



**Untersuchung der oxidativen und pH-abhängigen Regulation  
der vakuolären Protonen-ATPase und calciumabhängigen  
vakuolären Membranleitfähigkeiten von *Arabidopsis thaliana***

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Florian Christian Rienmüller**

Geboren in Stuttgart

Würzburg 2014

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die pflanzliche Vakuole und ihre Funktionen im Überblick .....	1
1.2 Aktiver und passiver Transport an der Vakuolenmembran .....	2
1.2.1 Anionentransport am Tonoplasten .....	5
1.2.2 Kationentransport am Tonoplasten .....	6
1.3 Calciumsignale im pflanzlichen Organismus .....	9
1.3.1 Intrazelluläre Calciumfreisetzung.....	12
1.4 Aktiver Protonentransport am Tonoplasten .....	12
1.4.1 Molekulare Struktur und Funktionsweise der vakuolären Protonen-ATPase .....	13
1.4.2 Physiologische Bedeutung und Regulation der V-ATPase .....	18
1.4.3 Die intrazelluläre pH-Homöostase.....	22
1.5 Zielsetzung.....	24
<b>2.0 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1 Pflanzenanzucht und Präparation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
2.1.1 Anzuchtbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i> für Patch-Clamp-Experimente ...	25
2.1.2 Präparation der <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllprotoplasten .....	26
2.1.3 Vakuolenisolation aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllprotoplasten für Patch-Clamp-Experimente .....	26
2.1.4 Sterilisation und Aussaat von <i>Arabidopsis thaliana</i> für Experimente mit intrazellulären Mikroelektroden.....	27
2.1.5 Anzuchtbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i> Keimlingen für Experimente mit intrazellulären Mikroelektroden .....	28
2.2 Herstellung der verwendeten Lösungen.....	28
2.2.1 Lösungen für Patch-Clamp-Experimente .....	29
2.2.2 Lösungen für Experimente mit intrazellulären Mikroelektroden und der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.....	33
2.3 Die Einstich-Technik von intrazellulären Mikroelektroden .....	34
2.3.1 Anwendung der Einstich-Technik von intrazellulären Mikroelektroden bei intakten <i>Arabidopsis thaliana</i> Wurzeln .....	35
2.3.2 Messprinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik .....	35
2.3.3 Aufbau des Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Messplatzes.....	36
2.3.4 Herstellung von Einstich- und Referenzelektroden .....	38

2.3.5 Calcium-Bildgebungsverfahren unter Verwendung des calciumsensitiven Farbstoffs FURA-2 .....	39
2.3.6 Spannungsprotokolle und Datenanalyse der Einstich-Experimente .....	40
2.4 Die Patch-Clamp-Technik .....	41
2.4.1 Anwendung der Patch-Clamp-Technik.....	42
2.4.2 Funktionsweise des Patch-Clamp-Verstärkers.....	45
2.4.3 Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes.....	46
2.4.4 Funktion der Applikationspipette .....	48
2.4.5 Herstellung von Mess- und Referenzelektrode .....	48
2.4.6 Herstellung von Mess- und Applikationspipette.....	49
2.4.7 Spannungsprotokolle und Datenanalyse der Patch-Clamp-Messungen .....	50
2.5 Die Vorzeichenkonvention.....	52
2.5.1 Nernstgleichung und Umkehrpotential .....	52
2.6 Theoretische Grundlagen zur Berechnung der V-ATPase-Protonenkopplungsrate ..	53
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der V-ATPase .....	58
3.1.1 Methodik der elektrophysiologischen Untersuchung von V-ATPase- .....	58
Strömen in <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllvakuolen.....	58
3.1.2 Effekt des vakuolären pH-Werts auf die Spannungsabhängigkeit der V-ATPase ..	60
3.1.3 pH-Abhängigkeit von ATP-induzierten Protonenauswärtsströmen in Wildtyp- Mesophyllvakuolen.....	63
3.1.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Protonentransportkapazität und ATP-Affinität der V-ATPase in Mesophyllvakuolen .....	66
3.1.5 Regulation der V-ATPase-Pumpaktivität durch Oxidationsmittel in Mesophyllvakuolen.....	70
3.2 Elektrophysiologische <i>in vivo</i> Untersuchungen von vakuolären Membranleitfähigkeiten in <i>Arabidopsis thaliana</i> Wurzeln mit Hilfe der Zwei- Elektroden-Spannungsklemme .....	74
3.2.1 Lokalisation der Mikroelektroden in Wildtyp-Wurzelrhizodermiszellen.....	75
3.2.2 Änderungen der Membranleitfähigkeiten nach dem Einstich von <i>double-     barreled</i> Elektroden in Wurzelrhizodermisvakuolen.....	76
3.2.3 Untersuchung der calciumabhängigen Regulation vakuolärer Membranleitfähigkeiten mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 in Trichoblasten .....	79

<b>4. Diskussion</b> .....	<b>84</b>
4.1. Die Protonenkopplungsrate der V-ATPase in Abhängigkeit von luminalen pH- Werten.....	84
4.2 pH-abhängige Parameter der V-ATPase-Aktivität .....	87
4.2.1 Entwicklung eines qualitativen Modells der V-ATPase Pumpaktivität unter Berücksichtigung der ermittelten $K_m$ - und $v_{max}$ - Werte.....	91
4.3 Redox-Regulation der V-ATPase-Pumpaktivität .....	95
4.4 Calciuminduzierte Veränderungen in der Leitfähigkeit der Vakuolenmembran in intakten Trichoblasten <i>in vivo</i> .....	97
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>102</b>
<b>6. Summary</b> .....	<b>104</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>106</b>
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	106
7.2 Tabellenverzeichnis.....	107
7.3 Literaturverzeichnis .....	108
7.4 Abkürzungsverzeichnis .....	122
7.5 Publikationen .....	127
7.6 Lebenslauf .....	128
7.7 Danksagung.....	130
7.8 Eidesstattliche Erklärung.....	131

# 1. Einleitung

## 1.1 Die pflanzliche Vakuole und ihre Funktionen im Überblick

Pflanzliche Vakuolen sind multifunktionelle Organellen, die wichtige Aufgaben in allen pflanzlichen Entwicklungsstadien übernehmen. Sie haben einige grundlegende Eigenschaften mit den Vakuolen von Algen, Hefen und den Lysosomen tierischer Zellen gemeinsam und entstehen als Endprodukt des sekretorischen Weges in Pflanzenzellen (Marty, 1999). In ausdifferenzierten Zellen des vegetativen Gewebes kann die Vakuole dabei zwischen 80% und 90% des Zellvolumens einnehmen und ist dadurch ein wichtiger Faktor für Turgorregulation, Zellexpansion und das Pflanzenwachstum (Sze et al., 1992; Wink, 1993; Marty, 1999; Martinoia et al., 2012; Faraco et al., 2014). Zum Beispiel trägt die Vakuole schon allein durch ihre Größe und der daraus resultierenden Expansion der Zelloberfläche zur Optimierung der Lichtabsorption für die Photosynthese bei (Martinoia et al., 2012).

In Pflanzen kann man grundsätzlich zwei verschiedene Vakuolentypen unterscheiden: lytische und proteinspeichernde Vakuolen (Paris et al., 1996; Marty, 1999; Carter et al., 2004; Martinoia et al., 2007, 2012). Die Klassifizierung erfolgt zum Einen anhand der enthaltenen gelösten Proteine (Paris et al., 1996; Martinoia et al., 2007, 2012). Lytische Vakuolen enthalten eine große Anzahl an hydrolytischen und oxidierenden Enzymen, wie zum Beispiel Hydrolasen, Lipasen, Esterasen, Nukleasen und Peroxidasen. Die Enzymzusammensetzung ist dadurch fast identisch mit den Lysosomen in tierischen Zellen (Wink, 1993). Proteinspeichervakuolen beinhalten hingegen Kohlenhydrate und Reserveproteine und schützen ihren Inhalt vor dem vorzeitigen Abbau (Marty, 1999). Dieser Vakuolentyp kommt vor allem in Samen und spezialisierten Speichergeweben vor (Paris et al., 1996; Marty, 1999). Dieser Vakuolentyp ist zwar kleiner, kann dafür aber in einer Zelle in großer Zahl auftreten (Trentmann and Haferkamp, 2013). Die zweite Möglichkeit zur Differenzierung beider Vakuolentypen erfolgt anhand von verschiedenen Aquaporinklassen am Tonoplasten, die als Wasser-permeable Kanäle fungieren. Lytische Vakuolen enthalten  $\gamma$ -TIPs (tonoplast intrinsic proteins), während in der Membran von proteinspeichernden Vakuolen  $\alpha$ - und  $\delta$ -TIPs zu finden sind (Paris et al., 1996; Jauh et al., 1999; Marty, 1999; Martinoia et al., 2007, 2012). Beide Vakuolentypen können auch gleichzeitig in einer Zelle vorkommen, wobei es in

ausdifferenzierten Geweben dann häufig zu einer Fusion der lytischen und proteinspeichernden Vakuolen kommt. Die daraus entstehende große Zentralvakuole übernimmt dann die funktionellen Aufgaben der ursprünglichen Kompartimente (Marty, 1999; Carter et al., 2004; Martinoia et al., 2012).

Neben ihrer Funktion als enzym- oder proteinspeicherndes Kompartiment und ihrer wichtigen Rolle beim Pflanzenwachstum erfüllen Vakuolen darüber hinaus auch noch andere wichtige Aufgaben. Sie fungieren in Abhängigkeit vom Gewebetyp als Speicher für Metabolite und Pigmente, für Komponenten von intrazellulären Signalwegen, für Zucker- und Aminosäuren, organische Säuren und Ionen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermeidung von intrazellulärem Salzstress, der Zellentgiftung, der Feindabwehr, der Zellhomöostase und der Regulation des cytoplasmatischen pH-Wertes (Barkla and Pantoja, 1996; Marty, 1999; Martinoia et al. 2007; Etxeberria et al., 2012; Martinoia et al., 2012). Vakuolen sind dadurch intrazelluläre Organellen, die hochspezialisierte Funktionen in Abhängigkeit von Zell- und Gewebetyp und deren Entwicklungsstadiums übernehmen (Martinoia et al., 2007).

## 1.2 Aktiver und passiver Transport an der Vakuolenmembran

Damit die Vakuolen ihre multifunktionale Rolle erfüllen können, sind in der Vakuolenmembran eine Vielzahl unterschiedlicher Transportproteine eingelagert. Diese Proteine ermöglichen die Akkumulation und Freisetzung von Ionen sowie von geladenen und ungeladenen Molekülen, wobei in Abhängigkeit vom zugrundeliegenden Transportmechanismus der Transport gegebenenfalls auch gegen einen (elektro)chemischen Gradienten verlaufen kann. Beim Transport unterscheidet man deshalb zwischen dem passiven und aktiven Membrantransport (Hedrich and Schroeder, 1989; Schroeder and Hedrich, 1989; Barkla and Pantoja, 1996; Lodish et al., 2000; Martinoia et al., 2007; Alberts et al., 2008; Martinoia et al., 2012).

Der passive Transport wird dabei von Membran-durchquerenden Kanalproteinen vermittelt und ermöglicht die Diffusion von Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten mit einer Transportrate von  $10^7$ - $10^8$  Ionen oder Molekülen pro Sekunde (Lodish et al., 2000; Alberts et al., 2008). Prominente Vertreter in der pflanzlichen Vakuole sind: (i) Der für mono-

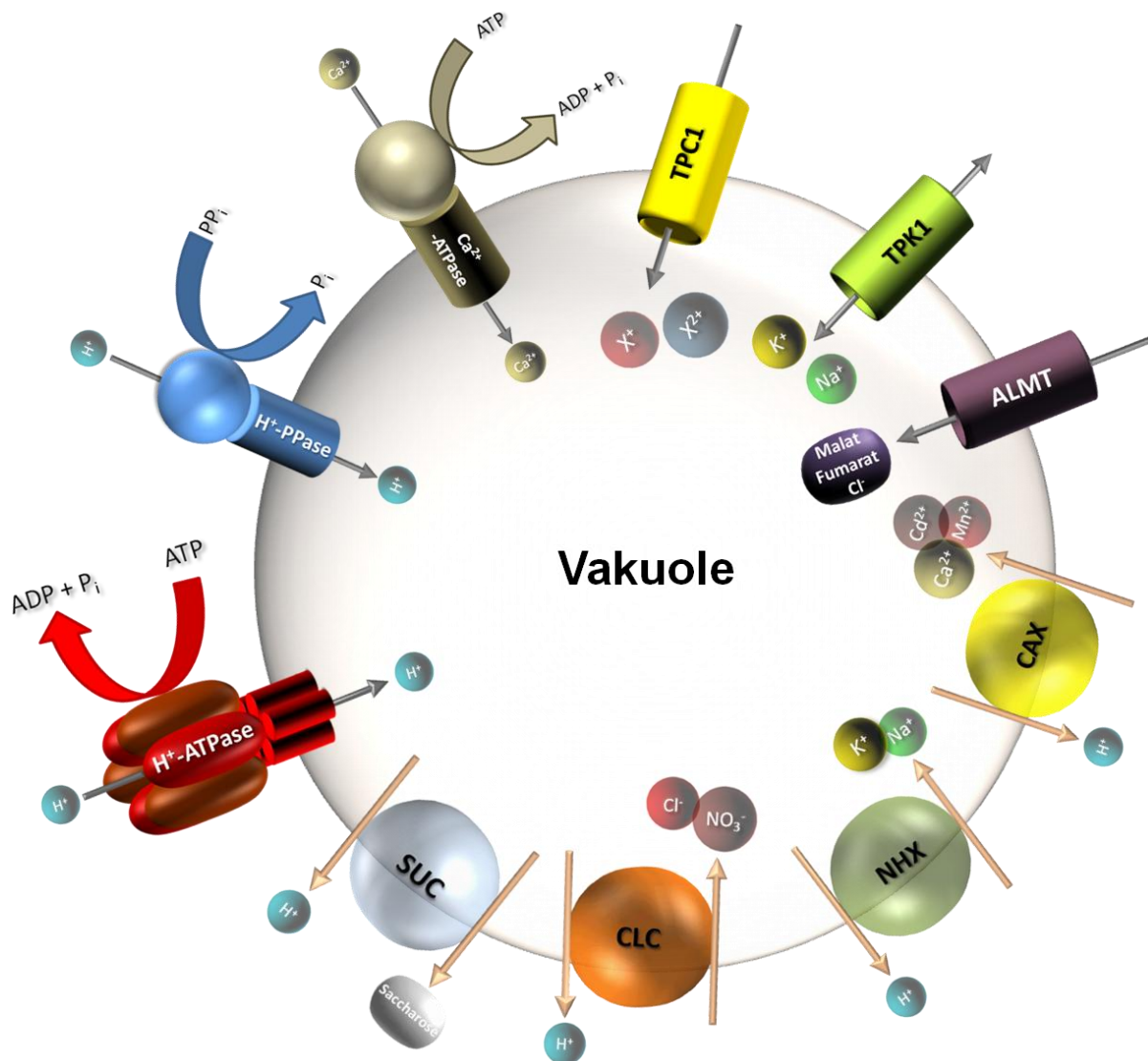
und divalente Kationen selektive TPC1- Kanal (*two-pore channel*; Abb. 1.1), der auch als SV-Kanal (*slow vacuolar*) bezeichnet wird (Hedrich and Neher, 1987; Hedrich and Kurkdjian, 1988; Beyhl et al., 2009; Rienmüller et al., 2010; Dadacz-Narloch et al., 2011; Hedrich and Marten, 2011). (ii) Der Kalium- und Natrium-permeable TPK1-Kanal (= *two-pore K<sup>+</sup>*, Abb. 1.1; Bihler et al., 2005; Dreyer and Uozumi, 2011; Hedrich, 2012) oder (iii) der für Chlorid und Malat durchlässige ALMT9-Kanal (= *aluminium-activated malate transporter*, Abb. 1.1; Kovermann et al., 2007; De Angeli et al., 2013).

Beim aktiven Transport wird zwischen primär- und sekundär-aktiv unterschieden. Bei den sekundär-aktiven Transportern oder „Carrier“-Proteinen wird in Pflanzen die Energie eines bestehenden elektrochemischen Protonengradienten ausgenutzt, um dadurch ein oder mehrere Substrate durch Konformationsänderungen über die Membran zu transportieren (Schroeder and Hedrich, 1989; Sze et al., 1992; Lodish et al., 2000; Alberts et al., 2008). Aufgrund dieser engen energetischen Kopplung ist es deshalb möglich, Substrate auch gegen ihren Konzentrationsgradienten zu transportieren und dadurch zu akkumulieren (Lodish et al., 2000). Je nach Art der Kopplung unterscheidet man zwischen Symporter und Antiporter. Beim Symport läuft der Transport von Ionen/Moleküle gegen ihren Konzentrationsgradienten entlang des Protonengradienten in die gleiche Richtung ab (Lodish et al., 2000). Beim Antiport werden die Ionen/Moleküle entgegengesetzt zur Protonenflussrichtung transportiert (Lodish et al., 2000). Durch diesen aufwendigeren sekundär-aktiven Transportmechanismus ist die Translokationsrate bei diesen Proteinen mit  $10^2$ - $10^4$  Substrate pro Sekunde deshalb deutlich geringer als bei den Ionenkanälen (Lodish et al., 2000). Beispiele für Protonen-gekoppelte Transporter sind (i) der  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter CAX1 (= *calcium exchangers*, Abb.1.1), der Calcium in der Vakuole akkumuliert (Hirschi et al., 1996; Mei et al., 2007) oder (ii) SUC4 (Abb. 1.1), der als  $\text{H}^+$ /Saccharose-Symporter Zucker aus der Vakuole exportiert (Schulz et al., 2011). Eine Sonderform der Carrier stellen die Uniporter dar, bei denen Ionen/Moleküle entlang ihres Konzentrationsgradienten transportiert werden und dabei eine höhere Transportrate im Vergleich zur einfachen passiven Diffusion aufweisen. Deshalb wird in diesem Fall auch von einer erleichterten Diffusion gesprochen (Lodish et al., 2000).

Beim primär-aktiven Transport hingegen liegt eine „direkte Energetisierung“ des Transportproteins vor. Dabei findet die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) bzw. Guanosintriphosphat, (GTP) oder Pyrophosphat ( $\text{PP}_i$ ) direkt durch das Transportprotein statt.



Die Hydrolyseenergie wird anschließend verwendet, um das jeweilige Substrat auch gegen einen Gradienten über die Membran zu transportieren (Hedrich et al., 1988; Nelson, 1988; Lodish et al., 2000; Martinoia et al., 2002; Wink, 1993). Aufgrund dieser aktiven Energetisierung ist es für die primär-aktiven Transportproteine auch möglich, sehr große elektrochemische Gradienten zu überwinden.



