), die „ CO_2 -Pumpe“ genannt wird, weist einen zirkadianen Aktivitätsrhythmus durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge und eine allosterische Regulation durch Malat auf (Osmond, 1978; Taybi et al., 2000; Cushman, 2001; Cushman und Borland, 2002). Die beiden malatdecarboxylierenden Enzyme (das mitochondriale NAD-abhängige und das cytosolische NADP-abhängige Malatenzym) werden während des Übergangs zum CAM induziert und weisen eine erhöhte Aktivität am Nachmittag und in der Nacht auf mit einer Depression während des Vormittages (Winter und Smith, 1996).

Am Beispiel der CAM-spezifischen PEPC-Induktion wurde gezeigt, dass als Glieder der Signaltransduktionskette, cytosolisches Ca^{2+} , Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige Proteinkinasen und Phosphorylasen sowie Phytohormone (Abscisinsäure und Cytokinin) an der Auslösung und Regulation der CAM-Reaktionen beteiligt sind (Winter und Smith, 1996; Taybi und Cushman, 1999; Cushman, 2001; Cushman und Borland, 2002).

Die Reaktionen des CAM laufen zwar in verschiedenen Zellkompartimenten (im Cytosol, in Chloroplasten und in Mitochondrien) ab, sind aber aneinander gekoppelt. Dies erfordert einen koordinierten Transport von Substraten durch die Organellmembranen sowie eine strenge Konzentrationskontrolle am Ort der biochemischen Reaktionen. Dies betrifft insbesondere die Äpfelsäuresynthese über PEPC im Cytosol. Um eine Azidifizierung des Cytoplasmas sowie die PEPC-Inhibierung durch das reduzierte Produkt Malat zu vermeiden, wird die Äpfelsäure während der nächtlichen CO_2 -Fixierung in die Vakuole sequestriert (Osmond, 1978; Lüttge, 1987).

1.3 Malattransport am Tonoplasten

1.3.1 Tonoplastidäre Protonenpumpen

Malatbestimmungen in isolierten Vakuolen von CAM-Pflanzen sowie Experimente mit der Aufnahme von radioaktiv-markiertem CO_2 haben gezeigt, dass sich nahezu das ganze zelluläre Malat im vakuolären Kompartiment befindet (Buser und Matile, 1977). Messungen des cytosolischen Malats in unterschiedlichen Pflanzen- und Zellarten

bewiesen, dass seine Konzentration im Cytoplasma nur in einem engen Bereich von 1 -10 mM schwankt (Martinoia und Rentsch, 1994). Daher muss der Malattransport in die Vakuole gegen einen beträchtlichen Konzentrationsgradienten ablaufen. Aus thermodynamischen Überlegungen wurde ein energieabhängiger Transportmechanismus für den Malatefflux aus dem Cytosol postuliert (Lüttge und Ball, 1980). Die Energielieferanten dafür sind primär aktive Protonenpumpen, die protonentranslozierende vakuoläre ATPase (V-ATPase) und Pyrophosphatase (V-PPase), die am Tonoplasten einen elektrochemischen Protonengradienten aufbauen. Untersuchungen an Tonoplastenvesikeln aus *M. crystallinum* zeigten, dass beim Übergang zur CAM-Photosynthese einige Veränderungen in der Transportrate, im molekularen Feinbau und in der Expression der Protonenpumpen festzustellen sind. In den CAM-Pflanzen gegenüber den C₃-Pflanzen steigt die V-ATPase Aktivität um Mehrfaches an (Lüttge und Ball, 1980; Struve et al., 1985; Lüttge, 1987). Die Membrandomäne V₀ der V-ATPase vergrößert sich mit dem Übergang zum CAM (Lüttge et al., 1995 b; Lüttge und Ratajczak, 1997; Ratajczak, 2000). Dies korreliert mit einer ansteigenden Expressionsrate der c-Untereinheit, die das Proteolipid der V-ATPase bildet. Die Untersuchungen mit anderen fakultativen CAM-Pflanzen, z.B. *Kalanchoe blossfeldiana*, zeigten gleiche Veränderungen der V-ATPase während des Übergangs zum CAM (Lüttge et al., 1995 a / b). In CAM-Pflanzen von *M. crystallinum* wurden zwei zusätzliche Untereinheiten D_i und E_i im Stielbereich der V-ATPase gefunden (Bremberger und Lüttge, 1992; Ratajczak et al., 1994 b; Zhigang et al., 1996). Ein verbessertes Kopplungsverhältnis zwischen der ATP-hydrolysierenden (V₁-) und der Protonen-translozierenden V₀-Domäne der V-ATPase beim CAM wurde in diesem Zusammenhang diskutiert.

Im Gegensatz zur V-ATPase verschwindet die zweite Protonenpumpe die V-PPase während des Übergangs zum CAM aus den Tonoplastenfractionen von *M. crystallinum* (Bremberger et al., 1988; Bremberger und Lüttge, 1992; Lüttge et al., 1995 a), obwohl in anderen Pflanzen sowohl mit obligatem CAM, *K. daigremontiana* und *Epidendrum ibaguense* (White und Smith, 1992), als auch mit fakultativem CAM, *K. blossfeldiana*, die V-PPase anwesend ist und eine stimulierende Wirkung auf den ATP-abhängigen H⁺-Transport aufweist (Marquardt-Jarczyk und Lüttge, 1990 a). Es ist bisher nicht klar, weswegen zwei unabhängige Protonenpumpen am Tonoplasten koexistieren (Rea und Poole, 1993). Im Gegensatz zum elektrochemischen Protonengradienten durch den Tonoplasten, der unter der Annahme eines Δ pH von 4,2 Einheiten in saurem Bereich zwischen dem Cytosol und dem Vakuolenlumen in *K. daigremontiana* etwa $-25 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

beträgt, ist die freie Energie der PP_i -Hydrolyse von $-19 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ nicht ausreichend, um einen entscheidenden Beitrag zur Energetisierung der Vakuolenmembran zu leisten (Marquardt-Jarczyk und Lüttge, 1990 a). Jedoch kann der energetische Beitrag des PP_i -abhängigen H^+ -Transports unter Bedingungen steigen, in denen die Aktivität der V-ATPase abnimmt, z.B. bei niedrigen Temperaturen, ATP-Mangel oder unter oxidierenden Bedingungen (Rea und Poole, 1993; Darley et al., 1995; Hoffman-Thoma und Willenbrink, 1993).

1.3.2 Tonoplastidärer Malattransporter

Der Malatinfux in die Vakuolen der CAM-Pflanze *K. daigremontiana* konnte in direkten Messungen mit radioaktiv-markiertem Malat nachwiesen werden (Buser-Suter et al., 1982; Nishida und Tominaga, 1987; Ratajczak et al., 1994 a). Die Transportrate wies dabei ein pH-Optimum im leicht alkalischen Bereich auf und stieg in der Anwesenheit vom Mg-ATP, dem Substrat der V-ATPase, an. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Malatinfux die protonentranslozierende Aktivität der V-ATPase und der V-PPase stimulieren kann (Jochem und Lüttge, 1987; White und Smith, 1989; Marquardt-Jarczyk und Lüttge, 1990 b). Dies deutet auf einen sekundär aktiven Transportmechanismus hin, wobei der Malattransporter durch den elektrochemischen Gradienten an die primär aktiven Protonenpumpen gekoppelt ist. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass nur die elektrische Komponente ($\Delta \Psi$) des von den Protonenpumpen generierten elektrochemischen Gradienten, nicht aber ΔpH , für die sekundär aktive Malataufnahme benötigt wird (Ratajczak et al., 1994 a).

Die Spezifität des Malattransporters gegenüber anderen Säuren wurde mittels der Inhibierung der Malataufnahme durch verschiedene Carboxylate bestimmt (White und Smith, 1989). Dabei ergab sich die folgende Selektivitätsreihe: Fumarat > Malat > Oxalacetat > Succinat > Malonat > Citrat > Isocitrat, Aconitat. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Malattransporter die Säuren nach einer bestimmten Strukturbesonderheit selektiert. So zeigt er eine höhere Selektivität für 1,4-Dicarboxylate in *trans*-Konformation (Fumarat) und 1,4-Dicarboxylate mit einer nicht-fixierten Konfiguration (Malat, Oxalacetat und Succinat) gegenüber Verbindungen in *cis*-Konformation (Maleat). Die 1,5-Dicarboxylate (Oxoglutarat, Glutamat und Glutarat), Tricarboxylate (Isocitrat) und Monocarboxylate (Oxalat, Malonat) zeigen ebenfalls eine niedrigere Permeation gegenüber Malat.

Am Tonoplasten der C_3 -Pflanzen *Hordeum vulgare* und *Catharanthus roseus*, die wie CAM-Pflanzen eine beträchtliche Malatspeicherung aufweisen, wurde ein ATP-stimulierbarer Malattransport beobachtet (Marigo et al., 1988). Dennoch erwies sich Malat in der C_3 -Pflanze *Avena sativa* als ein schlecht permeierendes Anion (Kaestner und Sze, 1987; Pope und Leigh, 1987). Eine höhere Malattransportaktivität wurde in der CAM-Spezies *Epidendrum ibaguense* aus der Familie Orchidaceae im Vergleich zu den C_3 -Spezies *Coelogyne crista* und *Coelogyne fimbriata* gefunden (White und Smith, 1992). Eine Erhöhung der Aktivität des Malattransporters wurde während des Übergangs zur CAM-Photosynthese in salzgestressten Pflanzen von *M. crystallinum* (Struve und Lüttge, 1987) gemessen. Dies deutet an, dass die Malattransportaktivität mit dem Auftreten des CAM korreliert ist (White und Smith, 1992). Versuche zur Identifikation des tonoplastidären Malattransporters führten zur Reinigung eines unbekanntes membranintegralen Polypeptids mit der Molmasse von 32 kDa aus der Tonoplastenfraktion von *K. daigremontiana*. Nach einer Inkorporierung dieses Proteins in Phospholiposomen konnte im Vergleich zu nativen Tonoplastenvesikeln ein mehr als 100fach angestiegener Malatflux gemessen werden (Ratajczak et al., 1994 a; Steiger et al., 1997). Die in den oben erwähnten Studien gefundenen Transportcharakteristika, K_m von 1-3 mM und eine relativ niedrige V_{max} von 40 – 250 nmol Malat * min^{-1} * $\text{mg}_{\text{protein}}^{-1}$, deuten auf einen Permease-vermittelten Malatflux hin. Dennoch stellt die Energetisierung des Malatuniporters allein durch das elektrische Potential den Hinweis auf einen kanalvermittelten Transportmechanismus dar.

In *Patch-clamp*-Studien wurde ein für Malat selektiver Einwärtsstrom am Tonoplasten der CAM-Pflanzen *Graptopetalum paraguayense* und *K. daigremontiana* gemessen (Iwasaki et al., 1992; Cheffings et al., 1997; Pantoja und Smith, 2002; Hafke et al., 2003). Die in den hoch auflösenden Stromaufnahmen bestimmte Einzelkanalamplitude betrug etwa 3 pS, was bei einem Tonoplastenpotential von -40 mV etwa $3,8 * 10^6$ Mal²⁻-Moleküle pro Sekunde pro Transportermolekül entspricht (Hafke et al., 2003). Der Malattransport durch den Malatkanal erfolgt entlang des elektrochemischen Gradienten, der von tonoplastidären Protonenpumpen generiert wird. Bei einem Membranpotential von -10 bis -40 mV, wie es am Tonoplasten pflanzlicher Zellen in der Regel vorliegt, kann der Malatkanal einen 5- bis 10fachen chemischen Malatgradienten zwischen Cytosol und Vakuolenlumen aufrechterhalten. Dabei deuten die gemessene Stromdichte und die ermittelte Kanalproteindichte von $0,2 \mu\text{m}^{-2}$ darauf hin, dass der Malatkanal einen Hauptweg für den Malatflux in die Vakuole darstellt (Hafke et al., 2003).

Der Malatkanal weist eine starke Rektifizierung bei negativen Potentialen auf (Iwasaki et al., 1992; Cheffings et al., 1997; Pantoja und Smith, 2002; Hafke et al., 2003). Aufgrund dieser strengen Potentialabhängigkeit (die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit des Kanals liegt bei -43 mV; Hafke et al., 2003) kann der Malatkanal nur den Malatflux in die Vakuole, nicht aber den Rücktransport ins Cytoplasma vermitteln. Die Potentialabhängigkeit des Kanals kann auf eine Blockierung durch Ionen zurückzuführen sein, die bei positiven Spannungen in die Kanalpore eindringen, z.B. Mg^{2+} aus Cytosol bzw. Cl^- aus Vakuolenlumen (Cheffings et al., 1997). Einen Hinweis für diesen Blockierungsmechanismus lieferten Experimente, in denen eine hohe Chloridkonzentration (100 mM) von der vakuolären Seite des Tonoplasten her eingesetzt wurde. Dabei konnte vakuoläres Cl^- den Malatstrom erheblich reduzieren (Plant et al., 1994).

Der Malatkanal zeigt eine zeitabhängige Aktivierungskinetik, die in drei Komponenten zerlegt werden konnte: eine instantane Komponente und zwei langsamere Zeitkomponenten mit entsprechenden Zeitkonstanten von 0,76 – 0,80 s und 4,00 – 5,26 s (Cerana et al., 1995; Cheffings et al., 1997). Die ungewöhnlich langsame Aktivierung scheint eine allgemeine Charakteristik der malatselektiven Kanäle aus unterschiedlichen Pflanzenspezies zu sein. Ein ähnlicher langsam aktivierender einwärts rektifizierender Kanal leitet Malat in Vakuolen von C_3 -Pflanzen *Beta vulgaris* und *Arabidopsis thaliana* (Pantoja et al., 1992; Plant et al., 1994; Cerana et al., 1995).

Der zeitabhängige Einwärtsstrom am Tonoplasten konnte nur in der Anwesenheit von Malat und weiteren Dicarboxylaten, wie Fumarat und Succinat, von der cytosolischen Seite her initiiert werden, nicht aber bei einer gleich hohen Chloridkonzentration (Pantoja et al., 1992; Pantoja und Smith, 2002; Hafke et al., 2003). Dies zeigt eine hohe Substratselektivität des Malatkanals für Dicarboxylate gegenüber Chlorid. In der C_3 -Pflanze *Avena sativa* wurde hingegen ein wesentlich höherer Chloridtransport im Vergleich zum Malat beobachtet (Kaestner und Sze, 1987; Pope und Leigh, 1987) und da der Chloridtransport von Malat nicht beeinflusst wird (Wissing und Smith, 2000), konnte man schließen, dass Cl^- und Mal^{2-} unterschiedliche tonoplastidäre Transportsysteme benutzen. Ein weiterer Hinweis darauf ist eine unterschiedliche Inhibitorsensitivität von Chlorid- und Malattransportern (Martinoia et al., 1991).

Die Abstimmung der Malatkanalaktivität auf die Bedürfnisse der CAM-Physiologie erfordert eine feine Regulation des Malatkanals im Tag-Nacht-Rhythmus. Die Wirkung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und des cytosolischen pH-Werts auf den Malatkanal, die im Signaltransduktionsweg in Pflanzen eine Schlüsselrolle spielen (Pantoja und Smith,

2002), wurde daher untersucht. Dabei zeigt $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ keinen signifikanten Effekt auf den Malatstrom. Dies unterschied den Malakanal stark von anderen, am Tonoplasten befindlichen Kanälen, die entweder nur bei einer millimolaren $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ -Konzentration funktionieren (*slow vacuolar* (SV)), oder stark von Ca^{2+} und Mg^{2+} inhibiert werden (*fast vacuolar* (FV)) (Hedrich und Neher, 1987; Ward und Schröder, 1994; Schulz-Leedorf und Hedrich, 1995; Brüggemann et al., 1999 a / b). Die Azidifizierung des Cytoplasmas ruft dagegen eine Inhibierung des Malatkanals hervor (Pantoja und Smith, 2002; Hafke et al., 2003). Die höchste pH-Sensitivität des Malatkanals liegt in einem Bereich, in dem CAM-bedingte cytosolische pH-Schwankungen (von 7,5 pH am Tag bis zu 7,8 pH in der Nacht) auftreten (Hafke et al., 2001). Dies hat eine große physiologische Relevanz, da die Ansäuerung im Cytosol am Tag zu einer Inhibierung des Malatkanals führt, was den störenden Rücktransport der Äpfelsäure in die Vakuole am Tag verhindern kann.

Obwohl viele der Charakteristika des Malatkanals in elektrophysiologischen Studien erarbeitet wurden und mit biochemischen Studien übereinstimmen, ist es nicht auszuschließen, dass mehrere Typen von Malattransportsystemen, darunter auch Kanäle mit unterschiedlichen Kanalampplituden, am Tonoplasten existieren können (Cheffings et al., 1997).

1.4 Die Vakuole als ein multifunktionelles Kompartiment beim CAM

Die Malatakkumulation in die Vakuole kann man nicht isoliert von anderen Funktionen der pflanzlichen Vakuole betrachten. Die Vakuole spielt eine Schlüsselrolle bei Anpassungen von Pflanzen an Umweltbedingungen (Wink, 1993; Martinoia et al., 2000). Beim CAM ist die Bedeutung des vakuolären Kompartiments besonders hervorgehoben. In diesen Pflanzen kann die Vakuole innerhalb einer ausdifferenzierten Mesophyllzelle bis 98 % des gesamten Volumens einnehmen (Lüttge, 1988; Winter und Smith, 1996). Die Vakuolengröße stellt eine der Vorbedingungen bei der CAM-Induktion dar, da die nächtliche Akkumulation von C_4 -Säuren teilweise von der vakuolären Speicherkapazität limitiert ist (Cushman und Borland, 2002). Die große zentrale Vakuole hat außerdem eine raumauffüllende Funktion (Wink, 1993). Durch eine Vergrößerung der Vakuole kann eine schnell wachsende Pflanzenzelle das neu erworbene Volumen energetisch günstig auffüllen, um eine optimale Organellenposition innerhalb der Zelle zu erreichen.

Die Umstellung auf CAM einiger fakultativer CAM-Pflanzen, unter anderen auch *M. crystallinum*, ist eine Reaktion auf die Verringerung des Wasserpotentials im Boden und auf den daraus folgenden Wasserverlust in den Blättern (Osmond, 1978; Lüttge, 1987).

Dabei sorgt die CAM-bedingte Säurespeicherung zusätzlich für einen osmotischen Ausgleich mit der Substratlösung, was eine weitere Wasseraufnahme ermöglicht. Darüber hinaus sind die CAM-Pflanzen fähig, das Gesamtwasserpotential im Gewebe höher zu halten als im Boden, indem sie die Vakuolen für die Wasserspeicherung benutzen. Die Rolle der Vakuolen als Wasserreservoir ist besonders in den epidermalen Blaszellen von *M. crystallinum* auffällig. In der Lichtphase fließt das Wasser aus den mehrere Pikoliter-großen Vakuolen der Blaszellen entlang des osmotischen Potentials in Richtung Mesophyll. Dies dient zu einer Pufferung extremer Wasserpotentialschwankungen im diurnalen Rhythmus bzw. wenn Wasseraufnahme bei extremer Trockenheit nicht mehr möglich ist (Osmond, 1978; Lüttge, 1993). An der Regulation des Wasserhaushalts der Zelle sind spezielle, membranintegrierte Wassertransportproteine (*major intrinsic proteins*, MIP) beteiligt (Martinoia et al., 2000). 14 für MIPs kodierende Gene wurden im Genom von *M. crystallinum* gefunden (Kirch et al., 2000), für zwei MIPs (MIP-F und eventuell MIP-B) konnte die tonoplastidäre Lokalisierung nachgewiesen werden.

Der Transport und die Speicherung des Wassers spiegeln sich im Aufbau des Zellurgors wider. Bei CAM-Pflanzen unterliegen die Wasseraufnahme und der damit verbundene Turgor dem diurnalen Rhythmus (Winter und Gademann, 1991; Winter und Smith, 1996). Sie steigen während der Dunkelphase zusammen mit der Säurekonzentration an und erreichen früh morgens nach dem Schließen der Stomata ein Maximum. Die niedrigsten Werte erreicht der Zellturgor am Ende der Lichtphase, wobei die gemessenen diurnalen Turgorschwankungen mehr als 0,5 Bar betragen können (Lüttge, 1988; Lüttge, 1993).

Das Vakuolenlumen ist mit einer komplexen wässrigen Lösung von Ionen und Metaboliten gefüllt. Vakuolärer Transport, die Speicherung von H^+ , K^+ , Na^+ und anorganischer Anionen, wie Chlorid, Sulphat, Phosphat und Nitrat, sorgt für das Aufrechterhalten der Ladungs- und Ionenbalance im Cytosol (Martinoia et al., 2000). Außerdem stellt die Vakuole ein wichtiges intrazelluläres Kalziumspeicherreservoir dar, was eine große Bedeutung bei der Signaltransduktion hat (Sanders et al., 1999; Martinoia et al., 2000). In *M. crystallinum* liegt vakuoläres Kalzium sowohl in löslicher Form, als auch teilweise in Form von Oxalatkristallen vor (Lüttge et al., 1978). In Vakuolen junger nicht gestresster Pflanzen von *M. crystallinum* wurden folgende Konzentrationen der oben erwähnten Ionen gemessen: pH 6,0-6,5; 100 mM K^+ ; 50 mM Na^+ und 10 mM weitere anorganische Kationen sowie 50 mM anorganische Anionen (der restliche Teil der Kationen ist mit organischen Anionen, wie Malat, Citrat, Oxalat etc. ausgeglichen) (Adams et al., 1998).

Der Ionenstatus der Pflanzen ändert sich jedoch dramatisch mit dem Übergang zum CAM, besonders wenn die CAM-Induktion durch Salzstress ausgelöst wird. Dabei zeigt *M. crystallinum* eine hohe Salzzakkumulation, die bis zu 600 mM in den Mesophyllgewebe erreichen kann (Lüttge et al., 1978; Adams et al., 1998). *M. crystallinum* zeigt bei einer moderaten NaCl-Konzentration von 100–200 mM in ihrem Wurzelmilieu ein Wachstumsoptimum (Vera-Estrella et al., 1999) und kann einen Anstieg der Salzkonzentration bis 700 mM tolerieren. Im Gegensatz zu Glykophyten ist die Salzzakkumulation in jungen, wachsenden Blättern der Halophyte *M. crystallinum* am höchsten. Hier wird anstelle metabolisch teurer organischer Osmotika das im Außenmedium verfügbare NaCl für eine osmotische Einstellung in den Zellen benutzt. Wegen der Ähnlichkeit des Ionenradius in der hydrierten Form kann Natrium um die Kaliumbindungsstellen im Cytosol konkurrieren. Um ein hohes K^+ / Na^+ -Verhältnis im Cytoplasma zu bewahren und damit die toxische Wirkung des Natriums auf metabolische Reaktionen zu vermeiden, wird Na^+ zusammen mit seinem Gegenion Cl^- in die Vakuole sequestriert (Blumwald et al., 2000).

1.5 Natrium- und Chloridtransport am Tonoplasten

Der Transport von Natrium in die Vakuole wird durch den Natrium-Protonenantiporter (Na^+H^+ -Antiporter) vermittelt, dessen Aktivität am Tonoplasten glykophytischer und halophytischer Pflanzenspezies nachgewiesen wurde (Blumwald und Poole, 1985; Garbarino und DuPont, 1989; Barkla und Blumwald 1991; Barkla et al., 1995; Gaxiola et al., 1999; Blumwald et al., 2000; Barkla et al., 2002). Diese Studien zeigten, dass die Aktivität des Na^+H^+ -Antiporters mit der Konzentration des angebotenen Natriums korreliert ist. Außerdem weisen halophytische Pflanzen (z.B. der salztolerante *Plantago maritima* im Vergleich zum salzempfindlichen *Plantago media*) und salzadaptierte Pflanzen (z.B. salzgestresste *M. crystallinum*-Pflanzen) eine gesteigerte Na^+ -Transportaktivität im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle auf. Dies deutet an, dass der Na^+H^+ -Antiporter direkt an der Salzsequestrierung beteiligt ist. Indirekte Messungen des Natriuminflusses zeigten weiterhin, dass der sekundär aktive Na^+ -Transport durch den elektrochemischen Protonengradienten energetisiert wird, elektroneutral ist und eine Sättigungskinetik aufweist (Barkla et al., 1995; Apse et al., 1999). Der Na^+H^+ -Antiporter in *M. crystallinum* hat den höchsten K_m -Wert von etwa 50 mM Na^+ im Vergleich zu anderen Pflanzenspezies (Barkla et al., 1995). In diesem Zusammenhang wird eine relativ hohe Na^+ -Konzentration im Cytoplasma von *M. crystallinum* vermutet. Das Gen, das für

den $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporter kodiert (AtNHX1), wurde in *Arabidopsis thaliana* identifiziert. Eine Überexpression dieses Gens in Hefe und *Arabidopsis thaliana* führte zu einem mehrfach angestiegenen $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiport am Tonoplasten und zur Salztoleranz (Apse et al., 1999; Aharon et al., 2003).

Im Gegensatz zum Natriumtransport ist über den Transport von Chlorid in die Vakuole wenig bekannt. In Studien mit dem chloridsensitiven Farbstoff Lucigenin konnte ein Chloridinflux an Tonoplastenvesikeln von *M. crystallinum* nachgewiesen werden (Wissing und Smith, 2000). Der Cl^- -Transporter zeigte dabei eine Sättigungskinetik mit einem K_m von etwa 17 mM und V_{\max} von $31 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ sowie eine Selektivität für Chlorid gegenüber anderen anorganischen Anionen und Malat. Außerdem konnte er durch ein negatives Potential am Tonoplasten stimuliert werden. Dagegen bewirkte ein niedriger pH-Wert auf der Vakuoleninnenseite eine Reduzierung der Cl^- -Transportaktivität.

1.6 Vakuoläre Transportsysteme unter Salzstress

Salzstress löst nicht nur in Hinsicht der Natrium- und Chlorid-Transportaktivitäten beträchtliche Veränderungen im vakuolären Transport aus. Die Expressionsrate und die Membranlokalisierung der unterschiedlichen MIP-Typen von *M. crystallinum* ändern sich während der Antwort auf einen salzinduzierten osmotischen Schock (Kirch et al., 2000). Unter einem osmotischen bzw. ionischen Stress, der von einer hohen NaCl-Konzentration verursacht wird, zeigen vakuoläre Ionenkanäle einen Aktivitätsrückgang (Bohnert und Cushman, 2000). Die Reaktion der V-ATPase und der V-PPase auf eine Salzadaption bzw. hohe NaCl-Konzentrationen im Medium ist unterschiedlich. Die V-ATPase weist bei einer hohen NaCl-Konzentration im Medium eine steigende Hydrolyse- und Protonentransportaktivität auf, was auf die Cl^- -Stimulierbarkeit der V-ATPase zurückzuführen ist (Lüttge und Ratajczak, 1997; Ratajczak, 2000). Andererseits verdoppeln sich die Proteinmenge und die Aktivität der V-ATPase während einer wochenlangen Salzbehandlung (Ratajczak et al., 1994 b; Wang et al., 2001; Lüttge et al., 2001). Die Reaktion der V-PPase auf Salzstress ist in Pflanzenspezies nicht einheitlich. Studien mit den nicht-halophytischen Pflanzen *Daucus carota* und *Acer pseudoplatanus* und der halophytischen Pflanze *Suaeda salsa* zeigten, dass die Salzbehandlung die V-PPase-Aktivität stimuliert (Colombo und Cerana, 1993; Zingarelli et al., 1994; Wang et al., 2001). Eine direkte reduzierende Wirkung hoher Na^+ -Konzentrationen auf die PP_i -Hydrolyserate konnte hingegen in Studien mit der V-PPase aus Wurzeln von *Vigna radiata* nachgewiesen werden (Nakamura et al., 1992). Die CAM-Induktion unter Salzstress

bewirkte auch in *M. crystallinum* eine Erniedrigung der V-PPase-Aktivität (Bremberger und Lüttge, 1992). In Hinsicht einer höheren Kapazität der V-ATPase zur Tonoplastenenergetisierung gegenüber der V-PPase wurde angenommen, dass letztere Pumpe beim Salzstress nur eine Nebenrolle spielt.

1.7 Verhältnis zwischen der Salzspeicherung und der CAM-Induktion in *M. crystallinum*

In vielen Pflanzen, darunter auch CAM-Pflanzen (z.B. Kakteen), wird die Malatakkumulation durch Salzstress beeinträchtigt (Lüttge, 1987; Lüttge 1993; Martinoia und Rentsch, 1994). Dagegen weist der *saltincluder* *M. crystallinum* unter einem starken und langanhaltenden NaCl-Stress eine Induktion des CAM auf (Lüttge, 1988; Bohnert und Cushman, 2000). Dem entsprechend ist die Expression der PEPC von *M. crystallinum* *in vivo* NaCl-stimulierbar (Winter und Smith, 1996; Lüttge, 1993). Die CAM-Induktion unter Salzstress ist vom Pflanzenalter abhängig. Einerseits sind die jungen Pflanzen im C₃-Status zu einer beträchtlichen Salzspeicherung bis zu 250 mM NaCl fähig. Andererseits ist der CAM unter Salz-Stress bei älteren Pflanzen (ab sechste Woche nach der Keimung) stärker ausgeprägt und irreversibel (Lüttge, 1993; Adams et al., 1998; Bohnert und Cushman 2000). Außerdem dauert die CAM-Induktion in *M. crystallinum* unter Salzstress über zehn Tage, was im Vergleich zu den anderen Stressfaktoren (z.B. hohe Lichtintensität) relativ lang ist (Broetto et al., 2002). Dagegen findet eine hohe NaCl-Akkumulation im Blattgewebe bereits wenige Tage nach Einsetzen des Salzstress statt (Adams et al., 1998). Die ontogenetischen Voraussetzungen des CAM und die oben erwähnte Unabhängigkeit der Salzakumulation vom Pflanzenalter weisen darauf hin, dass eine langfristige Adaptation an einen Salinität-bedingten osmotischen Stress der eigentliche Auslöser des CAM bei *M. crystallinum* ist, nicht aber die Akkumulierung des Salzes im Gewebe *per se* (Lüttge, 1993). Dies fand eine weitere Bestätigung, indem die typischen salzinduzierten Reaktionen, wie die Expression des Enzyms Myo-Inositol-Methyltransferase und die damit verbundene Akkumulation kompatibler Osmotika (Myoinositol, D-Pinitol und D-Ononitol) im Cytosol sowie die Erhöhung der Aktivitäten der V-ATPase und der P-ATPase bereits in nicht-photosynthetisch aktiven Zellkulturen von *M. crystallinum* stattfinden, während die CAM-Induktion das Organismusbildungsniveau erfordert (Vera-Estrella et al., 1999; Adams et al., 1992).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

M. crystallinum durchläuft in der Ontogenese eine Umstellung von der C₃-Photosynthese zum Crassulaceen Säurestoffwechsel. Da beim CAM die reversible Speicherung von Malat in der Vakuole im Tag-Nacht-Rhythmus ein zentraler Prozess des Zyklus ist, sollten Transportsysteme in Vakuolen von *M. crystallinum* während dieser Umstellung die Malattransportkapazität entsprechend erhöhen. Trockene und saline Standortbedingungen erfordern außerdem eine schnelle Reaktion der Pflanzen auf eine Erniedrigung des Wasserpotentials im Boden. Auch unter diesen Bedingungen spielen vakuoläre Transportsysteme von *M. crystallinum* eine entscheidende Rolle, indem sie zur osmotischen Balance mit dem Außenmedium beitragen und eine Sequestrierung des toxischen NaCl in die Vakuolen gewährleisten. Die Salz- und Malattransportvorgänge im Blattgewebe von *M. crystallinum* sind weder zeitlich noch räumlich von einander getrennt, da zum einen keine diurnale Rhythmik in der Salzkumulation nachgewiesen wurde und zum anderen NaCl direkt im Mesophyllgewebe akkumuliert wird. Das bedeutet, dass die Vakuolen photosynthetisch aktiver Zellen im CAM-Modus die Funktionen kontinuierlicher Salzspeicherung und diurnaler Malatoszillationen gleichzeitig erfüllen müssen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf dem Hintergrund der Identifizierung des Malattransportsystems im Tonoplasten von *M. crystallinum* die physiologische Regulation des Malattransports bei der C₃- und CAM-Photosynthese sowie unter Salzstress zu untersuchen. Dabei sollte der malatselektive Ionenkanal mittels der *Patch-clamp*-Technik in Vakuolen von C₃-Pflanzen und von Pflanzen, in denen die CAM-Induktion durch Salzstress oder durch eine hohe Lichtintensität hervorgerufen wurde, charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte das vakuoläre Kompartiment in den oben erwähnten Pflanzengruppen auf dem Niveau des gesamten Blattgewebes und einzelner Vakuolen charakterisiert werden. Weiterhin sollten mit Hilfe proteinbiochemischer Methoden vergleichende Untersuchungen der tonoplastidären Transportproteine, die an Malat- und Salztransport beteiligt sind, beim CAM, der durch Salzstress oder Hochlicht induziert wurde, durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Die Versuchspflanzen von *Mesembryanthemum crystallinum* L. wurden aus Samen (Sammlung des Botanischen Gartens, Darmstadt) bis zur Ausbildung des zweiten Folgeblattpaares (etwa vier Wochen lang) im Anzuchtsgewächshaus aufgezogen. Die weitere Anzucht erfolgte unter definierten Bedingungen in einer Phytokammer des ökophysiologischen Gewächshauses (Institut für Botanik, TU Darmstadt):

- 12 h Lichtphase mit einer Lichtintensität von $350-400 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ mit λ von 400-700 nm (HQI-R Lampen, Osram, Deutschland), einer Temperatur von 28 °C und relativer Luftfeuchte von 60 %;
- 12 h Dunkelphase mit einer Temperatur von 20 °C und relativer Luftfeuchte von 80 %.

