

Der Protonentransport an der Vakuole – ein Signalschritt
zur Auslösung der Biosynthese von Benzophenanthridin-
Alkaloiden in *Eschscholzia californica*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Diplompharmazeutin

Katrin Viehweger

geboren am 13.03.1975 in Lauchhammer

1. Gutachter: Prof. Dr. Werner Roos, Halle/Saale
2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Luckner, Halle/Saale
3. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Grimm, Berlin

Halle/Saale, den 28.03.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000004901

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004901>]

Meiner Familie

*Was die Keimkraft im Samenkorn, das ist die Liebe
in uns.*

Vincent van Gogh

Wissenschaftlicher Hintergrund

1 Das pH-Signal

1.1 Mechanismen der pH-Homöostase in Pflanzenzellen	6
1.1.1 Der biochemische pH-stat	6
1.1.2 Der biophysikalische pH-stat	7
1.1.3 Interaktionen zwischen biochemischem und biophysikalischem pH-stat	8
1.2 Eigenschaften von pH-shifts, welche als Signal wahrgenommen werden	9
1.2.1 Der Signalbegriff	9
1.2.2 pH-shifts als Signale	9
1.2.3 Ca^{2+} -Signale	10
1.2.4 Unterschiede zwischen H^{+} - und Ca^{2+} -Signal	10
1.3 Charakterisierung von Protonen-shifts als Bestandteil von Signalwegen	11
1.3.1 Adaptive Änderungen der Protonenverteilung und ihre Auswirkungen	11
1.3.2 Protonengradienten	11
1.3.3 Protonen-shifts als Signalschritte in pflanzlichen Systemen	11
1.3.3.1 Pflanzliche Hormone	11
1.3.3.2 Pflanzliche Entwicklung und Wachstum	12
1.3.3.3 Hypoxie und Anoxie	13
1.3.3.4 Lichtintensität	13
1.3.3.5 Reaktionen von Pflanzenzellen auf Mikroorganismen	14
1.4 Einzelzellen als Versuchsobjekt für Messungen der Protonenverteilung	17
1.5 Zielstellung der Arbeit	18

Methoden

2 Methodenentwicklungen

2.1 Entwicklung eines in-situ-Systems durch selektive Permeabilisierung der Plasmamembran	20
2.1.1 Osmotische Behandlung	21
2.1.2 Optimierung der Medien zur Permeabilisierung der Plasmamembran	23
2.1.3 Temperatureinfluss	24
2.1.4 Entwicklung einer Präparation der permeabilisierten Zellen für die Mikroskopie	24
2.1.5 Permeabilitätsmarker zum Charakterisieren des Permeabilisierungsverfahrens	25
2.1.6 Akkumulation von pH-Sonden und pH-Messung	27
2.2 Bestimmung der intrazellulären Na⁺-Konzentration	32
2.2.1 Messungen mit Sodium Green™ in <i>Eschscholzia californica</i> ...	32
2.3 Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung verschiedener Signalereignisse in derselben Zelle	35
2.3.1 Präparation der Zellen für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	36
2.3.2 Messung der Phospholipaseaktivität	36
2.3.3 Messung des vakuolären pH-Wertes	37
2.3.4 Nachweis der Benzophenanthridinproduktion in Einzelzellen ...	39
3 Experimenteller Teil	
3.1 Zellkultur und Kultivationsbedingungen	43
3.2 Permeabilisierung von Zellen für in-situ-Transportexperimente	43
3.2.1 Durchflusszellkammer zur Mikroskopie von in-situ-Vakuolen ...	43
3.2.2 Perfusion der in-situ-Vakuolen	44
3.2.3 Medien	44

3.3 Mikroskopie	45
3.3.1 Klassische Fluoreszenzmikroskopie	45
3.3.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	46
3.3.3 Kalibrierung der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzsonden	48
3.4 Na⁺-Messung	48
3.4.1 Kalibrierung der Na ⁺ -Abhängigkeit der Sodium Green TM -Fluoreszenz	48
3.5 Multispektrale Messung von Phospholipase A-Aktivität, vakuolärem pH-Wert und Alkaloidakkumulation in intakten Einzelzellen	49
3.5.1 Präparation von Zellen	49
3.5.2 Elicitor-Behandlung der Zellen im mikroskopischen Präparat ...	50
3.5.3 Messung der Phospholipase A-Aktivität	50
3.5.4 Messung des vakuolären pH-Wertes	50
3.5.5 Messung der Alkaloidakkumulation	51
3.6 Untersuchungen der Alkaloidbiosynthese in Suspensionskulturen ..	51
3.6.1 Elicitierung der Zellsuspensionen	51
3.6.2 Extraktion und fluorimetrische Bestimmung der Benzophenanthridin-Alkaloide	51
3.6.3 Bestimmung der Trockenmasse	52
3.7 Dünnschichtchromatographie der Hydrolyseprodukte des CFDA-AM	52

Ergebnisse

4 Ionenfluxe an in-situ-Vakuolen von *Eschscholzia californica*

4.1 Charakterisierung vakuolärer Protonenfluxe in-situ	53
4.1.1 Charakterisierung der V-ATPase-Aktivität	53
4.1.2 Charakterisierung der V-PPase-Aktivität	58
4.1.3 Wechselwirkungen zwischen V-ATPase und V-PPase	61

4.1.4 Kation/Proton-Austauscher der in-situ-Vakuole	62
4.1.4.1 Ca ²⁺ /H ⁺ -Antiporter	63
4.1.4.2 Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter	63
4.2 Suche nach Hydrolyse-Produkten von Phospholipiden mit Wirkung auf den vakuolären Protonentransport	69
4.2.1 Die Beteiligung von Phospholipasen an der pflanzlichen Signaltransduktion	69
4.2.2 Spaltprodukte von Phospholipiden beeinflussen den vakuolären Protonenpool in-situ	70
4.3 Charakterisierung der Wirkung von LPC auf den vakuolären Protonentransport	75
4.3.1 Abhängigkeit von der LPC- Konzentration	75
4.3.2 Eigenschaften und Bedingungen der LPC-Wirkung auf den vakuolären pH	75
4.3.2.1 Protonenpumpen	75
4.3.2.2 Cytoplasmatische Ionen	75
4.4 Auslösung von pH-shift und Alkaloidbildung durch LPC in Ganzzellen	79
4.5 Charakterisierung der DAG-Wirkung auf den Efflux vakuolärer Protonen	80
4.5.1 Abhängigkeit des vakuolären Protoneneffluxes von der DAG- Konzentration	80
4.5.2 Mögliche Angriffspunkte von DAG am Tonoplasten	81
5 Eine Sequenz von Signalereignissen nach Elicitorkontakt in Ganzzellen von <i>Eschscholzia californica</i>	
5.1 Elicitor-ausgelöste Signalereignisse in einer Zellpopulation - statistische Untersuchungen	88

5.2 Korrelation von PLA₂-Aktivierung, pH-shift und Alkaloidbiosynthese	92
5.3 Charakterisierung des Zusammenhangs der Signalereignisse in der Mutante antisenseG_α (TG11)	94
Schlussfolgerungen	
6 Schlussfolgerungen	
6.1 Ein in-situ-System zur Untersuchung vakuolärer Transportprozesse	100
6.2 Lysolipide als Effektoren des vakuolären Protonentransports	101
6.2.1 Strukturelle Voraussetzungen für Stimulatoren des Efflux vakuolärer Protonen	101
6.3 LPC - ein neuer Effektor des Na⁺/H⁺-Austauschers?	102
6.4 Ist der LPC-stimulierte Na⁺/H⁺-Austausch ein Signalschritt zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese?	104
6.5 Niedrige und hohe Elicitorkonzentrationen initiieren verschiedene Signalwege zur Alkaloidbildung	106
7 Zusammenfassung (Inhalt der Thesen)	109
8 Literaturverzeichnis	112
9 Abkürzungsverzeichnis	129
10 Abbildungsverzeichnis und Tabellen	132

1 Das pH-Signal

1.1 Mechanismen der pH-Homöostase in Pflanzenzellen

Die Protonenverteilung einer Pflanzenzelle ist durch scharfe Gegensätze gekennzeichnet: einem cytoplasmatischen Wert um 7,4 stehen alkalische Bereiche im Stroma der Chloroplasten (bis 8,5) und typische vakuoläre pH Werte von 4,0 – 5,0 (in extremen Fällen bis 2,1 [Müller et al. 1999]) gegenüber. Diese Protonenverteilung besitzt essentielle Bedeutung für die Aufrechterhaltung zellulärer Stoffwechselfvorgänge. Vor allem der cytoplasmatische pH-Wert unterliegt einer strengen Regulation, welche über verschiedene, teilweise überlappende Mechanismen erfolgt.

Die Summe der Bestandteile, welche dissoziierbare Gruppen aufweisen (organische Säuren, Proteine), bilden die Pufferkapazitäten der Zelle bzw. ihrer Organellen.

Die Kapazität des Cytoplasmas kann in Abhängigkeit vom aktuellen pH-Wert zwischen 10 und 100 mM/pH-Einheit variieren [Kurkdjian und Guern 1989; Guern et al. 1991; Oja et al. 1999], so dass im Extremfall 10^5 Protonen erforderlich sind, um eine pH-Änderung von 7 auf 6 zu erreichen. Diese passiven Puffersysteme schützen das Cytoplasma bei rapiden pH-Änderungen vor zu starken Abweichungen vom physiologischen Kontroll-pH-Wert (siehe Abschnitt 1.2.2).

Drei Hauptpuffersysteme sind bekannt:

- 1) der $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffer ($\text{pK}_a = 6,3$) für den sauren Bereich;
- 2) der Phosphat-Puffer ($\text{pK}_a \sim 7,2$) im Neutralen;
- 3) Proteine mit freien azidischen oder basischen Aminosäure Resten [Reid und Smith 2002].

1.1.1 Der biochemische pH-stat

Der zelluläre Metabolismus weist sowohl protonengenerierende als auch -konsumierende Prozesse auf, so dass ein ständiger turnover von Protonen stattfindet. Der biochemische pH-stat beruht vor allem auf pH-abhängiger Bildung und Verbrauch organischer Säuren.

In Abhängigkeit vom aktuellen Energiestatus werden bei steigendem pH Säuren (zum Beispiel Äpfelsäure) vermehrt gebildet und bei fallendem pH vermehrt decarboxyliert.

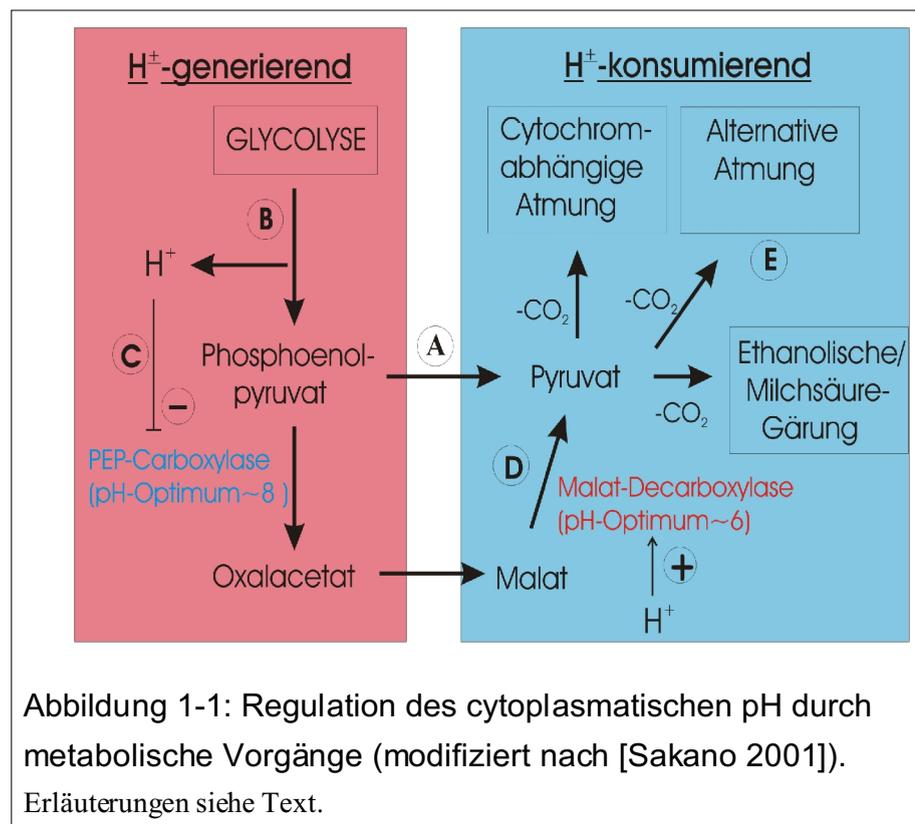
Als Erweiterung dieses klassischen pH-stat-Konzepts [Davies 1986] wurde eine präziser gesteuerte, biochemische pH-Regulation vorgeschlagen [Sakano 1998; Sakano 2001]: Sie

beruht auf einigen ausschließlich in Pflanzenzellen beobachteten, metabolischen Besonderheiten (Abb. 1-1):

1. Eine alternative glycolytische Route unter Umgehung der bekannten Pyruvat-Kinase-Reaktion (A) [Übersicht in Plaxton 1996]. Die PEP-Carboxylase fungiert dabei als Auslöser der protonengenerierenden Glycolyse, die Malat-Decarboxylase hingegen als Auslöser protonenkonsumierender Prozesse.
2. Niedrige cytoplasmatische PEP-Konzentrationen aktivieren die Glycolyse und damit eine Protonenfreisetzung (B). Fallende pH-Werte inhibieren die PEP-Carboxylase, die PEP-Konzentration steigt, die Glycolyse wird gehemmt, der pH steigt wieder (C). Bei diesen azidischen Bedingungen ist die Malat-Decarboxylase aktiviert, so dass PEP in Pyruvat umgewandelt werden kann (D).
3. Eine alternative, cyanid-resistente Form der Atmung [Vanlerberghe und McIntosh 1997] (E), welche nicht mit einer Energiegewinnung gekoppelt ist [Lance et al. 1985]. Dies eröffnet die Möglichkeit bei Überschuss an Protonen oder Redoxäquivalenten (das heißt bei drohendem "energy overflow" der Zelle) neben der cytochromabhängigen Atmung einen davon unabhängigen, protonenkonsumierenden, NADH verbrauchenden Stoffwechselweg nutzen zu können. Ist unter anaeroben Bedingungen keine Respiration möglich, können die überschüssigen Protonen über die ethanolische Gärung verstoffwechselt werden [Vanlerberghe et al. 1995, Gout et al. 2001].

1.1.2 Der biophysikalische pH-stat

Der Transport von Protonen durch Membranen ist eine weitere Möglichkeit, die intrazelluläre Protonenkonzentration zu beeinflussen [Übersichten u.a. in Kurkdjian und Guern 1989; Davies 1997; Sze et al. 1999; Reid und Smith 2002]. Die Protonenpumpen an der Plasmamembran (P-ATPase) und am Tonoplasten (V-ATPase, V-PPase) sind für eine schnelle Regulation des cytoplasmatischen pH-Wertes essentiell. Dieses System kann durch die unterschiedliche pH-Abhängigkeit der Aktivität von P-ATPase [Gout et al. 1992] und V-ATPase [Bligny et al. 1997] entsprechend den Bedürfnissen der Zelle differenziert reagieren.



Die Vakuole als der größte zelluläre Protonenspeicher weist deutlich variablere pH-Werte als das Cytoplasma auf [Kurkdjian und Guern 1989], dessen Puffermechanismen ein hohes Maß an Homöostase erlauben (vgl. oben).

Multigenfamilien, welche die P-ATPase kodieren, erlauben eine selektive Expression dieser Protonenpumpe, das heißt Anpassung an gewebespezifische Besonderheiten und an Umweltfaktoren, erreicht [Übersichten in Morsomme et al. 2000, Sze et al. 1999].

1.1.3 Interaktionen zwischen biochemischem und biophysikalischem pH-stat

Der aktuelle cytoplasmatische pH-Wert resultiert aus der Interaktion zwischen dem biochemischen und dem biophysikalischen pH-stat. Dies kommt u.a. in der zeitlichen Abfolge der zellulären Reaktionen auf pH-Änderungen zum Ausdruck: die "short-term"-Regulation beruht auf den zellulären Puffer- und Transportsystemen, die "long-term"-Regulation auf den langsameren metabolischen Prozessen [Felle 2001].

Eine enge Korrelation besteht zwischen dem ATP-Gehalt und dem pH-Wert im Cytoplasma (siehe Abschnitt 1.3.3.3) [Gout et al. 2001]. Da die Pumpaktivitäten der P- und V-ATPase entscheidend von der zur Verfügung stehenden Substratkonzentration beeinflusst werden,

besteht die Möglichkeit, in Abhängigkeit vom Energiestatus den pH-stat kurzzeitig entweder nur metabolisch oder nur biophysikalisch aufrechtzuerhalten [Sanders und Slayman 1982].

1.2 Eigenschaften von pH-shifts, welche als Signal wahrgenommen werden

1.2.1 Der Signalbegriff

In Analogie zu anderen chemischen Signalen in biologischen Systemen sollte der Signalcharakter von Ionenverschiebungen an folgenden Kriterien erkennbar sein:

1. eine Änderung der Ionenkonzentration über einen Schwellenwert (Grundzustand) hinaus,
2. kausale Verknüpfung mit Folgeereignissen und somit gezielte Übermittlung einer Information (second messenger),
3. der transiente und reversible Charakter der Konzentrationsänderung.

1.2.2 pH-shifts als Signale

Trotz der präzisen Regulation der intrazellulären Protonenverteilung können shifts der Protonenkonzentration ausgelöst werden, welche eine “messenger”-Funktion im zellulären Signaltransfer haben. Die strikte Regulation des zellulären pH setzt allerdings feste Grenzen, oberhalb derer “Abweichungen vom Normzustand” für die Zelle als Signal erkennbar werden und downstream Prozesse auslösen. Die Notwendigkeit zur Überschreitung von Schwellenwerten schützt vor permanenter Signalüberflutung durch häufig auftretende pH-Schwankungen [Roos 2002]. Weiterhin ist die Möglichkeit zur Generierung bestimmter pH-Signaturen gegeben, so dass die Zelle zwischen verschiedenen, gleichzeitig auftretenden Signalen differenzieren kann: sehr wahrscheinlich etabliert die Zelle sogenannte “pH-Landschaften” mit verschiedenen Protonenkonzentrationen in bestimmten Bereichen des Cytoplasmas, besonders in der Nähe von Membranen, wie Plasmamembran oder Tonoplast. Azidische Schichten im peripheren Cytoplasma existieren beispielsweise in *Gossypium* und in Pilzzellen, wie durch konfokale pH-Topographie nachgewiesen wurde [Roos 1992]. Die intrazelluläre Lokalisation definierter pH-Bereiche ist zum Beispiel eine entscheidende Voraussetzung für das Wachstum von Pollenschläuchen (siehe Abschnitt 1.3.3.2) [Feijo et al. 1999], charakteristische Verläufe von pH-shifts sind auch beim geotropen Wachstum bekannt [Scott und Allen 1999; Fasano et al. 2001; Johannes et al. 2001] (siehe Abschnitt 1.3.3.2).

1.2.3 Ca^{2+} -Signale

Im Gegensatz zu pH-shifts sind Signaturen der Ca^{2+} -Verteilung bereits länger als “second messenger” charakterisiert und akzeptiert. Es wurden zellspezifische, cytoplasmatische “ Ca^{2+} -fingerprints” beschrieben, mit deren Hilfe pflanzliche Zellen spezifisch auf unterschiedliche Stimuli in Form von Oszillationen, Wellen oder Spikes reagieren können [Übersichten u.a. in Rudd und Franklin-Tong 1999, Sanders et al. 1999; Malho et al. 1998; McAinsh et al. 1998; Sanders et al. 2002].

Ca^{2+} -Ionen sind an einer sehr großen Zahl von Signalkaskaden beteiligt, beispielsweise beim Öffnen/Schließen der Spaltöffnungen [Übersichten u.a. in Evans et al. 2001], bei der Wirkung pflanzlicher Hormone [Übersichten u.a. in Trewavas und Malho 1998; MacRobbie 1998] oder bei der Pathogenabwehr [Übersichten u.a. in Rudd und Franklin-Tong 1999]. Dabei wird Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, wie der Vakuole, dem endoplasmatischen Retikulum oder von cytoplasmatischen, Ca^{2+} -bindenden Proteinen, freigesetzt. Auch die Aufnahme von extrazellulärem Ca^{2+} wurde belegt [Malho et al. 1998]. Dazu sind in den Membranen der Ca^{2+} -speichernden Zellorganellen und der Plasmamembran Ca^{2+} -Kanäle integriert, welche unterschiedlichen Kontrollmechanismen unterliegen, wodurch zusätzliche Regulationsmöglichkeiten für die Zelle entstehen [Malho et al. 1998; McAinsh et al. 1998]. Am schnellsten reagieren spannungsabhängige Kanäle, welche im Verlauf von Millisekunden nach Stimulation Ca^{2+} -Ionen freisetzen [Allen et al. 1998].

1.2.4 Unterschiede zwischen H^+ - und Ca^{2+} -Signal

Protonen besitzen im Cytoplasma einen deutlich höheren Diffusionskoeffizienten als Ca^{2+} -Ionen [Malho et al. 1998]. Da sie aber über zahlreiche Homöostase-Mechanismen kontrolliert werden (vgl. oben) erfolgen pH-shifts deutlich langsamer als Ca^{2+} -shifts und haben eine geringere Amplitude.

Lokale cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentrationen können - im Gegensatz zu Protonenkonzentrationen - innerhalb kürzester Zeit um das Zehn- bis Tausendfache ansteigen. Beispielsweise basiert der Mechanismus der Pollenselektion (Verhinderung der Selbstbefruchtung) bei der Befruchtung von *Papaver rhoeas* unter anderem auf Schwankungen der Calciumkonzentration im Bereich von ca. 200 nM bis $<1,5 \mu\text{M}$ [Franklin-Tong et al. 1997; Rudd und Franklin-Tong 2003].

1.3 Charakterisierung von Protonen-shifts als Bestandteil von Signalwegen

1.3.1 Adaptive Änderungen der Protonenverteilung und ihre Auswirkungen

Eine Erhöhung der cytoplasmatischen Protonenkonzentration wurde von Sakano als ein "Schlüssel-Signal" für eine metabolische Umschaltung vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel postuliert [Sakano 2001]. Eine Azidifizierung des Cytoplasmas beobachtete man zum Beispiel während des Biosynthesezeitraumes von Anthrachinonen in *Morinda citrifolia*; von Lignin in *Petunia hybrida*, *Linum flavum* und von Coniferin in *Linum flavum*, wohingegen eine Erhöhung des pH-Wertes oft mit verminderter Sekundärstoffproduktion einherging [Hagendoorn et al. 1994]. Diese langandauernden pH-Änderungen sind eher Anpassungen der Zelle an neue metabolische Bedingungen und stellen somit keine Signale im eigentlichen Sinne dar (vgl. Abschnitt 1.2.1).

1.3.2 Protonengradienten

Intrazelluläre pH-Gradienten können durch kurzzeitige Verschiebungen der ihnen zugrunde liegenden Fluxgleichgewichte zur Generierung von pH-shifts genutzt werden. Dabei sind nicht nur Gradienten zwischen einzelnen Zellorganellen, wie Vakuole und Cytoplasma, von Bedeutung, sondern auch Unterschiede in der lokalen Protonenkonzentration eines Organells, zum Beispiel weisen die Thylakoide der Chloroplasten Protonengradienten auf, welche als Teil des Schutzmechanismus gegenüber intensivem Lichteinfluss wirken [Ewy und Dilley 2000]. Im Cytoplasma von *Penicillium cyclopium* wurde eine periphere, azidische neben einer inneren, neutralen Schicht lokalisiert [Roos und Slavik 1987]. In der Wachstumsrichtung vegetativer Hyphen des gleichen Pilzes existiert außerdem ein cytoplasmatischer pH-Gradient, wobei die Spitze am stärksten sauer ist [Roncal et al 1993]. Dieser Gradient ist für das apikale Spitzenwachstum notwendig, da nach seiner Zerstörung und nachfolgender Alkalisierung des Cytoplasmas statt des Spitzenwachstums verstärkte Konidienbildung stattfindet.

1.3.3 Protonen-shifts als Signalschritte in pflanzlichen Systemen

1.3.3.1 Pflanzliche Hormone

Die durch pflanzlicher Hormone ausgelösten Signalkaskaden benutzen in vielen Fällen Protonen-shifts als intermediäre Signale.

Ein bekanntes Beispiel dafür ist der Antagonismus von Auxin und Abscisinsäure bei der

Regulation des Öffnens und Schließens der Spaltöffnungen. Auxin induziert in kleinen Konzentrationen ($<100 \mu\text{M}$) eine Erniedrigung des cytoplasmatischen pH-Wertes, wahrscheinlich unter Beteiligung der Vakuole [Frohnmeier et al. 1998]. Diese Azidifizierung führt zu einer Aktivierung einwärts gerichteter K^+ -Kanäle und zum Öffnen der Spaltöffnungen [Grabov et al. 1997; Irving et al. 1992; Gehring et al. 1990]. Abscisinsäure bewirkt im Gegensatz dazu eine Alkalisierung des Cytoplasmas, die zu einem K^+ -Efflux durch Aktivierung zellauswärts gerichteter K^+ -Kanäle führt. Die Folge ist das Schließen der Stomata [Irving et al. 1992; Gehring et al. 1990; Blatt et al. 1993].

Barkla et al. [1999] konnten in *Mesembryanthemum crystallinum* nach Applikation von Abscisinsäure zu isolierten Tonoplastenvesikeln eine Aktivierung der V-ATPase zeigen. Der durch Wasserdefizit ausgelöste Konzentrationsanstieg dieses Hormons in der Ganzpflanze steigert die Transportaktivität der V-ATPase um das ca. 1,7 – 1,9-fache. Damit wird u.a. die Malat-Akkumulation in der Vakuole während der Etablierung des CAM-Stoffwechsels beschleunigt.

Ein transienter Abfall des cytoplasmatischen pH-Wertes wurde nach Gabe von Gibberellinsäure zu Korn-Coleoptile-Zellen gemessen [Gehring et al. 1994]. Dieser ist vermutlich eine Voraussetzung für die Aktivierung vakuolärer Proteasen, welche Speicherproteine aktivieren [Swanson et al. 1996].

1.3.3.2 Pflanzliche Entwicklung und Wachstum

Zeitlich und räumlich kontrollierte Protonengradienten sind für zahlreiche weitere pflanzliche Anpassungsprozesse essentiell. Diese belegen u.a. folgende Beispiele:

- Geotropismus

In Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* beobachteten Fasano et al. [2001] ein striktes pH-Profil in Abhängigkeit von der Wachstumszone. Nach gravitroper Stimulation reagiert die gesamte Elongationszone innerhalb von Minuten mit einer transienten Azidifizierung der Zellwand, welche verstärkt an der Wurzeloberseite auftritt. Die gravitrope Information zur Neuorientierung des Wachstums wird wahrscheinlich durch eine transiente Alkalisierung des Cytoplasmas der zentralen Columella übertragen. Erwartungsgemäß konnte durch einen artifiziellen Protonenanstieg mittels eines in das Cytoplasma eingebrachten und durch UV-Licht-gespaltenen Nitrophenylethylester dieser Mechanismus blockiert werden.

- Spitzenwachstum

Ein Muster von lokal begrenzten Protonengradienten ist auch für das Spitzenwachstum erforderlich. So treten in *Lilium longiflorum* deutliche pH-Profile sowie daraus resultierende Protonenkreisläufe entlang wachsender Pollenschläuche auf [Feijo et al. 1999; Übersicht in Feijo et al. 2001]. Eine ATPase, lokalisiert in der Membran des Pollenkornes, pumpt Protonen nach außen, welche jedoch sofort wieder in die sich daran anschließenden Regionen des Pollenschlauchs einströmen. Entgegen der Wachstumsrichtung nimmt der Einstrom ab und kehrt sich schließlich um, wodurch ein "alkalisches Band" im Cytoplasma entsteht. Ein azidisches Milieu in der Pollenschlauchspitze wird durch die Anhäufung von unspezifischen, dehnungsabhängigen Ionenkanälen [Pierson et al. 1996] erreicht. Durch diesen Protonengradienten entsteht ein "Reaktions-Diffusions-System", welches u.a. Einfluss auf die Polymerisation/Depolymerisation von Actinfilamenten nimmt.

1.3.3.3 Hypoxie und Anoxie

Pflanzen haben ihren Metabolismus im Laufe der Evolution an den O₂-Gehalt der Atmosphäre angepasst. Verschiedene Signalwege, in die auch Protonen-shifts integriert sind, sorgen für eine rasche Anpassung an das veränderte O₂-Angebot.

In *Acer pseudoplatanus*-Zellsuspensionskulturen wurde innerhalb von 4 – 5 Minuten nach Austausch von O₂ gegen N₂ eine deutliche Erniedrigung des Nukleosid-Triphosphat-Pools gemessen (³¹P- und ¹³C-NMR-Spektroskopie) [Gout et al. 2001]. Diese ist auf eine verstärkte Hydrolyse der energiereichen Nukleotide unter Freisetzung von Protonen zurückzuführen, deshalb fällt parallel der cytoplasmatische pH-Wert von 7,5 auf 6,8. Ein weiterer Grund für die Azidifizierung ist die Inhibition der P-ATPase durch Ca²⁺-Ionen, welche aus ihren intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Der pH-shift induziert die ethanolische Fermentation, so dass auch unter anoxischen Bedingungen die Versorgung der Zelle mit energiereichen Nukleosid-Triphosphaten gewährleistet wird. Deren Konzentration steigt ca. 15 Minuten nach beginnender Anoxie parallel mit dem pH-Wert wieder an.

1.3.3.4 Lichtintensität

Pflanzenzellen reagieren auf Änderungen der Lichtintensität mit verschiedenartigen Protonen-shifts. Ein Beispiel dafür ist die von Yin et al. [1990] beschriebene lichtabhängige Alkalisierung des Cytoplasmas und gleichzeitige Azidifizierung der Vakuole in

Mesophyllzellen von *Hordeum vulgare* oder *Spinacia oleracea*. Den umgekehrten Effekt kann man bei Dunkelheit beobachten. Als Konsequenz der steigenden Protonenkonzentration wurde von Felle und Bertl [1986] eine Stimulation der P-ATPase beobachtet, gefolgt von einer transienten Hyperpolarisation der Plasmamembran. Auslöser dieser pH-Änderungen sind vermutlich schnelle, lichtabhängige Protonenbewegungen über Thylakoidmembranen [Hansen et al. 1993].

1.3.3.5 Reaktionen von Pflanzenzellen auf Mikroorganismen

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise haben Pflanzenzellen spezielle Mechanismen zur Kommunikation und Interaktion mit der sie umgebenden Umwelt, einschließlich der mikrobiellen Flora, entwickelt. Bei den dazu notwendigen Signaltransduktionswegen spielen intrazelluläre Protonen-shifts eine essentielle Rolle, beispielsweise bei der Diskriminierung zwischen symbiotischen und pathogenen Mikroorganismen.

Wurzelhaarzellen von *Medicago sativa* reagieren auf die Applikation von N-Acetylchitooligosacchariden (GlcNAc)₈ mit Abwehrreaktionen, der Kontakt mit Lipochitooligosacchariden (Nod-Faktoren) ist dagegen ein Signal zur Vorbereitung der Symbiose zwischen Mikroorganismus und Leguminose [Felle et al. 2000]. Für diese gegensätzlichen Zellantworten werden gleiche Signalkomponenten benutzt, zum Beispiel die transiente Alkalisierung des Außenmediums, cytoplasmatische pH-shifts oder die Depolarisation der Plasmamembran. Die Differenzierung dieser Signale und ihre Umsetzung in spezifische Antwortreaktionen erfolgt u.a. durch eine bestimmte zeitliche Abfolge der oben genannten Ereignisse, welche auch die gleichzeitige Prozessierung von Signalen mit unterschiedlichen Inhalten, zum Beispiel zur Pathogenabwehr oder zur Symbiose, ermöglicht. Die Symbiose (ausgelöst durch Nod-Faktoren) löst eine schnelle cytoplasmatische Alkalisierung aus, wodurch die P-ATPase-Aktivität an der Plasmamembran reduziert wird. Im Gegensatz dazu wird im Abwehrfall (ausgelöst durch (GlcNAc)₈) das Cytoplasma langsam azidifiziert, wobei hier eine transiente Alkalisierung des Außenmediums und eine Depolarisation der Plasmamembran beobachtet werden kann. Der cytoplasmatische pH-Abfall stimuliert in diesem Falle jedoch die ATPase, was zu einem schnellen Wiederherstellen des Ausgangs-pH-Wertes im Cytoplasma führt. Die durch Nod-Faktoren ausgelöste persistente cytoplasmatische Alkalisierung ist wahrscheinlich ein zellulärer Schutzmechanismus vor Abwehrreaktionen gegen den Symbiosepartner [Felle et al. 2000;

pH-Signale unterschiedlichen Charakters sind an mehreren Reaktionen der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligt. Die meisten gehen von Elicitor-spezifischen Rezeptoren aus [Übersichten u.a. in Boller 1995 oder Cervone et al. 1997; Okada et al. 2002].

In Zellsuspensionen von *Nicotiana tabacum* verursachen Oligogalakturonid-Elicitoren (Polymerisationsgrad > 6) eine cytoplasmatische Ansäuerung [Mathieu et al. 1996]. In Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad zeigen die Elicitormoleküle spezifische Intensitäten und Kinetiken des pH-Abfalls. Dagegen löst ein Hepta- β -glucosid in diesen Zellen weder einen pH-shift noch eine Zellantwort aus, obwohl dieselbe Verbindung in *Glycine max* wirksam ist.

Die Quelle der im Cytoplasma transient auftretenden Protonen ist wahrscheinlich das Außenmedium. Dafür spricht die lineare Relation der Amplitude des pH-shifts zum pH-Gradienten zwischen Außenmedium und Cytosol.

Die oben genannten Arbeiten mit *Nicotiana tabacum* waren der erste experimentelle Hinweis auf die Beteiligung von Proteinphosphorylierungen noch vor dem pH-shift.

Ähnliche Befunde kommen aus *Oryza*-Zellkulturen, wo ein Serin/Threonin-Kinase-Inhibitor (K-252a) die cytoplasmatische Ansäuerung und die Erhöhung der mRNA-Transkript-Level verhindert. Eine Applikation des Hemmstoffes nach erfolgter experimenteller Ansäuerung blieb wirkungslos [He et al. 1998]. Somit scheint auch die durch (GlcNAc)₇-induzierte Azifidizierung des Cytoplasmas, einem Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsmechanismus zu unterliegen.

Eine Korrelation von cytoplasmatischer Ansäuerung und der Auslösung einer Phytoalexinbiosynthese nach Kontakt mit N-Acetylchitooligosacchariden ist aus Zellsuspensionskulturen von *Oryza sativa* bekannt [Kuchitsu et al. 1997].

Konkrete Folgeereignisse, welche durch den pH-shift ausgelöst werden, sind nur spärlich bekannt. In *Nicotiana*-Zellkulturen wurden unter folgenden Bedingungen jeweils steigende mRNA-Transkript-Level der Phenylalaninammoniumlyase (PAL) und der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym-A-reductase (HMGR) gemessen:

1. Elicitorkontakt (Oligogalakturonide);

2. Akkumulation von Propionsäure;
3. Hemmung der P-ATPase an der Plasmamembran mit Erythrosin B;
4. Aufnahme von Phosphat aus sauren Lösungen [Lapous et al. 1998].

Es wurde ein prinzipieller Zusammenhang zwischen dem Abfall des cytoplasmatischen pH (gemessen über die Aufnahme von ^{14}C -Benzoessäure) festgestellt. Allerdings führten nur transiente pH-shifts zu der Überexpression, eine über zwei bis drei Stunden dauernde cytoplasmatische Ansäuerung löste kaum erhöhte Transkript-Level aus. Dies zeigt, dass pH-shifts einer bestimmten Länge oder Amplitude bedürfen, um als Signal wahrgenommen zu werden (pH-Signatur, vgl. Abschnitt 1.2.2).

Genaktivierungen (für PAL und die nicht identifizierten Gene EL1 und EL2) nach transienten pH-Abfall im Cytoplasma sind auch aus *Oryza sativa* bekannt [He et al. 1998]. Als Auslöser fungieren hier N-Acetylchitooligosaccharide oder eine artifizielle Erhöhung der cytoplasmatischen Protonenkonzentration durch Propionsäure oder Buttersäure.

Eine Aktivierung von MAP-Kinasen nach transients Erniedrigung des pH-Wertes im Cytoplasma um mehr als 0,4 Einheiten, ausgelöst durch Auxin, Butter- oder Essigsäure, wurden von Tena und Renaudin [1998] in *Nicotiana tabacum* gemessen. Ähnliche Ergebnisse fanden Lebrun-Garcia et al. [2002] nach Applikation von Cryptogein oder schwachen Säuren, wie Salicylsäure zu Suspensionskulturen in der gleichen Spezies.

Während bei den bisher vorgestellten experimentellen Systemen ein Elicitorkontakt zu einer cytoplasmatischen Ansäuerung (und weiteren Reaktionen) führte, kann in *Glycine max* mit Oligogalakturoniden des Polymerisationsgrades von ~ 12 (welche jedoch oxidative burst und hypersensitive Reaktion auslösen) kein signifikanter cytoplasmatischer pH-shift beobachtet werden. Auch die vakuoläre Protonenkonzentration bleibt nahezu konstant [Horn et al. 1992]. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden:

1. eine relativ geringe Messempfindlichkeit oder pH-shifts geringer Amplitude (die ^{31}P -NMR-Spektroskopie besitzt eine ausreichende Sensitivität für shifts $>0,2$ pH-Einheiten [He et al. 1998; Kuchitsu et al. 1997]),
2. Es wurden Messungen mit pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffen (DCCF, DCMF) durchgeführt, wobei die Fluoreszenzintensität in der Gesamtsuspension an einem

Fluorimeter erfasst wurde. Die dabei erhaltenen Daten spiegeln eine Durchschnittsprotonenkonzentration von Cytoplasma, Vakuole und Außenmedium wider. Die für die Signaltransduktion notwendigen pH-shifts zwischen den Kompartimenten, das heißt ohne Änderungen der "Gesamtprotonenkonzentration" in der Zelle, werden dabei nicht oder nur sehr eingeschränkt erfasst.

Bei den bisher vorgestellten Untersuchungsobjekten kommen durch Elicitorkontakte ausgelöste pH-shifts offenbar durch den Einstrom externer Protonen, das heißt aus dem Apoplasten in das Cytoplasma, zustande.

In den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen von *Eschscholzia californica* werden dagegen Elicitor-ausgelöste pH-shifts gemessen, welche durch einen Efflux vakuolärer Protonen zustande kommen. Zellsuspensionskulturen von *Eschscholzia* reagieren auf einen Hefeelicitor mit der Biosynthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden. Unmittelbar nach Elicitorkontakt kommt es zu einer Azidifizierung des Cytoplasmas, welche von einer parallelen Alkalisierung der Vakuole begleitet ist. Eine Zerstörung des pH-Gradienten zwischen Vakuole und Cytoplasma durch Methylamin-Akkumulation in der Vakuole verhinderte den elicitorausgelösten pH-shift und die nachfolgende Alkaloidbildung.

Messungen der Protonenverteilung mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie erbrachten ein etwa konstantes Verhältnis des H^+ -Verlaufs in der Vakuole und dem H^+ -Anstieg im Cytoplasma: für etwa 10 aus der Vakuole austretende Protonen taucht ein freies Proton im Cytoplasma auf [Roos et al. 1998].

Der grundsätzliche Signalcharakter der cytoplasmatischen Ansäuerung kann wie in den oben genannten Systemen durch die Auslösung der Alkaloidbiosynthese durch Buttersäure gezeigt werden.

1.4 Einzelzellen als Versuchsobjekt für Messungen der Protonenverteilung

Aus den bisher vorgestellten Beispielen kann vermutet werden, dass das "pH-Signal" nicht in einer bloßen pH-Änderung des Cytoplasmas besteht, sondern an eine bestimmte räumliche und zeitliche Verteilung gebunden ist. In naher Zukunft ist die Auffindung von pH-Signaturen zu erwarten, welche ähnlich den besser bekannten Ca^{2+} -Signaturen bestimmten Primärsignalen zugeordnet werden können. Erste Hinweise darauf, dass eine bestimmte Amplitude und Dauer Voraussetzung für den Signalcharakter von pH-shifts sind, finden sich

auch in dieser Arbeit (siehe Abschnitte 5.2; 6.4 und 6.5).

Zur Messung potentieller pH-Signale wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit keine Durchschnitts-pH-Werte herangezogen, sondern die pH-Verteilung innerhalb intakter Zellen bzw. der Austritt von Protonen aus Vakuolen. Neben der räumlichen sollte auch die zeitliche Verteilung des pH-Signals in Minuten-Auflösung erfasst werden.

Diese Anforderungen lassen sich nicht mit Methoden erfüllen, welche entweder "Mittelwerte" verschiedener Zellkompartimente abbilden oder erheblichen Stress auf die zu untersuchenden Zellen ausüben. Letzteres gilt zum Beispiel für die ^{31}P -NMR, welche die pH-abhängige Verschiebung des chemischen shifts von Phosphat bzw. Phosphorsäureestern auswertet, die im Cytoplasma oder der Vakuole lokalisiert sind. Auch die Messung mit pH-sensitiven Mikroelektroden, die entweder in das Cytoplasma oder in die Vakuole eingeführt werden, kann nicht völlig von der Zellantwort auf den Verwundungsreiz bereinigt werden und misst überdies den pH-Wert nur an der (ungenau lokalisierbaren) Spitze der Messelektrode.

Im Gegensatz zu diesen Verfahren erlaubt die Fluoreszenzmikroskopie das mapping des pH-Wertes, das heißt die Topographie lokaler pH-Werte in einer intakten Zelle ohne wesentliche Beeinträchtigungen ihrer Lebensfähigkeit. Bei Benutzung des konfokalen Mikroskops können dabei auch definierte optische Schnittebenen mit der Auflösung des Lichtmikroskops sichtbar gemacht werden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die pH-Topographie als Standardmethode zur Messung transienter pH-shifts verwendet, wobei sowohl konfokale als auch klassische Fluoreszenzmikroskopie angewendet wurde.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Zellsuspensionskulturen von *Eschscholzia californica* reagieren auf den Kontakt mit einem Pilz-Elicitor (Glycoprotein-Präparat aus Bäckerhefe) mit der Biosynthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden. Zentraler Punkt der bisher identifizierten intrazellulären Signalkette ist eine transiente cytoplasmatische Azidifizierung, welche auf einem Efflux vakuolärer Protonen beruht [Roos et al.1998, Roos et al. 1999] (vgl. Abschnitt 1.3.3.5). Diesem Effekt geht die Aktivierung einer Phospholipase A₂ (PLA₂) voraus.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, Mechanismen der Auslösung vakuolärer Protonenfluxe und ihre Einbeziehung in den Signaltransfer zur Alkaloidbiosynthese aufzustellen. Dazu wurden folgende Schwerpunkte untersucht:

1. der Einfluss von Phospholipid-Hydrolyseprodukten auf den vakuolären pH-Wert. Als Voraussetzung für derartige Untersuchungen mussten auf zwei Arbeitsgebieten der Zellbiologie methodische Neuentwicklungen unternommen werden:
 - a. selektive Permeabilisierung der pflanzlichen Plasmamembran zur Untersuchung des vakuolären Transportes in-situ;
 - b. die mikroskopische Quantifizierung von zwei Fluoreszenzsonden und der Benzophenanthridin-Alkaloide in derselben Zelle.
2. Wirkungsmechanismen potentieller Effektoren auf den Protonen-Transport am Tonoplasten;
3. Prüfung von Korrelationen zwischen den elicitorausgelösten Signalereignissen:
 - a. Aktivierung einer Phospholipase A₂ (PLA₂),
 - b. pH-shift an der Vakuole,
 - c. Anstieg der Alkaloidproduktion in derselben Ganzzelle.