**Abbildung 1.1. Übersicht aktiver und passiver Transportsysteme in der Vakuole.** Illustration ausgewählter Transportproteine in der Vakuolenmembran mit ihren jeweiligen Leitfähigkeiten. Passiv: TPC1-Kanal (X<sup>+</sup>, X<sup>2+</sup>), TPK1-Kanal (K<sup>+</sup>; Na<sup>+</sup>), ALMT-Kanal (Malat, Fumarat, Cl<sup>-</sup>). Sekundär-aktiv: CAX-Antiporter (Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>), NHX-Antiporter (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>), CLC-Antiporter (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>), SUC-Symporter (Saccharose/H<sup>+</sup>), Primär-aktiv: H<sup>+</sup>-ATPase, H<sup>+</sup>-PPase und P-Typ-Ca<sup>2+</sup>-ATPase (In Anlehnung an Martinoia et al., 2012).

Ein Beispiel für ein primär-aktives Transportprotein ist die P-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Abb. 1.1), die Calcium mit Hilfe der ATP-Hydrolyseenergie in die Vakuole pumpt und bei der Calciumhomöostase eine wichtige Rolle spielt (Lee et al., 2007; Martinoia et al., 2012). Die prominentesten primär-aktiven Transportproteine sind allerdings die vakuolären Protonenpumpen ATPase und PPase. Im Vergleich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase liegt der Fokus bei diesen Proteinen allerdings weniger auf einem direkten Metabolittransport, sondern vielmehr im Aufbau einer protonenmotorischen Kraft (*proton-motive force*, PMF, Kap. 1.4.1), die dann sekundär-aktiven Transportern als indirekter Energielieferant zur Verfügung steht (Nelson, 1988; Hedrich et al., 1989; Schroeder and Hedrich, 1989; Barkla and Pantoja, 1996; Martinoia et al., 2007; Etxeberria et al., 2012). Mit  $10\text{-}10^3$  Ionen pro Sekunde besitzen diese Pumpproteine die niedrigste Transportrate (Lodish et al., 2000). Einen weiteren Vertreter des primär-aktiven Transportes stellen die ABC-Transporter dar. Sie können sowohl als Exporter oder auch als Importer wirken und transportieren im Unterschied zu den Calcium- und Protonenpumpen ganze Moleküle über die Membran (Martinoia et al., 2002; Kang et al., 2011). Die Translokation erfolgt dabei ebenfalls unter Verwendung der Hydrolyseenergie von ATP oder GTP (Martinoia et al., 2002; Kang et al., 2011). Dadurch können im Vergleich zum sekundär-aktiven Transport höhere Molekülkonzentrationen akkumuliert werden (Martinoia et al., 2002).

### 1.2.1 Anionentransport am Tonoplasten

In Pflanzen spielen Anionen unter anderem eine wichtige Rolle als Osmotika und helfen das Ladungsgleichgewicht in der Pflanzenzelle im Gleichgewicht zu halten. Anorganische Anionen, wie Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) oder Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) sind dabei auch noch essentielle Baustoffe für Wachstum und Entwicklung des pflanzlichen Organismus. Organische Anionen, wie Malat und Fumarat sind Zwischenstufen in verschiedenen Stoffwechselwegen und an der pH-Homöostase beteiligt (Meyer et al., 2010; Hedrich, 2012; Martinoia et al., 2012).

Für den Transport von Nitrat und Chlorid über den Tonoplasten wurden in den letzten Jahren in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) sieben Mitglieder der CLC-Transporterfamilie identifiziert (Marmagne et al., 2007; De Angeli et al., 2009), von denen mindestens drei im Tonoplasten lokalisiert sind: (i) AtCLCa, der als nitratspezifischer Protonen-Anionen-

Antiporter agiert (Abb. 1.1) und zwei Nitratmoleküle im Austausch gegen ein Proton in die Vakuole transportiert, aber auch eine geringe Chlorid-Selektivität besitzt (De Angeli et al., 2006, 2009; Martinoia et al., 2012). (ii) AtCLCb, der ebenfalls als  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ -Antiporter der Nitratakkumulation in der Vakuole dient (Martinoia et al., 2012; von der Fecht-Bartenbach et al., 2010) und (iii) AtCLCc (Abb. 1.1), der vor allem in der Vakuolenmembran von Schließzellen und Pollen zu finden ist und wahrscheinlich chloridspezifisch ist (Jossier et al., 2010; Martinoia et al., 2012).

Neben der AtCLC-Familie gibt es aber auch noch mit AtNRT2.7 einen weiteren Transporter, der in Samenvakuolen an der Nitratakkumulation beteiligt ist und hier die Aufgabe des Nitrattransportes übernimmt (Chopin et al., 2007; Martinoia et al., 2012).

Der Transport von Malat und Fumarat in Arabidopsis wird von der AtALMT-Familie vermittelt, zu der bisher 15 Mitglieder gezählt werden (Kovermann et al., 2007). Ein Mitglied davon ist AtALMT9 (Abb. 1.1), der überwiegend in Mesophyllzellvakuolen vorkommt, nach neuesten Erkenntnissen aber hauptsächlich als Chloridkanal fungiert und von cytosolischem Malat aktiviert wird (Meyer et al., 2010; De Angeli et al., 2013). Der Kanal leitet allerdings auch Malat und Fumarat und wird nicht durch cytosolisches Calcium reguliert (Kovermann et al., 2007; Martinoia et al., 2012; De Angeli et al., 2013). Ein zweites Mitglied, AtALMT6 (Abb. 1.1) ist nahezu exklusiv in der Schließzellvakuolenmembran lokalisiert. Der Kanal wird durch mikromolare cytosolische Calciumkonzentrationen und Hyperpolarisation aktiviert und vermittelt ebenfalls Malat- bzw. Fumaratströme (Meyer et al., 2011; Martinoia et al., 2012). Mit ALMT4 und -5 sind kürzlich noch zwei weitere Mitglieder im Tonoplast gefunden worden, darüber hinaus ist allerdings bezüglich ihrer Funktion, und Leitfähigkeiten nichts weiter bekannt (Martinoia et al., 2012).

## 1.2.2 Kationentransport am Tonoplasten

Das am häufigsten auftretende Kation in Pflanzen ist Kalium (Clarkson and Hanson, 1980; Dreyer and Uozumi, 2011; Wang et al., 2013; Wang and Wu, 2013), wobei der Kaliumgehalt bis zu 10% der pflanzlichen Trockenmasse betragen kann. Das Ion ist wichtig für die Enzymaktivität, stabilisiert die Proteinbiosynthese, neutralisiert negative Ladungen bei Proteinen und erzeugt zusammen mit der protonenmotorischen Kraft die

Membranpotentiale innerhalb der Pflanzenzelle (Marschner, 1995; Sharma et al., 2013). Kalium ist auch an der Aufrechterhaltung der cytosolischen pH-Homöostase beteiligt und spielt u.a. eine große Rolle als Osmotikum für den hydrostatischen Druck der Pflanzenzelle (Clarkson and Hanson, 1980; Leigh and Jones, 1984; Marschner, 1995; Dreyer and Uozumi, 2011; Pittman, 2012; Sharma et al., 2013). Die Konzentration von Kalium im Apoplast variiert zwischen 10 mM und 200 mM (Leigh and Jones, 1984; Wang et al., 2013). Während für die Vakuole eine Kaliumkonzentration von ca. 200 mM oder höher angenommen wird, könnten in geöffneten Stomata sogar 500 mM möglich sein (Leigh and Jones, 1984; Davies et al., 1992). Im Cytosol dagegen sollen ca. 100 mM Kalium vorliegen, was als optimal für die enzymatischen Aktivitäten gilt (Clarkson and Hanson, 1980; Dreyer and Uozumi, 2011; Wang and Wu, 2013). Damit eine bestmögliche Stoffwechselaktivität innerhalb der intrazellulären Kompartimente, wie Cytosol, Nukleus, Stroma oder mitochondrialer Matrix gewährleistet werden kann, müssen genaue Kaliumkonzentrationen aufrechterhalten werden (Dreyer and Uozumi, 2011). Die pflanzliche Zelle besitzt deshalb zwei Hauptspeicherorte für intrazelluläres Kalium. Zum einen das Cytosol und zum anderen die Vakuole, die den größten Kaliumpool darstellt (Walker et al., 1996). Es ist deshalb für die Kaliumhomöostase erforderlich, dass die Pflanzenzelle fein regulierte Kalium-Transportproteine in der Vakuolenmembran besitzt. Für den Transport von Kalium in die Vakuole konnten bisher AtNHX1 und AtNHX2 eindeutig identifiziert werden (Abb. 1.1). Diese Transporter können sowohl Natrium als auch Kalium im Antiport gegen Protonen in die Vakuole befördern (Apse, 1999; Barragán et al., 2012; Martinoia et al., 2012; Pittman, 2012; Wang and Wu, 2013) und sind daher wichtig für die vakuoläre Natrium- und Kaliumanreicherung (Martinoia et al., 2012). Da Natrium in hoher Konzentration toxisch wirkt, ist die Auslagerung in die Vakuole ein wichtiger Schutzmechanismus der Pflanzenzelle gegen Salzstress (Martinoia et al., 2012). Der Transport entlang des Kaliumgefälles aus der Vakuole in das Cytosol wird von Kaliumkanälen vermittelt. Zu deren Vertretern im Tonoplasten zählen TPK1, TPK2, TPK3, TPK5 und TPC1 (Abb. 1.1). Zusätzlich gibt es noch  $K_{ir}$ -ähnliche Kaliumkanäle, die aber faktisch zu den TPKs gehören (Sharma et al., 2013). Die Familie der TPK-Kanäle sind alle spannungsunabhängig (Dreyer and Uozumi, 2011; Hedrich, 2012). Davon sind TPK1 und TPK2 in der Vakuolenmembran von Wurzeln, Blättern und Blüten lokalisiert, während TPK3 in Wurzeln, Blüten, Samen und seneszierenden Blättern gefunden wird. TPK5 hingegen ist nur in Blüten und alterndem Blattgewebe zu finden

(Sharma et al., 2013). Von TPK1 ist bekannt, dass er cytosolische EF-Hand Motive und 14-3-3 Protein-Bindestellen aufweist (genauso wie TPK2, -3 und -4), sensitiv gegenüber cytosolischen Calciumänderungen ist und Kalium aus der Vakuole ins Cytosol entlässt (Bihler et al., 2005; Hedrich, 2012; Sharma et al., 2013). Zusätzlich ist TPK1 auch an der Keimung, der intrazellulären Kaliumhomöostase und an der Stomabewegung beteiligt (Sharma et al., 2013; Wang and Wu, 2013). Im Gegensatz zu den vakuolären TPK-Kanälen wurde TPC1 als nichtselektiver, langsam aktivierender, spannungsabhängiger und calciumregulierter Kationenkanal identifiziert, der unter physiologischen Bedingungen Kalium leitet, unter Salzstress aber auch für Natrium permeabel ist (Hedrich and Neher, 1987; Hedrich and Marten, 2011; Hedrich, 2012). Aber auch Ammonium, Calcium und Magnesium können den Kanal passieren (Hedrich and Marten, 2011; Martinoia et al., 2012). Es wird vermutet, dass TPC1 in nahezu allen Geweben lokalisiert ist und unter normalen physiologischen Bedingungen an der Kaliumhomöostase beteiligt ist (Hedrich, 2012).

Ein weiteres sehr wichtiges Kation neben Kalium ist das divalente Calciumion ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Es übernimmt im pflanzlichen Organismus viele verschiedene wichtige Funktionen. Als divalentes Kation trägt es in hoher apoplastischer Konzentration zur Festigung der pflanzlichen Zellwände bei. Zusätzlich stabilisiert es auch Zellmembranen, indem es verschiedenste Proteine und Lipide an die Membranoberfläche bindet (White and Broadley, 2003; Hirschi, 2004; Roelfsema and Hedrich, 2010; Martinoia et al., 2012). Calcium dient auch als positives Gegenion für organische und anorganische Anionen und ist an der Regulation der Öffnungsweite bei den Spaltöffnungen von Schließzellen beteiligt (White and Broadley, 2003; Dodd et al., 2010). Bei Calciummangel kann es zur Auflösung der Zellwand und Gewebeeinstabilität im betroffenen pflanzlichen Organismus kommen (Hirschi, 2004). Auf der anderen Seite führt eine zu hohe Calciumkonzentration im Boden zu vermindertem Pflanzenwachstum und verhindert die Samenreifung (White and Broadley, 2003). Der Pflanzliche Organismus nimmt Calcium über die Wurzel aus dem umgebenden Erdreich auf und transportiert es sowohl symplastisch als auch apoplastisch zum Xylem. Von dort wird es anschließend in den Spross gebracht. Dieser Transportprozess muss von der Pflanze sehr genau reguliert werden, so dass einerseits hohe Calciumkonzentrationen in der Wurzel cytosolische Calciumsignale nicht einfach überlagern und andererseits eine schädigende Anhäufung von Calcium im Spross verhindert wird (White and Broadley, 2003). Die Aufnahme von Calcium in die Vakuole, kann im Gegensatz zu Natrium oder Kalium entweder

primär-aktiv (Kapitel 1.2) oder sekundär-aktiv erfolgen. Der aktive Calciumimport über den Tonoplast wird von zwei P-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (ACA4 und ACA11) bewältigt (Lee et al., 2007; Martinoia et al., 2012; Kap. 1.2, Abb. 1.1), während die passive Aufnahme mit Hilfe vakuolärer CAX-Calciumtransporter (Abb. 1.1) aus der Überfamilie der Kationen/Calcium-Austauscher erfolgt (Hirschi et al., 1996; Pittman, 2012). Einige diese CAX-Transporter sind spezifisch für Calcium, während andere Transporter dieser Familie auch andere zweiwertige Kationen, wie Mangan oder Cadmium transportieren können (Hirschi et al., 1996; Shigaki et al., 2003; Mei et al., 2007; Edmond et al., 2009; Martinoia et al., 2012). CAX1 – der am häufigsten vorkommende Transporter in Pflanzen – ist ein  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter, der in den Vakuolen des Mesophyllgewebes sehr hoch exprimiert wird. Dadurch wird die Beobachtung unterstützt, dass Calcium hauptsächlich in Mesophyllzellen gespeichert wird (Hirschi et al., 1996; Mei et al., 2007; Martinoia et al., 2012). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften geht man deshalb davon aus, dass beide Systeme verschiedene Aufgaben erfüllen. Die P-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen besitzen im Allgemeinen eine hohe Affinität für Calcium und eine geringe Transportkapazität. Die CAX-Transporter verfügen dagegen über eine relativ niedrige Affinität für Calcium, dafür aber eine hohe Transportkapazität (Shigaki and Hirschi, 2006; Bose et al., 2011; Roelfsema and Hedrich, 2010). Daher wird angenommen, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen für die Aufrechterhaltung eines niedrigen Calciumspiegels im Cytosol verantwortlich sind, die Calciumtransporter hingegen ein Übermaß an Calcium – zum Beispiel nach Signalereignissen – abbauen (Shigaki and Hirschi, 2006; Roelfsema and Hedrich, 2010).

### 1.3 Calciumsignale im pflanzlichen Organismus

Neben den in Kapitel 1.2.2 angesprochenen Funktionen von Calcium in der Pflanze erfüllt das divalente Kation als ein intrazellulärer *second messenger* auch noch eine weitere sehr wichtige zelluläre Aufgabe (White and Broadley, 2003; Hashimoto and Kudla, 2011; Batistič and Kudla, 2012). Viele Signalwege werden erst durch Änderungen des cytosolischen Calciumspiegels ausgelöst (White and Broadley, 2003; Martinoia et al., 2007). Dazu muss der cytosolische Calciumlevel in „ruhenden“ Zellen konstant gehalten werden. Studien gehen von einer freien cytosolischen Calciumkonzentration von 100–200 nM aus (Schroeder and

Hedrich, 1989; White, 2000; Hirschi, 2004; Bose et al., 2011; Schönknecht, 2013). In der Vakuole kann die freie Calciumkonzentration zwischen 0,2 mM und 10 mM variieren und gilt damit als größter intrazellulärer Calciumspeicher, während die Konzentration im Apoplasten zwischen 1 mM und 10 mM Calcium betragen kann (Bose et al., 2011; Schönknecht, 2013). Calciumsignale können durch verschiedenste biotische und abiotische Faktoren, wie Licht oder Berührung, Temperaturänderungen, Wassermangel, oxidativer oder osmotischer Stress, Elicitoren, Nodulationsfaktoren oder Verwundung ausgelöst werden (Knight et al., 1993; León et al., 2001; Chico et al., 2002; White and Broadley, 2003; Martinoia et al., 2007; Hashimoto and Kudla, 2011;) Dabei kommt es zu einem Anstieg des cytosolischen Calciumspiegels (White and Broadley, 2003). So können zum Beispiel Hitze- oder ein hyperosmotischer Stress in *A. thaliana* Setzlingen einen langsamen, transienten Calciumanstieg von mehreren Minuten oder eine längerfristige Erhöhung des Calciumlevels (bis zu mehreren Stunden) hervorrufen (Knight et al., 1997; Kiegle et al., 2000; White and Broadley, 2003). Die Änderungen der Calciumkonzentration können dabei entweder direkt am Protein durch entsprechende Bindemotive, durch Calciumbindepoteine und Proteinkinasen (z. B. LeCDPK1) oder durch indirekte Signalwege weitergegeben werden (Heizmann and Hunziker, 1991; Baumann et al., 1993; Nalefski and Falke, 1996; Lewit-Bentley and Réty, 2000; Chico et al., 2002). Mehrere Studien konnten auch zeigen, dass es je nach Entwicklungsprozess und biotischen bzw. abiotischen Einflüssen eine Vielzahl von spezifischen Modulationen (Amplitude, Geschwindigkeit, räumliche und zeitliche Ausdehnung) bei den Calciumsignalen gibt (Berridge et al., 2000; White and Broadley, 2003; Dodd et al., 2010; Batistič and Kudla, 2012). Diese Signale können innerhalb der pflanzlichen Zelle dann an unterschiedlichen Stellen durch indirekte oder direkte Signalwege wirken (Hirschi, 2004).