Soweit nicht anderes vermerkt, wurden die Pflanzen mit Regenwasser gegossen. Nach der Ausbildung des dritten Folgeblattpaares (fünf Wochen alte Pflanzen) wurde eine Pflanzengruppe mindestens zwei Wochen lang mit einer hohen Lichtintensität von $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gestresst. Im Folgenden wurde diese Versuchsgruppe als Hochlicht-gestresste (HL) Pflanzen bezeichnet. Die Gruppe salzgestresster Pflanzen wurde über diese Zeit mit Wasser unter Zugabe von 400 mM NaCl gegossen. Die 4-5 Wochen alten mit Wasser gegossenen Pflanzen wurden als Kontrollpflanzen bezeichnet. Für die Experimente wurden vollständig entwickelte, unbeschädigte Blätter ab dem zweiten Folgeblattpaar verwendet.

2.2 Charakterisierung des Pflanzenmaterials

2.2.1 Herstellung von Blattpresssaft

Der Gesamtpresssaft aus dem rippenfreien Blattmaterial wurde zur Charakterisierung des Vakuoleninhaltes verwendet. Dies war hier zulässig, da in Mesophyllzellen besonders große Vakuolen vorkommen, die bis zu 90 % (in CAM-Pflanzen bis zu 99 %) des gesamten Zellvolumens einnehmen. Daher konnte man annehmen, dass das Vakuolenlumenmedium Hauptbestandteil des Blattpresssaftes war. Für die Herstellung von Blattpresssaft wurden Blätter von Pflanzen aller Versuchsgruppen am Ende der Dunkel- bzw. Lichtphase geerntet. Nach Ausschneiden dicker Rippen wurde das präparierte Blattgewebe eingefroren und wieder aufgetaut, um zelluläre Membranen zu zerstören. Nach zwei min Inkubation bei 80 °C (für eine Denaturierung der Malatenzyme) wurden die Blätter für 3-5 min mit 13000 Upm (Millipore, Heraeus Instruments, Deutschland)

zentrifugiert. Der Überstand wurde für nachfolgende Untersuchungen bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.2 Osmolaritätsbestimmung

Die Osmolarität des Blattpresssaftes wurde mit Hilfe eines kryoskopischen Osmometers (Osmomat 030, Gonotec, Deutschland) in jeweils $50\text{ }\mu\text{L}$ unverdünnter Probe gemessen. Dabei wurde deren Gefrierpunkt bestimmt und daraus die Konzentration osmotisch aktiver Substanzen ermittelt. Die erhaltenen Messdaten wurden vor allem zur Herstellung hypo- bzw. isoosmotischer Versuchslösungen verwendet.

2.2.3 Bestimmung des Malatgehaltes im Blattpresssaft

Diurnale Schwankungen der vakuolären Malatkonzentration dienen als Indikator für die CAM-Induktion in den gestressten Pflanzen. Hierzu wurde der Malatgehalt im Blattpresssaft aus Pflanzen der jeweiligen Anzuchtgruppe am Ende der Licht- und der Dunkelphase verglichen. Die Bestimmung der Malatkonzentration erfolgte in Anlehnung an Möllering (1974). Dabei wird die Konzentration von NADH, das bei der in Gegenwart von L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) ablaufenden enzymatischen Oxidierung des Malats entsteht, photometrisch gemessen. Nach der folgenden Reaktion ist die Menge an NADH äquivalent zur Menge an umgesetztem L-Malat:



Diese Reaktion kann durch das Abfangen des zweiten Reaktionsproduktes, OAA bis zu einem vollständigen Verbrauch des Malats getrieben werden. Hierzu wird noch eine Reaktion nachgeschaltet, bei der das gebildete OAA in Gegenwart von L-Glutamat und des Enzyms Glutamat-OAA-Transaminase (GOT) umgesetzt wird. Die entsprechende Reaktion ist unten wiedergegeben:



Der Malattest wurde bei Raumtemperatur (RT) in folgendem Reaktionsansatz (insgesamt $1,36\text{ mL}$) durchgeführt: 221 mM Glycylglycin mit NaOH auf pH 10 eingestellt, 37 mM L-Glutaminsäure mit NaOH auf pH 10 eingestellt, $3,47\text{ mM}$ NAD^+ , $3,7\text{ }\mu\text{g / mL}$ GOT, $13,7\text{ }\mu\text{M}$ L-Äpfelsäure für den Standardansatz bzw. $50\text{ }\mu\text{L}$ verdünnter Presssaft für den Probeansatz.

Nach dem Ansetzen des Reaktionsgemisches wurde die Grundextinktion im jeweiligen Ansatz gemessen (E_1). Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von L-MDH ($9 \mu\text{g} / \text{mL}$) gestartet und die Extinktionsmessung nach 20 min Inkubierung wiederholt (E_2). Die Extinktionswerte wurden auf einen Leerwert (die Extinktion im Reaktionsansatz ohne Presssaft und L-Äpfelsäure) korrigiert. Die Konzentration an gebildetem NADH wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt (Gleichung 2.1) und im Standardansatz und im Probeansatz verglichen:

$$c [\text{mM}] = (V * F * \Delta E) / (\epsilon * v * d * 1000) \quad (2.1)$$

V- Testvolumen [mL],

F- Verdünnungsfaktor des Presssaftes,

ϵ - molarer Extinktionskoeffizient von NADH, der bei 340 nm $6,22 \text{ cm}^2 * \mu\text{mol}^{-1}$ beträgt,

v – Probenvolumen [mL],

d – Lichtweg [cm],

ΔE – Differenz zwischen E_2 und E_1 , gemessen in einem Probe- bzw. Standardansatz.

2.2.4 Bestimmung des Citratgehaltes im Blattpresssaft

Zusätzlich zum Malat wurde der Citratgehalt am Ende der Dunkelphase bestimmt. Dabei wurde wiederum die Menge an NADH, das bei einer enzymatischen Reduktion verbraucht wird, photometrisch gemessen. Die zu reduzierenden Substanzen entstehen aus einer Spaltung des Citrats in Gegenwart von Citratlyase (CL):

Citrat \leftrightarrow OAA + Acetat.

Danach werden das entstandene OAA und sein Decarboxylierungsprodukt Pyruvat in Gegenwart von L-MDH und Laktat-Dehydrogenase (LDH) reduziert. Diese Reaktion erfolgt unter Verbrauch von NADH, dessen Menge äquivalent zur Ausgangsmenge an Citrat ist. Die dazugehörigen Reaktionen sind im folgend wiedergegeben:

$\text{OAA} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{L-Malat} + \text{NAD}^+$;

$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{L-Laktat} + \text{NAD}^+$.

Das Reaktionsgemisch (insgesamt 1,5 mL) wurde aus folgenden Substanzen zusammengesetzt: 164 mM Glycylglycin mit NaOH auf pH von 7,8 titriert, 0,19 mM ZnCl_2 , 0,19 mM NADH, $16 \mu\text{g} / \text{mL}$ L-MDH, $3 \mu\text{g} / \text{mL}$ LDH.

Die Extinktion wurde vor und 20 min nach der Zugabe von CL ($0,8 \cdot 10^{-3}$ U / mg Lyophilisat) bei RT in einem Reaktionsansatz (mit 25 μ L verdünntem Blattpresssaft) bzw. in einem Standardansatz mit 33,3 μ M Citronensäure gemessen. Die Konzentration des verbrauchten NADH wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (siehe Kapitel 2.2.3) errechnet und im Standardansatz und im Probeansatz verglichen.

2.2.5 Bestimmung der vakuolären pH-Wertes

Am Ende der Dunkelphase, wenn eine hohe Säurekonzentration in den Vakuolen zu erwarten war, wurde der pH des Vakuolensaftes getrennt aus den Blaszellen und aus dem Mesophyll der Blättern von *M. crystallinum* gemessen. Hierzu wurde die Blattoberfläche zuerst mit einer Rasierklinge vorsichtig abgekratzt. Die entstandene Flüssigkeit stellte grobenteils den Vakuolensaft aus epidermalen Blaszellen dar. Da der Saft auf der ganzen Blattoberfläche verteilt wurde und dessen Volumen extrem klein war, wurden die pH-Messungen mit Hilfe spezieller pH-Indikatorstreifen (pH-Fix 4,5-10,0, Roth, Deutschland) mit einer Genauigkeit von 0,5 pH-Einheiten durchgeführt. Anschließend wurden dicke Blattrippen und die Blaszellen am Rand des Blattes herausgeschnitten, und die Azidität des Presssaftes aus dem restlichen Blattgewebe ebenso mit Hilfe der pH-Indikatorstreifen bestimmt.

2.3 Herstellung nativer Blattquerschnitte

Von Blättern der unterschiedlichen Pflanzengruppen wurden 3-5 mm dicke Gewebestreifen herausgeschnitten. Davon wurden mit einer scharfen Rasierklinge dünne Querschnitte gemacht, die nach dem Waschen in einer leicht hypoosmotischen Lösung zur Färbung verwendet wurden.

2.4 Herstellung von Protoplasten und Vakuolenisolierung

Die Protoplasten aus Mesophyllzellen wurden durch einen enzymatischen Verdau der Zellwände isoliert. Hierzu wurden in den am Ende der Dunkelphase geernteten Blättern zuerst dicke Rippen ausgeschnitten und dann tiefe Einschnitte gemacht. Nach kurzem Waschen in einer isoosmotischen Lösung wurden die präparierten Blätter in eine kleine Plastikpetrischale mit 2 mL Enzymlösung überführt und 45-60 min bei 32 °C inkubiert. Die Enzymlösung enthielt 20 mM MES mit Tris zum pH-Wert von 5,7 titriert, 1 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 1 % (w/v) BSA, 1 % (w/v) Cellulase „Onozuka“ RS (Yakult Honsha, Japan), 0,2 % (w/v) Macerozym (Yakult Honsha, Japan) und 0,02 % (w/v) Pectolyase Y-

23 (Kikimann, Japan). Danach wurden die Blätter vorsichtig in eine Plastikpetrischale mit einer Versuchslösung (siehe Kapitel 2.10) überführt und sanft geschüttelt. Man konnte dabei das Herauslösen der Protoplasten aus dem Gewebeverband beobachten. Dabei schwamm ein Teil von ihnen an der Oberfläche der Versuchslösung, die anderen Protoplasten sammelten sich am Boden des Gefäßes. Die frisch präparierten Protoplasten wurden weiterhin sowohl zur Färbung, als auch zur Vakuolenisolierung verwendet.

Native Vakuolen wurden durch einen hypoosmotischen Schock aus den Mesophyllprotoplasten isoliert. Hierzu wurden die Protoplasten in einer Versuchslösung mit einer um 0,10-0,15 Osmol * kg⁻¹ niedrigeren Osmolarität als der Presssaft der jeweiligen Versuchspflanze resuspendiert. Eine rasche Zunahme des Protoplastenvolumens, die durch den niedrigen osmotischen Druck von außen verursacht worden war, induzierte einen Plasmalemmakollaps in den Protoplasten mit anschließender Vakuolenfreisetzung. In 10-15 min konnte das Freisetzen von Vakuolen bei etwa 30 % der Protoplasten beobachtet werden. Die isolierten Vakuolen wurden anschließend in einer isoosmotischen Versuchslösung stabilisiert und weiterhin zur Färbung und für elektrophysiologische Experimente verwendet.

2.5 Neutralrot-Färbung

Die Aziditätsbestimmung des Presssaftes wurde durch eine pH-sensitive Färbung von einzelnen Vakuolen mit Neutralrot (NR) ergänzt. Als schwache Base mit dem pK_a-Wert von 6,7 liegt NR beim cytosolischen pH von ungefähr 7,5 in einer ungeladenen, lipophilen, leicht gelblichen Form vor und kann daher ungehemmt Zellmembranen, einschließlich Tonoplasten passieren (Haugland, 1996). Nach seiner Protonierung in sauren Vakuolen wird NR hydrophil, rotgefärbt und reichert sich dort an. Außerdem akkumulieren die Mesophyllzellen von *M. crystallinum* im Vergleich zu epidermalen Blasen Zellen keine rotgefärbten Pigmente Betalaine (Lüttge et al., 1978). Daher konnte man annehmen, dass das rote Signal in den NR-behandelten Blattquerschnitten nur vom NR kommt und dadurch säurehaltige Vakuolen markiert.

Native Blattquerschnitte bzw. Protoplasten wurden bei RT mit 0,01 % (w/v) NR (aus einer 1 % (w/v) wässrigen Stammlösung) inkubiert. Nach dem Erreichen einer konstanten Färbung (in 30-45 min) wurden die Präparate gewaschen, in ein frisches Medium überführt und unter einem Lichtmikroskop (Karl Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht. Für eine quantitative Farbanalyse wurden Aufnahmen von Blattquerschnitten bzw. Protoplasten und Vakuolen mit Hilfe einer Mikroskop-kompatiblen digitalen Fotokamera (Coolpix 900,

Nikon, Japan) angefertigt. Die Bilder von Blattquerschnitten wurden weiterhin mittels der Bildverarbeitungsprogramme Photoshop 7.0 (Adobe International, Kanada) und ImageJ (*public domain Java image processing program, NIH Image*) analysiert. Dabei wurde der rote Kanal, in dem die NR-Färbung registriert wird, von den anderen Farbkanälen, dem grünen Kanal und dem blauen Kanal, separiert. Danach wurde die Intensität des Signals des roten Kanals durch digitales Abziehen einer schwarz-weiß-Digitalkopie des jeweiligen Vollfarbbildes auf Gesamthelligkeit korrigiert (Abb. 2.1 A-C). Weiterhin wurde für alle auf dem Bild vorhandenen Farbpunkte (Pixel) eine relative Intensität der Rotfärbung, die proportional zum Anteil des roten Kanals war, ermittelt (Abb. 2.1 D). Nach ihrer Rotintensität wurden die Pixel in vier Kategorien unterteilt. Pixel, die weniger als 10 Intensitätseinheiten aufwiesen, wurden aus weiteren Analysen ausgeschlossen, da sie dem Lösungshintergrund zuzuordnen waren. Farbpunkte mit 10 bis 40 Intensitätseinheiten repräsentierten NR-negative Objekte. Diejenigen Farbpunkte, die 40-60 Intensitätseinheiten zeigten, wurden den schwach gefärbten Objekten (rosa bis orange) zugeordnet. Intensiv gefärbte Objekte (rot) hatten mehr als 60 Intensitätseinheiten. Die Pixelanzahl der jeweiligen Kategorie wurde auf die Gesamtpixelanzahl des Bildes normiert. So wurden die relativen Anteile von NR-negativen und NR-angefärbten Objekten (hier Vakuolen) ermittelt. Aus der Analyse mehrerer Blattquerschnitte aus unterschiedlichen Pflanzengruppen konnte dann abgeleitet werden, wie sich die Anteile saurer (NR-gefärbter) und neutraler (NR-ungefärbter) Vakuolen im Mesophyllgewebe mit dem Übergang zum CAM und unter Salzstress ändern.

Eine quantitative Analyse der NR-Färbung in Protoplasten und Vakuolen konnte mit den oben erwähnten Computerprogrammen nicht durchgeführt werden. Die Protoplasten und Vakuolen in Suspensionsproben lagen weit verstreut und in unterschiedlichen Suspensionsschichten vor. Deshalb wurde visuell eine Farbabschätzung der NR-behandelten Protoplasten in jeweils 0,4 mL Suspensionsprobe durchgeführt.

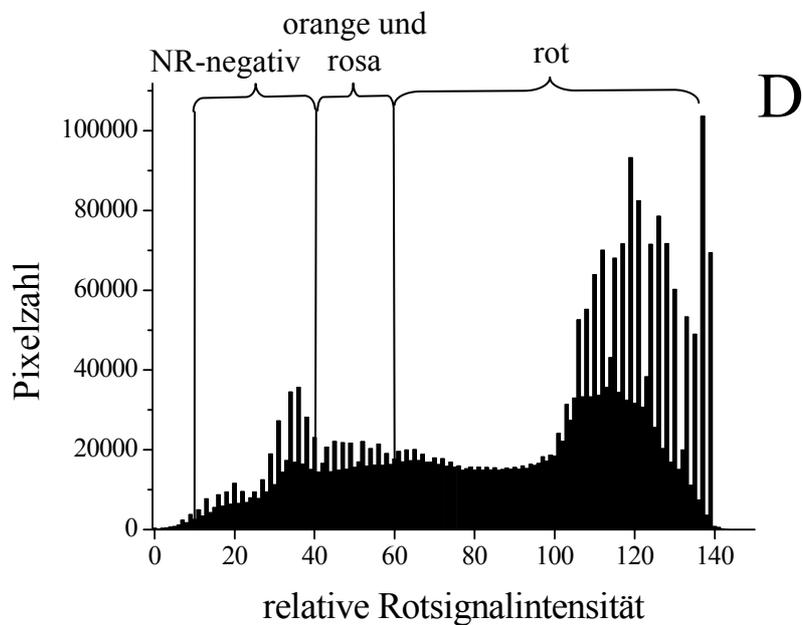
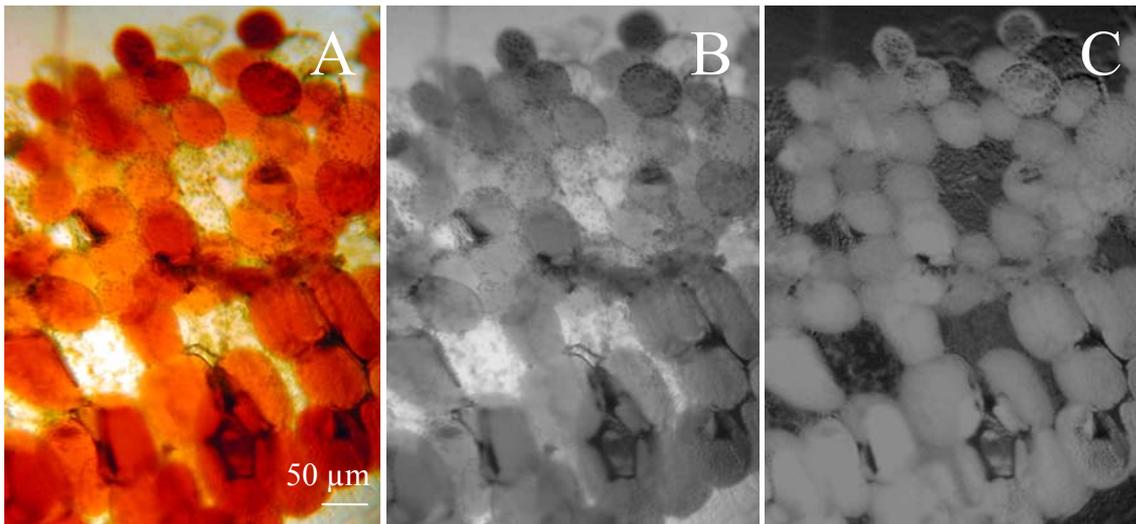


Abbildung 2.1: A) repräsentative mikroskopische Aufnahme eines Blattquerschnitts aus einer salzgestressten Pflanze nach Anfärbung mit NR; B) schwarz-weiße Kopie des Bildes A; C) resultierendes Bild aus der Differenz zwischen dem Vollsignal des Bildes B und dem Rotkanal des Bildes A; D) Verteilung der Pixel nach der Intensität des Rotsignals, ermittelt aus dem Bild C.

2.6 BCECF-Färbung

Die Unterschiede in der Vakuolenazidität, die durch die Färbung mit dem säuresensitiven NR gefunden worden waren, wurden mittels einer parallelen Färbung mit einem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein) überprüft. Die Fluoreszenz von BCECF ist stark pH-abhängig; sie tritt im alkalischen Milieu auf und wird bereits im leicht sauren Milieu (pH = 5,5) fast vollständig gelöscht (Haugland, 1996). Außerdem wird der Farbstoff BCECF in alkalischen Zellkompartimenten akkumuliert, weil er bei neutralen und alkalischen pH-Werten negative Ladungen trägt und daher nicht membrangängig ist. Zu einer nicht-invasiven Zellbeladung mit diesem Farbstoff wurde seine membranpermeierende, nicht-fluoreszierende Ester-Form (Acetoxymethylester, AM) verwendet. Innerhalb der Zellen wird die lipophile Gruppe des BCECF-AM von unspezifischen Esterasen abgespalten, und seine Fluoreszenzfähigkeit wieder hergestellt (Haugland, 1996; Swanson und Jones, 1996). Zur NR-BCECF-Doppelfärbung wurden Protoplasten und Vakuolen 30-45 min bei RT mit 1 μ M BCECF-AM (aus einer 1 mM Stammlösung in DMSO) zusammen mit 0,01 % (w/v) NR inkubiert. Die Färberegebnisse wurden unter einem inversen Mikroskop (Nikon, Japan) analysiert, das mit einer Quecksilber-UV-Lampe (HBO 50 W / AC, Osram, Deutschland) und einem Filtersatz (Bandpassspiegelfilter 490:510 nm; Omega Optical, USA) ausgerüstet war. Die Aufnahmen von Protoplasten und Vakuolen wurden jeweils im Durch- und UV-Licht mit Hilfe der Digitalkamera hergestellt.

2.7 Lysosensor-Färbung

Im Vergleich zu den NR und BCECF, die entweder bei saurem (NR) oder bei alkalischem (BCECF) Milieu ein positives Signal aufweisen, zeigt der ratiometrische membranpermeierende Fluoreszenzfarbstoff Lysosensor (LysoSensor *yellow / blue* DND-160, Molecular Probes, USA) sowohl bei niedrigen, als auch bei hohen pH-Werten positive und qualitativ unterschiedliche Signale, z.B. eine gelb-grüne Fluoreszenz im sauren und eine blaue Fluoreszenz im alkalischen Milieu (Haugland, 1996). Daher eignet sich Lysosensor (LS) besser als NR und BCECF für eine spektrometrische pH-Bestimmung innerhalb unterschiedlicher Vakuolentypen.

Blattquerschnitte, Protoplasten bzw. Vakuolen wurden 45-60 min mit 1 μ M LS (aus einer 1 mM Stammlösung in DMSO) inkubiert. Die Anregung der LS-Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Monochromators (Till Photonics, Deutschland) im isosbestischen Punkt von 360 nm. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit der digitalen Fotokamera unter einem

Mikroskop (Zeiss Axiovert 100, Karl Zeiss, Deutschland) mit einem dichroitischen Filtersatz FITC (*cut off* > 410 nm; Omega Optical, USA) angefertigt. Mit Hilfe der Photoshop-Software wurde eine quantitative Analyse der beobachteten Fluoreszenzsignale durchgeführt, indem ein Quotient zwischen durchschnittlichen Signalintensitäten des digital separierten grünen und des blauen Farbkanals ermittelt wurde. Absolute pH-Werte des Vakuolenlumens wurden mit Hilfe einer LS-Eichkurve ermittelt. Die Eichung des Farbstoffs wurde *in vitro* in einer Reihe von 100 mM Äpfelsäurelösungen durchgeführt, die mit BTP auf die pH-Werte von 2,3 bis 7,7 eingestellt wurden. In Abbildungen 2.2 A und B sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von den mit 10 µM LS versetzten Standardlösungsproben sowie dazugehörige Intensitätshistogramme des grünen und des blauen Farbkanals dargestellt. Die erhaltenen Eichdaten konnten gut mit einer Gleichung für pH-sensitive ratiometrische Farbstoffe (Haugland, 1996) beschrieben werden (Gleichung 2.2) und ergaben eine sigmoidale Eichkurve (Abb. 2.2 C):

$$\text{pH} = \text{pK} - \lg \left(\frac{R - R_B}{R_A - R} \right) * 0,95 \quad (2.2)$$

pK – Fluoreszenz-Dissoziationskonstante von LS beträgt 4,2 Einheiten (Haugland, 1996),

R – Wert des Grün / Blau-Verhältnisses,

R_A und R_B – dementsprechend limitierender Wert des Grün / Blau-Verhältnisses im sauren oder alkalischen Endpunkt der Titration.

Die LS-Eichkurve zeigte in einem Bereich von 3,5 bis 5,5 pH einen nahezu linearen Verlauf; folgend ist die pH-Auflösung hier am besten.

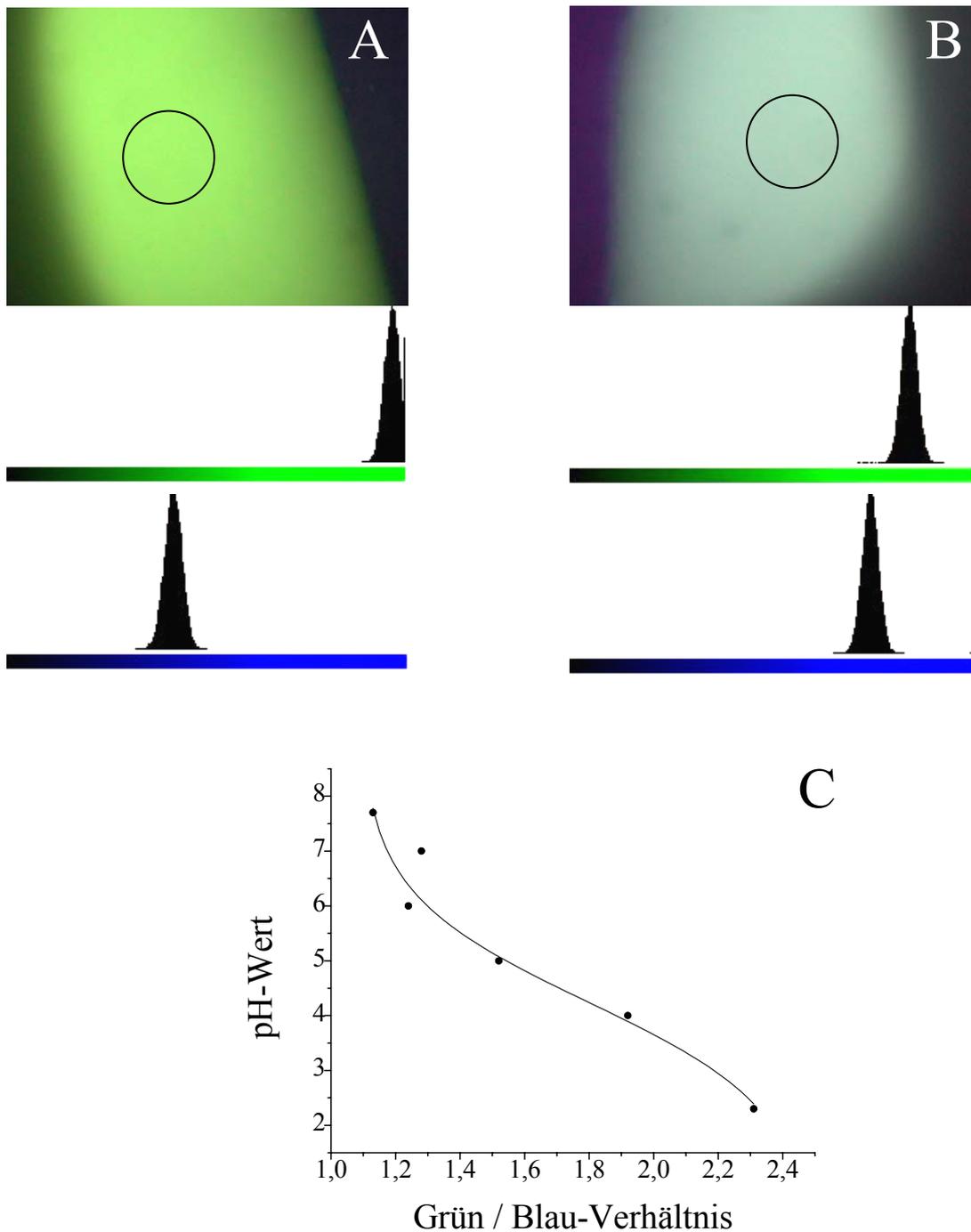


Abbildung 2.2: A) LS-Fluoreszenzaufnahme der Standardprobe mit dem pH-Wert von 2,3 mit den Intensitätshistogrammen des durchschnittlichen Signals des grünen bzw. blauen Kanals, ermittelt innerhalb des mit Kreis markierten Bereiches; B) LS-Fluoreszenzaufnahme der Standardprobe mit dem pH-Wert von 7,7 mit den Intensitätshistogrammen des durchschnittlichen Signals des grünen bzw. blauen Kanals, ermittelt innerhalb des mit Kreis markierten Bereiches; C) LS-Eichkurve.

2.8 Inhaltsstoffbestimmungen in sauren und neutralen Vakuolen

Zur Kristallanalyse wurden jeweils 10 μL Protoplastensuspension aus oberen und unteren Suspensionsschichten entnommen, dünn auf einen Objektträger aufgetragen und bei RT an der Luft angetrocknet. Nach Verdunsten des Wassers wurden die ausgebildeten Kristalle unter dem Mikroskop mit einem Set zur kompensierten Lichtpolarisation (Polarisator, einfacher Analysator, Kompensator Gips Rot 1. Ordnung und Interferenzkontrast-Hellfeld-Phasenkontrast-Kondensator) analysiert. Zum Vergleich wurden Kristalle verwendet, die sich nach Austrocknen von Proben der Standardlösungen (500 mM Mannit, 500 mM Äpfelsäure, 50 mM Citronensäure und 500 mM Natriumchlorid) ausgebildet hatten.

2.9 Versuche zur Erfassung der Dynamik des Vakuolenverhaltens innerhalb einer Mesophyllzelle

Die NR-angefärbten Blattquerschnitte aus salzgestressten Pflanzen (siehe Kapitel 2.5) wurden in ein NR-freies Medium, auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Spalten zwischen den Gläsern wurden mit geschmolzenem Paraffin abgedichtet, um das Präparat vor Austrocknung zu schützen. Nach einer ersten mikroskopischen Kontrolle wurden die Präparate für einige Stunden Weißlicht (eine Halogenlampe mit geringer Hitzeemission) ausgesetzt. In Zeitabständen von 30 min wurde der Zustand ausgewählter Zellen mit zwei Vakuolentypen (mit einer NR-negativen und einer NR-angefärbten Vakuole) beobachtet und mit Hilfe der Digitalkamera dokumentiert. Die Bilder wurden dann mit der Photoshop- und ImageJ-Software analysiert. Dabei wurden die Gesamtzellfläche, die Fläche der NR-angefärbten und NR-negativen Kompartimente gemessen und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

2.10 Versuchslösungen für die Färbung und für elektrophysiologische Messungen

Die Inkubationslösung für die Färbung mit NR und allen anderen verwendeten Farbstoffen (BCECF-AM und LS) setzte sich aus 10 mM L-Äpfelsäure, mit BTP auf pH von 7,7 eingestellt, und 3 mM MgCl_2 zusammen. Soweit nicht anders vermerkt, hatte die Badlösung, mit der die *Patch-clamp*-Messungen durchgeführt wurden, die gleiche Zusammensetzung. Die Pipettenlösung enthielt 100 mM L-Äpfelsäure, mit BTP auf pH 7,7 eingestellt und 3 mM MgCl_2 . Die Osmolarität aller Lösungen wurde mit Mannitol auf 0,3 $\text{Osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ für die Kontrollpflanzen, 0,4 – 0,5 $\text{Osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ für die HL-gestressten und 1,0 – 1,2 $\text{Osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ für die salzbehandelten Pflanzen eingestellt.

2.11 Durchführung der elektrophysiologischen Messungen

Das elektrische Potential bzw. der Strom durch Tonoplasten wurde mit Hilfe der Standard-*patch-clamp*-Technik (Hamil et al., 1981) anhand einer am *Patch-clamp*-Verstärker EPC-7 (Listelectronic, Darmstadt, Deutschland) angeschlossenen Messelektrode gegen die im Bad befindliche Referenzelektrode gemessen. Die Glaspipetten mit der Öffnungsweite von einem Paar Mikrometern für den flüssigen Teil der Messelektrode wurden mit Hilfe eines vertikalen Zweischiittpipettenziehers (PP-830, Narishige, Japan) aus Borosilikatglaskapillaren (Kimax-51, Kimble Products, USA) hergestellt. In den angegebenen Versuchslösungen (siehe Kapitel 2.10) betrug der Widerstand der freien Messelektrode ca. 13 M Ω . Der im Bad befindliche Teil der Pipettenspitze wurde von außen mit Wachs (*blue inlay casting wax*: Kerr Italia S.p.A., Scafati, Italia) beschichtet, um die Pipettenkapazität zu minimieren.

Für das Erhalten der *vacuolar-attached*-Konfiguration wurde die Messelektrode nach der Kompensierung des *Offset*-Potentials mit Hilfe eines Mikromanipulators (MMO-203, Narishige, Japan) an der Außenseite einer Vakuole plaziert und durch Anlegen eines leichten Unterdrucks an die Vakuolenmembran angeheftet. Hydrophobische Wechselwirkungen zwischen dem Pipettenglas und der Membran führten zum Ausbilden am Rand der Messelektrode eines hohen Abdichtwiderstandes (*Seal*) von >10 G Ω . Die *Seal*-Formierung wurde mittels eines Speicheroszillogskops (OS-3020D, Voltkraft, Korea) kontrolliert. Eine Beschichtung der Glasskapillaren von innen mit *Sigmacote* (Sigma, Deutschland) verbesserte die *Seal*-Qualität, indem bei der Ausbildung des *Seal* nur eine kleine Fläche des Glases beteiligt war, wo während des Pipettenziehens die *Sigmacote*-Beschichtung abgebrannt wurde (Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995). Mit dem hohen Abdichtwiderstand und daher geringem Rauschen konnten kleine ionische Ströme durch Tonoplastenkanäle aufgelöst und registriert werden, die sich am Membranfleck direkt unter der Messelektrode befanden.