2 Methodenentwicklungen

2.1 Entwicklung eines in-situ-Systems durch selektive Permeabilisierung der Plasmamembran

Zur Untersuchung von Protonenfluxen am Tonoplasten sind unterschiedliche experimentelle Systeme entwickelt worden, zum Beispiel die Präparation von Tonoplastenvesikeln [Kringstad et al. 1980; Tu et al. 1990; Facanha et al. 1998] oder die Isolation von Vakuolen [Dürr et al. 1975; Kreis und Reinhard 1985; Johannes und Felle 1989; Dietz et al. 1990]. In beiden Verfahren wird die Vakuole von ihrer cytoplasmatischen Umgebung getrennt. Es können Präparations-Artefakte entstehen, weil die Vakuolen den Kontakt zu Makromolekülen des Cytoplasmas verlieren. Derartige Interaktionen werden offenbar für mehrere, wichtige Funktionen des Tonoplasten benötigt.

Spezifische cytosolische Proteine regulieren vakuoläre Funktionen [Marty 1999; Venema et al. 2002], beispielsweise können 14-3-3-Proteine SV-Kanäle am Tonoplasten beeinflussen [van den Wijngaard et al. 2001], Tyrosin-Phosphatasen sind an der Regulation von K⁺-Kanälen beteiligt [Luan 2002]. Vakuoläre Transporter werden u.a. durch Dissoziation/Reassoziation ihrer Untereinheiten reguliert [Yoshida 1991; Kane 1995], der Kontakt mit cytoplasmatischen Makromolekülen ist kritisch für die Aufrechterhaltung der Transportkapazität des Tonoplasten für Aminosäuren in *Penicillium cyclopium* [Roos et al. 1997].

In einem in-situ-System sollte die Vakuole für Mikromoleküle zugänglich gemacht, jedoch in ihrer makromolekularen, cytoplasmatischen Umgebung belassen werden. Dadurch sind bei Erhalt der Integrität des Tonoplasten weiterhin Interaktionen zwischen Proteinen, Organellen des Cytoplasmas und Transportsystemen der Vakuole möglich. Die Integrität des Tonoplasten ist eine Voraussetzung für die Aktivität von Membranenzymen. (Ein grundlegender Zusammenhang zwischen Membranstruktur und der Aktivität eingebetteter Proteine ergibt sich zum Beispiel aus deren Integration in spezifischen Lipid-Mikrodomänen [Delrot et al. 2000].)

Des weiteren lässt die Anwesenheit der Zellwand und des Cytoskeletts bei der in-situ-Methode einen stabilisierenden Einfluss auf die volumenreiche Zentralvakuole erwarten.

Die Möglichkeit von Protein-Interaktionen in der selektiv permeabilisierten Zelle ist auch ein Vorteil gegenüber der Expression von Transportern in heterologen Systemen, wie in *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* [Barbier-Brygoo et al. 2001].

Ziel des im Folgenden beschriebenen Verfahrens ist die Präparation von in-situ-Vakuolen, deren H⁺-Transportsysteme funktionsfähig bleiben. Die Stabilität ihrer Transportfunktionen sollte Experimente über mindestens eine Stunde erlauben.

2.1.1 Osmotische Behandlung

Bisher bekannte Verfahren zur Permeabilisierung der Plasmamembran basieren zumeist auf der Verwendung von Detergenzien, wie dem Saponin Digitonin [Lequoc et al. 1987; Meiners et al. 1991]; CTAB [Gowda et al. 1991] oder Pluronic F-68 [Laouar et al. 1992]. Diese Verbindungen stören aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften die Integrität von Membranen, wobei nur Digitonin eine gewisse Selektivität gegenüber der Plasmamembran aufweist. Eine Inkorporation der Tenside in den Tonoplasten kann nicht ausgeschlossen werden, so dass die Untersuchung vakuolärer Transportvorgänge mit solchen Präparationen keine zuverlässigen Ergebnisse erbringt.

Permeabilisierungsversuche mit Digitonin in *Eschscholzia californica* zeigten in der Tat erhebliche Instabilitäten des Tonoplasten [Lohse 1998].

Aus diesem Grunde wurde ein Detergens-freies Verfahren entwickelt, welches die Plasmamembran von *Eschscholzia californica* durch osmotische Schocks selektiv permeabilisiert [Viehweger 1998]. Dazu wurden Zellsuspensionskulturen zunächst einer Plasmolyse durch ein hypertonisches Medium unterworfen. Nachfolgend erfolgte eine Deplasmolyse durch ein zur Vakuole nahezu isotones Medium (Abb. 2-1, siehe Abschnitt 3.2.3), das heißt ein Medium, in dem sich das durchschnittliche Vakuolenvolumen etwa auf die Werte der Ganzzelle einstellte. Dabei schrumpften zunächst die Zellmembranen, welche im zweiten Schritt in eine Dehnung übergingen. Als Ergebnis kam es zum "Zerreißen" der Plasmamembran (Kriterien siehe Abschnitte 2.1.5 und 2.1.6). Somit erfolgte eine kontrollierte Plasmolyse, wobei mikroskopische Untersuchungen eine durch Wasserverlust schrumpfende Vakuole bei etwa konstantem cytoplasmatischem Volumen zeigten (Abb. 2-1B). Dessen Konstanz ist ein Schutzmechanismus zur Aufrechterhaltung essentieller Strukturen im Cytoplasma [Barrieu et al. 1999], welche deshalb auch in den permeabilisierten Zellen noch vorhanden waren.

Die Fluidität und Elastizität des Tonoplasten ist höher als die der Plasmamembran, da er ein geringeres molares Verhältnis von rigiden Sterolen zu Phospholipiden (Tonoplast: 0,54;



Abbildung 2-1: Visualisierung des Permeabilisierungsverfahrens zur Herstellung von in-situ-Vakuolen.

Die Zellen wurden 30 min mit 50 nM CFDA-AM vorinkubiert (siehe 3.2). In allen Fällen wurden zusätzlich 2 μ M Propidiumjodid den Außenmedium zugesetzt.

(A) Intakte Zellen;

(B) Zellen nach Behandlung mit Medium 1 (600 mOsmol; Zusammensetzung Medium 1 siehe 3.2.3), Fluoreszenzaufnahme und Durchlichtbild überlagert;

(C) Zellen nach Durchlaufen des Permeabilisierungsverfahrens; permeable Zellen (in-situ-Vakuolen (V); Cytoplasma mit Zellkern, Propidiumjodidfärbung (C/K); Zellen mit defektem Tonoplasten, erkennbar an der fehlenden CF-Akkumulation in der Vakuole (T). Bildaufnahmen nach 3.3.1 (ch1).

Plasmamembran 0,89) besitzt [Yoshida et al. 1986]. Deshalb sollte er bei dieser osmotischen Behandlung intakt bleiben.

Ein weiterer Grund für die flexible Reaktion der Vakuole auf osmotischen Stress liegt in der größeren Anzahl von Aquaporinen im Tonoplasten [Barrieu et al. 1999], so dass dieser eine im Vergleich zur Plasmamembran 20 – 100-fach höhere Wasserpermeabilität aufweist [Maurel et al. 1997; Niemietz und Tyerman 1997].

Durch mehrfaches Resuspendieren der Zellen nach der Permeabilisierung der Plasmamembran und Perfusion mit einem “künstlichem Cytosol” (siehe Abschnitt 3.2.3) sollten eventuell freigesetzte Stress-Signale, wie Ca^{2+} , Fettsäuren, Lysophosphatidsäure oder Anionen, akkumuliert durch Aktivierung mechanosensitiver Anionenkanäle [Meijer et al. 2001; Shabala und Newman 1998; Übersicht in Munnik und Meijer 2001], ausgewaschen werden.

2.1.2 Optimierung der Medien zur Permeabilisierung der Plasmamembran

Um hohe Permeabilisierungsraten bei möglichst geringer Beeinflussung der vakuolären Transportvorgänge zu erreichen, war es notwendig, die verwendeten Medien zu optimieren. Für die Stabilität der in-situ-Vakuolen ist eine K^+ -Konzentration von mindestens 70 mM erforderlich, kleinere Konzentrationen führen zum Platzen der Vakuole. Für physiologische Transportvorgänge am Tonoplasten ist die Ionenverteilung zwischen dem Cytosol und dem vakuolären Medium essentiell [Serrano et al. 1999], so dass diese den Ionenverhältnissen der intakten Zelle anzupassen ist. Nach mehreren Variationen erwiesen sich 100 mM KCl plus 10 mM NaCl als optimal. Der cytoplasmatische pH-Wert liegt von 7,4 [Roos et al. 1998] wurde in den verwendeten Medien mit Hilfe der Puffer HEPES oder MOPS-BTP konstant gehalten. Ein Hemmstoff der Cytochromoxidase, KCN (100 μM), verlängerte die Lebensfähigkeit der permeablen Zellen nach der Permeabilisierung. Dies spricht für eine auch nach der Zerstörung der Plasmamembran noch vorhandenen mitochondrialen Stoffwechselaktivität, welche Moleküle mit toxischer Wirkung auf den Tonoplasten erzeugt. Auch der Zusatz von 5 mM Glutathion (GSH) zu den Medien verbesserte deutlich die Ausbeute und Stabilität an funktionsfähigen in-situ-Vakuolen, wahrscheinlich durch die Reduktion auftretender toxischer Oxidationsprodukte. Die gleiche Wirkung zeigte 2 mM Ascorbat im Perfusionsmedium.

Da während der Permeabilisierung die Membranen sehr stark beansprucht werden, können vermehrt Fettsäuren als Stressmetabolite auftreten, zu deren Bindung RSA verwendet wurde. Dieser Zusatz bewirkte ebenfalls eine Verlängerung der Perfusionszeit.

2.1.3 Temperatureinfluss

Die osmotische Behandlung wurde bei 13 °C durchgeführt, um den zellulären Stoffwechsel zu verlangsamen und somit eine Anhäufung von Stressmetaboliten zu vermeiden. Damit blieben deutlich mehr Vakuolen während des Beobachtungszeitraumes stabil als nach einer Permeabilisierung bei 24 °C.

Der größte Teil der Zellen ging in den permeablen Zustand über, nachdem die Temperatur von 13 °C wieder auf ca. 22 °C erhöht wurde (insgesamt ~ 70 %).

Man kann annehmen, dass dieses Phänomen durch einen thermisch induzierten Phasenübergang, den die Lipid-Bilayer biologischer Membranen durchlaufen, hervorgerufen wird. Wird die Phasenübergangstemperatur (meist zwischen 14 °C und 18 °C) überschritten, geht die Konformation der Fettsäureketten von der rigiden all-trans- in die gauche-Form über, so dass die Ketten, flexibel gefaltet, einen flüssig-kristallinen Zustand bilden [McElhaney 1994]. Dieser erleichtert offenbar die Desintegration der Plasmamembran.

2.1.4 Entwicklung einer Präparation der permeabilisierten Zellen für die Mikroskopie

Nachdem die Zellen das Permeabilisierungsverfahren durchlaufen hatten, wurden sie in eine zum Mikroskopieren geeignete Zellkammer eingebracht. Die vorgesehenen mikroskopischen Messungen stellten einige Anforderungen an die Präparate:

1. möglichst viele permeable Zellen sollten in einer Ebene zum Objektiv liegen,
2. eine große Spreitung der Zellsuspension, um möglichst viele, einzeln beobachtbare Zellen zu erreichen,
3. die Versorgung der Zellen mit Nährmedium über eine Perfusion, um Messungen über längere Zeiträume zu ermöglichen und um verschiedene Effektoren auf nicht-invasive Weise an die Zellen zu bringen.

Diese Bedingungen wurden mit Hilfe einer Perfusionszelle erreicht, wobei die Zellen in eine dünne Agaroseschicht eingebettet wurden (siehe Abschnitt 3.2.1). Durch das Agarosegel fixierte man die Zellen zugleich an ihrem Ort, so dass eine Perfusion ohne Bewegung der Zellen durchgeführt werden konnte. Die Erreichbarkeit der eingebetteten Zellen für das

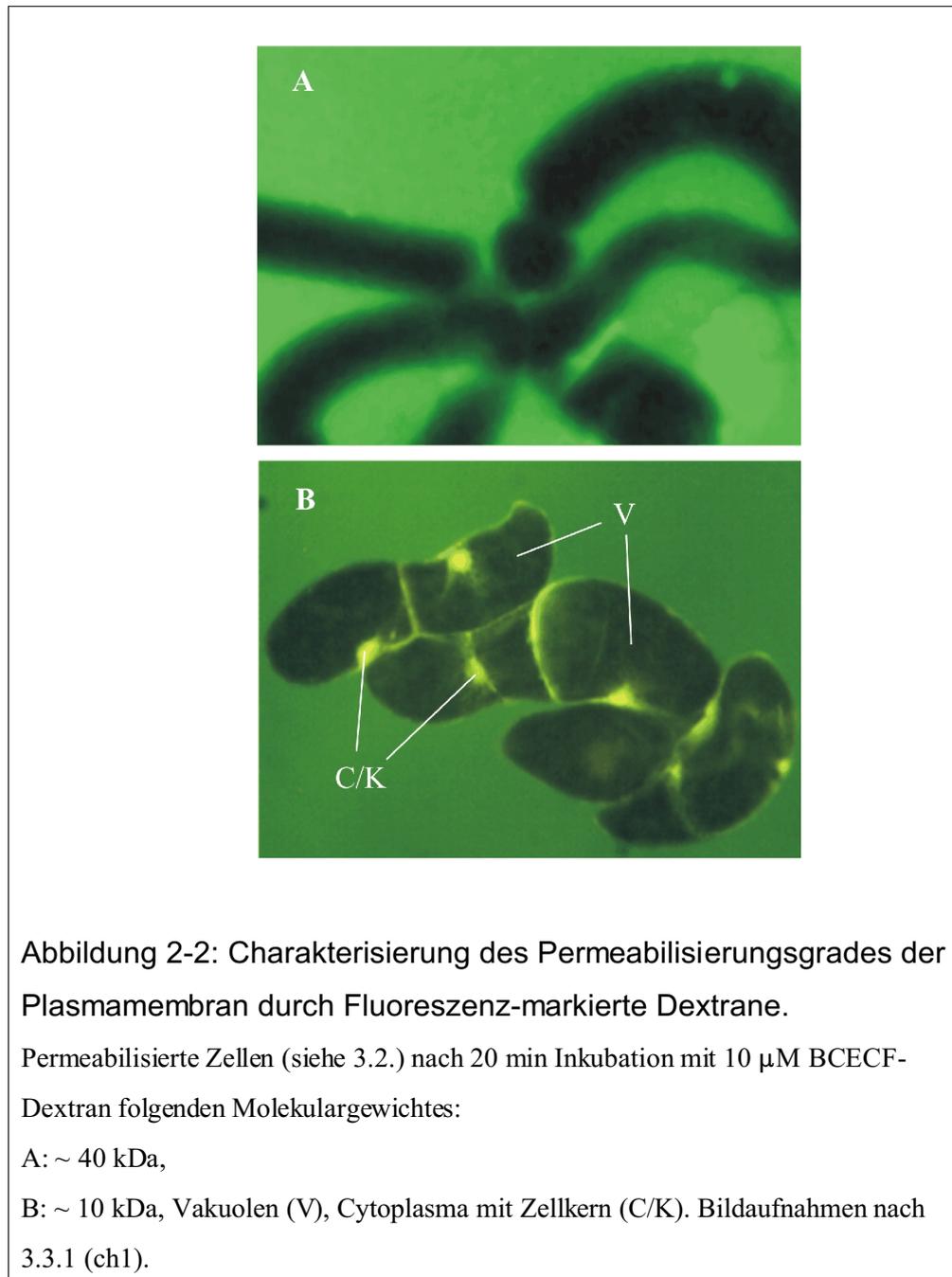
Nährmedium erschien gesichert, da über die Wahl der Agarosekonzentration eine möglichst hohe Porengröße im Gel eingestellt wurde. In Testversuchen wurde 1 mM Neutralrot zum Perfusionsmedium zugesetzt, wodurch eine rasche Farbstoffakkumulation in den in-situ-Vakuolen auftrat. Deshalb kann von einem ausreichenden Kontakt der in-situ-Vakuolen mit dem Perfusionsmedium und damit auch mit den zugesetzten Effektoren ausgegangen werden.

2.1.5 Permeabilitätsmarker zum Charakterisieren des Permeabilisierungsverfahrens

Um den Erfolg der Permeabilisierung zu testen, wurde der Zellsuspension 2 μ M Propidiumjodid zugesetzt. Dieser Farbstoff kann die intakte Membran nicht passieren. Das Eindringen dieser Verbindung zeigt also eine Zerstörung der Barrierefunktion der Plasmamembran an. In der Zelle interkalieren Propidiumkationen in DNS und binden an Cytoskelett-Proteine, so dass sie irreversibel in der permeablen Zelle festgehalten werden (Abb. 2-1C). Dies erleichtert die Detektion permeabler Zellen über die Fluoreszenz des Propidiumjodids.

Eine Abschätzung der erzielten Porengröße in der Plasmamembran ist mit Hilfe von Dextran-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen möglich. Diese sind in verschiedenen Molekülgrößen erhältlich. Aus Abbildung 2-2 wird ersichtlich, dass 10 kDa Fluorescein-Dextran-Konjugate das Cytoplasma erreichen, 40 kDa-Konjugate jedoch nicht. Der "Porendurchmesser" der Plasmamembran sollte also zwischen diesen Molekülgrößen liegen. In beiden Fällen trat keine Fluoreszenz in der Vakuole auf, was auf die Intaktheit des Tonoplasten schließen lässt. Poren dieser Größe in der Plasmamembran erlauben sehr wahrscheinlich den freien Austausch von Mikromolekülen zwischen Cytosol und Außenmedium. Zugleich kann man davon ausgehen, dass die meisten cytosolischen Proteine noch in der Zelle vorhanden sind.

Dies wird dadurch bestätigt, dass ein wesentlicher Verlust von zellulären Proteinen während des Permeabilisierungsprozesses nicht auftrat: der Proteingehalt des 10-fach konzentrierten Überstands einer Suspension permeabilisierter Zellen nach Filtration lag unter der Nachweisgrenze der Lowry-Proteinbestimmung beziehungsweise von SYPRO® Ruby-gefärbten SDS-Gelen [S. Evers, persönliche Mitteilung].



2.1.6 Akkumulation von pH-Sonden und pH-Messung

Ein weiteres Kriterium für die Intaktheit des Tonoplasten ist die Fähigkeit der Vakuole, schwache Säuren zu akkumulieren, die aus membranpermeablen Estern durch unspezifische Esterasen entstehen. Hierfür sind zum Beispiel Fluorescein-Derivate geeignet, die als Diacetat und/oder Acetoxymethylester eingesetzt werden.

Die Abbildung 2-1A zeigt, dass sich das aus seinem Diacetat freigesetzte 5-Carboxyfluorescein in den in-situ-Vakuolen anreichert. Dabei wurden Schäden des Tonoplasten durch einem raschen Verlust des akkumulierten Farbstoffes sichtbar (Abb. 2-1C). Solche Defekte der Barrierefunktion konnten experimentell zum Beispiel durch niedrige Detergentskonzentrationen ausgelöst werden (siehe Abschnitt 4.3.1). Die so in der Vakuole akkumulierten Fluoreszenzsonden waren zugleich als pH-Indikatoren nutzbar (vgl. Abschnitt 1.4).

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten wurden als pH-Indikatoren Carboxyfluorescein und DM-NERF verwendet, da sie ratiometrische Messungen erlauben und für vakuolare pH-Bestimmungen geeignete pK_s -Werte CF: 6,4; DM-NERF: 5,4 [Haugland 2002a] aufweisen.

Ratiometrische Fluoreszenzmessungen ("ratioing") sind das Mittel der Wahl zur Bestimmung von Ionenverteilungen: es werden Fluoreszenz-Bilder bei zwei verschiedenen Wellenlängen (Exzitations- oder Emissionswellenlängen) aufgenommen, welche jeweils bevorzugt die ionengebundene oder die ungebundene Form der Sonde erfassen. Der größte dynamische Bereich wird dann erreicht, wenn beide Aufnahmen bei Wellenlängen erfolgen, bei denen die Fluoreszenzintensität jeweils eine entgegengesetzte Abhängigkeit von der Ionenkonzentration zeigt. Alternativ kann eine der beiden Aufnahmen am isosbestischen Punkt erfolgen, das heißt einer distinkten Wellenlänge, bei der die Fluoreszenz nicht von der Ionenkonzentration, sondern nur von der akkumulierten Farbstoffmenge abhängig ist. Ein Beispiel dafür ist das verwendete Carboxyfluorescein (Abb.2-1A).

Aus dem Verhältnis der Intensitäten der sich entsprechenden Bildpunkte kann eine "Ionen-Karte" ermittelt werden, welche nur die durch Ionenbindung verursachten Fluoreszenzänderungen erfasst. Fluoreszenzheterogenitäten, zum Beispiel durch ungleiche

Farbstoffakkumulation, Photobleaching oder die Dicke der Probe, werden ausgeglichen, wenn sie beide Fluoreszenzbilder in gleicher Weise beeinflussen [Roos 2000].

Bei den hier verwendeten pH-Sonden erlauben beispielsweise die Fluoreszenzeigenschaften der Fluorescein-Derivate die Quotientenbildung von Bildern bei verschiedenen Exzitationswellenlängen (excitation ratioing), bei einigen pH-Sonden, wie DM-NERF von Bildern gleicher Exzitations-, aber verschiedenen Emissionswellenlängen (emission ratioing).

In den erhaltenen pH-Karten (Beispiele in Abb. 4-2, 4-11) entsprechen die dargestellten Intensitätsverhältnisse bestimmten pH-Werten. Diese wurden durch eine Kalibrierung ermittelt.

- pH-Kalibrierung der Fluoreszenzquotienten

Die auf diese Weise erhaltenen pH-Karten spiegeln experimentelle pH-Differenzen meist exakter wider als Absolutwerte des lokalen pH. Dennoch können sehr gute Annäherungen an den Absolutwert des pH in der lebenden Zelle mit Hilfe verschiedener Kalibrierungsverfahren (siehe unten) erreicht werden (mit maximalen Abweichungen von 0,1 pH-Einheiten).

Es sind mehrere Methoden bekannt, um die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzquotienten zu bestimmen, von denen zwei in dieser Arbeit durchgeführt wurden.

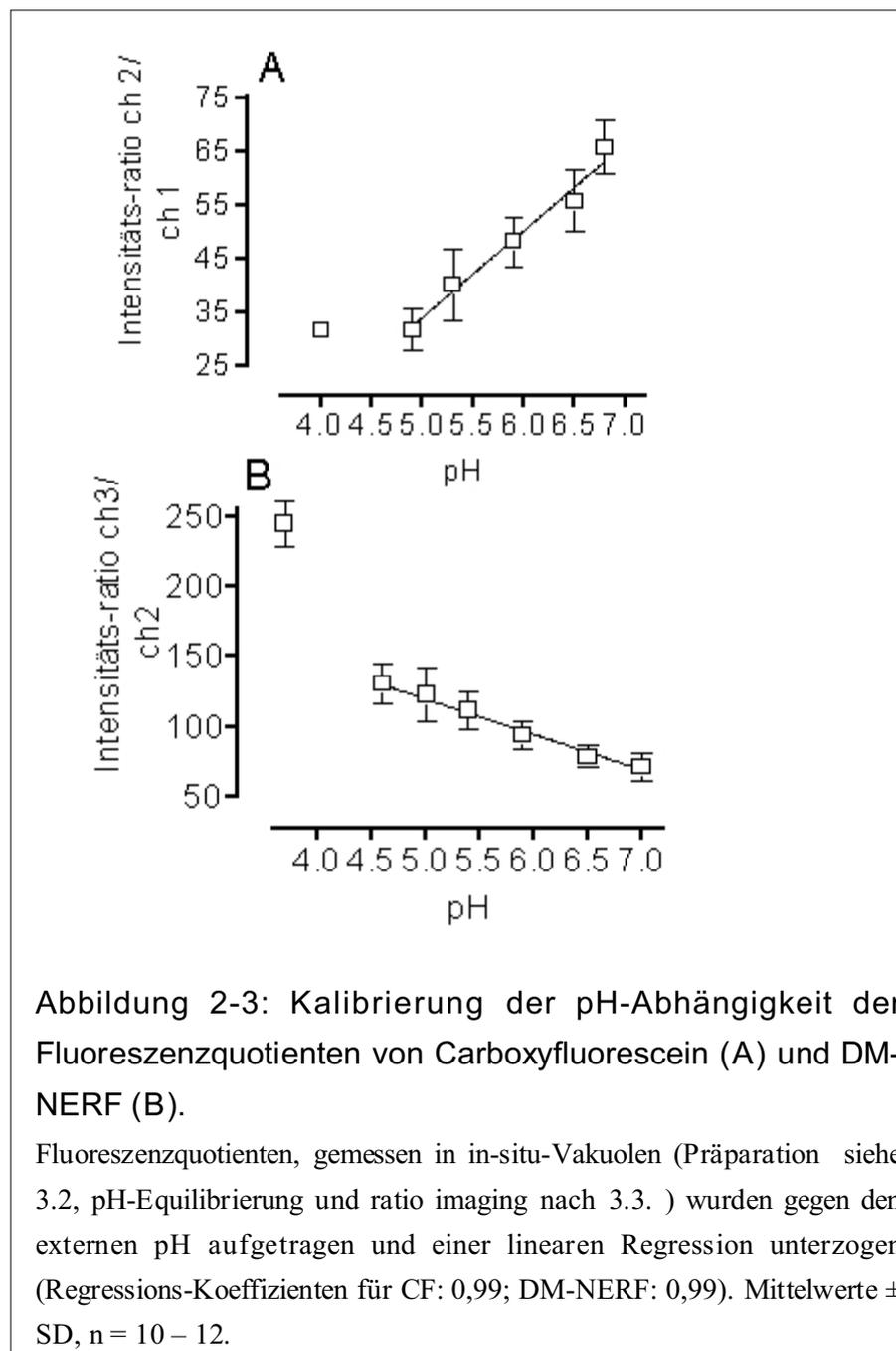
1. Die *in-vitro*-Kalibrierung ist eine Voraussetzung, um die generelle pH-Abhängigkeit des Farbstoffes zu belegen. Es werden dabei Fluoreszenzintensitäten in verschiedenen Pufferlösungen mit definierter Protonenkonzentration gemessen. Da hierbei die innerhalb einer Zelle herrschenden Bedingungen, beispielsweise Ionenkonzentrationen, makromolekulare Komponenten, nicht berücksichtigt werden, ist meist eine zusätzliche
2. *in-vivo*-Kalibrierung erforderlich. Dabei wird durch permeable Säuren bzw. Basen mit pK-Werten in der Nähe von pH_{cyt} oder pH_{vac} der pH-Wert des Cytoplasmas oder der Vakuole mit dem des Außenmediums equilibriert. Dieser Ausgleich kann durch Ionophore, wie Nigericin, welche das Membranpotential zerstören, beschleunigt werden [Brauer et al. 1997b; Roos et al. 1998]. Die Fähigkeit von Methylamin oder Pivalinsäure in jeweils undissoziiertem Zustand durch Membranen zu permeieren, führt dazu, dass sich diese Verbindungen zuerst nach den pH-Werten verteilen und anschließend pH-abhängigen Verbrauch oder Freisetzung

von Protonen zu einem pH-Ausgleich zwischen Ausgangs- und Zielkompartiment (zum Beispiel Außenmedium und Vakuole) führen. In den hier vorgestellten Experimenten war es möglich, nach Zusatz von Nigericin, Methylamin oder Na-Pivalat die vakuoläre Protonenkonzentration an die des Außenmediums anzugleichen. Abbildung 2-3 zeigt die mit dem in-vivo Verfahren erhaltenen Kalibrierungsgeraden für Carboxyfluorescein und DM-NERF.

- Akkumulation ausreichender intrazellulärer Farbstoffkonzentrationen

Eine wichtige Voraussetzung zur Erstellung von pH-Karten (pH-mapping) ist eine ausreichende zelluläre Farbstoffakkumulation, um quantifizierbare Intensitäten in allen interessierenden Regionen zu erreichen. Andererseits sollte die pH-Sonde so wenig wie möglich den Grundzustand der Zelle beeinflussen. Insbesondere ist zu beachten, dass der Indikator selbst ein Puffersystem in dem interessierenden pH-Bereich darstellt. Dieses kann vorhandene pH-Gradienten nivellieren und sie somit der Messung entziehen. Feijo et al. [1999] wiesen beispielsweise in wachsenden Pollenschläuchen nach, dass BCECF in Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ als mobile Puffer wirken kann, der fragile, lokale pH-Gradienten zerstört. Deshalb wurden in den hier vorgestellten Experimenten die Konzentrationen der eingesetzten Indikatoren optimiert, indem die zelluläre Fluoreszenzakkumulation beobachtet und die experimentelle Konzentration im Außenmedium auf ein Minimum reduziert wurde, welche die für die Fluoreszenzmessung nötige Minimalfluoreszenz ergab. Als für das ratioing ausreichende Konzentrationen in *Eschscholzia californica* wurden 50 nM Carboxyfluorescein und 1 μM DM-NERF ermittelt.

In Abhängigkeit von der chemischen Struktur der pH-Sonde, dem verwendeten Zelltyp und dem gewünschten intrazellulären Hauptakkumulationsort sind mehrere Methoden zum Einbringen des Farbstoffes in die Zelle bekannt:



1. die Verwendung von membranpermeablen Estern, zum Beispiel Acetoxymethylester, welche intrazellulär gespalten werden und die eigentliche pH-Sonde freisetzen (in dieser Arbeit verwendet),
2. “acid-loading” mit den freien Säuren, das heißt Inkubation bei niedrigen externen pH-Werten, zum Beispiel mit cSNARF-1 in Pilzhyphen [Bachewich und Heath 1997],
3. intrazelluläre Injektion oder Iontophorese, beispielsweise des Indikators BCECF in

Vicia faba [Grabov und Blatt 1997];

4. Etablierung von Mutanten, die zellorganell-spezifisch pH-empfindliche, fluoreszierende Proteine, wie GFP, exprimieren, zum Beispiel in *Arabidopsis* [Moseyko und Feldman 2001] oder in Bakterien [Olsen et al. 2002] [Übersichten in Roos 1999; Roos 2000].

In den hier vorgestellten Experimenten mit kultivierten Zellen von *Eschscholzia californica* erwies sich die Inkubation mit dem Acetoxymethylester von Carboxyfluorescein (CFDA-AM) als die Methode der Wahl: bereits nach 30 Minuten waren ausreichende, intrazelluläre Konzentrationen akkumuliert. Dagegen waren bei der freien Säure DM-NERF eine deutlich höhere Konzentration (1 μM) und 2 Stunden Inkubationszeit erforderlich, um eine gut messbare Fluoreszenzintensität zu erreichen.

Der verwendete Carboxyfluoresceindiacetat-Acetoxymethylester erwies sich bei längerer Lagerung als sehr hydrolyseempfindlich (siehe Abschnitt 3.7), die entstehenden Spaltprodukte zeigten abweichende pH-abhängige Fluoreszenzeigenschaften und waren zudem toxisch für die in-situ-Vakuolen, erkennbar am Austreten von Farbstoff.

Neuentwickelte Methoden der Laser-Fluoreszenzmikroskopie zeigen einige Vorteile gegenüber den bisher vorrangig angewendeten Verfahren. Bei der "Fluorescence-Lifetime-Imaging-Microscopy" (FLIM) untersucht man beispielsweise den zeitlichen Verlauf des Intensitätsverlustes der emittierten Fluoreszenz ("lifetime") nach beendeter Exzitation des Farbstoffes. Da diese von der Ionenkonzentration und der chemischen Umgebung abhängt, kann man anhand dieses Fluoreszenzrückganges Zeitkonstanten für jedes Bildpixel bestimmen [van Geest et al. 1999]. Dieses Detektionsverfahren gestattet durch seine Unabhängigkeit von lokalen Fluoreszenzintensitäten der Probe die Anwendung eines breiteren Spektrums an Fluoreszenzindikatoren [Roos 2000].

Als Exzitationsquelle dieser Verfahren wird oftmals die "Two-Photon-Excitation" (TPE) angewandt [Brown et al. 1999; de Grauw et al. 1999]. Dabei absorbiert ein Molekül des Fluorophores bei hoher Photonendichte gleichzeitig zwei Photonen, welche die halbe Energiemenge enthalten, die für eine Ein-Photonen-Anregung notwendig ist. Somit wird Lichtstress in nicht-fokussierten Teilen des Präparates vermieden, so dass daraus eine geringere Zerstörung der Probe durch Lichteinfluss, und somit durch weniger Hintergrundinformationen der Bildkontrast erhöht wird [König et al. 1996; Roos 2000].

2.2 Bestimmung der intrazellulären Na⁺-Konzentration

Die Verfügbarkeit Na⁺-selektiver Fluoreszenzindikatoren, wie SBFI, SBFO oder Sodium GreenTM ermöglicht prinzipiell Messungen lokaler Na⁺-Konzentrationen intakter Zellen [Zhang und Melvin 1996; Diarra et al. 2001].

Die prinzipielle Struktur dieser Verbindungen besteht aus einem Kronenether, an dem über eine tertiäre Aminstruktur aromatische und heterozyklische Chromophore gebunden sind [Minta und Tsien 1989]. Die Bindung von Alkali-Kationen bewirkt den Verlust eines Großteils der Konjugation zwischen den Aminogruppen und dem Rest des Chromophores und damit eine Änderung der Fluoreszenzintensität. Über die Größe des Kronenethers kann man Selektivität für Na⁺ gegenüber anderen Alkalimetallionen erreichen (“cage-Mechanismus”). Die Maskierung der polaren Substituenten dieser Indikatoren erfolgt durch Veresterung. Die zellpermeanten Ester können durch unspezifische Esterasen hydrolysiert und damit in die ionenabhängigen Fluorophore überführt werden.

2.2.1 Messungen mit Sodium GreenTM in *Eschscholzia californica*

Um Na⁺-Gradienten zwischen Cytoplasma und Vakuole festzustellen, wurden die Messungen zur Na⁺-Topographie am konfokalen Lasermikroskop durchgeführt. Da der ratiometrische Indikator SBFI nur Exzitations-ratioing mit den Wellenlängen 340 und 380 nm erlaubt und eine relativ geringe Diskriminierung zwischen Na⁺ und K⁺ zeigt [Minta und Tsien 1989], wurde dem nicht-ratiometrischen Fluorescein-Kronenether Sodium GreenTM der Vorzug gegeben. Die Exzitations- und Emissionspeaks dieses “single-wavelength” Indikators liegen bei 507 nm bzw. 532 nm. Die Dissoziationskonstante für Na⁺ liegt bei 21 mM in Gegenwart von Na⁺- und K⁺-haltigen Lösungen (bei Abwesenheit von K⁺-Ionen $K_d \sim 6$ mM), wobei diese außerdem durch den pH-Wert, die Ionenstärke und andere Parameter beeinflusst wird [Haughland 2002b].

- Kalibrierung der Sodium GreenTM- Fluoreszenzintensität zur Na⁺-Konzentration

Um den Einfluss der Protonenkonzentration auf die Na⁺-Messung abzuschätzen, wurde zunächst Sodium GreenTM in Pufferlösungen mit verschiedenen Na⁺-Konzentrationen, aber jeweils konstanten Protonenkonzentrationen, verwendet. Abbildung 2-4 zeigt, dass sich im interessierenden pH-Bereich von 5,0 – 7,4 die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von

der Na^+ -Konzentration nicht ändert. Eine in-vivo-Kalibrierung in Vakuolen von *Eschscholzia*-Zellen führte zu derselben Na^+ -Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität (Abb. 2-4). Analog zur Kalibrierung des pH-Wertes wurden hierbei die Zellen permeabilisiert und in Pufferlösungen des pH-Wertes 5,0 mit definierten Na^+ -Konzentrationen inkubiert, wobei zur Equilibrierung des vakuolären Na^+ -Gehaltes mit dem Außenmedium das Na^+ -Ionophor Gramicidin D benutzt wurde [Hodges et al. 1971; Diarra et al. 2001]. Zugleich wurde der vakuoläre pH-Wert mit der Protonenkonzentration der Pufferlösung ausgeglichen (Zusatz von Methylamin, vgl. Abschnitt 2.1.6). Da die Selektivität von Sodium Green™ keinen völligen Ausschluss von K^+ ermöglicht, wurden die Messungen bei 70 mM K^+ , das heißt der geschätzten K^+ -Konzentration des Cytoplasmas, durchgeführt. Alle Pufferlösungen enthielten daher 70 mM KCl, dessen Konzentration mit Hilfe von 10 μM Nigericin, einem K^+/H^+ -Austauscher [Darley et al. 2000], zwischen Außenmedium und Vakuole equilibriert wurde. Somit wurden der vakuoläre pH-Wert und die K^+ -Konzentration (das heißt die wesentlichen Störquellen) konstant gehalten.

- Experimentelle Beeinflussungen der Na^+ -Konzentration der in-situ-Vakuolen

Durch Applikation des Na^+ -Ionophors Gramicidin D (5 μM) im Na^+ -freien Außenmedium konnte die Na^+ -Konzentration der in-situ-Vakuolen deutlich reduziert werden, was zu dem erwarteten Abfall der Fluoreszenz führte (Abb. 2-5).

Der Zusatz von 10 μM Nigericin löste einen Anstieg der vakuolären Fluoreszenzintensität aus (Abb. 2-5), welcher jedoch nicht auf einen Na^+ -Einstrom zurückzuführen war, da das Perfusionsmedium kein Na^+ enthielt. Dieser Fluoreszenzanstieg ist also durch K^+ bedingt. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Diskriminierung von Sodium Green™ zwischen Na^+ und K^+ unter den gegebenen Bedingungen nicht vollständig ist [Haughland 2002b], so dass der K^+ -Gehalt bei der Na^+ -Messung berücksichtigt werden muss. Dafür spricht auch: in-situ-Vakuolen wiesen in der Regel eine höhere Sodium Green™ auf als Ganzzellen, obwohl erstere mit Na^+ -freiem Lösungen perfundiert wurden. Um den Einfluss des K^+ auszuschalten, wurde in allen Experimenten ein Blindwert der Fluoreszenzintensität subtrahiert, welcher in Na^+ -freiem, 70 mM K^+ enthaltenem Perfusionsmedium (siehe Abschnitt 3.2.3), gemessen wurde. Sodium Green™ erweist sich also als prinzipiell einsetzbar für die Na^+ -Topographie, jedoch nur unter der Voraussetzung, dass der K^+ -Gehalt innerhalb bestimmter Grenzen konstant gehalten werden kann.

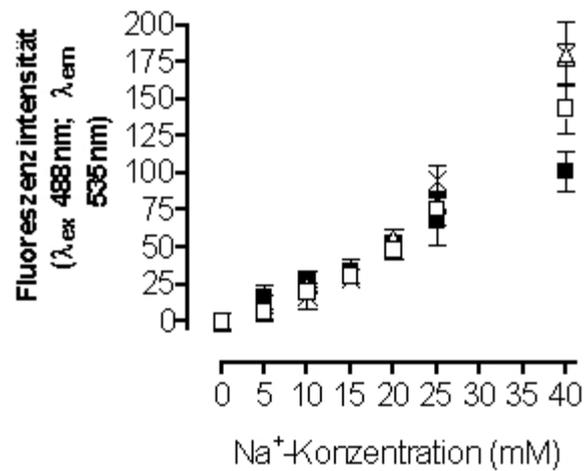


Abbildung 2-4: Kalibrierung der Na⁺-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Sodium Green™.

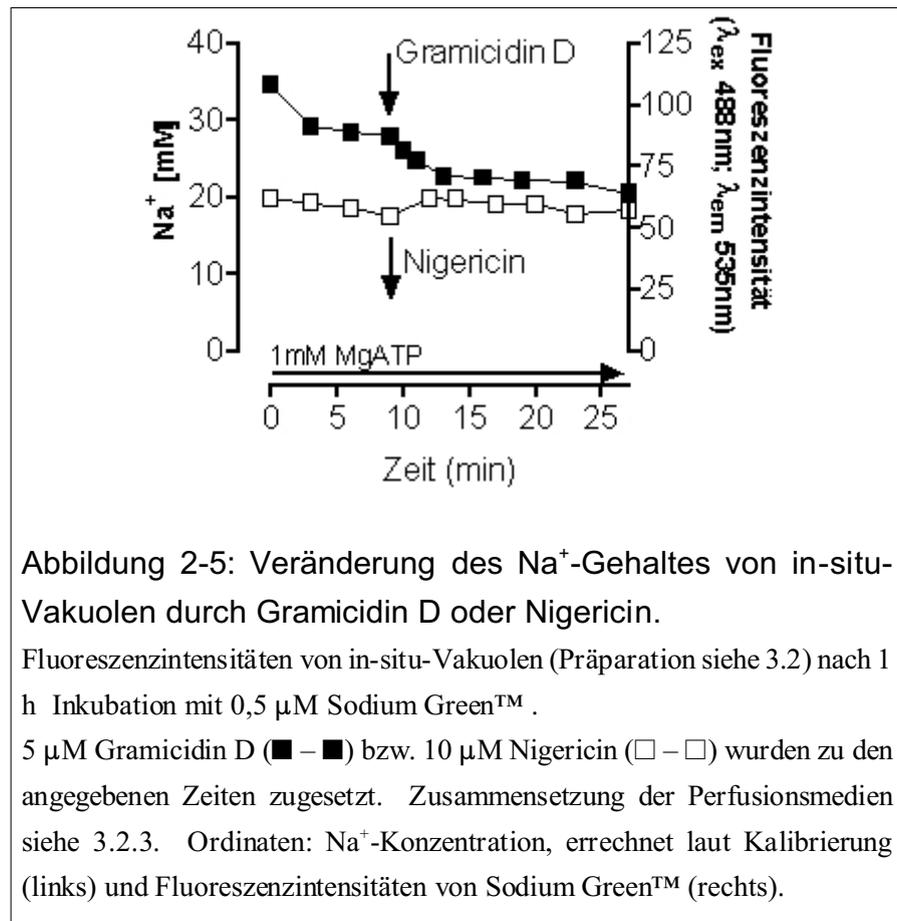
Es sind die Fluoreszenzintensitäten, gemessen nach 3.3 und 3.4., von Na⁺-haltigen Pufferlösungen und in-situ-Vakuolen dargestellt.

In-situ-Vakuolen wurden mit Na⁺-Lösungen des angegebenen Gehalts plus 5 μM Gramicidin D für 30 min inkubiert. Die Medien enthielten zusätzlich: 70 mM KCl, 40 mM Methylamin, 40 mM MES, 10 μM Nigericin.