Eine Möglichkeit des indirekten Signalweges ist die transkriptionelle Regulation. Im Jahr 2006 konnte Kaplan et al. sogenannte „*early response*“ Gene identifizieren, die teilweise schon ca. 30 Minuten nach einem Calciumsignal maximal exprimiert wurden (Kaplan et al., 2006; Dodd et al., 2010). Andere Arbeiten gehen davon aus, dass sogar ca. 3% des gesamten Genoms von *A. thaliana* durch Calcium reguliert werden (Dodd et al., 2010). Calcium kann aber auch posttranslational direkt über die Bindung an das jeweilige Zielprotein einwirken und damit dessen Aktivität beeinflussen. Das häufigste Calcium-Bindemotiv bei Proteinen stellt dabei die EF-Hand dar (Lewit-Bentley and Réty, 2000). Als Beispiel für eine direkte

Calciumregulation kann hier der Kationenkanal TPC1 angeführt werden, der cytosolische EF-Hand-Motive in der Proteinstruktur besitzt und durch hohe cytosolische Calciumkonzentrationen aktiviert werden kann (Hedrich and Neher, 1987; Hedrich and Schroeder, 1989; Beyhl et al., 2009; Rienmüller et al., 2010; Hedrich and Marten, 2011; Schulze et al., 2011). Dabei moduliert das erste EF-Hand-Motiv die Calciumsensitivität, während das zweite EF-Hand-Motiv für die Kanalöffnung zuständig ist (Schulze et al., 2011). Ein anderes Beispiel für einen calciumaktivierten, vakuolären Kanal ist TPK1, der ebenfalls EF-Hand-Motive besitzt und durch cytosolisches Calcium aktiviert wird (Bihler et al., 2005).

Eine zusätzliche Option für die direkte und sehr schnelle Signalübertragung bieten Calciumsensorproteine. Diese werden repräsentiert durch Calmodulin (CaM), Calmodulin-ähnliche Proteine (CML, *calmodulin-like*), die Familie der calciumabhängigen Proteinkinasen (CDPK, *calcium-dependent protein kinases*) und durch die Familie der Calcineurin-B ähnlichen (CBL, *calcineurin B-like*) Proteine (Hashimoto and Kudla, 2011). Die Sensorproteine können wiederum in zwei Klassen eingeteilt werden: „*sensor relay*“ oder „*sensor responder*“ Proteine. CDPKs sind „*sensor responder*“, die mit Calciumbindedomänen ausgestattet sind und mit einem anderen Protein verknüpft sind. Diese können dann zum Beispiel andere Kinasen in ihrer Aktivität regulieren (Dodd et al., 2010). Im Gegensatz dazu interagieren „*sensor relay*“-Proteine (CaM, CMLs und CBLs) direkt mit dem Zielprotein (Dodd et al., 2010; Hashimoto and Kudla, 2011). Ein Beispiel für eine Aktivierung über Sensorproteine ist der S-Typ-Anionenkanal in der Plasmamembran von *N. tabacum* Schließzellen. Dieser wird ohne messbare Verzögerung durch einen Anstieg des cytosolischen Calciumlevels aktiviert. Da bei dem entsprechenden Gen *SLAC1* keine Calciumbindemotive identifiziert werden konnten, sind vermutlich Proteinkinasen an der calciumabhängigen Aktivierung beteiligt (Geiger et al., 2009; Stange et al., 2010).

Direkte Messungen der Regulation von Ionenkanälen an der Vakuolenmembran durch Calciumsignale in intakten Pflanzen wurden bislang allerdings noch nicht durchgeführt. Ein direkter Nachweis im intakten System steht deshalb bislang noch aus und könnte tiefere Einblicke in die Calciumregulation von Leitfähigkeiten am Tonoplasten *in vivo* gewähren.



### 1.3.1 Intrazelluläre Calciumfreisetzung

Um Calciumsignale zu erzeugen, strömt Calcium entweder aus dem Apoplasten über die Plasmamembran in das Cytosol ein oder es wird aus internen Speicherorten wie dem Endoplasmatischen Retikulum bzw. der Vakuole in das Cytosol entlassen (White and Broadley, 2003; Martinoia et al., 2007; Hashimoto and Kudla, 2011). Für die Plasmamembran werden dabei verschiedene Calciumkanäle postuliert, die entweder durch Hyper- oder Depolarisation aktiviert werden oder gänzlich spannungsunabhängig sind (Roelfsema and Hedrich, 2010). Weiterhin werden auch von zyklischen Nukleotiden gesteuerte CNGC-Kanäle (*cyclic nucleotide gated channels*) und Glutamatrezeptor-ähnliche Proteine (GLR, *glutamate receptor-like*) mit einer Calciumleitfähigkeit vorgeschlagen. (Roelfsema and Hedrich, 2010; Jammes et al., 2011). Auch Vertreter der mechanosensitiven, calciumpermeablen MSCC-Kanäle (*mechanosensitive Ca<sup>2+</sup> permeable channels*) können am cytosolischen Calciumanstieg beteiligt sein (Jammes et al., 2011). Neben der Plasmamembran ist die Vakuolenmembran sehr wahrscheinlich ein weiteres wichtiges Ziel für die gesteuerte Freisetzung des *second messengers* in das Cytosol (Roelfsema and Hedrich, 2010). Da der SV-Kanal neben seiner Kaliumpermeabilität auch eine Leitfähigkeit für zweiwertige Kationen, wie Calcium und Magnesium besitzt (Martinoia et al., 2012), wurde der Kanal in Schließzellvakuolen unter experimentellen Bedingungen sehr häufig als Kandidat für eine calciuminduzierte Calciumfreisetzung postuliert (Ward and Schroeder, 1994). Allerdings konnte die Rolle von TPC1 in der durch Calcium ausgelösten Freisetzung von eben diesem Kation bis heute unter physiologischen Bedingungen nicht eindeutig nachgewiesen werden (Hedrich and Marten, 2011; Hedrich, 2012).

### 1.4 Aktiver Protonentransport am Tonoplasten

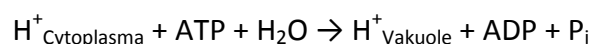
Zur Akkumulation oder Freisetzung von gelösten Stoffen in die bzw. aus der Vakuole gegen einen Konzentrationsgradienten mittels eines sekundär-aktiven Transportmechanismus (Kap. 1.2) wird Energie benötigt (Hedrich et al., 1988; Wink, 1993; Lodish et al., 2000; Martinoia et al., 2012). Diese Energie wird am Tonoplasten in Form eines elektrochemischen Protonengradienten hauptsächlich von der Protonen-ATPase (V-ATPase) und zu einem

geringeren Anteil von der Protonen-Pyrophosphatase (V-PPase) erzeugt (Martinoia et al., 2007; Krebs et al., 2010; Etxeberria et al., 2012; Martinoia et al., 2012), indem die Energie aus der Hydrolyse von ATP bzw.  $PP_i$  genutzt wird, um Protonen über die Vakuolenmembran zu transportieren (Hedrich et al., 1986, 1989; Hedrich and Schroeder, 1989).

### **1.4.1 Molekulare Struktur und Funktionsweise der vakuolären Protonen-ATPase**

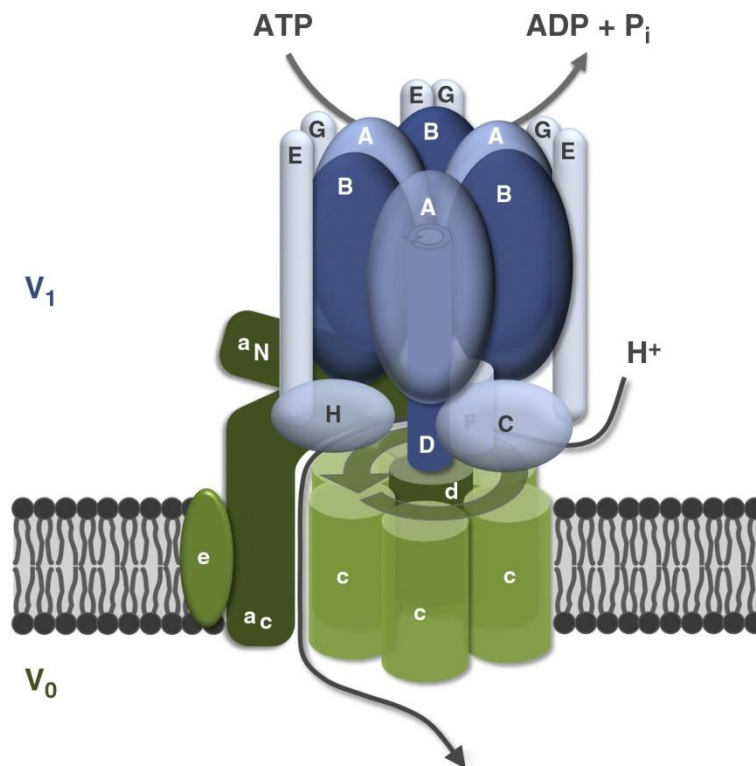
Die V-ATPase ist ein ubiquitäres Enzym, das in den verschiedensten Membranen von Pro- und Eukaryoten, inklusive Pilze, allen Pflanzen, Tieren und beim Menschen zu finden ist (Hedrich and Schroeder, 1989; Cross and Taiz, 1990; Sze et al., 1999; Martinoia et al., 2007; Neuhaus, 2007; Ma et al., 2011). Sie hat einen gemeinsamen Ursprung mit der F-ATPase (ATP-Synthase) aus der inneren Mitochondrienmembran, den Chloroplasten von Eukaryoten und der A-ATPase (Archae-ATPase) aus Archaeobakterien (Cross and Taiz, 1990; Nelson et al., 1992; Bickel-Sandkötter et al., 1998; Forgac, 1998, 1999; Schumacher and Krebs, 2010). Die V-ATPase ist in den Vakuolen von Pflanzen und Pilzen, in Lysosomen, Endosomen, Chlatriin-überzogenen und synaptischen Vesikeln ebenso wie in sekretorischen- und Speichergranula lokalisiert (Nelson, 1988; Hedrich and Schroeder, 1989; Gambale et al., 1994; Forgac, 1998) und bildet zusammen mit der V-PPase ca. 30% der gesamten Proteine im Tonoplasten (Schumacher, 2006). Das pflanzliche V-ATPase-Holoenzym besteht aus 12 bis 14 verschiedenen Untereinheiten (Kluge et al., 2003; Diepholz et al., 2008; Ma et al., 2011), die je nach Art von 14 Genen in *Chlamydomonas*, 23 in *A. thaliana* oder von bis zu 54 Genen in der Sojabohne kodiert werden (Seidel et al., 2008; Schumacher and Krebs, 2010). Die V-ATPase-Untereinheiten (VHA) bilden zwei große Protein-Subkomplexe: (i) Den peripheren, dem Cytoplasma zugewandten  $V_1$ -Komplex (Abb. 1.2, blaue Färbung), der aus den acht Untereinheiten VHA-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G und -H besteht und ein Molekulargewicht von ca. 400-600 kDa besitzt (Sze et al., 1999; Beyenbach and Wiczorek, 2006; Ma et al., 2011). Innerhalb diese Komplexes gibt es einen Kern, der aus einem alternierenden Hexamer aus VHA-A und VHA-B ( $A_3B_3$ ) Untereinheiten aufgebaut ist (Kluge et al., 2003; Beyenbach and Wiczorek, 2006; Schumacher and Krebs, 2010; Ma et al., 2011). (ii) Der zweite V-ATPase-Subkomplex (Abb. 1.2, grüne Färbung) ist der in der Vakuolenmembran eingebettete  $V_0$ -

Komplex und enthält die Untereinheiten VHA-a, -c, -c', -c'', -d und -e mit einem Molekulargewicht von 150-350 kDa (Sze et al., 1999; Beyenbach and Wieczorek, 2006; Ma et al., 2011;). VHA-c, -c' und -c'' weisen dabei große strukturelle Übereinstimmungen auf (Ma et al., 2011). Die Untereinheiten c und -c' sind aus jeweils vier transmembranen  $\alpha$ -Helices aufgebaut, während bei c'' fünf Membran-durchquerende  $\alpha$ -Helices vorkommen (Ma et al., 2011). Der zentrale Bestandteil des  $V_0$ -Komplexes besteht aus einem Proteolipid-Ring, der sich wahrscheinlich aus mindestens sechs Kopien der Untereinheit VHA-c zusammensetzt (Grabe et al., 2000; Kluge et al., 2003; Beyenbach and Wieczorek, 2006; Martinoia et al., 2007; Schumacher and Krebs, 2010; Ma et al., 2011). Die genaue Anzahl der c-Untereinheiten scheint aber je nach Spezies zu variieren. So wurde zum Beispiel bei der verwandten F-ATPase in *Enterococcus hirae* und *Manduca sexta* 10 c-Untereinheiten entdeckt, die an der Bildung des  $V_0$ -Komplexes beteiligt sind, bei Spinat-Chloroplasten sogar 14 (Murata et al., 2005; Beyenbach and Wieczorek, 2006; Muench et al., 2009). Die genaue Anzahl der VHA -c, -c' und -c'' Untereinheiten in *A. thaliana* ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und es ist unklar, ob VHA-c'' in Arabidopsis überhaupt vorkommt (Kluge et al., 2003). An den Proteolipid-Ring grenzen zusätzlich die Untereinheiten VHA-a und VHA-e an (Abb. 1.2). Die beiden zentralen Bestandteile der Subkomplexe  $V_1$  und  $V_0$  werden durch einen im Zentrum gelegenen Stiel aus den Untereinheiten VHA-D, VHA-F und VHA-d und drei peripheren, statischen Stielen aus VHA-E, VHA-G, VHA-C, VHA-H und der N-terminalen Domäne von VHA-a verbunden (Schumacher and Krebs, 2010, Abb. 1.2). Diese Stiele halten das  $A_3B_3$ -Hexamer in einer stationären Position und sind am Protonentransport über die Membran beteiligt (Beyenbach and Wieczorek, 2006; Schumacher and Krebs, 2010). Die Hydrolyse von ATP zu ADP, unter Abspaltung eines anorganischen Phosphates, findet am  $A_3B_3$ -Hexamer des peripheren  $V_1$ -Komplexes statt (Hedrich and Schroeder, 1989; Beyenbach and Wieczorek, 2006; Ma et al., 2011):



Der ins Cytoplasma gerichtete  $V_1$ -Komplex enthält dazu katalytische Bindungsstellen in VHA-A, die an der Hydrolyse beteiligt sind (Hedrich and Schroeder, 1989; Beyenbach and Wieczorek, 2006; Schumacher and Krebs, 2010; Ma et al., 2011). Die freiwerdende Energie aus der ATP-Spaltung bewirkt Konformationsänderungen, die vermutlich unter Mitwirkung des zentralen Stieles zu einer Drehbewegung – in Analogie zur F-ATPase – des  $V_0$ -Komplexes

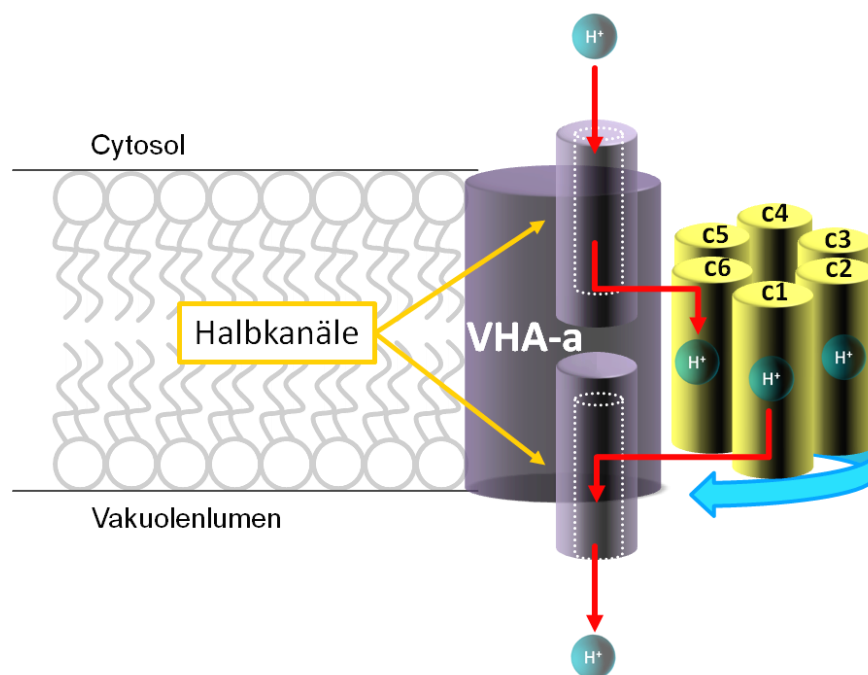
führen (Grabe et al., 2000; Kinosita et al., 2000; Kluge et al., 2003; Beyenbach and Wieczorek, 2006; Okuno et al., 2011).



**Abbildung 1.2. Schematisches Modell der V-ATPase.** Die Grafik zeigt das aus zwei Teilen bestehende V-ATPase Holoenzym: die periphere, dem Cytosol zugewandte  $V_1$ -Domäne aus alternierenden A- und B-Untereinheiten (blau) und die Membran-integrierte  $V_0$ -Domäne aus fünf Kopien der Untereinheit VHA-c und einer Kopie der Untereinheit VHA-c'' (grün).  $V_1$  und  $V_0$  sind durch drei periphere, statische Proteinstiele miteinander verbunden. Ein zentraler Stiel, bestehend aus den Untereinheiten VHA-D, VHA-F und VHA-d und drei peripheren, statischen Stielen aus VHA-E, VHA-G, VHA-C, VHA-H und der N-terminalen Domäne von VHA-a verbinden die Komplexe  $V_1$  und  $V_0$  (Aus Schumacher and Krebs, 2010, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier).

Auf Grundlage der Funktionsweise der F-ATPase-Synthase wurde ein hypothetisches Modell zur Protonentranslokation für die V-ATPase entwickelt (Forgac, 1998; Grabe et al., 2000; Kluge et al., 2003; Beyenbach and Wieczorek, 2006; Abb. 1.3). Nach diesem Modell besitzt die an den Proteolipid-Ring angrenzende Untereinheit VHA-a zwei Halbkanäle, die mit dem Cytosol bzw. dem Vakuolenlumen Kontakt haben. Die Halbkanäle stehen jedoch in keiner direkten Verbindung zueinander. Ein Proton kann den Halbkanal auf der cytosolischen Seite passieren und an eine freie Protonenbindungsstelle an der VHA-c Untereinheit im

Proteolipid-Ring binden (Abb. 1.3). Durch eine von der ATP-Hydrolyse ausgelöste Rotation dreht sich die besetzte c-Untereinheit weiter und ein weiteres Proton kann an die nächste, freie c-Untereinheit binden. Dieser Ablauf wiederholt sich, bis nach einer ca. 360° Drehung die erste, mit einem Proton besetzte Untereinheit den zweiten Halbkanal erreicht. Dort kann das Proton dann den Proteolipid-Ring in Richtung des Vakuolenlumens wieder verlassen (Beyenbach and Wiczorek, 2006, Abb. 1.3). Der Vorgang kann kontinuierlich wiederholt werden, solange im Cytosol ATP zur Verfügung steht.