Für weitere Untersuchungen wurden die *inside out*-(cytoplasmische Seite des Tonoplasten nach außen) und *outside out*-(luminale Seite des Tonoplasten nach außen)-Konfigurationen verwendet. Für die *inside out*-Messungen wurde die Membran unter der *Patch*-Pipette durch einen kräftigen Saugzug bei gleichzeitigem Anlegen kurzer bipolarer Spannungspulse von ± 500 mV zerstört. Damit wurde elektrischer Zugang zum Vakuoleninneren erzeugt. Dies äußerte sich durch eine schlagartige Erhöhung der langsameren Kapazitätskomponente (Membrankapazität). Beim Wegziehen der *Patch*-Pipette von der Vakuole konnte sich die Membran unter der Pipettenspitze wieder

zusammenschließen, was zu einer Isolierung eines kleinen Tonoplastenareals mit cytoplasmischer Seite zum Bad führte. Zum Erzeugen der *outside out*-Konfiguration wurde direkt nach der *Seal*-Formierung aus der *vacuolar-attached*-Konfiguration ein Membranareal isoliert. Die zuletzt erwähnte Konfiguration wurde jedoch selten erfolgreich erhalten.

Die Erfassung und Aufzeichnung der Daten erfolgte mit Hilfe der PCLAMP 5.5 Hard- und Software (Axon Instruments, USA). Die Messdaten wurden bei 1 kHz über einen 8-Pol-Besselfilter Tiefpass-gefiltert, mit einer Abtastungsrate von 3 kHz mittels eines Analog-Digital-Wandlers (TL-1 DMA Interface, Axon Instruments, USA) digitalisiert und auf der Computerfestplatte gespeichert. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Clampfit 8.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), Excel 97 (Microsoft Corp., USA) und Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, USA).

In meisten Fällen wurde die Leitfähigkeit eines Membranareals mit einer Spannungsrampe (genauere Beschreibung siehe im Kapitel 3.7) getestet. Ein Rampenprotokoll wurde 10- bis 20-mal wiederholt, um eine mittlere Stromaktivität zu erhalten. Die gemessenen Stromamplituden wurden danach gegen die entsprechenden Spannungen aufgetragen. Daraus ergaben sich Strom-Spannungs-Kennlinien (I/V-Kurven). Die I/V-Kurven verliefen meistens nicht linear: in Bereichen von > 20 mV und < -20 mV waren hohe Stromamplituden zu registrieren, was aus Aktivitäten spannungsabhängiger Ionenkanäle an Tonoplasten resultierte; hingegen war in dem Spannungsbereich von 0 bis ± 20 mV nur sehr geringen Strom zu sehen. Hier dominierte die Hintergrund-Leitfähigkeit, die durch eine nicht-spezifische Membranleitfähigkeit bzw. einen nicht-perfekten Abdichtwiderstand verursacht wurde. Um die gemessenen Ströme um den Hintergrund-Strom zu korrigieren, wurde der Anteil des Hintergrund-Stroms in Spannungsbereichen von > 20 mV und < -20 mV durch die Extrapolation einer linearen Anpassung in dem Bereich von -20 bis 20 mV auf die restlichen positiveren und negativeren Spannungen hin ermittelt und vom Gesamtstrom subtrahiert (Thiel und Weise, 1999). Die damit erhaltenen Stromabweichungen von allen Messungen an einem Membranareal wurden danach gemittelt.

Bei der Bezeichnung der Membranspannungen und Ströme wurde die Vorzeichenkonvention für Endomembranen berücksichtigt (Bertl et al., 1992). Die Effekte von *Liquid-Junction*-Potentialen wurden durch die Verwendung der gleichen Lösung in der *Patch*-Pipette und für die Salz-Brücke in der Referenzelektrode minimiert (Amtmann und Sanders, 1997). Alle Messungen wurden bei RT durchgeführt.

2.12 Redoxpotentialmessungen

Das Redoxpotential (E_{red}) des Blattpresssafts wurde mit Hilfe einer konventionellen elektrischen Messmethode bestimmt (Thiel, 1994). Dabei wurde das elektrische Potential zwischen Elektroden gemessen, die in einen frisch hergestellten unverdünnten Presssaft eingetaucht wurden. Die Messelektrode war dabei ionisierbar. Ihr Messteil bestand aus einem dünnen Draht aus Platin / Iridium-Legierung (Goodfellow Metals, Cambridge, UK). Die Referenzelektrode war nicht-ionisierbar (ein Silber-Silberchlorid-Übergang mit einer Salzbrücke). Die Elektroden wurden an *input* (Messelektrode) und an *ground* (Referenzelektrode) des Oszilloskops angeschlossen. Eine Kalibrierung der verwendeten Elektroden wurde in Lösungen mit folgenden Anteilen von Kaliumhexacyanoferrat II (HCF II) und Kaliumhexacyanoferrat III (HCF III) durchgeführt: 75%:25%; 50%:50%; 25%:75%. Eine Auftragung der in den Standardlösungen gemessenen Potentiale gegen die E_{red} , die nach der Gleichung 2.3 für die erwähnten $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ -Konzentrationsverhältnisse errechnet wurden, ergab eine lineare Korrelation ($R = 0,998$) mit einer Steigung von 0,9 mV und dem Schnittpunkt mit der X-Achse bei 283 mV (Abb. 2.3). Alle in weiteren Untersuchungen gemessenen Potentiale wurden um das gefundene Mittelpunktpotential der verwendeten Elektroden korrigiert:

$$E_{\text{red}} = E_0 + R * T / F * \ln ([\text{Fe}^{3+}] / [\text{Fe}^{2+}]) \quad (2.3)$$

E_0 – Mittelpunktpotential für das Redoxpaar $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ unter Standardbedingungen gleich 430 mV,

R, F, T – Gas- und Faraday-Konstanten sowie absolute Temperatur.

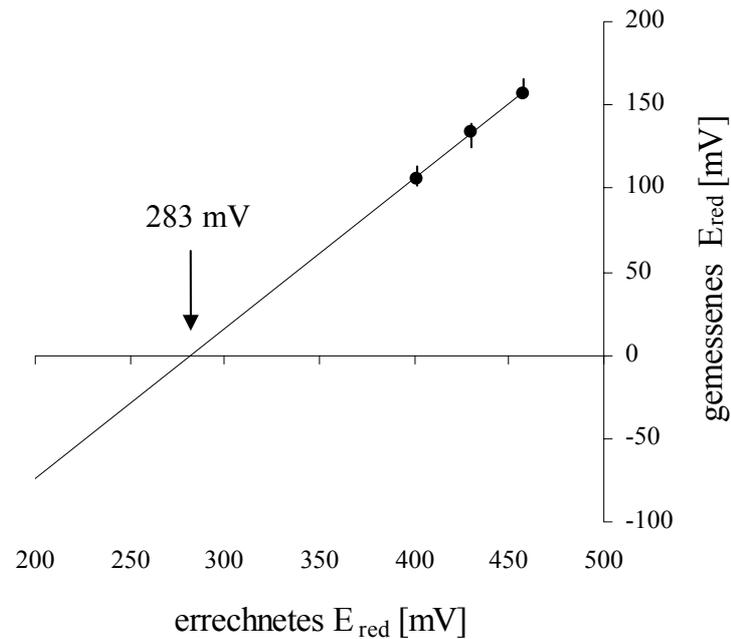


Abbildung 2.3: Kalibrierungskurve des verwendeten Elektrodenpaar, ermittelt in Lösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von HCF III und HCF II ($MW \pm SD$; $n = 4$). Der Pfeil mit der Zahl zeigt das Mittelpunktpotential unter den gewählten Messbedingungen an.

2.13 Partielle Trennung saurer und neutraler Vakuolen

Die Trennungsmethode beruhte auf einem in den vorausgegangenen Experimenten an NR-gefärbten Vakuolen beobachteten differentiellen Verhalten der Vakuolen unterschiedlicher Azidität in einer Suspension, das auf ihre Dichteunterschiede hinwies. Für die folgenden immunologischen Versuche wurden NR-gefärbte Vakuolen salzgestresster Pflanze durch Zentrifugation in einem Fikolldichtegradienten aufgetrennt (Buser und Matile, 1977; Struve et al., 1985). Hierzu wurde das Blatt nach der Inkubation im Enzymmedium (siehe Kapitel 2.4) vorsichtig in eine Plastikpetrischale mit einem Lysispuffer überführt, sanft geschüttelt und ca. 5 min inkubiert. Der Lysispuffer enthielt 10 % (w/v) Fikoll 400, 20 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 mM HEPES, 0,5 % (w/v) BSA, 0,01 % (w/v) Neutralrot. Er wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und hatte eine um ca. $0,2 \text{ Osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ niedrigere Osmolarität als der Presssaft der jeweiligen Pflanze. Die erhaltene Vakuolensuspension wurde dann vorsichtig abpipettiert, in ein 15 mL großes Zentrifugationsglas gegeben und mit 3 mL Gradientenpuffer und 2 mL Vakuolenpuffer überschichtet. Der Vakuolenpuffer enthielt 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1,5 % (w/v) BSA und wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Der Gradientenpuffer

wurde aus dem Lysispuffer (ohne BSA) und aus dem Vakuolenpuffer im Verhältnis 1: 1,5 zusammengesetzt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 4 °C unter 2600 Upm (Heraeus-Christ D 3086, Heraeus Holding GmbH, Deutschland). Nach 20 min Zentrifugation konnte man zwei Vakuolenbanden unterscheiden: eine rot gefärbte Bande an der Oberfläche des Zentrifugationsgemisches, angereichert mit NR-gefärbten Vakuolen, und mit einem kleinen Abstand darunter eine opake Bande (NR-negative Vakuolen); in dem Pellet befanden sich ganze Protoplasten, Bruchstücke und Chloroplasten. Die Vakuolenfraktionen wurden getrennt abgenommen und nach einer mikroskopischen Kontrolle bis zu weiteren Untersuchung bei – 20 °C aufbewahrt.

2.14 Subzelluläre Fraktionierung

Zur Isolierung einzelner zellulärer Membranen wurde eine Gesamtmembranfraktion (die mikrosomale Fraktion) aus dem Blattgewebe unterschiedlicher Versuchsgruppen (aus den C₃-Pflanzen, HL- bzw. salzgestressten Pflanzen) über einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Das Gradientenmedium enthielt 5 mM HEPES, mit Tris auf pH 7,5 eingestellt, 2 mM DTT, 1 mM Benzamidin, 1 µM Leupeptin und 30 % bzw. 50 % (w/w) Saccharose. Zur Herstellung des analytischen Saccharosegradienten wurden je 30 mL von der 30 %- und 50 %-Saccharosegradientenlösung mit Hilfe eines Gradientenmischers in Zentrifugationsröhrchen so übereinander geschichtet, dass die Dichte von oben nach unten kontinuierlich zunahm.

Zur Herstellung der mikrosomalen Fraktion wurde 20 g rippenfreies Blattmaterial von 2-4 Blattpaaren (pro Präparation wurde in der Regel das Blattmaterial von drei bis vier Pflanzen einer Versuchsgruppe vereinigt) in 50 mL Homogenisierungsmedium in einem Mixer homogenisiert. Das Homogenisierungsmedium enthielt 100 mM Tricin, mit 1 M Tris auf pH 8,0 eingestellt, 3 mM MgCl₂, 3 mM EGTA, 0,5 % (w/v) PVP, 0,5 % (w/v) PVPP, 1 mM DTT, 1 mM Benzamidin, 1 µM Leupeptin und wurde mit Mannitol auf die Osmolarität des jeweiligen Presssaftes eingestellt. Das Reduktionsmittel DTT und die Proteaseinhibitoren Benzamidin und Leupeptin wurden unmittelbar vor der Präparation frisch zugegeben. Während der Präparation wurden alle Schritte auf Eis bei Verwendung der auf 4 °C vorgekühlten Lösungen und vorgekühlten Geschirrs durchgeführt. Nach Filtrierung durch zwei Lagen Nylongaze wurde das erhaltene Homogenat 10 min bei 4500 Upm vorzentrifugiert, um nicht-zerstörte Zellen sowie Nukleus- und Chloroplastenfraktionen zu entfernen. Der erhaltene Überstand wurde dann 30 min bei 4 °C und 50000 Upm im 50.2 Ti-Festwinkelrotor (L7-55, Beckmann, Deutschland) zentrifugiert.

Das Pellet aus der letzten Zentrifugation (die mikrosomale Fraktion) wurde in 2 mL Gradientenmedium (ohne Saccharose) resuspendiert und in Zentrifugationsröhrchen mit je 30 mL Gradientenmedium mit kontinuierlichem Saccharosedichtegradienten (siehe oben) geladen. Die Zentrifugation erfolgte für 16 h bei 4 °C und einer Geschwindigkeit von 28000 Upm ohne Bremse im *swing out*-Rotor SW 28 (L7-55, Beckmann, Deutschland). Um einzelne Fraktionen zu trennen, wurde jeweils 1 mL des erhaltenen Gradienten von oben nach unten vorsichtig entnommen. Für die jeweilige Blattgewebepräparation wurden 33 Gradientenfraktionen gesammelt. Die Saccharosekonzentration in jeder Gradientenfraktion wurde mit Hilfe eines Refraktometers überprüft. Die Saccharosekonzentration der Fraktionen stieg nahezu linear von 13 % (w/w) bis 49 % (w/w) an. Für die unterschiedlichen Membranpräparationen wurden geringe Abweichungen des Saccharosegehaltes in vergleichbaren Fraktionen festgestellt, insbesondere bei niedrigen Saccharosedichten (Abb. 2.4). Aus diesen Gründen wurde die Saccharosekonzentration der Fraktionen für jede Präparation bestimmt und bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt. Die Gradientenfraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -74 °C aufbewahrt.

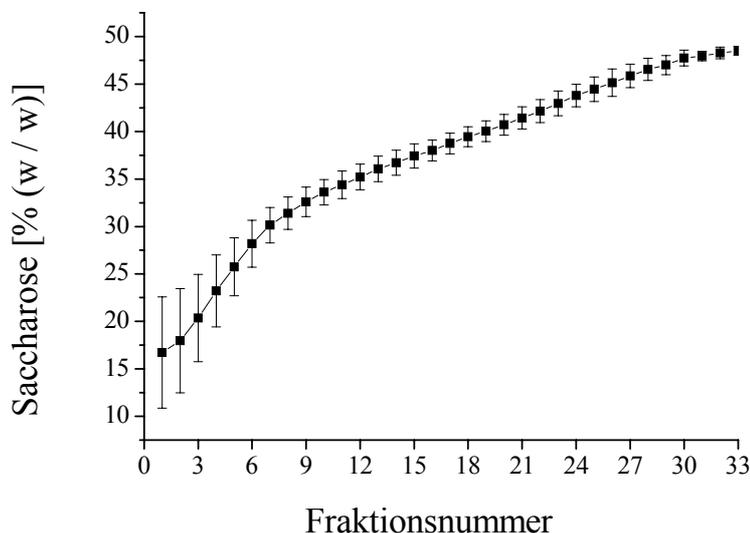


Abbildung 2.4: Saccharosekonzentrationen der Gradientenfraktionen, die nach Zentrifugation der mikrosomalen Fraktionen aus C₃-, HL- und salzgestressten Pflanzen in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten erhalten wurden (MW mit SD; n = 12).

2.15 Proteinbestimmung

Eine Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den erhaltenen Gradientenfractionen wurde nach Popov et al. (1975) durchgeführt. Dabei wurden Proteine, die in 5 μ L Probe der jeweiligen Gradientenfraction vorlagen, in saurem Milieu (in einem 1: 9 Essigsäure / Ethanol-Gemisch) mit 1,3 % (w/v) Amidoschwarz ¹⁰B (Merck, Deutschland) gefällt und angefärbt. Der nicht-gebundene Farbstoff wurde sorgfältig mit dem Essigsäure / Ethanol-Gemisch (siehe oben) ausgewaschen und das angefärbte Proteinpellet angetrocknet. Bei alkalischem pH-Wert (1 M NaOH) konnten die Protein-Amidoschwarz-Komplexe wieder gelöst werden, dabei war die Konzentration des freigesetzten Farbstoffs zur Proteinmenge proportional. Die Konzentration an freigesetzten Amidoschwarz wurde spektralphotometrisch bei 620 nm (beim Absorptionsmaximum des Farbstoffs) und RT mit Hilfe eines Photometers (Spektra Thermo, SLT Labinstrumente, Deutschland) gemessen. Die Proteinquantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die für BSA-Konzentrationen von 0 bis 0,027 mg/mL ermittelt wurde.

2.16 Konzentrierung und Denaturierung der Proteine

Da für nachfolgende immunologische Studien gleiche Auftragungsvolumina von Proben benötigt wurden, wurden die in den Proben befindlichen Proteine konzentriert. Die Proben der zu untersuchenden Gradientenfractionen mit der erforderlichen Proteinmenge wurden hierzu bei 4 °C in 1 mL 60 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12000 g (Eppendorfzentrifuge, Deutschland) wurde das Pellet von ausgefallenen Proteinen mit eiskaltem Aceton gewaschen und angetrocknet. Bei einer solchen TCA-Fällung wurden zusätzlich zur Proteinkonzentrierung auch die Deaktivierung von Proteasen und die Entfernung von Membranlipiden erreicht. Anschließend wurden die Proteine mit 20 μ L Probenpuffer versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Der Probenpuffer enthielt 50 mM Tris, mit HCl auf pH 6,8 eingestellt, 4 M Harnstoff, 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 15 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Farbstoff Bromphenolblau und 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol. Dabei sorgten SDS und Harnstoff für die Proteindenaturierung und das reduzierende Milieu (β -Mercaptoethanol) unterband die Protein-Protein-Wechselwirkung.

2.17 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse der Proteine auf den Gradientenfractionen wurde eine Elektrophorese in Polyacrylamidgelen verwendet. Die unter Zugabe von SDS entstandenen

negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe (siehe Kapitel 2.16) haben ein konstantes Ladung / Masse-Verhältnis und daher vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Während der Gelelektrophorese wandern sie im elektrischen Feld durch die poröse Polyacrylamidmatrix und werden anhand des Molekularsiebeffekts nach ihrer Molmasse getrennt.

Die Elektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen 1 mm dicken Gelsystem (zwei Gele mit unterschiedlicher Porengröße) in einem Puffer aus 25 mM Tris, 193 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS durchgeführt (Lämmli, 1970). Das obere großporige Sammelgel mit Taschen für die Auftragung der Proben diente zur Polypeptidfokussierung und wurde aus einem 5 % (v/v) Acrylamid / Bisacrylamid-Gemisches (4K Mix 37,5: 1, Applichem) und 0,4 % (w/v) SDS in 0,5 mM Tris, mit HCl auf pH 6,8 eingestellt, zusammengesetzt. Das untere Gel für die Auftrennung der Polypeptide wurde aus 12,5 % (v/v) Acrylamid / Bisacrylamid-Gemisches, 0,4 % (w/v) SDS und 1,5 mM Tris / HCl (pH 8,8) zusammengesetzt. Nach Zugabe des Radikalbildners Ammoniumperoxodisulfat, äquilibriert mit N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, erfolgte die Polymerisierung der Gelmische. Die Gele wurden in einer Mini-Protein II-Kammer (BioRad, München, Deutschland) hergestellt. Nach Beladung mit den zu untersuchenden Proben wurden sie an ein Spannungsgerät (PowerPac 300, BioRad, München, Deutschland) angeschlossen, das ein elektrisches Feld unter konstantem Strom von 20 mA je Gel erzeugte. Die Elektrophorese wurde anhand der Verschiebung der Bromphenolblau-Front kontrolliert. Bei RT betrug die Laufzeit ca. 2,5 h.

2.18 Western blotting

Die während der Gelelektrophorese getrennten Proteine wurden nachfolgend auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (Immobilon von Millipore, Billerica, USA) übertragen. Der Transfer erfolgte elektrophoretisch in Anlehnung an Ratajczak et al. (1994 a) in einer Halbtrockenzelle (BioRad, München, Deutschland). Dabei wurde ein Gel-Membran-Sandwich zwischen den in Blotpuffer (48 mM Tris-Glycin, pH 9,4) getränkten Filterpapier-Stücken platziert. Nach Kontakt mit Platin / Edelstahl-Elektroden der Blot-Apparatur erfolgte der Elektrotransfer bei Spannungen von 10,0 V, 12,5 V und 15,0 V je 15 min.

2.19 NBT-Immunfärbung

Vor einer Immunfärbung wurden die restlichen Proteinbindungsstellen auf den Membranen mit den geblotteten Proteinen durch 2 h Inkubation in 1 % (w/v) entfetteter Milchpulverlösung abgesättigt. Für die Milch- und die unten erwähnten Wasch- und Antikörperlösungen wurde 10 mM Tris mit 0,9 % (w/v) NaCl, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt, (TBS) verwendet. Nach ausgiebigem Waschen im TBS wurden die Blot-Membranen zu der angegebenen Zeit mit polyklonalen mit TBS 1:1000 verdünnten Antikörpern inkubiert, die gegen die unten aufgezählten Proteine gerichtet sind:

anti-VM23, gerichtet gegen VM23 (γ -TIP) aus *Raphanus sativus* (Maeshima, 1992), Inkubation über Nacht, hergestellt in Kaninchen;

ATP88b, gerichtet gegen das Holoenzym der V-ATPase von *Kalanchoe daigremontiana* (Haschke et al., 1989), Inkubation 2 h, hergestellt in Kaninchen;

anti-V-PPase, gerichtet gegen das Polypeptid der V-PPase von *Vigna radiata* (Maeshima und Yoshida, 1989), Inkubation über Nacht, hergestellt in Kaninchen;

anti-AtNHX1, gerichtet gegen den C-Terminus des AtNHX1-Produktes (des Na^+ - H^+ -Antiporters) von *Arabidopsis thaliana* (Apse et al., 1999), Inkubation über Nacht, hergestellt in Kaninchen.

Nach Wegwaschen der ungebundenen Antikörper wurden die Blot-Membranen für 1 h mit dem sekundären *anti-Kaninchen* Antikörper (*Goat-anti-rabbit-IgG*, Sigma, Deutschland) inkubiert, der an einer alkalischen Phosphatase gekoppelt und 1:15000 mit TBS verdünnt war. Die Aktivität der Phosphatase wurde nachfolgend für die Visualisierung der Position von Antigenen benutzt. Hierzu wurden die Blot-Membranen in einem Puffer mit 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 und 100 mM Tris, mit HCl auf einen pH-Wert von 9,5 eingestellt, äquilibriert und im Dunkeln in Gegenwart von 0,033 % (w/v) p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT) und 0,025 % (w/v) 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP) inkubiert. Dies hatte die Ausbildung eines blauen Farbstoff-Protein-Präzipitats zu Folge. Die Reaktion wurde durch Spülen mit *Aqua bidest.* gestoppt. Die Blot-Membranen wurden getrocknet und mit Hilfe eines Scanners dokumentiert. Apparente Molmassen der angefärbten Proteine wurden durch Vergleiche mit Molmassenstandard (Kaleidoscop Prestained Standards oder Precision Plus Proteintm Standards *all blue*, Bio-Rad Laboratories, Deutschland) ermittelt.

2.20 Bestimmung der V-ATPase- und V-PPase-Aktivitäten

Raten von ATP- und PP_i -Hydrolyse-Aktivitäten in Gradientenfraktionen wurden über die Freisetzung von anorganischem Phosphat (P_i) ermittelt, das unter optimalen Bedingungen in Gegenwart von ATPasen bzw. PPasen und den entsprechenden Substraten ATP und PP_i entsteht. Hierzu wurde das freigesetzte P_i in einen reduzierten, blauen Phosphomolybdat-Komplex umgewandelt, dessen Menge kolometrisch bei 820 nm ermittelt und mit Hilfe einer Eichkurve quantifiziert wurde (Ames, 1966).

Die Reaktion erfolgte bei 37 °C im Schüttelbad im Reaktionsansatz von 225 μ L Gesamtvolumen. Das Reaktionsgemisch enthielt 50 mM BTP, mit MES auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt, 50 mM KCl und 0,006 % (w/v) Detergenz Brij 58 sowie 5 mM Mg-ATP bzw. 0,2 mM PP_i und 2,0 mM $MgSO_4$. Um die ATP-Hydrolyse durch unspezifische Phosphatasen zu unterbinden, wurde zusätzlich 0,1 mM Na_2MoO_4 zugegeben. Nach 45 min Inkubation wurden die Enzyme durch Zugabe von 500 μ L 10 % (w/v) SDS inaktiviert. Nach Versetzen mit 500 μ L Phosphatreagenz (0,36 % (w/v) $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 1,43 % (w/v) Ascorbinsäure, 0,86 N H_2SO_4) wurde das Reaktionsgemisch weiter bei 37 °C inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach 45 min durch abruptes Temperaturabsenken auf 4 °C gestoppt. Die Extinktion wurde mit Hilfe des Spektrophotometers Spectronic Genesys™ 5 (Spectronic Instruments, USA) gemessen.

Die V-ATPase-Aktivität in Gradientenproben aus HL- und salzgestressten Pflanzen wurde als eine Differenz zwischen den P_i -Werten ohne und unter Zugabe des spezifischen V-ATPase-Inhibitors Concanamycin (20 nM) bestimmt (Dröse et al., 1993; Dröse und Altendorf, 1997). Die Aktivität der V-PPase wurde durch einen Vergleich der PP_i -Hydrolyse-Aktivität ohne und mit 50 mM KCl, dem Stimulator der membrangebundenen V-PPase (Maeshima, 2000) ermittelt.

2.21 Statistik

Daten, die auf mindestens drei unabhängigen Experimenten beruhen, sind als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) und Versuchszahl (n) angegeben. Zur Überprüfung der Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden F- und t-Tests mit Excel 97 (Microsoft Corporation, USA) oder Origin 6.0 (Microcal Software Incorporation, USA) durchgeführt.

2.22 Chemikalien

Soweit nichts anderes vermerkt, wurden alle Chemikalien über die Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deutschland), Merck KGaA (Deutschland) und Carl Roth & CO. KG GmbH (Deutschland) bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Stoffwechsels untersuchter Pflanzen

Die nächtliche Speicherung des Malats in der Vakuole und sein Rücktransport am Tag ins Cytosol mit anschließender Decarboxylierung sind zentrale Vorgänge des CAM-Zyklus. Daher kann die Differenz zwischen vakuolären Malatkonzentrationen am Ende der Dunkel- und Lichtphase (Δ Malat) zur Charakterisierung des Stoffwechselzustandes der Versuchspflanzen herangezogen werden.

In jungen, bis fünf Wochen alten, mit Regenwasser gegossenen Pflanzen betragen die Δ Malat-Werte $1,6 \pm 0,6$ mM ($n = 4$). Folglich wiesen die jungen, nicht-gestressten Pflanzen fast keine nächtliche Ansäuerung auf und zeigen damit ein für die C_3 -Photosynthese charakteristisches Verhalten. Sie werden im Folgenden als C_3 -Pflanzen bezeichnet. Dagegen stieg die Malatdifferenz in den zwei Wochen lang gestressten Pflanzen drastisch an. Hoch-Licht-gestresste Pflanzen (HL-Pflanzen) und Pflanzen, die mit 400 mM NaCl im Gießwasser behandelt wurden (salzgestresste Pflanzen), wiesen einen vergleichbaren Anstieg der Δ Malat-Werte auf, der $35,1 \pm 2,9$ ($n = 4$) bzw. $30,9 \pm 2,9$ mM Malat ($n = 8$) betrug. Dies zeigte, dass sich beide Gruppen gestresster Pflanzen (HL und Salz) zum Zeitpunkt der Experimente im CAM-Zustand befanden. Aus den vergleichbaren Δ Malat-Werten der HL- und salzgestressten Pflanzen konnte man außerdem schließen, dass durch beide Stressfaktoren die gleiche Ausprägung des CAM induziert wurde.

3.2 Färbung mit Neutralrot

3.2.1 Neutralrotfärbung der Blattquerschnitte

Abbildung 3.1 zeigt die typischen Aufnahmen von NR-angefärbten Blattquerschnitten aus C_3 -, HL- und salzgestressten Pflanzen zum Ende der Dunkelphase.

Die meisten Vakuolen der Kontrollpflanzen (C_3) wiesen am Ende der Dunkelphase nur eine leichte rötliche Färbung auf oder blieben unangefärbt (Abb. 3.1 A). Neben den leicht gefärbten und NR-negativen Vakuolen war auch eine kleine Population von Zellen mit intensiv gefärbten Vakuolen zu identifizieren, die sich im Bündelscheidebereich befand (Abb. 3.1 D). Die Abwesenheit der NR-Akkumulation in meisten Vakuolen der C_3 -Pflanzen deutete auf einen relativ hohen, nahezu neutralen pH-Wert ihres Lumens hin, was mit der niedrigen Azidität des Presssaftes aus Mesophyllgewebe dieser Pflanzen von pH 6,0-6,5 ($n = 3$) übereinstimmte. Die starke NR-Färbung in anderen Zellen deutete dagegen auf eine hohe Vakuolenazidität hin. Eine genaue Bestimmung des pH-Wertes in den

angefärbten Vakuolen anhand der NR-Färbintensität ist jedoch gescheitert, da die Färbung nicht nur von der pH-bedingten NR-Farbe (gelb oder rot), sondern auch von der Menge des in einer Vakuole akkumulierten Farbstoffs abhängig war. Aus diesen Gründen konnte die NR-Färbung in Vakuolen mit einfachen statischen Systemen, wie NR-Standardlösungen oder NR-Lösungsmikrotröpfchen in einer Oktanolphase, nicht verglichen werden.

Im Gegensatz zu C₃-Pflanzen sahen die Vakuolen aus HL-Pflanzen am Ende der Dunkelphase homogener aus: fast alle von ihnen wiesen eine intensive NR-Färbung und damit eine starke Ansäuerung auf (Abb. 3.1 B). Dies korrelierte mit dem niedrigen pH-Wert des Presssaftes aus Mesophyll von ca. 4,0-4,5 (n = 6), der am Ende der Dunkelphase bei dieser Pflanzen gemessen wurde. Dennoch konnte auch in HL-Pflanzen ein kleiner Anteil an nur leicht gefärbten Vakuolen und ganz NR-negativen Vakuolen identifiziert werden.

Auch ein Teil der Vakuolen aus salzgestressten CAM-Pflanzen zeigten eine intensive NR-Färbung (Abb. 3.1 C). Allerdings konnten NR-negative Vakuolen in salzgestressten Pflanzen im Vergleich zu den HL-Pflanzen wesentlich häufiger identifiziert werden, obwohl die salzgestressten Pflanzen einen beträchtlichen Säuregehalt im Mesophyll mit dem durchschnittlichen pH-Wert von 4,0 (n = 8) aufwiesen. Darüber hinaus war eine charakteristische Verteilung der NR-negativen Zellen im Blattgewebe der Salz-Pflanzen zu erkennen. Im Gegensatz zu den C₃-Pflanzen konnten die NR-negativen Zellen in salzgestressten Pflanzen in Bündelscheiden (Abb. 3.1 E) und in Mesophyllschichten unter den Blasenzellen lokalisiert werden (Abb. 3.1 F).