- Offene Symbole: in-vitro-Messungen (Pufferlösungen) bei pH 5,0 (□ – □); 6,0 (Δ – Δ); 7,0 (× – ×).

- Geschlossene Symbole: Messungen an in-situ-Vakuolen (Präparation siehe 3.2) bei pH_{ex} 5,0 (■ – ■).

Von allen Messwerten wurde die Grundfluoreszenz eines Na⁺-freien Außenmediums bzw. einer mit Na⁺-freiem Außenmedium equilibrierten in-situ-Vakuole subtrahiert. Mittelwerte ± SD, n = 4 (in-vitro), n = 15 – 20 (in-situ-Vakuolen).



2.3 Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung verschiedener Signalereignisse in derselben Zelle

Um zu prüfen, ob die in dieser Arbeit beschriebenen Signalereignisse, PLA₂-Aktivierung und pH-shift, in derselben Zelle ablaufen, in welcher die Alkaloidsynthese nach Elicitorkontakt ausgelöst wird, war es notwendig, experimentelle Bedingungen zu finden, welche die gleichzeitige Messung von drei Fluoreszenzänderungen gestatten:

1. Quantifizierung der PLA₂-Aktivität durch den Fluoreszenzanstieg, der durch Spaltung des bis-BODIPY®-FL C₁₁-PC-Substrates erhalten wurde, bei $\lambda_{\text{EX}} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 495 - 515 \text{ nm}$,
2. das Auftreten vakuolärer pH-shifts, Emissionsratioing mit DM-NERF, $\lambda_{\text{EX}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 535 - 555 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 580 - 600 \text{ nm}$,
3. das Auftreten von Alkaloiden in der Zellwand, $\lambda_{\text{EX}} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 580 - 630 \text{ nm}$.

Da ein sicherer mikroskopischer Nachweis der Alkaloidbildung erst 15 – 20 h nach

Elicitorgabe möglich ist, musste ein spezielles, für die Mikroskopie geeignetes Kultivationsystem entwickelt werden, welches die Lebensfähigkeit über diesen Zeitraum garantierte.

2.3.1 Präparation der Zellen für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Mikroskopische Präparate von Zellen, deren Lebensfähigkeit und Alkaloidbildung nicht wesentlich eingeschränkt ist, erfordern eine ausreichende Zufuhr von Nährstoffen und die Aufrechterhaltung einer optimalen, kontinuierlichen Feuchtigkeitsversorgung. Mit dem in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Präparat (Abb. 3-1) konnten diese Anforderungen erfüllt werden.

Diffusionsversuche mit Neutralrot bestätigten einen ausreichenden Flüssigkeitsaustausch zwischen Zellsuspension und Agaroseblock und eine rasche Verteilung injizierter Lösungen im Präparat.

Die so präparierten Zellen zeigten innerhalb von 48 Stunden keine nachlassende Akkumulation des vakuolären Vitalitätsmarkers Carboxyfluorescein, was auf die Intaktheit der zellulären Protonenkompartimentierung hinweist. Für die Nährstoffversorgung der Zellen erwies sich die in batch-Versuchen benutzte 75%tige, Phosphat-freie Nährlösung als nicht optimal (keine erkennbare Alkaloidbildung in 24 h), sondern es war ein Zusatz von 4,75 % Saccharose erforderlich, um die Alkaloidbildung zu ermöglichen. Die Abhängigkeit der Alkaloidsynthese von der Versorgung mit C-Quellen ist bekannt [Leschke 1997] und wurde in Testexperimenten mit der oben genannten Zellpräparation bestätigt.

2.3.2 Messung der Phospholipaseaktivität

Die verwendete Methode beruht auf der Spaltung eines Phospholipase A-Substrats, dem fluorogenen Phospholipid bis-BODIPY®-FL C₁₁-PC. Die beiden Fettsäureketten in sn1- und sn2-Position tragen jeweils an ihren freien Enden ein BODIPY®-Fluorophor. Durch ihre räumliche Nähe im intakten Phospholipid kommt es zu einem gegenseitigen Fluoreszenzquench. Kommt es durch Aktivität einer Phospholipase A zur Abspaltung einer Fettsäure, wird der Quencheffekt aufgehoben, und es entstehen fluoreszierende Fettsäure und fluoreszierendes Lysophosphatidylcholin (LPC). (Da sowohl bei Hydrolyse in sn1- als auch in sn2-Position diese Endprodukte entstehen, ist eine Differenzierung zwischen

Phospholipase A₁- und A₂-Aktivität mit Hilfe dieses Substrates nicht möglich.)

Die Eignung dieses Substrates zum mikroskopischen Aktivitätstest wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten getestet und optimiert. Eine wesentliche Bestätigung war dabei die Hemmung des Fluoreszenzanstieges durch den Phospholipase A₂-Inhibitor ETYA [Roos et al. 1999; Hollstein 2001; Nitzsche 2001; Schwartze 2001].

Unter den Bedingungen des oben genannten Präparats wurde als geeignete bis-BODIPY®-FL C₁₁-PC- Konzentration 0,25 µM ermittelt, Konzentrationen ≥0,5 µM führten zu einer Hemmung der Alkaloidbildung.

Aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften ist das entstehende LPC sehr schnell im Cytoplasma beweglich (ein typischer PLA₂-Anstieg): selbst von außen zugesetztes BODIPY®-LPC hat nach ca. 2 Minuten bereits den Tonoplasten erreicht (Abb. 2-6). Die Abbildung belegt weiterhin, dass das LPC nicht in die Vakuole gelangen kann (auch nicht nach mehreren Stunden), sondern im Cytoplasma akkumuliert wird. Die Abwesenheit der PLA₂-Produkte in der Vakuole verhindert Störungen der dort erfolgenden pH-Messung mit DM-NERF (siehe Abschnitt 2.3.3). Es findet eine Anreicherung in den zum Tonoplasten benachbarten Regionen des Cytoplasmas statt, wobei im Zellkern keine oder nur eine geringe Konzentration der fluoreszierenden Produkte auftritt.

2.3.3 Messung des vakuolären pH-Wertes

Durch die erwähnte räumliche Trennung der pH-Sonde (Akkumulation in der Vakuole) und der fluoreszenzmarkierten Spaltprodukte des PLA₂-Substrates (Abwesenheit von der Vakuole) (Abb. 2-6) konnte die pH-Messung von der Bestimmung der PLA-Aktivität unabhängig gestaltet werden. Dadurch konnten auch solche pH-Indikatoren verwendet werden, deren Emissionswellenlängen mit denen der PLA-Spaltprodukte (510 – 530 nm) überlappen. Dies gilt auch für die im Folgenden beschriebenen pH-Messungen mit dem Rhodolderivat DM-NERF (pK_s 5,4).

Die Akkumulation dieser pH-Sonde erfolgte hauptsächlich in der Vakuole, jedoch konnte eine geringe cytoplasmatische Anreicherung nicht ausgeschlossen werden. Um die im Cytoplasma ablaufende Messung der PLA-Aktivität nicht zu beeinflussen, war es notwendig

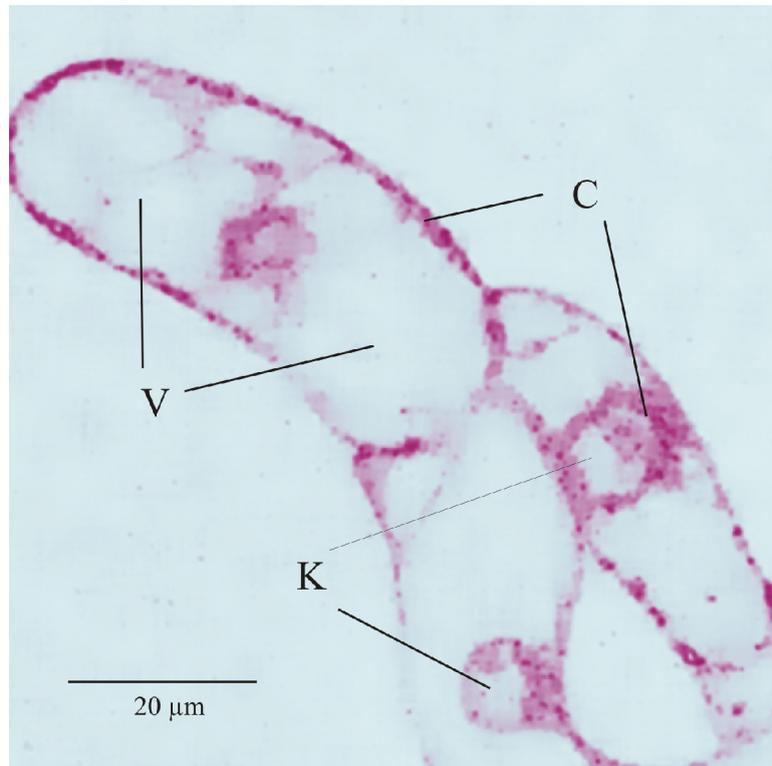


Abbildung 2-6: Zelluläre Verteilung des BODIPY®-markierten Ether-Lysophospholipides BELPC.

Zellen (mikroskopisches Präparat nach 3.5.1) 2 min nach Zusatz von 2 μM BELPC. Diese Verbindung wurde nach Hydrolyse von BEPC mit PLA_2 chromatographisch isoliert. Vakuole (V), Cytoplasma (C), Zellkernbereiche (K), Konfokale Fluoreszenzaufnahme nach 3.3.2 (ch1). Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden in Magenta konvertiert.

zu zeigen, dass die cytoplasmatische Konzentration des pH-Farbstoffes sich nicht wesentlich ändert, zum Beispiel durch einen Ausstrom aus der Vakuole bei starker cytoplasmatischer Azidifizierung. Im Rahmen der hier vorgestellten Experimente war dies nicht der Fall, wie mehrere Testexperimente belegten.

Aufgrund des pK_s -Wertes der pH-Sonde DM-NERF (5,4) konnten Vakuolen mit einem pH-Wert $<4,5$ nicht vermessen werden, weil mit steigender Protonenkonzentration die Fluoreszenzintensität des DM-NERFs soweit abnimmt (vgl. Abb. 2-3B, Kalibriergerade), dass der Mindestwert zur Erstellung von pH-Karten unterschritten wurde (siehe Abschnitt 3.3).

Dass Zellen von *Eschscholzia californica* nach Zusatz von 1 $\mu\text{g/ml}$ Hefeelicitor einen vakuolären Protonenefflux zeigten [Roos et al. 1998], konnte auch bei gleichzeitiger Anwesenheit des Phospholipase-Substrates bis-BODIPY®-FL-PC reproduziert werden (Abb. 5-2).

Neben den PLA-Spaltprodukten bleibt auch die pH-Sonde DM-NERF (im wesentlichen in der Vakuole) während der gesamten Inkubationszeit der Zellen (~ 24 h) im Präparat akkumuliert. Ihre Anwesenheit beeinträchtigte jedoch weder die Fähigkeit der Zellen zur Alkaloidproduktion, noch wirkte sie elicitierend.

2.3.4 Nachweis der Benzophenanthridinproduktion in Einzelzellen

Das angestrebte Verfahren setzte voraus, alkaloidproduzierende Einzelzellen zu identifizieren und die nach externer Stimulation neugebildeten Alkaloidmenge zu quantifizieren.

Nach sorgfältiger Optimierung der Emissionswellenlängen am konfokalen Lasermikroskop, konnte ein klarer Fluoreszenzanstieg im Zellwandbereich von *Eschscholzia*-Zellen nachgewiesen werden, der ca. 20 h nach Elicitorkontakt auftrat (Abb. 5-3C, D, E). Folgende Belege sprechen dafür, dass es sich dabei um die ausgeschiedenen Benzophenanthridin-Alkaloide handelt:

1. Der Fluoreszenzanstieg in der Zellwandregion erfolgte in Abhängigkeit von der Elicitorkonzentration;
2. Das verwendete Lasermikroskop erlaubt die Aufnahme von Fluoreszenzspektren. In Abbildung 5-3F wird ein aus dem Zellwandbereich abgeleitetes Spektrum mit

Referenzspektren der Alkaloide Sanguinarin, Chelerythrin und Macarpin verglichen. (Der benutzte Zellstamm produzierte nach Elicitorkontakt die Hauptalkaloide Chelirubin, Macarpin und 10-Hydroxychelerythrin; D. Weiß, persönliche Mitteilung). Der Vergleich der Spektren spricht dafür, dass in den Zellwandbereichen die erwartete Mischung aus Benzophenanthridinen mit kürzeren Emissionswellenlängen (zum Beispiel Chelerythrin, Maximum bei λ_{EX} ~585 nm) und mit längeren Emissionswellenlängen (wie Macarpin, Maximum bei λ_{EM} ~605 nm) akkumuliert wurde.

3. Mehrere Experimente belegten die Fähigkeit der Alkaloide, an Cellulose-Derivate zu binden, zum Beispiel an Cellulosefasern von Papierfiltern (was den Alkaloidgehalt der Lösung deutlich reduzierte). In-vitro-Experimente zeigten eine Bindung verschiedener Benzophenanthridine an Carboxymethylcellulose. Die Zellwand wirkt durch ihre Cellulose- aber auch ihre Pektinbestandteile (u.a. Glucuron- oder Galakturonsäuren [Cosgrove 1997]) als Kationenaustauscher [Gillet et al. 1998]. Dies eröffnet die Möglichkeit zur Bindung der quaternären Benzophenanthridine in der Zellwand. Die in den Zellwandregionen der elicitierten Zellen nachgewiesene Fluoreszenz blieb auch nach einem osmotischen Schock, welcher zu einem Schrumpfen des Zellinhaltes führte, nachweisbar (Abb. 5-3E). Dies ermöglichte zugleich eine genaue räumliche Identifizierung der Zellwand, da durch Plasmolyse die Plasmamembran von der Zellwand abgelöst werden kann [Kohorn 2000], zur Ableitung des in Abbildung 5-3F gezeigten Spektrums.

Die Nutzung der Zellwand-Bindung zum mikroskopischen Alkaloidnachweis hat zwei Vorteile:

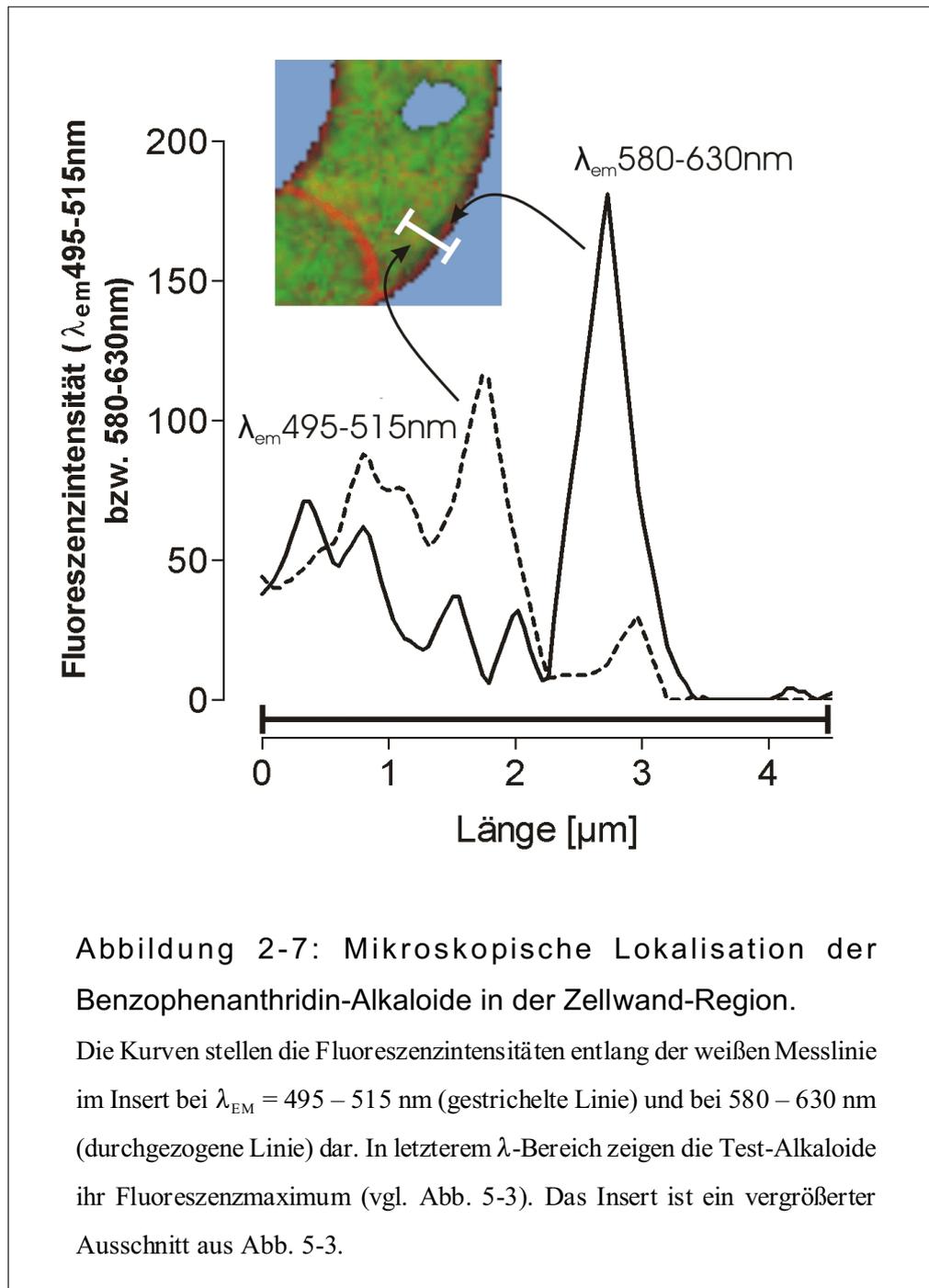
1. Es müssen keine zusätzlichen Indikator-Verbindungen in das Präparat eingebracht werden,
2. Das neu gebildete Alkaloid kann eindeutig der Produzentenzelle zugeordnet werden. Die Akkumulation fluoreszierender Benzophenanthridine in der Zellwandregion war nur dann nachweisbar, wenn die Elicitorbehandlung und anschließende Inkubation der Zellen im mikroskopischen Präparat, das heißt unter der Agarosefläche fixiert, durchgeführt wurde. Zellen aus einer gleichfalls elicitierten, alkaloidproduzierenden Zellsuspension auf dem Rundschüttler (siehe Abschnitt 3.6) zeigten bei mikroskopischer Untersuchung keine

fluoreszierenden Zelloberflächen.

Man kann daher annehmen, dass durch die Bewegung der Zellen im Medium der Submerskultur die Zellwand-gebundenen Alkaloide zu einem erheblichen Teil abgelöst werden. Die Alkaloidakkumulation im mikroskopischen Präparat (Zellwand-Detektion; Abb. 2-7) zeigte etwa die gleiche Abhängigkeit von der Elicitorkonzentration wie der Anstieg des Gesamtalkaloidgehaltes in einer geschüttelten Zellsuspension.

Auch in fixierten Zellpräparationen wurde bei mikroskopischer Betrachtung festgestellt, dass die Akkumulation in der Zellwand nur im Zeitraum von 15 – 20 h nach Elicitorgabe stattfindet. Längere Beobachtungszeiten ergaben keinen weiteren Anstieg der Zellwand-gebundenen Fluoreszenz. Sehr wahrscheinlich wird nach Absättigung der begrenzten Bindekapazität der Zellwand das darüber hinaus gebildete Alkaloid an das Außenmedium abgegeben. Es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die im mikroskopischen Präparat vorhandenen Zellen 15 - 20 h nach Elicitorgabe die Alkaloidbildung einstellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die drei Fluorophore, BODIPY®, DM-NERF und Benzophenanthridin-Alkaloide, voneinander unabhängig in derselben Zelle messbar sind, und damit in dieser Zelle der Nachweis von PLA₂-Aktivität, pH-shift und Alkaloidbildung möglich wird (Abb. 5-4).



3 Experimenteller Teil

3.1 Zellkultur und Kultivationsbedingungen

Zellsuspensionskulturen des Kalifornischen Goldmohns (*Eschscholzia californica* Cham.) werden in einem modifizierten Nährmedium nach Linsmaier und Scoog [1965] mit 2,4-D und α -Naphthalenessigsäure (jeweils 1 μ M) kultiviert. Die Kultivation erfolgt auf einem Rundschtüttler (100 rpm) bei 24 °C im Dauerlicht ($\sim 7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) in einem 9 Tage-Wachstumszyklus.

3.2 Permeabilisierung von Zellen für in-situ-Transportexperimente

2 ml einer 3 bis 5 Tage alten Zellsuspension werden im Dunkeln unter Schütteln mit der pH-Sonde CFDA-AM (50 nM; 30 min; Stammlösung: 2 mM in DMSO) oder DM-NERF (1 μ M; 2 h; Stammlösung 2 mM in DMSO) inkubiert. Danach wird die Zellsuspension durch eine Nylon-Gaze (50 μ m Porendurchmesser) vom Inkubationsmedium getrennt und mit 6 ml 100 mM Sorbitollösung gewaschen. Das Zellpellet resuspendiert man in 4 ml auf 13 °C vorgekühlten Medium 1 (siehe Abschnitt 3.2.3). Nach 15 min Inkubation im Thermomixer bei 13 °C wird die Zellsuspension durch die Nylon-Gaze filtriert, in 4 ml Medium 2 (siehe Abschnitt 3.2.3) resuspendiert und weitere 15 min inkubiert. Durch erneutes Filtrieren und Resuspendieren in 2 ml Medium 2 wird die Zellsuspension wieder auf die anfängliche Zelldichte eingestellt. Ein Aliquot dieser Suspension wird auf 21 °C erwärmt und mit 2 μ M Propidiumjodid (Stammlösung 1 mM¹) versetzt. Das andere Aliquot verbleibt bei 13 °C und kann innerhalb von 3 h zur Perfusion eingesetzt werden.

3.2.1 Durchflusszellkammer zur Mikroskopie von in-situ-Vakuolen

10 μ l der permeabilisierten Zellsuspension werden mit 50 μ l Medium 2, das 3 % Agarose (Typ VII) enthält, bei 40 °C gemischt und sofort bei 20 °C auf einem Deckglas zu einem dünnen Film gespreitet. Dieses Deckglas wird in eine Durchflusszellkammer (Volumen 140 μ l; Bachofer, Reutlingen, BRD) eingebaut, wobei zur Fixierung des Agarosefilms eine Schicht Siebgewebe aus Polypropylen, 75 μ m Porendurchmesser (Reichert Chemietechnik, Heidelberg, BRD) dient.

¹ Wenn nicht anders angegeben, wird Aqua destillata als Lösungsmittel verwendet.

3.2.2 Perfusion der in-situ-Vakuolen

Die in dem Agarosefilm eingebetteten permeablen Zellen werden durch Perfusion mit Hilfe einer peristaltischen, pulsationsarmen Pumpe (Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, BRD), Fließgeschwindigkeit 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, versorgt und können gleichzeitig durch spezielle Zusätze zum Perfusionsmedium mit Effektoren oder Hemmstoffen behandelt werden.

3.2.3 Medien

Medium 1

» 300 mM KCl; 20 mM HEPES; 5 mM Glutathion (reduziert)

Medium 2

» 100 mM KCl; 20 mM HEPES; 5 mM Glutathion (reduziert)

Standardperfusionsmedium

» 100 mM KCl, 5 mM Glutathion (reduziert); 10 mM NaCl; 0,5 mM Na-Citrat; 0,5 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM Ascorbinsäure; 100 μM KCN; 0,1 % RSA; 50 mM MOPS mit gesättigter BTP- Lösung auf pH 7,0 eingestellt

Für Experimente mit veränderter Na^+ -Konzentration wird folgendes Perfusionsmedium verwendet:

» 70 mM KCl; 80 mM Sorbitol; 5 mM Glutathion (reduziert); 0,5 mM K-Citrat; 0,5 mM K_2HPO_4 ; 2 mM Ascorbinsäure; 100 μM KCN; 0,1 % RSA; variable NaCl-Konzentrationen (0-40 mM), Sorbitolkonzentration entsprechend vermindert; 50 mM MOPS mit gesättigter BTP- Lösung auf pH 7,0 eingestellt Alle Medien wurden mit KOH auf pH 7,4 eingestellt und täglich frisch aus 10fach konzentrierten wässrigen Stammlösungen hergestellt.

Energiequellen

» Na_2ATP oder K_2ATP (Stammlösung: 0,3 mM oder in 50 mM MOPS-BTP, pH 7,0) beziehungsweise Na_4PP_i (Stammlösung: 0,3 mM) werden zusammen mit äquimolaren Mengen MgCl_2 (Stammlösung: 0,3 mM) dem Perfusionsmedium zugesetzt.

Zur Generierung eines größeren pH-Gradienten zwischen Vakuole und Außenmedium wird zunächst mit 3/1 mM MgATP perfundiert, danach zur Einstellung einer geringeren Rate der Ansäuerung mit 1/0,6 mM MgATP.

Effektoren und Hemmstoffe:

- » Stammlösungen der Phospholipide und -Derivate: 20 mM in Chloroform, zur vollständigen Lösung im Perfusionsmedium erfolgen 90 s Ultraschallbehandlung bei 70 % Leistung (Bandelin Sonoplus HD70; Berlin, BRD)

- » Bafilomycin A₁: 100 µM in DMSO; Destruxin B: 20 mM in DMSO;
- » Etidronsäure: 10 mM; Phytinsäure: 10 mM;
- » DMA: 50 mM; MIA: 50 mM
- » EIPA: 50 mM; DM-BAPTA-AM: 5 mM in DMSO;
- » BAPTA: 5 mM; BAPTA-AM: 5 mM in DMSO;
- » Staurosporin: 5 mM in DMSO

Plasmamembranvesikel (zur Verfügung gestellt von B. Dordschbal) wurden mit PLA₂ aus *Apis mellifera* (Endaktivität 61 U/ml; Stammlösung 1225 U/min) 1 h bei 37 °C inkubiert, danach zur Abtrennung des Enzyms einer Ultrafiltration unterworfen (cutoff 5 kDa). Das Ultrafiltrat wurde analog den anderen Effektoren zum Perfusionsmedium zugesetzt.

3.3 Mikroskopie

3.3.1 Klassische Fluoreszenzmikroskopie

Dazu wird das inverse Fluoreszenzmikroskop Nikon Diaphot 300 (Tokyo, Japan); mit dem Objektiv 40*0,70 benutzt. Die mikroskopischen Bilder werden durch eine CCD-Kamera (SONY Progressive 3, Tokyo, Japan) digitalisiert

Einstellungen:

- » gain: 10; Integrationszeit: 0,5 s; Brightness: 160; Contrast: 180

und auf einer Festplatte gespeichert. Zur Bildanalyse dient die Software ist OPTIMAS® 6.2 (Bothell, USA), die computergestützte Kamerasteuerung wurde von Tynpel Engineerings (Jena, BRD) entwickelt.

Zur pH-Messung wird das excitation ratioing (vgl. Abschnitt 2.1.6) der Fluoreszenz des akkumulierten Carboxyfluoresceins mit den Filterkombinationen angewendet:

ch 1: $\lambda_{EX} = 470 - 490$ nm; $\lambda_{EM} = 520$ nm; dichroidischer Spiegel: 510 nm (pH-abhängiger Kanal);

ch 2: $\lambda_{EX} = 435$ nm; $\lambda_{EM} = 520$ nm; dichroidischer Spiegel: 455 nm (isosbestischer Punkt; pH-

unabhängiger Kanal).

Fluoreszenzlichtquelle: Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO) 100W/2 (Osram GmbH, Berlin-München, BRD)

Nacheinander werden 2 Fluoreszenzbilder (ch1 und ch2) aufgenommen, diese werden für nicht-konfokale pH-Karten verwendet.

- Nicht-konfokale pH-Karten

Zur Berechnung der pH-Karten aus ch1 und ch2 wird jeweils die Intensität des grünen RGB-Teilbildes benutzt, um Beeinflussungen durch die Fluoreszenz des Propidiumjodids zu vermeiden. Die pH-Karte wird durch pixelweise Division von ch1/ch2 erhalten. Zur einfacheren Erkennbarkeit schnelleren Visualisierung von pH-Änderungen weist man den dadurch erhaltenen Intensitätswerten Farbwerte auf einer definierten Farbskala (lookup-table) zu (Beispiel siehe Skala in Abb. 4-2).

3.3.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Benutzt wird ein konfokales Mikroskop, Leica TCS-SP (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, BRD), das mit einem 16 A Argon-Krypton-Laser (Omnichrome, Chino, USA) ausgestattet ist. Anregungslicht ist die 488 nm-Linie. Zur Bildanalyse und zur Mikroskopsteuerung dient die "Leica Confocal Software".

Objektiv: HCX PL APO 63*1,20 W

Image Dimensions: x 158,73 μm

y 158,73 μm

Format: 512 \times 512

Das Gerät ermöglicht Messungen in vier Kanälen (ch), die für folgende Fluoreszenzbereiche eingestellt wurden:

pH-Messung:

- » ch2: $\lambda_{\text{EM}} = 535 - 555 \text{ nm}$; Gain PMT 2: 1225 V; Offset: -5
- » ch3: $\lambda_{\text{EM}} = 580 - 600 \text{ nm}$; Gain PMT 3: 1225 V; Offset: 0
- » Pinhole: 0,75

PLA-Messung:

- » ch1: $\lambda_{EM} = 495 - 515 \text{ nm}$; Gain PMT 1: 1153 V; Offset: -8
- » Pinhole: 0,75

Alkaloidmessung:

- » ch3: $\lambda_{EM} = 580 - 630 \text{ nm}$; Gain PMT 3: 1225 V; Offset: 0
- » Pinhole: 0,75

Na⁺-Messung:

- » ch1: $\lambda_{EM} = 530 - 540 \text{ nm}$; Gain PMT 1: 1175 V; Offset: -8
- » ch2: $\lambda_{EM} = 570 - 630 \text{ nm}$; Gain PMT 2: 1200 V; Offset: -5
- » Pinhole: 0,75

Fluoreszenzspektren, aus CLSM-Aufnahmen abgeleitet (λ scan):

- » ch2: $\lambda_{EM} = 560 - 640 \text{ nm}$; Gain PMT 2: 1250 V; Offset: 0
- » Pinhole: 0,90

Transmissionsaufnahmen:

- » Gain PMT Tr: 343V; Offset: 0

Für die meisten Fluoreszenz-Anwendungen werden je 4 Aufnahmen (innerhalb von ca. 2 s) gescannt, aus denen ein Durchschnittsbild errechnet wird.

Zum Erhalt eines Fluoreszenzspektrums werden 20 dieser Durchschnittsbilder schrittweise in jeweils gleichem Wellenlängenabstand über einen vorgegebenen λ -Bereich gescannt.

- Konfokale pH-Karten

Zur Erstellung der pH-Karten wird die Software OPTIMAS® 6.2 benutzt. Die konfokalen Aufnahmen der DM-NERF-Fluoreszenz werden in 8-Bit-Grau-Bilder umgewandelt und mit einem Median 3×3-Filter bearbeitet. Um sicherzustellen, dass eine ausreichende Fluoreszenzintensität zum ratioing vorhanden ist, werden Intensitäten <5 nicht berücksichtigt. Die pH-Karte wird durch pixelweise Division der Bilder aus ch3/ch2 erhalten. Zur Visualisierung von pH-Änderungen weist man den dadurch erhaltenen Intensitätswerten Farbwerte auf einer definierten Farbskala (lookup-table) zu (siehe beispielsweise Skalen in Abb. 4-11; 5-2). Bildverbesserungen (zum Beispiel Reduktion des Hintergrundes, Kontrastverbesserung) erfolgen mit der Corel PHOTO-PAINT® 10 Software (Corel Corporation Ottawa, Kanada).

pH-shifts werden als maximal erreichte vakuoläre Alkalisierung, bezogen auf den pH-Gradienten zwischen Vakuole und Cytoplasma (pH 7,4) zum Zeitpunkt des 2. Zusatzes (siehe Abschnitt 3.5.3), dargestellt.

3.3.3 Kalibrierung der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzsonden

3 oder 4 Tage alte Zellsuspensionen werden mit 50 nM CFDA-AM (30 min) oder 1 μ M DM-NERF (2 h) inkubiert, permeabilisiert (vgl. Abschnitt 3.2), durch Nylon-Gaze abgesaugt und in Pufferlösungen mit definierten pH-Werten resuspendiert (siehe unten). Nach 10 min (Na-Pivalat-Puffer) oder 30 min (Methylamin-Puffer) Inkubationszeit werden pH-Karten der in-situ-Vakuolen erstellt (vgl. Abschnitt 3.3.2). Die daraus erhaltenen Intensitätsquotienten trägt man gegen den externen pH-Wert auf (vgl. Abb. 2-3). Für pH-Werte ≤ 5 wird Pivalat-Pufferlösung, für pH-Werte ≥ 5 der Methylamin-Puffer verwendet.

Pufferlösungen:

- » 40 mM MES; 80 mM Methylamin bzw. 5 mM Na-Pivalat; 100 mM KCl; 10 μ M Nigericin (Stammlösung: 10 mM in Ethanol); mit KOH bzw. HCl auf die erforderlichen pH-Werte eingestellt

3.4 Na⁺-Messung

3 oder 4 Tage alte Zellsuspensionen werden 1 h mit 0,5 μ M Sodium GreenTM-tetraacetat (Stammlösung: 20 mM in DMSO) inkubiert, permeabilisiert und in eine Durchflusszelle eingebracht (vgl. Abschnitt 3.2). 5 μ M Gramicidin D (Stammlösung 2 mM in Methanol) oder 10 μ M Nigericin (Stammlösung 10 mM in Ethanol) werden dem Perfusionsmedium zugesetzt. Es wird die Fluoreszenzintensität am konfokalen Mikroskop bei $\lambda_{EM} = 530 - 540$ nm gemessen.

3.4.1 Kalibrierung der Na⁺-Abhängigkeit der Sodium GreenTM-Fluoreszenz

- in-vitro-Kalibrierung

0,5 μ M Sodium GreenTM (Tetramethylammonium-Salz; Stammlösung: 20 mM in DMSO) wird Pufferlösungen zugesetzt (siehe unten), diese werden auf IsoporeTM-Membranen aufgegeben und die Fluoreszenzintensität in den Filterporen am konfokalen Mikroskop vermessen (vgl. Abschnitt 3.3.2). Die Fluoreszenzintensität wird gegen die Na⁺-Konzentration der Pufferlösung graphisch aufgetragen (vgl. Abb. 2-4).

Pufferlösungen:

» NaCl (0- 40 mM); 40 mM MES; 40 mM Methylamin; 70 mM KCl ; 5 μ M Gramicidin D (Stammlösung: 2 mM Methanol); 10 μ M Nigericin; mit HCl auf die erforderlichen pH-Werte eingestellt.

- in-vivo-Kalibrierung

3 oder 4 Tage alte Zellsuspensionen werden 1 h mit 0,5 μ M Sodium GreenTM-tetraacetat (Stammlösung: 20 mM in DMSO) inkubiert, permeabilisiert (vgl. Abschnitt 3.2) und 30 min in den zur in-vitro-Kalibrierung verwendeten Pufferlösungen inkubiert. Danach misst man die Fluoreszenzintensität der in-situ-Vakuolen und trägt diese gegen die externe Na⁺-Konzentration auf (vgl. Abb. 2-4).

3.5 Multispektrale Messung von Phospholipase A-Aktivität, vakuolärem pH-Wert und Alkaloidakkumulation in intakten Einzelzellen

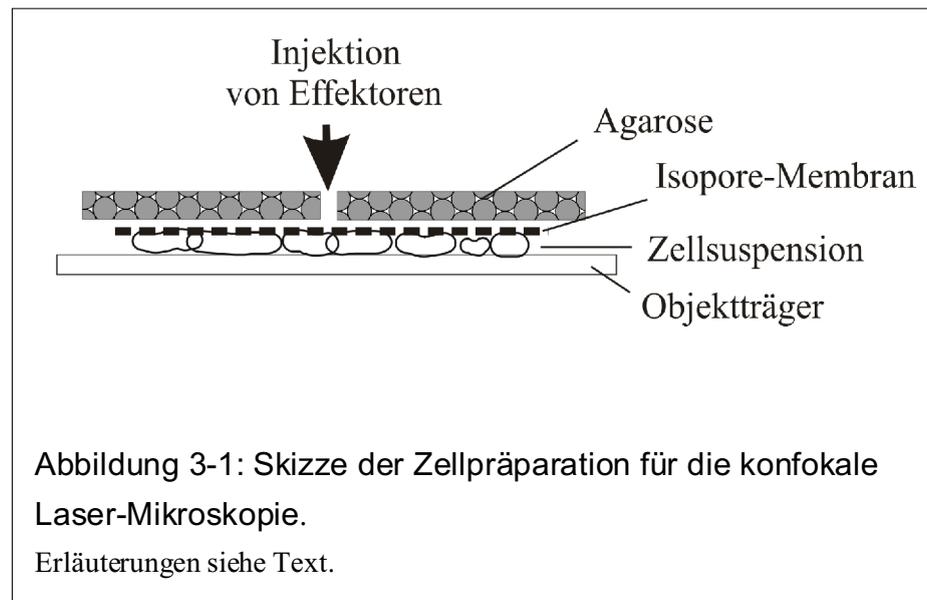
3.5.1 Präparation von Zellen

3 oder 4 Tage alte Zellsuspensionen werden 2 h mit 1 μ M DM-NERF inkubiert, danach mit 100 mM Sorbitollösung gewaschen und im gleichen Volumen Nährlösung (siehe unten) resuspendiert. 5 μ l Zellsuspension werden auf einem Objektträger mit einer IsoporeTM-Membran (Porendurchmesser 10,0 μ m; Typ TCTP; Millipore Corporation, Bedford, USA) bedeckt. Darauf wird ein Agarose-Block von 0,5 mm Dicke gelegt, bestehend aus 200 μ l Nährlösung (siehe unten) mit 2 % Agarose Typ VII. In diesen wird ein Loch von ~3 mm Durchmesser gestochen, durch welches Effektoren, Hemmstoffe etc. appliziert werden (Abb. 3-1). Zum Schutz des Präparats wird es mit Biofolie abgedeckt (Heraeus Instruments; Hanau; BRD). Bevor die Präparate für Messungen verwendet werden, erfolgt eine 30 min Adaptationszeit der Zellen an die neuen Bedingungen.

Zwischen den mikroskopischen Beobachtungen werden die Präparate in einer wassergefüllten, mit Filterpapier ausgekleideten Petrischale unter Lichtschutz bei 24 °C aufbewahrt.

Nährlösung zur Resuspension der Zellen und für den Agarose-Block:

» 22,7 % LS-P; 4,75 % Saccharose



3.5.2 Elicitor-Behandlung der Zellen im mikroskopischen Präparat

Die Stammlösung des Hefeelicitors (Präparation nach Schumacher et al. [1987]; 1 mg/ml) wird auf das Dreifache der gewünschten Endkonzentration mit Nährlösung (vgl. Abschnitt 3.5.1) verdünnt. Von dieser Lösung injiziert man 5 μ l durch das Agaroseloch auf die IsoporeTM-Membran, durch deren Poren die Lösung an die Zellen gelangt.

3.5.3 Messung der Phospholipase A-Aktivität

Von einer 100 mM bis-BODIPY[®]-FL C₁₁-PC-Stammlösung in Ethanol wird eine 0,5 μ M Verdünnung in Nährlösung hergestellt. Diese wird 3 mal jeweils 5 s mit Ultraschall bei 70 % Leistung (Bandelin Sonoplus HD70; Berlin, BRD) bei 0 °C behandelt. 5 μ l dieser Lösung werden durch das Agaroseloch auf die IsoporeTM-Membran injiziert (1. Zusatz), nach ca. 6 min erreicht die aus der PLA-Grundaktivität resultierende Fluoreszenzintensität infolge der ein konstantes Level, so dass anschließend die Elicitierung der Zellen erfolgen kann (2. Zusatz).

Um einen Vergleich der Enzymaktivitäten bei verschiedenen Experimenten zu gewährleisten, wird die Differenz der Fluoreszenzintensitäten 2 min nach Elicitorzusatz und direkt vor dem Elicitor-Zusatz gebildet.

3.5.4 Messung des vakuolären pH-Wertes

Die Topographie des vakuolären pH-Wertes erfolgt wie unter den Abschnitten 3.3.1 und

3.3.2 für permeable Zellen angegeben.

3.5.5 Messung der Alkaloidakkumulation

Die Bilder der Kanäle ch1 (PLA₂-Spaltprodukt) und ch3 (Benzophenanthridine) (vgl. Abschnitt 3.3.2) werden pixelweise übereinander gelegt, um Zelloberflächenbereiche mit hoher Fluoreszenzintensität leichter zu erkennen. Durch das resultierende Bild legt man eine Messlinie, entlang der die Fluoreszenzintensität zwischen 580 – 630 nm gemessen wird (Abb. 2-7). Die Fluoreszenz repräsentiert sehr wahrscheinlich Benzophenanthridin-Alkaloide, wie aus Fluoreszenzspektren hervorgeht, die aus derartigen Bereichen abgeleitet wurden (Abb. 5-3E, F).

Die Alkaloidreferenzlösungen enthielten jeweils 10 µg/ml Sanguinarin, Chelerythrin oder Macarpin (als Chloride) in wässriger Lösung (Stammlösungen: 1 mg/ml).

3.6 Untersuchungen der Alkaloidbiosynthese in Suspensionskulturen

3.6.1 Elicitierung der Zellsuspensionen

Zu 3 oder 4 Tage alten Zellsuspensionen (jeweils 1,5 ml) werden 1 µg/ml oder 10 µg/ml Hefeelicitator (Präparation nach Schumacher et al. [1987]) aus einer Stammlösung (1 mg/ml) zugesetzt. Nach 30 min Inkubationszeit werden die Suspensionen durch Nylon-Gaze (50 µm Porendurchmesser) abfiltriert, mit dem doppelten Volumen 100 mM Sorbitollösung gewaschen und in 1,5 ml 75 % LS-P resuspendiert. Danach werden je 3 Parallelen (500 µl) in Rollrandgläser pipettiert und 24 h bei den beschriebenen Bedingungen (vgl. Abschnitt 3.1) kultiviert.

3.6.2 Extraktion und fluorimetrische Bestimmung der Benzophenanthridin-Alkaloide

500 µl Zellsuspension werden mit 500 µl 1 % HCl in 96 % (v/v) Ethanol versetzt und im Thermomixer 20 min bei 40 °C unter Schütteln extrahiert. Der nach 30 min Zentrifugieren bei 5000 rpm erhaltene Überstand wurde im Fluoreszenzreader (Fluorolite 1000; Dynatech Laboratories; Sullyfield Circle Chantilly, USA) bei $\lambda_{EX} = 490 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$; $\lambda_{EM} = 570 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$; Lampenspannung 7 V vermessen. Über die Kalibriergerade werden diese Messwerte in Alkaloidkonzentrationen umgerechnet.

- Kalibrierung der Alkaloidfluoreszenz am Fluoreszenzreader

0-2 µg/ml Sanguinarin (Stammlösung: 1 mg/ml) in Methanol/HCl werden am

Fluoreszenzreader vermessen und gegen die Sanguinarin-Konzentration aufgetragen.