**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des Protonentransportes über die Vakuolenmembran.** Veranschaulichung der hypothetischen Protonentranslokation im  $V_0$ -Komplex mit Hilfe der beiden Halbkanäle in der Untereinheit VHA-a (violett) zusammen mit dem Proteolipid-Ring aus sechs VHA-c Untereinheiten (gelb). Das Proton passiert dabei auf der cytosolischen Seite den Halbkanal und bindet an eine freie VHA-c Untereinheit. Die durch ATP-Hydrolyse angetriebene Rotation führt schließlich die besetzte c-Untereinheit zum zweiten Halbkanal, durch den das Proton in das Vakuolenlumen entlassen wird. Die roten Pfeile geben die Richtung des Protonentransportes wieder. (Darstellung frei nach Beyenbach and Wiczorek, 2006)

Zusätzlich trägt die elektrogene Protonentranslokation wesentlich zur Entstehung eines elektrischen Feldes und einer Membranpotentialdifferenz an der Vakuolenmembran bei (Hedrich et al., 1989; Hedrich and Schroeder, 1989; Davies, 1997; Martinoia et al., 2012). So

konnte zum Beispiel für *Hordeum vulgare* L. mit Hilfe intrazellulärer Mikroelektroden Tonoplastenpotentiale zwischen -9 und -23 mV *in vivo* erfasst werden (Walker et al., 1996), während in intakten *Eremosphaera viridis* Membranpotentiale zwischen -30 bis -65 mV beobachtet wurden (Bethmann et al., 1995). Generell wird aber ein Vakuolenmembranpotential im Bereich von ca. -20 mV bis -30 mV *in vivo* angenommen (Barbier-Brygoo et al., 1986; Bethmann et al., 1995; Walker et al., 1996; Martinoia et al., 2007, 2012).

Das Membranpotential unterstützt dabei aufgrund seiner negativen Polarisierung auf der cytosolischen Seite relativ zum Lumen die Aufnahme von Anionen durch Ionenkanäle in die Vakuole (Hedrich et al., 1988; Bethmann et al., 1995; Martinoia et al., 2012) und reguliert die Aktivität von spannungsabhängigen Proteinen wie zum Beispiel TPC1 (Hedrich and Neher, 1987; Beyhl et al., 2009; Hedrich and Marten, 2011; Hedrich, 2012).

Die Kombination aus Protonengradient und Membranpotential bildet die sogenannte *proton-motive force* (Taiz, 1992; Sze et al., 1999; Tomashek and Brusilow, 2000; Kluge et al., 2003; Hanitzsch et al., 2007; Seidel et al., 2012) und wird von sekundär-aktiven Transportern verwendet (Abb. 1.1; Kap. 1.2), um Stoffe auch gegen einen Gradienten im Vakuolenlumen zu akkumulieren (Lodish et al., 2000; Ratajczak, 2000; Dietz et al., 2001; Krebs et al., 2010; Etxeberria et al., 2012). Die V-ATPase ist deshalb nicht nur aktiv an der Erzeugung eines elektrochemischen Gradienten zur Aufrechterhaltung vakuolärer Transportprozesse, sondern auch indirekt über das Membranpotential an der Regulation von spannungsabhängigen Transportproteinen beteiligt.

Aufgrund der engen strukturellen und evolutionären Verwandtschaft der V-ATPase mit der F-ATPase wurde deshalb auch lange Zeit angenommen, dass bei der vakuolären Pumpe in Analogie zur F-ATPase zwei Protonen pro hydrolysiertem ATP-Molekül über die Membran in die Vakuole transportiert werden (Bennett and Spanswick, 1984; Cross and Taiz, 1990; Nelson, 1992; Forgac, 1999; Tomashek and Brusilow, 2000). Allerdings wurde durch spätere Arbeiten an verschiedenen Organismen bei wechselnden pH-Bedingungen eine unterschiedliche Anzahl an translozierten Protonen pro ATP kalkuliert (Davies et al., 1994; Davies et al., 1996; Yabe et al., 1999; Maeshima, 2001; Müller and Taiz, 2002; Kettner et al., 2003). Deshalb wurde postuliert, dass die vakuoläre Protonenpumpe in der Lage wäre, die Rate der transportierten Protonen pro hydrolysiertem ATP in Abhängigkeit vom pH-Wert zu variieren (Davies et al., 1994; Yabe et al., 1999; Tomashek and Brusilow, 2000; Müller and

Taiz, 2002; Kettner et al., 2003). Die V-ATPase würde demnach in ihrer Funktionsweise einem flexiblen molekularen Motor entsprechen, der je nach Bedarf eine unterschiedliche Anzahl an Protonen über die Vakuolenmembran transportieren könnte. Kenntnisse über eine potentielle und pH-regulierte Kopplungsrate der V-ATPase in *A. thaliana* lagen bislang allerdings noch nicht vor.

### 1.4.2 Physiologische Bedeutung und Regulation der V-ATPase

Als hauptsächlicher Energieerzeuger für alle Protonen-gekoppelten Transportprozesse an der Vakuolenmembran spielt die V-ATPase eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase von Ionen bzw. Metaboliten. (Kap. 1.1-2, Abb. 1.1.; Taiz, 1992; Sze et al., 1999; Lodish et al., 2000; Tomashek and Brusilow, 2000; Kluge et al., 2003; Hanitzsch et al., 2007; Etxeberria et al., 2012; Seidel et al., 2012). Darüber hinaus ist die V-ATPase auch entlang des endozytotischen und sekretorischen Weges innerhalb der Zelle bei der Ansäuerung bestimmter Organellen involviert (Dettmer et al., 2006; Schumacher, 2006). Diese durch den Protonentransport hervorgerufene saure Umgebung ist zum Beispiel im Inneren von Endosomen für die Dissoziation zellinterner Liganden-Rezeptor-Komplexe notwendig, um das Rezeptor-Recycling zu gewährleisten und die Bildung von endosomalen Transportvesikeln zu ermöglichen, die den Ligandentransfer von frühen zu späten Endosomen gestatten (Forgac, 1998; Pérez-Sayáns et al., 2012). Ein saures vakuoläres Milieu ist außerdem für den Transport von neu synthetisierten lysosomale Enzymen vom Golgi-Apparat zum Lysosomen bedeutend und wird benötigt, um dissoziierte Liganden den Lysosomen zuführen zu können (Forgac, 1998; Pérez-Sayáns et al., 2012). In Lysosomen ist ein niedriger pH-Wert ebenfalls für die Funktion der darin enthaltenen degradierenden Enzyme wichtig (Pérez-Sayáns et al., 2012). Die V-ATPase scheint darüber hinaus an der Erzeugung von Mikromilieus für den korrekten Transport, Austausch und Sekretion von Proteinen beteiligt zu sein (Pérez-Sayáns et al., 2012). Zusätzlich ist die Protonenpumpe sowohl für die Funktion des Golgi-Apparates als auch während der Entwicklung der männlichen Gametophyten und der Embryogenese essentiell (Dettmer et al., 2006).

### 1.4.2.1 Regulation der V-ATPase-Funktion

Aufgrund der vielen zellulären Funktionen, an der die V-ATPase im pflanzlichen Organismus indirekt beteiligt ist, erscheint es nicht verwunderlich, dass die Aktivität eines so komplexen Enzyms auch einer Vielzahl von regulatorischen Mechanismen unterliegt (Ratajczak, 2000; Beyenbach and Wieczorek, 2006). Dadurch ist die Protonenpumpe in der Lage, innerhalb der Zelle ihre Aktivität entsprechend den jeweiligen Umweltbedingungen zu regeln. Die grundsätzlichsste Möglichkeit zur Steuerung der Protonenpumpaktivität besteht in der (Langzeit-) Kontrolle der Genexpression (je nach Art in Pflanzen zwischen 14 und 54 V-ATPase-Gene, Kap. 1.4.1) über transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen (Merzendorfer et al., 1997; Dietz et al., 2001; Hanitzsch et al., 2007; Martinoia et al., 2007). Dies ist zum Beispiel aufgrund von Sauerstoffmangel, cytosolischer Ansäuerung oder durch Umweltverschmutzung, Salz-, Kälte- oder Trockenstress der Fall (Dietz et al., 2001; Ratajczak, 2000). So führt Salzstress nachweislich zu einer Zunahme des mRNA-Levels für die Untereinheiten VHA-A, -B und -c des Pumpenzym (Sze et al., 1999; Ratajczak, 2000; Kluge et al., 2003;). Ferner können Hitze- und Trockenstress zu Änderungen des Expressionslevels der V-ATPase-Untereinheiten VHA- E, -G führen (Hanitzsch et al., 2007). Zusätzlich ermöglicht die Expression mehrerer VHA-Isoformen eine feinere Steuerung der Enzymkinetik und schafft dadurch in Kombination mit unterschiedlichen Lokalisationen der Pumpproteine weitere, Kompartiment-spezifische Regulationsmöglichkeiten der Pumpaktivität (Dschida and Bowman, 1995; Sze et al., 2002; Dettmer et al., 2006; Schumacher and Krebs, 2010). Solche unterschiedlichen Expressionsorte der Isoformen konnte bereits für VHA-a im trans-Golgi-Netzwerk (VHA-a1) bzw. Tonoplasten (VHA-a2 und -a3) nachgewiesen werden (Dettmer et al., 2006). Im Gegensatz zur Langzeit-Regulation durch Modifikation der Genexpression kann die V-ATPase-Aktivität durch biochemische Steuerung auch kurzfristiger angepasst werden, um im Fall plötzlicher Veränderungen im cytosolischen pH- oder bei sekundär-aktiven Transportprozessen reagieren zu können (Dietz et al., 2001). Als Fallbeispiel für eine pH-abhängige Steuerung der Pumpaktivität zeigten partiell aufgereinigte V-ATPasen in Hafer-Wurzeln bei einem neutralen pH-Wert ein Maximum an Aktivität, die mit steigendem pH-Wert wieder abnahm (Randall and Sze, 1986; Dietz et al., 2001). Dies deutet auf eine Regulation der Aktivität durch den cytosolischen pH-Wert hin (Dietz et al., 2001; Pittman,



2012). Weitere Unterstützung dieser Hypothese wurde durch Arbeiten in *B. vulgaris*, *S. cerevisiae* und *C. limon L.* geliefert, bei denen mit verschiedenen cytosolischen und luminalen pH-Werten unterschiedliche Kopplungsraten für den Transport von Protonen pro hydrolysiertem ATP-Molekül durch die V-ATPase kalkuliert wurden (Davies et al., 1994; Müller and Taiz, 2002; Kettner et al., 2003). Dadurch wurde eine Regulierung des Protonentransportes unter Beteiligung cytosolischer und luminaler pH-Werte in den untersuchten Organismen postuliert (Davies et al., 1994; Davies et al., 1996; Yabe et al., 1999; Maeshima, 2001; Müller and Taiz, 2002; Nishi and Forgac, 2002; Kettner et al., 2003; Pittman, 2012). Für *A. thaliana* lag diesbezüglich allerdings noch kein entsprechender Nachweis vor.

Aufgrund der ATP-Abhängigkeit des Pumpvorgangs ist durch Verfügbarkeit von cytosolischem ATP (zwischen 0,5 und 2 mM *in vivo*) eine weitere Regulationsmöglichkeit der V-ATPase-Aktivität gegeben (Dietz et al., 1998; Ratajczak, 2000; Dietz et al., 2001). Da ADP und  $P_i$ , als Produkte der ATP-Hydrolyse, zusätzlich auch kompetitive Inhibitoren der Pumpe sind, ergibt sich darüber hinaus eine mögliche Rückkopplungssteuerung der Pumpe (Dietz et al., 1998, 2001; Kettner, 2003). Verfügt die Zelle über viel Energie in Form einer hohen cytosolischen ATP-Konzentration ist der Gehalt an ADP und  $P_i$  niedrig und die Pumpe wird stimuliert, während bei ATP-Mangel – zum Beispiel unter Trockenstress durch Hemmung der ATP-Synthese – das Enzym durch höhere ADP-/ $P_i$ -Konzentrationen gehemmt wird (Dietz et al., 1998, 2001; Kettner, 2003).

Mit Hilfe der reversiblen Dissoziation der Protonenpumpe kann die V-ATPase-Aktivität ebenfalls kontrolliert werden (Merzendorfer et al., 1997; Forgac, 1998; Cipriano et al., 2008). Dabei zerfällt das V-ATPase Holoenzym, ausgelöst durch verschiedene Faktoren, in die separaten  $V_0$  und  $V_1$  Komplexe und wird somit inaktiv (Ward et al., 1992; Kettner, 2003; Forgac, 2007). Bei Bedarf können sich die beiden Komplex wieder zusammenfügen und ergeben wieder eine funktionsfähige Pumpe (Forgac, 1998, 2007). Dieser Vorgang scheint sowohl in Hefen und Insekten als auch in Säugetieren ein gängiger Regulationsmechanismus zu sein und konnte aber auch schon in *A. sativa* beobachtet werden (Ward et al., 1992; Merzendorfer et al., 1997; Forgac, 1998, 2007; Cipriano et al., 2008). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass dieser Vorgang sehr schnell ist und keine neuen Proteine synthetisiert werden müssen (Forgac, 1998; Nishi and Forgac, 2002; Cipriano et al., 2008).

Ferner wird postuliert, dass verschiedene Lipide und vermutlich auch der Phosphorylierungszustand einiger ATPase-Untereinheiten (z. B. VHA-C) eine Rolle bei der Stimulation der V-ATPase spielen (Scherer and Stoffel, 1987; Scherer et al., 1988; Ratajczak, 2000; Dietz et al., 2001; Hong-Hermesdorf et al., 2006; Martinoia et al., 2007).

Ein weiterer, schon früh identifizierter, biochemischer Steuerungsmechanismus der Protonenpumpe ist die Veränderung des Redox-Zustandes bestimmter Aminosäurereste des Enzyms (Scherer et al., 1988; Hager and Lanz, 1989; Martiny-Baron et al., 1992; Dschida and Bowman, 1995; Ratajczak, 2000; Dietz et al., 2001; Martinoia et al., 2007; Cipriano et al., 2008). Hierbei sind die Disulfidbindungen zwischen den Sulfhydrylgruppen von drei in Eukaryoten hochkonservierten Cysteinresten (homolog zu Cys<sup>261</sup>, Cys<sup>284</sup> und Cys<sup>538</sup> in Hefe, zu Cys<sup>254</sup> und Cys<sup>532</sup> in Vesikeln des Rinderhirns oder zu Cys<sup>256</sup>, Cys<sup>279</sup> und Cys<sup>535</sup> in *A. thaliana*) beteiligt, die alle in der katalytischen Untereinheit A im V<sub>1</sub>-Komplex lokalisiert sind (Hager and Lanz, 1989; Feng and Forgac, 1992b; Feng, Y., Forgac, 1994; Merzendorfer et al., 1997; Forgac, 1998; Dietz et al., 2001; Seidel et al., 2012). Auch Disulfidbrücken in der Untereinheit E (ebenfalls im V<sub>1</sub>-Komplex) werden als möglicherweise beteiligte Regulationsorte postuliert (Tavakoli et al., 2001). Oxidationsmittel wie zum Beispiel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Glutathion (in oxidierten Form) oder Nitrat führen zur Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen zwischen den entsprechenden Cysteinresten und damit zur Inaktivierung der Pumpe, während reduzierende Substanzen wie Glutathion (in reduzierter Form) oder Dithiothreitol (DTT) die Protonenpumpe wieder reaktivieren können (Hager and Lanz, 1989; Feng and Forgac, 1992a; Feng, Y., Forgac, 1994; Dschida and Bowman, 1995; Dietz et al., 2001; Tavakoli et al., 2001). Diese Art der Regulation ermöglicht eine kurzfristige und schnelle Regulation der V-ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von den metabolischen Anforderungen der pflanzlichen Zelle (Hager and Lanz, 1989; Dschida and Bowman, 1995; Merzendorfer et al., 1997; Dietz et al., 2001; Tavakoli et al., 2001; Nishi and Forgac, 2002). Es wird allerdings angenommen, dass die oxidative Herabregulierung der V-ATPase nur dann möglich ist, wenn das Cytosol nicht angesäuert ist, was auf eine dominante Funktion der Protonenpumpe in der cytosolischen pH-Homöostase hinweisen würde (Dietz et al., 2001). Die Relevanz der Redox-Regulation – im Allgemeinen und spezifisch für die verschiedenen Cysteinreste der VHA-A Untereinheit – für die V-ATPase-Aktivität bedarf in *A. thaliana* allerdings noch einer eingehenden Untersuchung (Seidel et al., 2012).