Um die Anteile an unterschiedlich gefärbten Vakuolen in allen untersuchten Pflanzengruppen (C₃-, HL- und Salz-Pflanzen) zu vergleichen, wurden alle Farbpunkte auf den Blattquerschnittsbildern auf die Intensität des roten Signals hin überprüft. Durch die Analyse der Farbhistogramme wurden drei Hauptkategorien der Rotfärbungsintensität in Vakuolen definiert: ungefärbte Objekte, Objekte mit einer mäßigen Färbung oder mit einer intensiven Färbung. Diese Farbklassen konnten den NR-negativen, leicht gefärbten (rosa bis orange) bzw. intensiv gefärbten (rot) Vakuolen zugeordnet werden. In HL-gestressten Pflanzen wiesen $73,2 \pm 10,9$ % (n = 8) aller Vakuolen eine intensive Rotfärbung auf (Abb. 3.1 G). Hingegen haben nur $4,9 \pm 2,7$ % (n = 7) der Vakuolen in C₃-Pflanzen eine starke NR-Akkumulation gezeigt. In salzbehandelten Pflanzen betrug der Anteil roter Vakuolen $28,0 \pm 12,0$ % (n = 12) und lag dabei deutlich höher als in C₃-Pflanzen. Allerdings zeigte

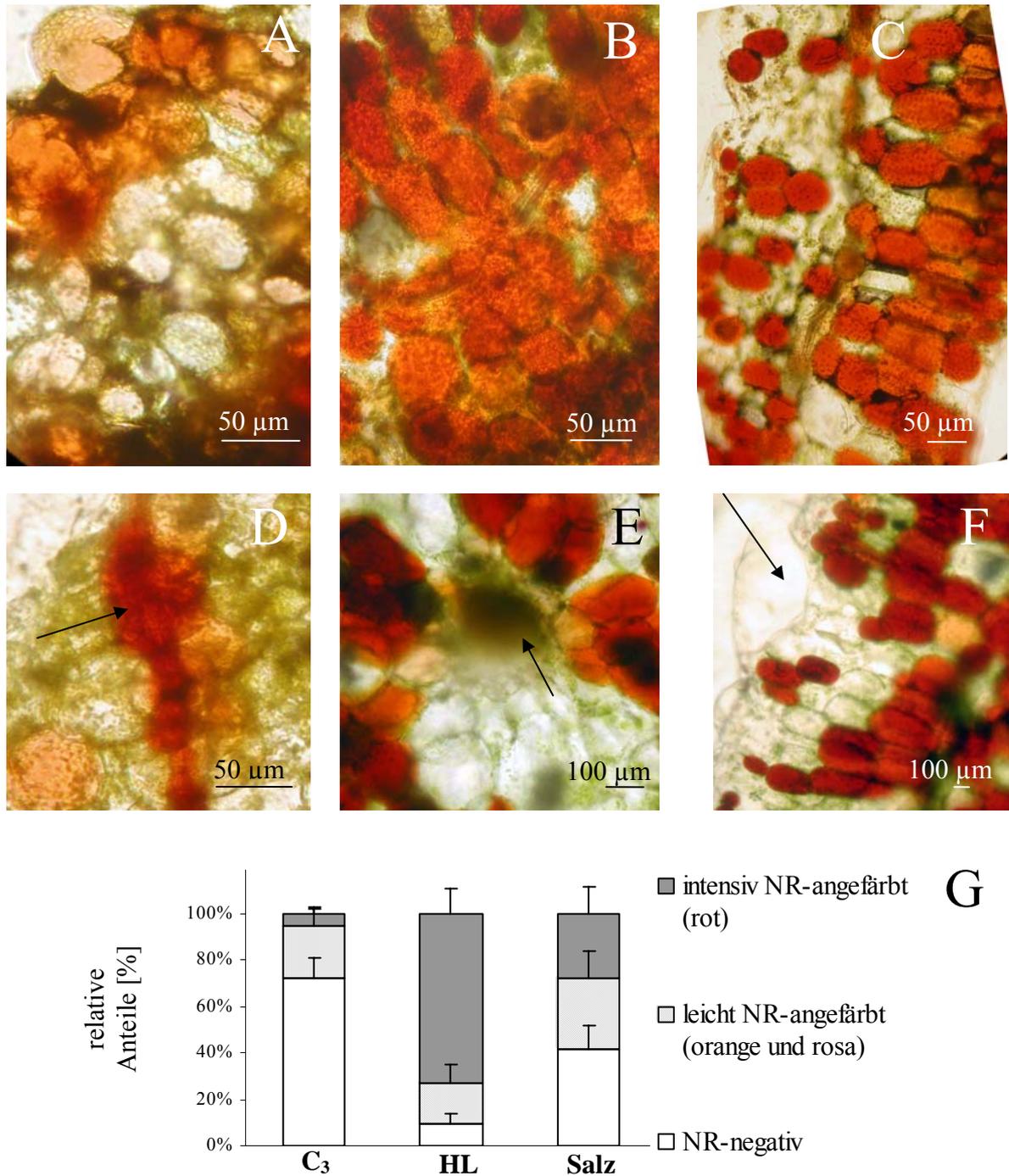


Abbildung 3.1 NR-angefärbte Blattquerschnitte: A) C₃-Pflanze; B) HL-gestresste Pflanze; C) salzbehandelte Pflanze; D) längsgetroffene C₃-Leitbündelscheide (mit einem Pfeil markiert); E) quergetroffene Leitbündelscheide aus einer salzgestressten Pflanze (mit einem Pfeil markiert); F) Blasenzone aus einer salzgestressten Pflanze mit dem unterliegenden Mesophyllgewebe; G) Prozentuale Anteile an unterschiedlich gefärbten Vakuolen in den Blattquerschnitten (MW mit SD; n = 10 - 12).

die Hälfte der Vakuolen aus salzgestressten Pflanzen keine NR-Färbung. Der höchste Anteil an NR-negativen Vakuolen von ca. 72 % konnte in C₃-Pflanzen gefunden werden. Die Population von leicht gefärbten Vakuolen war in allen Versuchsgruppen ungefähr gleich und betrug ca. 20–30 % aller Vakuolen.

3.2.2 Neutralrotfärbung der Vakuolenkompartimente innerhalb einer Zelle

Innerhalb einzelner Zellen von salzgestressten Pflanzen konnten Vakuolen mit unterschiedlicher NR-Akkumulation, intensiv gefärbte und NR-negative, identifiziert werden (Abb. 3.2). Auf den Konfokalbildern (Aufnahmen wurden von Tobias Meckel hergestellt) sieht man, dass die NR-gefärbten und NR-negativen Kompartimente nur durch einen dünnen Cytoplasmastrang getrennt waren und daher mit Sicherheit einer Zelle zugeordnet werden konnten (Abb. 3.2 A). Außerdem wiesen die NR-negativen Kompartimente keine für das Cytosol charakteristische Fluoreszenz auf (hier die grüne Falschfarbe), die vermutlich durch die im Cytosol befindlichen aromatischen Verbindungen verursacht wurde. Dies wies darauf hin, dass sich die NR-negativen Kompartimente vom Cytosol unterschieden, was zusammen mit ihrer Größe und mit dem Vorkommen im ausdifferenzierten Mesophyllgewebe auf ihre Vakuolenidentität hindeutete. Dabei waren die innerhalb einer Zelle befindlichen, unterschiedlich NR-gefärbten Vakuolenkompartimente ungefähr gleich groß, wie es in Abbildung 3.2 B zu sehen ist. Andere Zellen besaßen wiederum eine große NR-negative Vakuole in zentraler Lage und kleinere NR-gefärbte Vakuolen an der Zellperipherie (Abb. 3.2 C). Eine hohe Anzahl an Zellen mit zwei Vakuolentypen (NR-positive und NR-negative) wurde in der Mesophyllschicht gefunden, die sich direkt unter den epidermalen Blaszellen befand (Abb. 3.2 D).

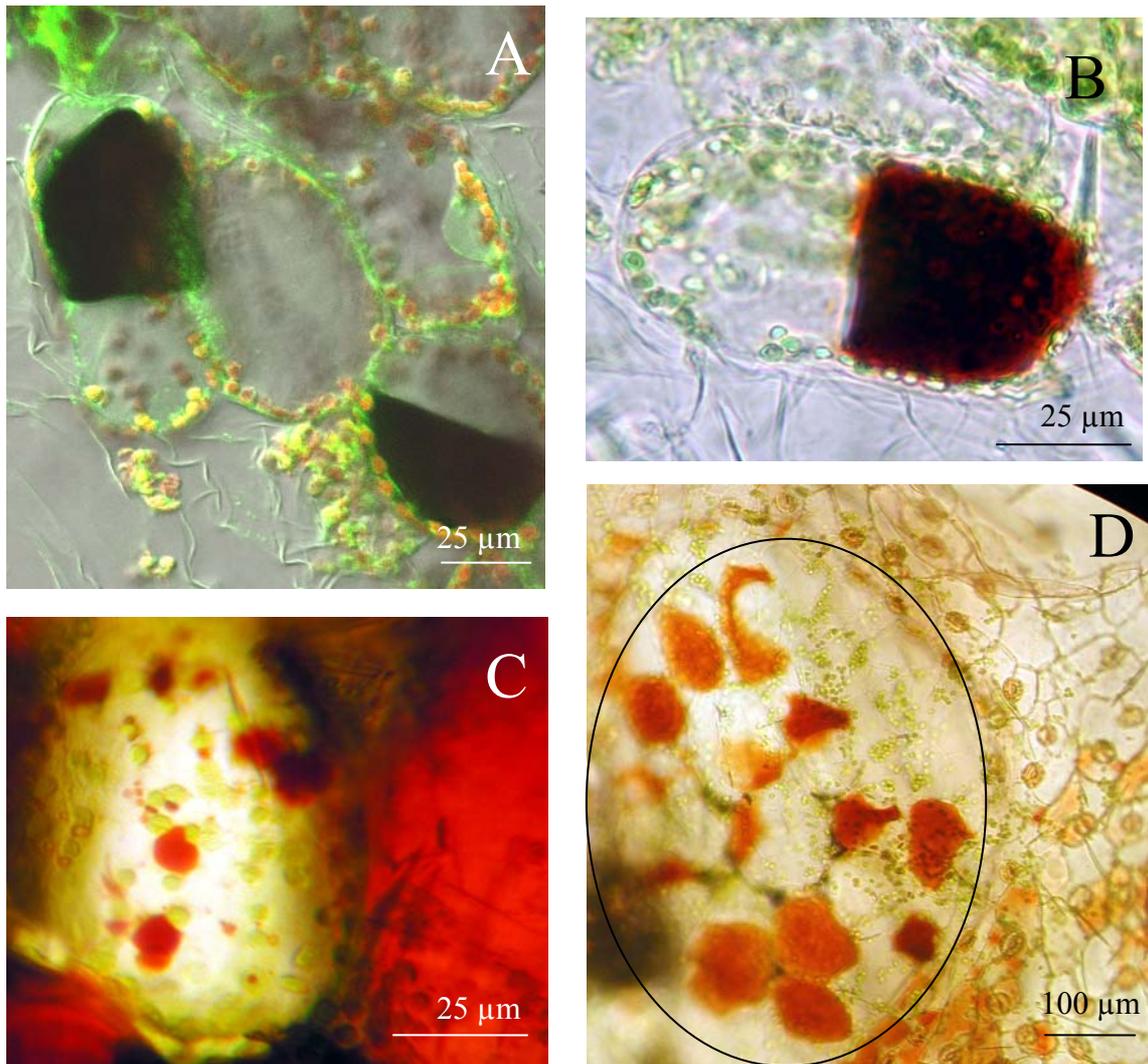


Abbildung 3.2 NR-angefärbte Blattquerschnitte salzgestresster Pflanzen: A) Konfokalbildoverlay: zwei Zellen mit den unterschiedlich NR-markierten Kompartimenten (dunkle und helle Zellbereiche), getrennt durch einen dünnen grün erscheinenden Cytosolstrang; Chloroplasten an der Zellperipherie weisen gelb-rote Falschfärbung auf; B) Zelle mit gleichgroßen NR-negativen und NR-positiven Vakuolenkompartimenten; C) Zelle mit einem großen zentralen NR-negativen Kompartiment und kleineren NR-angefärbten Vakuolen; D) Blick von oben; obere Blattepidermis mit einer Blasen-Blasenzelle (mit schwarzem Oval markiert); durch die transparente Blasen-Blasenzelle hindurch ist eine unterliegende Schicht von Mesophyllzellen zu sehen; die NR-markierten Kompartimente in einigen Zellen besetzen nur einen Teil der sichtbaren Zellfläche, dabei ist die Form der NR-angefärbten Vakuolen durch die in diesen Zellen befindlichen NR-negativen Kompartimente verzerrt.

3.2.3 Neutralrotfärbung der Protoplasten und isolierter Vakuolen

Die drastischen Unterschiede in der vakuolären NR-Färbung nativer Zellen wiesen darauf hin, dass die Vakuolen von *M. crystallinum* eine variable Fähigkeit zur NR-Akkumulation hatten, was vor allem auf ihre Azidität zurück zu führen war. Es war aber nicht auszuschließen, dass Eigenschaften der Zellwände oder des Cytosols, die sich mit zunehmendem Alter der Pflanzen oder bei Stressreaktionen ändern (Winter und Smith, 1996; Adams et al., 1998), die vakuoläre NR-Akkumulation beeinflussen könnten. Daher wurden im folgenden Experiment aus Blattgewebe enzymatisch hergestellte zellwandfreie Protoplasten einer NR-Färbung unterzogen. Die Inkubation mit NR wurde in leicht hypoosmotischen Lösungen durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde bei 10-50 % der Protoplasten ein Plasmalemmakollaps mit einer anschließenden Freisetzung nativer Vakuolen beobachtet. Während dessen konnten keine Veränderungen in der NR-Färbung der Vakuolen innerhalb der Protoplasten oder freisetzenden Vakuolen festgestellt werden. Dies deutete darauf hin, dass die NR-Akkumulation allein von Eigenschaften der Vakuolen abhängig war.

Wie die nativen Zellen zeigten auch die isolierten Protoplasten eine breite Diversität in der NR-Anfärbbarkeit ihrer Vakuolen (Abb. 3.3 A und B). Die vakuoläre Farbpalette in Protoplasten konnte genauso wie in nativen Zellen in drei Hauptfarbklassen (NR-negative, leicht gefärbte und intensiv gefärbte Vakuolen) unterteilt werden. Da sich die Protoplasten in unterschiedlichen Schichten der Protoplastensuspension befanden, konnte keine quantitative Analyse ihre NR-Farbintensität mit Hilfe von Computerprogrammen durchgeführt werden. Die Abbildung 3.3 G zeigt eine relative Abschätzung der Farbklassenfraktionen in Protoplastensuspensionen unterschiedlicher Versuchsgruppen. Der Anteil an intensiv gefärbten Protoplasten war am höchsten in HL-gestressten Pflanzen und betrug ca. 80 % gegenüber durchschnittlich 4 % in C₃-Pflanzen. Auch salzgestresste Pflanzen zeigten im Vergleich zu C₃-Pflanzen eine um den Faktor drei größere Fraktion von intensiv gefärbten Vakuolen. Zu gleicher Zeit waren bei ihnen die NR-negativen Vakuolen mit einem Anteil von ungefähr 40 % vertreten. Zu bemerken war, dass die Anteile der NR-negativen und der intensiv gefärbten Vakuolen in Protoplasten aus allen untersuchten Pflanzengruppen mit denen der Blattquerschnitte übereinstimmten (siehe Kapitel 3.2.1). Dies bestätigte die früheren Beobachtungen, dass unterschiedliche Vakuolenpopulationen gleichzeitig im Blattgewebe von *M. crystallinum* koexistierten, und die Anteile an diesen Populationen sich im Blattgewebe mit dem Übergang zum CAM unter HL- und Salzstress änderten.

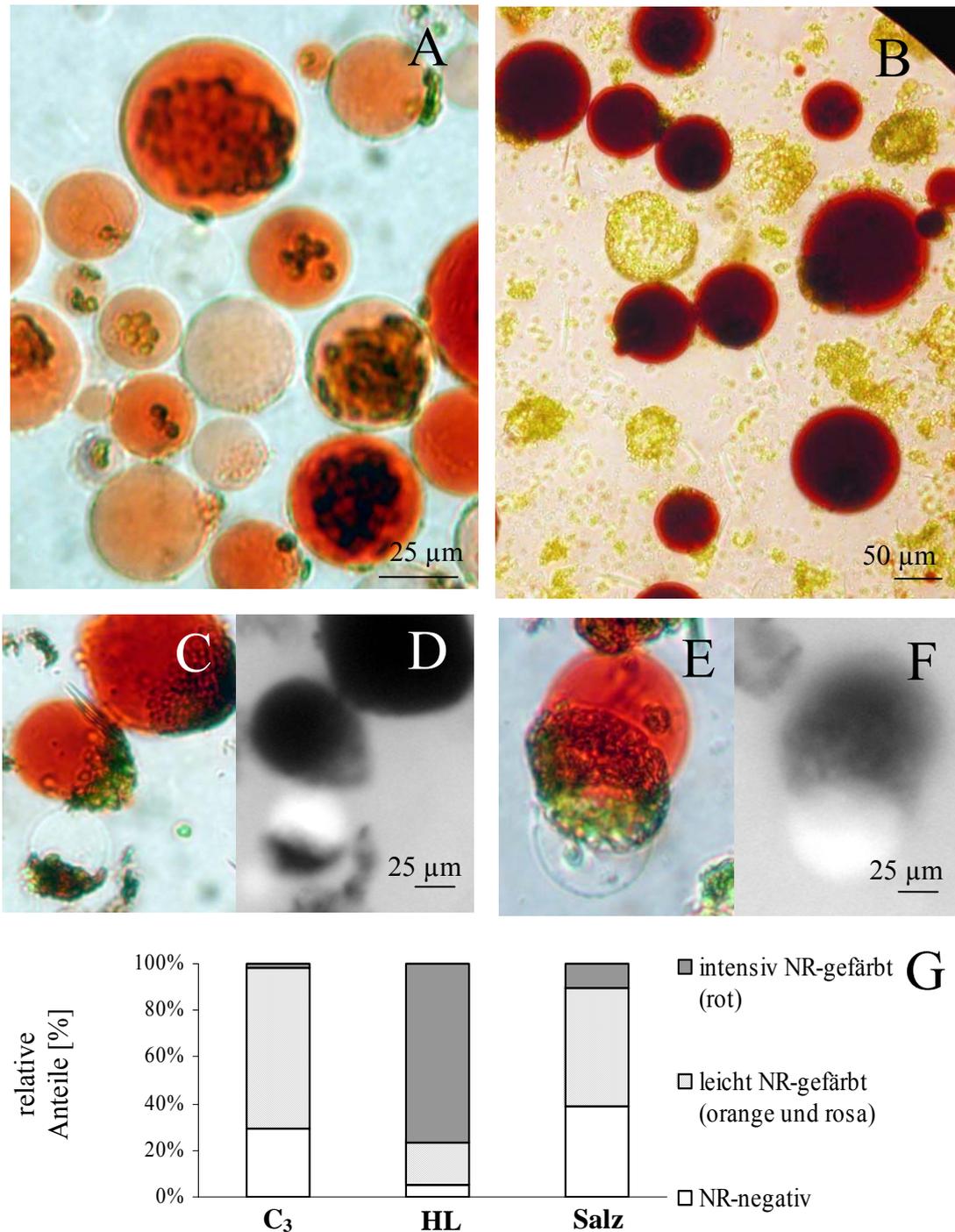


Abbildung 3.3 NR-angefärbte Vakuolen, isoliert und innerhalb der Protoplasten: A) aus C_3 -Pflanzen; B) aus salzgestressten Pflanzen; C) simultan mit NR- und BCECF-behandelte Protoplasten aus salzgestressten Pflanzen im Durchlicht; D) gleiche Objekte wie in C im UV-Licht; E) Vakuolenfreisetzung aus einem simultan mit NR- und BCECF-behandelten Protoplasten einer salzgestressten Pflanze im Durchlicht; F) gleiche Objekte wie in E im UV-Licht; G) prozentuale Anteile an differenziell NR-gefärbte Protoplasten aus unterschiedlichen Versuchsgruppen.

3.3 Neutralrot-BCECF-Doppelfärbung

Die Ergebnisse der NR-Färbung lieferten erste Hinweise auf die Existenz einer Population nicht-säurehaltiger Vakuolen im Blattgewebe der Pflanzen von *M. crystallinum* im CAM-Zustand. Besonders groß war der Anteil der NR-negativen Vakuolen in CAM-Pflanzen unter Salzstress, obwohl sie den niedrigsten pH-Wert des Mesophyllpresssaftes von ca. 4,0 ($n = 9$) aufwiesen. Um abzuschließen, dass die Abwesenheit von der NR-Akkumulation in diesen Vakuolen allein durch eine niedrige Protonenkonzentration ihres Lumens zu erklären war, wurde der pH-sensitive Farbstoff BCECF, simultan mit NR eingesetzt. Im Gegensatz zum NR weist BCECF ein Signal, die grüne Fluoreszenz, bei neutralem bis alkalischem pH auf (Haugland, 1996). Unter anderem wurde die BCECF-Färbung zur positiven Kontrolle der NR-negativen Vakuolen verwendet.

Die Abbildung 3.3 C zeigt eine typische Durchlicht-Aufnahme von Protoplasten (der cytosolische Teil mit Chloroplasten war polarisiert und zur Seite verschoben) aus einer salzgestressten Pflanze, die gleichzeitig mit beiden Farbstoffen inkubiert wurden. Dabei wies ein Protoplast gegenüber den beiden anderen keine NR-Akkumulation auf. In der Fluoreszenzaufnahme (Abb. 3.3 D) zeigte nur dieser NR-negative Protoplast eine BCECF-Fluoreszenz. Hier kam das Fluoreszenzsignal offensichtlich aus dem Vakuolenlumen. Der NR-negative Protoplast hatte etwa die gleiche Größe wie die NR-positiven Protoplasten. Daher konnte die Vermutung einer möglichen Devakuolisierung oder des nicht-ausdifferenzierten Zustands dieses Protoplasten ausgeschlossen werden. Andererseits wurden diese Aufnahmen eine Stunde nach der Zugabe der Farbstoffe gemacht. Daher konnte man annehmen, dass die BCECF-Akkumulation in der Vakuole bereits stattgefunden hatte (Swanson und Jones, 1996). In Abbildung 3.3 E sind zwei schon isolierte Vakuolen im Durch- und UV-Licht dargestellt, die aus einem Protoplasten hervorgetreten waren. Die Vakuolen ließen sich unterschiedlich mit NR (Durchlichtbild E) und BCECF (schwarz-weißes Fluoreszenzbild F) markieren, wobei das Fluoreszenzsignal nur in der NR-negativen Vakuole zu sehen war. Darüber hinaus zeigte keine der untersuchten Vakuolen eine Kolokalisierung der NR-Färbung und des BCECF-Signals. Dies wies auf sehr unterschiedliche pH-Werte des Lumens in den NR-angefärbten und in den fluoreszierenden Vakuolen hin.

Die in den vorliegenden Experimenten nachgewiesene Fähigkeit der NR-negativen Vakuolen BCECF zu akkumulieren, bestätigte ihren intakten Zustand (Swanson und Jones, 1996). Der Ausschluss von NR aus den BCECF-fluoreszierenden Vakuolen und ihr starkes BCECF-Signal deuteten auf einen hohen pH-Wert ihres Lumens hin. Einen zusätzlichen

Hinweis auf die niedrige Protonenkonzentration in den NR-negativen Vakuolen lieferte die Beobachtung, dass die für *M. crystallinum* typischen Kalziumoxalatkristalle, deren Präzipitation durch einen pH-Anstieg gefördert wird, am häufigsten in den NR-negativen Vakuolen zu finden waren (Daten nicht gezeigt). Alle diese Befunde deuteten darauf hin, dass im Blattgewebe und innerhalb einzelner Mesophyllzellen von *M. crystallinum* beim Salzstress-CAM Vakuolen unterschiedlicher Azidität koexistieren.

3.4 Lysosensor-Färbung

3.4.1 Lysosensor-Färbung der Blattquerschnitte

In den mit NR und BCECF durchgeführten Experimenten konnten qualitative Unterschiede im pH-Wert des Vakuolenlumens nachgewiesen werden. Dennoch ließen sich genaue vakuoläre Protonenkonzentrationen aus diesen Versuchen nicht ableiten. Unter anderem lag dies daran, dass das NR-Signal nur in sauren Vakuolen beobachtet werden konnte und in neutralen Vakuolen abwesend war. Dies gilt auch für das BCECF-Signal, das nur in neutralen Vakuolen zu detektieren war. Deshalb wurde der pH-Indikator Lysosensor *yellow / blue* (LS) zur Bestimmung vakuolärer pH-Werte eingesetzt, der sowohl in saurem, als auch in neutralem Milieu ein Signal zeigt (Haugland, 1996; Swanson et al., 1998).

Abbildung 3.4 zeigt eine Auswahl von Fluoreszenzaufnahmen mit je einem Beispiel für HL-gestresste (A) und für salzbehandelte Pflanzen (B). Alle Zellen im Blattquerschnitt aus HL-Pflanzen wiesen ein grünliches Fluoreszenzsignal auf. In den mit Zahlen markierten Zellen wurde die LS-Fluoreszenz quantitativ ausgewertet. Hierzu wurde das durchschnittliche Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in grünen und in blauen Bereichen der jeweiligen Vakuole ermittelt und in die LS-Eichkurve eingesetzt (siehe Abb. 2.2 C). In den HL-Pflanzen konnte eine nahezu homogene Ansäuerung des vakuolären Lumens am Ende der Dunkelphase nachgewiesen werden. Dabei schwankten die pH-Werte von einer Zelle zur benachbarten in einem Bereich von pH 4,5 bis 5,5. Selten konnte man in diesen Präparaten auch Zellen mit einem schwachen bläulichen Signal beobachten, dem ein pH-Wert von etwa 5,8 - 6,0 entsprach. In den Blattquerschnitten aus salzgestressten Pflanzen waren Zellen mit einer sehr hellen gelb-grünen Fluoreszenz und Zellen mit einem starken blauen LS-Signal zu finden (Abb. 3.4 B). Dies wies auf eine beträchtliche Heterogenität des vakuolären pH in diesen Pflanzen hin. Für die grünfluoreszierenden Zellen ließ sich eine Azidität von pH 3,0 bis 4,0 ablesen. Die Zellen mit einer blauen Fluoreszenz zeigten einen Wert des Grün / Blau-Verhältnisses von $< 1,3$ relativen Einheiten. Da der lineare Abschnitt der LS-Eichkurve den Bereich von $< 1,3$ relativen Einheiten nicht abdeckte

(siehe Abb. 2.2 C), konnte die genaue Protonenkonzentration in den blaufluoreszierenden Vakuolen nicht bestimmt werden. Daher wurde der pH-Wert für solche Fälle im Folgenden als $\geq 6,5$ bezeichnet, um anzudeuten, dass das Vakuolenlumen auch alkalischer sein könnte. Dem entsprechend wurden solche Vakuolen als neutrale Vakuole bezeichnet, im Gegensatz zu sauren Vakuolen mit einem höheren Wert des Grün / Blau-Verhältnisses. Statistische Untersuchungen zur Verteilung von grün- und blaufluoreszierenden Zellen in den Blattquerschnitten konnten nicht durchgeführt werden, da die Intensität des roten Signals, das auf den Bildern 3.4 A und B zu sehen ist, in HL- und in salzgestressten Pflanzen sehr stark variierte. Das rote Fluoreszenzsignal wurde offensichtlich von UV-angeregtem Chlorophyll erzeugt. Bereits in unterschiedlichen Blattquerschnitten eines Blattes war die Autofluoreszenz des Chlorophylls variabel. Dies verhinderte eine vergleichende Farbauswertung der LS-Fluoreszenz in unterschiedlichen Blattquerschnitten.

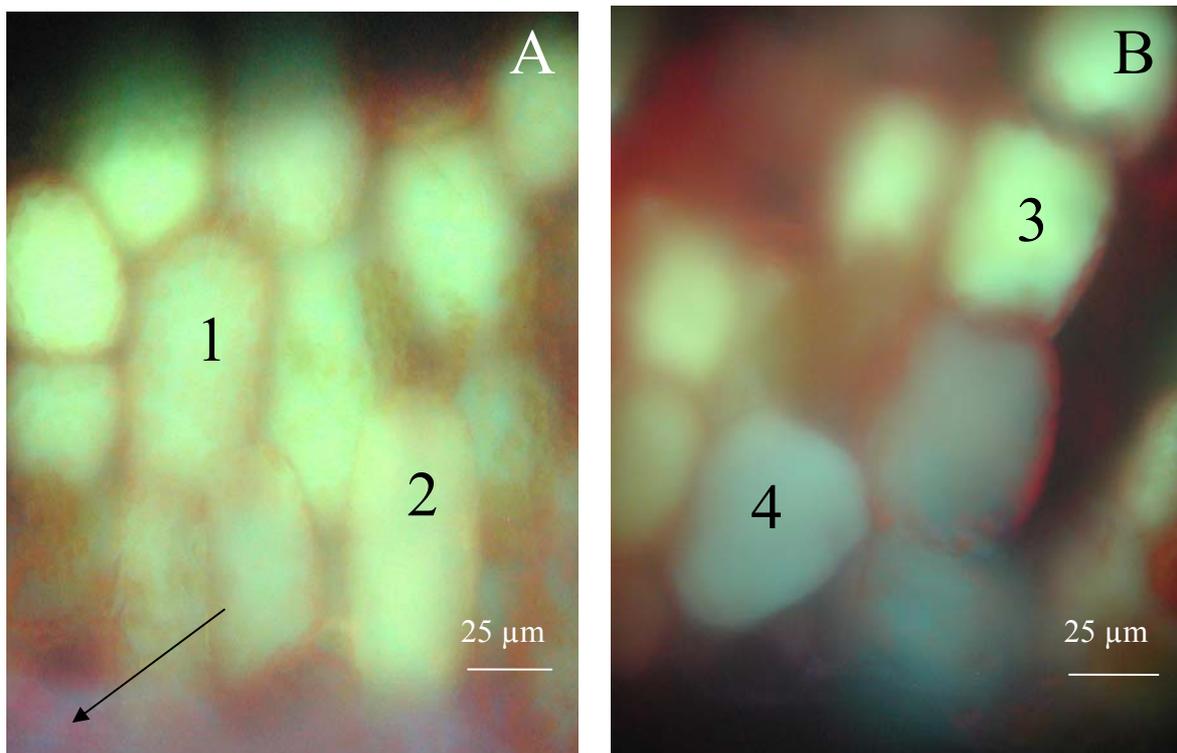


Abbildung 3.4: A) LS-markierter Blattquerschnitt aus einer HL-gestressten Pflanze; der Pfeil zeigt auf ein Leitbündel; B) LS-markierter Blattquerschnitt aus einer salzgestressten Pflanze; das rote Signal auf den Bildern kommt von der Autofluoreszenz der Chloroplasten; für die Zellen 1 und 2 betrug der ermittelte pH-Wert ≈ 5 ; für die Zelle 3 pH 3,5 und für die Zelle 4 pH $\geq 6,5$.

3.4.2 Lysosensor-Färbung der Protoplasten und Vakuolen

Auf einigen Fluoreszenzaufnahmen von Blattquerschnitten zeigten auch die Leitbündel eine bläuliche Fluoreszenz (Abb. 3.4 A mit dem Pfeil markiert). In diesem Fall stellten Zellwandreste der Xylemelemente die Fluoreszenzquelle dar. Deshalb sollte überprüft werden, ob auch die Zellwände des intakten Mesophyllgewebes den Zellen eine blaue Fluoreszenz verleihen könnten und damit das LS-Signal von Vakuolen möglicherweise verfälschen. Dazu wurde die LS-Färbung mit Protoplasten bzw. isolierten Vakuolen wiederholt. Wie die Blattquerschnitte zeigten die LS-behandelten Protoplasten aus salzgestressten Pflanzen deutliche Unterschiede in ihrer Fluoreszenz (Abb. 3.5). Dies schloss Zellwand- und Cytosol-Artefakte aus. Außerdem waren alle Chloroplasten innerhalb der Protoplasten zu einem Zellpol hin verschoben, wie an der roten Autofluoreszenz der Chloroplasten zu erkennen ist (Abb. 3.5 A). Daher konnte die Vakuolenfluoreszenz in diesen Präparaten präziser (ohne die störende Chlorophyllautofluoreszenz) ausgewertet werden. Die ermittelten pH-Werte für die grün- und blaufluoreszierenden Protoplasten in Abbildung 3.5 A betragen entsprechend 4,5 pH und $\text{pH} \geq 6,5$. Der pH-Wert grünfluoreszierender Vakuolen von salzgestressten Pflanzen variierte in einem pH-Bereich von 2,5 bis 5,5 und betrug im Durchschnitt $4,02 \pm 0,77$ ($n = 14$). Ebenso wiesen isolierte Vakuolen eine breite Diversität in der Fluoreszenzfarbe (Abb. 3.5 D) auf. Einige Protoplasten enthielten wiederum beide Vakuolentypen, einen grün-(sauer) und den anderen blaufluoreszierend (neutral). Dabei konnten unterschiedliche räumliche Verteilungen zwischen den beiden Vakuolentypen beobachtet werden. Die sauren und neutralen Vakuolen waren innerhalb eines Protoplasten entweder gleich groß oder eine bzw. mehrere große neutrale Vakuolen nahmen eine zentrale Lage ein, während kleinere saure Vakuolen sich an der Zellperipherie befanden (Abb. 3.5 B und C). Schließlich konnten die beiden Typen von Vakuolen mit saurem ($\text{pH} = 3,5$) oder mit einem neutralen Vakuoleninhalt beim Freisetzen aus einem Protoplasten beobachtet werden (Abb. 3.5 E und F). Zellen mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Vakuolen wurden auch in LS-angefärbten Blattquerschnitten beobachtet, jedoch konnte eine pH-Auswertung in diesen Fällen nicht durchgeführt werden, da sich die Fluoreszenz-Signale von benachbarten Kompartimenten und Zellen teilweise überstrahlten.

Zusammenfassend haben die LS-Untersuchungen an Blattquerschnitten und Protoplasten sowie isolierten Vakuolen gezeigt, dass die Unterschiede in der Azidität des Vakuolenlumens im Blattgewebe von CAM-Pflanzen mehr als drei Einheiten betragen können (siehe Tab. 3.1).

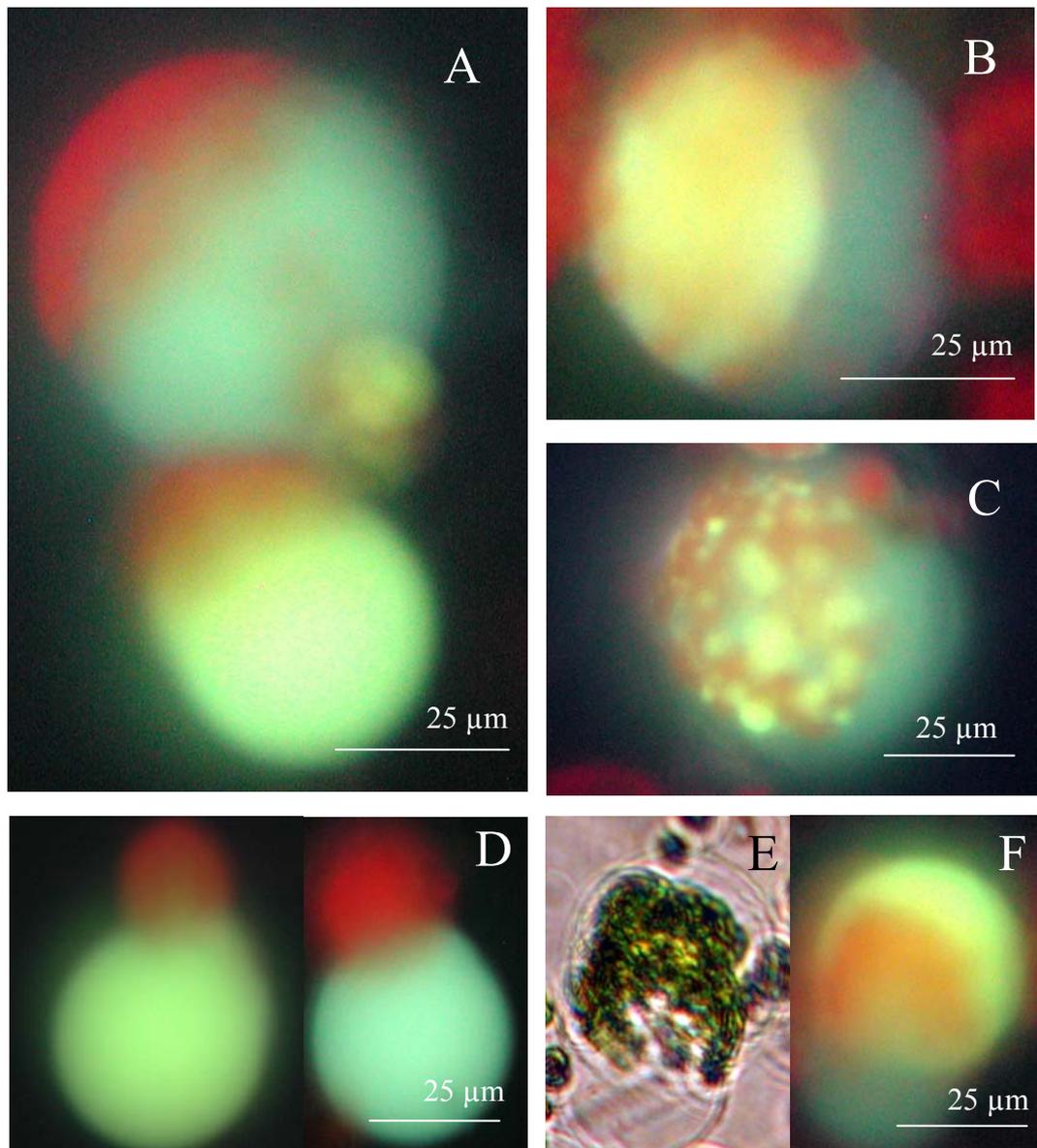


Abbildung 3.5 LS-Färbung von Protoplasten und Vakuolen aus salzgestressten Pflanzen: A) Protoplasten mit unterschiedlich LS-markierten Vakuolen; B) Protoplast mit zwei gleich großen Vakuolenkompartimenten mit saurem und neutralem pH-Wert; C) Protoplast mit einer großen zentralen neutralen Vakuole und kleineren sauren Vakuolen; D) freie Vakuolen, isoliert aus einer salzgestressten Pflanze; E) Vakuolen bei der Freisetzung aus einem Protoplasten im Durchlicht; F) das gleiche Objekt wie in E im UV-Licht.