3.6.3 Bestimmung der Trockenmasse

Die Bestimmung der Trockenmasse der Zellsuspension erfolgt mit der Analysenwaage nach Trocknung von Zellpellets bei 80 °C über 4 h und Abkühlen bei Raumtemperatur.

3.7 Dünnschichtchromatographie der Hydrolyseprodukte des CFDA-AM

Zur Prüfung der Stabilität des Acetoxymethylesters von Carboxyfluorescein werden in regelmäßigen Abständen Dünnschichtchromatogramme der verwendeten Farbstoffstammlösung mit den möglichen Hydrolyseprodukten (zum Beispiel Carboxyfluoresceinacetat) als Referenzen angefertigt.

Mobile Phase: n-Butanol: Ethanol: Wasser (90:10:10) [Schweppe 1969]

Stationäre Phase: HPTLC- Alufolie, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, BRD)

Detektion: Fluoreszenz $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ (Ultraviolettstrahler; Konrad Benda, Wiesloch, BRD)

Jeweils 5 μl von 0,3 μM Lösungen in Methanol werden aufgetragen:

	Rf-Werte
5- und 6-Carboxyfluorescein	0,61 und 0,66
Carboxyfluorescein-Diacetat	0,49
Carboxyfluorescein-Diacetat-Acetoxymethylester	0,78 (nach 5 h Lichteinfluss)
Zellextrakt mit Methanol	0,60 und 0,64

Nach 5 h können weitere, nicht identifizierbare Rf-Werte bestimmt werden.

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, BRD), Molecular Probes (Eugene, USA), Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden/Ts., BRD) oder Roth (Karlsruhe, BRD) bezogen. Sie entsprachen dem Reinheitsgrad "p.a."

Destruxin B wurde freundlicherweise von A. Takatsuki (Riken Institute Saitama, Japan) zur Verfügung gestellt.

4 Ionenfluxe an in-situ-Vakuolen von *Eschscholzia californica*

4.1 Charakterisierung vakuolärer Protonenfluxe in-situ

Schwerpunkt der im Folgenden dargestellten Experimente waren Protonenfluxe am Tonoplasten an den durch selektive Permeabilisierung der Plasmamembran erhaltenen Vakuolen (vgl. Abschnitt 2.1).

Die Eigenschaften der in-situ-Vakuolen, insbesondere ihre pH-Regulation, sollten den physiologischen Eigenschaften der Vakuolen in intakten Zellen möglichst nahekommen. Dazu zählt vor allem die Aufrechterhaltung des Protonengradienten zwischen Vakuole und Cytoplasma durch die Protonenpumpen am Tonoplasten (vgl. Abschnitt 1.1.3). Dieser elektrochemische Gradient energetisiert Transportsysteme für Ionen und Metabolite an dieser Membran, u.a. Kationenaustauscher, wie den $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ - oder den $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher. Da die in-situ-Vakuolen im Rahmen dieser Arbeit vor allem zur Charakterisierung des Protonentransportes und seiner Effektoren verwendet werden sollten, stand die Funktion der Protonenpumpen bei der Generierung von Protonengradienten im Vordergrund.

4.1.1 Charakterisierung der V-ATPase-Aktivität

Das ca. 750 kDa große Protein besteht aus zwei funktionellen Sektoren, die ihrerseits aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt sind. Der periphere, cytoplasmatische Sektor (V_1) katalysiert die ATP-Hydrolyse, der integrale, membrandurchspannende Sektor (V_o) bildet einen Protonenkanal [Übersichten u.a. in Ratajczak und Wilkins 2000; Maeshima 2001; Sze et al. 2002; Maeshima und Nakanishi 2002]. Die Protonenpumpe kann reversibel arbeiten, so dass auch ATP-Synthese über einen von der V-PPase (siehe Abschnitt 4.1.2) generierten pH-Gradienten möglich wird [Facanha und de Meis 1998].

Typische Eigenschaften der V-ATPase sollten auch in den in-situ-Vakuolen messbar sein. Dazu zählen u.a.:

1. eine von der MgATP- Konzentration abhängige Pumprate;
2. eine Inhibition durch Bafilomycin A_1 [Crider et al. 1994; Brauer et al. 1997a] oder Destruxin B [Muroi et al. 1994; Bandani et al. 2001] oder NO_3^- [Griffith et al. 1986].

Die Abbildungen 4-1 und 4-2 zeigen die vakuoläre Azidifizierung nach Zusatz von MgATP zum Perfusionsmedium. Der Ausgangs-pH-Wert der in-situ-Vakuolen (6,2 – 7,2) war

deutlich höher als der von Vakuolen intakter Zellen (4,3 – 6,4). Dies widerspiegelt sehr wahrscheinlich den Mangel an ATP und PP_i , während des Permeabilisierungsverfahrens. Obwohl alle Vakuolen mit der gleichen ATP-Konzentration perfundiert wurden, zeigte sich eine große Variabilität der Azidifizierungsraten. Die dabei erzielten Protonenkonzentrationen entsprechen ungefähr der Bandbreite des vakuolären pH-Wertes in Ganzzellen (Abb. 4-1).

Die Aktivität der Protonenpumpe wird sowohl durch den cytoplasmatischen als auch durch den vakuolären pH-Wert beeinflusst. Steigt der pH-Gradient zwischen Vakuole und Cytoplasma zu stark an, wird durch partielle Entkopplung der V-ATPase eine Verringerung der vakuolären Protonenaufnahme erreicht [Davies et al. 1994; Müller et al. 1999].

Auch bei den in-situ-Vakuolen wurde in dieser Arbeit nach ca. 40 min Anwesenheit von MgATP im Perfusionsmedium ein End-pH-Wert erreicht, der ein Gleichgewicht zwischen Protonenaufnahme und -efflux repräsentiert.

Die Abhängigkeit der initialen Azidifizierungsrate von der zugesetzten MgATP-Konzentration ist in Abbildung 4-3 dargestellt. Der hieraus ableitbare K_m -Wert liegt bei ca. 0,75 mM MgATP, was mit in der Literatur angegebenen Daten von ca. 0,5 mM MgATP, gemessen in isolierten Vakuolen [Johannes und Felle 1989], in etwa übereinstimmt.

Die V-ATPase-Hemmstoffe (Bafilomycin A_1 , Destruxin B und NO_3^-) zeigten als gemeinsame Wirkung die Auslösung eines Efflux von Protonen. Dies weist darauf hin, dass am Tonoplasten ein turnover von Protonen stattfindet, der zur Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Aufnahme und Efflux führt. Nach Hemmung der Protonenpumpe wird der ständig ablaufende Efflux messbar.

Beim Vergleich der Hemmstoffwirkungen fällt auf, dass die durch Bafilomycin A_1 oder Destruxin B ausgelösten Efflux von Protonen bereits teilweise kompensiert wurden, bevor der Hemmstoff aus dem Perfusionsmedium entfernt wurde (Abb. 4-4A, B). Dies weist auf einen Regelmechanismus zur Kompensation des Protonenverlustes hin: nach einer bestimmten Verringerung des Protonengradienten wird offenbar die Aufnahmerate von Protonen erhöht, vermutlich über die Änderung des Membranpotentials am Tonoplasten.

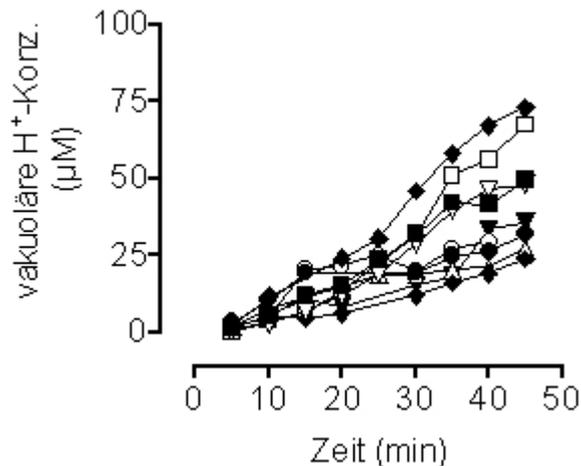


Abbildung 4-1: Erhöhung der Protonenkonzentration von in-situ-Vakuolen während der Perfusion mit 1 mM MgATP. pH-Kurven individueller, mit 1 mM MgATP energetisierter in-situ-Vakuolen. Präparation und Perfusion siehe 3.2, pH-Topographie nach 3.3.1.

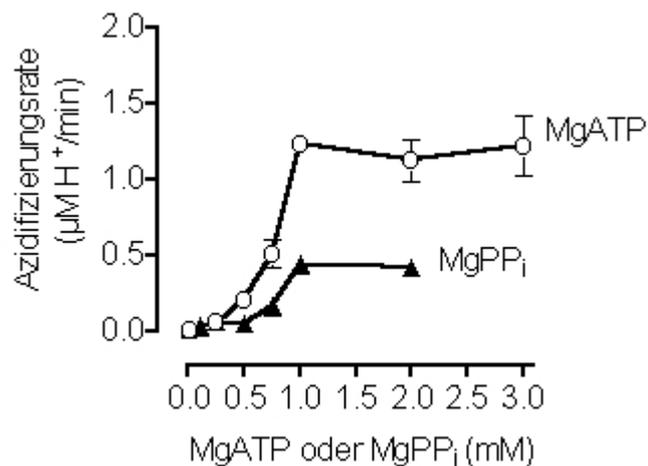


Abbildung 4-3: Abhängigkeit der initialen Azidifizierungsrate von in-situ-Vakuolen von der MgATP oder MgPP_i-Konzentration.

Die Werte sind Zuwächse der Protonenkonzentration zwischen 5 und 10 min nach MgATP oder MgPP_i-Zusatz. Es werden Mittelwerte \pm SD der jeweils höchsten 3 Werte bei jeder gegebenen Substratkonzentration dargestellt. Diese wurden aus 3 unabhängigen Experimenten mit 10 – 12 Vakuolen pro Konzentration ausgewählt. Präparation und Perfusion siehe 3.2.

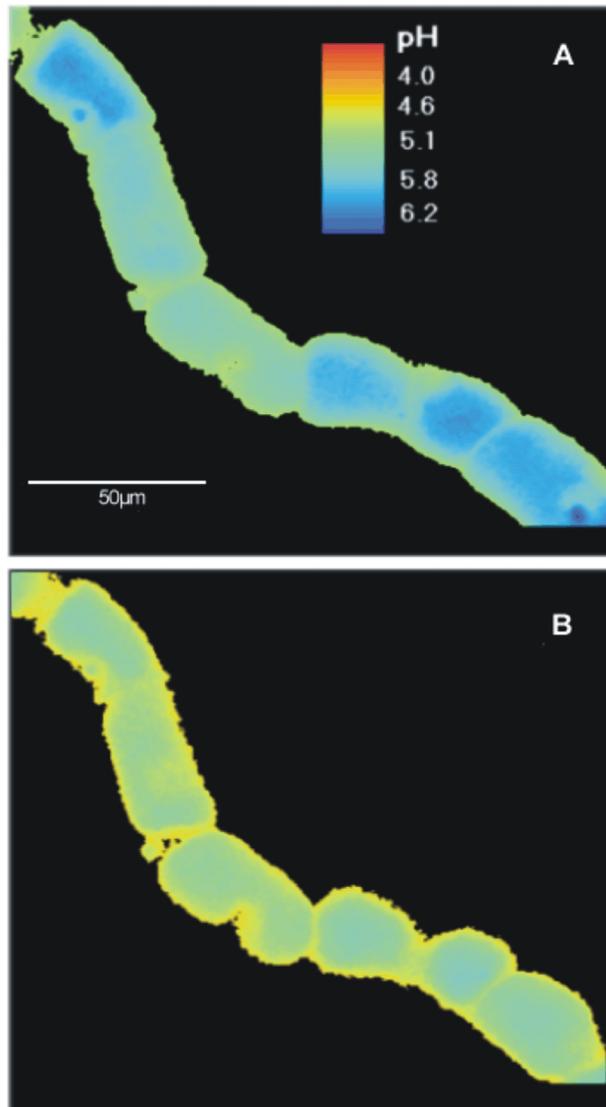


Abbildung 4-2: ATP-abhängige Azidifizierung von in-situ-Vakuolen.

pH-Topographie mit klassischer Mikroskopie, siehe 3.3.1; Vorinkubation der Zellen 30 min mit 50 nM CFDA-AM, Präparation und Perfusion siehe 3.2.

A: 5 min, B: 10 min nach Zusatz von 3 mM MgATP.

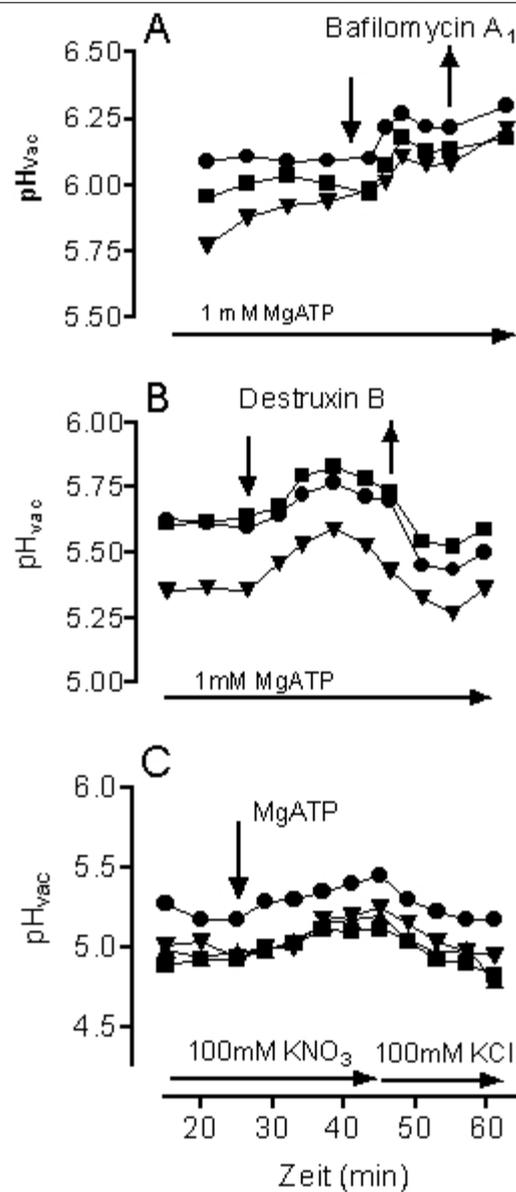


Abbildung 4-4: Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss von Inhibitoren der V-ATPase.

pH-Kurven individueller, mit 1 mM MgATP energetisierter in-situ-Vakuolen nach Zusatz von:

- 200 nM Bafilomycin A₁ (A),
- 10 μ M Destruxin B (B),
- 100 mM KNO₃ (nach 45 min wurden 100 mM KNO₃ durch 100 mM KCl ersetzt) (C).

Präparation und Perfusion siehe 3.2; Pfeile bezeichnen den Zusatz (\downarrow) bzw. das Entfernen (\uparrow) der Effektoren aus dem Perfusionsmedium.

Dieser kompensatorische Mechanismus war nach dem Ersatz von KCl durch KNO_3 nicht erkennbar (Abb. 4-4C). Dort begann die Wiederaufnahme von Protonen erst nach dem Rücktausch von KNO_3 gegen KCl. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass bei diesen Experimenten nicht nur NO_3^- als Hemmstoff der V-ATPase zugesetzt wurde, sondern Cl⁻ als Stimulator entzogen wurde. Ein weiterer Grund könnte die durch NO_3^- ausgelöste Dissoziation peripherer Untereinheiten der V-ATPase [Ward et al. 1992; Dschida und Bowman 1995] sein.

4.1.2 Charakterisierung der V-PPase-Aktivität

Im Unterschied zur V-ATPase besteht die V-PPase aus nur einem dimeren 80 kDa Polypeptid, welches transmembranäre Domänen sowie cytosolische und vakuoläre “loops” aufweist [Übersicht in Maeshima 2000]. Diese Protonenpumpe wird hauptsächlich als “ancillary enzyme” angesehen, das heißt, sie gewinnt an Bedeutung, wenn die Aktivität der V-ATPase zur Aufrechterhaltung des Protonengradienten zwischen Vakuole und Cytoplasma nicht ausreicht, beispielsweise bei ATP-Mangel [White et al. 1990]. Interessanterweise hat die V-PPase in wachsenden Pflanzenzellen den größten Anteil an der Aufrechterhaltung des pH-Gradienten zwischen Vakuole und Cytoplasma, wahrscheinlich bedingt durch das vermehrte Vorkommen von PP_i während der Protein- oder der RNA-Synthese [Maeshima und Nakanishi 2002].

Auch in den hier untersuchten in-situ-Vakuolen konnte eine Akkumulation von Protonen nach Zusatz von MgPP_i festgestellt werden (Abb. 4-3).

Es ist zu erkennen, dass die Initialrate der vakuolären Protonenaufnahme durch die V-PPase eine geringere Effizienz des Protonentransports erreicht als die V-ATPase, was sich in einem langsameren pH-Abfall und einer niedrigeren maximalen Azidifizierungsrate bei sättigender PP_i -Konzentration widerspiegelt. Die unterschiedlichen Transportkapazitäten der beiden Protonenpumpen am Tonoplasten sind u.a. durch die unterschiedliche Stöchiometrie der V-ATPase und der V-PPase (V-ATPase: 2-3 H^+/ATP ; V-PPase: 1 H^+/PP_i) [Übersicht in Sze et al. 1999] bedingt, was auch ein Hinweis auf die “ancillary enzyme” Funktion der V-PPase ist [White et al. 1990; Ratajczak und Wilkins 2000].

Da PP_i in wässriger Lösung Mg-Komplexe unterschiedlicher Stöchiometrie ausbildet, resultiert daraus eine Vielzahl von Substraten beziehungsweise Effektoren der V-PPase. Komplexe sind zum Beispiel MgPP_i^{2-} oder Mg_2PP_i [White et al. 1990; Leigh et al. 1992;

Baykov et al. 1993; Gordon-Weeks et al. 1996].

Die in-situ-Vakuolen von *Eschschozia* zeigten die erwartete starke Abhängigkeit der V-PPase-Aktivität von der Mg^{2+} -Konzentration. Bei einem konstanten Mg^{2+} -Gehalt von 0,25 mM wurden über einen weiten Bereich von PP_i -Konzentrationen (0,25 – 1,5 mM) sehr niedrige, konstante Azidifizierungsraten ($\sim 0,02 \mu M H^+ / min$) gemessen. Diese Transportaktivität war damit um eine Größenordnung kleiner als die in Abbildung 4-3 dargestellten maximalen Raten bei stöchiometrischen $MgPP_i$ -Verhältnis.

Eine typische Eigenschaft der V-PPase ist die Aktivierung durch K^+ [White et al. 1990; Leigh et al. 1994]. In den hier vorgestellten Experimenten wurde erwartungsgemäß nach Austausch von K^+ gegen Na^+ im Perfusionsmedium erwartungsgemäß eine Alkalisierung der in-situ-Vakuolen gemessen, welche wieder eine Verschiebung des Protonen-turnovers in Richtung des Efflux widerspiegelt (Abb. 4-5A).

Nichthydrolysierbare Pyrophosphat-Analoga, wie Etidronsäure, sind als Hemmstoffe der V-PPase in tierischen und pflanzlichen Zellen sowie in Bakterien bekannt [Smirnova et al. 1988; Zhen et al. 1994; Gordon-Weeks et al. 1999]. Diese Wirkung wurde auch in den in-situ-Vakuolen von *Eschschozia* beobachtet. Abbildung 4-5B zeigt einen reversiblen Verlust von vakuolären Protonen nach Zusatz von 1 mM Etidronat bei Anwesenheit von 3 mM $MgPP_i$ als Energiequelle.

Als ein weiterer bekannter Hemmstoff der V-PPase wurde Phytinsäure [Takasu et al. 1997] eingesetzt, wobei eine Konzentration von 1 mM die durch 3 mM $MgPP_i$ aktivierte Protonenpumpe inhibierte (Abb. 4-5C). (Die für den inhibitorischen Effekt notwendige Phytoatkonzentration ist wahrscheinlich etwas geringer als die hier eingesetzte, da schwerlösliches Mg-Phytoat eine schwache Trübung der Lösung hervorrief.)

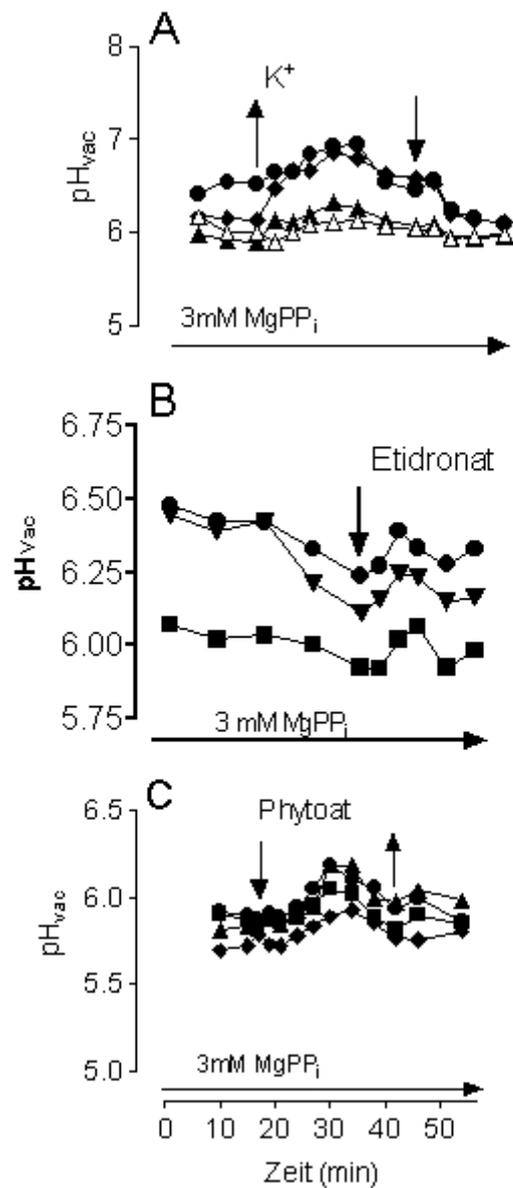


Abbildung 4-5: Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss von Inhibitoren der V-PPase.

pH-Kurven individueller, mit 3mM MgPP_i energetisierter in-situ-Vakuolen nach:

- K⁺-Entzug (Ersatz von 100 mM KCl gegen 100 mM NaCl) (A),
- Zusatz von 1 mM Na-Etidronat (B),
- Zusatz von 1 mM Na-Phytoat (C).

Präparation und Perfusion siehe 3.2; Pfeile bezeichnen den Zusatz (↓) bzw. das Entfernen (↑) der Effektoren aus dem Perfusionsmedium.

4.1.3 Wechselwirkungen zwischen V-ATPase und V-PPase

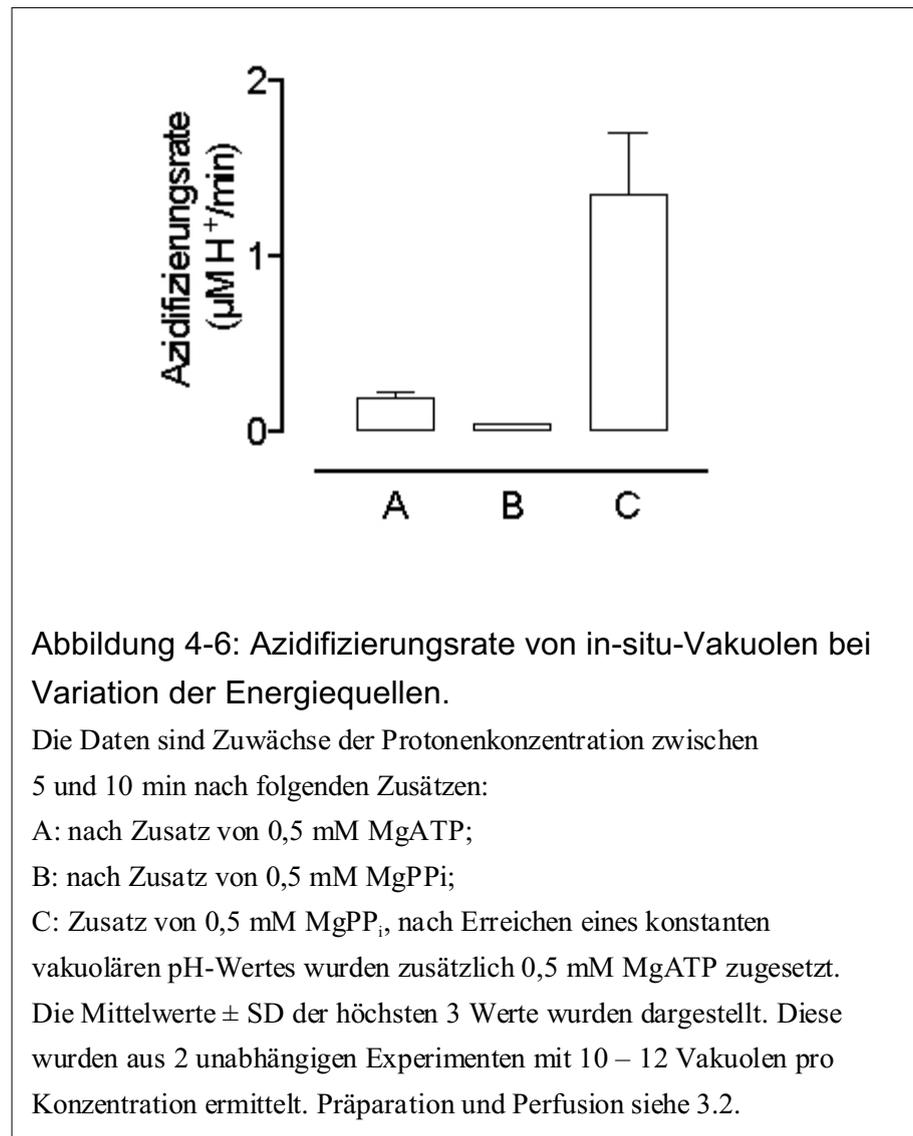
Die Initialrate des ATP-abhängigen Protonentransportes konnte in Tonoplastenvesikeln von *Kalanchoe daigremontiana* und *blossfeldiana* bis auf das Dreifache der normalen Rate erhöht werden, wenn vor der Aktivierung der V-ATPase die V-PPase durch PP_i -Zusatz eingeschaltet wurde [Marquardt-Jarczyk et al. 1990; Fischer-Schliebs et al. 1997]. Enge Assoziationen von Untereinheiten beider Protonenpumpen wurden durch die Immunopräzipitationen von Tonoplastenproteinen belegt [Fischer-Schliebs et al. 1997]. Für eine Interaktion von V-ATPase und V-PPase sprechen ebenfalls Experimente an Vakuolen von *Acer pseudoplatanus*. Hier erfolgte nach Hemmung der V-ATPase auch eine Inhibition des PP_i -abhängigen Protonentransports [Fraichard et al. 1994].

Um zu prüfen, ob beide an der in-situ-Vakuole in *Eschscholzia* aktiven Protonenpumpen einander gegenseitig beeinflussen, wurden die Substrate beider Pumpen (MgATP und Mg PP_i) in verschiedener Reihenfolge zugesetzt.

Bei gleichzeitigem Zusatz von je 0,5 mM MgATP und Mg PP_i summierten sich etwa die jeweils mit MgATP und Mg PP_i allein gemessenen Initialraten der vakuolären Azidifizierung. Dies spricht dafür, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit die Protonenpumpen voneinander unabhängig arbeiten (vgl. Abb. 4-3).

Setzte man jedoch zunächst 0,5 mM Mg PP_i zu und aktivierte nach der Gleichgewichtseinstellung des vakuolären pH-Wertes die V-ATPase mit 0,5 oder 1 mM MgATP, dann beobachtete man eine drastische Erhöhung der Initialrate der vakuolären Azidifizierung (Abb. 4-6), welche die Summe der jeweils einzeln gemessenen Initialraten der V-ATPase und der V-PPase deutlich überschritt. Es wird also eine der beiden Protonenpumpen durch die Aktivität der anderen stimuliert.

Die Generierung derart hoher Azidifizierungsraten durch die V-PPase ist unwahrscheinlich, weil vor allem aus stöchiometrischen Gründen (V-ATPase: 2-3 H^+ /ATP; V-PPase: 1 H^+ / PP_i [Übersicht in Sze et al. 1999]) die V-ATPase eine höhere Transportkapazität besitzt (vgl. auch Abb.4-3). Deshalb spricht der in Abbildung 4-6 dargestellte Effekt für eine Stimulierung der V-ATPase durch die V-PPase.



4.1.4 Kation/Proton-Austauscher der in-situ-Vakuole

Verschiedene Ionen werden am Tonoplasten durch Cotransport bewegt, wobei der Protonengradient als Energiequelle dient. Dabei werden Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ im antiport, das heißt in Gegenrichtung zu den ausfließenden Protonen, aufgenommen. Somit trägt der durch die V-ATPase und V-PPase generierte Protonengradient wesentlich zur zellulären Ionenkompartimentierung bei. Die Vakuole ist der Hauptakkumulationsort für Na⁺ und Ca²⁺ in der Pflanzenzelle [Übersichten in Rudd und Franklin-Tong 1999; Blumwald et al. 2000]. So ermöglichen zum Beispiel die niedrigen Ca²⁺-Spiegel im Cytosol eine “second messenger”-Funktion dieses Kations (vgl. Abschnitt 1.2.3). Toxische Na⁺-Konzentrationen im Cytoplasma können durch Na⁺/H⁺-Antiporter vermieden werden.

4.1.4.1 Ca²⁺/H⁺-Antiporter

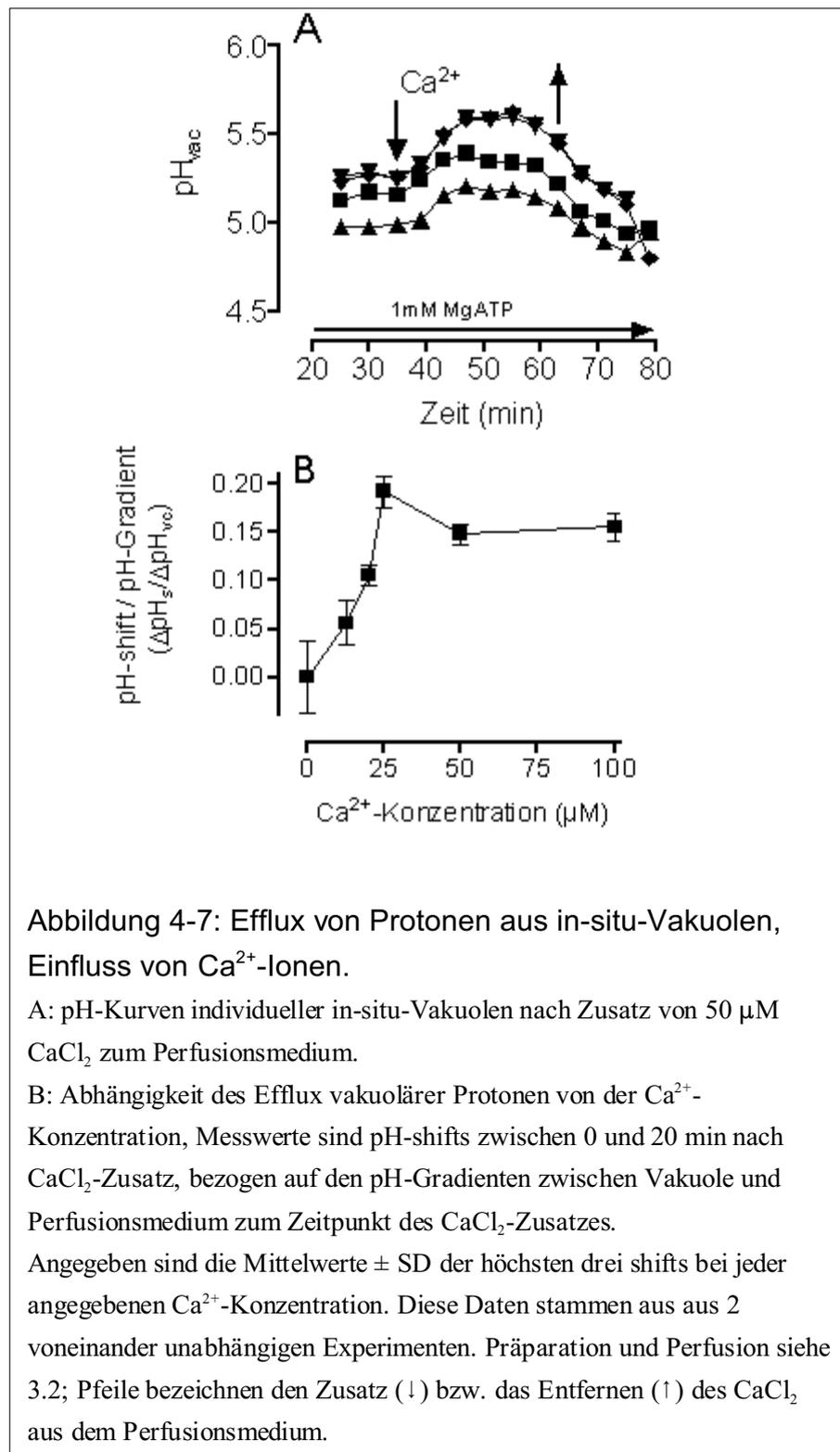
Dieser Transporter wurde u.a. in Tonoplastenvesikeln von *Avena sativa* [Schumaker und Sze 1986], *Beta vulgaris* [Blackford et al. 1990] oder *Vigna radiata* [Ueoka-Nakanishi et al. 1999] nachgewiesen. Er ist wahrscheinlich für die hohen vakuolären Ca^{2+} -Konzentrationen (im millimolaren Bereich) verantwortlich [Ueoka-Nakanishi et al. 2000]. Da der Ca^{2+} -Spiegel als messenger (vgl. Abschnitt 1.2.3) des zellulären Signaltransfers starke Veränderungen durchläuft, ist eine effektive Kontrolle der Fluxes dieses Kations unerlässlich. Dabei spielt der $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter des Tonoplasten eine wichtige Rolle [Miseta et al. 1999]. Deshalb wurde auch am Tonoplasten von *Eschscholzia californica* ein solcher Transporter erwartet.

Setzte man Ca^{2+} dem Perfusionsmedium zu, erfolgte eine Alkalisierung der in-situ-Vakuolen, auch bei aktiver V-ATPase (Abb. 4-7A). Ausgehend von diesen Experimenten wurde eine Abhängigkeit der vakuolären Alkalisierung von der extravakuolären Ca^{2+} -Konzentration gefunden (Abb. 4-7B). Ab ca. $12 \mu\text{M}$ Ca^{2+} erfolgte ein messbarer Protonenefflux, die halbmaximale Effluxrate wurde bei $\sim 15 \mu\text{M}$ gefunden.

Obwohl die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration in der intakten Zelle nur im nanomolaren Bereich liegt [Bush 1995], wurden in anderen Spezies ähnliche hohe K_m -Werte für den $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter gemessen ($\sim 10 - 40 \mu\text{M}$) [Schumaker und Sze 1986; Blackford et al. 1990; Ueoka-Nakanishi et al. 1999]. Offenbar kann ein Ca^{2+} -ausgelöster Protonenefflux nur nach extremen Anstiegen des cytosolischen Ca^{2+} erwartet werden. Eine durch den pH-Gradienten getriebene Ca^{2+} -Aufnahme ist jedoch bereits bei mikromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen vorstellbar.

4.1.4.2 Na^+/H^+ -Antiporter

Natrium-gekoppelte Kationenaustauscher kommen in Pro- und Eukaryoten vor [Übersicht in Padan et al. 2001], beispielsweise wurden Gene für Na^+/H^+ -Austauscher in *Escherichia coli* (nhaB) [Pinner et al. 1992], in *Synechocystis sp.* (SynNhaP) [Hamada et al. 2001], in *Saccharomyces cerevisiae* (NHX1) [Nass et al. 1997], in Säugetieren (NHE) [Übersicht in Counillon und Pouyssegur 2000] oder in *Arabidopsis thaliana* (AtNHX1) [Apse et al. 1999; Quintero et al. 2000], *Oryza sativa* (OsNHX1) [Fukuda et al. 1999] nachgewiesen und zum Teil kloniert.



Im Verlaufe der Evolution haben Pflanzenzellen statt des ursprünglichen “Natrium-Systems” ein “Protonen-System” zur Generierung elektrochemischer Gradienten entwickelt [Sakano 1998], so dass eine strenge Regulation des cytosolischen Na^+ notwendig ist.

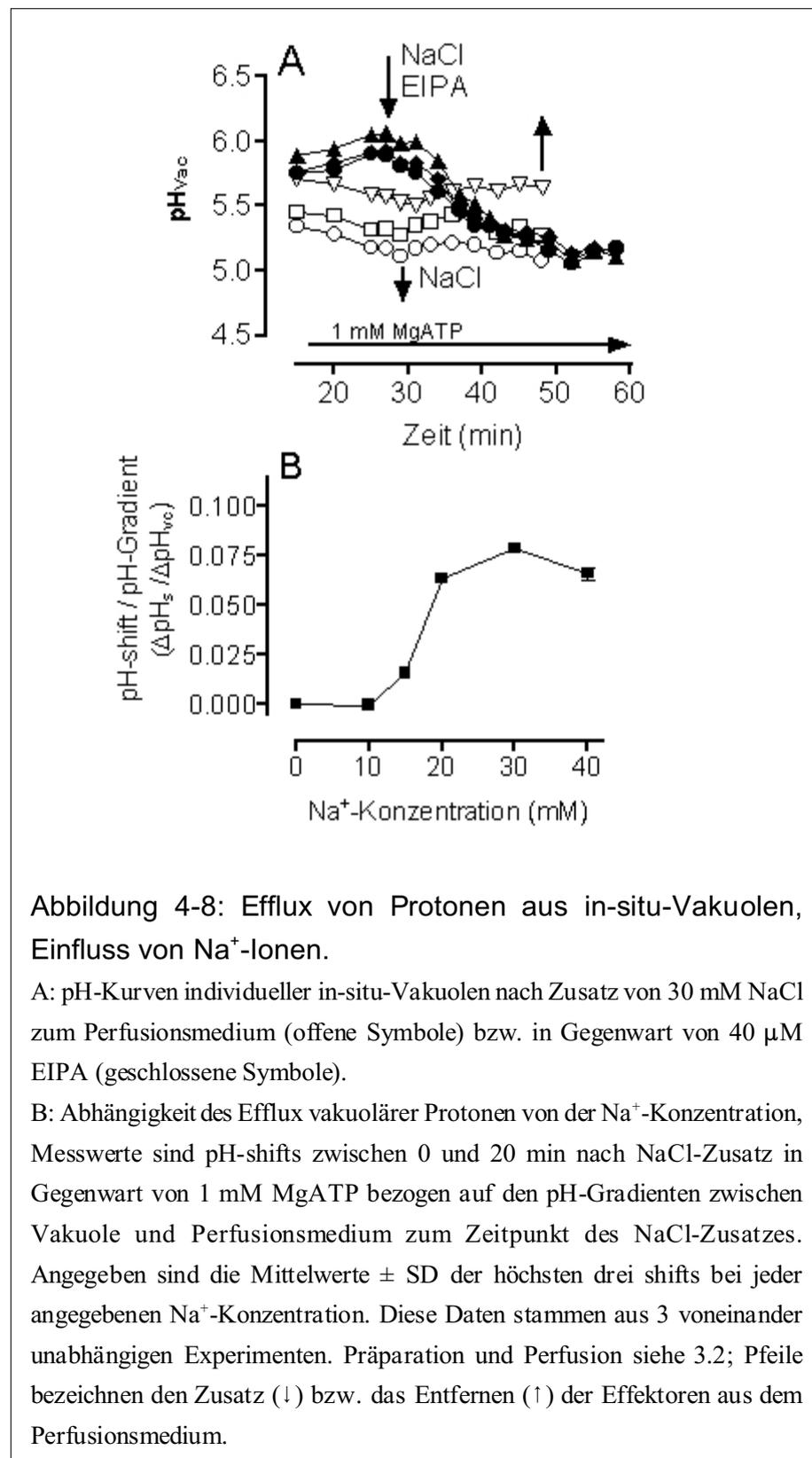
Ein hohes cytosolisches K^+/Na^+ -Verhältnis (100 mM/10 mM in *Arabidopsis thaliana* [Gaxiola et al. 1999; Maathuis und Amtmann 1999]) ist u.a. für die Proteinbiosynthese essentiell [Wyn Jones et al. 1983]. Glycophyten (salzsensitive Pflanzen) und Halophyten (salztolerante Pflanzen) weisen eine ähnliche Na^+ -Sensitivität cytosolischer Enzyme auf [Glenn et al. 1999]. Deshalb sind sowohl an der Plasmamembran (z.B. SOS [Shi et al. 2000; Liu et al. 2000; Quintero et al. 2002]) als auch am Tonoplasten der Halophyten (zum Beispiel AtNHX1 [Apse et al. 1999]) Na^+/H^+ -Antiporter aktiv [Übersichten in Blumwald et al. 2000; Hasegawa et al. 2000]. Na^+ -Ionen beeinflussen den Zellturgor, den Wasserhaushalt der Zelle und folglich auch das Zellwachstum [Barkla und Pantoja 1996; Quintero et al. 2000]. Dies erklärt u.a. warum diese Transporter sowohl in Halophyten wie auch in Glycophyten vorhanden sind.

Grundsätzlich legt die Existenz eines Na^+/H^+ -Austauschers die Möglichkeit nahe, dass nicht nur der auswärts gerichtete Protonengradient für die Na^+ -Aufnahme, sondern auch ein einwärts gerichteter Na^+ -Gradient als Triebkraft für den Protonenefflux genutzt werden kann.

Abbildung 4-8A zeigt eine deutliche Alkalisierung der in-situ-Vakuolen von *Eschscholzia* nach Zusatz von 30 mM NaCl zum Perfusionsmedium bei aktiver V-ATPase. Ausgehend von diesem experimentellen Ansatz wurde die in Abbildung 4-8B dargestellte Abhängigkeit des Efflux vakuolärer Protonen von der angebotenen Na^+ -Konzentration gefunden. Ein Efflux von Protonen erfolgte bei Na^+ -Konzentrationen > 10 mM NaCl, eine Sättigung wurde ab ca. 20 mM erreicht, die halbmaximale Aufnahme bei ungefähr 18 mM NaCl.