### 1.4.3 Die intrazelluläre pH-Homöostase

Da viele metabolische und enzymatische Prozesse von spezifischen pH-Bedingungen abhängen, ist die intrazelluläre pH-Regulation ein essentieller Prozess in allen Organismen (Casey et al., 2010; Orij et al., 2011; Pittman, 2012). Der pH-Wert liegt im Cytosol annähernd zwischen pH 7,2 und 7,5 und in der Vakuole in der Regel bei ca. pH 5,5 (Martinoia et al., 2007; Krebs et al., 2010; Pittman, 2012). Die cytosolische pH-Regulation kann grundsätzlich in zwei verschiedene Arten eingeteilt werden (Pittman, 2012). Beim Metabolismus-basierenden Prinzip wirken verschiedene Stoffwechselprodukte innerhalb der Zelle als pH-Puffer oder in pH-abhängigen Reaktionen. So verbraucht oder erzeugt zum Beispiel die Carboxylierung bzw. Decarboxylierung von organischen Säuren (z.B. Malat) freie Protonen (Pittman, 2012). Das zweite Prinzip basiert auf dem aktiven Membrantransport von Protonen zwischen dem Cytosol und dem sauren Apoplast oder der Vakuole durch die Plasmamembran-ATPase bzw. durch die V-PPase oder V-ATPase (Pittman, 2012). Die V-ATPase ist dadurch bei der Ansäuerung von Organellen des endozytotischen und sekretorischen Weges beteiligt und vermutlich auch in der Aufrechterhaltung des cytosolischen und vakuolären pH-Wertes involviert (Dettmer et al., 2006; Schumacher, 2006; Pittman, 2012). Neben den Protonenpumpen wirken aber auch eine größere Anzahl anderer Transportwege an der intrazellulären pH-Regulation mit (Pittman, 2012). Bei einem dieser Transportwege am Tonoplasten handelt es sich um den Dicarboxylattransporter AttdT, der Malat in die Vakuole liefert und damit wichtig für die pH-Regulation sein kann (Hurth et al., 2005; Martinoia et al., 2012; Pittman, 2012). Darüber hinaus gibt es starke Anhaltspunkte, dass im Endomembransystem die Protonen-gekoppelten Ionentransporter aufgrund ihres Protonenaustausches auch an der Feinabstimmung des pH-Wertes einen Anteil haben könnten (Martinoia et al., 2012; Pittman, 2012). Einer dieser Transporter ist NHX1. Er befördert sowohl Natrium als auch Kalium im Antiport gegen Protonen in die Vakuole, ist an der Kaliumhomöostase beteiligt, erhöht die Toleranz gegenüber Salzstress und spielt vermutlich auch bei der vakuolären pH-Regulation eine Rolle (Apse, 1999; Ape et al., 2003; Barragán et al., 2012; Martinoia et al., 2012; Pittman, 2012). In *Ipomoea tricolor* scheint NHX1 durch ein enges Zusammenspiel mit der V-ATPase und der V-PPase eine zu starke vakuoläre Alkalisierung während der Blütenöffnung und Änderung der Blütenfarbe zu verhindern (Yoshida et al., 2005; Pittman, 2012; Faraco et al., 2014). Da der  $K^+/H^+$ -Austausch

durch NHX bei einer potentiellen pH-Regulation intrazelluläre Kaliumkonzentrationen verändert und diese auch wieder ausgeglichen werden müssen, sind folglich auch die zur Kaliumhomöostase notwendigen Transportproteine indirekt an der Steuerung des pH-Wertes beteiligt (Pittman, 2012). Weitere mögliche Kandidaten, die ebenfalls sehr wahrscheinlich an der intrazellulären pH-Steuerung einen Anteil haben, sind in *A. thaliana* AtCHX16 bis AtCHX20, die vermutlich zu den  $K^+$ ,  $Na^+/H^+$ - Transportern gehören bzw. Kha1 (ebenfalls ein CHX-Transporter) aus *S. cerevisiae*, der den Austausch von  $K^+/H^+$  vermittelt (Brett et al., 2005; Maresova and Sychrova, 2005; Pittman, 2012). Allerdings ist ihre Funktion bei der pH-Homöostase nur rudimentär untersucht. Im Gegensatz zu den Kaliumtransportern scheinen die Calciumtransporter in der Vakuolenmembran (z.B. CAX) bei der pH-Homöostase keine direkte Rolle zu spielen (Pittman, 2012). Es ist allerdings bekannt, das Calcium aufgrund seiner Wirkung als *second messenger* eine indirekte Rolle bei der pH-Regulation zukommt (Felle, 2001; Pittman, 2012). Da es aufgrund der Protonenpumpenaktivität an der Vakuolenmembran zu einer elektrischen Feldebildung kommt, die einen weiteren Protonenimport aufgrund der Abstoßungskräfte irgendwann verhindert würde, bekommen die Anionentransporter deshalb eine besondere Bedeutung bei der pH-Regulation (Pittman, 2012). Der Import von Anionen als Gegenionen in die Vakuole verhindert die Ausbildung eines dem Protonentransport entgegengerichteten elektrischen Potentials und ermöglicht dadurch die Aufrechterhaltung der Protonenakkumulation und der luminalen Ansäuerung (Pittman, 2012). Hierbei könnten in Pflanzen vor allem die CLC-Transporter in der Vakuolenmembran in Frage kommen (Pittman, 2012). Über den Protonen-gekoppelten Ionentransport am Tonoplasten hinaus scheinen zum Beispiel aber auch angesäuerte Vesikel aus dem sekretorischen Weg zur vakuolären Ansäuerung beizutragen (Schumacher and Krebs, 2010). Obwohl es viele Anhaltspunkte für eine Teilnahme dieser Protonen-gekoppelten Ionentransporter an der pH-Homöostase gibt, ist es nach wie vor unklar, ob diese aktiv oder passiv in der pH-Regulation involviert sind (Pittman, 2012). Es ist auch unbekannt, ob es eine direkte Interaktion der vakuolären Protonenpumpen mit diesen Transportern gibt. Es gibt zwar mehrere Anhaltspunkte für eine indirekte Regulierung, zum Beispiel durch die Kinase CIPK24/SOS2, die sowohl NHX als auch die V-ATPase reguliert, aber auch hier besteht noch Aufklärungsbedarf (Pittman, 2012).

## 1.5 Zielsetzung

Die ATP-Hydrolyseenergie ermöglicht der V-ATPase durch den aktiven Protonentransport ins Vakuolenlumen und einer dadurch verursachten Potentialdifferenz die Etablierung und Aufrechterhaltung der luminalen Protonenkonzentration und eines damit verbundenen elektrochemischen Gradienten. Dadurch spielt die V-ATPase eine Schlüsselrolle bei der Bereitstellung von Energie für andere Transportproteine und der Regulation verschiedener intrazellulärer Prozesse (Martinoia et al., 2007, 2012; Pittman, 2012;).

Aufgrund der vielfältigen Aufgaben wird die Protonenpumpe daher auch durch verschiedene, komplexe Regulationsmechanismen in ihrer Aktivität gesteuert. Bislang sind allerdings einige dieser Mechanismen, insbesondere der Einfluss des pH-Wertes und der oxidativen Regulation verschiedener Aminosäurereste auf die V-ATPase-Aktivität im Detail in *A. thaliana* noch nicht hinreichend aufgeklärt worden.

Der erste Teil der hier vorliegenden Arbeit beschäftigte sich deshalb mit der elektrophysiologischen Untersuchung der pH-abhängigen Regulation und deren Auswirkung auf den maximalen Protonentransport ( $v_{max}$ ), die ATP-Affinität ( $K_m$ ) und die Protonenkopplungsrate der V-ATPase an isolierten Mesophyllvakuolen. Zusätzlich sollte die Redox-Regulation der V-ATPase-Pumpaktivität durch den Einsatz eines starken Oxidationsmittels und verschiedener V-ATPase-Cystein-Mutanten untersucht werden.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der elektrophysiologischen Untersuchung vakuolärer Membranleitfähigkeiten an intakten Wurzelrhizodermisvakuolen von *A. thaliana* Keimlingen. Aufgrund der physiologischen Bedeutung von Calcium als *second messenger* bei der Regulation von vakuolären Ionenkanalaktivitäten sollte durch die Kombination von intrazellulären Mikroelektroden und Fluoreszenz-Bildgebender-Technik der Einfluss von cytosolischen Calciumänderungen auf vakuoläre Leitfähigkeiten im intakten Pflanzensystem erforscht werden.

## 2.0 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenanzucht und Präparation von *Arabidopsis thaliana*

#### 2.1.1 Anzuchtbedingungen von *Arabidopsis thaliana* für Patch-Clamp-Experimente

*A. thaliana* Pflanzen vom Ökotyp Columbia (Col-0) wurden auf Glasmann Standard Pikiererde in Plastiktöpfen mit einem Durchmesser von 7 cm unter konstanten Bedingungen in einer Klimakammer angezogen. Während der 8-stündigen Lichtperiode herrschte eine konstante Temperatur von 22°C bei einer Lichtintensität von ca. 100  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  und ca. 60% Luftfeuchtigkeit. In der Dunkelphase wurde die Temperatur auf 16°C abgesenkt. Als Beleuchtung war in der Klimakammer eine Kombination aus Osram L58W/77 Fluora und Philips TLD 58W/840 Leuchtstoffröhren installiert. Die in dieser Arbeit zusätzlich verwendeten *A. thaliana* Mutanten (Tab. 2.1) wurden alle in der gleichen Klimakammer unter denselben Bedingungen angezogen. Das Alter der für die Patch-Clamp Experimente verwendeten Pflanzen variierte zwischen 4-8 Wochen (Tab. 2.1)

**Tabelle 2.1. Durchschnittliches Alter der für Patch-Clamp-Experimente verwendeten *A. thaliana* Pflanzen.**

Pflanzen	Alter
Wildtyp Col-0	4-8 Wochen
<i>tpc1-2</i> Col-0 SALK 145413	5-8 Wochen
<i>C256S</i>	5-7 Wochen
<i>C535S</i>	5-7 Wochen

### 2.1.2 Präparation der *Arabidopsis thaliana* Mesophyllprotoplasten

Zur Gewinnung der in den Patch-Clamp-Experimenten benötigten *A. thaliana* Mesophyllzellvakuolen mussten Mesophyllzellprotoplasten zuerst aus dem Zellverbund herausgelöst werden. Hierzu wurde bei abgeschnittenen *A. thaliana* Blättern zunächst die Blattunterseite mit Schleifpapier der Körnung P500 vorsichtig aufgeraut. Anschließend wurde das Blatt mit der Unterseite in eine mit 3 ml Standard-Enzymlösung (SEL1, Kap. 2.2.1.1) gefüllte Petrischale ( $\varnothing = 3,5$  cm, mit Nocken Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gelegt. Auf einem Schwenkautomaten (KS -15, E. Bühler GmbH) wurden die Blattstücke dann für 60 min bei 75 U/min und Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur Aufreinigung der Protoplasten wurde anschließend die Suspension mit Hilfe der Waschlösung SWL1 (Kap. 2.2.1.2) durch ein damit angefeuchtetes Nylonnetz (Maschenweite: 50  $\mu\text{m}$ ) filtriert und das Filtrat in einem 50 ml Probenröhrchen aufgefangen. Nach 10-minütiger Zentrifugation (Eppendorf 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 60 x  $g$  und 4°C (ohne Beschleunigung und Bremse) waren die Protoplasten am Boden des 50 ml Probenröhrchens angereichert. Nach Dekantieren des Überstands wurden die im Pellet verbliebenen Mesophyllzellprotoplasten abhängig von der Protoplastenmenge – die über die Grünfärbung visuell abgeschätzt wurde – mit 600  $\mu\text{l}$  bis 1000  $\mu\text{l}$  SWL1 resuspendiert. Die Protoplastensuspension wurde anschließend bis zur Verwendung für die Patch-Clamp-Experimente auf Eis aufbewahrt.

### 2.1.3 Vakuolenisolation aus *Arabidopsis thaliana* Mesophyllprotoplasten für Patch-Clamp-Experimente

Zu Beginn einer Patch-Clamp-Messung wurden 40 bis 100  $\mu\text{l}$  der Mesophyllzellprotoplastensuspension (abhängig von der jeweiligen Protoplastendichte) in die Messkammer vorgelegt. Zur Vakuolenfreisetzung wurden die Protoplasten anschließend über die Zugabe von ca. 400-500  $\mu\text{l}$  Standardlysispuffer (SLP1, Kap. 2.2.1.3) lysiert. Hierzu wurde die auf 200 mosmol  $\text{kg}^{-1}$  eingestellte SLP1-Lösung für die Lysis der Mesophyllprotoplasten von Col-0 und *tpc1-2*-Mutanten verwendet. Bei *C256S*-Mutanten wurden die Vakuolen hingegen mit einer SLP1-Lösung von 350 mosmol  $\text{kg}^{-1}$  und bei *C535S*-Mutanten mit einer SLP1-Lösung von 300 mosmol  $\text{kg}^{-1}$  freigesetzt. Aufgrund der im Vergleich zur Waschlösung niedrigeren

Osmolalität von SLP1 kam es zu einer osmotischen Wasseraufnahme in die Protoplasten, die letztendlich zu einem Platzen der Plasmamembran und Freisetzen der Vakuolen aus dem Protoplasten führte. Durch die Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und der Anwesenheit von 10 mM EGTA in der SLP1-Lösung wurde der Freisetzungsprozess der Vakuolen durch Destabilisierung der Plasmamembran weiter unterstützt. Da die freigesetzten Vakuolen am Glasboden der Messkammer nach einer 8-minütigen Ruhephase anhafteten, konnte anschließend SLP1 gegen die jeweilige Badmesslösung im Rahmen einer 8-minütigen Lösungspfusion ausgetauscht werden, um genau definierte Bedingungen für die geplanten Patch-Clamp-Experimente zu schaffen. Die Perfusionsgeschwindigkeit lag dabei zwischen 0,5 und 0,7 ml/min. Dieser Austausch war notwendig, da sich SLP1 aufgrund seiner Membranstabilisierenden Eigenschaften, seiner Osmolalität und seiner Zusammensetzung nicht für die Ausbildung eines Abdichtwiderstandes und für die weiteren Untersuchungen im Zuge der Patch-Clamp Experimente eignete.

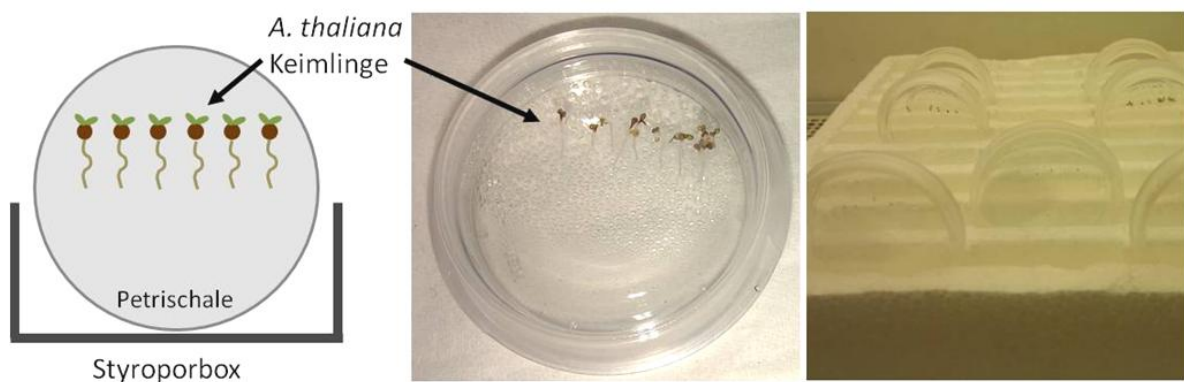
#### **2.1.4 Sterilisation und Aussaat von *Arabidopsis thaliana* für Experimente mit intrazellulären Mikroelektroden**

Eine Spatelspitze *A. thaliana* Samen wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Sterilisationlösung (STL1, Kap. 2.2.2.2) versetzt. Die Suspension wurde gut vermischt und nach 8-minütiger Absetzung der Samen wurde die STL1-Lösung entfernt. Im anschließenden Waschschrift wurde 1 ml steriles, destilliertes Wasser hinzugefügt, die Suspension vermischt und der Überstand nach einer 2-minütigen Sedimentation wieder entfernt. Dieser Reinigungsschrift wurde noch viermal wiederholt. Nach Dekantieren des Überstands beim letzten Reinigungsschrift wurden die Samen in sterile Petrischalen ( $\varnothing = 3,5$  cm, mit Nocken, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) ausgesät, die mit 1 ml Nährmedium ( $\frac{1}{4}$  MS, Kap. 2.2.2.1) vorher aufgefüllt wurden. Dabei wurden fünf bis sieben einzelne Samen in einer Reihe auf das feste Medium aufgetragen (Abb. 2.1). Die Petrischalen wurden abschließend mit Parafilm gegen Feuchtigkeitsverlust versiegelt.



### 2.1.5 Anzuchtbedingungen von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen für Experimente mit intrazellulären Mikroelektroden

Petrischalen mit sterilen *A. thaliana* Samen (Kap. 2.1.4) wurden hochkant in einem Phytotron unter konstanten Bedingungen angezogen, so dass die Samenreihe parallel zum Boden stand und die Wurzeln entlang der Oberfläche der Agaroseschicht nach unten wachsen konnten (Abb. 2.1). Während der 12-stündigen Lichtperiode herrschte im Phytotron eine konstante Temperatur zwischen 21 und 22°C bei einer Lichtmenge von 190-200  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ . In der Dunkelphase wurde die Temperatur auf 16 bis 17°C abgesenkt. Die Anzuchtdauer betrug – je nach Entwicklungsstand der *A. thaliana* Wurzeln – drei bis fünf Tage.



**Abbildung 2.1.** Anzucht der *A. thaliana* Keimlinge für Einstich-Experimente im Phytotron. Links: Schematische Darstellung der *A. thaliana* Keimlinge in einer Petrischale. Das mittlere Foto zeigt die Rückseite einer Petrischale mit 3 Tage alten Keimlingen. Rechts abgebildet: Mehrere hochkant ausgerichtete Petrischalen in einer Styroporbox.

### 2.2 Herstellung der verwendeten Lösungen

Zur Herstellung der Lösungen (Kap. 2.2.1 und 2.2.2) wurden die verschiedenen Bestandteile inklusive der pH-Puffersubstanz eingewogen und in destilliertem Wasser mit einem Volumen nahe dem gewünschten Endvolumen gelöst. Der pH-Wert wurde durch Titration der Lösung mit dem jeweiligen Puffer-Antagonisten unter konstantem Rühren eingestellt. Dazu wurden ein Digital-pH-Meter 646 oder ein 766 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co.KG Berlin, Deutschland) verwendet. Die Osmolalität der verwendeten Patch-Clamp-

Messlösungen in Kapitel 2.2.1 wurde mit Hilfe eines Osmometers (Vapor Pressure Osmometer 5520, Wescor, Vapro) mit D-Sorbitol eingestellt und schließlich das Endvolumen mit destilliertem Wasser hergestellt. Bei den in Kapitel 2.2.2 aufgeführten Lösungen für die Experimente mit intrazellulären Mikroelektroden war es nicht notwendig die Osmolalität separat einzustellen. Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

## **2.2.1 Lösungen für Patch-Clamp-Experimente**

### **2.2.1.1 Standard-Enzymlösung zur Vakuolenisolation (SEL1)**

1 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM Mes/Tris pH 5,6

1% BSA

0,05% Pectolyase Y23 (Kyowa Chemical Products CO., LTD, Japan)

0,5% Cellulase R-10 (Yakult Honsha CO., LTD, Japan)

0,5% Mazerozym R-10 (Yakult Honsha CO., LTD, Japan)

$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$

Die Enzymlösung wurde unter konstanter Kühlung auf Eis hergestellt und die Bestandteile in der oben beschriebenen Reihenfolge eingewogen.

### 2.2.1.2 Standard-Waschlösung zur Vakuolenisolation (SWL1)

1 mM CaCl<sub>2</sub>

$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$

Bei SWL1 entsprach der pH-Wert dem von destilliertem Wasser und wurde nicht mit einem Puffersystem eingestellt.