Dabei variierte der pH-Wert in den Vakuolenlumina von einer mäßigen Ansäuerung von ca. pH 4,5 in HL-Pflanzen bzw. einer starken Azidifizierung von pH 2,5 in Salz-Präparaten bis zu einem nahezu neutralen pH-Wert.

Tabelle 3.1: Auswertung des pH-Wertes in LS-gefärbten Blattquerschnitten HL-gestresster Pflanzen und in Protoplasten salzgestresster Pflanzen.

	HL-gestresst	Salzgestresst
minimaler gemessener pH-Wert	4,5	2,5
maximaler gemessener pH-Wert	6,0	≥ 6,5
Auftreten der blaufluoreszierenden Vakuolen	selten	häufig

3.5 Untersuchungen zur Identifizierung der vakuolären Inhaltsstoffe

Die im Blattgewebe von *M. crystallinum* gefundenen Unterschiede in der Azidität des Vakuolenlumens deuten darauf hin, dass sich Vakuolen in der Zusammensetzung ihres Inhaltes von einander unterscheiden, d.h. verschiedene Substanzen werden in verschiedenen Vakuolen gespeichert. Da dies besonders für die salzgestressten Pflanzen von großer Bedeutung sein könnte, wurde in den folgenden Experimenten versucht, die vakuolären Hauptinhaltsstoffe Äpfel-, Citronensäure und Natriumchlorid in einzelnen Vakuolen aus salzbehandelten Pflanzen zu identifizieren. Hierzu wurde mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie eine Analyse der Kristalle durchgeführt, die sich nach Austrocknen der am Ende der Dunkelphase präparierten Protoplasten salzgestresster Pflanzen ausbilden.

Die Identifikation der Kristalle beruhte auf der Untersuchung ihrer Form und dem Nachweis der Doppelbrechung (Gerlach, 1976). Die Aufnahmen von getrockneten Proben der Standardlösungen als Kontrollen im polarisierten Licht zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Kristallen der getesteten Substanzen. Die Citronen- und Äpfelsäure bildeten feine, eisblumenartige Kristalle mit einer starken Doppelbrechung (Abb. 3.6 A und B). Mannit, das für den Osmolaritätsausgleich des Protoplastenmediums verwendet wurde, zeigte im polarisierten Licht eine schwache Doppelbrechung (Abb. 3.6 C). Die Mannitkristalle konnten jedoch von den mehrmals verzweigten Kristallen organischer Säuren leicht unterschieden werden. Die Kochsalzkristalle zeigten im Gegensatz zu den organischen Kristallen keine, für doppelbrechende Objekte charakteristische Interferenzfarben und besetzen kubische Elemente in Kristalleinheiten (Abb. 3.6 D). Weiterhin wiesen die Kristalle von NR, wie auch von anderen eingesetzten Farbstoffen,

eine Doppelbrechung auf (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Gründen wurde auf die pH-Bestimmung des Vakuolenlumens unter Einsatz dieser Farbstoffe verzichtet, um keine fremden organischen Substanzen in die zu untersuchenden Vakuolen einzubringen. Bei den vorausgegangenen Experimenten mit NR-angefärbten Protoplasten wurde die Beobachtung gemacht, dass die Protoplasten mit zentralen sauren (intensiv gefärbten) Vakuolen an der Oberfläche des Mediums schwammen, während die Protoplasten mit zentralen neutralen Vakuolen zum Boden des Gefäßes absanken. Daher bestand die Möglichkeit, auch nicht-angefärbte Protoplasten für die nachfolgende Kristallanalyse nach Vakuolenazidität zu trennen, indem flotierende und abgesunkene Protoplasten aufgefangen wurden.

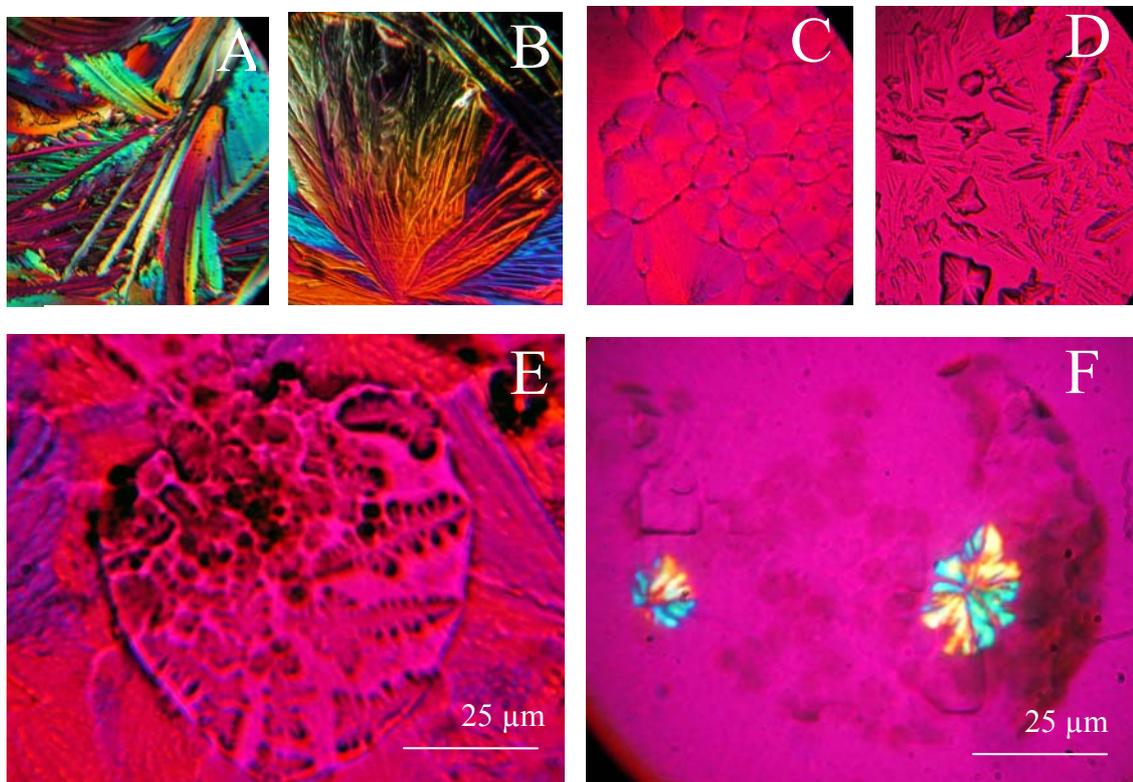


Abbildung 3.6 Polarisationsmikroskopie von getrockneten Standardproben: A) 500 mM Äpfelsäure; B) 50 mM Citronensäure; C) 500 mM Mannit D) 500 mM NaCl; E) und F) Protoplasten salzgestresster Pflanzen, getrocknet in mannithaltigem Medium.

In den während der Austrocknung nicht-kollabierten Protoplasten aus der unteren Suspensionsschicht (neutrale Vakuolen waren hier dominierend) konnten optisch inaktive Kristalle gefunden werden, die einen dichten Belag bildeten (Abb. 3.6 E). Diese Kristalle waren deutlich von den Kristallen des Außenmediums (hauptsächlich Mannitkristalle) zu

unterscheiden, da die beiden Kristalltypen ausgetrocknete Reste von Zellmembranen trennten. An den Kanten des Belages innerhalb der Protoplasten waren senkrecht zueinander gerichtete Einzelkristalle zu sehen. Keine weiteren Kristallarten (z.B. doppelbrechende) konnten in dieser Protoplastenpopulation identifiziert werden. Isotropische, kubische Kristalle, wie im vorliegenden Fall, sind für Halide (z.B. NaCl oder KCl) sehr charakteristisch. In salzgestressten Pflanzen, die mit 400 mM NaCl im Gießwasser behandelt wurden, kam NaCl als der wahrscheinlichste Vertreter der gefundenen Halidsalze in Frage. Daher konnte man ableiten, dass die NaCl-Speicherung in Vakuolen mit neutralem pH stattgefunden hatte.

Die eisblumenartigen, doppelbrechenden Kristalle wurden am häufigsten in den Protoplasten gefunden, für die große, saure Vakuolen typisch waren (Abb. 3.6 F). Diese Kristalle ähnelten in ihrer Form und in der Weise der Lichtbrechung denen von organischen Säuren. Der Befund von Kristallen organischer Säuren stand in guter Übereinstimmung mit hohen Malat- und Citrat-Werten von $31,3 \pm 3,1$ mM ($n = 6$) und $38,8 \pm 2,5$ mM ($n = 3$), die am Ende der Dunkelphase im Blattpresssaft salzgestresster Pflanzen gemessen wurden. Daraus konnte man ableiten, dass die hohe Azidität der Vakuolen in diesen Pflanzen aus einer Akkumulation der Äpfel- und Citronensäure resultierte. Interessanterweise konnten keine weiteren Kristallarten (z.B. von den oben erwähnten Haliden) in sauren Vakuolen identifiziert werden. Folglich wiesen saure Vakuolen salzgestresster Pflanzen keine massive Speicherung von NaCl auf.

Zusammenfassend hat die durchgeführte Kristallanalyse gezeigt, dass zumindest zwei Substanzarten vorwiegend getrennt voneinander in unterschiedlichen Vakuolentypen akkumuliert werden: die organischen Säuren (Äpfel- und Citronensäuren) in sauren Vakuolen und NaCl in neutralen Vakuolen.

3.6 Untersuchungen zur Erfassung der Dynamik zweier Vakuolentypen im Tagesgang innerhalb einer Mesophyllzelle

Bekanntlich wird Äpfelsäure, die während der Nacht beim CAM in Vakuolen gespeichert war, am Tag wieder aus den Vakuolen entlassen und decarboxyliert (Osmond, 1978; Lüttge, 1987). Daraus folgt, dass während der Lichtphase eine Absäuerung säurespeichernder Vakuolen stattfindet. In diesem Zusammenhang schien eine Untersuchung des Verhaltens der in einer Zelle befindlichen neutralen und sauren Vakuolen im Tagesgang von besonderem Interesse.

In Blattquerschnitten salzgestresster Pflanzen wurden durch die NR-Behandlung Zellen mit zwei Vakuolentypen, eine Vakuole sauer und die andere neutral, identifiziert. Eine nachfolgende mehrstündige Beleuchtung der vor Austrocknung geschützten Zellen sollte die Lichtphase des CAM-Zyklus simulieren. Nach etwa vier Stunden Beleuchtung konnte eine deutliche Verringerung der von sauren (NR-angefärbten) Vakuolen besetzten Zellfläche festgestellt werden (Abb. 3.7). Im Gegensatz zu den sauren Vakuolen nahmen die neutralen (NR-negativen) Kompartimente zu. Nach einer quantitativen Analyse der Zellfläche (Gesamt-, NR-gefärbt und NR- negativ) mit Hilfe des Computerprogramms

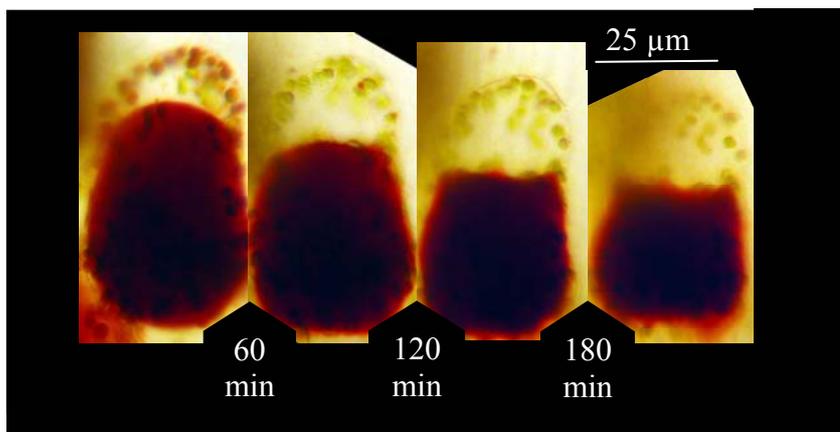


Abbildung 3.7: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen einer NR-gefärbten Zelle mit einer sauren Vakuole und einer neutralen Vakuole aus einer salzgestressten Pflanze unter Dauerlicht.

ImageJ betrug die Flächenverringerng saurer Kompartimente in vier Stunden $17,8 \pm 5,8$ % ($n = 3$). In diesem Zeitraum trat eine Vergrößerung neutraler Kompartimente um $14,1 \pm 1,6$ % ($n = 3$) auf. Somit zeigten die sauren und neutralen Vakuolen in einer Zelle antiparallele und proportionale Veränderungen ihrer Volumina während der Lichtbehandlung.

3.7 Elektrophysiologische Untersuchungen zum Malattransport

Aus früheren indirekten proteinbiochemischen Untersuchungen des Malattransports an Tonoplastenvesikeln von *M. crystallinum* (Pfeifer, 1999; Lüttge et al., 2000) stellte sich die Frage, ob dieses Transportsystem den malatselektiven Anionenkanälen ähnelt, die mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden am Tonoplasten unterschiedlicher Pflanzenspezies identifiziert wurden (Pantoja et al., 1992; Iwasaki et al., 1992; Plant et al., 1994; Cerana et al., 1995; Cheffings et al., 1997; Pantoja und Smith, 2002; Hafke et al., 2003). Daher

wurden auch die Tonoplasten der C₃-, HL- und salzgestressten Pflanzen von *M. crystallinum* mit Hilfe der *Patch-clamp*-Technik hinsichtlich der Aktivität von Ionenkanälen untersucht. Darüber hinaus schien interessant, ob sich säurespeichernde Vakuolen bezüglich der Aktivität des eventuellen Malatkanals von neutralen, NaCl-speichernden Vakuolen unterscheiden können. Hierzu wurden *Patch-clamp*-Messungen zuerst an nativen Vakuolen durchgeführt, deren luminaler pH-Wert durch die NR-Färbung abgeschätzt wurde.

3.7.1 Elektrische Eigenschaften intakter Vakuolen

Elektrische Ströme durch den Tonoplasten wurden mittels Anlegen einer Spannungsrampe induziert, die mit 33 mV pro Sekunde von 125 mV bis zu -125 mV abfiel. Am Anfang und am Ende der Rampe wurden Spannungen von 125 mV und -125 mV für 2,5 Sekunden konstant gehalten, um eine eventuelle zeitabhängige Aktivierung der Ionenkanäle zu verfolgen (Abb. 3.8 A). Da die Ionenkanäle ein stochastisches Verhalten des Schließens und Öffnens zeigen, wurden mehrere Wiederholungen des Messprotokolls benötigt (bis zu 20mal), um ein Bild über die mittlere Kanalaktivität im Membranareal zu erhalten. Die *vacuolar-attached*-Messkonfiguration ermöglichte es, Messungen bei intaktem Vakuoleninhalt durchzuführen (Abb. 3.8 B). Die cytosolische Seite des Tonoplasten war zur Badlösung exponiert. Nur das kleine Tonoplastenareal direkt unter der Messpipette wurde der Pipettenlösung ausgesetzt.

In Abbildungen 3.8 C und D sind Stromantworten aus repräsentativen Messungen an einer neutralen (NR-negativen) und an einer sauren (intensiv NR-angefärbten) Vakuole aus salzgestressten Pflanzen dargestellt. Die neutrale Vakuole zeigte bei allen Wiederholungen des Testprotokolls einen geringen Strom, der eine Linearität gegenüber der angelegten Spannung im getesteten Spannungsbereich aufwies und daher den Hintergrund-Strom repräsentierte. In der sauren Vakuole waren hingegen beträchtliche, am Anfang der jeweiligen Spannungsrampe nach oben und zum Ende hin nach unten gerichtete Stromdeflektionen zu sehen. Hohe Amplitude und unruhige Form dieser Stromerscheinungen wiesen auf die Aktivität von Ionenkanälen in der Membran der sauren Vakuole hin.

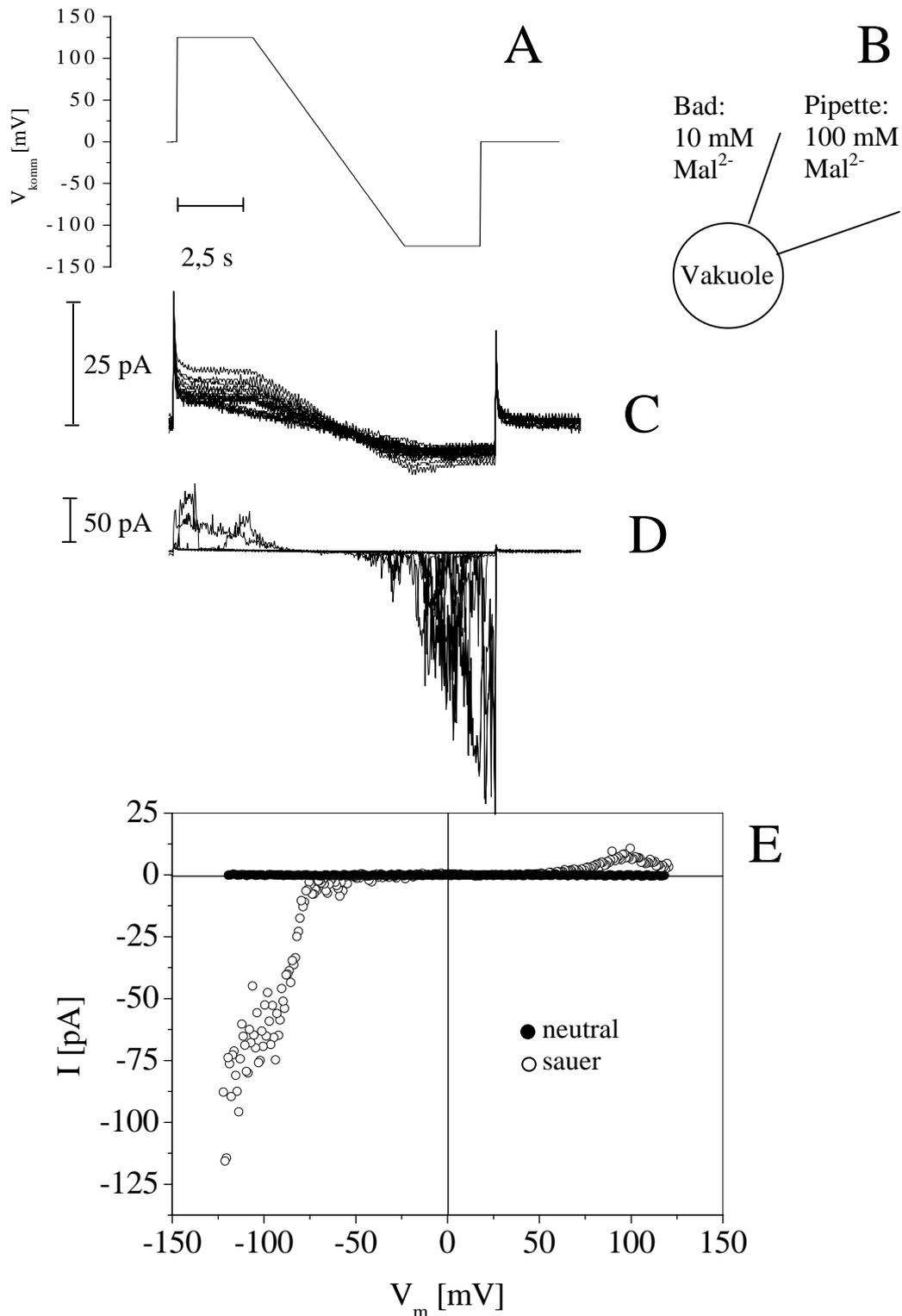


Abbildung 3.8: A) Rampenprotokoll; B) Schema der *vacuolar-attached*-Konfiguration und Konzentrationsverhältnisse; C) repräsentative Messung an einer neutralen Vakuole aus einer salzgestressten Pflanze; D) repräsentative Messung an einer sauren Vakuole aus einer salzgestressten Pflanze; E) I/V-Kurven der durchschnittlichen Ströme (MW; $n = 15-16$) aus den Messungen C und D; alle Messlösungen enthielten neben Mal^{2-} auch 3 mM MgCl_2 und wurden mit BTP auf pH 7,7 eingestellt.

Nachfolgend wurden die in Rampenprotokollen gemessenen Ströme eines Membran-*Patch* auf den Hintergrund-Strom korrigiert, gemittelt und gegen die entsprechende Spannung aufgetragen. Bei einer daraus resultierenden Strom-Spannungs-Kennlinie (I/V-Kurve) gab der V_m -Wert die am Tonoplasten angelegte Spannung (Kommandospannung (V_{komm})) wieder. Dies war zulässig, da das freilaufende Potential einer isolierten Vakuole von ca. -5 bis -10 mV gering war und bei der Analyse dieser *vacuolar-attached*-Messungen vernachlässigt werden konnte.

In Abbildung 3.8 E sind I/V-Kurven oben erwähnter Messungen mit der sauren und neutralen Vakuole dargestellt. Während die I/V-Kurve der neutralen Vakuole sich über den ganzen Spannungsbereich mit der Spannungs-Achse überlagerte, was auf die Abwesenheit des nicht-linearen Kanalstroms hindeutete, zeigte die I/V-Kurve der sauren Vakuole einen zweiphasigen Verlauf. Hier waren der Strom und damit die Kanalaktivität im Bereich von 50 mV bis -25 mV sehr gering. Zu höheren positiven bzw. negativen Membranspannungen hin stieg die Stromamplitude immer steiler an, was auf eine durch die angelegte Spannung induzierte Kanalaktivität hindeutet. Demnach weisen die im Tonoplasten der sauren Vakuole beobachteten Ionenkanäle ein spannungsabhängiges Öffnungsverhalten auf. Zwei Spannungsbereiche, bei denen sich die Kanalaktivitäten zeigten, einer bei < -25 mV und der andere bei > 50 mV, deuteten auf das Vorhandensein von zumindest zwei Typen von Ionenkanälen hin. Um zu überprüfen, ob die mit Hilfe von relativ schnellen Rampenprotokollen registrierten Ströme mit Rektifizierungen in positiven oder negativen Spannungsbereichen tatsächlich Aktivitäten von zwei individuellen Kanaltypen widerspiegelten und nicht instantane Ströme eines Kanals darstellten, wurden die Strom-Spannungs-Verhältnisse verglichen, die an einem Tonoplastenareal während des Rampenprotokolls oder eines Schrittprotokoll ermittelt wurden. Beim Schrittprotokoll wurde der Strom durch Spannungssprünge von einer Haltespannung von 0 mV in 25 mV-Schritten in positive und negative Richtungen induziert und nach 6 s gemessen. Jedem Spannungssprung folgte eine Rückkehr zur Haltespannung für 4 s. Dies garantierte eine vollständige Inaktivierung des vorher aktivierten Kanals. In Abbildung 3.9 zeigten die I/V-Kurven des Rampen- und Schrittprotokolls einen identischen Verlauf, was das Vorhandensein zweier Kanaltypen bestätigte. Ein Kanaltyp, der eine hohe Stromdichte bei negativen Membranspannungen aufwies, kann aufgrund seiner Spannungsabhängigkeit positive Ladungen ins Cytosol bzw. negative Ladungen in die Vakuole transportieren. Dieser Kanal wird nach der Konvention

von Bertl et al. (1992) als einwärts gleichrichtender Kanal bezeichnet. Bei positiven Membranspannungen zeigte sich ein auswärts gleichrichtender Kanal, der Ladungen in die Gegenrichtung leitet.

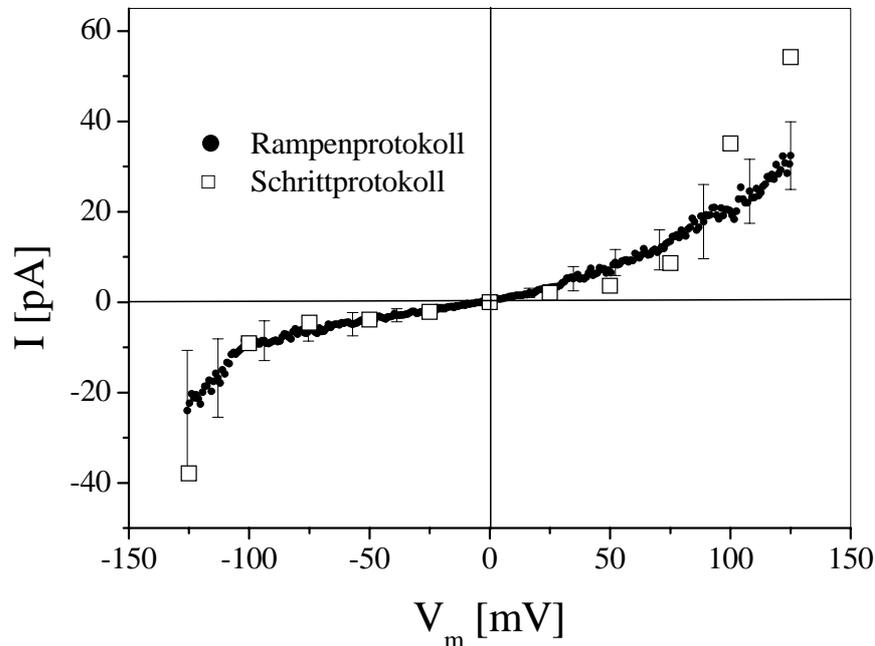


Abbildung 3.9: I/V-Kurve aus einer Messung in der *vacular-attached*-Konfiguration, ermittelt 6 s nach dem Anlegen der Spannungspulse von einer Haltespannung von 0 mV zu -125 mV und 125 mV in 25 mV Schritten (Schrittprotokoll) oder während des Rampenprotokolls an einer sauren Vakuole aus einer HL-gestressten Pflanze, gezeigt ist dabei der gemittelte Strom ohne die Korrektur um den Hintergrund (MW mit SD; $n = 11$).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass Vakuolen gleicher Azidität unabhängig vom Stoffwechselmodus (C_3 oder CAM) bzw. von der Stressart (HL- oder Salzstress) gleiche Kanalaktivitäten aufwiesen. In Abbildung 3.10 sind I/V-Kurven mit den durchschnittlichen Stromantworten aus Messreihen mit Vakuolen verschiedener Versuchsgruppen dargestellt. Dabei wurde ein mittlerer Strom aus mehreren Testprotokollen (maximal 20 Rampen) für jede Vakuole errechnet. Die intensiv NR-gefärbten (sauren) Vakuolen aller Versuchsgruppen zeigten eine signifikant höhere Aktivität sowohl der einwärts, als auch der auswärts gleichrichtenden Kanäle als die leicht gefärbten (wenig-säurehaltigen) Vakuolen, die für die C_3 -Pflanzen typisch sind. Die NR-negativen (neutralen) Vakuolen, die häufig in salzgestressten Pflanzen zu beobachten waren, zeigten ebenfalls sehr niedrige oder gar keine Kanalaktivität unter den gewählten Messbedingungen.

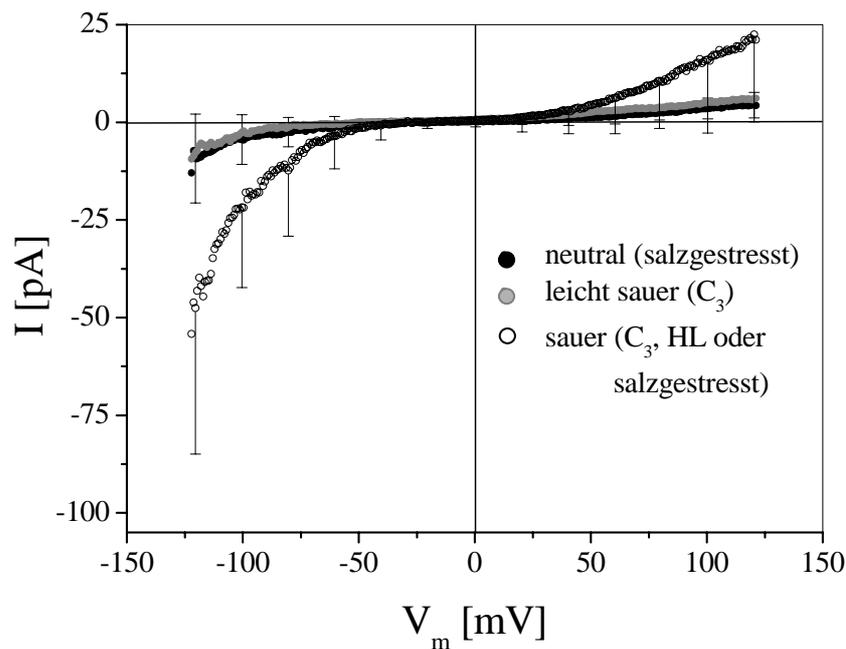


Abbildung 3.10: Gemittelte I/V-Kurven des durchschnittlichen Stroms in Vakuolen unterschiedlicher Azidität, gemessen in den Rampenprotokollen in der *vacuolar-attached*-Konfiguration (MW mit SD; n = 9-21).

Der Farbstoff NR, der zum Nachweis der vakuolären Azidität eingesetzt wurde, ist eine redoxaktive Substanz. Untersuchungen von Ullrich et al. (1990) haben gezeigt, dass sich NR auf elektrische Eigenschaften der Zellmembranen auswirkt, indem es eine Membrandepolarisierung gefolgt von Kalium- und Leckströmen induzieren kann. Um abzuschließen, dass die gemessene Stromaktivität am Tonoplasten der NR-behandelten Vakuolen nicht von der NR-Akkumulation im Vakuolenlumen abhängig war, wurden Kontrollmessungen in der *vacuolar-attached*-Konfiguration mit nicht NR-behandeltem Vakuolen aus einer salzgestressten Pflanze durchgeführt. Durchschnittliche Hintergrundkorrigierte Ströme bei -125 mV wurden dabei verglichen. Zwei Stromaktivitätsmuster waren bei diesen Versuchen zu erkennen: Vakuolen mit einem beträchtlichen Einwärtsstrom (ES) von $-15,6 \pm 5,4$ pA; n = 3 und Vakuolen mit einem relativ geringen ES von $-5,8 \pm 0,5$ pA; n = 6. Dies zeigte, dass die Unterschiede in der Kanalaktivität zwischen einzelnen Vakuolen auch ohne eine NR-Behandlung vorkamen und in Folge dessen eine Eigenschaft dieser Vakuolen waren. Beachtenswert war die Tatsache, dass ein Drittel der gemessenen Vakuolen einen beträchtlichen ES aufwies (drei Vakuolen aus den neun getesteten Vakuolen). Dies korrelierte mit dem Anteil an sauren Vakuolen, der in den vorausgegangenen Experimenten mit NR in dieser Pflanzengruppe ermittelt wurde (siehe

Kapitel 3.2.1). Daraus konnte man ableiten, dass die NR-unbehandelten Vakuolen mit dem aktiven Einwärtskanal zur Population saurer Vakuolen gehörten. Demnach ließ sich ein enger Zusammenhang zwischen der vakuolären Protonenkonzentration und der Kanalaktivität am Tonoplasten erkennen. Eine weitere Charakterisierung der ein- und auswärts gleichrichtenden Kanäle war daher notwendig, um die wahre Natur des beobachteten Phänomens zu verstehen.

3.7.2 Identifizierung spannungsabhängiger Tonoplastenkanäle

3.7.2.1 Kinetische Eigenschaften der Tonoplastenkanäle

Aus den steigenden Stromamplituden an den Flanken der angelegten Spannungsrampe, wenn die Spannung 2,5 s konstant bei 125 mV oder bei -125 mV gehalten wurde (Abb. 3.8 D), ist abzuleiten, dass die beiden Kanäle, insbesondere der einwärts rektifizierende Kanal, zeitabhängiges Schaltverhalten demonstrieren, d.h. ihre Stromantworten mit der Dauer der angelegten Spannung größer wurden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die beiden Kanaltypen, der einwärts und der auswärts rektifizierende Kanal, eine langsame Stromaktivierung aufweisen. Die Aktivierungskinetik ist eine der wichtigsten Charakteristika und kann zur Kanalidentifizierung sowie zu einem Vergleich der in unterschiedlichen Organismen vorhandenen Kanäle beitragen (Hille, 1992). Daher wurden die Stromantworten am Tonoplasten von *M. crystallinum* beim Anlegen noch länger konstanter Spannungen unterschiedlicher Höhe mit Hilfe des Schrittprotokolls in der *vacuolar-attached*-Konfiguration (Abb. 3.11 A) weiter erforscht.