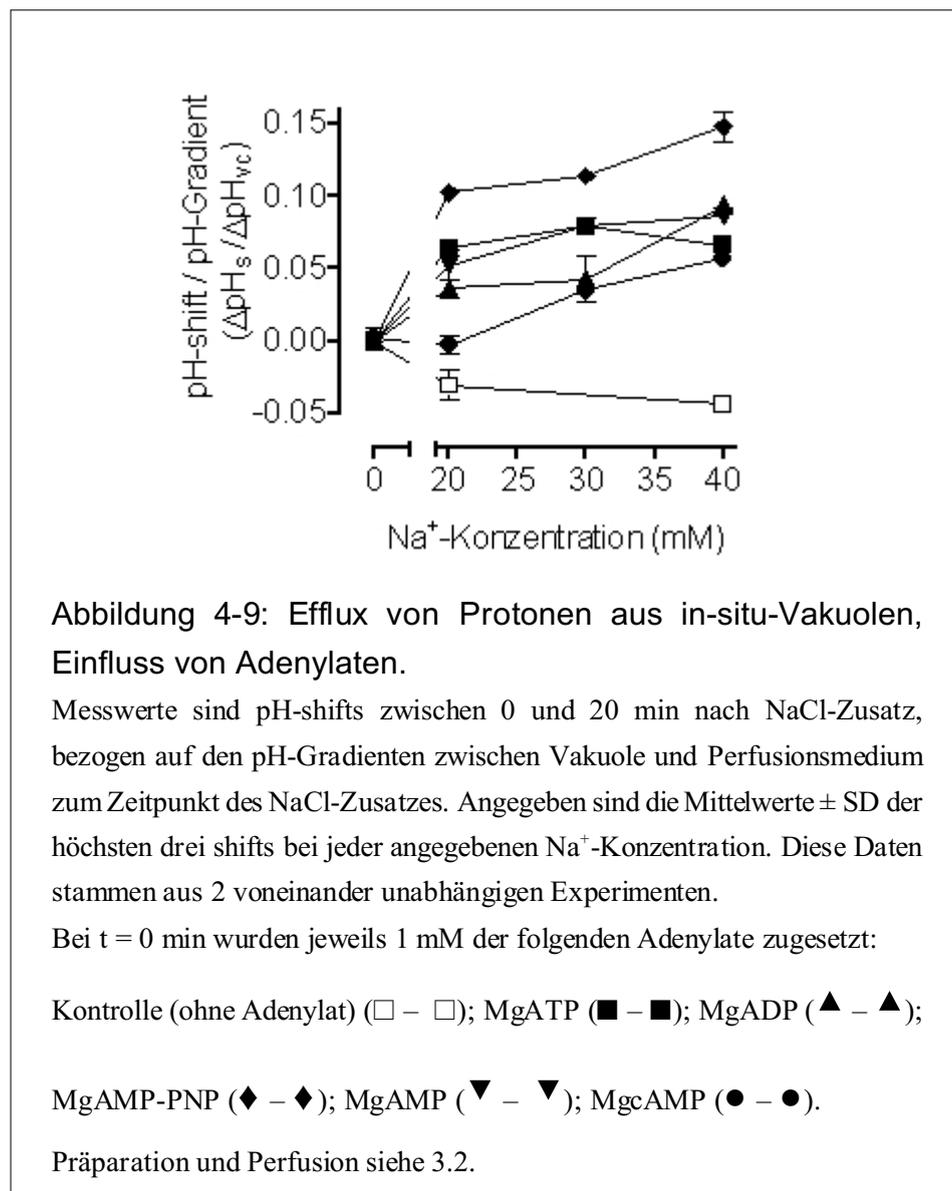
K_m -Werte dieser Größenordnung sind auch aus anderen Pflanzenspezies bekannt, beispielsweise 11 mM in *Arabidopsis thaliana* [Darley et al. 2000]; 11,5 mM in *Salicornia bigelovii* [Parks et al. 2002] oder 51 mM in *Mesembryanthemum crystallinum* [Barkla et al. 1995].

Der Austausch von extravakuolärem Na^+ durch vakuoläre H^+ sollte prinzipiell auch in Abwesenheit von Energiequellen (MgATP; MgPP_i) möglich sein. Abbildung 4-9 zeigt jedoch, dass Na^+ -Konzentrationen bis 40 mM keinen Anstieg des vakuolären pH-Wertes in Abwesenheit der oben genannten Energiequellen auslösten. Es wurde deshalb geprüft, ob



der in Abbildung 4-8B dargestellte Na⁺-abhängige Protonenefflux die Anwesenheit von ATP erfordert. Um zu verhindern, dass das eingesetzte ATP zu einer sofortigen Wiederaufnahme

freigesetzter Protonen führt, wurde das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PNP eingesetzt. In der Mehrzahl der Experimente bewirkte der Zusatz des Analogons denselben Effekt wie MgATP. Für die stimulierende Wirkung auf den Na^+/H^+ -Austausch ist also nicht die Aktivität der Protonenpumpe oder die Spaltung von ATP, sondern nur die Anwesenheit eines Adenylats erforderlich. Dies wurde in weiteren Experimenten bestätigt, bei denen ADP, AMP, cAMP ebenfalls den Protonenfluss ermöglichten (Abb. 4-9).



Eine ähnliche Adenylat-Abhängigkeit wurde auch für alle Isoformen von Na^+/H^+ -Austauschern (NHE) der Plasmamembran und endosomalen Membranen in tierischen Zellen beschrieben [Demaurex et al. 1997; Cabado et al. 1996; Aharonovitz et al. 1999].

Amilorid und dessen Analoga EIPA, MIA, DMA inhibieren den Na^+/H^+ -Antiporter sowohl in tierischen Zellen [Orlowski und Kandasamy 1996] als auch in Pflanzenzellen [Blumwald et al. 1985; Darley et al. 2000; Parks et al. 2002]. Dabei bindet der Inhibitor an die N-terminale, integrale Membran-Domäne, welche den Na^+/H^+ -Austausch katalysiert [Orlowski und Kandasamy 1996].

In den hier vorgestellten Experimenten wurde nach Zusatz von 40 μM EIPA die durch NaCl ausgelöste Erhöhung des vakuolären pH-Wertes verhindert (Abb. 4-8A). Ähnliche Hemmeffekte wiesen MIA beziehungsweise DMA auf (Daten nicht gezeigt). Damit ist das Vorhandensein eines Amilorid-sensitiven Na^+/H^+ -Austauschers im Tonoplasten von *Eschscholzia californica* sehr wahrscheinlich.

Eine Prüfung auf eine mögliche K^+ -Abhängigkeit des Protonenefflux konnte nicht vorgenommen werden, da zur Perfusion der in-situ-Vakuolen eine Mindestkonzentration an K^+ (70 mM) notwendig war (vgl. Abschnitt 2.1.2). Diese entspricht in etwa der im Cytoplasma höherer Pflanzen vorkommenden Konzentration [Walker et al. 1996; Gaxiola et al. 1999]. Variationen der K^+ -Konzentration im Bereich 70 – 100 mM, wobei als „Auffüllosmotikum“ Sorbitol benutzt wurde (vgl. Abschnitt 2.1.2), beeinflussten den LPC-ausgelösten Protonenefflux nicht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Zusatz einer osmotisch gleichwertigen Menge an NaCl (30 mM) zum maximalen Protonenefflux aus der Vakuole führte (Abb. 4-8B). Damit wurde gezeigt, dass K^+ keine oder eine deutlich kleinere Aktivität zur Auslösung des pH-shifts besitzt als Na^+ , und K^+ -Konzentrationen oberhalb von 100 mM führten zu einem deutlichen, offenbar osmotisch bedingten Wasserverlust aus den Vakuolen und somit zu deren Schrumpfung.

Die bisher Experimente zeigen, dass die nach osmotischer Permeabilisierung der Plasmamembran zugänglichen Vakuolen wesentliche, typische Eigenschaften des vakuolären Protonentransports in-situ aufweisen:

1. Die Initialrate des Protonentransports in die Vakuole (0,1-1,3 $\mu\text{M H}^+/\text{min}$) wird durch die unter zellulären Bedingungen zu erwartenden Konzentrationen der Energiequellen stimuliert. Damit ist es möglich, diese Pumpen selektiv durch Zusatz von MgATP oder MgPP_i zu aktivieren.
2. Beide Protonenpumpen zeigen die erwartete Abhängigkeit ihrer Aktivitäten von

stimulierenden Ionen beziehungsweise Inhibitoren. Die Tatsache, dass nach dem Erreichen eines konstanten pH-Gradienten der Zusatz eines Hemmstoffes der V-ATPase oder der V-PPase zu einem Verlust von Protonen aus der Vakuole führt, weist darauf hin, dass ein "turnover" dieser Ionen über den Tonoplasten, das heißt ein Gleichgewicht zwischen aktiver Aufnahme und passivem H⁺-Efflux, stattfindet.

3. Die Stimulation des Protonentransportes in die Vakuole durch gegenseitige Beeinflussungen der beiden Pumpen (vgl. Abschnitt 4.1.3) demonstriert eine weitere, aus intakten Zellen bekannte Kontrolle des vakuolären Protonentransports. Sie ist damit ein weiterer Hinweis auf die funktionelle Intaktheit des Tonoplasten der in-situ-Vakuole.

Die Kontrolle der Aktivität der Protonenpumpen über die Konzentration der Energiequellen MgATP und MgPP_i gestattet es, die Rate der Ansäuerung der Vakuole auf einen bestimmten Bereich einzustellen. Dies erleichtert Tests zur Auffindung von Verbindungen, welche einen Efflux vakuolärer Protonen, das heißt eine Alkalisierung der Vakuole, auslösen: Dieser Effekt stellt sich dann als eine Abweichung von einer langsam fallenden pH-Kurve dar (zum Beispiel in Abb. 4-1). Die Triebkraft des Protonenefflux aus der Vakuole ist der Gradient zwischen hoher Protonenkonzentration in der Vakuole und niedrigerer im Außenmedium.

4.2 Suche nach Hydrolyse-Produkten von Phospholipiden mit Wirkung auf den vakuolären Protonentransport

4.2.1 Die Beteiligung von Phospholipasen an der pflanzlichen Signaltransduktion

Phospholipasen sind in der letzten Zeit häufig als Signalenzyme für die Auslösung vielfältiger biologischer Effekte erkannt worden. In pflanzlichen Objekten sind Hydrolyseprodukte von Phospholipasen als potentielle Signalmoleküle an der Auxin-induzierten Signalkaskade [Scherer et al. 1997; Paul et al. 1998], Prozessen der Samenreifung [Ryu et al. 1996; Ritchie und Gilroy 1998], Seneszenzerscheinungen [Fan et al. 1997], der osmotischen Regulation [Munnik et al. 2001] und vor allem bei Pathogenabwehrmechanismen beteiligt.

Beispiele für die Beteiligung von Phospholipasen an der Pathogenabwehr sind: die elicitorspezifische PLA₂-Aktivierung in Soja-Kulturen (*Glycine max*) [Chandra et al. 1996]; eine durch Verwundung, Systemin oder Oligosaccharide ausgelöste PLA-Aktivität in Tomatenblättern (*Lycopersicon esculentum*) [Narvaez-Vasquez et al. 1999]; die durch

verschiedene Elicitoren ausgelöste Phospholipase C-Aktivierung in Zellsuspensionskulturen der Tomate [van der Luit et al. 2000]; oder eine Erhöhung der Phospholipase D-Aktivität nach Xylanase-Zusatz zu Zellsuspensionskulturen der Tomate [Laxalt et al. 2001; Übersichten in Chapman 1998; Munnik et al. 1998; Munnik 2001; Wang 2001].

Das bisher vorgestellte in-situ-System zur Untersuchung vakuolärer Transportvorgänge wurde nun benutzt, um Verbindungen aufzufinden, welche Protonenflüsse am Tonoplasten auslösen können. Dabei erschienen die durch Phospholipasen A₂ (PLA₂) gebildeten Hydrolyseprodukte von Phospholipiden aus mehreren Gründen als attraktive Test-Kandidaten:

1. In der verwendeten Zellkultur von *Eschscholzia californica* konnte mehrfach die elicitorausgelöste Aktivierung einer PLA₂ nachgewiesen werden [Roos et al. 1999; Hollstein 2001; Nitzsche 2001; Schwartz 2001; Viehweger et al. 2002].
2. Eine Beziehung dieser Enzymaktivierung zur Auslösung des Alkaloidstoffwechsels ergab sich daraus, dass
 - a. beide Effekte Ca²⁺-unabhängig und durch die gleichen Konzentrationen des Hefeelicitors (1 µg/ml) auslösbar sind,
 - b. eine Ausschaltung der PLA₂-Aktivierung durch Vorbehandlung mit externen Oxidationsmitteln, wie Hexabromoiridat (V) oder Ferricyanid, zu einem Verlust der Elicitierung des Sekundärstoffwechsels führte [Roos et al. 1999].
3. Ca. 2 – 5 min nach Elicitorkontakt konnte in *Eschscholzia*-Zellen eine Azidifizierung des Cytoplasmas, hervorgerufen durch Efflux vakuolärer Protonen, nachgewiesen werden [Roos et al. 1998]. Die in 1. genannte PLA₂-Aktivierung geschah in einem Zeitraum zwischen 0 und 2 min nach Elicitorzusatz [Roos et al. 1999; Hollstein 2001; Nitzsche 2001; Schwartz 2001; Viehweger et al. 2002], das heißt unmittelbar vor dem Zeitraum, in dem vakuoläre Protonenabgabe beobachtet wurde.

4.2.2 Spaltprodukte von Phospholipiden beeinflussen den vakuolären Protonenpool in-situ
Zunächst wurde die Wirkung von Lysophospholipiden und freien Fettsäuren auf den pH-Wert von in-situ-Vakuolen untersucht.

Dabei löste Lysophosphatidylcholin (LPC) einen deutlichen Efflux vakuolärer Protonen aus (Abb. 4-10, 4-11). Dieser Efflux ist unabhängig von der Kettenlänge oder dem

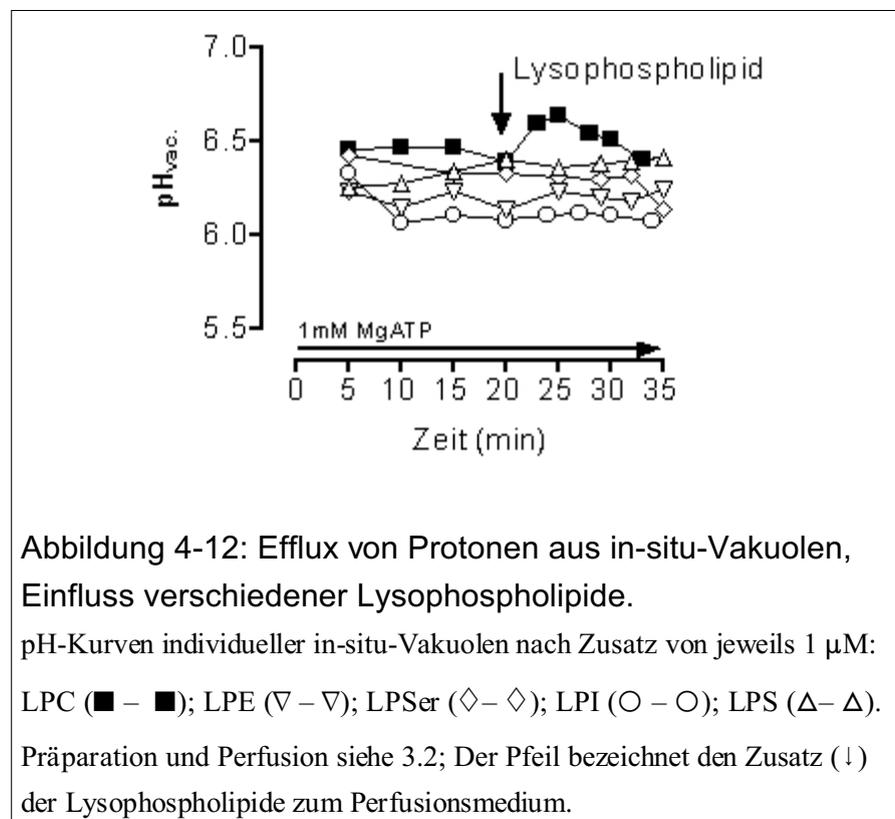
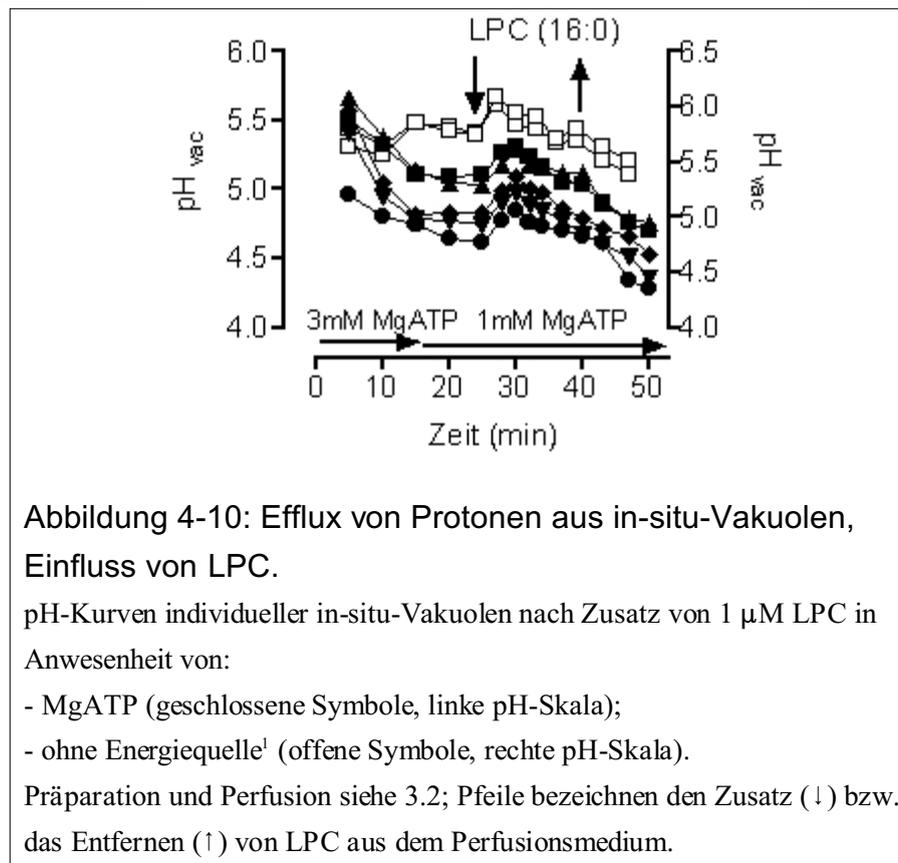
Sättigungsgrad der Fettsäure in sn1-Position des LPC. Im Gegensatz dazu beeinflussten Lysophospholipide mit anderen polaren Kopfgruppen, wie Lysophosphatidylethanolamin (LPE), Lysophosphatidylserin (LPS), Lysophosphatidylinositol (LPI) und Lysophosphatidsäure (LPA) nicht den pH-Wert der in-situ-Vakuolen. Abbildung 4-12 zeigt den typischen pH-Verlauf in in-situ-Vakuolen nach Applikation dieser Verbindungen.

Freie Fettsäuren verschiedener Kettenlängen und unterschiedlicher Sättigungsgrade konnten keinen vakuolären Protonenefflux induzieren (Tab. 4-1).

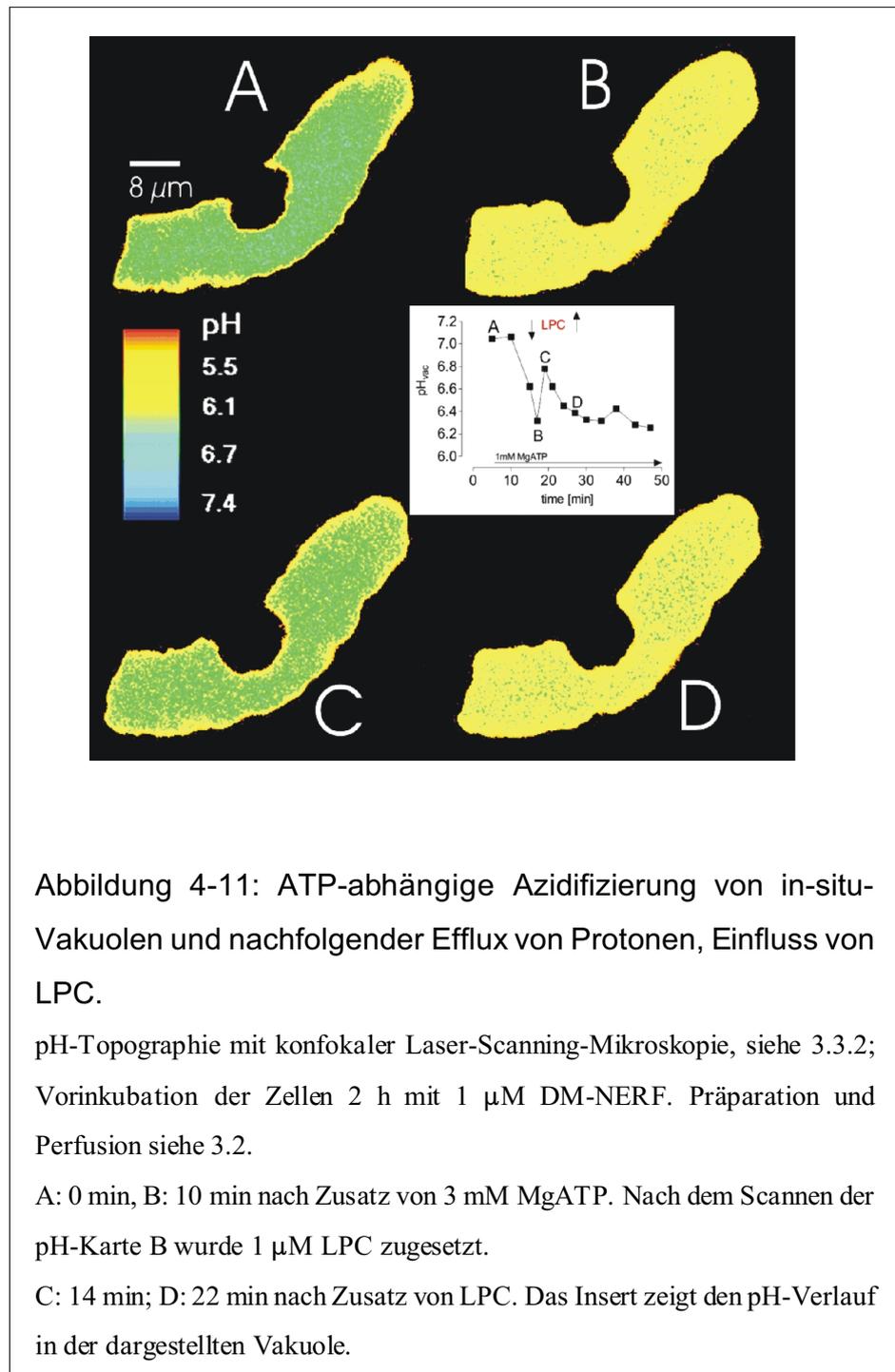
Im Gegensatz zu LPC zeigte das entsprechende Substrat, das Phospholipid Phosphatidylcholin (PC), keinen Einfluss auf die Protonenkonzentration der in-situ-Vakuole. Nach Zusatz von Diacylglycerol (DAG) wurde eine dem LPC-Effekt vergleichbare Alkalisierung der in-situ-Vakuole gefunden (Abb. 4-18), jedoch nur bei Ca^{2+} -Konzentrationen $\geq 25 \mu\text{M}$.

Einen Überblick über alle getesteten Verbindungen gibt Tabelle 4-1. Außer LPC und DAG konnte keine der anderen Substanzen einen Efflux vakuolärer Protonen auslösen, was auf eine hohe Spezifität beider Interaktionen mit der Vakuole hinweist.

Nach Inkubation von Plasmamembranvesikeln mit PLA_2 aus *Apis mellifera* und nachfolgender Ultrafiltration (5 kDa) zeigte das Filtrat ähnliche vakuoläre Alkalisierungsraten wie LPC (Tab. 4-1). Angesichts der hohen Spezifität bei der Auslösung des Protonenefflux spricht dieses Ergebnis dafür, dass das Signalmolekül LPC auch aus den *Eschscholzia*-Lipiden durch PLA_2 -Einwirkung gebildet werden kann.



¹Nach Permeabilisierung erhielten die Vakuolen für 30 min 1 mM MgATP, dieses wurde vor Versuchsbeginn entfernt.



Getestete Verbindung (Fettsäurekettenlänge: Anzahl der Doppelbindungen)	Anstieg des vakuolären pH-Wertes¹
L- α -Phosphatidylcholin (16:0/16:0)	-
L- α -Phosphatidsäure (16:0/16:0)	-
L- α -Lysophosphatidylcholin (18:0); (18:1); (18 ungesättigt): (16:0); (14:0); (12:0)	0,1 \pm 0,02
L- α -Lysophosphatidylethanolamin (hauptsächlich 18:0 und 16:0)	-
L- α -Lysophosphatidylserin (hauptsächlich 18:0)	-
L- α -Lysophosphatidylinositol (hauptsächlich 16:0 und 18:0)	-
L- α -Lysophosphatidsäure (18:1)	-
1,2-sn-Diacylglycerole (18:0/18:0); (16:0/16:0)	0,09 \pm 0,03 (Zusatz >20 μ M Ca ²⁺)
Phosphorylcholin	-
Cholin	-
D-myo-Inositol-1,4,5-tris-phosphat	-
Palmitinsäure (16:0)	-
Stearinsäure (18:1)	-
Linolsäure (18:2)	-
α -Linolensäure (18:3)	-
γ -Linolensäure (18:3)	-
mit PLA ₂ umgesetzte Plasmamembranvesikel	0,09 \pm 0,02

Tabelle 4-1: Effekt von Phospholipiden, Lysolipiden und ähnlichen Verbindungen auf den vakuolären pH-Wert in-situ.

Die Effektorkonzentrationen im Perfusionsmedium betragen 10 μ M. Löste eine Verbindung keinen Efflux vakuolärer Protonen innerhalb 10 min aus, wurde sie gegen den Standardeffektor Lysophosphatidylcholin (16:0/16:0), 1 μ M ausgetauscht. Wenn danach kein pH-shift auftrat, wurde das Ergebnis verworfen. Daten sind Mittelwerte \pm SD aus 9 – 10 pH-Kurven von 3 unabhängigen Zellsuspensionen. Präparation, Perfusion siehe 3.2, pH-Topographie nach 3.3.

¹pH-shift /pH-Gradient (Δ pH_s/ Δ pH_{vc})

4.3 Charakterisierung der Wirkung von LPC auf den vakuolären Protonentransport

4.3.1 Abhängigkeit von der LPC-Konzentration

Das Ausmaß des durch LPC ausgelöstem Efflux vakuolärer Protonen zeigte eine hyperbole Abhängigkeit von der LPC-Konzentration (Abb. 4-13). Bereits 200 nM können einen pH-shift auslösen, der halbmaximale Effekt wird bei etwa 600 nM erreicht, während ab etwa 1 μ M LPC die Sättigung eintritt.

Die durch LPC ausgelöste pH-Änderung der Vakuole war transient, das heißt, der vakuoläre pH-Wert kehrte einige Minuten nach seiner Auslenkung wieder in die Nähe des Ausgangswertes zurück. Diese Reversibilität des LPC-Effektes, die noch bei Anwesenheit dieses Moleküls auftrat (Abb. 4-10; 4-11), ist ein erneuter Beleg dafür, dass die in-situ-Vakuolen auf die pH-Änderungen rasch kompensierend reagieren können.

Damit wird auch ein membranbeeinflussender Detergenseffekt der wirksamen LPC-Konzentrationen ausgeschlossen. Eine Instabilität des Tonoplasten (angezeigt durch den Verlust des akkumulierten Carboxyfluoresceins (Abb. 2-1C) wurde erst bei LPC-Konzentrationen oberhalb von 10 μ M erkennbar. "Klassische" Detergenzien, wie 0,01 % Triton X-100; CTAB oder Desoxycholat, verursachten erwartungsgemäß einen Verlust der in der Vakuole akkumulierten pH-Sonde. Bis zu 0,05 % des Detergens Pluronic F-127 beeinflussten den vakuolären pH-Wert und die Akkumulation des Fluoreszenzindikators nicht.

4.3.2 Eigenschaften und Bedingungen der LPC-Wirkung auf den vakuolären pH

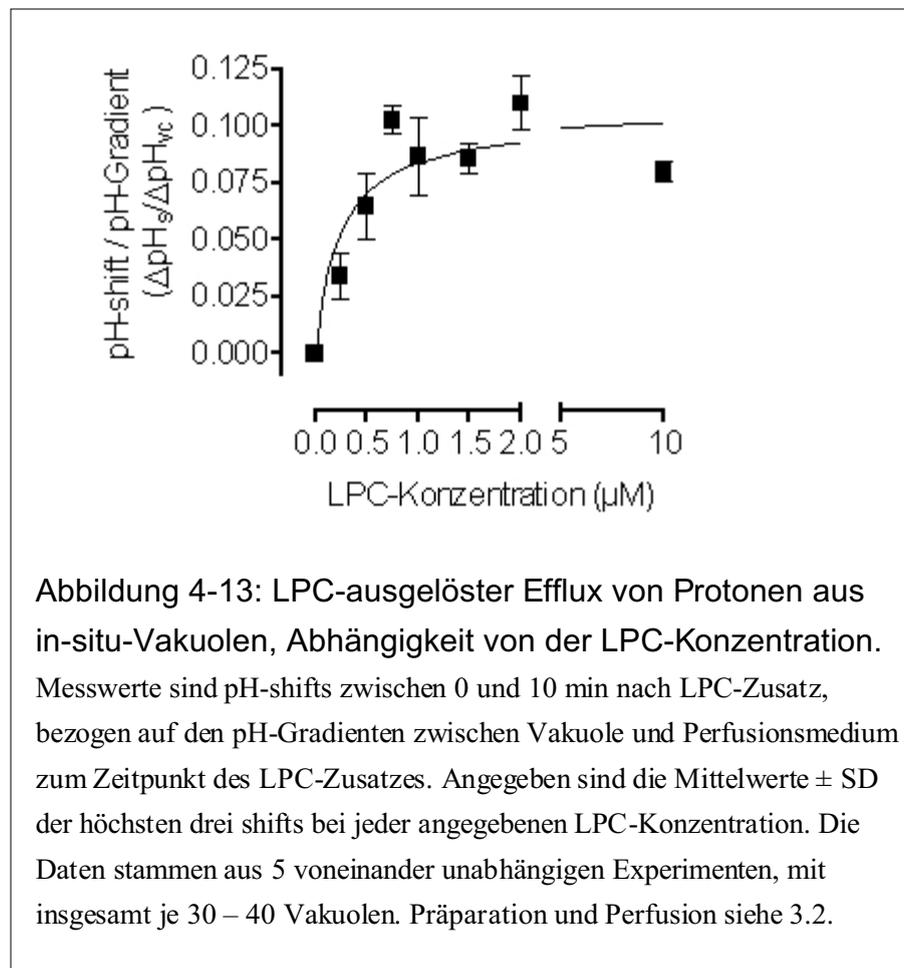
4.3.2.1 Protonenpumpen

Da Hemmstoffe der V-ATPase ebenfalls einen transienten Efflux von Protonen auslösten (Abb.4-4), stellte sich die Frage, ob die Wirkung von LPC eine aktive Protonenpumpe voraussetzt. Wäre dies der Fall, müsste in Abwesenheit von MgATP und MgPP_i der LPC-Effekt unterbleiben. Abbildung 4-10 zeigt jedoch, dass auch bei inaktiven Protonenpumpen (das heißt Abwesenheit von MgATP und MgPP_i) LPC einen Protonenefflux verursacht.

4.3.2.2 Cytoplasmatische Ionen

Ein Efflux vakuolärer Protonen konnte auch durch Aktivierung von Kation/Protonaustauschern bedingt sein. Die bisher vorgestellten Untersuchungen von in-situ-Vakuolen in *Eschscholzia californica* zeigten bereits die Aktivität eines Ca²⁺/H⁺- und

eines Na^+/H^+ -Antiporters (vgl. Abschnitt 4.1.4).



Der LPC-Effekt auf den vakuolären pH-Wert erwies sich als Ca^{2+} -unabhängig (bis 250 μM). Spezifische Ca^{2+} -Chelatoren, wie BAPTA [Tsien 1980; Pierson et al. 1994], hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die LPC-Wirkung (Abb. 4-14).

Einen erheblichen Einfluss auf den LPC-bedingten vakuolären Protonenefflux hatte dagegen die Na^+ -Konzentration. In Abwesenheit von Na^+ war LPC ohne Effekt. Der nachfolgende Zusatz von 10 mM NaCl zum Perfusionsmedium löste den Protonenefflux in voller Stärke aus. Das gleiche Resultat wurde bei Zugabe von LPC nach NaCl erhalten (Abb. 4-15).

Während bei Abwesenheit von LPC mindestens 15 mM NaCl zur Auslösung eines Protonenefflux notwendig sind, tritt in Gegenwart von LPC bereits bei 2 mM NaCl ein deutlicher Verlust an Protonen aus der Vakuole auf (Abb. 4-16).

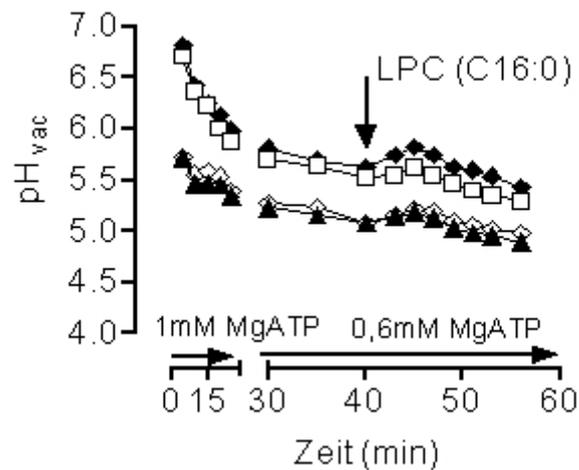


Abbildung 4-14: LPC-ausgelöster Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen in Gegenwart des Ca^{2+} -Chelators DM-BAPTA.

pH-Kurven individueller in-situ-Vakuolen in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ DM-BAPTA. Präparation und Perfusion siehe 3.2; Der Pfeil bezeichnet den Zusatz (\downarrow) von LPC zum Perfusionsmedium.

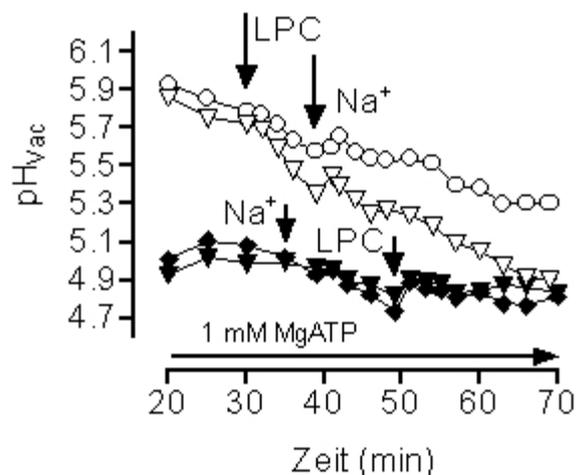


Abbildung 4-15: Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, ausgelöst durch sukzessiven Zusatz von LPC und NaCl.

pH-Kurven individueller in-situ-Vakuolen nach aufeinanderfolgenden Zusätzen von $1 \mu\text{M}$ LPC, dann 10 mM NaCl (offene Symbole) oder in umgekehrter Reihenfolge (geschlossene Symbole). Präparation und Perfusion siehe 3.2; Pfeile bezeichnen die Zusätze (\downarrow) von LPC und NaCl zum Perfusionsmedium.

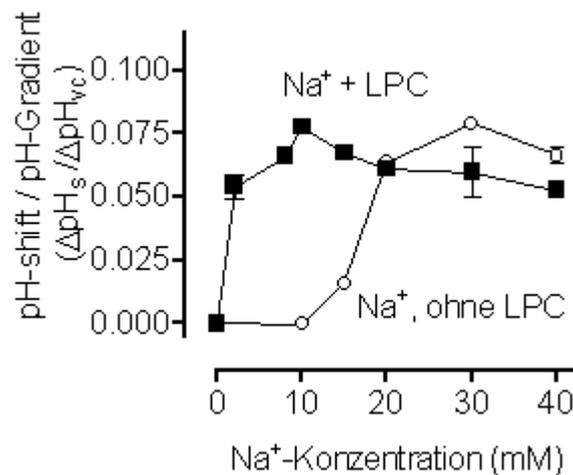


Abbildung 4-16: Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss von Na⁺-Ionen und LPC.

Abhängigkeit der Effluxrate vakuolärer Protonen von der NaCl-Konzentration, Messwerte sind pH-shifts zwischen 0 und 20 min nach NaCl-Zusatz, bezogen auf den pH-Gradienten zwischen Vakuole und Perfusionsmedium zum Zeitpunkt des NaCl-Zusatzes.

- offene Symbole: Zusatz steigender Na⁺-Konzentrationen (laut Abb. 4-8B),

- geschlossene Symbole: gleiches Experiment in Gegenwart von 1 μM LPC.

Angegeben sind die Mittelwerte ± SD der höchsten drei shifts bei jeder angegebenen NaCl-Konzentration aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Präparation und Perfusion siehe 3.2.

Bei näherer Untersuchung der Na⁺-Abhängigkeit des Protonenefflux wurde gefunden, dass durch Zusatz von 1 μM LPC die für den Protonenefflux erforderliche Na⁺-Konzentration auf ca. 1/10 absinkt (Abb. 4-16). Das bedeutet, dass bei Anwesenheit von LPC ein Efflux vakuolärer Protonen bereits bei Na⁺-Konzentrationen stattfindet, welche unter normalen physiologischen Bedingungen im Cytoplasma vorkommen (ca. 5 mM siehe unten). Diese Resultate sprechen für eine Aktivierung des Na⁺/H⁺-Austauschers durch LPC, das heißt, er wird für niedrige Na⁺-Konzentrationen (ab 2 mM) sensibilisiert.

Die Na⁺-Verteilung in intakten *Eschscholzia*-Zellen (Fluoreszenzmessung mit Sodium Green™, siehe Abschnitt 3.5) ergaben für das Cytoplasma Konzentrationen von ca. 5 mM,

während in der Vakuole bis zu 25 mM Na⁺ akkumuliert waren. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit elektrophysiologischen Daten aus anderen Pflanzen [Binzel et al. 1988; Walker et al. 1996].

Wenn der Na⁺/H⁺-Austauscher der Angriffspunkt von LPC ist, sollte man eine deutliche Hemmwirkung von Amilorid auf den LPC- ausgelösten pH-shift erwarten, insbesondere weil für den Na⁺-ausgelösten Protonenefflux die Wirksamkeit von Amilorid bereits gezeigt wurde (Abb. 4-8A). Wie aus Abbildung 4-17 hervorgeht, konnte der durch LPC verursachte Efflux vakuolärer Protonen durch Amilorid-Derivate ebenfalls komplett unterdrückt werden. Damit ist der Na⁺/H⁺-antiporter sehr wahrscheinlich der Angriffspunkt des LPC am Tonoplasten.

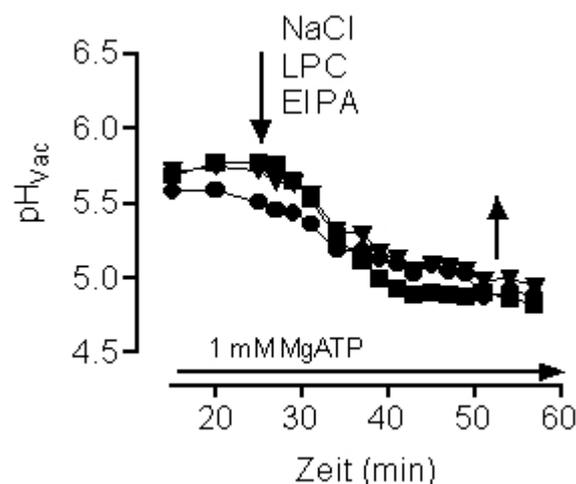


Abbildung 4-17: Inhibition des durch LPC + Na⁺ ausgelösten Efflux vakuolärer Protonen durch EIPA.

pH-Kurven individueller in-situ-Vakuolen nach gleichzeitigem Zusatz von 1 μM LPC, 10 mM NaCl und 40 μM EIPA. Präparation und Perfusion siehe 3.2; Pfeile bezeichnen den Zusatz (↓) bzw. das Entfernen (↑) der Effektoren aus dem Perfusionsmedium.

4.4 Auslösung von pH-shift und Alkaloidbildung durch LPC in Ganzzellen

Nach den bisher vorgestellten Ergebnissen ist LPC sehr wahrscheinlich das Signalmolekül, welches das Elicitorsignal von der Plasmamembran zum Tonoplasten überträgt [Viehweger et al. 2002] (Abb. 2-6). Es wurde deshalb geprüft, ob der Zusatz von LPC zu Ganzzellen die downstream-Ereignisse: “vakuoläre Alkalisierung” und “erhöhte Alkaloidproduktion”

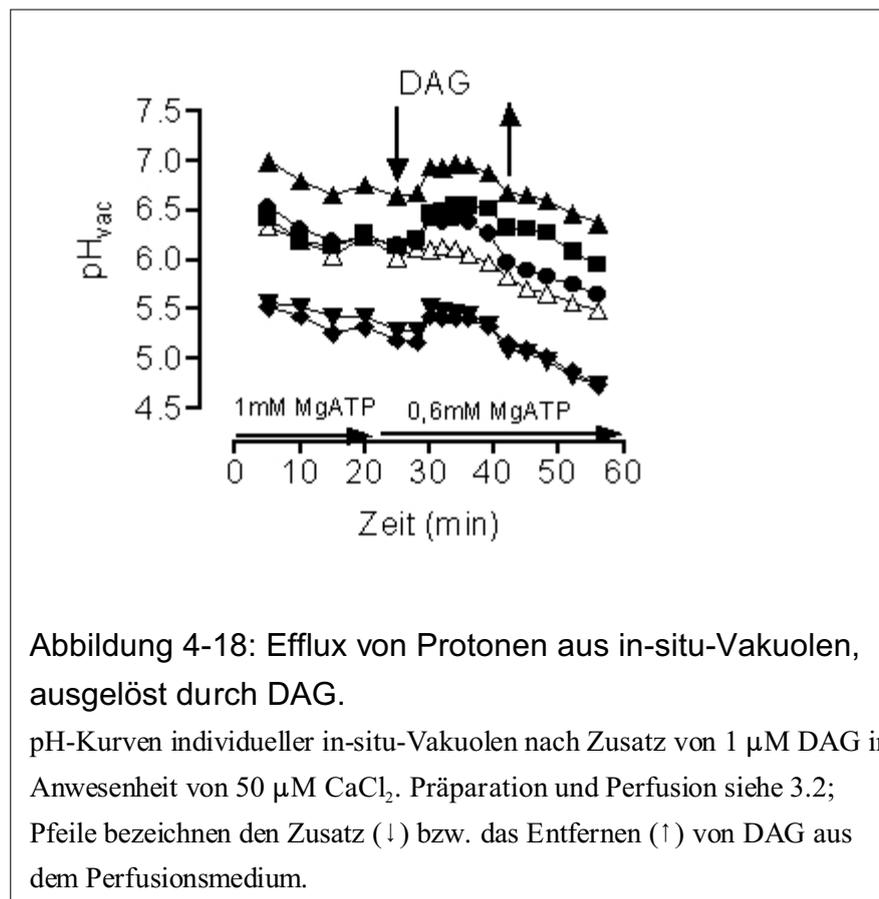
auslöst.

Tatsächlich erwies sich ein Zusatz von 0,5 - 2 μM als ausreichend, um in den einigen Zellen einen pH-shift und eine nachfolgende Alkaloidbildung zu bewirken. Dieser Befund bedarf jedoch noch einer besseren statistischen Absicherung.