### 2.2.1.3 Standard-Lysispuffer zur Vakuolenisolation (SLP1)

10 mM EGTA

10 mM Hepes/Tris pH 7,5

$\pi = 200, 300 \text{ oder } 350 \text{ mosmol kg}^{-1}$

### 2.2.1.4 Bad- und Pipettenmesslösungen zur Untersuchung der pH-abhängigen V-ATPase-Aktivität

#### Standardbadlösung 1

##### (SBL1-pH 7,5)

100 mM KCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM Hepes/Tris pH 7,5

$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$

#### Standardbadlösung 2

##### (SBL2-pH 5,5)

100 mM KCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM Mes/Tris pH 5,5

$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$

#### Standardbadlösung 3

##### (SBL3-pH 9,5)

100 mM KCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM Bis-Tris-Propan/  
Mes pH 9,5

$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$

<b><u>Standardpipettenlösung 1</u></b> <b><u>(SPL1-pH 7,5)</u></b>	<b><u>Standardpipettenlösung 2</u></b> <b><u>(SPL2-pH 5,5)</u></b>	<b><u>Standardpipettenlösung 3</u></b> <b><u>(SPL3-pH 9,5)</u></b>
100 mM KCl	100 mM KCl	100 mM KCl
5 mM MgCl <sub>2</sub>	5 mM MgCl <sub>2</sub>	5 mM MgCl <sub>2</sub>
1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	10 mM Mes/Tris pH 5,5	10 mM Bis-Tris-Propan/ Mes pH 9,5
$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$

### 2.2.1.5 Bad- und Pipettenmesslösungen zur Untersuchung der V-ATPase-Spannungsabhängigkeit

#### **Standardbadlösung 4 (SBL4/CsCl-pH 7,5)**

50 mM CsCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Hepes/Tris pH 7,5  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$

#### **Standardpipettenlösung 4** **(SPL4/CsCl-pH 7,5)**

50 mM CsCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Hepes/Tris pH 7,5  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$

#### **Standardpipettenlösung 5** **(SPL5/CsCl-pH 6,5)**

50 mM CsCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Hepes/Tris pH 6,5  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$

#### **Standardpipettenlösung 6** **(SPL6/CsCl-pH 5,5)**

50 mM CsCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Mes/Tris pH 5,5  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$

### **2.2.1.6 Bad- und Pipettenmesslösungen zur Untersuchung der V-ATPase-Aktivität in Anwesenheit eines Oxidationsmittels**

Zur elektrophysiologischen Untersuchung der Redox-Abhängigkeit der V-ATPase wurde die Standardbadlösung 1 (SBL1-pH 7,5; Kap. 2.2.1.4) und die Standardpipettenlösung 2 (SPL2-pH 5,5; Kap. 2.2.1.4) verwendet. Für die Messungen an den *A. thaliana* Redox-Mutantenlinien C535S und C256S wurde lediglich die Osmolalität der Bad- und Pipettenmesslösungen auf 350 mosmol kg<sup>-1</sup> (C535S) bzw. auf 300 oder 350 mosmol kg<sup>-1</sup> für C256S eingestellt.

### **2.2.1.7 Applikationspipettenlösungen**

Für die Herstellung der Applikationspipettenlösungen wurden immer kleine Mengen (5-10 ml) der originalen Standardbadlösungen verwendet und entsprechend ihrem Verwendungszweck mit zusätzlichem Magnesium-ATP (Mg-ATP), Bafilomycin A1 (BF) oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entsprechend den jeweils gewünschten Endkonzentrationen (Kap. 3.1) zugesetzt. Um Änderungen des pH-Wertes aufgrund der zugegebenen Stoffe auszuschließen, wurde dieser nochmals überprüft und gegebenenfalls mit dem entsprechenden Puffersystem neu eingestellt. Die hergestellten Applikationslösungen wurden zwischen den Patch-Clamp-Messungen immer auf Eis und im Dunkeln aufbewahrt, um Zerfallsprozesse der Zusatzstoffe (Mg-ATP, BF, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zu verhindern.

#### **Magnesium-ATP:**

Zur Herstellung der unterschiedlich konzentrierten ATP-Applikationslösungen wurde jeweils Mg-ATP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland) aus einer 0,5 M Stammlösung (0,5 M Mg-ATP + 0,5 M oder 1 M Tris) entnommen und den jeweiligen Badlösungen (SBL1-pH 7,5; SBL2-pH 5,5; SBL3-pH 9,5; SBL4/CsCl-pH 7,5) in entsprechender Konzentration zugesetzt.

**Bafilomycin A1:**

Zur Hemmung der V-ATPase Aktivität wurde der spezifische Inhibitor BF (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland) in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und eine 1 mM Stocklösung hergestellt. Als Endkonzentration wurde 500 nM BF in SBL1-pH 7,5 verwendet.

**Wasserstoffperoxid:**

Für die täglich frische Herstellung der 1 M Stocklösung wurde 30%iges Wasserstoffperoxid (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) verwendet. Um eine konstante Ionen- und ATP-Konzentration während der Messreihen zu gewährleisten, wurde eine Stocklösung aus SBL1-pH 7,5 mit 5 mM Mg-ATP erstellt, der dann 1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stocklösung zur Einstellung der Endkonzentration von 2 mM zugegeben wurde.

**2.2.2 Lösungen für Experimente mit intrazellulären Mikroelektroden und der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme**

**2.2.2.1 Standard Agar-Nährmedium für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen**

**Murashige and Skoog basal salt mixture (¼ MS)**

0,12% MS Basal salt mixture inkl. Mes Puffer      Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)

0,5% Saccharose

0,8% Universal Agarose      (Bio&Sell, e.K, Nürnberg, Deutschland)

pH 5.8 mit Tris eingestellt

### **2.2.2.2 Sterilisierungslösung für *Arabidopsis thaliana* Samen (STL1)**

6% Natriumhypochlorid

0,05% TritonX-100

(Natriumhypochlorid und TritonX-100 wurden in jeweils 50 ml Wasser gelöst)

### **2.2.2.3 Badlösung für die Experimente mit intrazellulären Mikroelektroden**

#### **Standardbadlösung 5 (SBL5-0.1KCl pH7)**

0,1 mM KCl

0,1 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM CaCl<sub>2</sub>

0,5 mM NaCl

1 mM Mops/NaOH pH 7,0

## **2.3 Die Einstich-Technik von intrazellulären Mikroelektroden**

Bei der konventionellen Mikroelektroden-Einstich-Technik wird eine spitze Glasmikroelektrode, die entweder aus einer (*single-barreled*) oder mehreren Kapillaren (*double- oder triple-barreled*) besteht, in das pflanzliche Gewebe eingestochen. Bei dieser Technik kann an separierten Pflanzenteilen oder auch an kompletten, intakten Pflanzen gearbeitet werden. Die relativ scharfe Glasspitze der Mikroelektroden kann – je nach experimenteller Aufgabenstellung – durch die Zellwand und Plasmamembran in das Cytosol oder zusätzlich durch die Vakuolenmembran in das Vakuolenlumen eingestochen werden. In Kombination mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Kap. 2.3.2) können dann elektrophysiologische Untersuchungen zu den Membranleitfähigkeiten an Plasma- und Vakuolenmembran durchgeführt werden. Die Verwendung von ionensensitiven Farbstoffen (z.B. FURA-2) ermöglicht zudem die Untersuchung von intrazellulären physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel cytosolische Calciumänderungen.

### 2.3.1 Anwendung der Einstich-Technik von intrazellulären Mikroelektroden bei intakten *Arabidopsis thaliana* Wurzeln

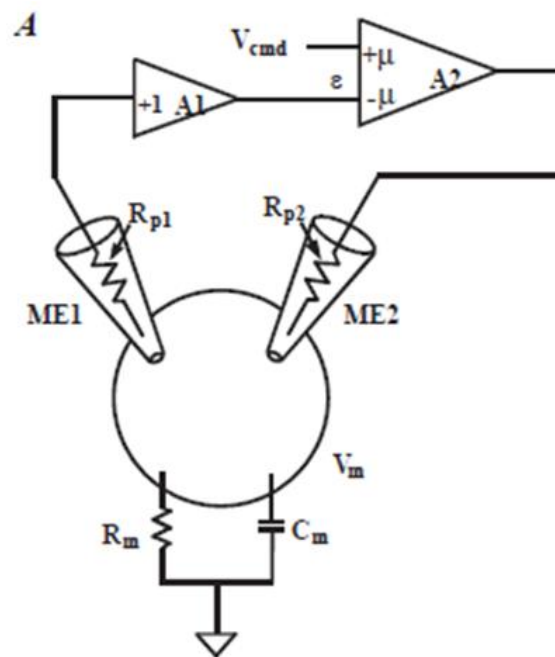
In dieser Arbeit wurden *single*- und *double-barreled* Glaspipetten in das Cytosol oder die Vakuole von intakten *A. thaliana* Wurzelrhizodermiszellen eingeführt. Die Wurzeln wurden hierzu in Petrischalen auf Agar unter sterilen Bedingungen angezogen (Kap. 2.1.5). Vor dem Beginn der Experimente wurde mit einer Zange die Hälfte des Petrischalenrandes entfernt, um einen flachen Einstichwinkel zu ermöglichen. Anschließend wurde eine zweikapillare Glasmikroelektrode mit Hilfe eines piezoelektrischen Manipulators (MM3A-Mikromanipulator, Kleindiek Nanotechnik, Reutlingen, Deutschland) in die Vakuole von Wurzelrhizodermiszellen eingestochen und die vakuoläre Lokalisation entweder mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 (Kap. 2.3.5) oder durch Messungen von freilaufenden Potentialen in der Spannungsklemmen-Konfiguration überprüft. Bei parallelen Messungen der cytosolischen Calciumkonzentrationen wurde eine zusätzliche *single-barreled* Glaspipette in das Cytosol eingeführt, dessen cytosolische Lokalisation anhand des Fluoreszenzsignals kontrolliert wurde.

### 2.3.2 Messprinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik

Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik wird das Membranpotential bei einer bestimmten Spannung konstant gehalten und korrespondierende Membranleitfähigkeiten aufgezeichnet. Hierzu werden auftretende Abweichungen von der vorgegebenen Sollspannung ( $V_{cmd}$ ) gemessen und gegebenenfalls ein Kompensationsstrom injiziert (Abb. 2.2), bis die gewünschte Sollspannung wieder erreicht wird (The Axon Guide, 2008). Beim Einstich einer *double-barreled* Mikroelektrode – wobei jede Kapillare für sich einer einzelnen Elektrode entspricht – wird das Membranpotential ( $V_m$ ) durch eine Messelektrode (ME1) mit dem Widerstand  $R_{p1}$  gemessen und über den Vorverstärker A1 an den ersten Eingang des Differentialverstärker A2 (mit dem Verstärkungsfaktor  $-\mu$ ) weitergegeben. Am zweiten Eingang von A2 (mit dem Verstärkungsfaktor  $+\mu$ ) wird die vorgegebene  $V_{cmd}$  angelegt. Wenn  $V_{cmd}$  von  $V_m$  abweicht, entsteht am Ausgang von A2 eine Spannung, die proportional zur Differenz ( $\epsilon$ ) von  $V_{cmd}$  und  $V_m$  ist (The Axon Guide, 2008). Dadurch wird ein



ausgleichender Kompensationsstrom durch die zweite Messelektrode (ME2) mit dem Widerstand  $R_{p2}$  in die Zelle injiziert (The Axon Guide, 2008). Dieser Stromfluss wird solange aufrechterhalten, bis der Wert von  $V_m$  dem eingestellten Wert von  $V_{cmd}$  entspricht. Für die Aufzeichnung von freilaufenden Potentialen wurden Elektroden im Stromklemmen-Modus verwendet, dabei wird der Strom der Elektroden auf 0 nA festgesetzt („geklemmt“) und die Potentiale gemessen.



**Abbildung 2.2. Einfache schematische Darstellung eines Schaltbildes der Zwei-Elektroden Spannungsklemme.** A1: Vorverstärker,  $V_{cmd}$ : Sollspannung, A2: Differentialverstärker,  $+/-\mu$ : Verstärkungsfaktor,  $\epsilon$ : Differenz von  $V_{cmd}$  und  $V_m$ , ME1: Messelektrode mit dazu gehörigem Widerstand  $R_{p1}$ , ME2: Messelektrode mit dazu gehörigem Widerstand  $R_{p2}$ ,  $V_m$ : Membranpotential,  $C_m$ : Membrankapazität,  $R_m$ : Membranwiderstand (Axon Instruments Inc., 2008, mit freundlicher Genehmigung von Molecular Devices, LLC)

### 2.3.3 Aufbau des Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Messplatzes

Der Messplatz war zur Abschirmung vor äußeren, systemunabhängigen elektromagnetischen Induktionen von einem Faradaykäfig umgeben. Im Inneren war ein schwingungsgedämpfter Tisch aufgestellt, auf dem ein Zeiss Axioskop 2FS Mikroskop (Carl Zeiss AG, Deutschland) mit einer Quantem 512SC Kamera und einem *CARV2 confocal imager* (Visitron Systems GmbH,

Puchheim, Deutschland) und einem 63x Wasser-Immersionsobjektiv zur Detektion von fluoreszierenden Farbstoffen befestigt war. Die Anregung der Farbstoffe wurde mit einem Visichrom Polychromator (High Speed Polychromatic Illumination System, Visitron Systems GmbH, Deutschland) vorgenommen. Um externe Badlösungen während der Messung austauschen zu können, wurde ein Gravitations-getriebenes Perfusionssystem bestehend aus einem Zulauf (ca. 6 ml/min) und einer Pumpe zur Flüssigkeitsabsaugung verwendet. Der Einstich der Mikroelektroden in pflanzliches Gewebe erfolgte mit zwei piezoelektrischen Manipulatoren (MM3A, Kleindiek Nanotechnik, Reutlingen, Deutschland), die über Magnethalterungen auf dem Mikroskop-Kreuztisch fixiert waren. Die Mikroelektroden, die an den Mikromanipulatoren befestigt waren, wurden mit drei in unmittelbarer Nähe angebrachten Vorverstärkern (HS-180, Bio-Logic, Claix, Frankreich, Eingangswiderstand ca.  $10^{11} \Omega$ ) verbunden. Die beiden Vorverstärker, die für die Strom-Spannungsklemme genutzt wurden, waren an einen Kombinations-Mikroelektrodenverstärker (VF-102 Dual microelectrode amplifier + CA-100 Clamp amplifier, Bio-Logic, Claix, Frankreich) angeschlossen. Zur Schließung des Stromkreises wurde eine Silber-/Silberchlorid-Referenzelektrode mit Kontakt zur Badlösung angebracht. Die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 bzw. die Messung der Plasmamembranpotentiale unter Zuhilfenahme einer *single-barreled* Elektrode wurde mit dem dritten Vorverstärker und einem baugleichen Nachbau des VF-102 Mikroelektrodenverstärkers vorgenommen. Die elektrischen Eingangssignale wurden bei 33 Hz mit einem 8-Pol Tiefpass-Bessel-Filter (Type 902, Frequency Devices, Haverhill, MA, USA) bzw. mit einem 4-Pol Tiefpass-Bessel-Filter (LPF 202A, Warner Instruments Corp., Hamden, CT, USA) bei 200 Hz gefiltert und über einen Analog/Digital-Wandler (DA/AD-Wandler LIH-1600, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) an einen Microsoft-Windows-Computer übertragen. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der Software HEKA Pulse Version 8.74 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland). Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem separaten zweiten Microsoft-Windows-Computer und der Software VisiView Version 2.0.4 (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) vorgenommen. Die Steuerungseinheit der piezoelektrischen Manipulatoren, beide Computer, die Filter, der Analog/Digital Wandler, die Verstärker, die Absaugpumpe des Perfusionssystems und die Steuerungseinheit der Kamera, sowie das Netzteil der Mikroskoplampe waren außerhalb des Faradaykäfigs angebracht.

### 2.3.4 Herstellung von Einstich- und Referenzelektroden

Die verwendeten *single-* und *double-barreled* Messelektroden sowie die Referenzelektrode wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1 mm und einer Wandstärke von 0,21 mm (Hilgenberg GmbH, Mahlsfeld, Deutschland) angefertigt. In den Glaskapillaren war zusätzlich ein durchgehendes 0,1 mm dickes Glasfilament angebracht. Die Herstellung der *single-barreled* Pipetten erfolgte in einem horizontalen Pipettenziehgerät (P-2000, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA). Dazu wurde eine einzelne Glaskapillare in der entsprechenden Halterung des Ziehgeräts eingespannt. Während der Erhitzung der Kapillare durch einen Laserstrahl wurde diese dann durch eine Zugvorrichtung auseinandergezogen, so dass zwei separate, zugespitzte Einstich-Glasmikroelektroden mit einem Widerstand von 60 bis 100 M $\Omega$  entstanden. Zur Herstellung der *double-barreled* Messpipetten wurden zwei Borosilikat-Glaskapillaren nebeneinander angeordnet, in einem vertikalen Pipettenziehgerät (List-Medical L/M-3P-A, List-Electronic, Darmstadt, Deutschland) unter Hitzeeinwirkung miteinander um 360° verdrillt und anschließend ca. 4 mm auseinandergezogen. Im folgenden Schritt wurden die Kapillaren dann im vertikalen Ziehgerät P-2000 zu spitzen Pipetten vollständig auseinandergezogen und staubfrei in einer Kunststoffbox gelagert. Die *double-barreled* Pipetten hatten einen Widerstand zwischen ca. 120 und 190 M $\Omega$ . Die zweikapillarigen Pipetten wurden vor der Verwendung mit 300 mM KCl luftblasenfrei gefüllt. Die einkapillarigen Glaspipetten wurden bei der Verwendung als Injektionspipette für den Fluoreszenzfarbstoff FURA-2 (Kap. 3.2) zuerst mit ca. 0,5  $\mu$ l 20 mM FURA-2 und anschließend mit 300 mM KCl aufgefüllt. Als Messpipette für freilaufende Membranpotentiale wurden die einkapillarigen Glaspipetten nur mit 300 mM KCl gefüllt. Die Referenzelektrode bestand aus einer einzelnen, an einem Ende gebogenen Borosilikat-Glaskapillare, die mit 300 mM KCl gefüllt wurde und deren Lösungs-zugewandtes Ende mit einem Agarosepropfen (2% Agarose und 300 mM KCl) verschlossen wurde. Die Agarosebrücke verhinderte dabei den Austritt der 300 mM KCl-Lösung und zytotoxischer Silberionen. Für die Verbindung der Einstichpipetten und der Referenzelektrode mit den Vorverstärkern bzw. der Erdung wurden sogenannte Silber-/Silberchlorid-Halbzellen verwendet. Diese bestanden aus einem ca. 2 cm langem Polyvinylschlauch, in dem ein ca. 3 cm langer Silberdraht mit Zweikomponentenkleber fixiert wurde. Die beiden überstehenden Enden des Silberdrahtes wurden auf der einen Seite mit einem Kupferdraht

und Stecker verbunden und auf der anderen Seite mit 0,5 M KCl chloriert (Kap. 2.4.5). Das chlorierte Silberdrahtende wurde über das offene Ende in die Elektrolytlösung der Messpipetten und der Referenzelektrode gesteckt. Anschließend wurden die Elektroden mit den Vorverstärkern bzw. der Erdung verbunden.