Unmittelbar nach jedem Spannungssprung war eine schnelle Stromkomponente (Abb. 3.11 B), der instantane Strom zu sehen. Dieser Strom konnte direkt nach dem Ablauf des kapazitiven Stroms, der durch das Umladen der Membran bzw. der Pipettenspitze zustande kam, gemessen werden. Wurde die Membran weiterhin auf der Testspannung gehalten, nahm der Strom zu und erreichte nach einigen Sekunden seine maximale Amplitude (der stationäre Strom). Die Differenz zwischen dem stationären und instantanen Strom ergab die Amplitude des zeitaktivierenden Stroms (I_{zt}). Die I/V-Kurve der instantanen Komponente (I_{ins}) war nahezu linear (Abb. 3.11 C). Dies bedeutete, dass sie großenteils den potentialunabhängigen Hintergrund-Strom repräsentierte. Der träge aktivierende Strom wies in Hinsicht auf seine Spannungsabhängigkeit zwei Komponenten auf. Während bei den positiven Spannungen und Membranpotentialen nahe 0 mV die I/V-Kurve des I_{zt}

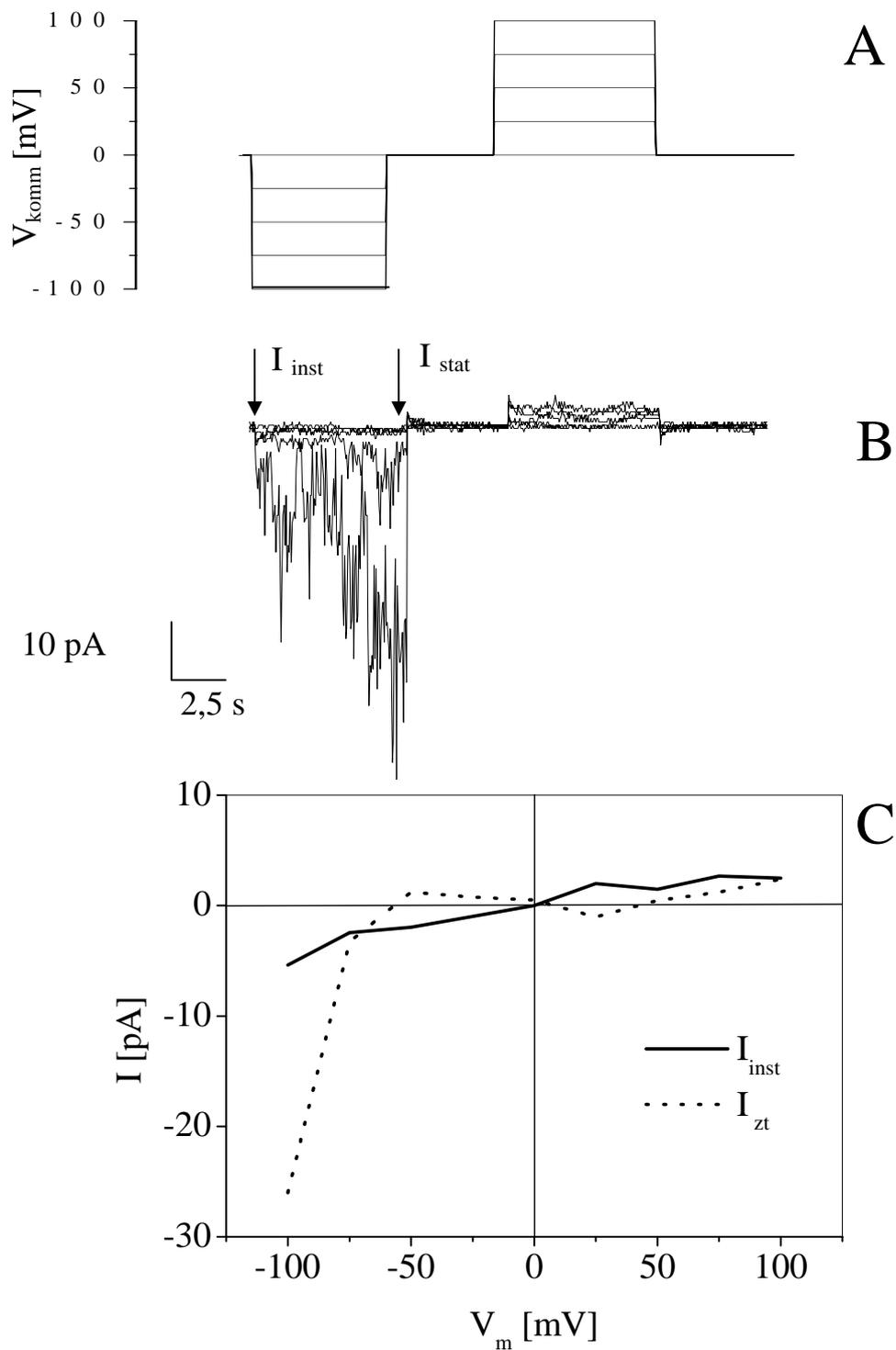


Abbildung 3.11: A) Schrittprotokoll; B) Stromantworten einer sauren Vakuole, gemessen in der *vacuolar-attached*-Konfiguration; die Pfeile zeigen die instantanen (I_{inst}) und stationären Ströme (I_{stat}); C) I/V-Kurve des instantanen Stroms und des zeitaktivierenden (I_{zt}) Stroms aus der Messung B.

beinahe linear verlief, zeigte sich bei der zunehmenden Hyperpolarisierung eine starke Rektifizierung nach innen. Da in den erwähnten Spannungsbereichen die einwärts gleichrichtenden Kanäle aktiv waren, konnte man daraus ableiten, dass die einwärts rektifizierenden zeitabhängigen Ströme diesen Kanälen zuzuordnen waren, d.h. die Einwärtskanäle träge aktivierbar sind und zwar in einem Zeitbereich von mehreren Sekunden.

3.7.2.2 Selektivität der Tonoplastenkanäle

Um die Art der Ionen, die durch die Kanäle am Tonoplasten von *M. crystallinum* permeieren, zu bestimmen, wurden die Gleichgewichtspotentiale der ein- und auswärts rektifizierenden Ströme unter streng definierten Messbedingungen bestimmt. Hierzu wurden kleine Tonoplastenareale von Vakuolen isoliert. Dadurch wurde das natürliche Vakuolenmilieu mit der Pipettenlösung ersetzt. Die Ströme wurden anschließend in Doppelpulsprotokollen gemessen. Dabei wurden Kanäle durch einen langen Puls der aktivierenden Spannung (konstanter Vorpuls von vier s) zuerst in den offenen Zustand gebracht. Anschließend sprang die Spannung zu niedrigeren Werten (Testpulse), die von -75 bis 75 mV variierten. Das Anlegen des Testpulses rief ein träge Schließen der Kanäle hervor. Dabei entsprach eine bei jedem Testpuls auftretende instantane Stromkomponente dem Strom durch alle, während des Vorpulses aktivierten Kanäle. Im Laufe des Testpulses schlossen sich die Kanäle spannungsbedingt, was sich in einer trägen Abnahme des Stroms äußerte (I_{stat}). Die Differenz zwischen I_{inst} und I_{stat} , die als *Tail*-Strom bezeichnet wird, war in jedem Fall nur von der treibenden Kraft, d.h. dem elektrochemischen Gradienten des permeierenden Ions abhängig, nicht aber von der Anzahl offener Kanäle (Hille, 1992). Der ermittelte *Tail*-Strom wurde gegen die Testspannung aufgetragen.

Auswärtskanal

Wurde eine positive Spannung von 100 mV als Vorpuls an die Tonoplastenmembran angelegt, aktivierten sich die auswärts rektifizierenden Kanäle (Abb. 3.12 A). Die bei 10 mM $\text{Mal}^{2-}_{\text{cyt}} / 100$ mM $\text{Mal}^{2-}_{\text{vak}}$ ermittelte I/V-Kurve der *Tail*-Ströme konnte mit einer Regressionsgeraden beschrieben werden, die einen Schnittpunkt mit der Spannungsachse bei $23 \pm 1,9$ mV ($n = 3$) hatte (Abb. 3.12 B) Bei dieser Gleichgewichtsspannung floss kein Netto-Strom durch die Membran, da die angelegte Spannung dem Nernstpotential (E_{Nernst}) des permeierenden Ions gleich war.

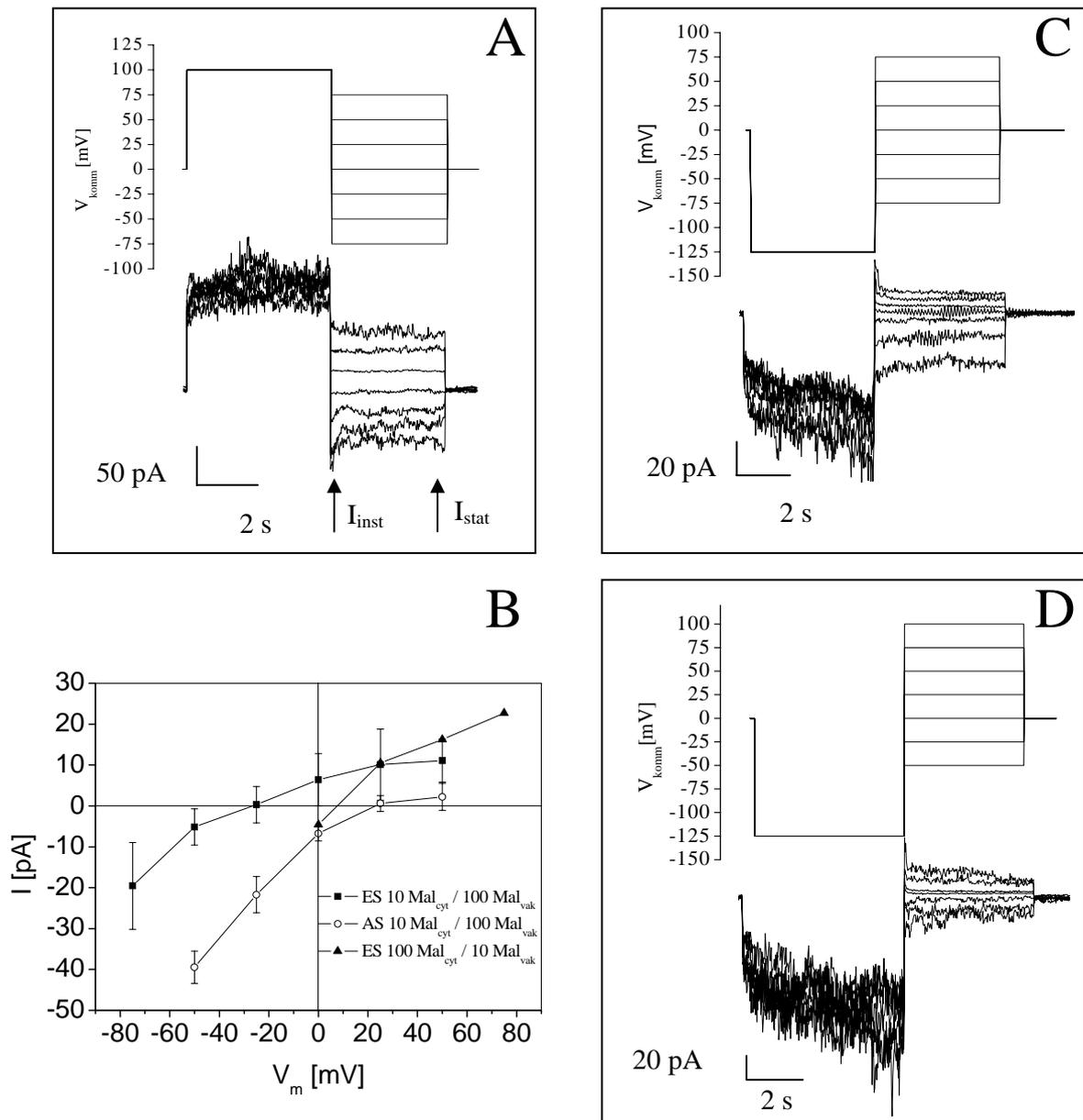


Abbildung 3.12: Repräsentative *Tail*-Strom-Messungen mit Doppelpulsprotokollen: A) Auswärtsstrom (AS) bei 10 mM Mal²⁻_{cyt} / 100 mM Mal²⁻_{vak} in der *inside out*-Konfiguration; B) Strom-Spannungs-Kennlinien der *Tail*-Ströme des AS und des Einwärtsstroms (ES) bei den verschiedenen Malatkonzentrationsgradienten (MW mit SD; n = 2-3); C) ES bei 10 mM Mal²⁻_{cyt} / 100 mM Mal²⁻_{vak} in der *inside out*-Konfiguration; D) ES bei 100 mM Mal²⁻_{cyt} / 10 mM Mal²⁻_{vak} in der *outside out*-Konfiguration; alle Messlösungen enthielten neben Mal²⁻ auch 3 mM MgCl₂ und wurden mit BTP auf pH 7,7 eingestellt.

Die gefundene Gleichgewichtsspannung lag im positiven Bereich und damit weit entfernt von E_{Nernst} für Mal^{2-} , das unter den gewählten Bedingungen -23 mV betrug. Aus einem Vergleich mit E_{Nernst} der anderen in der verwendeten Pipetten- und Badlösung vorhandenen Ionenspezies (0 mV für Cl^- und Mg^{2+} und 53 mV für BTPH^+) konnte man schließen, dass der AS größtenteils durch den Kationenfluss von der vakuolären zur cytoplasmischen Seite des Tonoplasten hervorgerufen wurde. Dennoch stand die Umkehrspannung dieses Stroms weder im Einklang mit dem erwarteten E_{Nernst} -Werten für BTPH^+ -Ionen, noch mit den E_{Nernst} für die im Konzentrationsausgleich befindlichen Mg^{2+} - bzw. Cl^- -Ionen. Daher schien dieses Gleichgewichtspotential eine schwache Selektivität des Auswärtskanals für Kationen zu reflektieren. Die Selektivität für Kationen und eine beträchtliche Aktivität bei einer hohen Konzentration von Mg^{2+} (3 mM an beiden Seiten der Membran) deuteten darauf hin, dass es sich hier um den tonoplastenspezifischen SV-Kanal handeln kann, der bereits am Tonoplasten unterschiedlicher Pflanzenarten identifiziert wurde (Hedrich und Neher, 1987; Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995; Brüggemann et al., 1999 a / b). Auch am Tonoplasten von *M. crystallinum* wurde von Miedema et al. (2000) unter zur vorliegenden Arbeit vergleichbaren Messbedingungen ein auswärts rektifizierender Kanal registriert. Aufgrund seiner nachgewiesenen Impermeabilität zu Anionen (Miedema und Pantoja, 2001) ist der SV-Kanal nicht am Malattransport beteiligt und wurde daher aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Einwärtskanal

Für die Aktivierung der einwärts rektifizierenden Kanäle wurde ein Vorpuls von -125 mV angelegt (Abb. 3.12 C). Die Testpulse und Messlösungen auf beiden Seiten des Tonoplasten waren gleich wie für den Auswärtskanal (siehe oben). Die I/V-Kurve des Tail-Stroms des Einwärtskanals schnitt die Abszisse bei einer Spannung von $-25 \text{ mV} \pm 4,5 \text{ mV}$ ($n = 7$) (Abb. 3.12 B). Diese Gleichgewichtsspannung lag sehr nah zu E_{Nernst} für Mal^{2-} -Ionen und weit entfernt von den E_{Nernst} -Werten für andere Ionenspezies (siehe oben). Dies bedeutete, dass die Einwärtsströme hier hauptsächlich von Malationen getragen wurden. Um die Befunde der Kanalselektivität abzusichern, sollten Gleichgewichtsspannungen bei unterschiedlich gerichteten Malatkonzentrationsgradienten bestimmt werden. Jedoch war es im Falle entgegengesetzter asymmetrischer Messlösungen ($100 \text{ mM Mal}^{2-}_{\text{cyt}} / 10 \text{ mM Mal}^{2-}_{\text{vak}}$) nicht möglich, die Tail-Ströme von beiden Kanaltypen, dem Ein- und dem Auswärtskanal, zu unterscheiden. Wenn man davon ausging, dass das erwartete E_{Nernst} für Mal^{2-} unter diesen Messbedingungen 23 mV beträgt, sollte es sich im Bereich der

aktivierenden Spannungen für den Auswärtskanal befinden. Aus diesen Gründen konnten nur, wenn die Aktivität des Auswärtskanals niedrig war, *Tail*-Ströme des Einwärtskanals beobachtet werden (Abb 3.12 D). Die I/V-Kurve von zwei solchen Messungen schnitt die Spannungsachse bei ca. 5,5 mV. Dies wich wesentlich von einem Potential von 23 mV ab, das im Idealfall für den malatselektiven Kanal unter diesen Bedingungen zu erwarten war. Dennoch wies eine Verschiebung des Umkehrpotentials des ES zu positiveren Spannungen in Folge der Veränderung des Malatkonzentrationsgradienten darauf hin (siehe auch Abb. 3.12 B), dass der ES hauptsächlich von Malationen getragen wurde. Somit haben die Untersuchungen mit *Tail*-Protokollen gezeigt, dass der Einwärtskanal gegenüber den in den verwendeten Messlösungen vorhandenen Ionen selektiv für Malat war. Aus der gefundenen Selektivität dieses Kanals für Malationen und der Aktivierung bei negativen Membranspannungen konnte man ableiten, dass der einwärts rektifizierende Kanal von *M. crystallinum* am Malattransport in die Vakuolen beteiligt ist. Nach Untersuchungen von Hafke et al. (2003) vermittelt ein ähnlicher, träge aktivierender Einwärtskanal den Malatinfux in die Vakuolen der CAM-Pflanze *K. daigremontiana*.

3.7.2.3 Untersuchungen zur Substratspezifität des Einwärtskanals

Im Cytosol der CAM-Pflanzen ist nicht nur Malat, sondern auch Chlorid ein wichtiges Anion. Daher sollten Untersuchungen zur Substratspezifität des Einwärtskanals bezüglich der Malationen durchgeführt werden. Hierzu wurden Strom-Spannungs-Beziehungen bei unterschiedlichen Malat- und Chloridkonzentrationsgradienten ermittelt. Die Messungen wurden in der *inside out*-Konfiguration durchgeführt. Dabei wurden die trägen Einwärtskanäle durch einen fünf s langen negativen Vorpuls von -125 mV voraktiviert und anschließend mit einer um 17 mV pro s von -125 mV bis 50 mV ansteigenden Spannungsrampe getestet.

Die Abbildung 3.13 zeigt, dass bei einer Verringerung der Malatkonzentration in der Badlösung (cytosolische Seite des Tonoplasten) ES signifikant abnahm. Bei -120 mV war der mittlere ES in Gegenwart von 10 mM Malat im Vergleich zu 100 mM Malat auf ca. 55 % (n = 4) reduziert. Da der Kanal sowohl mit 10 mM, als auch mit 100 mM Malat²⁻ eine steile Spannungsabhängigkeit zeigte, konnten unter diesen Bedingungen die entsprechenden Umkehrpotentiale nicht bestimmt werden. Dennoch ist die beobachtete Abhängigkeit der Stromantworten von der Malatkonzentration im Cytosol ein Hinweis darauf, dass die Ströme von Malat²⁻, nicht aber von Cl⁻ getragen wurden, dessen Konzentration in beiden Fällen 6 mM betrug.

In weiteren Experimenten wurde 100 mM $\text{Mal}^{2-}_{\text{cyt}}$ durch 100 mM Chlorid (ausbalanciert mit Cholin^+) ersetzt. Trotz eines großen, in die Vakuole gerichteten elektrochemischen Gradienten, der einen Chloridtransport in diese Richtung thermodynamisch sehr wahrscheinlich machte ($106 \text{ mM Cl}^-_{\text{cyt}} / 6 \text{ mM Cl}^-_{\text{vak}}$; die Messlösungen auf beiden Seiten des Tonoplasten enthielten neben Cholin-Chlorid (ChCl) auch 3 mM MgCl_2), war die Amplituden des ES gering.

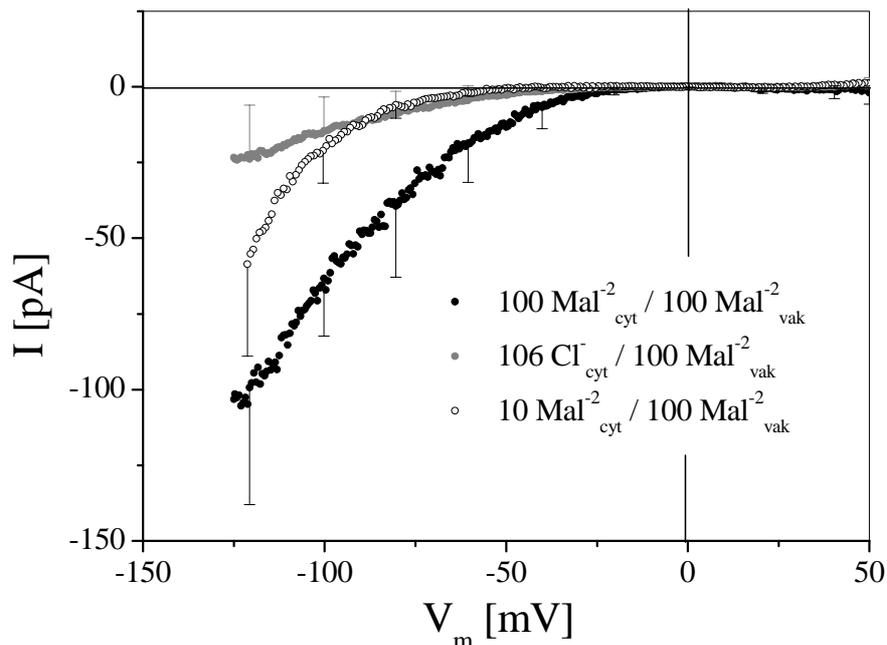


Abbildung 3.13: I/V-Kurven, ermittelt bei unterschiedlichen Konzentrationen von $\text{Mal}^{2-}_{\text{cyt}}$, gemessen mit der *inside out*-Konfiguration (MW mit SD; $n = 4-5$); alle Messlösungen enthielten außer Mal^{2-} oder ChCl 3 mM MgCl_2 und wurden mit BTP auf pH 7,7 eingestellt.

Im Vergleich zu einem mittleren Strom, der bei -120 mV mit $100 \text{ mM Mal}^{2-}_{\text{cyt}}$ gemessen wurde, war der durchschnittliche ES in Anwesenheit von $106 \text{ mM Cl}^-_{\text{cyt}}$ auf 24% ($n = 3$) reduziert. Auch bei einem ins Cytosol gerichteten Malatkonzentrationsgradienten ($10 \text{ mM Mal}^{2-}_{\text{cyt}} / 100 \text{ Mal}^{2-}_{\text{vak}}$) floss in die Vakuole mehr Strom als mit $106 \text{ mM Cl}^-_{\text{cyt}} / 6 \text{ mM Cl}^-_{\text{vak}}$ (Abb. 3.13), was für eine hohe Selektivität des Einwärtskanals für Mal^{2-} gegenüber Cl^- sprach. Dies stand in guter Übereinstimmung mit einer relativ niedrigen Permeabilität der malatselektiven Kanäle zu Cl^- , die in anderen Pflanzen beschrieben wurde (Iwasaki et al., 1992; Plant et al., 1994; Cerana et al., 1995; Hafke, 2001).

Zusammenfassend sprachen die hohe Malatselektivität und ausgeprägte langsame Aktivierungskinetik (siehe Kapitel 3.7.2.1) des hier beschriebenen einwärts

rektifizierenden Anionenkanal am Tonoplasten von *M. crystallinum* für seine Ähnlichkeit mit den Malatkanälen, die in einigen Pflanzenspezies identifiziert wurden (Iwasaki et al., 1992; Cerana et al., 1995; Cheffings et al., 1997; Hafke et al., 2003).

Vakuoläres Chlorid hemmt den Einwärtskanal.

Die Untersuchungen von Plant et al. (1994) zeigten, dass bei hohem Cl^-_{vak} die Malatströme am Tonoplasten der salztoleranten C_3 -Pflanze *Beta vulgaris* reduziert werden, was eine ökophysiologische Bedeutung haben könnte, indem Malat im Cytosol für Oxidierungsvorgänge in Mitochondrien zurückgehalten wird. In *M. crystallinum* mit Salzstress-CAM müssen hingegen beide Anionen, Cl^- und Malat^{2-} , in die Vakuole akkumuliert werden. In dieser Hinsicht sollte überprüft werden, ob der Malatkanal in *M. crystallinum* auch eine ähnliche Reaktion auf hohe Cl^- -Konzentrationen in der Vakuole aufweist. Hierzu wurde ES in Anwesenheit von 100 mM ChCl auf der vakuolären Seite und 100 mM BTPH^+ -Malat auf der cytoplasmischen Seite des Tonoplasten mit dem oben beschriebenen Pulsprotokoll in der *inside out*-Konfiguration getestet.

Obwohl der gewählte Malatkonzentrationsgradient den Malatstrom eigentlich begünstigte, zeigte sich unter diesen Bedingungen eine beträchtliche Verringerung des ES (Abb. 3.14 A). Gegenüber dem Strom, der mit 100 mM Mal^{2-} und 6 mM Cl^- auf der vakuolären Seite des Tonoplasten gemessen wurde, betrug die Reduzierung des durchschnittlichen Stroms mit 106 mM Cl^-_{vak} bei -120 mV ca. 80 % ($n = 5$). Dies lässt den Schluss zu, dass das hohe Cl^-_{vak} den Malatkanal in *M. crystallinum* hemmte. Die Stromamplituden aus den Experimenten mit 106 mM Cl^-_{vak} wurden auf die Ströme normiert, die bei entsprechenden Spannungen mit 100 mM $\text{Mal}^{2-}_{\text{vak}}$ registriert wurden. Die daraus resultierende Kurve verlief parallel mit der Spannungsachse (Abb. 3.14 B). Dies deutete darauf hin, dass die beobachtete Kanalhemmung durch Cl^-_{vak} nicht spannungsabhängig war. Daraus konnte man ableiten, dass Cl^- nicht in den Malatkanal eindrang und seine Bindungsstelle am Kanalprotein sich außerhalb der Kanalpore befand. In Studien über den Anionentransport am Tonoplasten von *Beta vulgaris* wurde ebenso gezeigt, dass eine Erhöhung der Cl^- -Konzentration in der Vakuole die Einzelkanalamplitude des Malatstroms nicht verändert. Diese Autoren stellten die Hypothese einer chaotropischen Wirkung des Cl^- auf den Potentialsensor des Malatkanals auf (Plant et al., 1994).

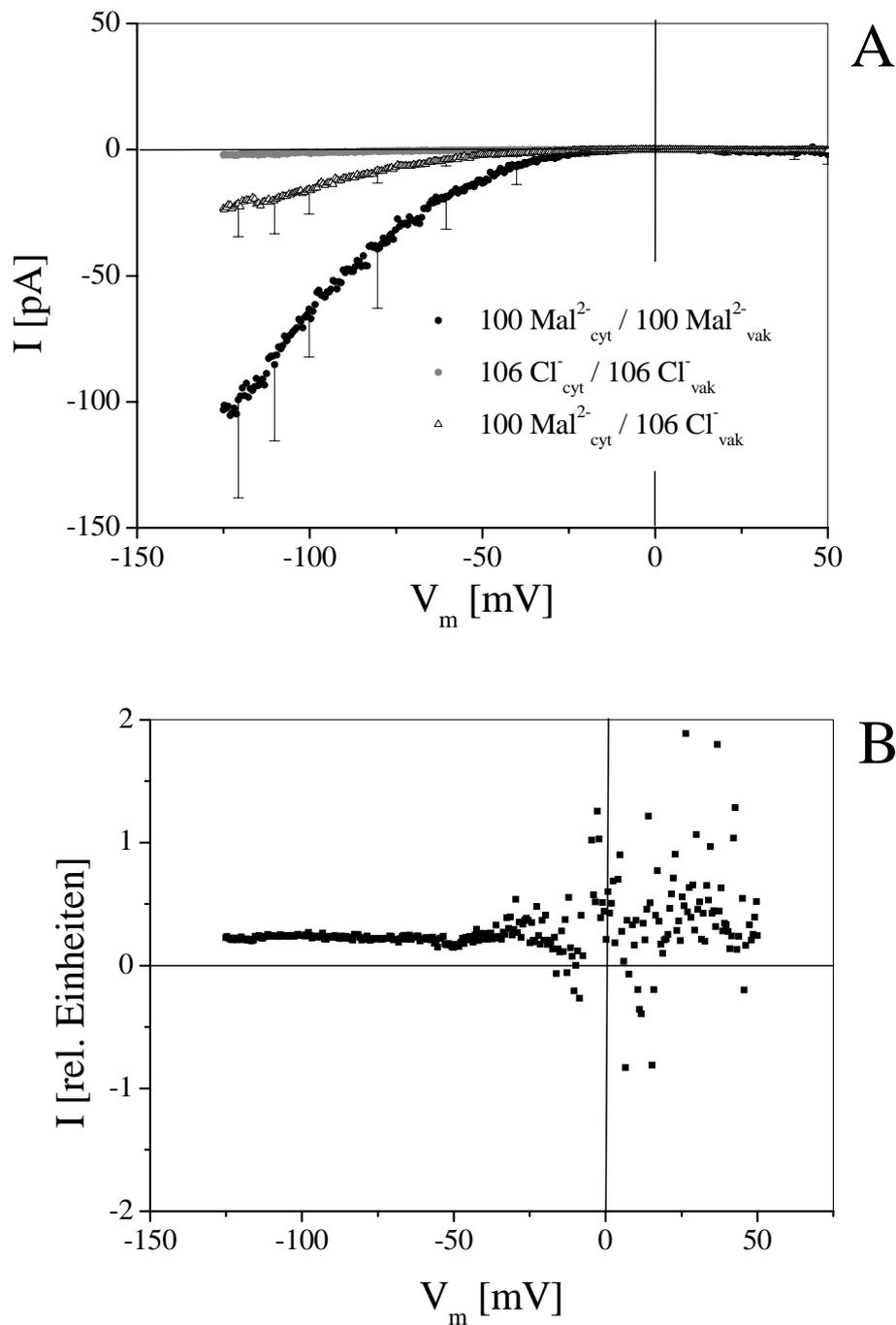


Abbildung 3.14: A) I/V-Kurven, ermittelt bei unterschiedlichen Malat- und Chloridkonzentrationsgradienten (MW mit SD; $n = 3-5$); B) Quotient aus dem Strom bei 100 mM $\text{Mal}^{2-}_{\text{cyt}}$ / 106 mM $\text{Cl}^{-}_{\text{vak}}$ und dem Strom bei 100 mM $\text{Mal}^{2-}_{\text{cyt}}$ / 100 mM $\text{Mal}^{2-}_{\text{vak}}$ als Funktion der Membranspannung; alle Messlösungen enthielten neben Mal^{2-} auch 3 mM MgCl_2 und wurden mit BTP auf pH 7,7 eingestellt.

In weiteren Experimenten wurde 106 mM Cl^- symmetrisch auf beiden Seiten des Tonoplasten appliziert. Im ganzen Spannungsbereich zeigte sich dabei ein sehr geringer Strom (Abb. 3.14 A). Dies war ein weiteres Indiz dafür, dass der Einwärtskanal einerseits sehr selektiv für Mal^{2-} gegenüber Cl^- ist, andererseits von Cl^-_{vak} effizient gehemmt wird. Außerdem deutete dieser Sachverhalt darauf hin, dass keine spezifischen Kanäle, die zur Cl^- -Akkumulation in der Vakuole beitragen könnten, in der Membran saurer Vakuolen vorhanden waren, bzw. solche Kanäle unter den gewählten Messbedingungen inaktiviert waren. Darüber hinaus unterstreicht die Hemmung des Malatstroms durch hohes Cl^-_{vak} die physiologische Bedeutung einer separaten Akkumulation von NaCl und Malat in unterschiedlichen Vakuolen salzgestresster Pflanzen, die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 3.5).

3.7.3 Nachweis der Malatkanalaktivität in der Membran neutraler Vakuolen

In den Experimenten an nativen Vakuolen zeigten sich große Unterschiede in der Aktivität des Malatkanals in neutralen und sauren Vakuolen (siehe Kapitel 3.7.1). In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, ob dies auf die Menge an Malatkanalproteinen oder auf eine Aktivitätsregulation durch das Vakuolenmilieu zurückzuführen ist. Hierzu wurden die Tonoplasten, die von Vakuolen unterschiedlicher Azidität isoliert wurden, in Anwesenheit einer Messlösung (siehe Kapitel 2.10) auf der vakuolären Seite auf Kanalaktivität untersucht.