4.5 Charakterisierung der DAG-Wirkung auf den Efflux vakuolärer Protonen

4.5.1 Abhängigkeit des vakuolären Protoneneffluxes von der DAG-Konzentration

Wie bereits erwähnt (Tab. 4-1), induziert auch DAG einen Efflux vakuolärer Protonen. Ähnlich wie beim LPC ist dieser Effekt reversibel (Abb. 4-18) und erfordert Konzentrationen zwischen 0,5 und 1 μM DAG (Abb. 4-19).



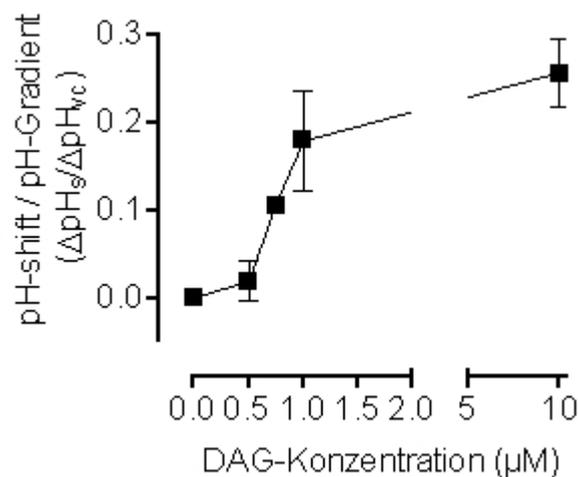


Abbildung 4-19: DAG-ausgelöster Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Abhängigkeit von der DAG-Konzentration. Messwerte sind pH-shifts zwischen 0 und 10 min nach DAG-Zusatz in Anwesenheit von 50 μM CaCl₂, bezogen auf den pH-Gradienten zwischen Vakuole und Perfusionsmedium zum Zeitpunkt des DAG-Zusatzes. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD der höchsten drei shifts bei jeder angegebenen DAG-Konzentration aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten, mit insgesamt je 15 – 20 Vakuolen. Präparation und Perfusion siehe 3.2.

4.5.2 Mögliche Angriffspunkte von DAG am Tonoplasten

Ebenso ist die durch DAG-ausgelöste Alkalisierung der in-situ-Vakuole nicht an die Aktivierung der V-ATPase beziehungsweise V-PPase geknüpft, da sie auch ohne Zusatz von MgATP oder MgPP auftritt.

Ein messbarer, DAG-bedingter Protonenefflux erfordert Ca²⁺-Konzentrationen von mindestens 25 μM im Perfusionsmedium. Da diese Konzentration annähernd dem K_m-Wert des bereits beschriebenen Ca²⁺/H⁺-Antiporters entspricht (Abb. 4-7B), ist dieser Antiporter wahrscheinlich der Angriffspunkt des DAG. In den vorgestellten Experimenten (Abb. 4-18 und 4-19) wurden jeweils 50 μM CaCl₂ vor dem DAG zugesetzt, so dass der Austauscher sehr wahrscheinlich für Ca²⁺ gesättigt war, bevor die Stimulation durch DAG gemessen wurde. Die Erfordernis für derart hohe Ca²⁺-Konzentrationen ist zunächst überraschend, da der Ca²⁺-Spiegel im Cytosol nicht-stimulierter Zellen im Bereich von 100 – 200 nM liegt

[Legau et al. 1997].

Es ist nicht bekannt, ob solche cytoplasmatischen Ca^{2+} -Peaks in *Eschscholzia californica* auftreten können. Die Auffindung eines DAG-angefassten, vakuolären Protonenefflux zeigt jedoch erneut das Potential des entwickelten in-situ-Systems zur Untersuchung von Ionenfluxen.

5 Eine Sequenz von Signalereignissen nach Elicitorkontakt in Ganzzellen von *Eschscholzia californica*

Die bisher vorgestellten Ergebnisse und weitere Daten unserer Arbeitsgruppe legen folgende Sequenz von Signalereignissen nahe, welche nach Einwirkung niedriger Elicitorkonzentrationen in intakten Zellen abläuft:

1. Aktivierung einer PLA_2 an der Plasmamembran und Freisetzung von LPC,
2. Diffusion von LPC zum Tonoplasten und Aktivierung eines Na^+/H^+ -Austauschers,
3. Efflux von Protonen aus der Vakuole und Ausbildung eines transienten pH-shifts im Cytoplasma,
4. nach dem Durchlaufen weiterer, bisher wenig charakterisierter Signalereignisse (Induktion elicitorspezifischer Proteine [Färber 2002], Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen (S. Evers, persönliche Mitteilung)), kommt es zur Bildung der Benzophenanthridinalkaloide und deren Ausscheidung in Zellwand und Außenmedium.

Diese Ergebnisse erlauben jedoch noch keine Aussage, ob die oben genannten Ereignisse in derselben Zelle nach Elicitorkontakt ablaufen. Nur in diesem Falle kann aber von einem intrazellulären Signaltransfer gesprochen werden. Alternativ ist zum Beispiel auch die Ausscheidung von LPC und dessen Einwirkung auf Nachbarzellen denkbar oder die pH-abhängige Freisetzung von Signalmolekülen, welche in anderen Zellen die Alkaloidsynthese auslösen.

Um zu klären, ob die unter 1 – 4 genannten Ereignisse tatsächlich in derselben Zelle aufeinander folgen, wurde ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe PLA_2 -Aktivität, pH-shift und die Neubildung von Alkaloiden in derselben Zelle verfolgt

werden konnten.

Zunächst wurden die Messverfahren für die oben genannten Einzelereignisse soweit optimiert, dass sie in Zellpräparationen für die konfokale Mikroskopie beobachtet werden konnten. Die Methodik zur Messung dieser Ereignisse ist im Kapitel 2 beschrieben. Typische Darstellungen der Elicitor-ausgelösten Signalschritte PLA_2 -Aktivierung, vakuolärer pH-shift und Alkaloidbildung sind in den Abbildungen 5-1, 5-2, 5-3 dargestellt.

Im nächsten Schritt wurde versucht, die bisher einzeln gemessenen Ereignisse (PLA_2 -Aktivierung, vakuolärer pH-shift und Alkaloidbildung) durch wiederholte mikroskopische Beobachtung in derselben Zelle nachzuweisen. Wie aus Abbildung 5-4 hervorgeht, war dieser Ansatz erfolgreich: es können Zellfäden aufgefunden werden, in denen die transienten Ereignisse der PLA_2 -Aktivierung und des vakuolären pH-shifts sowie der deutlich später erfolgenden Alkaloidbildung beobachtet werden können. Damit konnte nicht nur gezeigt werden, dass diese Ereignisse tatsächlich in derselben Zelle ablaufen, sondern auch bestätigt werden, dass die Aktivierung der PLA_2 tatsächlich dem pH-shift vorausgeht.

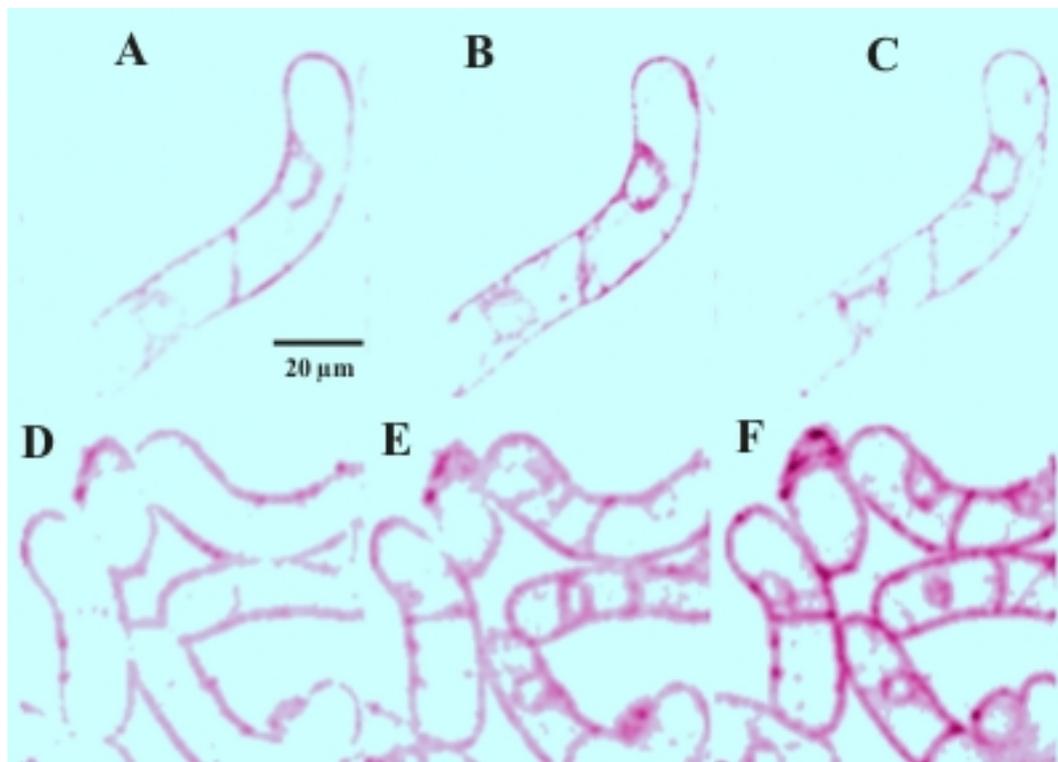


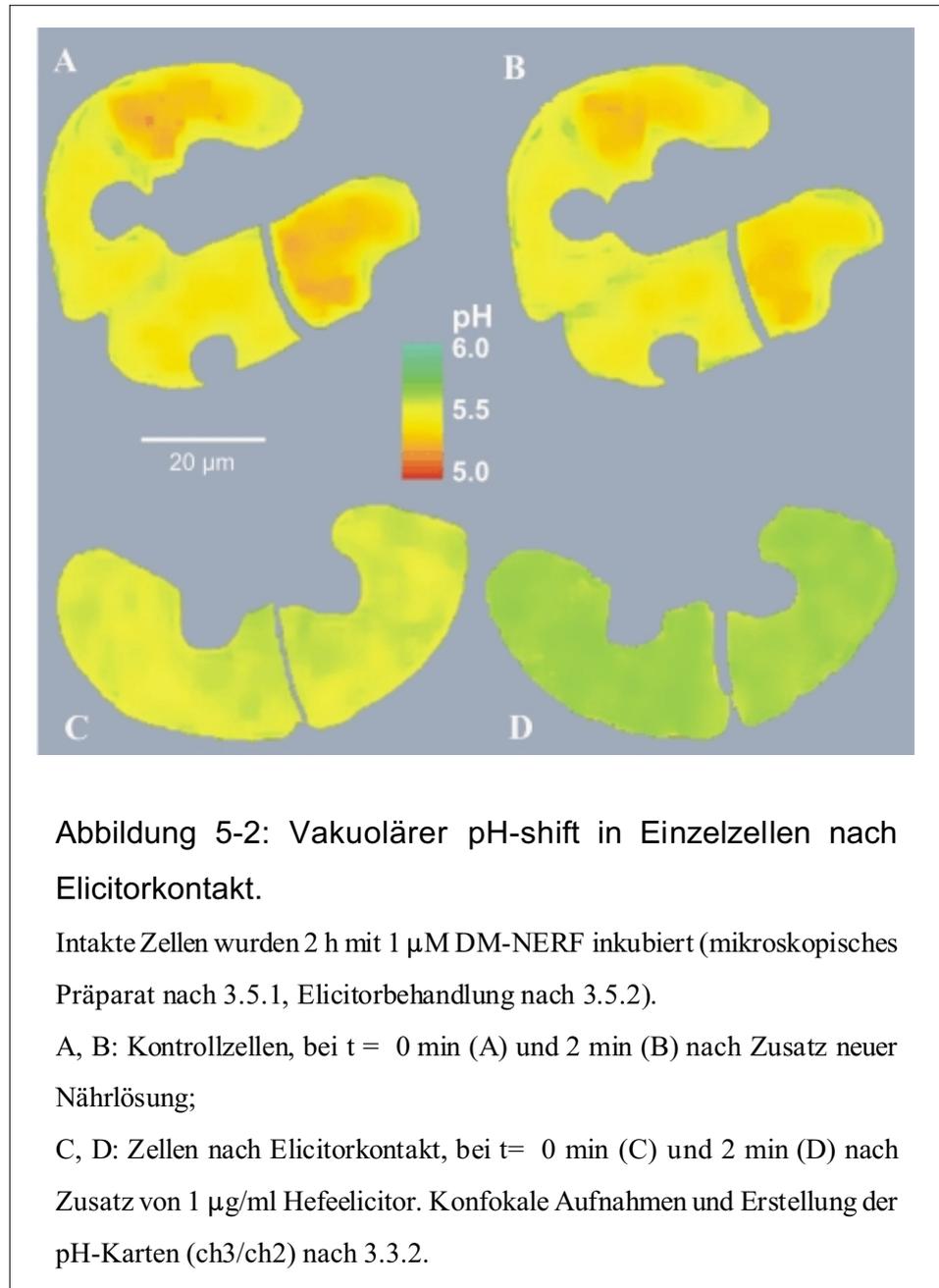
Abbildung 5-1: PLA₂-Aktivität in Einzelzellen nach Elicitorkontakt.

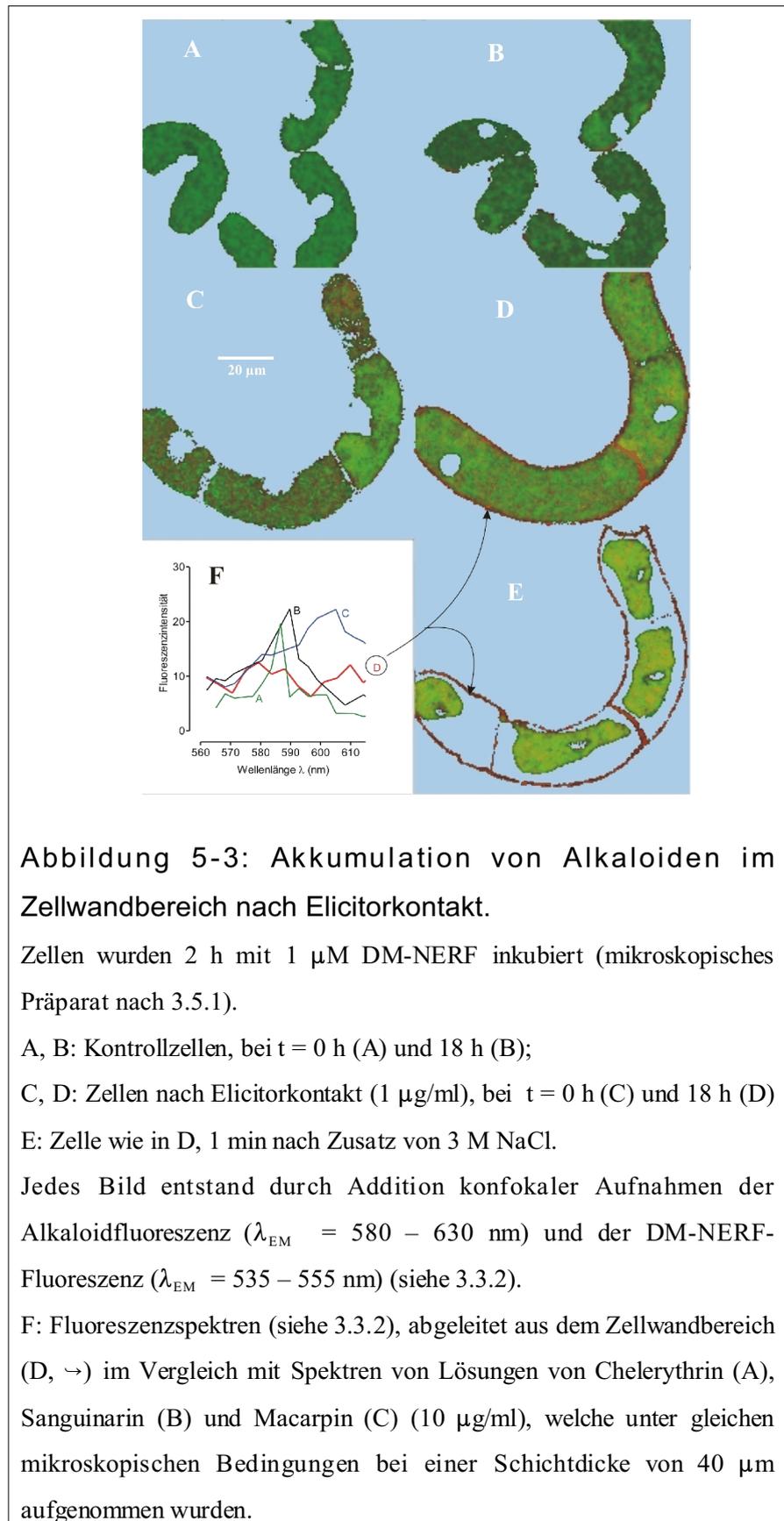
Den Zellen (mikroskopisches Präparat nach 3.5.1) wurden 0,25 µM fluorogenes Substrat bis-BODIPY® FL C₁₁-PC zugesetzt (siehe 3.5.3).

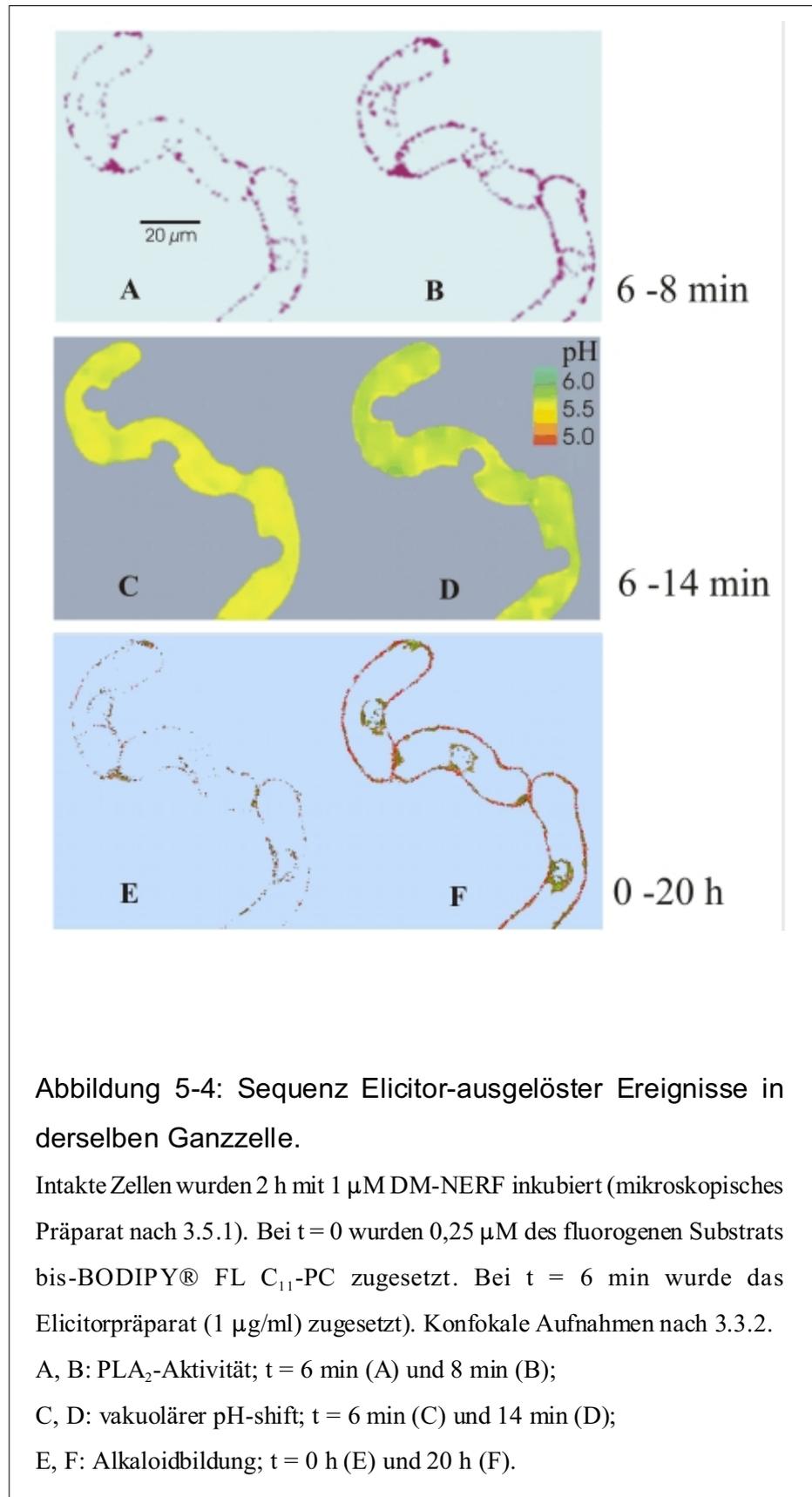
A-C: Kontrollzellen (kein Elicitor) 2 min (A), 4 min (B) und 6 min (C) nach Substratzugabe, bei t = 4 min (B) erfolgte der Zusatz von 5 µl neuer Nährlösung.

D-F: Zellen nach Elicitorzusatz (1 µg/ml) 2 min (D), 4 min (E) und 6 min (F) nach Substratzugabe, bei t = 4 min (E) erfolgte der Zusatz des Elicitors (siehe 3.5.2).

Konfokale Aufnahmen nach 3.3.2. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden in Magenta konvertiert.



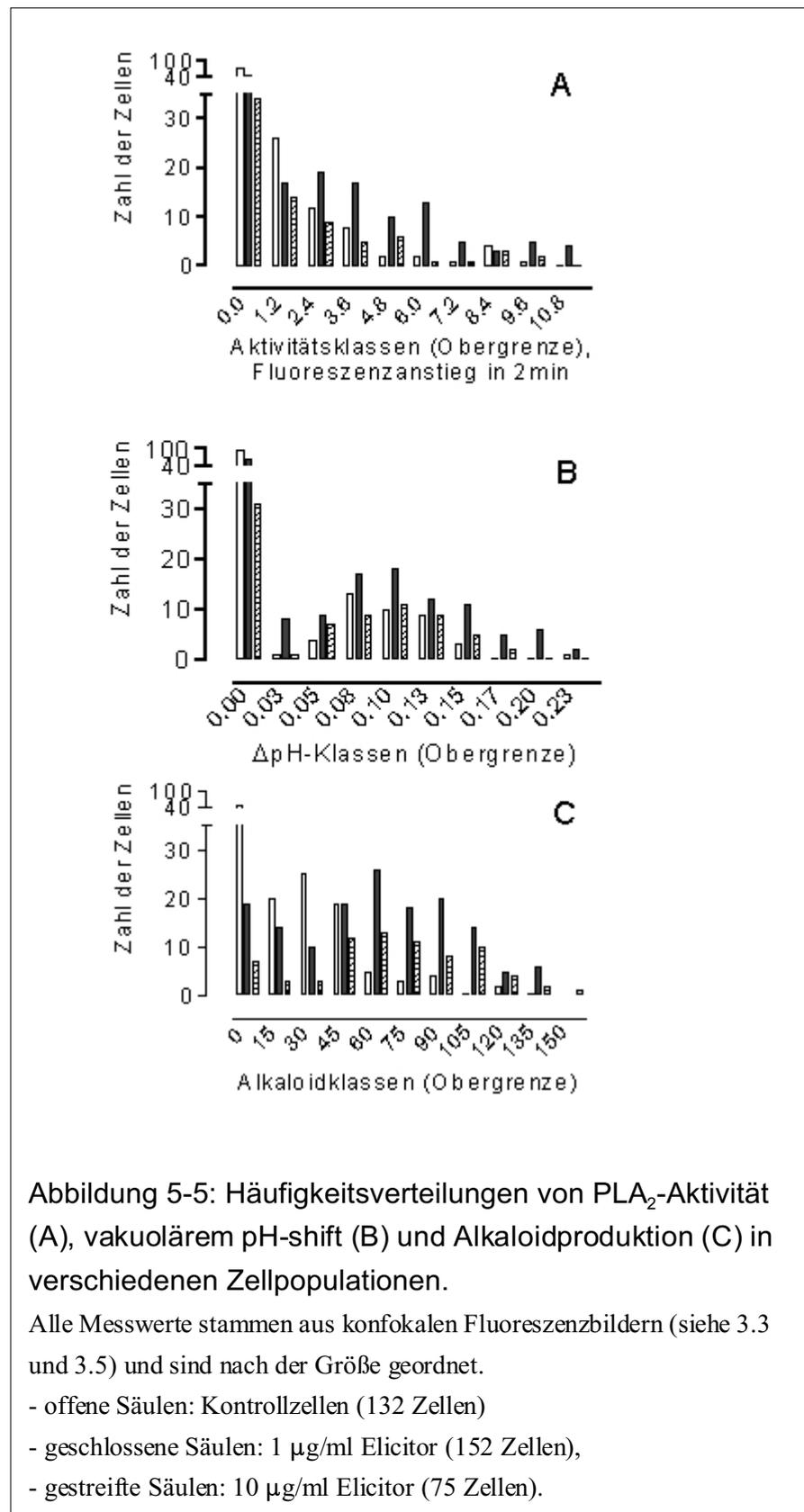




5.1 Elicitor-ausgelöste Signalereignisse in einer Zellpopulation-statistische Untersuchungen

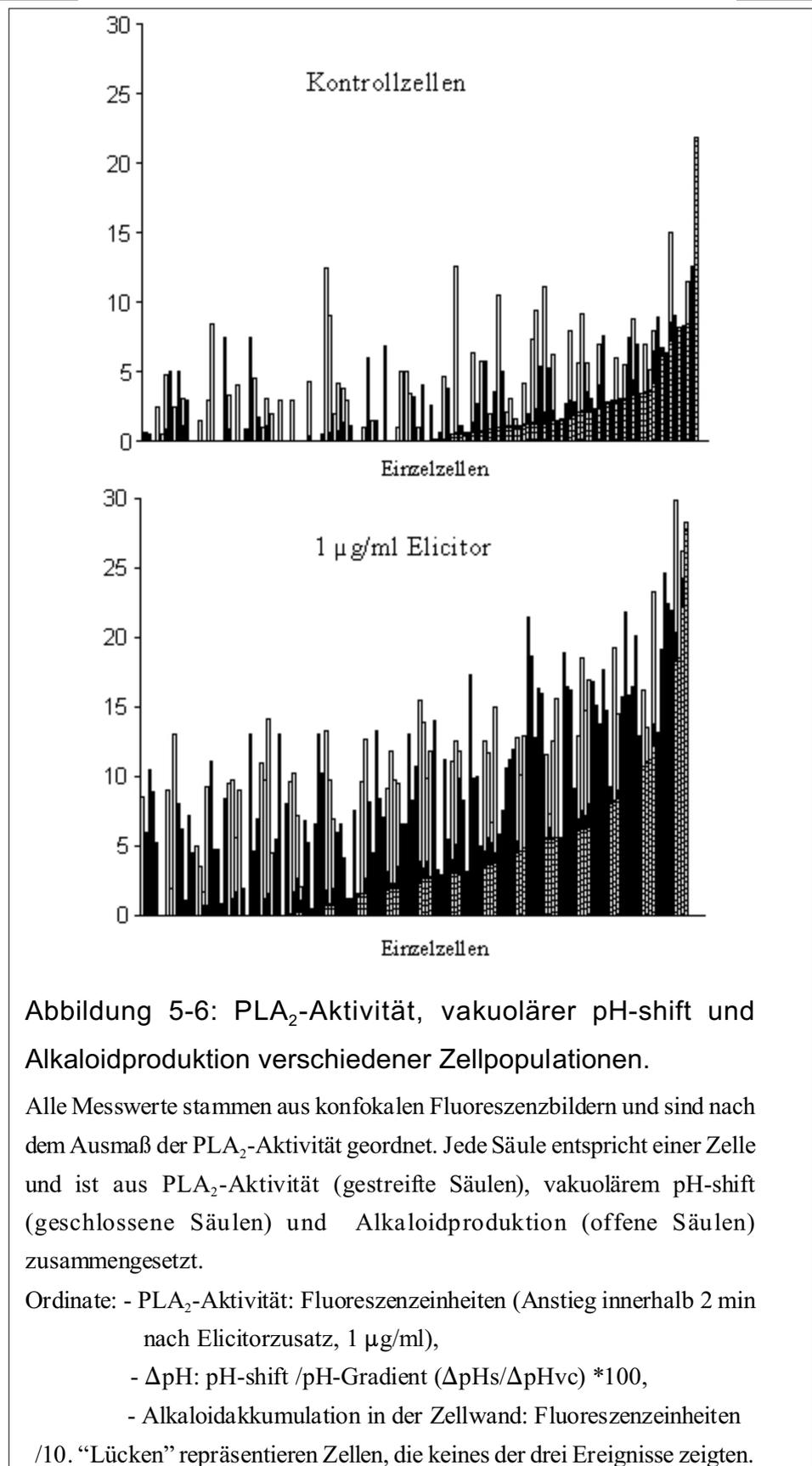
Bei der Suche nach Einzelzellen, in welchen die in Abbildung 5-4 dargestellte Sequenz beobachtet werden konnte, stellte sich heraus, dass die Zellen der verwendeten Suspension in dieser Hinsicht eine beträchtliche Heterogenität aufweisen. Neben Zellen, die nur eines oder alle Signalereignisse erkennen ließen, wurden auch solche gefunden, die in denen keine Elicitor-ausgelösten Ereignisse messbar waren. Deshalb wurden im Folgenden Messungen einer größeren Population aus verschiedenen Chargen der verwendeten Zellkultur untersucht. Die Ergebnisse wurden in Form einer Häufigkeitsverteilung vergleichend dargestellt (Abb. 5-5). Folgende Aussagen können getroffen werden:

1. Ein erheblicher Anteil von Zellen zeigte keine Stimulation von PLA_2 und pH-shift nach Zusatz von Elicitor. Diese Zellen sind jeweils in Klasse "0" zusammengefasst, welche auch die Zellen mit scheinbar negativem Elicitoreffekt, das heißt mit kleineren Messwerten als der Mittelwert der Kontrollzellen, enthalten.
2. Zellen nach Elicitorkontakt zeigen mit höherer Wahrscheinlichkeit einen Anstieg der oben genannten Parameter als Kontrollzellen. Elicitorbehandelte Suspensionen enthielten also deutlich mehr Zellen in Klassen starker Erhöhung der PLA_2 -Aktivität, des pH-shifts und der Alkaloidfreisetzung.
3. Wenn anstelle der standardmäßig verwendeten ElicitorKonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt wurde, kam es zu wesentlich geringeren Erhöhungen der PLA_2 -Aktivität und des pH-shifts. Dies gilt jedoch nicht für die Alkaloidbildung, welche sowohl bei geringen (1 $\mu\text{g/ml}$) als auch bei hohen ElicitorKonzentrationen (10 $\mu\text{g/ml}$) in etwa in gleichem Maße anstieg (Abb. 5-5).



In Abbildung 5-6 sind die Ereignisse aus den Histogrammen der Abbildung 5-5 jeweils auf der Basis einzelner Zellen einander zugeordnet (vgl. Abb. 5-4). Die Daten der Einzelzellen wurden nach dem Ausmaß der ersten Reaktion, das heißt der PLA₂-Aktivierung, geordnet. Man erkennt:

1. Eine erste Betrachtung der Ergebnisse zeigt, dass die hier gemessenen Ereignisse durchaus nicht in allen Zellen vorkommen. Es sind sowohl Zellen auffindbar, die weder Elicitor-abhängige PLA₂-Aktivierung, pH-shifts, Alkaloidbildung zeigen als auch solche, in denen nur eines dieser Ereignisse nachgewiesen werden konnte.
2. Nach Elicitorkontakt ist die Zahl der Zellen, welche eine Aktivierung der PLA₂ zeigen, deutlich erhöht, ebenso das durchschnittliche Ausmaß dieser Aktivierung. Gleiches gilt für die Zahl der alkaloidproduzierenden Zellen und das Ausmaß der Alkaloidbildung. Es sind jedoch unter den Zellen mit fehlender PLA₂-Aktivierung auch starke Alkaloidproduzenten vorhanden. Dies ist ein Hinweis auf einen von der PLA₂ unabhängigen Signalweg zur Alkaloidbildung.
3. Zellen mit nachweisbarem pH-shift sind auch unter Kontrollbedingungen nachweisbar, nach Elicitorbehandlung jedoch deutlich häufiger anzutreffen. Das Ausmaß der Phospholipase-Aktivierung elicierter Zellen korreliert nicht mit der Stärke des pH-shifts und der Menge der Alkaloide. Dies zeigt, dass nicht die Menge der gebildeten Phospholipid-Spaltprodukte für das Ausmaß der nachfolgenden Signalereignisse entscheidend ist, sondern nur ein bestimmter Schwellenwert erreicht werden muss. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Histogrammen der Kontrollzellen (kein Elicitorkontakt), so ist offensichtlich, dass in Zellen ohne PLA₂-Aktivierung deutlich seltener pH-shifts gemessen werden können.



5.2 Korrelation von PLA₂-Aktivierung, pH-shift und Alkaloidbiosynthese

Aus Abbildung 5-5 ergeben sich Hinweise auf eine positive Korrelation der Ereignisse “Phospholipase-Aktivierung”, “pH-shift” und “Alkaloidbildung”. Diese Korrelation ist offenbar nicht linear, da wie aus Abbildung 5-6 ersichtlich, steigende Phospholipase-Aktivierungen nicht auch steigende pH-shifts und eine gesteigerte Alkaloidproduktion zur Folge haben.

Vielmehr deutet sich ein Schwellenwert, das heißt eine “Ja-Nein”-Beziehung zwischen den Signalereignissen, an. Ein solcher Zusammenhang lässt sich statistisch mit dem “exakten Test nach Fischer” untersuchen [Hartung 2002]. Dabei entstehen durch Auszählung der beobachteten Häufigkeiten der Signalereignisse sogenannte Kontingenztafeln (2×2-Felder-Tafeln).

Voraussetzung ist die Kenntnis dieses Schwellenwertes, bei dessen Überschreitung das Ereignis als eingetreten (“Ja”) gilt. Aus den Erfahrungen zahlreicher Messungen und der Kenntnis der Empfindlichkeit der verwendeten Messverfahren wurden dabei folgende Schwellenwerte abgeschätzt, deren Überschreitung nach Elicitorgabe häufig nachgewiesen wurde, und die sich erkennbar von den innerhalb einer Zelle gefundenen Schwankungen (ohne Einwirkung äußerer Signale) unterschieden (vgl. Abschnitte 2.3 und 3.5):

1. Phospholipase-Aktivität: Ein erkennbarer Fluoreszenzanstieg unter den gegebenen Einstellungen des konfokalen Lasermikroskops (8 Fluoreszenzeinheiten entsprechen der vollständigen Spaltung von 0,25 µM markiertem Phospholipid),
2. pH-shift (vakuoläre Alkalisierung) von mindestens 0,05 pH-Einheiten und einer Dauer von mindestens 3 Minuten,
3. Alkaloidneusynthese: mindestens 55 Fluoreszenzeinheiten pro Zelle (~160 µg/mg Alkaloid/Trockenmasse).

In Tabelle 5-1 wird die Prüfung auf eine Korrelation der Ereignisse “PLA₂-Aktivierung” und “vakuolärer pH-shift” in Zellen mit normaler (Kontrollniveau) und elicierter Alkaloidbildung vorgestellt.

Kontrolle

Alkaloidbildung beobachtet

PLA₂	-		+	
pH-shift	-	4	-	4
PLA₂	-		+	
pH-shift	+	3	+	3

Exakter Test

nach Fischer: P = 1,4079

Signifikante Abhängigkeit ($\alpha < 0,05$): nein

Keine

Alkaloidbildung beobachtet

-		+	
-	48	-	36
-		+	
+	14	+	18

P = 0,2172

nein

1 µg/ml Elicitor

Alkaloidbildung beobachtet

PLA₂	-		+	
pH-shift	-	12	-	18
PLA₂	-		+	
pH-shift	+	10	+	49

Exakter Test

nach Fischer: P = 0,0216

Signifikante Abhängigkeit ($\alpha < 0,05$): ja

Keine

Alkaloidbildung beobachtet

-		+	
-	9	-	16
-		+	
+	10	+	28

P = 0,5755

nein

10 µg/ml Elicitor

Alkaloidbildung beobachtet

PLA₂	-		+	
pH-shift	-	8	-	12
PLA₂	-		+	
pH-shift	+	9	+	19

Exakter Test

nach Fischer: P = 0,7603

Signifikante Abhängigkeit ($\alpha < 0,05$): nein

Keine

Alkaloidbildung beobachtet

-		+	
-	5	-	9
-		+	
+	3	+	11

P = 0,6776

nein

Tabelle 5-1: Modifizierte Kontingenztafeln für das Auftreten von Signalereignissen in Einzelzellen.

Die untersuchten Zellen wurden nach dem Auftreten der Signalereignisse (+) und deren Fehlen (-) bewertet (Kriterien vgl. 3.5.3 - 3.5.5). Die Zahlen geben die Anzahl der Zellen an, in denen das betreffende Ereignis auftrat. Alle Berechnungen wurden sowohl für Zellen mit nachweislicher Alkaloidbildung (unter mikroskopischen Bedingungen, siehe 3.5.5) und in Zellen ohne Alkaloidzuwachs (in ~ 20 h) durchgeführt. Es wird ersichtlich, dass auf dem 95 %-Niveau nur in den mit 1 µg/ml behandelten Zellen eine Abhängigkeit von der PLA₂-Aktivität und dem pH-shift gesichert werden kann. Je kleiner der P-Wert, desto wahrscheinlicher ist die Abhängigkeit der beobachteten Ereignisse PLA₂-Aktivierung und pH-shift.

Die Kontingenztests sagen aus:

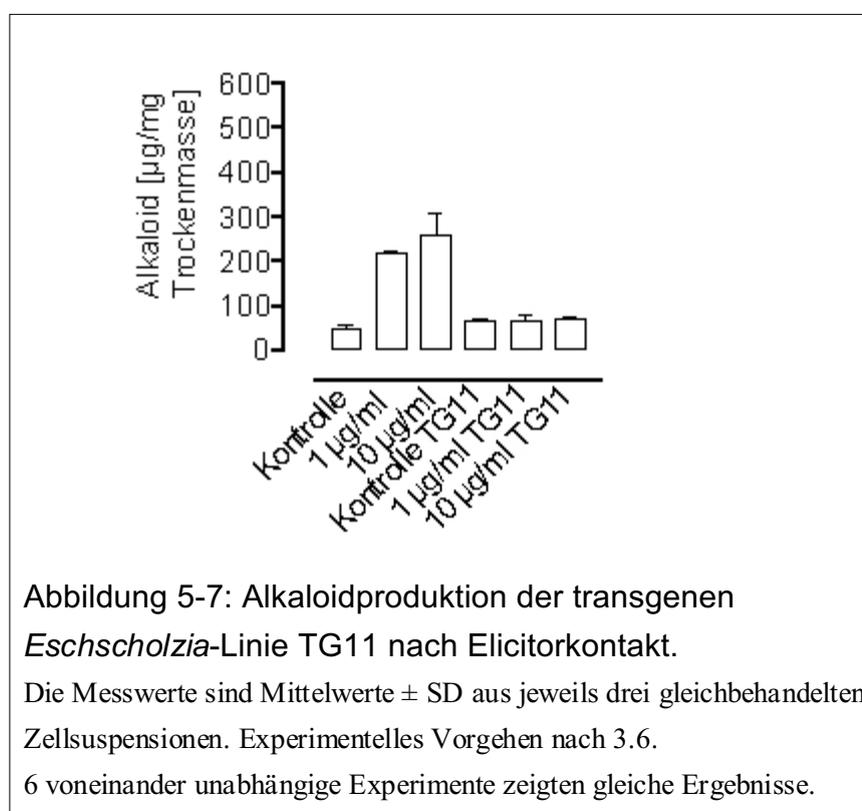
1. Für die durch den Hefeelicitor (1 µg/ml) ausgelöste Alkaloidbiosynthese besteht eine positive Korrelation zwischen Phospholipase-Aktivierung und vakuolärem pH-shift;
2. Eine nicht unerhebliche Anzahl von Zellen produziert trotz Elicitorzusatz keine Alkaloide (Abb. 5-5). In diesem Falle sind PLA₂-Aktivierung und vakuolärer pH-shift zwar gelegentlich nachweisbar, jedoch nicht miteinander korreliert (Tab. 5-1).
3. Es bestätigt sich, dass die Einwirkung hoher Elicitorkonzentrationen (10 µg/ml) keine Verschiebung der Histogramme in Richtung von Zellklassen mit erhöhter PLA₂-Aktivierung und pH-shift verursachte (Abb. 5-5). Obwohl bei 10 µg/ml Elicitor die Anzahl alkaloidproduzierender Zellen höher ist als nach Einwirkung niedrigerer Elicitorkonzentrationen besteht keine Korrelation zwischen PLA₂-Aktivierung und pH-shift. Es ist also wahrscheinlich, dass hohe Elicitorkonzentrationen die Alkaloidbiosynthese auf einem anderen Signalweg auslösen als niedrige (1 µg/ml). Dies bestätigt frühere Ergebnisse, welche für hohe Elicitorkonzentrationen einen anderen Signalweg postulierten [Färber et al. 2003].

5.3 Charakterisierung des Zusammenhangs der Signalereignisse in der Mutante antisense-G_α (TG11)

Zur Erhärtung einer sich abzeichnenden Korrelation zwischen PLA₂-Aktivierung und pH-shift erwies sich die Untersuchung einer antisense-G_α-Mutante als geeignet. Diese Mutante

wurde durch biolistische Transformation von *Eschscholzia*-Zellen mit einem antisense-Konstrukt des G_α -Gens erhalten [Schumann, Lein, Roos, unveröffentlicht]. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass der Elicitorkontakt zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins führt [Roos et al. 1999; Gesell 2001]. Die Vermutung, dass die Phospholipase A_2 ein Zielprotein des G-Proteins ist [Roos et al. 1999], konnte bisher jedoch nicht klar bewiesen werden.