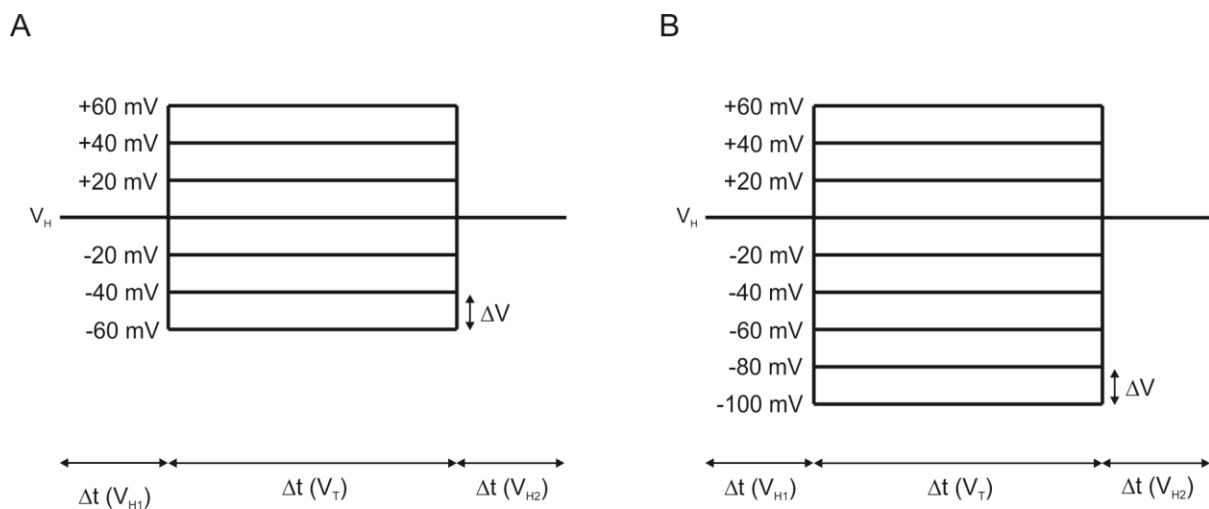
### **2.3.5 Calcium-Bildgebungsverfahren unter Verwendung des calciumsensitiven Farbstoffs FURA-2**

In dieser Arbeit wurden Änderungen des cytosolischen Calciumlevels in intakten *A. thaliana* Wurzelhaarzellen und ihre Auswirkungen auf vakuoläre Ionenkanäle mit Hilfe des calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 untersucht. Der Farbstoff wurde von Gryniewicz et al. (1985) entwickelt und löste den bisherigen zur Calciumdetektion überwiegend verwendeten Fluoreszenzfarbstoff Quin2 ab. FURA-2 zeichnet sich vor allem durch eine sehr viel höhere Fluoreszenz, eine sehr viele bessere Calciumselektivität und eine geringfügig niedrigere Calciumaffinität aus (Gryniewicz et al. 1985). Die Bindung von Calcium an das FURA-2-Molekül führt zu einem Chelatkomplex, welche eine Verschiebung der Wellenlänge des Absorptionsmaximum-Verhältnisses von 362 nm zu 335 nm bewirkt, während das Maximum der Emissionswellenlänge bei 510 nm nahezu unverändert bleibt. Durch eine abwechselnde Anregung bei 345 nm und 390 nm kann anhand der Absorptionskoeffizienten die Calciumkonzentration bestimmt werden. FURA-2-basierte Messungen sind unabhängig von Zellwanddicke und Farbstoffkonzentration und weniger anfällig für z.B. Ausbleichen oder Streulicht (Gryniewicz et al., 1985; Tsien, 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff FURA-2 in die zu untersuchenden Zellen mittels der eingestochenen *single-barreled* Elektrode durch einen angelegten negativen Beladungsstrom ( $I_{\text{inject}}$ ) von -1 nA injiziert. Die Aufzeichnung der FURA-2-Fluoreszenz wurde mit einer QuantEM 512SC Kamera und einem *CARV2 confocal imager* (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) durchgeführt (Kap. 2.3.3). Da die Charakterisierung der cytosolischen Calciumänderungen in Trichoblasten ohne eine Kalibrierung der minimalen und maximalen Calciumkonzentrationen vorgenommen wurde, konnten keine absoluten, sondern nur relative cytosolische Calciumänderungen erfasst werden.

### 2.3.6 Spannungsprotokolle und Datenanalyse der Einstich-Experimente

Zur elektrophysiologischen Untersuchung der vakuolären Membranleitfähigkeiten und Membranpotentiale in intakten *A. thaliana* Wurzelhaarzellen wurden verschiedene Strom-Spannungspulsprotokolle verwendet. Zur Aufzeichnung der freilaufenden intrazellulären Potentiale wurde im Stromklemmenmodus der Strom auf null geklemmt. Um vor allem die bis dato unbekanntenen Membranleitfähigkeiten in der Vakuolenmembran von intakten Wurzelhaarzellen zu untersuchen, wurden die in Abbildung 2.3 gezeigten Spannungspulsprotokolle im Spannungsklemmenmodus eingesetzt.



**Abbildung 2.3. Spannungspulsprotokolle für Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Experimente an intakten Wurzelrhizodermiszellen.**  $V_{H1}$  und  $V_{H2}$  = Haltespannungen,  $V_T$  = Testspannung,  $\Delta t(V_{H1/H2})$  = Zeitraum der applizierten Haltespannungen  $V_{H1}$  bzw.  $V_{H2}$ ,  $\Delta t(V_T)$  = Zeit der applizierten Testspannung.

Dabei wurden verschiedene Testspannungen ( $V_T$ ) im Bereich von +60 mV bis -60 bzw. -100 mV (nach der Vorzeichenkonvention für Endomembranen (Bertl et al., 1992) relativ zur Haltespannung ( $V_{H1}$ ) in konstanten Spannungsschritten von 20 mV ( $\Delta V$ ) sukzessive angelegt (Kap. 3.2.2 und 3.2.3). Im Anschluss an die jeweiligen Testspannungen wurde wieder zur Haltespannung ( $V_{H2}$ ) zurück gesprungen. Die Spannungen ( $V_{H1/H2/T}$ ) wurden in den vorliegenden Experimenten jeweils über einen Zeitraum  $\Delta t(V_{H1})$ ,  $\Delta t(V_{H2})$  bzw.  $\Delta t(V_T)$  von 2 s appliziert. Die Aufbereitung der elektrophysiologischen Rohdaten wurde mit der Software HEKA Pulse Version 8.74 und Patchmaster 2.0 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden vakuolären Membranleitfähigkeiten

und Spannungen nach der Konvention für Endomembranen aufgetragen (Bertl et al., 1992). Bei der Datenauswertung wurde zwischen instantanen und *steady-state* Stromantworten unterschieden. Die instantanen Stromamplituden wurden zu Beginn des Spannungstestpulses, d.h. zu einem Zeitpunkt zwischen 3-6% der Testpulslaufzeit  $\Delta t(V_T)$ , aus den aufgezeichneten Datenpunkten ermittelt (Abb.2.3). Die *steady-state*-Ströme wurden hingegen aus den aufgezeichneten Datenpunkten zum Ende des Testspannungspulses zu einem Zeitpunkt zwischen 97-99% der gesamten Testspannungspuls-Laufzeit  $\Delta t(V_T)$ , bestimmt (Abb.2.3). Die weiterführende Datenanalyse wurde anhand der Software Igor Pro 6.0 (Wave Metrics, Inc., Oregon, USA) vorgenommen.

Die Rohdaten der Fluoreszenzaufnahmen wurden mit der Software VisiView (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) und Microsoft Excel bearbeitet. Für die Analyse der FURA-2-Messungen wurde anschließend die Hintergrundfluoreszenz des unbehandelten Wurzelgewebes (345 nm Hintergrund) von der Fluoreszenz der untersuchten Zellen (345 nm  $\text{Ca}^{2+}$  Wurzelzelle) abgezogen und durch die entsprechenden jeweiligen Wellenlängen von 390 nm (390 nm  $\text{Ca}^{2+}$  Wurzelzelle, 390 nm Hintergrund) dividiert:

$$\text{FURA-2 Ratio} = \frac{345 \text{ nm } (\text{Ca}^{2+} \text{ Wurzelzelle}) - 345 \text{ nm } (\text{Hintergrund})}{390 \text{ nm } (\text{Ca}^{2+} \text{ Wurzelzelle}) - 390 \text{ nm } (\text{Hintergrund})}$$

Demzufolge kann das Verhältnis der beiden Wellenlängen zur Quantifizierung relativer  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen genutzt werden. Ein Anstieg der FURA-2-Ratio repräsentiert somit eine Zunahme im Calciumspiegel, während eine Ratio-Verringerung folglich einem Rückgang im Calciumlevel entspricht. Die weiterführende Analysen wurde dann mit der Software Igor Pro 6.0 (Wave Metrics, Inc., Oregon, USA) vorgenommen.

## 2.4 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann 1976 zur elektrischen Ableitung von Einzelkanalströmen an biologischen Zellmembranen entwickelt (Hedrich and Schroeder, 1989; Numberger and Draguhn, 1996). Der wesentliche Fortschritt dieser Technik bestand darin, dass die bis dahin sehr großen Hintergrundströme bei elektrophysiologischen Messungen an Frosch-Muskelfasern stark reduziert werden konnten. Damit war es zum

ersten Mal möglich, auch Einzelkanalströme von Ionenkanälen in kleinen Membranarealen *in vivo* aufzuzeichnen (Neher and Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981). Erwin Neher und Bert Sakmann wurden für ihre wegweisende Innovation 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet. Die Patch-Clamp-Technik wird nicht nur bei tierischen Zellen angewendet, sondern dient unter anderem auch bei pflanzlichen Membranen der elektrophysiologischen Charakterisierung von aktiven und passiven Membran-Transportprozessen (Hedrich and Neher, 1987; Hedrich et al., 1989; Hedrich and Schroeder, 1989; Schulz et al., 2011; Hedrich, 2012; Rienmüller et al., 2012).

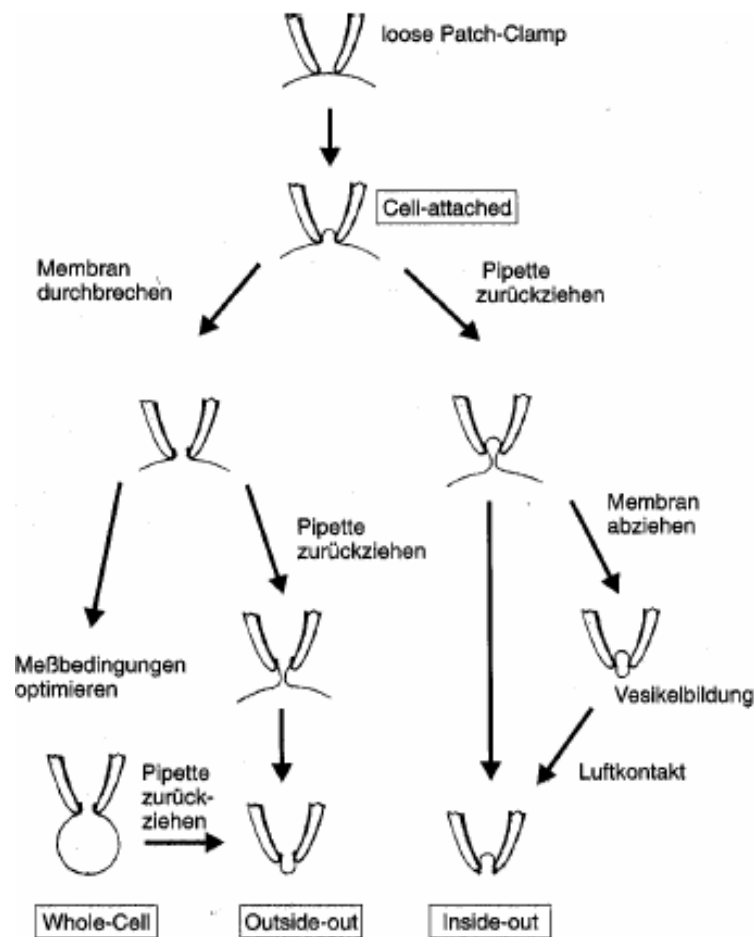
### 2.4.1 Anwendung der Patch-Clamp-Technik

Bei der Patch-Clamp-Technik wird eine Glasmikroelektrode mit einem Spitzendurchmesser von 0,5 bis 2  $\mu\text{m}$  unter Zuhilfenahme eines Mikromanipulators und eines Mikroskops auf die saubere und frei zugängliche Membran einer Zelle, eines Protoplasten oder eines inneren Kompartiments wie der Vakuole aufgesetzt (Abb.2.4). Da an den Grenzschichten zwischen Pipetten- und Badlösung bzw. Badlösung und chlorierten Drähten unterschiedliche Potentiale entstehen, müssen diese sogenannten *Offsetpotentiale* nach dem Eintauchen der Glaspipette in das Badmedium und vor dem Aufsetzen auf die Membran am Verstärker kompensiert werden. So wird gewährleistet, dass während der Messung das eingestellte Kommandopotential wirklich an der Membran anliegt und nicht durch zusätzliche Potentiale verfälscht wird (Numberger and Draguhn, 1996). Erst dann kann durch das Aufsetzen der Glasmikroelektrode und die Anlagerung der Membran an die Glaspipette ein elektrischer Widerstand in der Größenordnung von mehreren Megaohm ( $\text{M}\Omega$ ) zwischen Glaspipette und Membran aufgebaut werden. Zur weiteren Minimierung der störenden Hintergrundströme wird der Abdichtwiderstand zwischen Glaspipette und Membran auf mehrere Gigaohm ( $\text{G}\Omega$ ) erhöht, indem ein Unterdruck über die Glaspipette auf die Membran manuell behutsam appliziert wird (Neher and Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981; Neher and Sakmann, 1992; Numberger and Draguhn, 1996). Wird die Patch-Clamp-Technik an Vakuolen eingesetzt, dann kann die Einstellung eines Gigaohm-Abdichtwiderstandes – wie in der vorliegenden Arbeit – durch die Verwendung des hydrophilen Reagenz Sigmacote® (Kap. 2.4.6) erleichtert werden. Die Ausbildung des Abdichtwiderstandes wird mithilfe eines angelegten Rechteck-

spannungspulses ( $\pm 10$  mV für 10 ms) anhand der korrespondierenden Stromantwort mit der Patch-Clamp-Software überwacht. Der Vorzeichenwechsel der Rechteckspannung verursacht dabei kapazitive Auf- und Entladungsströme an allen Oberflächen, die mit dem Stromkreislauf verbunden sind (z.B. Pipettenspitze und Messkammerboden). Aufgrund deren schneller kapazitiver Eigenschaften ( $C_{fast}$ ) werden beim Vorzeichenwechsel transiente, exponentiell abnehmende Stromspitzen beobachtet. Zusätzlich kommt es durch die Rechteckspannung zu kleinen, langsam relaxierenden kapazitiven Strömen auf Grund von Auf- und Entladungsprozessen am Membranfleck unter der Pipettenöffnung, die zu diesem Zeitpunkt aber in der Regel von den  $C_{fast}$ -abhängigen Umladeströmen überlagert werden. Mit dem Einstellen des Gigaohm-Abdichtwiderstandes liegt dann die sogenannte *cell-attached* Messkonfiguration vor (Abb. 2.4), in der die schnellen kapazitiven Ströme am Patch-Clamp-Verstärker kompensiert werden müssen. In der *cell-attached* Konfiguration bleibt die gesamte Membran intakt und damit die ursprüngliche zelluläre bzw. luminale Komposition inklusive der Regulationsfaktoren und Ionenkonzentrationen erhalten. Nach Kompensation der schnellen Kapazitäten können Ionenkanalfluktuationen innerhalb des Membranflecks (dem sogenannten *patch*) in der Glaspipettenspitze unter dem Einfluss eines unbekanntes, aber intakten inneren Milieus aufgezeichnet und untersucht werden. Die *cell-attached* Konfiguration dient ferner als Ausgangspunkt für drei weitere Messkonfigurationen. Wird der *patch* mit Hilfe der Glaspipette vorsichtig aus der Plasmamembran herausgelöst und bleibt dabei der Gigaohm-Abdichtwiderstand erhalten, erreicht man die *inside-out* Konfiguration (Abb. 2.4). Diese Membrananordnung ermöglicht die Untersuchung von Einzelkanalereignissen, bei denen die cytosolische Membranseite dem Badmedium zugewandt ist und damit kontrollierte Lösungsbedingungen auf beiden Membranseiten möglich sind. Alternativ kann ausgehend von der *cell-attached* Konfiguration der Membranfleck unter der Glaspipette durch schwache Saugimpulse – wie in der vorliegenden Arbeit angewandt – in Kombination mit sehr kurzen Rechteckspannungspulsen ( $\pm 800$  mV, 10 ms) durchbrochen werden. Dadurch wird dann die *whole-cell* Konfiguration erreicht (Abb. 2.4). Da aufgrund des elektrischen Zugangs zum Zellinnern jetzt die gesamte Membranoberfläche als Ladungsträger zur Verfügung steht, kommt es folglich auch zu einer Zunahme von langsamen Kapazitäten ( $C_{slow}$ ). Diese Membrankapazitäten ( $C_m = C_{slow}$ ) müssen ebenfalls am Patch-Clamp-Verstärker kompensiert werden, um kapazitive Stromüberlagerungen mit den zu untersuchenden Transporter-



vermittelten Ströme zu vermeiden. Mit dem Membrandurchbruch kommt es außerdem zu einem diffusionsbedingten kompletten Austausch des Zelllumens mit dem Pipetteninhalt (Pusch and Neher, 1988; Marty and Neher, 1995). Die *whole-cell* Konfiguration ermöglicht dann die makroskopische Stromableitung über die gesamte Membranoberfläche. Bei gleichzeitiger Kontrolle der intra- und extrazellulären Lösungsbedingungen können dadurch auch sehr geringe Transportkapazitäten aufgelöst werden. Es können dabei aber in der Regel keine Einzelkanal-Ereignisse aufgezeichnet werden. Wird die Glaspipette ausgehend vom *whole-cell* Modus von der am Kammerboden anhaftenden Membran vorsichtig weg bewegt, dann erhält man die *outside-out* Konfiguration (Abb. 2.4).



**Abbildung 2.4. Schematische Darstellung der Etablierung verschiedener Patch-Clamp-Messkonfigurationen.** Ausgehend von der *cell-attached* Konfiguration können alternativ die verschiedenen Messkonfigurationen *inside-out*, *whole-cell* und *outside-out* erreicht werden. (aus Numberger and Draguhn, 1996; mit freundlicher Genehmigung des Verlags).