In Abbildung 3.15 A ist der Verlauf einer Strommessung an einer neutralen Vakuole dargestellt. Dabei konnte nahezu kein Kanalstrom in der *vacuolar-attached*-Konfiguration registriert werden. Nach dem Durchbruch zum Vakuoleninneren mit anschließender Abtrennung eines Membranareals nahm der ES allmählich zu und erreichte nach etwa 20 Minuten eine konstante Amplitude. Der gleiche Vorgang der Kanalaktivierung wurde am Tonoplasten anderer neutraler Vakuolen salzgestresster Pflanzen oder leicht saurer Vakuolen aus C_3 -Pflanzen beobachtet. In Abbildung 3.15 B sind die Strom-Spannungs-Verhältnisse dargestellt, die aus den durchschnittlichen Stromantworten der isolierten Membranareale von Vakuolen aus C_3 -, HL- und salzgestressten CAM-Pflanzen ermittelt wurden. Vor einer Strommessung wurden die Membranareale jeweils 15 Minuten in der Badlösung inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit konnten keine signifikanten Unterschiede in den Strömen in Tonoplasten unterschiedlicher Vakuolentypen festgestellt werden. Bei einer Aktivierungsspannung von -120 mV zeigten sich Stromantworten in Tonoplasten saurer Vakuolen von

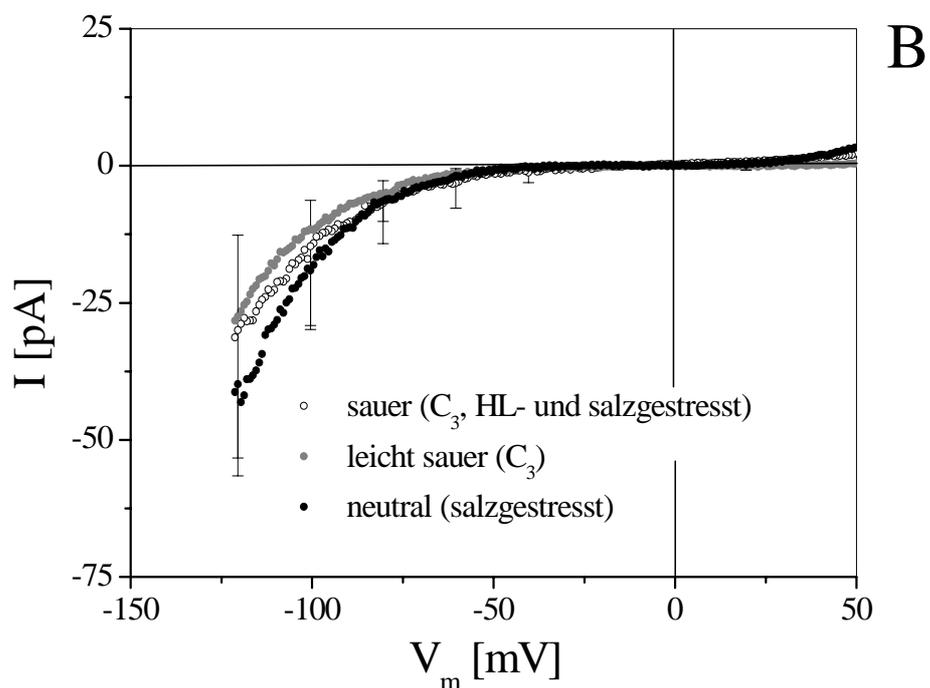
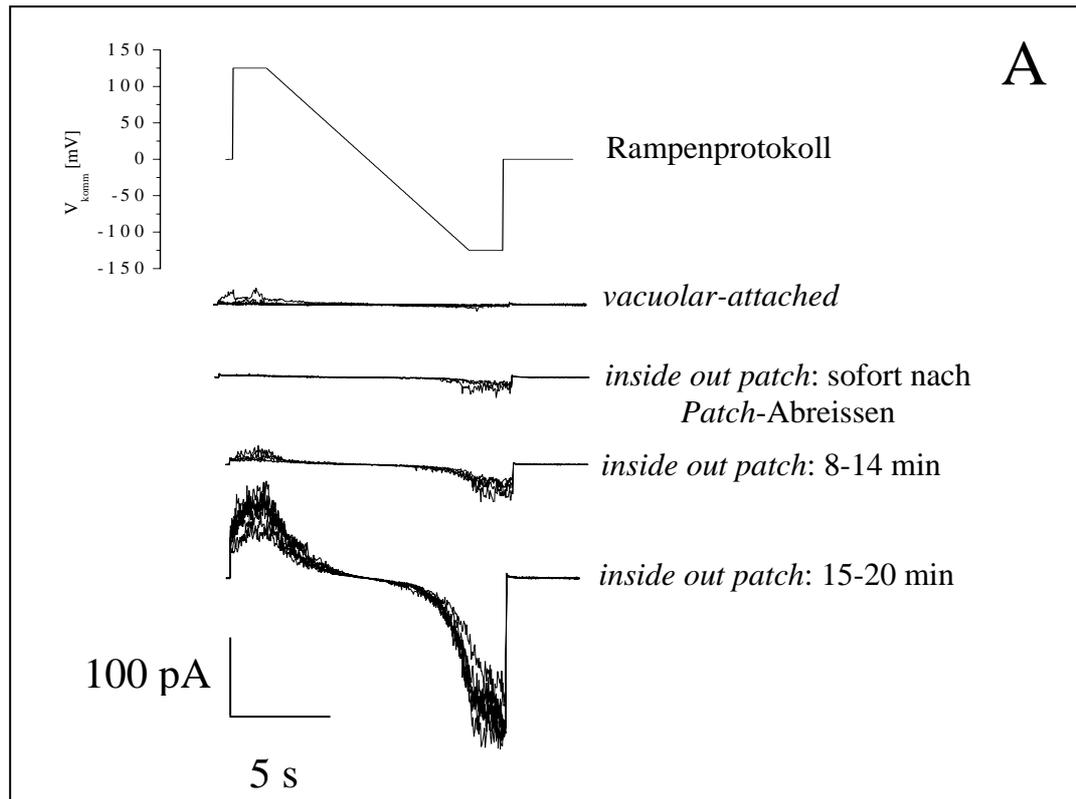


Abbildung 3.15: A) Repräsentative Messung an einer neutralen Vakuole aus einer salzgestressten Pflanze vor und nach der *Patch*-Isolierung; B) I/V-Kurven, ermittelt 15-20 min nach einem Lösungsaustausch auf der vakuolären Seite der Tonoplastenareale, die aus den Vakuolen unterschiedlicher Azidität isoliert wurden (MW mit SD; n = 4-11).

$-30,0 \pm 26,6$ pA ($n = 11$), leicht saurer Vakuolen von $-27,5 \pm 14,8$ pA ($n = 5$) und neutraler Vakuolen von $-39,9 \pm 13,5$ pA ($n = 5$).

Es ist nachvollziehbar, dass die Flächengröße eines abgerissenen Membran-*Patch* von der Messpipettengeometrie abhing. Wurden, wie im vorliegenden Fall, die Pipettenparameter während einer Versuchsreihe nicht geändert, bestanden keine wesentlichen Unterschiede in der Größe der isolierten Membranareale. Da gleich große Membranareale aus unterschiedlichen Vakuolentypen gleiche Stromamplituden aufwiesen, konnte man schließen, dass die Malatkanäle in Tonoplasten aller Vakuolentypen vorkamen und die Kanaldichte in allen Vakuolentypen ungefähr gleich groß war. Darüber hinaus konnte man ableiten, dass sich die Menge an Malatkanalproteinen am Tonoplasten von *M. crystallinum* während der Stress-Behandlung oder mit dem Übergang zum CAM nicht änderte. Hingegen wurden die Malatströme in Vakuolen mit einem nicht-sauren Milieu inaktiviert. Eine andere Erklärung wäre, dass saure Vakuolen einen malatkanalaktivierenden Faktor enthielten. Das Letztere schien aber wenig relevant zu sein, da eine beträchtliche Aktivität des Malatkanals bereits in einfach zusammengesetzten Messlösungen (siehe Kapitel 2.10) gemessen werden konnte, was komplexe Faktoren, wie Liganden oder gekoppelte Enzymreaktionen, die zur Kanalaktivierung beitragen könnten, ausschloss.

3.7.4 Regulation des Malatkanals

3.7.4.1 Untersuchungen zur Abhängigkeit des Malatkanals vom vakuolären pH-Wert

Es war anzunehmen, dass der Regulationsfaktor, der die Malatströme in nicht-säurehaltigen Vakuolen abschaltete, löslich oder nur schwach membrangebunden sein sollte, da seine Wirkung mit einem Auswaschen nachließ (siehe Kapitel 3.7.3). Der Befund, dass der Malatstrom ausschließlich in sauren Vakuolen beobachtet werden konnte, legte eine Abhängigkeit des Malatkanals vom vakuolären pH-Wert nahe. Um dies zu überprüfen, wurden ES bei unterschiedlichen pH-Werten auf der vakuolären Seite des Tonoplasten gemessen. Hierzu bot sich die Verwendung der *outside out*-Konfiguration an, bei der die vakuoläre Seite eines Membranareals zur Badlösung exponiert wird. Dies machte einen Lösungsaustausch während einer Messung möglich. Jedoch konnten Tonoplastenareale in dieser Konfiguration nur selten erhalten werden. Deshalb wurde die *inside out*-Konfiguration für diese Untersuchungen verwendet. Dabei wurden einzelne unabhängige Strommessungen mit einer auf pH-Werte von 4,7 oder 7,7 eingestellten Pipettenlösung verglichen.

Experimente mit dem variablen pH-Wert auf der vakuolären Seite des Tonoplasten zeigten, dass ein 1000facher Unterschied in der vakuolären Protonenkonzentration keine beträchtliche Auswirkung auf den Verlauf der I/V-Kurven und auf die Amplitude des Malatstroms hatte (Abb. 3.16 A und Tab. 3.2). Einen indirekten Hinweis auf die Unempfindlichkeit des Malatkanals gegenüber dem pH_{vak} -Wert lieferte auch ein Vergleich der ES-Amplituden aus Experimenten an nativen sauren Vakuolen und an isolierten Tonoplastenarealen mit dem künstlichen leicht alkalischen Vakuolenmilieu von pH 7,7 (siehe Tab. 3.2). Dies alles deutete darauf hin, dass der vakuoläre pH-Wert *per se* die gefundenen drastischen Unterschiede in der Aktivität des Malatkanals in neutralen und sauren Vakuolen (siehe Kapitel 3.7.1) nicht erklären kann.

Tabelle 3.2: Mittlerer ES [pA], gemessen an Tonoplastenarealen bei einer Spannung von -120 mV; die Pipettenlösung enthielt neben 5 mM CaCl_2 ohne bzw. mit 5 mM EDTA 100 mM Mal^{2-} (ausbalanciert mit BTPH^+) und 3 mM MgCl_2 ; die Badlösung enthielt 10 mM Mal^{2-} und 3 mM MgCl_2 (pH 7,7) dargestellt sind MW \pm SD.

<i>Vacuolar-attached-</i> Messungen	<i>Inside out</i> -Messungen beim angegebenen pH_{vak} und $\text{Ca}^{2+}_{\text{vak}}$			
	pH 7,7 5,00 mM Ca^{2+}	pH 4,7 5,00 mM Ca^{2+}	pH 7,7 0,39 mM Ca^{2+}	pH 7,7 0 mM Ca^{2+}
-43,2 \pm 29,4 (n = 21)	-55,2 \pm 27,4 (n = 3)	-50,0 \pm 46,7 (n = 5)	-42,5 \pm 12,9 (n = 4)	-39,8 \pm 13,9 (n = 19)

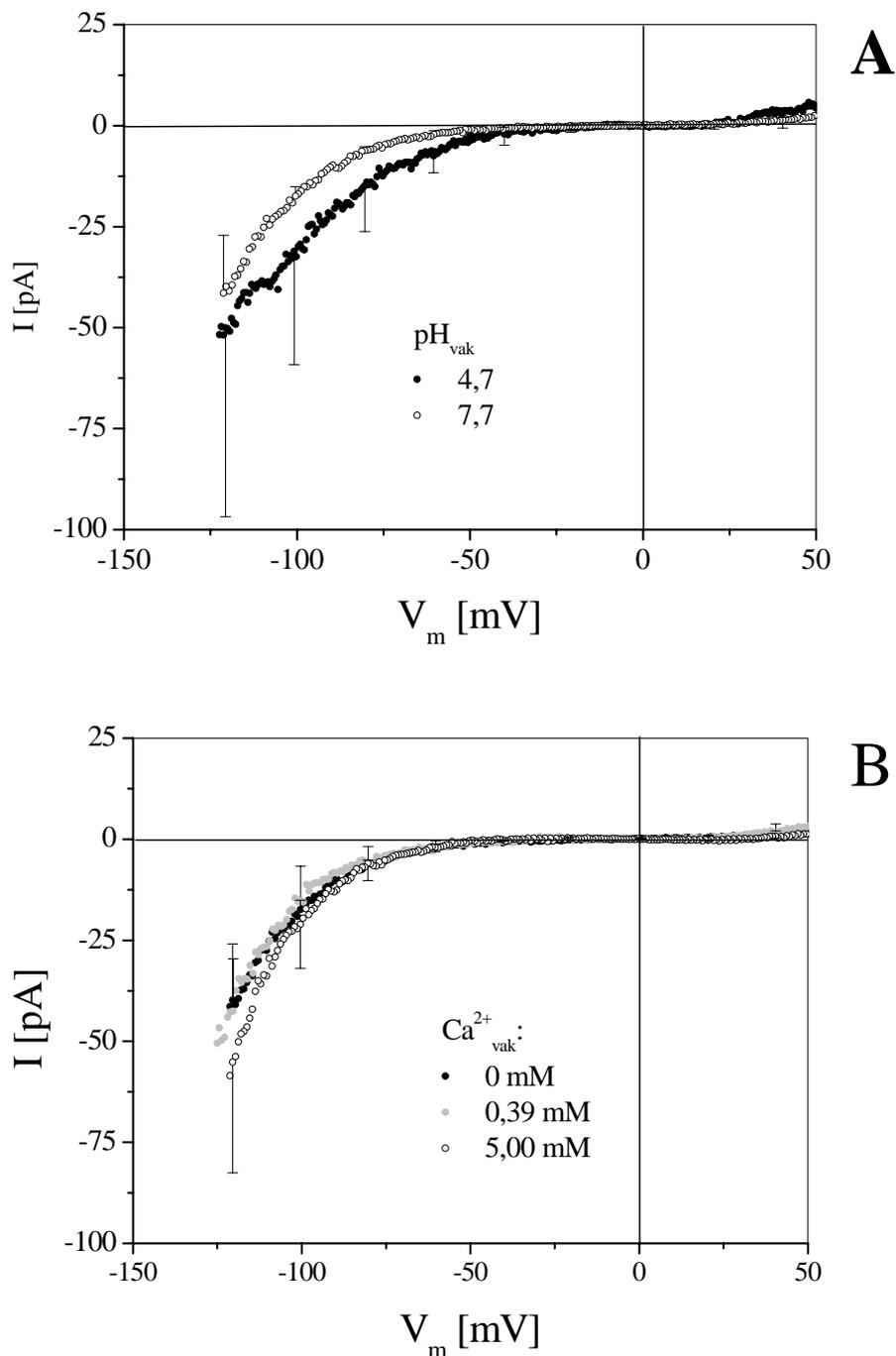


Abbildung 3.16: A) I/V-Kurven, ermittelt bei unterschiedlichen vakuolären pH-Werten (MW mit SD; $n = 3-19$); B) I/V-Kurven, ermittelt bei den unterschiedlichen Konzentrationen von freiem Ca^{2+} auf der vakuolären Tonoplastenseite (MW mit SD; $n = 3-19$); in Fall B enthielt die Messlösung auf der vakuolären Seite neben CaCl_2 auch 3 mM MgCl_2 und 100 mM BTPH^+ -Malat (pH 7,7); die Messlösung auf der cytoplasmischen Seite enthielt in beiden Fällen 10 mM BTPH^+ -Malat (pH 7,7) und 3 mM MgCl_2 .

3.7.4.2 Untersuchungen zur Abhängigkeit des Malatkanals von der vakuolären Kalziumkonzentration

Kalzium ist ein effizienter Regulator des Membrantransports einschließlich der Ionenkanäle am Tonoplasten (Ward und Schröder, 1994; Schulz-Leesdorf und Hedrich, 1995; Brüggemann et al., 1999 a / b; Sanders et al., 1999). Obwohl eine Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration in einem breiten Bereich von 10^{-8} bis 10^{-4} mM keine Wirkung auf den Malatkanal aufwies (Pantoja und Smith, 2002), war es nicht auszuschließen, dass der Malatkanal gegen vakuoläres Ca^{2+} empfindlich sein könnte. Außerdem war zu erwarten, dass ein Unterschied in der Konzentration von freiem Ca^{2+} in den Lumina von sauren und neutralen Vakuolen vorhanden sein könnte. Ein Indiz dafür war die Verteilung der für *M. crystallinum* charakteristischen Kalziumoxalatkristalle in Vakuolen unterschiedlicher Azidität. In salzgestressten Pflanzen stieg der Anteil der Vakuolen mit Kalziumoxalatkristallen von ca. 4,1 % in der Population saurer Vakuolen auf ca. 20,7 % in der Population neutraler Vakuolen an. Aus diesem Befund konnte man ableiten, dass die Ausbildung dieser Kristalle in säurehaltigen Vakuolen aufgrund eines niedrigen pH-Wertes unterbunden war. Folglich könnte die Konzentration von löslichem Ca^{2+} in sauren Vakuolen höher sein als in neutralen Vakuolen. Ob sich die Ca^{2+} -Konzentration in der Vakuole auf die Aktivität des Malatkanals auswirkte, wurde nachfolgend überprüft. Hierzu wurden Messungen entweder ohne Ca^{2+} oder unter einer Zugabe von 5 mM CaCl_2 , oder 5 mM CaCl_2 und 5 mM EDTA in der Pipettenlösung in der *inside out*-Konfiguration durchgeführt. Konzentrationen von freiem Ca^{2+} beim gewählten pH-Wert von 7,7 wurden mit dem Computerprogramm Calciumcalculator (Foehr und Warchol, 1989-1990) berechnet und betragen 0 mM, 5,00 mM und 0,39 mM. Diese Unterschiede in $\text{Ca}^{2+}_{\text{vak}}$ wirkten sich auf die Malatströme nicht wesentlich aus, weder auf die Stromamplitude noch auf die Form von I/V-Kurven des ES (Tab. 3.2 und Abb. 3.16 B). Daraus folgte, dass auch die Konzentration von freiem $\text{Ca}^{2+}_{\text{vak}}$ für die hohe Malatkanalaktivität in sauren Vakuolen und ihre Inaktivierung in neutralen Vakuolen nicht verantwortlich war.

3.7.4.3 Wirkung SH-modifizierender Reagenzien auf den Malatkanal

Viele organische Säuren und Basen, darunter die Äpfelsäure, sind redoxaktive Substanzen. Daher gehen Änderungen des pH-Werts innerhalb eines Zellkompartiments oft mit Verschiebungen im Redoxpotential (E_{red}) einher (Roth et al., 1983). An Algen-Zellen wurde gezeigt, dass die Zufuhr einer schwachen Säure ins Cytosol E_{red} in die positive

Richtung verschob, was seinerseits Transporteigenschaften des Plasmalemmas beeinflusste (Thiel, 1994). Man kann daher vermuten, dass die E_{red} -Werte des Lumens Äpfelsäureakkumulierender und neutraler Vakuolen von einander abweichen. Die nahe liegende Frage ist, ob sich das luminale E_{red} auf die Aktivität des Malatkanals in sauren und neutralen Vakuolen von *M. crystallinum* auswirken kann. Bekanntlich sind Cystein-Reste eines Proteins die empfindlichen Stellen zur Vermittlung von E_{red} -Schwankungen. Dies äußert sich in Veränderungen der Konformation eines Kanalproteins, die ihrerseits Änderungen in dessen Aktivität hervorrufen. Sulfhydryl-(SH)-modifizierende Reagenzien zeigen eine hohe Affinität zu Cystein-Resten und ahmen eine Wirkungsweise von Oxidantien nach. Drei verschiedene SH-Reagenzien wurden in den folgenden Experimenten auf der vakuolären Seite des Tonoplasten getestet. Diese Substanzen wurden in die auf den pH-Wert von 7,7 eingestellte Pipettenlösung zugegeben. Der Strom wurde 15-20 Minuten nach der Membranisolierung in der *inside out*- Konfiguration gemessen. In Abbildung 3.17 A sind die Strom-Spannungs-Kennlinien dargestellt, die in Gegenwart von NEM (N-Ethylmaleimid), DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)) und PCMBS (p-Chloromercuriphenylsulfonsäure) ermittelt wurden. Alle diese SH-Reagenzien zeigten eine stimulierende Wirkung auf die Malatleitfähigkeit. Dabei ist die SH-modifizierende Substanz NEM membrangängig, PCMBS und DTNB sind dagegen nicht-permeierend und konnten daher nur auf der vakuolären Seite des Tonoplasten wirken. Eine Wechselwirkung der letzteren zwei Reagenzien nur mit den zum Vakuolenlumen exponierten SH-Gruppen der Membranproteine konnte ES wesentlich erhöhen. Darüber hinaus induzierte das nicht-permeierende PCMBS die höchste Stromaktivierung. Bei einer Spannung -120 mV war die mittlere Stromamplitude in Anwesenheit von PCMBS um den Faktor 4,2 größer als bei der Kontrolle. Nach einer Normierung der Stromamplituden unter den Kontrollbedingungen auf die Stromantworten in Gegenwart von PCMBS verlief die resultierende I/V-Kurve parallel zur Spannungsachse (Abb. 3.17 B). Dies deutete darauf hin, dass PCMBS nur die Stromamplituden, nicht aber das Aktivierungspotential des Malatkanals beeinflusste.

Die reduzierende nicht-membranpermeierende Substanz Mercaptoethanol zeigte umgekehrt eine hemmende Wirkung auf den Malatstrom. In Abbildung 3.18 A ist der Verlauf einer typischen Messung an einer sauren Vakuole wiedergegeben. Dabei wurde zuerst die cytosolische Seite in der *vacuolar-attached*-Konfiguration und nach der *Patch*-Abtrennung die vakuoläre Seite des Tonoplasten 10 mM Mercaptoethanol exponiert. In

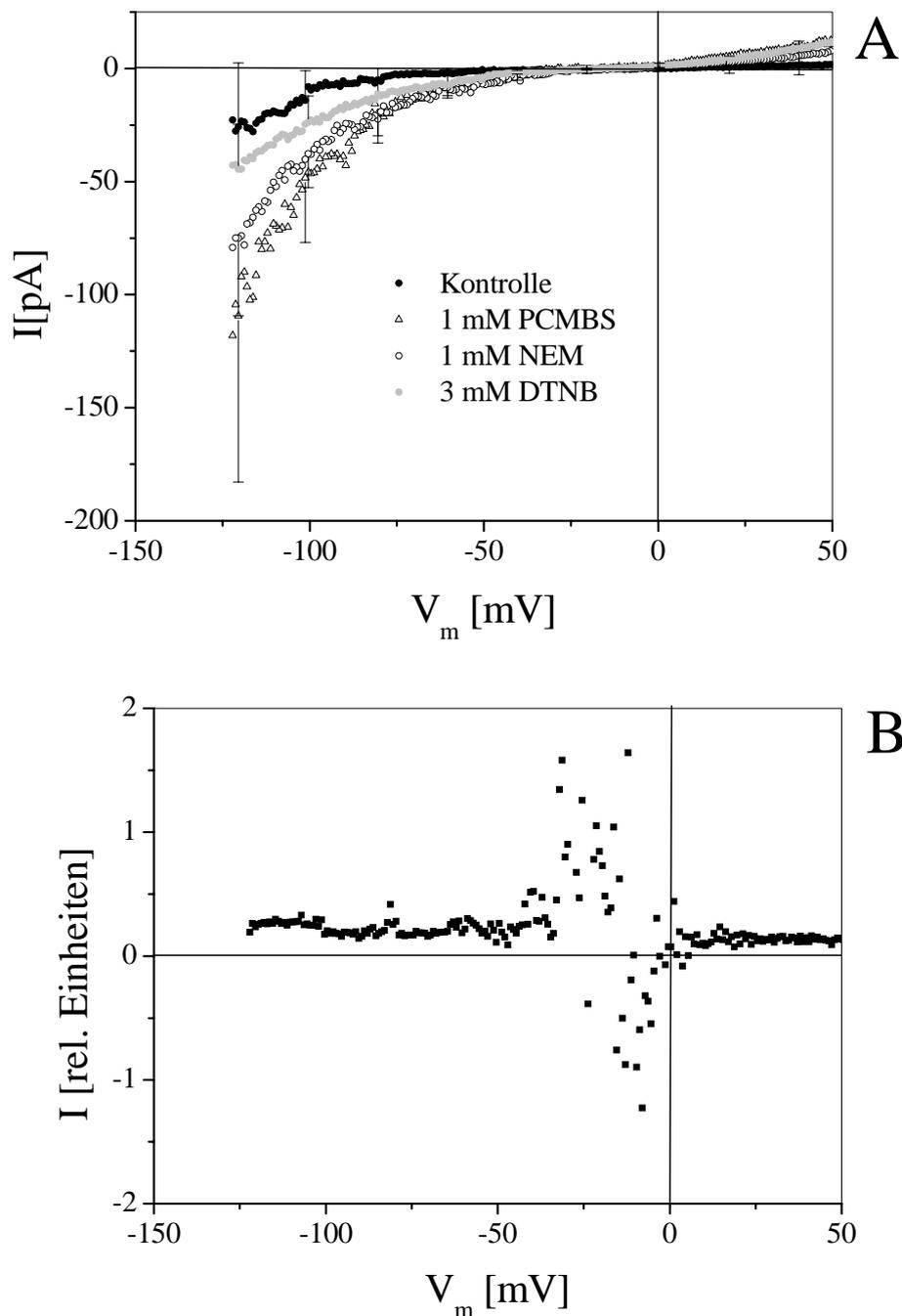


Abbildung 3.17: A) I/V-Kurven in Gegenwart von SH-modifizierenden Reagenzien auf der vakuolären Seite des Tonoplasten, gemessen in der *inside out*-Konfiguration (MW mit SD; $n = 4-11$); B) Quotient aus dem Kontroll-Strom und dem Strom mit 1 mM PCMBs_{vak} als Funktion der Membranspannung; außer den angegebenen Substanzen enthielten die Messlösungen 3 mM MgCl₂ und 100 mM BTPH⁺-Malat (pH 7,7) auf der vakuolären Seite bzw. 10 mM BTPH⁺-Malat (pH 7,7) auf der cytoplasmischen Seite.

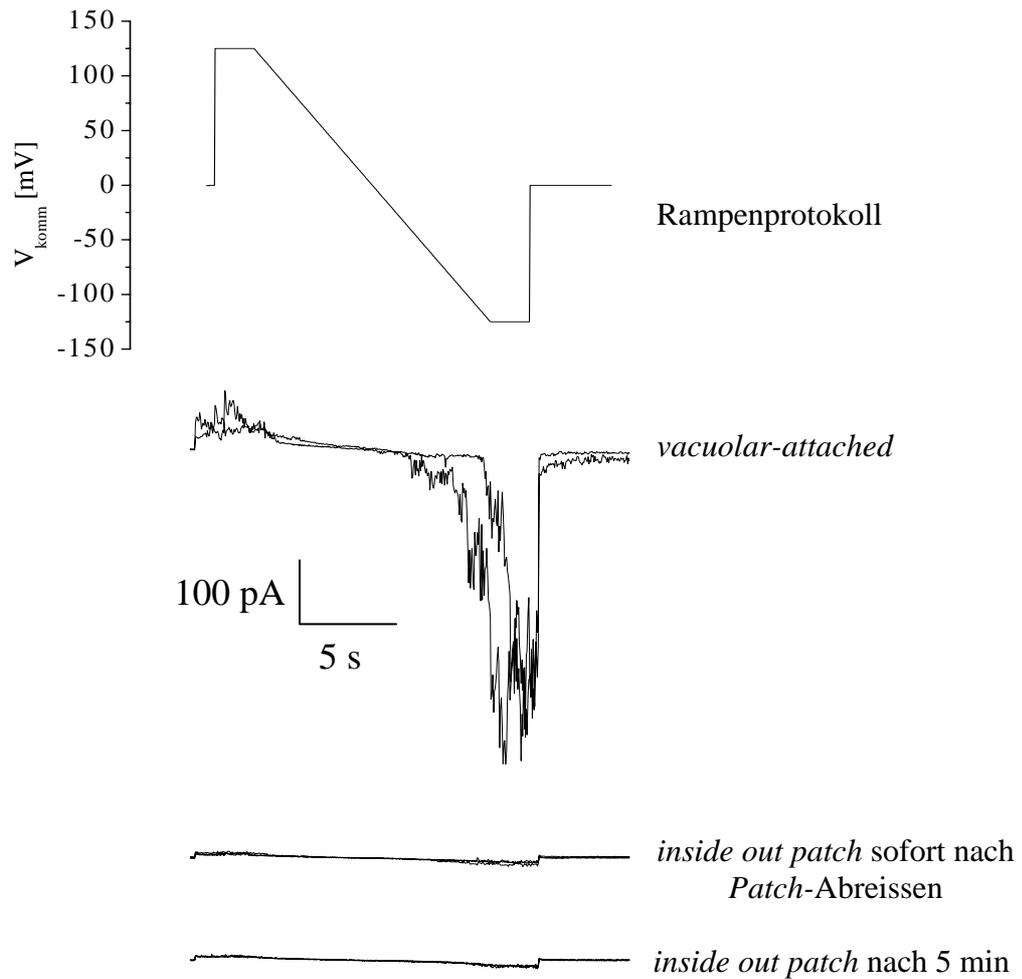


Abbildung 3.18: Repräsentative Messung an einer sauren Vakuole aus einer HL-Pflanze vor und sofort bzw. 5 min nach der *Patch*-Isolierung; die Pipettenlösung enthielt 10 mM Mercaptoethanol, 3 mM MgCl_2 und 100 mM BTPH^+ -Malat (pH 7,7); die Badlösung enthielt 3 mM MgCl_2 und 10 mM BTPH^+ -Malat (pH 7,7).

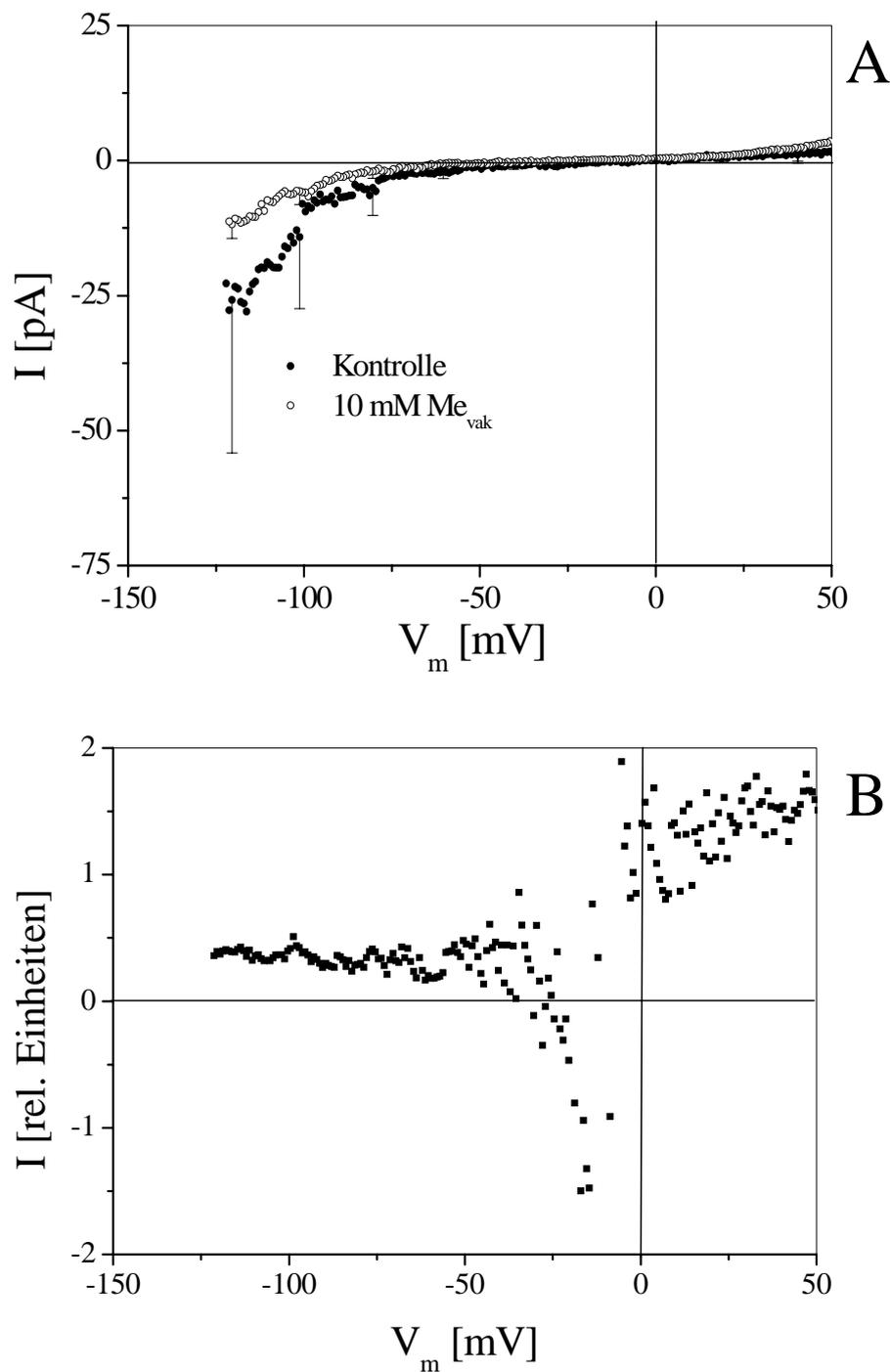


Abbildung 3.19: A) I/V-Kurven in Anwesenheit 10 mM Mercaptoethanol (Me) auf der vakuolären Tonoplastenseite (MW mit SD; $n = 4-11$); B) Quotient aus dem Strom mit Me und dem Kontroll-Strom als Funktion der Membranspannung; außer Me enthielten die Messlösungen 3 mM $MgCl_2$ und 100 mM $BTPH^+$ -Malat (pH 7,7) auf der vakuolären Seite bzw. 10 mM $BTPH^+$ -Malat (pH 7,7) auf der cytoplasmischen Seite.

der *vacuolar-attached*-Konfiguration zeigte sich ein beträchtlicher Malatstrom, der vollständig gehemmt wurde, sobald die vakuoläre Seite des Tonoplasten der reduzierenden Pipettenlösung ausgesetzt wurde. Weitere Untersuchungen an isolierten Membranarealen zeigten, dass 10 mM Me den Malatstrom erheblich verringerte. Bei einer Testspannung von -120 mV betrug die Inhibierung des durchschnittlichen Malatstroms in Anwesenheit von Me_{vak} im Vergleich zur Kontrolle ca. 60 %. Wie aus dem Verlauf der auf die Kontrolle normierten I/V-Kurve in Gegenwart von Me_{vak} zu sehen ist, verringerte dieses Reduktionsmittel die Gesamtstromamplitude ohne sich auf das Aktivierungspotential des Malatkanals auszuwirken (Abb. 3.19 B).