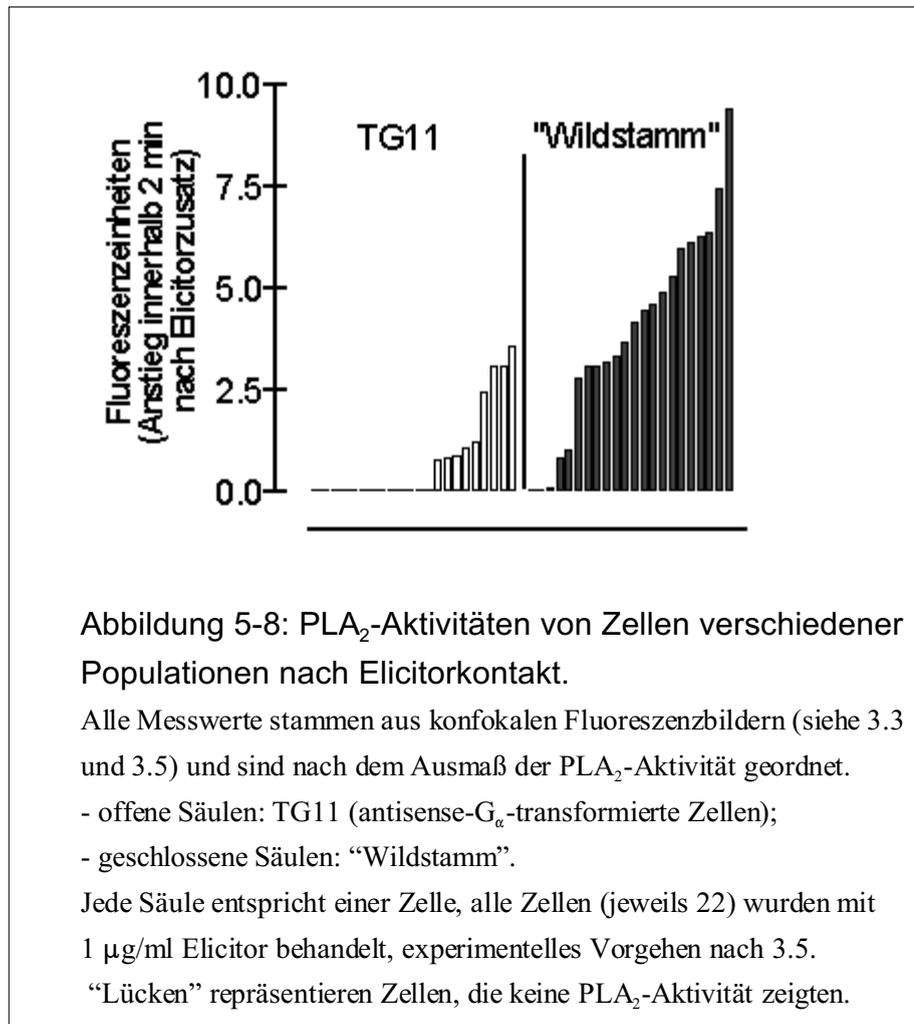
Untersuchungen mit Zellsuspensionen ("Schüttelkolben") zeigten, dass in der antisense- G_α -Mutante der Elicitorkontakt keine Alkaloidbiosynthese auslöste (Abb. 5-7).



Es stellte sich deshalb die Frage, ob in dieser Mutante auch die Elicitorwirkung auf die Phospholipase ausgeschaltet ist. Wie aus Abbildung 5-8 hervorgeht, ist dies tatsächlich der Fall: im Gegensatz zum Wildstamm stieg die Zahl der Zellen mit aktivierter Phospholipase nach Elicitorkontakt nicht signifikant an. Die Tabelle 5-2 bestätigt diese Aussage. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die PLA_2 tatsächlich ein Zielprotein von G_α darstellt, und die PLA_2 -Aktivität für die Auslösung der Alkaloidsynthese essentiell ist.

Aus Abbildung 5-9 geht hervor, dass in den antisense- G_α -Zellen bei fehlender Elicitor-

Aktivierung der PLA₂ auch keine Elicitor-ausgelösten pH-shifts (über Kontrollniveau) stattfinden. Auch dieser Befund wird durch die Korrelationsanalyse (Tab. 5-2) bestätigt. Damit ergibt sich ein weiterer wesentlicher Hinweis für die Verbindung von PLA₂-Aktivierung und pH-shift.



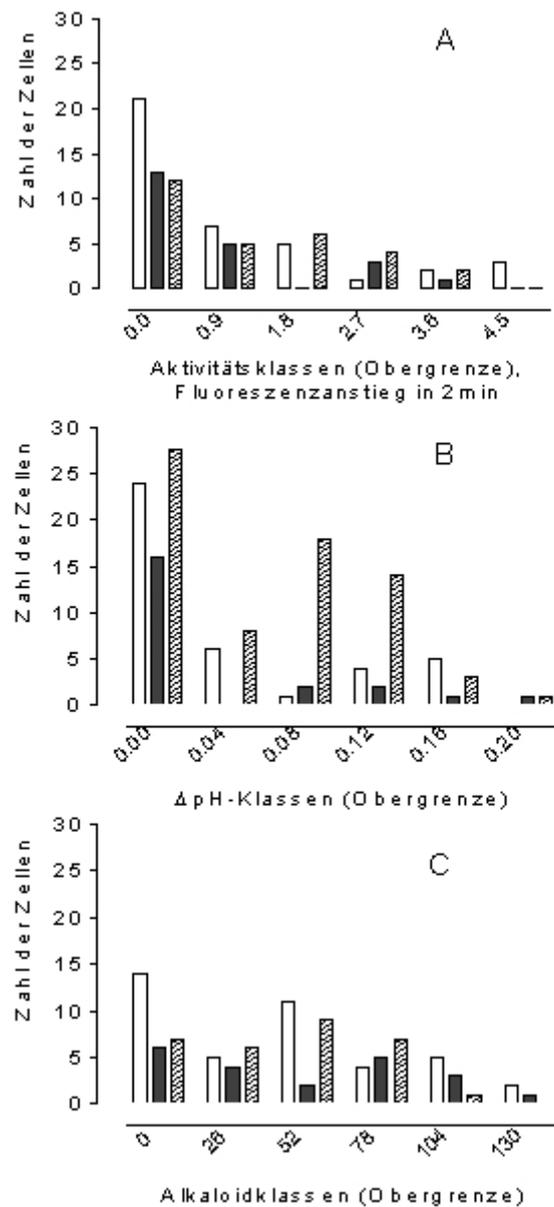


Abbildung 5-9: Häufigkeitsverteilungen von PLA₂-Aktivität (A), vakuolärem pH-shift (B) und Alkaloidproduktion (C) in verschiedenen Zellpopulationen antisense-G_α-transformierter Zellen.

Alle Messwerte stammen aus konfokalen Fluoreszenzbildern (siehe 3.3 und 3.5) und sind nach der Größe geordnet.

- offene Säulen: Kontrollzellen (41 Zellen),
- geschlossene Säulen: 1 µg/ml Elicitor (22 Zellen),
- gestreifte Säulen: 10 µg/ml Elicitor (30).

Kontrolle					Keine			
Alkaloidbildung beobachtet					Alkaloidbildung beobachtet			
PLA₂	-		+		-		+	
pH-shift	-	4	-	3	-	7	-	10
PLA₂	-		+		-		+	
pH-shift	+	3	+	4	+	4	+	6
<u>Exakter Test</u>								
<u>nach Fischer:</u> P = 1,0000					P = 1,0000			
Signifikante Abhängigkeit ($\alpha < 0,05$): nein					nein			
1 μg/ml Elicitor					Keine			
Alkaloidbildung beobachtet					Alkaloidbildung beobachtet			
PLA₂	-		+		-		+	
pH-shift	-	7	-	1	-	2	-	6
PLA₂	-		+		-		+	
pH-shift	+	2	+	2	+	2	+	0
<u>Exakter Test</u>								
<u>nach Fischer:</u> P = 0,2364					P = 0,1333			
Signifikante Abhängigkeit ($\alpha < 0,05$): nein					nein			
10 μg/ml Elicitor					Keine			
Alkaloidbildung beobachtet					Alkaloidbildung beobachtet			
PLA₂	-		+		-		+	
pH-shift	-	3	-	4	-	4	-	11
PLA₂	-		+		-		+	
pH-shift	+	3	+	1	+	1	+	3
<u>Exakter Test</u>								
<u>nach Fischer:</u> P = 0,5455					P = 1,0000			
Signifikante Abhängigkeit ($\alpha < 0,05$): nein					nein			

Tabelle 5-2: Modifizierte Kontingenztafeln für das Auftreten von Signalereignissen in antisense- G_{α} -transformierten Zellen.

Die untersuchten Zellen wurden nach dem Auftreten der Signalereignisse (+) und deren Fehlen (-) bewertet (Kriterien vgl. 3.5.3 - 3.5.5). Die Zahlen geben die Anzahl der Zellen an, in denen das betreffende Ereignis auftrat. Alle Berechnungen wurden sowohl für Zellen mit nachweislicher Alkaloidbildung (unter mikroskopischen Bedingungen, siehe 3.5.5) und in Zellen ohne Alkaloidzuwachs (in ~ 20 h) durchgeführt. In keinem Fall konnte eine Abhängigkeit von der PLA_2 -Aktivität und dem pH-shift nachgewiesen werden. Je kleiner der P-Wert, desto wahrscheinlicher ist die Abhängigkeit der beobachteten Ereignisse PLA_2 -Aktivierung und pH-shift.

Bei der mikroskopischen Analyse der antisense- G_{α} -Mutante wurden erhebliche pH-shifts auch in nicht Elicitor-behandelten Zellen gemessen (vgl. Abb. 5-9). Ebenso konnte eine gut nachweisbare Alkaloidausscheidung in die Zellwand beobachtet werden. Beide Ereignisse sind jedoch nicht wie im Wildstamm miteinander korreliert. Dies bestätigt erneut, dass es weitere Signalwege zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese gibt, die nicht durch den Hefeelicitor (1 $\mu\text{g/ml}$) ausgelöst werden.

6 Schlussfolgerungen

6.1 Ein in-situ-System zur Untersuchung vakuolärer Transportprozesse

Mit der selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran kultivierter Zellen von *Eschscholzia californica* wurde ein direkter Zugang für Mikromoleküle (≤ 10 kDa) zum Tonoplasten geschaffen, ohne die Vakuole aus ihrer makromolekularen, cytoplasmatischen Umgebung zu entfernen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erfahrungen belegen in vielfältiger Weise die Funktionsfähigkeit der in-situ-Vakuole:

1. Die Barrierefunktion des Tonoplasten ist gewährleistet. Dafür spricht die Aufrechterhaltung eines Protonengradienten zwischen Vakuole und Perfusionsmedium, welcher experimentell durch Zusatz der Energiequellen für die Protonenpumpen noch verstärkt werden konnte (vgl. Abschnitt 4.1). Der Tonoplast ist impermeabel für hydrophile Moleküle, was insbesondere durch die Akkumulation der aus permeablen Estern freigesetzten und akkumulierten Fluoreszenzderivate angezeigt wird (Abb. 2-1).
2. Die in-situ-Vakuolen zeigen mehrere Transportaktivitäten, die den aktuellen Erkenntnissen zur Funktion vakuolärer Transporter (übereinstimmende Aussagen aus zahlreichen Studien mit Tonoplastenvesikeln, isolierten Vakuolen, elektrophysiologischen Daten, pH-Messungen mit ^{31}P -NMR) sehr gut entsprechen:
 - a. die Akkumulation von Protonen durch selektive Zufuhr der Energiequellen zu den Protonenpumpen (vgl. Abschnitte 4.1.1; 4.1.2; Abb. 4-1; 4-2; 4-3; 4-11),
 - b. die Wirksamkeit spezifischer Hemmstoffe beider Protonenpumpen, welche das dynamische Gleichgewicht von Akkumulation und Efflux von Protonen erkennbar machen (vgl. Abschnitte 4.1.1; 4.1.2; Abb. 4-4; 4-5);
 - c. die Wirksamkeit kompensierender Mechanismen der pH-Kontrolle, welche zum Beispiel eine Reakkumulation verlorener Protonen noch in Gegenwart des Hemmstoffes (Bafilomycin A_1 , Destruxin B oder Phytoat) auslösen ;
 - d. Die Interaktion von V-ATPase und V-PPase auf Aktivitätsebene (vgl. Abschnitte 4.1.3; Abb. 4-6);
 - e. Die Auslösung eines Efflux von Protonen durch Na^+ (≥ 18 mM) und seine Hemmung durch Amilorid, welche die Funktion eines Na^+/H^+ -Austauschers wahrscheinlich macht (vgl. Abschnitt 4.1.4.2; Abb. 4-8);

- f. Die Auslösung eines Efflux von Protonen durch Ca^{2+} ($\geq 25 \mu\text{M}$), welche für die Funktion des $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauschers spricht (vgl. Abschnitt 4.1.4.1; Abb. 4-7).

Die günstigen experimentellen Voraussetzungen der in-situ-Vakuolen ermöglichten die Entdeckung bisher unbekannter Eigenschaften der vakuolären pH-Regulation, insbesondere die Stimulation des Na^+/H^+ -Austauschers durch LPC (siehe unten).

Nach den bisher gewonnenen Erfahrungen sollte das etablierte in-situ-System eine Vielfalt weiterer Untersuchungen vakuolärer Transportprozesse in Einzelzellen ermöglichen, zum Beispiel von Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- und andere, über Fluoreszenzindikatoren erfassbare Ionen, sowie andere mikroskopisch detektierbare Biomoleküle.

6.2 Lysolipide als Effektoren des vakuolären Protonentransports

6.2.1 Strukturelle Voraussetzungen für Stimulatoren des Efflux vakuolärer Protonen

Das in-situ-System erwies sich als ausreichend sensitiv, um unter einer Vielzahl von getesteten Lipid-Derivaten Effektoren des Protonentransportes am Tonoplasten zu identifizieren (Tab. 4-1).

Dabei erwiesen sich zwei Molekülstrukturen als Auslöser eines Efflux von Protonen: Lysophosphatidylcholin und Diacylglycerol.

1. In Abwesenheit von mikromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen sind offenbar Moleküle wirksam, welche folgende Strukturelemente besitzen:
 - a. Lysophospholipid-Grundstruktur (Fettsäure an C1; -OH an C2);
 - b. Phosphorylcholin an C3;
 - c. Kettenlänge und Doppelbindungsmuster der C1-Fettsäure haben keinen wesentlichen Einfluss.
2. In Gegenwart mikromolarer Ca^{2+} -Konzentrationen erwies sich auch DAG als Auslöser eines Efflux vakuolärer Protonen. Der Vergleich verschiedener DAG-Species zeigt, dass auch hier die Spezifität der Fettsäureketten für die Wirkung nicht bedeutsam war (vgl. Tab. 4-1). Interessanterweise ist die optimale Ca^{2+} -Konzentration (ca. $25 \mu\text{M}$, Abb. 4-18) in etwa identisch mit der Menge, die bereits

ohne DAG zur Auslösung eines Protonenefflux führt (Abb.4-7B). Dies ist ein Hinweis, dass die Wirkung des DAG auf eine Aktivierung dieses Austauschers gerichtet ist, wobei seine Ca^{2+} -Affinität aber nicht geändert wird. DAG ist sowohl das Produkt der Phospholipid-Hydrolyse durch Phospholipase C als auch ein wichtiger Metabolit im Glycerolipidstoffwechsel [Wakelam 1998; Miede et al. 1999]. Aufgrund seiner Hydrophobie verbleibt die Verbindung wahrscheinlich stets in Membranen [Jimenez-Monreal et al. 1998; Miede et al. 1999; Laxalt und Munnik 2002], wo es durch eine DAG-Kinase zu Phosphatidsäure phosphoryliert werden kann, welche vermutlich den eigentlichen "messenger" darstellt [van der Luit et al. 2000; Munnik 2001; den Hartog et al. 2001].

Es kann derzeit nicht entschieden werden, ob die erforderliche Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma von *Eschscholzia californica* tatsächlich unter bestimmten Bedingungen erreicht werden kann. Die Ca^{2+} -Konzentrationen im Cytoplasma pflanzlicher Zellen liegen im nicht-stimulierten Bereich bei ca. 100 - 200 nM [Legau et al. 1997]. Das Auftreten extrem hoher Ca^{2+} -Peaks in dem oben genannten Bereich wurde allerdings nach Einwirkung bestimmter Stressoren in anderen Objekten beschrieben [Übersichten in Rudd und Franklin-Tong 1999, Sanders et al. 1999; Malho et al. 1998; McAinsh et al. 1998] (vgl. Abschnitt 1.2.3).

6.3 LPC - ein neuer Effektor des Na^+/H^+ -Austauschers?

Die Tatsache, dass durch unphysiologisch hohe Na^+ -Konzentrationen (halbmaximaler Effekt bei 18 mM) ein Efflux vakuolärer Protonen ausgelöst wird, der durch Amilorid-Derivate vollständig hemmbar ist, spricht für die Aktivität eines Na^+/H^+ -Austauschers in der Vakuolenmembran (vgl. Abschnitt 4.1.4.2). Antiporter dieses Typs wurden zuerst in Halophyten gefunden, wo sie offenbar der Entfernung toxischer Na^+ -Konzentrationen aus dem Cytoplasma dienen [Glenn et al. 1999; Aspe und Blumwald 2002; Zhu 2002]. Der überzeugendste Beweis für diese biologische Funktion stammt aus Experimenten in denen ein NHX-Gen in *Arabidopsis* überexprimiert wurde, wodurch salzresistente Pflanzen entstanden [Aspe et al. 1999].

An den in der vorliegenden Arbeit benutzten in-situ-Vakuolen wurde erstmals gezeigt, dass in Gegenwart von LPC der Na^+/H^+ -Austausch auch bei den typischen Na^+ -Konzentrationen des Cytoplasmas in *Eschscholzia californica* (um 5 mM) ablaufen kann. Die aktivierende

Funktion des LPC auf diesen Austauscher besteht also in einer Verminderung der notwendigen Na^+ -Konzentration, etwa um den Faktor 10. Im Ergebnis kann der Na^+/H^+ -Transporter zur Generation von pH-Signalen unter physiologischen Bedingungen benutzt werden. Dieser durch LPC bewirkte "Funktionswandel" des Austauschers eröffnet neue Möglichkeiten zum Verständnis der Funktionen dieses Transportsystems, da auch Glycophyten solche Transporter aufweisen. Beispielsweise wurden im *Arabidopsis*-Genom bis jetzt 7 Na^+/H^+ -Austauscher-kodierende Gene gefunden [Axelsen und Palmgren 2001; Blumwald 2000].

Auch in Säugetierzellen gibt es Hinweise auf Na^+/H^+ -Austauscher als Auslöser von intrazellulären pH-shifts im Signaltransfer, zum Beispiel bei der Regulation des Wachstums [Hesketh et al. 1985; Grinstein et al. 1989].

Der Mechanismus, durch welchen LPC die Na^+ -Abhängigkeit des Antiporters verändert, ist noch unklar. Eine Proteinphosphorylierung an Ser/Thr kann ausgeschlossen werden, wie aus der fehlenden Hemmwirkung von Staurosporin (10 μM) hervorgeht.

Ebenso ist eine Beteiligung von Ca^{2+} unwahrscheinlich, da Ca^{2+} -Zusatz, wie seine Komplexierung durch Ca^{2+} -Chelatoren von BAPTA-Typ keinerlei Effekt zeigte (Abb. 4-14).

Damit ist die Wirkung von LPC auf den Na^+/H^+ -Transport von einer anderen Qualität als der bekannte stimulierende Einfluss dieser Verbindungen auf die P-ATPase der Plasmamembran [Palmgren et al. 1988; Palmgren und Sommarin 1989; Pedchenko et al. 1990]. Diese Protonenpumpe wird durch den Einfluss von LPC Ca^{2+} -abhängig phosphoryliert [Martiny-Baron und Scherer 1989; Scherer et al. 1993; Hanju et al. 1996]. In Tonoplastenvesikeln von *Cucurbita pepo* konnte eine Aktivierung der V-ATPase durch LPC gemessen werden [Martiny-Baron und Scherer 1989]. Dazu waren jedoch deutlich höhere LPC-Konzentrationen (>5 μM) erforderlich als bei der hier gefundenen Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers, so dass detergens-ähnliche Wirkungen nicht mehr auszuschließen sind. Im Augenblick ist eine direkte Interaktion des LPC mit dem Na^+/H^+ -Austauscher wahrscheinlicher als eine indirekte Wirkung, zum Beispiel über eine Protein-Phosphorylierung.

Von einigen tierischen Zellen ist bekannt, dass Na^+/H^+ -Transporter durch verschiedene Adenylate allosterisch aktiviert werden [Demaurex et al. 1997; Cabado et al. 1996; Aharonovitz et al. 1999]. Dieser Adenylat-Effekt ist wahrscheinlich auf die Stabilisierung spezifischer Konformationen des Transporters (3-D-motifs) zurückzuführen [Wakabayashi et al. 1992; Dibrov et al. 1998].

An in-situ-Vakuolen von *Eschscholzia californica* wurde erstmals in Pflanzenzellen ein stimulierender Effekt nicht-hydrolysierbarer Adenylate auf den Na^+ -ausgelösten Protonenefflux gefunden (Abb. 4-9). In Gegenwart von LPC war die stimulierende Adenylat-Wirkung nicht mehr nachweisbar (Abb. 4-10). Es ist also gut vorstellbar, dass LPC und die Adenylate einen gemeinsamen Angriffspunkt haben.

Eine zusammenfassende Betrachtung der Charakteristika der LPC-Wirkung macht deutlich, dass eine unspezifische, detergensähnliche Störung der Membranfunktion nicht die Grundlage der Stimulation des Na^+/H^+ -Austauschers sein kann. Dies zeigt sich besonders in der Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration, der Reversibilität und Strukturspezifität der LPC-Wirkung. Eine Störung der Barriere-Funktion des Tonoplasten würde außerdem zum Auslaufen der akkumulierten pH-Sonden führen, wie sie bei klassischen Detergenzien auch beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 4.3.1).

6.4 Ist der LPC-stimulierte Na^+/H^+ -Austausch ein Signalschritt zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese?

Das experimentelle System der permeablen Zelle erlaubte zwar in-situ-Messungen von Protonenfluxen an der Vakuole, aber keine Alkaloidbiosynthese. Die Frage, ob der in-situ gefundene Effekt des LPC tatsächlich ein Signalschritt zur Auslösung der Benzophenanthridin-Biosynthese ist, konnte daher nur in intakten Zellen untersucht werden. Die erhaltenen Daten sprechen klar für die Einbeziehung des LPC-Effektes auf den vakuolären Protonentransport in die Signalkette:

1. Die in Abbildung 5-5 vorgestellten Experimente zeigen eine gute Korrelation zwischen einer elicitorausgelösten PLA_2 -Aktivierung und einem transienten Anstieg des vakuolären pH. Dabei ist bemerkenswert, dass diese Korrelation nur für ca. 30 % aller Zellen einer Suspension gilt, das heißt, diese Zellen zeigen alle der oben genannten Signalereignisse.

2. Diese Beziehung wird vor allem durch Messungen mit der antisense- G_{α} -Mutante unterstützt (Abb.5-9), welche nach dem Ausfall der Elicitor-Aktivierung der PLA_2 auch einen Ausfall des Elicitor-verursachten pH-shifts zeigt.
3. Für den Effektor LPC kann es als sehr wahrscheinlich gelten, dass die erforderliche Konzentration zur Auslösung des Protonenefflux (halbmaximaler Effekt bei ca. 0,6 μ M; Sättigung bei ca. 1,0 μ M; Abb. 4-13) in Elicitor-behandelten Zellen tatsächlich erreicht wird: Für das Molekül LPC 18:2 wurde durch MALDI-TOF-MS-Messungen ein transienter Anstieg des zellulären Gehalts ermittelt, welcher ungefähr eine 1,9 μ M Lösung im geschätzten cytoplasmatischen Volumen ergeben würde [Viehweger et al. 2002].
4. Ein linearer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der PLA-Aktivität (Fluoreszenzanstieg) und dem Ausmaß der Alkalisierung der Vakuole existiert offenbar nicht (Abb.5-6). Wahrscheinlich spielt die "Signatur" des pH-shiftes eine wichtigere Rolle in der Signaltransduktion als seine Amplitude (vgl. Abschnitt 1.3.2). Sehr wahrscheinlich ist dabei die Überschreitung des Grenzwertes von ca. 0,2 pH-Einheiten noch nicht ausreichend, sondern es ist auch eine Mindestdauer von 3 min erforderlich. Andererseits führten zu starke cytoplasmatische Ansäuerungen mit permeablen Säuren, wie Butter- oder Pivalinsäure, in vielen Experimenten mit *Eschscholzia*-Suspensionskulturen nicht zu einer Steigerung der Phytoalexin-Produktion [S. Evers; Z. Angelova, persönliche Mitteilungen]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Pflanzenspezies gefunden (vgl. Abschnitt 1.3.4.5) [Lapous et al. 1997].

Die Eignung des LPC für eine Funktion als intrazellulärer messenger liegt auch in seiner schnellen Beweglichkeit im Cytoplasma und in seinem schnellen turnover begründet. Abbildung 2-6 zeigt, dass fluoreszenzmarkiertes, extern zugesetztes LPC bereits nach 2 min den Tonoplasten erreicht. Ähnliche Kinetiken wurden auch für die Lyso-Lipid-Verteilung zwischen endoplasmatischem Retikulum und Chloroplasten beschrieben (< 1 min) [Moreau et al. 1998]. Der intrazelluläre messenger LPC wird nicht in die Vakuole aufgenommen (Abb. 2-6). Eine hohe Kapazität cytoplasmatischer Acyltransferasen katalysiert eine rasche Reacylierung zu Phosphatidylcholin [W. Schwartze, persönliche Mitteilung], so dass der Anstieg des LPC-Gehalts transient bleibt. Dies ist eine wesentliche Eigenschaft eines Signalmoleküls (vgl. Abschnitt 1.2.1).

6.5 Niedrige und hohe Elicitorkonzentrationen initiieren verschiedene Signalwege zur Alkaloidbildung

1. Niedrige Elicitorkonzentrationen (1 µg/ml)

Die Summe der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Resultate lässt eine Folge miteinander verbundener Signalereignisse erkennen, die nach dem Kontakt mit Elicitorkonzentrationen um 1 µg/ml (bezogen auf das verwendete Präparat nach Schumacher et al. [1987]) ausgelöst werden. Die hier untersuchten Signalereignisse ordnen sich gut in die folgende Sequenz ein [Roos et al. 1998; Roos et al. 1999; Viehweger et al. 2002].

- a. Aktivierung einer G-Protein kontrollierten PLA₂ an der Plasmamembran, Bildung von LPC und Fettsäuren:

In Vesikeln der Plasmamembran wurde die Aktivierung der GTP-Bindung und der PLA₂-katalysierten Phospholipid-Spaltung sowie der Anstieg von LPC-Derivaten nachgewiesen. In Ganzzellen lässt sich der Anstieg der PLA₂-Aktivität mittels fluorogener Substrate mikroskopisch quantifizieren, der in dieser Arbeit erstmals mit konfokaler Auflösung nachvollzogen wurde (Abb. 5-1). In Suspensionen von Ganzzellen wurde ein transienter Peak der LPC-Spezies LPC 18:2 und LPC 16:0 massenspektrometrisch gezeigt.

- b. Die Aktivierung eines Na⁺/H⁺-Austauschers am Tonoplasten:

Der Efflux von Protonen aus dem vakuolären Pool wurde in-situ demonstriert. LPC verschiebt das vakuoläre Protonengleichgewicht transient zur Seite des Efflux. Dafür sind cytoplasmatische Na⁺-Konzentrationen von ca. 2 mM ausreichend (vgl. Abschnitt 4.3.2.2). Kompensierende Mechanismen (wahrscheinlich über das Membranpotential kontrolliert) führen zur Reakkumulation der ausgetretenen Protonen.

- c. Der resultierende pH-shift im Cytoplasma führt zu downstream-Ereignissen, in deren Folge die Biosynthese der Benzophenanthridin-Alkaloide induziert wird:

Die molekularen Details dieses Teils der Signalkette sind bisher unbekannt. Bereits bekannte Ergebnisse wiesen darauf hin, dass folgende Signalkomponenten beteiligt sind:

- i. die Neubildung von Proteinen und das Verschwinden vorhandener Proteine [Färber 2002];
- ii. die Tyr-Phosphorylierung spezifischer Proteine [S. Evers, persönliche Mitteilung].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese drei Ereignisse in derselben Zelle visualisiert werden können (Abb. 5-4). Zugleich wurde deutlich, dass nur etwa 30 % aller Zellen der verwendeten Suspension an diesem Signalweg teilnehmen.

2. Hohe Elicitorkonzentrationen (10 µg/ml)

Der Kontakt mit Elicitorkonzentrationen von 10 µg/ml führt ebenfalls zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese (mit nur geringfügig erhöhter Bildungsrate), jedoch kommen weitere Ereignisse hinzu, die bei Elicitorkonzentrationen um 1 µg/ml nicht beobachtet werden [Roos et al. 1998; Färber et al. 2003].:

- a. Das Browning der Kultur, das heißt die Bildung von Polyphenolen;
- b. Die Alkalisierung des Außenmediums;
- c. Der Anstieg der Jasmonat-Konzentration.

Diese Anstiege sind typisch für die aus vielen Pflanzenspezies bekannte, ubiquitäre Signalkaskade der Pathogenabwehr, welche über komplexe Abläufe zur hypersensitiven Reaktion führt [Übersichten u.a. in Somssich und Hahlbrock 1998; Heath 2000; Thomma et al. 2001; Kunkel und Brooks 2002]. Ein zentrales Ereignis dieses Signalweges ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (oxidative burst) [Lamb und Dixon 1997], deren Beteiligung auch in *Eschscholzia* nach Kontakt mit hohen Elicitorkonzentrationen gezeigt wurde (Ausschaltung des Brownings durch Katalase) [Roos et al. 1998].

Die hier vorgestellten Arbeiten zeigen ebenfalls klare Besonderheiten bei der Reaktion von Einzelzellen auf hohe Elicitorkonzentrationen, welche sich deutlich von den durch 1 µg/ml ausgelösten unterscheiden (vgl. Abschnitt 5.2):

- a. Es erfolgt kein oder nur ein wesentlich geringerer Anstieg der PLA₂-Aktivität.
- b. Es werden keine oder wesentlich weniger pH-shifts ausgelöst.
- c. Es ergibt sich demzufolge keine Korrelation dieser beiden Ereignisse mit der Auslösung der Alkaloidbiosynthese.

Diese Daten sprechen deshalb für die Existenz eines Signalweges, der auf einem alternativen Weg, ohne Einbeziehung des hier untersuchten pH-shifts, die Expression des Alkaloidstoffwechsels auslöst. Dieser Weg schließt offenbar das Stress-Hormon Jasmonat als "second messenger" ein [Gundlach et al. 1992; Haider et al. 2000]. Dafür sprechen auch

aktuelle Daten der hier verwendeten Zellsuspension, die eine Differenzierung beider Signalwege über selektive Desensibilisierungs-Mechanismen zeigen [Färber et al. 2003].

7 Zusammenfassung (Inhalt der Thesen)

1. Der Kontakt von Zellsuspensionskulturen von *Eschscholzia californica* mit einem Pilz-Elicitor (Glycoprotein-Fraktion aus Bäckerhefe) löst die Bildung von Benzophenanthridin-Alkaloiden aus. Ein intermediärer Signalschritt nach Elicitorkontakt ist der Efflux von Protonen aus der Vakuole, welcher zu einer transienten Ansäuerung im Cytoplasma führt.

2. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Suche nach einem Mechanismus für den Efflux vakuolärer Protonen und seines Zusammenhanges mit anderen Signalereignissen bei der Auslösung der Alkaloidbiosynthese. Dazu wurde ein in-situ-System zur Untersuchung vakuolärer Protonenfluxe entwickelt, welches folgende Charakteristika aufweist:
 - a. Durch osmotische und Temperatur-Schocks konnte eine Permeabilisierung der Plasmamembran für Mikromoleküle herbeigeführt werden, ohne dass Detergenzien notwendig waren.
 - b. Nach der Permeabilisierung ist das Zellinnere für Moleküle <40 kDa zugänglich. Der Verlust intrazellulärer Proteine war nur sehr gering bzw. nicht nachweisbar.
 - c. Der direkte Zugang für Mikromoleküle ermöglichte die Einstellung einer definierten Ionenzusammensetzung in der Umgebung der Vakuole und die selektive Benutzung von Energiequellen und Hemmstoffen der vakuolären Transportsysteme. Mit Hilfe der konfokalen pH-Topographie konnte eine kontinuierliche Aufzeichnung des vakuolären pH-Werts unter Perfusionsbedingungen erreicht werden. Damit wurde gezeigt, dass die Protonenpumpen des Tonoplasten, das heißt die V-ATPase und die V-PPase, funktionell intakt waren und ähnliche Protonenakkumulationen auslösen konnten wie in Ganzzellen. Außerdem wurden nach der Etablierung eines Protonengradienten Na^+/H^+ - und $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauschvorgänge gemessen.

3. Das in-situ-Testsystem ermöglicht die Prüfung von Mikromolekülen mit Wirkung auf den vakuolären Protonentransport. Nachdem unsere Arbeitsgruppe die Elicitoraktivierung einer Phospholipase A_2 gezeigt hat, wurden Phospholipide und

- ihre Spaltprodukte als Testsubstanzen ausgewählt. Unter diesen wurden mit Lysophosphatidylcholin und Diacylglycerol zwei bisher unbekannte Effektoren entdeckt, welche einen Efflux vakuolärer Protonen auslösen.
4. Das Signalmolekül LPC löst bei Konzentrationen $\leq 1 \mu\text{M}$ einen Na^+ -abhängigen, transienten Verlust vakuolärer Protonen aus. Ein solcher Efflux kann auch durch Na^+ -Ionen im Konzentrationsbereich $>20 \text{ mM}$ bewirkt werden. In Gegenwart von LPC sinkt die erforderliche Na^+ -Konzentration auf etwa 2 mM , das heißt, ein Na^+/H^+ -Austausch ist bei den typischen Na^+ -Konzentrationen des Cytoplasmas (um 5 mM in *Eschscholzia*-Zellen) möglich. Alle Austauschvorgänge werden durch das Amilorid-Derivate vollständig inhibiert. Dies spricht für die Beteiligung eines Na^+/H^+ -Antiports (NHX), für den bisher nur in salztoleranten Pflanzen eine Funktion bei der Entgiftung toxischer Na^+ -Konzentrationen gefunden wurde. LPC verwandelt also diesen Antiporter in einen Generator für pH-shifts. Dieser Funktionswandel des Na^+/H^+ -Austauschers von der Na^+ -Homöostase in Halophyten zur Generierung von pH-shifts mit Signalcharakter konnte erstmals in Pflanzenzellen gezeigt werden.
 5. Zur Auslösung eines pH-shiftes durch Diacylglycerol waren hohe Ca^{2+} -Konzentrationen (ca. $25 \mu\text{M}$) erforderlich. Bisher ist nicht bekannt, ob diese Konzentrationen unter bestimmten Bedingungen im Cytosol der *Eschscholzia*-Zellen erreicht werden.
 6. In Zellsuspensionen konnten die nach Elicitorkontakt ($1 \mu\text{g/ml}$) auftretenden Signalereignisse: Aktivierung einer Phospholipase A_2 , pH-shift (Efflux von Protonen aus der Vakuole) und Alkaloidbiosynthese (Akkumulation in der Zellwand) jeweils in derselben intakten Zelle durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen und semiquantitativ gemessen werden. Dabei wurde eine positive Korrelation zwischen der Aktivierung der Phospholipase A_2 , dem pH-shift und der Alkaloidbildung gefunden. In einem antisense- G_α -Zellstamm wurden nach Elicitorkontakt keine Benzophenanthridin-Alkaloide neu gebildet. Diese Zellen zeigten auch keine Aktivierung der Phospholipase A_2 .
 7. Zusammen betrachtet sprechen die Ergebnisse für eine durch den Elicitorkontakt

- (1 μ /ml) ausgelöste Signalkette, welche folgende Schritte einschließt:
- a. Aktivierung einer Phospholipase A₂ und Bildung des Signalmoleküls LPC,
 - b. Efflux vakuolärer Protonen, die eine cytoplasmatische Azidifizierung auslösen,
 - c. Expression der Biosynthese von Alkaloiden.
2. Bei der Verwendung hoher Elicitorkonzentrationen (10 μ g/ml) wurde eine Alkaloidbiosynthese beobachtet, welche keine Korrelation zwischen Phospholipase A₂ und pH-shift aufwies. Dies spricht für die Existenz eines Signalweges, welcher von den hier vorgestellten Signalereignissen unabhängig ist.

8 Literaturverzeichnis

- Aharonovitz, O., Demaurex, N., Woodside, M., Grinstein, S.** (1999). ATP dependence is not an intrinsic property of Na^+/H^+ exchanger NHE1: Requirement for an ancillary factor. *Am. J. Physiol.* 276, C1303-C1311.
- Allen, G.J., Amtmann, A., Sanders, D.** (1998). Calcium-dependent and calcium-independent K^+ mobilization channels in *Vicia faba* guard cell vacuoles. *J. Exp. Bot.* 49, 305-318.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E.** (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285, 1256-1258.
- Apse, M.P. und Blumwald, E.** (2002). Engineering salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 146-150.
- Axelsen, K.B. und Palmgren, M.G.** (2001). Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126, 696-706.
- Bachewich, C.L. und Heath I.B** (1997). The cytoplasmic pH influences hyphal tip growth and cytoskeleton related organization. *Fungal Gent. Biol.* 21, 76-91.
- Bandani, A.R., Amiri, B., Butt, T.M., Gordon-Weeks, R.** (2001). Effects of efrapeptin and destruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1510, 367-377.
- Barbier-Brygoo, H., Gaymard, F., Rolland, N., Joyard, J.** (2001). Strategies to identify transport systems in plants. *Trends Plant Sci.* 6, 577-585.
- Barkla, B.J. Zingarelli, L., Blumwald, E., Smith, J.A.C.** (1995). Tonoplast Na^+/H^+ antiport activity and its energization by the vacuolar H^+ -ATPase in the halophytic *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol.* 109, 549-556.
- Barkla, B.J. und Pantoja, O.** (1996). Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 159-184.
- Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Maldonado-Gama, M., Pantoja, O.** (1999). Abscisic acid induction of vacuolar H^+ -ATPase activity in *Mesembryanthemum crystallinum* is developmentally regulated. *Plant Physiol.* 120, 811-819.
- Barrieu, F., Marty-Mazars, D., Thomas, D., Chaumont, F., Charbonnier, M., Marty, F.** (1999). Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BopTIP26-1 in cauliflower cells. *Planta* 209, 77-86.
- Baykov, A.A., Bakuleva, N.P., Rea, P.A.** (1993). Steady-state kinetics of substrate hydrolysis by vacuolar H^+ -pyrophosphatase, a simple three-state model. *Eur. J.*

- Biochem.* 217, 755-762.
- Binzel, M.L., Hess, F.D., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M.** (1988). Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 86, 607-614.
- Blackford, S., Rea, P.A., Sanders, D.** (1990). Voltage Sensitivity of H⁺/Ca²⁺ antiport in higher plant tonoplast suggests a role in vacuolar calcium accumulation. *J. Biol. Chem.* 265, 9617-9620.
- Blatt, M.R. und Armstrong, F.** (1993). K⁺ channels of stomatal guard-cells-abscisic-acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH. *Planta* 191, 330-341.
- Bligny, R., Gout, E., Kaiser, W., Heber, U., Walker, D., Douce, R.** (1997). pH regulation in acid-stressed leaves of pea plants grown in the presence of nitrate or ammonium salts: Studies involving ³¹P-NMR spectroscopy and chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 142-152.
- Blumwald, E., Poole, R.L.** (1985). Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue from *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 78, 163-167.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., Apse, M.P.** (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465, 140-151.
- Blumwald, E.** (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Cur. Opin. Cell Biol.* 12, 431-434.
- Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 189-214.
- Brauer, D., Uknalis, J., Triana, R., Shachar-Hill, Y., Tu, S.-I.** (1997a). Effects of bafilomycin A₁ and metabolic inhibitors on the maintenance of vacuolar acidity in maize root hair cells. *Plant Physiol.* 113, 809-816.
- Brauer, D., Uknalis, J., Triana, R., Tu, S.-I.** (1997b). Effects of external pH and ammonium on vacuolar pH in maize root hair cells. *Plant Physiol. Biochem.* 35, 31-39.
- Brown, E.B., Wu, E.S., Zipfel, W., Webb, W.W.** (1999). Measurement of molecular diffusion in solution by multiphoton fluorescence photobleaching recovery. *Biophys. J.* 77, 2837-2849.
- Bush, D.S.** (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 95-122.
- Cabado, A.G., Yu, F.H., Kapus, A., Lukacs, G., Grinstein, S., Orlowski, J.** (1996). Distinct structural domains confer cAMP sensitivity and ATP dependence to the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 isoform. *J. Biol. Chem.* 271, 3590-3599.
- Cervone, F., Castoria, R., Leckie, F., De Lorenzo, G.** (1997). Perception of fungal

- elicitors and signal transduction. In *Signal transduction in plants*, P. Aducci ed (Basel: Birkhäuser Verlag), pp 153-177.
- Chandra, S., Heinsteins, P.F., Low, P.S.** (1996). Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiol.* 110, 979-986.
- Chapman, K.D.** (1998). Phospholipase activation during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci.* 11, 419-426.
- Cosgrove, D.J.** (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 171-201.
- Counillon, L. und Pouyssegur, J.** (2000). The expanding family of eukaryotic Na⁺/H⁺ exchangers. *J. Biol. Chem.* 275, 1-4.
- Crider, B.P., Xie, X.-S., Stones, D.K.** (1994). Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pumps. *J. Biol. Chem.* 269, 17379-17381.
- Darley, C.P., van Wuytswinkel, O.C.M., van der Woude, K., Mager, W.H., de Boer, A.H.** (2000). *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers. *Biochem. J.* 351, 241-249.
- Davies, D.D.** (1986). The fine control of cytosolic pH. *Physiol. Plant* 67, 702-706.
- Davies, J.M., Hunt, I., Sanders, D.** (1994). Vacuolar H⁺-pumping ATPase variable transport coupling ratio controlled by pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8547-5851.
- Davies, J.M.** (1997). Vacuolar energization: Pumps, shunts and stress. *J. Exp. Bot.* 48, 633-641.
- Delrot, S., Atanassova, R., Maurousset, L.** (2000). Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 281-306.
- de Grauw, C.J., Gerritsen, H.C.** (1999). Quantitative imaging in thick specimen using two-photon FLIM. In *Fluorescence microscopy and fluorescent probes*, A. Kotyk, ed (Usti nad Labem: Espero Publishing), pp. 91-98.
- den Hartog, M., Musgrave, A., Munnik, T.** (2001). Nod factor- induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: A role for phospholipase C and D in root hair deformation. *Plant J.* 25, 55-66.
- Demaurex, N., Romanek, R.R., Orlowski, J., Grinstein, S.** (1997). ATP dependence of Na⁺/H⁺ exchange, Nucleotide specificity and assessment of the role of phospholipids. *J. Gen. Physiol.* 109, 117-128.
- Diarra, A., Sheldon, C., Church, J.** (2001). In situ calibration and [H⁺] sensitivity of the fluorescent Na⁺ indicator SBFI. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C1623-C1633.
- Dibrov, P., Fliegel, L.** (1998). Comparative molecular analysis of Na⁺/H⁺ exchangers: A

- unified model for Na^+/H^+ antiport? *FEBS Letters* 424, 1-5.
- Dietz, K.J., Jager, R., Kaiser, G., Martinoia, E.** (1990). Amino-acid-transport across the tonoplast of vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts - uptake of alanine, leucine, and glutamine. *Plant Physiol.* 92, 123-129.
- Dschida, W.J.A. und Bowmann, B.J.** (1995). The vacuolar ATPase: Sulfite stabilization and the mechanism of nitrate inactivation. *J. Biol. Chem.* 270, 1557-1563.
- Dürr, M., Boller, T., Wiemken, A.** (1975). Polybase induced lysis of spheroplasts. A new gentle method for preparation of vacuoles. *Arch. Microbiol.* 105, 319-327.
- Evans, N.H., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M.** (2001). Calcium oscillations in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 415-420.
- Ewy, R.G. und Dilley, R.A.** (2000). Distinguishing between luminal and localized proton buffering pools in thylakoid membranes. *Plant Physiol.* 122, 583-585.
- Facanha, A.R. und de Meis, L.** (1998). Reversibility of H^+ -ATPase and H^+ -pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiol.* 116, 1487-1495.
- Fan, L., Zheng, S., Wang, X.** (1997). Antisense suppression of phospholipase D_{α} retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 9, 2183-2196.
- Färber, K.** (2002). Alkaloide als Toxine und Signale bei der pathogenen Interaktion zwischen Pilz- und Pflanzenzelle. *Dissertation Fachbereich Pharmazie, Universität Halle-Wittenberg.*
- Färber, K., Schumann, B., Miersch, O., Roos, W.** (2003). Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the expression of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*. *Phytochemistry* 62, 491-500.
- Fasano, J.M., Swanson, S.J., Blancaflor, E.B., Dowd, P.E., Kao, T., Gilroy, S.** (2001). Changes in root cap pH are required for the gravity response of the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 13, 907-921.
- Feijo, J.A., Sainhas, J., Hackett, G.R., Kunkel, J.G., Hepler, P.K.** (1999). Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J. Cell Biol.* 144, 483-496.
- Feijo, J.A., Sainhas, J., Holdaway-Clarke, T., Cordeiro, M.S., Kunkel, J.G., Hepler, P.K.** (2001). Cellular oscillations and the regulation of growth: The pollen tube paradigm. *Bioessays* 23, 86-94.
- Felle, H.H. und Bertl, A.** (1986). Light-induced cytoplasmic pH-changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans*. *Biochim. Biophys. Acta* 848, 176-182.

- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Schultze, M.** (2000). How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors. *Plant Physiol.* 124, 1373-1380.
- Felle, H.H.** (2001). pH: Signal and messenger in plant cells. *Plant Biol.* 3, 577-591.
- Felle, H.H.** (2002). pH as a signal and regulator of membrane transport. In *Handbook of Plant Growth: pH as the Master Variable*, Z. Rengel, ed (New York: Marcel Dekker), pp. 107-130.
- Fischer-Schliebs, E., Mariaux, J.-B., Lüttge, U.** (1997). Stimulation of H⁺-transport activity of vacuolar H⁺-ATPase by activation of H⁺-PPase in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Biol. Plant.* 39, 169-177.
- Fraichard, A., Trossat, C., Magnin, T., Pugin, A.** (1994). Influence of ATPase activity on PP_i dependent H⁺-transport in tonoplast vesicles of *Acer pseudoplatanus*. *Plant Sci.* 100, 129-138.
- Franklin-Tong, V.E., Hackett, G., Hepler, P.K.** (1997). Ratio-imaging of Ca²⁺ in the self-incompatibility response in pollen tubes of *Papaver rhoeas*. *Plant J.* 12, 1375-1386.
- Frohnmeier, H., Grabov, A., Blatt, M.R.** (1998). A role for the vacuole in auxin-mediated control of cytosolic pH by *Vicia mesophyll* and guard cells. *Plant J.* 13, 109-116.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tanaka, Y.** (1999). Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim. Biophys. Acta* 1446, 149-155.
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S.L., Fink, G.R.** (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1480-1485.
- Gehring, C.A., Irving, H.R., Parish, R.W.** (1990). Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9645-9649.
- Gehring, C.A., Irving, H.R., Parish, R.W.** (1994). Gibberellic acid induces cytoplasmic acidification in maize coleoptiles. *Planta* 194, 532-540.
- Gesell, A.** (2001). Untersuchungen zur Elicitor-abhängigen Aktivierung von G-Proteinen in *Eschscholzia californica*. *Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie*, Universität Halle-Wittenberg.
- Gillet, C. Voue, M., Cambier, P.** (1998). Site-specific counterion binding and pectic chains conformational transitions in the *Nitella* cell wall. *J. Exp. Bot.* 49, 797-805.
- Glenn, E., Brown, J.J., Blumwald, E.** (1999). Salt-tolerant mechanism and crop potential of halophytes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18, 227-255.
- Gordon-Weeks, R., Steele, S.H., Leigh, R.A.** (1996). The role of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates and activators of the vacuolar H⁺-pumping inorganic pyrophosphatase. *Plant Physiol.* 111, 195-202.

- Gordon-Weeks, R., Parmar, S., Davies, T.G.E., Leigh, R.A.** (1999). Structural aspects of the effectiveness of bisphosphonates as competitive inhibitors of the plant vacuolar proton-pumping pyrophosphatase. *Biochem. J.* 337, 373-377.
- Gout, E., Bligny, R., Douce, R.** (1992). Regulation of intracellular pH values in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* 267, 13903-13909.
- Gout, E., Boisson, A.-M., Aubert, S., Douce, R., Bligny, R.** (2001). Origin of the cytoplasmic pH changes during anaerobic stress in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiol.* 125, 912-925.
- Gowda, L.R., Joshi, M.S., Bhat, S.G.** (1988). Fragilis by digitonin permeabilization of cell membrane. *Analyt. Biochem.* 175, 531-536.
- Grabov, A. und Blatt, M.R.** (1997). Parallel control of the inward rectifier K⁺ channel by cytosolic free Ca²⁺ and pH in *Vicia* guard cells. *Planta* 201, 84-95.
- Griffith, C.J., Rea, P.A., Blumwald, E., Poole, R.J.** (1986). Mechanism of stimulation and inhibition of tonoplast H⁺-ATPase of *Beta vulgaris* by chloride and nitrate. *Plant. Physiol.* 81, 120-125.
- Grinstein, S., Rotin, D., Mason, M.J.** (1989). Na⁺/H⁺ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 988, 73-97.
- Guern, J., Felle, H.H., Mathieu, Y., Kurkdjian, A.** (1991). Regulation of intracellular pH in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 127, 111-173.
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M., Zenk, M.H.** (1992). Jasmonic acid as a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2389-2393.
- Hagendoorn, M.J.M., Wagner, A.M., Segers, G., van der Plas, L.H.W., Oostdam, A., van Walraven, H.S.** (1994). Cytoplasmic acidification and secondary metabolite production in different plant cell suspensions. *Plant Physiol.* 103, 723-730.
- Haider, G., von Schrader, T., Fülllein, M., Blechert, S., Kutchan, T.M.** (2000). Structure activity relationships of synthetic analogs of jasmonic acid and coronatine on induction of benzo[c]phenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholzia californica* cell cultures. *Biol. Chem.* 381, 741-748.
- Hamada, A., Hibino, T., Nakamura, T., Takabe, T.** (2001). Na⁺/H⁺ antiporter from *Synechocystis* species PCC 6803, homologous to SOS1, contains an aspartic residue and long C- terminal tail important for the carrier activity. *Plant Physiol.* 125, 437-446.
- Hanju, Y., Doonam, P., Youngsook, L.** (1996). In vivo evidence for the involvement of phospholipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin

- induced corn coleoptile elongation. *Physiol. Plant.* 96, 359-368.
- Hansen, U.-P., Moldaenke, C., Tabrizi, H., Ramm, D.** (1993). The effect of transthylakoid proton uptake on cytosolic pH and the imbalance of ATP and NADH/H⁺ production as measured by CO₂- induced and light-induced depolarisation of the plasmalemma. *Plant Cell Physiol.* 34, 681-695.
- Hartung, J.** (2002). Analyse diskreten Datenmaterials in Form von Kontingenztafeln. In *Statistik*, (München: Oldenbourg Wissenschaftsverlag), pp. 407-503.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 463-499.
- Haugland, R.P.** (2002a). pH Indicators. In: *Handbook of fluorescent probes and research products*. J. Gregory, ed (Eugene: Molecular Probes Inc.), pp. 827-848.
- Haugland, R.P.** (2002b). Indicators for Na⁺, K⁺ and miscellaneous ions. In: *Handbook of fluorescent probes and research products*. J. Gregory, ed (Eugene: Molecular Probes Inc.), pp. 849-864.
- He, D.-Y., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N., Minami, E.** (1998). Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 1167-1174.
- Heath, M.C.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 315-319.
- Hesketh, R.T., Moore, J.P., Morris, J.D.H., Taylor, M.V., Rogers, J., Smith, G.A.M.J.C.A.** (1985). Common sequence of calcium pH signals in the mitogenic stimulation of eukaryotic cells. *Nature* 313, 481-484.
- Hodges, T.K., Darding, R.L., Weidner, T.** (1971). Gramicidin-D-stimulated influx of monovalent cations into plant roots. *Planta* 97, 245 &.
- Hollstein, P.** (2001). Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der Phospholipase A₂-Aktivität und ihrer Beziehung zum Glutathion-Gehalt in Einzelzellen von *Eschscholzia californica*. *Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie*, Universität Halle-Wittenberg.
- Horn, M.A., Meadows, R.P., Apostol, I., Jones, C.R., Gorenstein, D.G., Heinstein, P.F., Low, P.S.** (1992). Effect of elicitation and changes in extracellular pH on the cytoplasmic and vacuolar pH of suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol.* 98, 680-686.
- Irving, H.R., Gehring, C.A., Parish, R.W.** (1992). Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1790-1794.

- Johannes, E. und Felle, H.** (1990). Proton gradient across the tonoplast of *Riccia fluitans* as a result of the joint action of two electroenzymes. *Plant Physiol.* 93, 412-417.
- Johannes, E., Collings, D.A., Rink, J.C., Allen, N.,S.** (2001). Cytoplasmic pH dynamics in maize pulvinal cells induced by gravity vector changes. *Plant Physiol.* 127, 119-130.
- Kane, P.M.** (1995). Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺ ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 17025-17032.
- Kohorn, B.D.** (2000). Plasma membrane-cell wall contacts. *Plant Physiol.* 124, 31-38.
- König, K., Simon, U., Halbhuber, K.J.** (1996). 3D resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser scanning microscope. *Cell. Mol. Biol.* 42, 1181-1194.
- Kreis, W., Reinhard, E.** (1985). Rapid isolation of vacuoles from suspension cultured *Digitalis lanata* cells. *J. Plant Physiol.* 121, 385-390.
- Kringstad, R., Kenyon, W.H., Black, C.C. Jr.** (1980). The rapid isolation of vacuoles from leaves of crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* 66, 379-382.
- Kuchitsu, K., Yazaki, Y., Sakano, K., Shibuya, N.** (1997). Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor. *Plant Cell Physiol.* 38, 1012-1018.
- Kunkel, B.N. und Brooks, D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 325-331.
- Kurkdjian, A. und Guern, J.** (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 271-303.
- Lamb, C. und Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Lance, C., Chauveau, M., Dizengremel, P.** (1985). The cyanide resistant pathway of plant mitochondria. In *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Higher Plant Cell Respiration*, R. Douce und D.A. Day, ed (Berlin: Springer-Verlag), pp. 202-247.
- Laouar, L., Mulligan, B.J., Lowe, K.C.** (1992). Yeast permeabilization with surfactants. *Biotechnol. Letters* 14, 719-72.
- Lapous, D., Mathieu, Y., Guern, J., Lauriere, C.** (1998). Increase of defense gene transcripts by cytoplasmic acidification in tobacco cell suspensions. *Planta* 205, 452-458.
- Laxalt, A.M., ter Riet, B., Verdonk, J.C., Parigi, L., Tameling, W.I.L., Vossen, J., Haring, M., Musgrave, A., Munnik, T.** (2001). Characterization of five tomato phospholipase D cDNAs: Rapid and specific expression of LePLD β 1 on elicitation

- with xylanase. *Plant J.* 26, 27-247.
- Laxalt, A.M. und Munnik, T.** (2002). Phospholipid signaling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 1-7.
- League, V., Blancaflor, E., Wymer, C., Perbal, G., Fantin, D., Gilroy, S.** (1997). Cytoplasmic free Ca^{2+} in Arabidopsis roots changes in response to touch but not gravity. *Plant Physiol.* 114, 789-800.
- Lebrun-Garcia, A., Chiltz, A., Gout, E., Bligny, R., Pugin, A.** (2002). Questioning the role of salicylic acid and cytosolic acidification in mitogen-activated protein kinase activation induced by cryptogin in tobacco cells. *Planta* 214, 792-797.
- Leigh, R.A., Pope, A.J., Jennings, I.R., Sanders, D.** (1992). Kinetics of the vacuolar H^+ -pyrophosphatase. The roles of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates, activators, and inhibitors. *Plant Physiol.* 100, 1698-1705.
- Leigh, R.A., Gordon-Weeks, R., Steele, S.H., Korenkov, V.D.** (1994). The H^+ -pumping inorganic pyrophosphatase of the vacuolar membrane of higher plants. In *Membrane transport in plants and fungi: Molecular mechanisms and control*, M.R. Blatt, R.A. Leigh, D. Sanders ed Cambridge: Society for Experimental Biology), pp. 61-74.
- Lequoc, K., Lequoc, D., Pugin, A.** (1987). An efficient method for plant vacuole isolation using digitonin for plasmalemma lysis. *J. Plant Physiol.* 126, 329-336.
- Leschke, G.** (1997). Untersuchungen zu den Voraussetzungen der Alkaloidbiosynthese in *Eschscholtzia californica*. *Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie*, Universität Halle-Wittenberg.
- Linsmaier, E.M. und Skoog, F.** (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 18, 100-127.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.-S., Zhu, J.-K.** (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3730-3734.
- Lohse, S.** (1998). Entwicklung eines detergensfreien in situ-Systemes zur Untersuchung vakuolärer Funktionen in Pflanzenzellen. *Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie*, Universität Halle-Wittenberg.
- Luan, S.** (2002). Tyrosine phosphorylation in plant cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11567-11569.
- Maathuis, F.J.M., Amtmann, A.** (1999). K^+ nutrition and Na^+ toxicity: The basis of cellular K^+/Na^+ ratios. *Ann. Botany* 84, 123-133.
- MacRobbie, E.A.C.** (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 353, 1475-1488.
- Maeshima, M.** (2000). Vacuolar H^+ -pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 37-51.

- Maeshima, M.** (2001). Tonoplast transporters: Organization and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 469-497.
- Maeshima, M. und Nakanishi, Y.** (2002). H⁺-ATPase and H⁺-PPase in the vacuolar membrane: Physiology and molecular biology. In *Handbook of Plant Growth: pH as the Master Variable*, Z. Rengel ed (New York: Marcel Dekker), pp. 23-47.
- Malho, R., Moutinho, A., van der Luit, A., Trewawas, A.J.** (1998). Spatial characteristics of calcium signaling: The calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signaling. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 353, 1463-1473.
- Marquardt-Jarczyk, G., Lüttge, U.** (1990). Inorganic pyrophosphatase-activated ATP dependent proton transport at the tonoplast of mesophyll cells of the CAM plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Bot. Acta* 103, 203-213.
- Martiny-Baron, G. und Scherer, G.F.E.** (1989). Phospholipid-stimulated protein kinase in plants. *J. Biol. Chem.* 264, 18052-18059.
- Marty, F.** (1999). Plant vacuoles. *Plant Cell* 11, 587-599.
- Mathieu, Y., Lapous, D., Thomine, S., Lauriere, C., Guern, J.** (1996). Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta* 199, 416-424.
- Maurel, C., Tacnet, F., Guclu, J., Guern, J., Ripoche, P.** (1997). Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7103-7108.
- McAinsh, M.R., Hetherington, A.M.** (1998). Encoding specificity in Ca²⁺ signaling systems. *Trends Plant Sci.* 3, 32-35.
- McElhaney, R.N.** (1994). Techniques for measuring lipid phase state and fluidity in biological membranes. In: *Temperature adaptation of biological membranes*, A. R. Cossins, ed (London: Portland Press), pp. 31-34.
- Meijer, H.J.G., Arisz, S.A., van Himbergen, J.A.J., Musgrave, A., Munnik, T.** (2001). Hyperosmotic stress rapidly generates lyso-phosphatidic acid in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 25, 541-548.
- Meiners, S., Gharyal, P.K., Schindler, M.** (1991). Permeabilization of the plasmalemma and wall of soybean root cells to macromolecules. *Planta* 184, 443-447.
- Miege, C., Marechal, E.** (1999). 1,2-sn-Diacylglycerol in plant cells: Product, substrate and regulator. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 795-808.
- Minta, A. und Tsien, R.Y.** (1989). Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J. Biol. Chem.* 264, 19449-19457.
- Miseta, A., Kellermayer, R., Aiello, D.P., Fu, L., Bedwell, D.M.** (1999). The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S.*

- cerevisiae*. *FEBS Lett.* 451, 132-136.
- Moreau, P., Bessoule, J.J., Mongrand, S., Testet, E., Vincent, P., Cassagne, C.** (1998). Lipid trafficking in plant cells. *Prog. Lipid Res.* 37, 371-391.
- Morsomme, P., Boutry, M.** (2000). The plant plasma membrane H⁺-ATPase: Structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 1-16.
- Moseyko, N. und Feldman, L.J.** (2001). Expression of pH-sensitive green fluorescent protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 24, 557-563.
- Müller, M.L., Jensen, M., Taiz, L.** (1999). The vacuolar H⁺-ATPase of lemon fruits is regulated by variable H⁺/ATP coupling and slip. *J. Biol. Chem.* 274, 10706-10716.
- Munnik, T.** (2001). Phosphatidic acid: An emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.* 6, 227-233.
- Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A.** (1998). Phospholipid signaling in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1389, 222-272.
- Munnik, T., Meijer, H.J.G.** (2001). Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signaling pathways in plants. *FEBS Letters* 198, 172-178.
- Muroi, M., Shiragami, N., Takasuki, A.** (1994). Destruxin B, specific and readily reversible inhibitor of vacuolar- type H⁺-translocating ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1358-1365.
- Narvaez-Vasquez, J., Florin-Christensen, J., Ryan, C.A.** (1999). Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* 11, 2249-226.
- Nass, R., Cunningham, K.W., Rao, R.** (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272, 26145-26152.
- Niemietz, C.M. und Tyerman, S.T.** (1997). Characterization of water channels in wheat root membrane vesicles. *Plant Physiol.* 115, 561-567.
- Nitzsche, A.** (2001). Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung zellulärer Kontrollmechanismen der Phospholipase A₂-Aktivität in *Eschscholzia californica*. *Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie, Universität Halle-Wittenberg.*
- Oja, V., Savchenko, G., Jakob, B., Heber, U.** (1999). pH and buffer capacities of apoplastic and cytoplasmic cell compartments in leaves. *Planta* 209, 239-249.
- Okada, M., Matsumura, M., Ito, Y., Shibuya, N.** (2002). High-affinity binding proteins for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley and carrot cells: Conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor. *Plant Cell Physiol.* 43, 505-512.
- Olsen, K.N, Budde, B.B., Siegumfeld, H., Rechinger, K.B., Jakobsen, M., Ingmer, H.**

- (2002). Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4145-4147.
- Orlowski, J. und Kandasamy, R.A.** (1996). Delineation of transmembrane domains of the Na^+/H^+ exchanger that confer sensitivity to pharmacological antagonists. *J. Biol. Chem.* 271, 19922-19927.
- Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y., Dover, N.** (2001). Na^+/H^+ antiporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 144-157.
- Palmgren, M.G., Sommarin, M., Ulvskov, P., Jorgensen, P.L.** (1988). Modulation of plasma membrane H^+ -ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty acids and phospholipase A_2 . *Physiol. Plant.* 74, 11-19.
- Palmgren, M.G. und Sommarin, M.** (1989). Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma-membrane vesicles. *Plant Physiol.* 90, 1009-1014.
- Parks, G.E., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S.** (2002). Increased vacuolar Na^+/H^+ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *J. Exp. Bot.* 53, 1055-1065.
- Paul, R.U., Holk, A., Scherer, G.F.E.** (1998). Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A_2 activity by auxin in suspension cultured parsley and soybean cells. *Plant J.* 16, 601-611.
- Pedchenko, V.K., Nasirova, G.F., Palladina, T.A.** (1990). Lysophosphatidylcholine specifically stimulates plasmamembrane H^+ ATPase from corn roots. *FEBS Letters* 275, 205-208.
- Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., Shipley, A.M., Rivers, B.A., Cresti, M., Hepler, P.K.** (1994). Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell* 6, 1815-1828.
- Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., van Aken, J., Hackett, G., Hepler, P.K.** (1996). Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev. Biol.* 174, 160-173.
- Pinner, E., Padan, E., Schuldiner, S.** (1992). Cloning, sequencing, and expression of the NhaB gene, encoding a Na^+/H^+ antiporter in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 1064-11068.
- Plaxton, W.C.** (1996). The organisation and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 185-214.

- Quintero, F.J., Blatt, M.R., Pardo, J.M.** (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS Letters* 471, 224-228
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K., Pardo, J.M.** (2002). Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9061-9066.
- Ratajczak, R., Wilkins, T.** (2000). Energizing the tonoplast. *Annu. Plant Rev.* 5, 133-173.
- Reid, R.J., Smith, F.A.** (2002). The cytoplasmic pH stat. In *Handbook of Plant Growth: pH as the Master Variable*, Z. Rengel, ed (New York: Marcel Dekker), pp. 49-71.
- Ritchie, S. und Gilroy, S.** (1998). Abscisic acid signal transduction in barley aleurone is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2697-2702.
- Roncal, T., Ugalde U.O., Irastorza, A.** (1993). Calcium-induced conidiation in *Penicillium cyclopium*: Calcium triggers cytosolic alkalization at the hyphal tip. *J. Bacteriol.* 175, 879-886.
- Roos, W. und Slavik, J.** (1987). Intracellular pH topography of *Penicillium cyclopium* protoplasts. Maintenance of ΔpH by both passive and active mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 899, 67-75.
- Roos, W.** (1992). Confocal pH topography in plant cells - acidic layers in the peripheral cytoplasm and the apoplast. *Bot. Acta* 105, 253-259.
- Roos, W., Schulze, R., Steighardt, J.** (1997). Dynamic compartmentation of vacuolar amino acids in *Penicillium cyclopium*. *J. Biol. Chem.* 272, 15849-15855.
- Roos, W., Evers, S., Hieke, M., Tschöpe, M., Schuhmann, B.** (1998). Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Physiol.* 118, 349-364.
- Roos, W.** (1999). Imaging of pH in plant cells- Methods and concepts in the elucidation of proton signaling. In *Fluorescence microscopy and fluorescent probes*, A. Kotyk, ed (Usti nad Labem: Espero Publishing), pp. 209-221.
- Roos, W.** (2000). Ion mapping in plant cells: Methods and applications in signal transduction research. *Planta* 210, 347-370.
- Roos, W.** (2002). Confocal pH topography in plant cells: Shifts of proton distribution involved in plant signaling. In *Handbook of Plant Growth: pH as the Master Variable*, Z. Rengel ed (New York: Marcel Dekker), pp. 73-106.
- Rudd, J.J. und Franklin-Tong, V.E.** (1999). Calcium signaling in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 214-232.
- Rudd, J.J. und Franklin-Tong, V.E.** (2003). Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *J. Exp. Bot.* 54, 141-148.
- Ryu, S.B., Zheng, I., Wang, X.** (1996). Changes in phospholipase D expression in soybean

- during seed development and germination. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1171-1176.
- Sakano, K.** (1998). Revision of biochemical pH-stat: Involvement of alternative pathway metabolism. *Plant Cell Physiol.* 39, 467-473.
- Sakano, K.** (2001). Metabolic regulation of pH in plant cells: Role of cytoplasmic pH in defence reaction and secondary metabolism. *Int. Rev. Cytol.* 206, 1-44.
- Sanders, D. und Slayman, C.L.** (1982). Control of intracellular pH. Predominant role of oxidative metabolism, not proton transport, in the eukaryotic microorganism *Neurospora*. *J. Gen. Physiol.* 80, 377-402.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F.** (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* 11, 691-706.
- Sanders, D., Pelloux, J. Brownlee, C., Harper, J.F.** (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, S401-S417.
- Scherer, G.F.E., Hecker, D., Muller, J.** (1993). Ca²⁺ ions and lysophospholipids activate phosphorylation of different proteins in plasma membranes and tonoplast. *J. Plant Physiol.* 142, 425-431.
- Scherer, G.F.E., Arnhold, B.** (1997). Inhibitors of animal phospholipase A₂ enzymes are selective inhibitors of auxin-dependent growth. Implications for auxin-induced signal transduction. *Planta* 202, 462-469.
- Schumacher, H.M., Gundlach, H. Fiedler, F., Zenk, M.H.** (1987). Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Rep.* 6, 410-413.
- Schumaker, K. S. und Sze, H.** (1986). Calcium transport into the vacuole of oat roots. *J. Biol. Chem.* 261, 12172-12178.
- Schwartz, W.** (2001). Untersuchungen zur Rolle der Phospholipase A₂ und ihrer Katalyseprodukte im Signaltransfer in Einzelzellen von *Eschscholtzia californica*. *Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie, Universität Halle-Wittenberg.*
- Schweppe, H.** (1969). IV. Basic dyes. In *Thin-layer chromatography*, E. Stahl ed (Berlin: Springer-Verlag), pp. 618-622.
- Scott, A.C. und Allen, N.S.** (1999). Changes in cytosolic pH within *Arabidopsis* root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism. *Plant Physiol.* 121, 1291-1298.
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., Montesinos, C.** (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.* 50, 1023-1036.
- Shabala, S.N. und Newman, I.A.** (1998). Osmotic sensitivity of Ca²⁺ and H⁺ transporters

- in corn roots: Effect on fluxes and their oscillations in the elongation region. *J. Membrane Biol.* 161, 45-54.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J.-K.** (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6896-6901.
- Smirnova, I.N., Kudryavtseva, N.A., Komissarenko, S.J., Tarusova, N.B., Baykov, A.A.** (1988). Diphosphonates are potent inhibitors of mammalian inorganic pyrophosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 280-284.
- Somssich, I. und Hahlbrock, K.** (1998). Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3, 86-90.
- Swanson, S.J., Jones, R.L.** (1996). Gibberelic acid induces vacuolar acidification in barley aleurone. *Plant Cell* 8, 2211-2221.
- Sze, H., Li, X., Palmgreen, M.G.** (1999). Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11, 677-689.
- Sze, H., Schumacher, K., Müller, M.L., Padmanaban, S., Taiz, L.** (2002). A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. *Trends Plant Sci.* 7, 157-161.
- Takasu, A., Nakanishi, Y., Yamauchi, T., Maeshima, M.** (1997). Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H⁺-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies. *J. Biochem.* 122, 883-889.
- Tena, G. und Renaudin, J.-P.** (1998). Cytosolic acidification but not auxin at physiological concentration is an activator of MAP kinases in tobacco cells. *Plant J.* 16, 173-182.
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A.** (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 63-68.
- Trewavas, A.J. und Malho, R.** (1998). Ca²⁺ signaling in plant cells: The big network! *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 428-433.
- Tsien, R.Y.** (1980). Calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19, 2396-2404.
- Tu, S.-I., Brauer, D., Nungesser, E.** (1990). Differential inhibition of tonoplast H⁺-ATPase activities by fluoescamine and its derivatives. *Plant Physiol.* 93, 1102-1109.
- Ueoka-Nakanishi, H., Nakanishi, Y., Maeshima, M.** (1999). Properties and molecular cloning of Ca²⁺/H⁺ antiporter in the vacuolar membrane of mung bean. *Eur. J. Biochem.* 262, 417-425.
- Ueoka-Nakanishi, H., Tsuchiya, T., Sasaki, M., Nakanishi, Y., Cunningham, K.W., Maeshima, M.** (2000). Functional expression of mung bean Ca²⁺/H⁺ antiporter in

- yeast and its intracellular localisation in the hypocotyl and tobacco cells. *Eur. J. Biochem* 267, 3090-3098.
- van der Luit, A.H., Piatti, T., van Doorn, A., Musgrave, A., Felix, G., Boller, T., Munnik, T.** (2000). Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol.* 123, 1507-1515.
- van den Wijngaard, P.W.J., Bunney, T.D., Roobeek, I., Schönknecht, G., de Boer, A.H.** (2001). Slow vacuolar channels from barley mesophyll cells are regulated by 14-3-3 proteins. *FEBS Letters* 488, 100-104.
- van Geest, L.K., Boddeke, F.R., van Dijk, P.W., Kamp, A.F., van der Oord, J.R., Stoop, K.W.J.** (1999). System for fluorescence-lifetime-imaging microscopy. In *Fluorescence microscopy and fluorescent probes*, A. Kotyk, ed (Usti nad Labem: Espero Publishing), pp. 109-125.
- Vanlerberghe, G.C., Day, D.A., Wiskich, J.T., Vanlerberghe, A., McIntosh, L.** (1995). Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria: Dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox-regulation and pyruvate activation. *Plant Physiol.* 109, 353-361.
- Vanlerberghe, G.C. und McIntosh, L.** (1997). Alternative oxidase: From gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 185-214.
- Venema, K., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Donaire, J.P.** (2002). The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.* 277, 2413-2418.
- Viehweger, K.** (1998). Präparation von in-situ-Vakuolen und Charakterisierung ihrer Rolle bei der pH-Regulation in *Eschscholtzia californica*. *Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie*, Universität Halle-Wittenberg.
- Viehweger, K., Dordschbal, B., Roos, W.** (2002). Elicitor-activated phospholipase A₂ generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H⁺ pool for pH signaling via the activation of Na⁺- dependent proton fluxes. *Plant Cell* 14, 1509-1525.
- Wakabayashi, S., Fafournoux, P., Sardet, C., Pouyssegur, J.** (1992). The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H⁺-sensing". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2424-2428.
- Wakelam, M.J.O.** (1998). Diacylglycerol-when is it an intracellular messenger? *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 117-126.
- Walker, D.J., Leigh, R.A., Miller, A.J.** (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10510-10514.

- Wang, X.** (2001). Plant phospholipases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 211-231.
- Ward, J.M., Reinders, A. Hsu, H-T., Sze, H.** (1992). Dissociation and reassembly of the vacuolar H⁺-ATPase complex from oat roots. *Plant Physiol.* 99, 161-169.
- White, P.J, Marshall, J., Smith, J.A.C.** (1990). Substrate kinetics of the tonoplast H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase and its activation by free Mg²⁺. *Plant Physiol.* 93, 1063-1070.
- Wyn Jones, R.G., Pollard, A.** (1983). Proteins, enzymes and inorganic ions. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, A. Lauchli, A. Person ed (New York: Springer-Verlag), pp. 528-562.
- Yin, Z., Neimanis, S., Wagner, U., Heber, U.** (1990). Light-dependent pH changes in leaves of C₃ plants. *Planta* 182, 244-252.
- Yoshida, S. und Uemura, M.** (1986). Lipid composition of plasmamembranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of *Mung bean*. *Plant Physiol.* 82, 807-812.
- Yoshida, S.** (1991). Chilling-induced inactivation and its recovery of tonoplast H⁺-ATPase in mung bean cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 95, 455-460.
- Zhang, G.H. und Melvin, J.E.** (1996). Na⁺-dependent release of Mg²⁺ from an intracellular pool in rat sublingual mucous acini. *J. Biol. Chem.* 271, 29067-29072.
- Zhen, R.-G., Baykov, A.A., Bakuleva, N.P., Rea, P.A.** (1994). Aminomethylenediphosphonate: A potent type-specific inhibitor of both plant and phototrophic bacterial H⁺- pyrophosphatases. *Plant Physiol.* 104, 153-159.
- Zhu, J.-K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247-273.

9 Abkürzungsverzeichnis

AMP-PNP	Adenosin-5'-(β , γ -imido)triphosphat
AtNHX	Na ⁺ /H ⁺ Austauscher in <i>Arabidopsis thaliana</i>
BAPTA	Glycin-N,N'-(1,2-ethandiylbis(oxy-2,1-phenylen))bis(N-(carboxymethyl))-, tetrakaliumsalz
BAPTA-AM	Glycin- N,N'-[1,2-ethandiylbis(oxy-2,1- phenylen)]bis[N- [2-[(acetyloxy) methoxy]-2-oxoethyl]]-, bis[(acetyloxy)methyl] ester
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)5(und-6-)-carboxyfluorescein
bis-BODIPY®- FL C ₁₁ - PC	1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4- bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3- undecanoyl)- <i>sn</i> -glycero-3- phosphocholin
BTP	1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propan
CAM	Crassulacaen acid metabolism
CCD	charged coupled device
ch	Channel (Kanal)
CFDA-AM	5-carboxyfluorescein diacetat, acetoxymethyl ester
CF	5-(und-6)-carboxyfluorescein
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein diacetat
cSNARF-1	Carboxy-seminaphtorhodafluor; Spiro[7H-benzo[c]xanthen-7,1'(3H) isobenzofuran]-ar'-carboxyl säure, 3-(acetyloxy)-10-(dimethylamino)-3'-oxo- , (acetyloxy)methyl ester
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DAG	Diacylglycerol
DCCF	5-(und 6-)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein
DCMF	5-(und 6-)-Carboxy-4',5'-dimethylfluorescein
DMA	N,N- Dimethylamilorid

DM-BAPTA-AM	Glycin-N,N'-[1,2-ethandiylbis[oxy(4-methyl-2,1-phenylen)]]bis[N-(carboxymethyl)-bis[(acetyloxy)methyl]ester
DM-NERF	5-(und-6)carboxy-2',7'-dimethyl-3'hydroxy-6'-N-ethylaminospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
EL1, EL2	Elicitor-responsive genes
ETYA	5,8,11,14-Eicosatetrainsäure
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid
FLIM	Fluorescence-Lifetime-Imaging-Microscopy
FRAP	Fluorescence- Recovery-After-Photobleaching
(GlcNAc) ₇ ; (GlcNAc) ₈	N-Acetylchitooligosaccharide
GSH	reduziertes Glutathion
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethanesulfonsäure]
HPTLC	High performance thin layer chromatography
HMGR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym-A-reductase
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
LPI	Lysophosphatidylinositol
LPS	Lysophosphatidylserin
LS-P	Nährmedium nach Linsmaier und Skoog ohne PO ₄ ³⁻
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption and ionizationtime-of-flight mass spectrometry
MAP-Kinase	Mitogen-activated-protein kinase
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MIA	5-N-Methyl-N-Isobutylamilorid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure

NHE	Na ⁺ /H ⁺ Austauscher in Säugetierzellen
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
Nod-Faktoren	Nodulations-Faktoren (Lipo-chitooligosaccharide)
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PC	Phosphatidylcholin
PEP	Phosphoenolpyruvat
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMT	Photomultiplier
RSA	Rinder-Serum-Albumin
SBFI	Sodium-binding benzofuran isophthalate; [1,3-Benzendicarboxylsäure, 4,4'-[1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diylbis(5-methoxy-6,2-benzofurandiyl)]bis-, tetraammonium salz]
TG11	transgene Zelllinie (antisense-G _α -Mutante von <i>Eschscholzia californica</i>)
$\Delta\text{pH}_s/\Delta\text{pH}_v$	pH-shift/pH-Gradient zwischen Vakuole und Perfusionsmedium zum Zeitpunkt des Effektor-Zusatzes

10 Abbildungsverzeichnis und Tabellen

- Abbildung 1-1 Regulation des cytoplasmatischen pH durch metabolische Vorgänge (modifiziert nach [Sakano 2001]).
- Abbildung 2-1 Visualisierung des Permeabilisierungsverfahrens zur Herstellung von in-situ-Vakuolen.
- Abbildung 2-2 Charakterisierung des Permeabilisierungsgrades der Plasmamembran durch Fluoreszenz-markierte Dextrane.
- Abbildung 2-3 Kalibrierung der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzquotienten von Carboxyfluorescein (A) und DM-NERF (B).
- Abbildung 2-4 Kalibrierung der Na⁺-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Sodium Green™.
- Abbildung 2-5 Veränderung des Na⁺-Gehaltes von in-situ-Vakuolen durch Gramacidin D oder Nigericin.
- Abbildung 2-6 Zelluläre Verteilung des BODIPY®-markierten Ether-Lysophospholipides BELPC.
- Abbildung 2-7 Mikroskopische Lokalisation der Benzophenanthridin-Alkaloide in der Zellwand-Region.
- Abbildung 3-1 Skizze der Zellpräparation für die konfokale Laser-Mikroskopie.
- Abbildung 4-1 Erhöhung der Protonenkonzentration von in-situ-Vakuolen während der Perfusion mit 1 mM MgATP.
- Abbildung 4-2 ATP-abhängige Azidifizierung von in-situ-Vakuolen.
- Abbildung 4-3 Abhängigkeit der initialen Azidifizierungsrate von in-situ-Vakuolen von der MgATP oder MgPP_i-Konzentration.
- Abbildung 4-4 Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss von Inhibitoren der V-ATPase.
- Abbildung 4-5 Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss von Inhibitoren der V-PPase.
- Abbildung 4-6 Azidifizierungsrate von in-situ-Vakuolen bei Variation der Energiequellen.

- Abbildung 4-7 Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss von Ca^{2+} -Ionen.
- Abbildung 4-8 Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss von Na^{+} -Ionen.
- Abbildung 4-9 Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss von Adenylaten.
- Abbildung 4-10 Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss von LPC.
- Abbildung 4-11 ATP-abhängige Azidifizierung von in-situ-Vakuolen und nachfolgender Efflux von Protonen, Einfluss von LPC.
- Abbildung 4-12 Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss verschiedener Lysophospholipide.
- Abbildung 4-13 LPC-ausgelöster Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Abhängigkeit von der LPC-Konzentration.
- Abbildung 4-14 LPC-ausgelöster Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen in Gegenwart des Ca^{2+} -Chelators DM-BAPTA.
- Abbildung 4-15 Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, ausgelöst durch sukzessiven Zusatz von LPC und NaCl.
- Abbildung 4-16 Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Einfluss von Na^{+} -Ionen und LPC.
- Abbildung 4-17 Inhibition des durch LPC + Na^{+} ausgelösten Efflux vakuolärer Protonen durch EIPA.
- Abbildung 4-18 Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, ausgelöst durch DAG.
- Abbildung 4-19 DAG-ausgelöster Efflux von Protonen aus in-situ-Vakuolen, Abhängigkeit von der DAG-Konzentration.
- Abbildung 5-1 PLA_2 -Aktivität in Einzelzellen nach Elicitorkontakt.
- Abbildung 5-2 Vakuolärer pH-shift in Einzelzellen nach Elicitorkontakt.
- Abbildung 5-3 Akkumulation von Alkaloiden im Zellwandbereich nach Elicitorkontakt.
- Abbildung 5-4 Sequenz Elicitor-ausgelöster Ereignisse in derselben Ganzzelle.

- Abbildung 5-5 Häufigkeitsverteilungen von PLA₂-Aktivität (A), vakuolärem pH-shift (B) und Alkaloidproduktion (C) in verschiedenen Zellpopulationen.
- Abbildung 5-6 PLA₂-Aktivität, vakuolärer pH-shift und Alkaloidproduktion verschiedener Zellpopulationen.
- Abbildung 5-7 Alkaloidproduktion der transgenen Linie TG11 nach Elicitorkontakt.
- Abbildung 5-8 PLA₂-Aktivitäten von Zellen verschiedener Populationen nach Elicitorkontakt.
- Abbildung 5-9 Häufigkeitsverteilungen von PLA₂-Aktivität (A), vakuolärem pH-shift (B) und Alkaloidproduktion (C) in verschiedenen Zellpopulationen antisense-G_α-transformierter Zellen.
- Tabelle 4-1 Effekt von Phospholipiden, Lysolipiden und ähnlichen Verbindungen auf den vakuolären pH-Wert in-situ.
- Tabelle 5-1 Modifizierte Kontingenztafeln für das Auftreten von Signalereignissen in Einzelzellen.
- Tabelle 5-2 Modifizierte Kontingenztafeln für das Auftreten von Signalereignissen in antisense-G_α-transformierten Zellen.

Dank an die Welt

Durch die Hilfe einiger Menschen konnte ich in die faszinierende Welt der *Eschscholzia californica* eintauchen und einige Geheimnisse den “kleinen Freunden” entlocken.

Mein Betreuer Herr Professor Dr. Werner Roos weckte in mir Begeisterung, Freude und auch Geduld, geistig und experimentell einen kleinen Teil des Lebens zu entdecken. Unsere freundschaftliche Zusammenarbeit und seine Aufgeschlossenheit gegenüber allem ließ mich einen “Blick hinter die Kulissen” des menschlichen Daseins und der Wissenschaft werfen. Beeindruckend war sein nie enden zu wollender Optimismus und sein Vertrauen in mich - auch im Chaos und bis zum Schluss - “...in jedem ... sind die Möglichkeiten zum Menschen da, aber erst, indem er sie ahnt, indem er sie teilweise sogar bewusst machen lernt, gehören diese Möglichkeiten ihm.” (H. Hesse).

Meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Bruder Kay, danke ich für die liebevolle, vielfältige Unterstützung. So konnte Euer “Forscher” wenigstens mit einem Bein auf der Erde stehen. Danke, ohne Euch wäre ich nicht das, was ich heute bin.

Sven Evers half mir bei der Bestimmung des Proteinverlustes der permeabilisierten Zellen sowie mit konstruktiven, ernsthaften wie auch humorvollen Diskussionen über “Gott und die Welt”.

Ohne Margit Hiekes Betreuung der *Eschscholzia*-Zellsuspensionskulturen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mit Margits fürsorglicher Hilfe konnten sich die “Eschscho-Kiddies” optimal für meine “stressigen” Experimente vorbereiten.

Bei Dr. Brigitte Schumann bedanke ich mich für die Bereitstellung und Tipps zur transgenen Zelllinie “TG11”.

Allen Mitarbeitern unserer Abteilung (Institut für Pharmazeutische Biologie, Abteilung Molekulare Zellbiologie), ehemaligen wie auch jetzigen, danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung, beispielsweise für die Bereitstellung von Lösungen oder für die Erledigung unliebsamer Büroarbeiten.

Herr Zschörner vom Universitätsrechenzentrum bewahrte meine Computer durch seine schnelle, kompetente Hilfe vor dem "Super-GAU" - rettete so meine Daten vor dem Verschwinden und ermöglichte eine weitere Arbeit mit den widerspenstigen "Rechenknechten".

Herr Reese von den Universitätswerkstätten schaffte es, meine zumeist idealistischen Ideen in praktisch nutzbare Vorrichtungen zum Mikroskopieren umzusetzen- vielen Dank dafür.

Und natürlich allen Freunden für die vielfältige Unterstützung ...

*And in the end
the love you take
is equal
to the love you make.*

The Beatles

Beruflicher Werdegang

Name:	Katrin Viehweger	
Wohnorte:	An der Brautgasse 6	Harz 18
	01990 Ortrand	06108 Halle/Saale
Geburtstag und Geburtsort:	13.03.1975 in Lauchhammer	
Familienstand:	ledig	
Schulbildung:		
1981-1991	Polytechnische Oberschule "Witja Korobkow" Ortrand	
1991-1993	Gymnasium Großenhain; Abschluss Abitur	
Berufsausbildung:		
1993- 1998	Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg	
- 1995	Erstes Staatsexamen	
- 1997	Zweites Staatsexamen	
- 1997- 1998	Anfertigung einer Diplomarbeit im Institut für Pharmazeutische Biologie; Abteilung Zellphysiologie/Biotechnologie; Titel der Arbeit: "Präparation von in-situ-Vakuolen und Charakterisierung ihrer Rolle bei der pH-Regulation in <i>Eschscholtzia californica</i> "	
- 1998	Pharmazie-Praktikantin in der Apotheke Silberhöhe Halle/Saale	
- 1998	Drittes Staatsexamen	
1998	Erteilung der Approbation als Apothekerin	
seit 1998	Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Institutes für Pharmazeutische Biologie; Abteilung Molekulare Zellbiologie mit dem Ziel der Promotion	

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel und keine nichtgenannte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt. Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Katrin Viehweger