Die oben erwähnten Redoxsubstanzen wurden bei konstantem pH-Wert appliziert, daher beeinflussten sie den Malatkanal direkt und unabhängig von der Azidität des Mediums. Aus der beobachteten entgegengesetzten Wirkung reduzierender und SH-Reagenzien konnte man weiterhin ableiten, dass das vakuoläre E_{red} die Aktivität des Malatkanals regulieren könnte, da eine Verschiebung des E_{red} die gleiche Auswirkung auf eventuelle SH-Gruppen des Kanalproteins wie die Anwesenheit der reduzierenden bzw. SH-modifizierenden Reagenzien hat. Demnach ist bei einem negativeren E_{red} eine Hemmung der Malatströme zu erwarten, bei einer E_{red} -Positivierung aktivieren die Malatkanäle.

3.8 Redoxpotentialmessungen im Blattpresssaft

Mit dem Befund, dass im Experiment ein oxidierendes Vakuolenmilieu den Malattransport direkt aktivieren konnte, stellte sich die Frage, ob eine solche Regulation auch in nativen Vakuolen stattfand. Daher sollte nachgeprüft werden, ob sich der Inhalt saurer Vakuolen, in denen eine hohe Aktivität des Malatkanals gefunden wurde, im E_{red} vom Inhalt neutraler Vakuolen unterschied.

Eine direkte Messung des E_{red} mit konventionellen elektrophysiologischen Methoden in einzelnen Vakuolen konnte aufgrund ihrer Fragilität und geringen Größe nicht durchgeführt werden. Daher wurde das E_{red} im Presssaft von HL- und von salzgestressten Pflanzen bestimmt.

In HL-gestressten Pflanzen betrug E_{red} $34,9 \pm 13,4$ mV ($n = 4$) und lag dabei um ca. 75 mV positiver als der Wert des Presssafftes salzgestresster Pflanzen ($P < 0,05$) (Abb. 3.20).

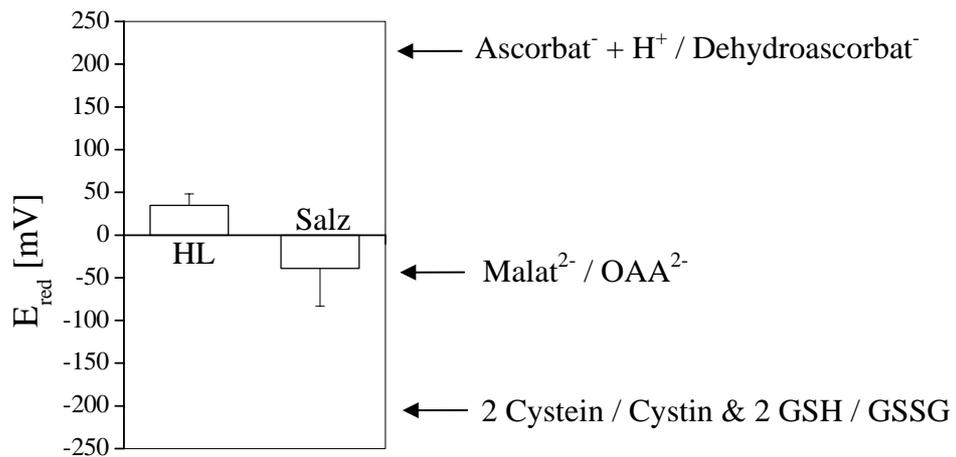


Abbildung 3.20: Redoxpotentiale des Blattpresssaftes (MW mit SD; $n = 4$); die Pfeile zeigen die Mittelpunktpotentiale von einigen physiologisch relevanten Redoxpaaren bei pH 4 und 25 °C (Rauen, 1964).

Ausgehend von einem zweifach höheren Anteil an sauren Vakuolen in HL-Pflanzen gegenüber salzbehandelten Pflanzen, der in den vorausgegangenen Experimenten mit NR nachgewiesen wurde, konnte man aus diesen Redoxmessungen entnehmen, dass saure Vakuolen ein wesentlich positiveres Redoxpotential als neutrale Vakuolen aufwiesen. Außerdem enthielt der Presssaft aus salzgestressten Pflanzen Inhalte saurer und neutraler Vakuolen in annähernd gleichem Verhältnis (siehe Kapitel 3.2.1). Daher gab das E_{red} der salzgestressten Pflanzen ein gemischtes Vakuolenmilieu wieder. Daraus konnte man ableiten, dass das Redoxpotential des Lumens einer neutralen Vakuole wesentlich reduzierender sein könnte, als das Redoxpotential des Gesamtpresssaftes salzgestresster Pflanzen. Es sollte außerdem erwähnt werden, dass die verwendeten Platin/Iridium-Elektroden sehr empfindlich gegenüber Anionen sind. Dabei verursachte eine steigende Anionenkonzentration eine positive Verschiebung gemessener Werte von E_{red} jeweils um 60 mV für eine zehnfache Konzentrationszunahme (Thiel, 1994). Aus einem signifikanten Unterschied der Osmolarität salzgestresster Pflanzen von $1,18 \pm 0,20 \text{ Osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($n = 11$) gegenüber HL-gestressten Pflanzen ($0,43 \pm 0,05 \text{ Osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$; $n = 12$) vor dem Hintergrund ähnlicher Malat- und Citratwerte in diesen Versuchsgruppen konnte man ableiten, dass in salzbehandelten Pflanzen eine starke Akkumulation von NaCl und somit von Cl⁻-Ionen stattgefunden hat. Daher konnte man annehmen, dass der gemessene E_{red} -Wert des Presssaftes von salzgestressten Pflanzen im Vergleich zu HL-gestressten Pflanzen wegen der höheren Anionenkonzentration in salzbehandelten Pflanzen in die positive Richtung verschoben wurde. Demnach könnte der tatsächliche Unterschied

zwischen E_{red} dieser Versuchsgruppen noch größer sein. Dies deutete darauf hin, dass die sauren Vakuolen HL-gestresster Pflanzen gegenüber den neutralen Vakuolen salzgestresster Pflanzen ein wesentlich positiveres E_{red} hatten. Aus den *Patch-clamp*-Messungen an nativen Vakuolen folgt, dass die Aktivität des redoxsensitiven Malatkanals genau in sauren Vakuolen, d.h. in den Vakuolen mit positiveren E_{red} zu beobachten war. Dies stimmte mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit redoxaktiven Substanzen überein, die auf eine Aktivierung des Malatkanals im oxidierenden Milieu hingewiesen haben. Darüber hinaus konnte der inaktive Zustand des Malatkanals in neutralen Vakuolen sowohl der C_3 - als auch der salzbehandelten Pflanzen auf eine Redoxinhibierung zurückzuführen sein.

Aus den vorausgegangenen mikroskopischen Experimenten mit NR war bekannt (siehe Kapitel 3.2.1), dass HL-Pflanzen nur einen kleinen Anteil neutraler Vakuolen hatten. Daraus konnte man annehmen, dass das E_{red} ihres Presssaftes für ein saures Vakuolenmilieu charakteristisch war. Ihr E_{red} -Wert von $34,9 \pm 13,4$ mV ($n = 4$) konnte daher Auskunft über das dominierende Redoxpaar in sauren Vakuolen geben. Vergleicht man die für den pH-Wert von 4,0 korrigierten Mittelpunktspotentiale der für das Vakuolenlumen relevanten Redoxsysteme, findet man, dass das Malat-OAA-Paar den größten Beitrag zum E_{red} in diesen Vakuolen leisten könnte (Abb. 3.20).

Die E_{red} -Messung der *Patch-clamp*-Pipettenlösung zeigte ein sehr positives E_{red} von $185,0 \pm 7,7$ mV ($n = 4$) gegenüber den Vakuolensäften aus HL- und salzgestressten Pflanzen. Demnach wurden isolierte Membranareale während der *Patch-clamp*-Messungen nach Austausch des natürlichen Mediums auf der vakuolären Seite des Tonoplasten gegen die Pipettenlösung einem wesentlich stärker oxidierenden Milieu exponiert, als es das natürliche Vakuolenmilieu darstellte. Eine beobachtete Steigerung der Malatkanalaktivität in der *inside out*-Konfiguration im Vergleich zur *vacuolar-attached*-Konfiguration könnte daher auf diese nach einer *Patch*-Isolierung stattgefundene Verschiebung von E_{red} zurückzuführen sein. Dieses Aktivitätsverhalten des Malatkanals bei unterschiedlichen E_{red} stützte die Ergebnisse der *Patch-clamp*-Messungen in Gegenwart verschiedenen SH-Reagenzien und lieferte einen weiteren Hinweis auf die Redoxregulation des Malatkanals.

3.9 Proteinbiochemische Charakterisierung des Tonoplasten

3.9.1 Identifizierung des Na⁺-H⁺-Antiporters

Aufgrund des Nachweises einer hohen Malatkanalaktivität in Tonoplasten saurer Vakuolen im Vergleich zu einem inaktiven Zustand dieses Kanals in neutralen Vakuolen konnte man davon ausgehen, dass nur in den sauren Vakuolen Äpfelsäure akkumuliert werden konnte, was auch die Kristallanalyse der vakuolären Inhaltstoffe bestätigte. Eine NaCl-Anreicherung in neutralen Vakuolen salzgestresster Pflanzen erforderte hingegen die Präsenz anderer, spezieller Transportsysteme in ihren Tonoplasten, darunter Na⁺-H⁺-Antiporter (Blumwald und Poole, 1985; Barkla et al. 1995; Blumwald et al., 2000; Barkla et al. 2002). Daher sollten Tonoplasten saurer und neutraler Vakuolen auf das Vorhandensein dieses Transportsystems hin untersucht werden. Bekanntlich ist der Na⁺-H⁺-Antiport elektroneutral und kann mit elektrophysiologischen Methoden, wie der *Patch-clamp*-Technik, nicht erfasst werden. Für den Nachweis dieses Transportsystems wurden deshalb immunologische Methoden verwendet. Es wurden zwei experimentelle Strategien eingesetzt: i) Isolierung und Trennung intakter saurer und neutraler Vakuolen salzgestresster Pflanzen, in denen diese Vakuolentypen in annähernd gleichen Anteilen vorlagen; ii) Reinigung von Tonoplastenangereicherten Membranpopulationen vergleichend aus salzgestressten Pflanzen und HL-gestressten Pflanzen mit dem höchsten Anteil an sauren Vakuolen (siehe Kapitel 3.2.1).

3.9.1.1 AtNHX1-Immunmarkierung in Membranen partiell getrennter nativer Vakuolen

Die Trennung saurer und neutraler Vakuolen aus Blättern salzgestresster Pflanzen erfolgte durch Zentrifugation in einem Fikolldichtegradienten (Buser und Matile, 1977; Struve et al., 1985). Nach der partiellen Anreicherung saurer und neutraler Vakuolen wurden die Vakuolenmembranen sedimentiert und nach SDS-PAGE eine Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper gegen AtNHX1-Produkt aus *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Eine der Voraussetzungen für den Einsatz von *anti*-AtNHX1 für die Immunmarkierung des Na⁺-H⁺-Antiporters in Tonoplasten von *M. crystallinum* war der hohe Identitätsgrad zwischen den AtNHX1-Sequenzen und den salzinduzierbaren, putativen Na⁺-H⁺-Antiporter-Transkripten aus *M. crystallinum* (Chauhan et al. 2000).

In Tonoplasten sowohl saurer, als auch neutraler Vakuolen erkannte das *anti*-AtNHX1 zwei Polypeptide mit Molmassen von 35 und 47 kDa (Abb. 3.21). Durch den Molmassenvergleich der markierten Proteine mit dem in der Literatur beschriebenen

AtNHX1-Produkt konnte das 47 kDa-Polypeptid dem $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporter zugeordnet werden. Die Markierung eines 35 kDa-Proteins mit *anti-AtNHX1* wurde in *A. thaliana* nicht beobachtet (Apse et al., 1999) und könnte die Folge einer unspezifischen Kreuzreaktion mit einem unbekanntem Protein von *M. crystallinum* sein. In Abbildung 3.21 kann man erkennen, dass die Fraktion der neutralen Vakuolen gegenüber der Fraktion der sauren Vakuolen eine deutlich stärkere Markierung des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporters aufwies. Da für beide Fraktionen die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde, konnte man aus den Unterschieden in der Markierungsintensität ableiten, dass der $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporter in der Fraktion neutraler Vakuolen in einer höheren Menge vorlag, als in der Fraktion der sauren Vakuolen.

Tonoplastenfraktionen

sauer neutral

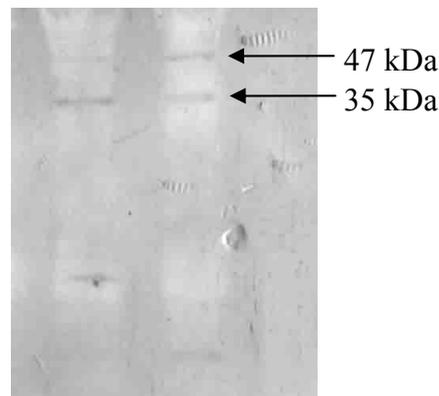


Abbildung 3.21: AtNHX1-Immunmarkierung der partiell gereinigten sauren und neutralen Vakuolen salzgestresster Pflanzen; partiell gereinigte Vakuolen aus fünf Präparationen wurden vereinigt; eingesetzte Proteinmenge 30 μg ; die Zahlen mit den Pfeilen geben Molmassen der markierten Polypeptide an.

Das Auftreten einer schwächeren, aber deutlichen $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporter-Markierung in Tonoplasten saurer Vakuolen könnte auf das tatsächliche Vorhandensein dieses Protein in ihren Membranen hindeuten, wenn auch in einer geringeren Konzentration. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die hier untersuchten Tonoplastenfraktionen aus Vakuolenpopulationen stammten, die zwar mit sauren oder neutralen Vakuolen angereichert waren, die aber auch geringfügige variable Anteile des entsprechenden anderen Vakuolentyps enthielten, was eine mikroskopische Kontrolle der im Fikollgradienten getrennten Vakuolen bestätigte (Daten nicht gezeigt). Zahlreiche Versuche zur Optimierung der Trennmethode hinsichtlich des Fikollkonzentrations-Verhältnisses führten nicht zu einer vollständigen Trennung der Vakuolen

unterschiedlicher Azidität. Aus zeitlichen Gründen konnten diese Versuche im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergeführt werden. Dennoch scheint diese Trennmethode der Tonoplasten aus isolierten nativen Vakuolen die Methode der Wahl für weitere Untersuchungen der Proteinausrüstung der beiden Vakuolentypen zu sein.

3.9.1.2 AtNHX1-Immunmarkierung in Membranpräparaten der Saccharosedichtegradienten

Nach Untersuchungen von Hoh et al. (1995) ließen sich durch kontinuierliche Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation aus Kotyledonen von *Pisum sativum* zwei Tonoplastenpopulationen trennen, die durch eine unterschiedliche isopyknische Dichte charakterisiert sind und die aufgrund spezifischer Immunmarkierungen den PSVs und lytischen Vakuolen zugeordnet werden konnten. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit in einem zweiten experimentellen Ansatz zur Lokalisierung des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporters in Membranen neutraler Vakuolen versucht, die Membranen unterschiedlicher Vakuolen aus salzgestressten Pflanzen von *M. crystallinum* durch die Zentrifugation in einem kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten zu trennen. Zum Vergleich wurden Membranpräparate HL-gestresster Pflanzen verwendet.

In Saccharosedichtefraktionen salzgestresster und HL-gestresster Pflanzen zeigte das *anti-AtNHX1* wie mit den partiell gereinigten sauren und neutralen Vakuolen (siehe Kapitel 3.9.1.1) eine deutliche Kreuzreaktion mit einem passenden 47 kDa-Polypeptid (Abb. 3.22 A und B). Gegenüber den HL-gestressten Pflanzen war in den Präparaten salzbehandelter Pflanzen eine wesentlich stärkere Markierung zu sehen. Dies war im Einklang mit Ergebnissen von Barkla et al. (1995; 2002), die durch Messungen der Na^+ -Transportaktivität eine Salzinduzierbarkeit des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporters in *M. crystallinum* nachgewiesen haben. Interessanterweise wurden von *anti-AtNHX1* in den vorliegenden Membranpräparaten beider Pflanzengruppen zwei Membrandichtebereiche erkannt. Der erste *AtNHX1*-markierte Fraktionsbereich lag in salzgestressten CAM-Pflanzen zwischen 13 und 30 % (w/w) Saccharose und in HL-gestressten CAM-Pflanzen zwischen 15 und 28 % (w/w) Saccharose. Dies entspricht der Dichteposition, die in der Literatur bis auf wenige Ausnahmen für die Dichte von Tonoplastenvesikeln (etwa bei 25 % (w/w) Saccharose) angegeben wird. Die zweite *AtNHX1*-positive Membranpopulation lag bei höheren Saccharosekonzentrationen: zwischen 38 und 49 % (w/w) Saccharose in salzbehandelten Pflanzen und zwischen 39 und 49 % (w/w) Saccharose in HL-gestressten Pflanzen. Die *AtNHX1*-Markierung war in den schweren Dichtebereichen bei beiden Versuchsgruppen

deutlich intensiver als in den leichten Fraktionen. In der Fraktionsreihe salzgestresster Pflanzen lag das AtNHX1-Markierungsmaximum bei 40 / 45 % (w/w) Saccharose und somit weit entfernt von der angesprochenen 25 % (w/w) Saccharose-Tonoplastenfraktion. Daraus konnte man ableiten, dass sich in den Fraktionen bei 40 / 45 % (w/w) Saccharose eine Membranvesikelpopulation befand, die eine besondere Rolle im Na^+ -Transport spielen könnte und sich dennoch durch ihre Dichte von der bekannten Tonoplastenfraktion bei 25 % (w/w) Saccharose unterschied. Nach Ergebnissen einer subzellulären AtNHX1-

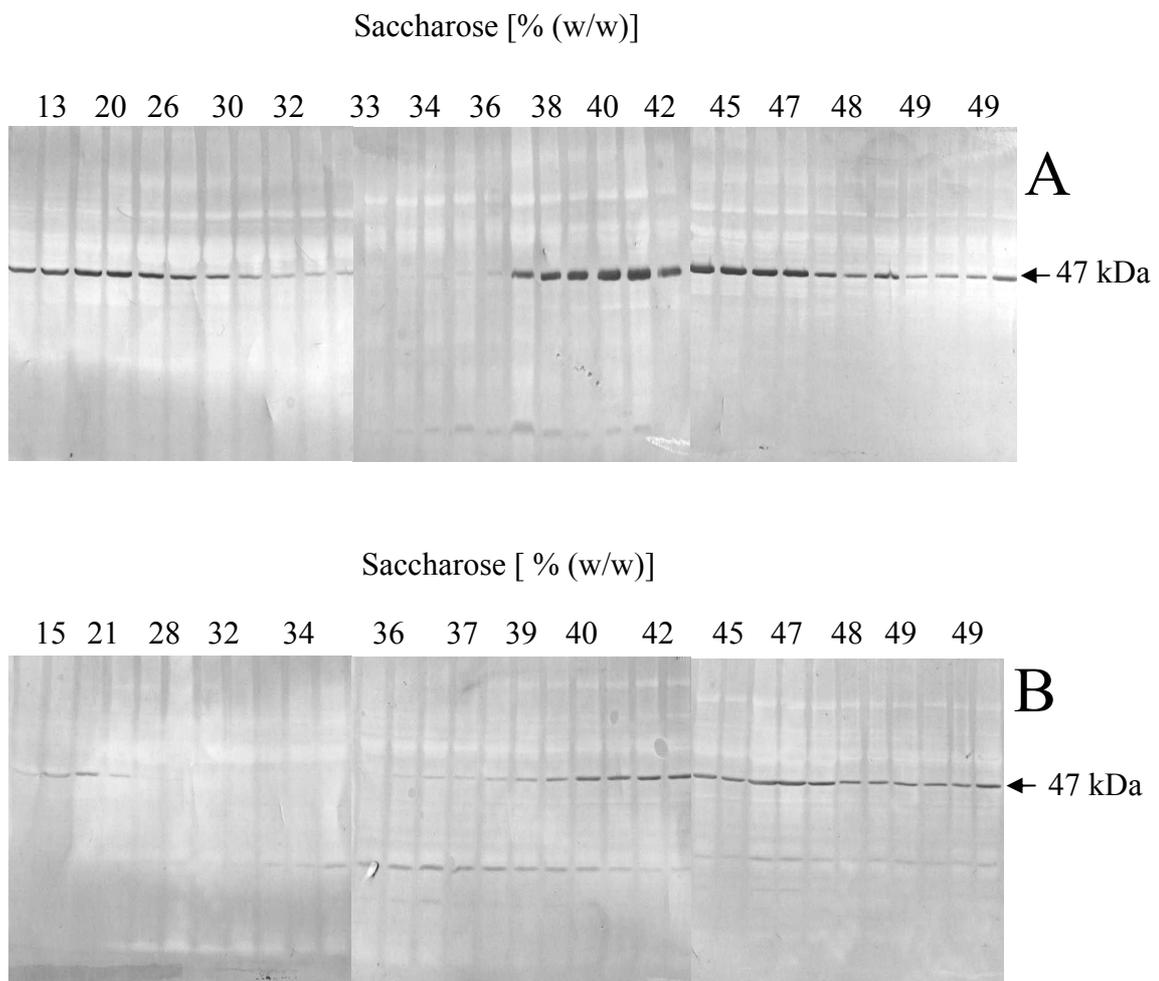


Abbildung 3.22 AtNHX1-Immunmarkierung der Saccharosedichtefractionen: A) Membranpräparate salzgestresster Pflanzen, eingesetzte Proteinmenge 40 μg ; B) Membranpräparate HL-gestresster Pflanzen, eingesetzte Proteinmenge 40 μg ; Zahlen mit den Pfeilen geben Molmassen der markierte Polypeptide an.

Lokalisation in Membranpräparaten von *A. thaliana* konnte das Na⁺-H⁺-Antiporter-Protein großenteils in Tonoplasten gefunden werden (Apse et al., 1999). Dieses Erkenntnis legte die Schlussfolgerung nahe, dass die in den vorliegenden Untersuchungen an *M. crystallinum* gefundenen AtNHX1-markierten Membranpopulationen unterschiedlicher Dichte zwei individuelle Tonoplastenfraktionen darstellen könnten. Diese Vermutung führte weiterhin dazu, die Unterschiede in der Na⁺-H⁺-Antiporter-Markierungsstärke in den leichten und schweren Fraktionen mit der unterschiedlichen Markierungsstärke des Na⁺-H⁺-Antiporters in partiell getrennten sauren und neutralen intakten Vakuolen in Verbindung zu bringen, wo ebenso eine ungleiche Verteilung zu beobachten war (siehe Kapitel 3.9.1.1). Dabei könnten die Membranen neutraler, salzspeichernder Vakuolen in den dichten Gradientenfraktionen und die Membranen saurer, malatspeichernder Vakuolen in den leichten Gradientenfraktionen vorliegen.

Studien von Emig (1999) und Neubert (2000) an *M. crystallinum* haben gezeigt, dass in kontinuierlichen Saccharosedichtebereichen von 37 / 49 % (w/w) bei salzgestressten Pflanzen Membranvesikel des Golgi-Apparats und des Plasmalemmas zu fraktionieren waren. Daher sollten auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit die Membranpräparate auf das Vorhandensein weiterer tonoplastspezifischer Proteine untersucht werden, um die Tonoplastenidentität der hier angesprochenen AtNHX1-markierten Membranfraktion von 37 / 49 % (w/w) Saccharose bzw. den Anteil an Tonoplasten in dieser eventuellen Mischfraktion abzusichern.

3.9.2 Nachweis zweier Populationen von Tonoplastenmembranen im Blattgewebe

3.9.2.1 VM23-Immunmarkierung

Für die weitere Charakterisierung und Identifikation der Tonoplasten wurde der Tonoplastenmarker γ -VM23 (nachfolgend als VM23 bezeichnet) verwendet (Maeshima, 1992). Dieses Protein aus *Raphanus sativus* ist eine tonoplastspezifische Aquaporin-Isoform, die eine hohe Homologie zum γ -TIP (*tonoplast intrinsic protein*) aus *A. thaliana* aufweist (Higuchi et al., 1998).

In Membranpräparaten aus HL-gestressten Pflanzen wurden von *anti*-VM23 Membranfraktionen von 18 % bis 34 % (w/w) Saccharose mit einem Markierungsmaximum bei 25 % (w/w) Saccharose erkannt (Abb. 3.23 A). Eine vergleichbar starke Kreuzreaktion war auch in den schwereren Fraktionen von 45 % (w/w) Saccharose und höher zu sehen. In allen erwähnten Fraktionen aus HL-gestressten Pflanzen zeigte *anti*-VM23 eine Kreuzreaktion mit einem Polypeptid mit apparenter

Molmasse von 23 kDa (die hellen Banden höherer Molmassen auf der Abbildung 3.23 A sind Artefakte der Proteinanlagerung). Im Gegensatz dazu wurden in Präparaten aus salzgestressten Pflanzen mehrere Polypeptide (130, 67, 47, 40, 32 und 23 kDa) von *anti*-VM23 markiert (Abb. 3.23 B). Nach immunologischen Untersuchungen an Aquaporinen stellen die Banden höherer Molmasse Produkte einer Oligomerisierung des VM23 dar (Maeshima, 1992; Barkla et al., 1999; Kirch et al., 2000). In den vorliegenden Studien war die Kreuzreaktion mit dem Polypeptid der Molmasse von 23 kDa wesentlich stärker im

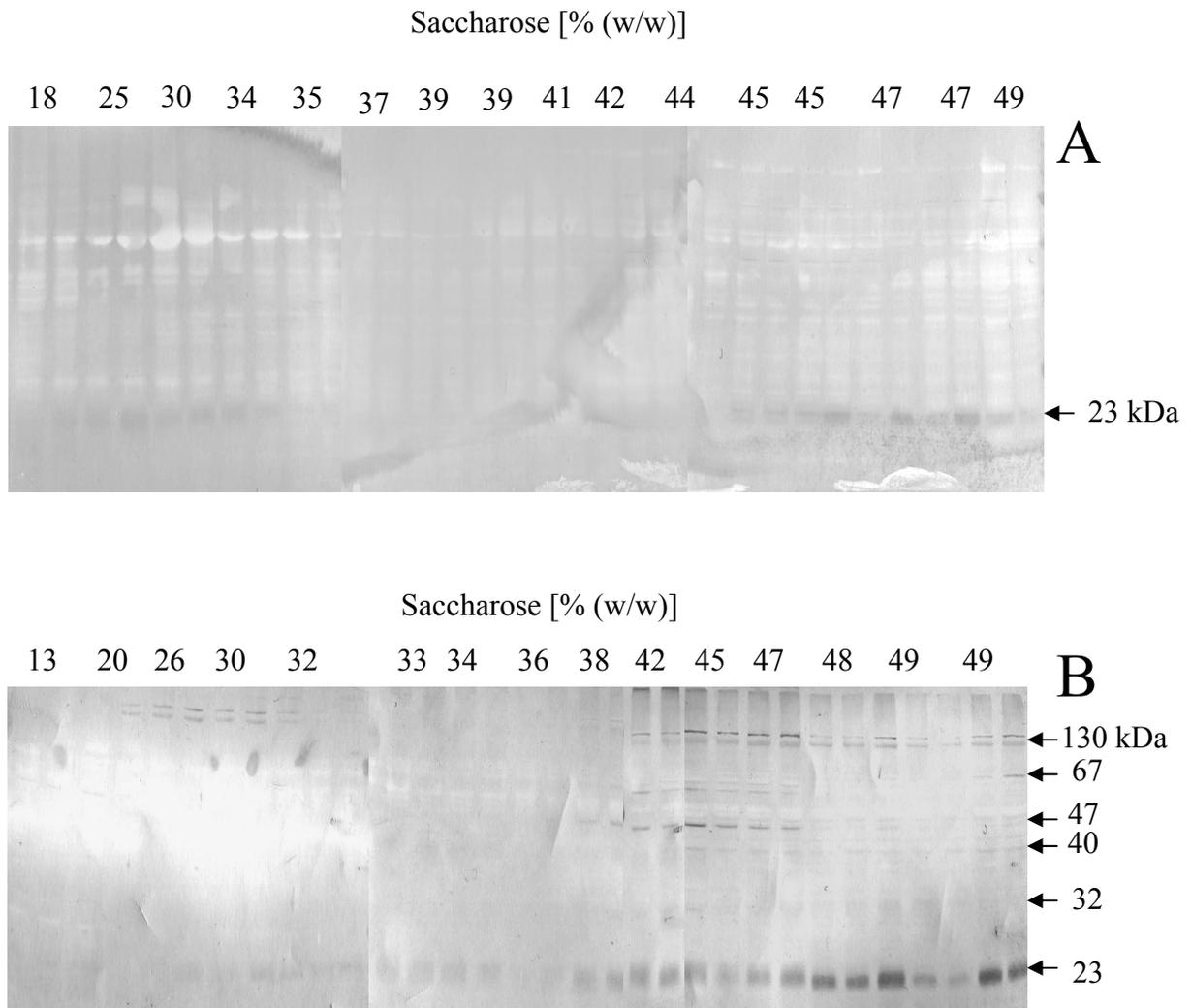


Abbildung 3.23: VM23-Immunmarkierung der Saccharosedichtefractionen:

A) Membranpräparate HL-gestresster Pflanzen, eingesetzte Proteinmenge 20 µg; die hellen Banden hoher Molmassen stellen keine immunspezifischen Reaktionen dar; B) Membranpräparate salzgestresster Pflanzen, eingesetzte Proteinmenge 20 µg; Zahlen mit Pfeilen geben Molmassen der markierten Polypeptide an.

Vergleich zu den anderen Polypeptiden und zeigte ein besonderes Verteilungsmuster: eine schwache Markierung in den Fraktionen von 26 / 34 % (w/w) Saccharose und eine wesentlich stärkere Markierung in den schweren Fraktionen ab 38 % (w/w) Saccharose und höher mit einem Maximum bei 49 %. Die Kreuzreaktion mit dem 23 kDa-Polypeptid in den schweren Fraktionen war in Präparaten aus salzgestressten Pflanzen stärker ausgeprägt als in HL-Pflanzen.

Die VM23-markierte Membranpopulation in den leichten Gradientenfraktionen der vorliegenden Untersuchungen stimmte mit der angesprochenen Tonoplastenfraktion von 25 % (w/w) Saccharose aus früheren Studien überein. Die leichten Membranfraktionen von ca. 25 % (w/w) Saccharose wurden bisher als die einzige Population der Tonoplastenvesikel angesehen, da bei diesen Dichten hohe Aktivitäten der V-ATPase und der V-PPase sowie geringe Aktivitäten der Enzymmarker anderer Membrantypen nachgewiesen wurden, z.B. der Cytochrom-c-Reduktase und der Azid-sensitiven ATPase der mitochondrialen Membran, der der Hydroxypyruvat-Reduktase von Peroxysomen, der P-ATPase des Plasmalemmas sowie der Antimycin-resistenten Cytochrome-c-Reduktase des ER (Struve und Lüttge, 1987; Jochem und Lüttge, 1987; Bremberger et al., 1988).

Die Lokalisierung der Tonoplastenaquaporine in Membranen hoher Dichte wird oft auf einen intrazellulären Membranaustausch zurückgeführt, der das Auftauchen membranspezifischer Proteine in nicht-typischen Fraktionen verursacht (Robinson et al., 1996; Kirch et al., 2000). Die vorliegenden immunologischen Studien schlossen dies nicht aus. Dennoch war die VM23-Markierung bei den hohen Saccharosekonzentrationen in HL-Präparaten vergleichbar und in Salz-Präparaten sogar stärker im Vergleich zur „echten“ Tonoplastenfraktion bei 25 % (w/w) Saccharose. Es erschien daher fraglich, ob ein intrazellulärer Membranaustausch allein zu einer so ausgeprägten VM23-Markierung in „nicht-tonoplastidären“ Membrantypen führen konnte. Aus diesen Gründen wurde die in dichten Gradientenfraktionen von ca. 48 % (w/w) Saccharose gefundene VM23-Markierung als eine Evidenz für eine nicht-einheitliche Dichte der Tonoplastenmembran von *M. crystallinum* gewertet. Außerdem kofraktionierte die VM23-Markierung in dichten Gradientenfraktionen mit AtNHX1 (siehe Kapitel 3.9.1.2) und stützte damit die hier aufgestellte Hypothese des Vorhandenseins einer zweiten Tonoplastenpopulation.

3.9.2.2 V-ATPase-Immunmarkierung

In weiteren Untersuchungen sollte die Tonoplastenidentifizierung durch den Nachweis von Untereinheiten der tonoplastidären Protonenpumpe der V-ATPase abgesichert werden.