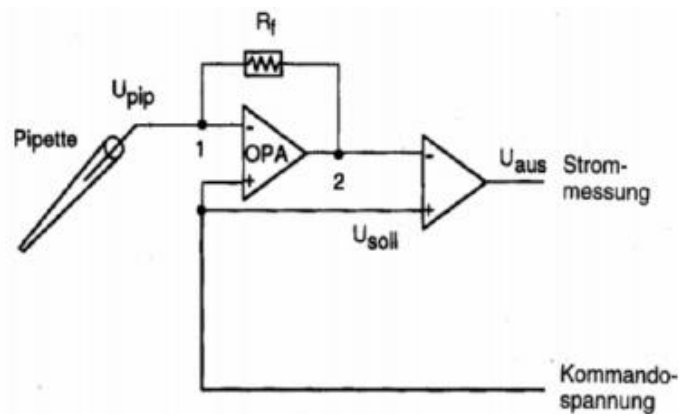
In dieser Messkonfiguration ist die extrazelluläre Membranoberfläche dem Badmedium zugewandt, während die intrazelluläre Membranseite dem Pipettenmedium zugekehrt ist. D.h. in Analogie zur *inside-out* und *whole-cell* Konfiguration können auch in der *outside-out* Konfiguration auf beiden Membranseiten definierte Lösungszusammensetzung eingestellt werden. Dabei können Einzelkanal-Ereignisse aufgezeichnet werden.

Da in der vorliegenden Arbeit Ganzzelleableitungen ausschließlich an Vakuolen vorgenommen wurden – was der *whole-cell* Konfiguration bei Protoplasten entspricht – wird im Folgenden immer von der *whole-vacuole* Konfiguration gesprochen. Dabei imitiert die Badlösung das Cytosol, während die Pipettenlösung nach der Equilibrierung dann das Vakuolenlumen bildet.

#### **2.4.2 Funktionsweise des Patch-Clamp-Verstärkers**

Dem Messprinzip des Patch-Clamp-Verstärkers liegt eine spezielle Art der Spannungsklemme (*voltage clamp*) zugrunde. Sie wurde Ende der dreißiger Jahre von Kenneth S. Cole und H. J. Curtis entwickelt und ermöglichte es, das Zellmembranpotential mit Hilfe von zwei Elektroden (Strom- und Spannungselektrode) bei einer definierten Spannung zu halten (Numberger and Draguhn, 1996; Brette and Destexhe, 2012). Um eine Abweichung des Membranpotentials zu verhindern, wird ein Kompensationsstrom injiziert, dessen Amplitude genauso groß ist wie der Membranstrom, allerdings mit entgegengesetztem Vorzeichen. Dies wird mit Hilfe eines negativen Rückkopplungsmechanismus erreicht, bei dem das Membranpotential gemessen und mit der vorgegebenen Soll- oder Kommandospannung ( $U_{\text{soll}}$ ) verglichen und gegebenenfalls kompensiert wird (Numberger and Draguhn, 1996). Im Gegensatz zur Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ist bei der Patch-Clamp-Technik nur eine Elektrode nötig, da hier mit einem sogenannten Strom-Spannungs-Wandler gearbeitet wird. Dieser Schaltkreis ist im Vorverstärker untergebracht (Abb. 2.5). Die beiden wichtigsten darin enthaltenen Bauteile sind der Operationsverstärker (OPA) mit einem sehr hohen Eingangswiderstand ( $10^{12}\Omega$ ) und der Rückkopplungswiderstand ( $R_f$ ). Am Eingang des OPA liegen die Pipettenspannung ( $U_{\text{pip}}$ ) und das vorgegebene  $U_{\text{soll}}$  an (Numberger and Draguhn, 1996). Kommt es während einer Messung aufgrund von vorliegenden Membranleitfähigkeiten oder Leckströmen zwischen Membran und Glaspipette zur

Abweichung zwischen  $U_{\text{pip}}$  und  $U_{\text{soll}}$ , dann entsteht am OPA-Ausgang eine Spannung, die proportional zu dieser Spannungsdifferenz, aber sehr viel größer ist (Numberger and Draguhn, 1996). Durch die Spannungsdifferenz zwischen Punkt 1 ( $U_{\text{pip}}$ ) und 2 kommt es zu einem Stromfluss durch  $R_f$ . Dort entsteht dann eine Spannung proportional zum Strom  $U_f = R_f \times I$  (Numberger and Draguhn, 1996). Da der Strom aufgrund des hohen Eingangswiderstandes des OPA (ca.  $10^{12} \Omega$ ) nur durch die Pipette abfließen kann, wird der Strom solange fließen und das Potential an  $U_{\text{pip}}$  (Punkt 1) ändern, bis keine Differenz mehr an den OPA-Eingängen vorliegt und das definierte  $U_{\text{soll}}$  erreicht ist (Numberger and Draguhn, 1996).



**Abbildung 2.5. Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers.** OPA: Operationsverstärker,  $R_f$ : Rückkopplungswiderstand,  $U_{\text{soll}}$ : Soll- oder Kommandospannung,  $U_{\text{pip}}$ : Pipettenpotential,  $U_{\text{aus}}$ : Ausgangsspannung proportional zur Strommessung. (Numberger and Draguhn, 1996; mit freundlicher Genehmigung des Verlages)

### 2.4.3 Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes

Der Patch-Clamp-Messplatz war zum Schutz vor äußeren, systemunabhängigen elektromagnetischen Induktionen von einem Faradaykäfig umgeben. Innerhalb des Käfigs war ein pneumatisch-schwingungsgedämpfter Tisch (Technical Manufacturing Corporation, Peabody, Massachusetts, USA) aufgestellt, auf dem ein inverses Mikroskop ohne Kreuztisch (Axiovert 10, Carl Zeiss AG, Deutschland) montiert war. Aufgrund des besseren Dämpfungsverhaltens wurde ein separater Kreuztisch (Inverted movable top plate, Scientifica, England) mit einer Aufnahme für Patch-Clamp-Messkammern (Kammervolumen

ca. 600  $\mu$ l) direkt auf dem pneumatisch-schwingungsgedämpften Tisch montiert. Auf dem Kreuztisch waren zusätzlich zwei sich gegenüberstehende Mikromanipulatoren (Patch Star Mikromanipulator, Scientifica, England) verschraubt. Am rechten Manipulator war die Patch-Clamp-Pipette zusammen mit dem Vorverstärker angebracht. Am linken Manipulator wurde eine sogenannte Applikationspipette fixiert (Kap. 2.4.4), die mit einem Schlauch zur manuellen Druck-Applikation verbunden war. Mit Hilfe dieser Applikationspipette konnte eine definierte Lösung direkt an die Zellmembran appliziert werden. Um einen geschlossenen Stromkreis mit Erdung herzustellen, tauchte eine mit dem Vorverstärker verbundene Referenzelektrode (Kap. 2.4.5) am Perfusionsablauf in die mit Badmedium gefüllte Patch-Clamp-Messkammer ein. Mit Hilfe zweier Peristaltikpumpen für den Zu- und Ablauf (Pharmacia LKB Pump P-1, Pfizer, Berlin), die außerhalb des Faradaykäfigs angebracht waren, und zweier Schlauchsysteme wurde die Messkammer während den Messungen kontinuierlich mit Badlösung durchgespült. Dadurch wurde eine konstante Ionenkonzentration in der Kammer gewährleistet. Zur Applikation und Ableitung der elektrischen Signale wurde ein EPC10-Verstärker (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) mit integriertem DA/AD-Wandler verwendet. Der Verstärker war zusätzlich mit einem separaten Vorverstärker verbunden. Der DA/AD-Wandler diente der Umwandlung von den analogen elektrischen Messsignalen der Patchelektrode in digitale Signale, die der Computer verarbeiten konnte. Umgekehrt wurden digitale Computersignale über den DA/AD-Wandler in analoge Signale umgewandelt und an die Elektroden angelegt. Der EPC10 wurde mit einem Microsoft-Windows-Computer über eine spezielle Patch-Clamp-Software (HEKA Patchmaster 2.35, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) angesteuert, die die Pulserzeugung und Aufzeichnung der Signale übernahm. Die elektrischen Eingangssignale wurden mit Hilfe der im Verstärker integrierten Vorfilterung bei 10 kHz gefiltert. Zusätzlich wurden die Eingangssignale, je nach experimentellem Ablauf, mit dem integrierten Tiefpass acht-pol-Bessel-Filter bei 5 kHz oder 100 Hz gefiltert. Da in der verwendeten Patch-Clamp-Software (HEKA Patchmaster Version 2.35, Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) keine Option für die entsprechende vakuoläre Vorzeichenkonvention vorhanden war, wurde zur Erleichterung der späteren Datenanalyse in der *inside-out* Konfiguration für Protoplasten gemessen. Das entspricht der *whole-vacuole* Konfiguration an Vakuolen. Der EPC10-Verstärker, sowie die Netzteile des Mikroskops und

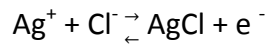
der Mikromanipulatoren waren zusammen mit dem Computer und den Peristaltikpumpen außerhalb des Faradaykäfigs angebracht.

#### **2.4.4 Funktion der Applikationspipette**

Im Vergleich zur herkömmlichen Methode der Badperfusion besteht der Vorteil beim Einsatz einer Applikationspipette darin, dass auch kleinere Mengen verschiedenster Lösungen zielgerichtet und innerhalb weniger Sekunden an die jeweils zu vermessende Vakuole gebracht werden können (siehe Schulz et al. 2011 und Dissertation Alexander Schulz, Universität Würzburg, 2012, Kap. 2.2.5). Bei diesem System wurde eine Glaspipette mit dem zwei- bis dreifachen Öffnungsdurchmesser der Messpipettenspitze verwendet (Kap. 2.4.6). Die Applikationspipette wurde vor dem eigentlichen Messvorgang mit Hilfe eines Mikromanipulators in der Messkammer immer nahe dem Ablauf der laufenden Badperfusion positioniert. Dies sollte eine vorzeitige Kontamination der Vakuolumgebung mit der Applikationslösung verhindern. Während der Messung wurde die Applikationspipette dann an die entsprechende Vakuole navigiert und anschließend konnte der Lösungsinhalt dieser Pipette durch das Anlegen eines Überdrucks kontinuierlich an die Zellmembran gebracht werden. Dabei wurde die Badperfusion immer angehalten, um ein vorzeitiges Auswaschen zu verhindern. Da das applizierte Lösungsvolumen im Vergleich zum Gesamtvolumen der Messkammer nur sehr gering war, wurde dieses durch die Badperfusion später auch sehr schnell wieder ausgewaschen.

#### **2.4.5 Herstellung von Mess- und Referenzelektrode**

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Patch-Clamp- und Einstich-Experimente wurden Mess- und Referenzelektrode aus Silber-/Silberchlorid verwendet. Für die Herstellung dieser Elektroden wurde ein Silberdraht ( $\text{Ag}^+$ ) in eine 0,5 M KCl-Lösung getaucht und elektrolytisch chloriert. Dabei wurde durch die angelegte Gleichspannung der Silberdraht mit einer Silberchloridschicht ( $\text{AgCl}$ ) überzogen:



Die Referenzelektrode für den Patch-Clamp-Messplatz wurde in einen gebogenen Polyethylenschlauch eingeführt, der mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und dessen Ende mit einem Agarosepropfen aus 2% Agarose und 3 M KCl verschlossen war. Die Agarosebrücke verhinderte den Austritt der 3 M KCl-Lösung und zytotoxischer Silberionen, bei gleichzeitig gewährleisteter elektrischer Leitfähigkeit der Referenzelektrode mit dem Badmedium.

#### 2.4.6 Herstellung von Mess- und Applikationspipette

Die Patch-Clamp-Pipetten wurden aus Borosilikat-Hartglaskapillaren (1,5-1,8 mm x 70 mm Kimax-51, Kimble Products, Vineland, New Jersey, USA) hergestellt. Diese wurden auf der Innenseite mit einem dünnen Film einer speziellen Silikonlösung (Sigmacote®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) beschichtet und bei 60°C mehrere Stunden getrocknet. Die so beschichteten Kapillaren wurden in einem vertikalen Pipettenziehgerät (Narishige PC-10, Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japan) in zwei Stufen zu spitzen Patch-Clamp-Pipetten auseinander gezogen. Anschließend wurden die Glaspipetten außen mit einem hydrophoben Silikon-Elastomer (Sylgard® 184 silicon elastomer kit, Dow Corning Corporation, Midland, Michigan, USA) bis kurz vor der Pipettenöffnung beschichtet. Durch die hydrophobe Beschichtung wurde die Wandstärke der Glaspipettenspitze vergrößert und zusätzlich verhindert, dass sich ein Film aus Badmedium am Glas bildet. Dadurch wurde das kapazitive, elektrische Rauschen wesentlich vermindert. Abschließend wurde die Pipettenspitze mit einer *Microforge-Apparatur* (Zeiss ID03, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland; List Medical L/M-CPZ 101, List-electronic, Darmstadt, Deutschland) hitzepoliert und bis zur Verwendung, zum Schutz vor Verschmutzung, in einer geschlossenen Kunststoffbox aufbewahrt. Die Hitzepolitur der Glaspipettenspitze glättete zum einen die durch das Auseinanderziehen entstandenen scharfen Ränder der Abrisskante, die die Zellmembran irreversible beschädigen konnten. Es ermöglichte zum anderen auch eine genauere Justierung der Öffnungsweite und die Form der Pipettenspitze. Dadurch kann die Pipettenöffnung an den jeweiligen Zelltyp optimal angepasst und die Ausbildung des Abdichtwiderstandes unterstützt werden. Der Öffnungsdurchmesser der Pipettenspitze ist

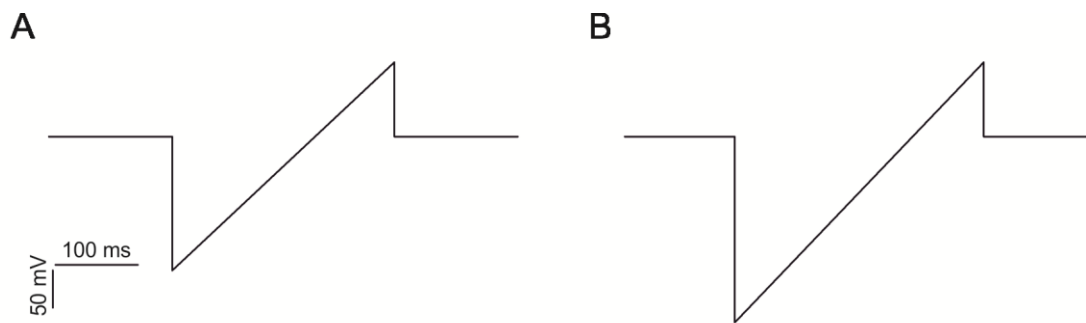
dabei mit dem Pipettenwiderstand korreliert und abhängig von den jeweils verwendeten Ionen und deren Konzentrationen in den jeweiligen Bad- und Pipettenlösungen. Für die verwendeten Lösungen in Kapitel 2.2.1.4 und Kapitel 2.2.1.5 betrug der Pipettenwiderstand ca. 3-5 M $\Omega$  bzw. 5-7 M $\Omega$ . Zum Befüllen der Patch-Clamp-Glaspipette mit der entsprechenden Pipettenlösung wurde zuerst die Spitze in die Lösung getaucht und über Applikation eines Unterdrucks vom entgegengesetzten Ende in die feine Spitze hineingezogen (sogenanntes *Tip-Filling*). Anschließend wurde die Pipette über das hintere Ende zu ca. 2/3 mit Pipettenlösung gefüllt (sogenanntes *Back-Filling*). Durch Schütteln und vorsichtiges Abklopfen wurden die verbliebenen, isolierend wirkenden Luftblasen aus der Pipette entfernt.

Die Applikationspipetten (Borosilikat-Hartglaskapillaren, 1,5-1,8 mm x 70 mm Kimax-51) wurden ebenfalls in zwei Stufen ausgezogen (Narishige Pipettenziehgerät PP830, Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japan). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Pipettenöffnung etwa dem zwei- bis dreifachen Spitzendurchmesser der Patchpipette entsprach. Die Kapillaren waren nicht mit Sigmacote<sup>®</sup> oder Sylgard<sup>®</sup> beschichtet und die Ränder der Pipettenspitze wurden nicht hitzepoliert. Aufgrund des großen Spitzendurchmessers genügte bei der Applikationspipette das *Back-Filling* und ein leichtes Schütteln, um die Pipette luftblasenfrei mit gewünschter Lösung zu füllen.

#### **2.4.7 Spannungsprotokolle und Datenanalyse der Patch-Clamp-Messungen**

Für die experimentelle, elektrophysiologische Charakterisierung der vakuolären Protonen-ATPase wurden verschiedene Spannungsprotokolle mit Hilfe der Patch-Clamp Software (HEKA Patchmaster) erzeugt. Die Bildung des Gigaohm-Abdichtwiderstandes und im späteren Messverlauf auch die Equilibrierung der Pipettenlösung mit dem Vakuolenlumen wurde mit Hilfe eines Rechteckspannungs-Testpulses überwacht. Dafür wurde ausgehend von einer Haltespannung von 0 mV eine Rechteckspannung von  $\pm 10$  mV über einen Zeitraum von jeweils 10 ms und abschließend wieder eine Haltespannung von 0 mV angelegt. Die Aufzeichnung der ATP-abhängigen Aktivierung der V-ATPase-Protonenpumpströme wurde bei einem kontinuierlichen Spannungspuls von 0 mV und einer Frequenz von 100 Hz vorgenommen. Die Charakterisierung der V-ATPase-

Spannungsabhängigkeit wurde mit Hilfe von Rampenpulsprotokollen durchgeführt. Ausgehend von einer 0-mV-Haltespannung (für 150 ms) wurde die Spannung linear von -180 bis +100 mV innerhalb von 270 ms (Abb. 2.6A) bzw. von -250 bis +100 mV im Zeitraum von 340 ms (Abb. 2.6B) verändert. Abschließend wurde wieder für 150 ms eine Haltespannung von 0 mV angelegt. Da bei beiden Rampenspannungsprotokollen eine Spannungsänderung von 1 mV/ms vorgenommen wurde, war bei beiden Pulsprotokollen somit ein identisches Verhältnis von applizierter Spannung pro Zeiteinheit gewährleistet. Es wurden immer fünf aufeinander folgende (mit einem Abstand von 5 s) Rampenprotokolle verwendet<sup>1</sup>. Die Filterung der Stromantwort wurde bei 5 kHz durchgeführt.



**Abbildung 2.6. Rampenpulsprotokoll.** Die grafische Darstellung zeigt die zeitliche Spannungsänderung der Rampenpulsprotokolle in (A) von -180 mV bis +100 mV im Zeitraum von 270 ms und in (B) von -250 mV bis +100 mV im Zeitraum von 340 ms.

Die Aufbereitung der erhaltenen elektrophysiologischen Rohdaten erfolgte mittels der Patch-Clamp-Software Patchmaster 2.35 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland). Die Datenanalyse wurde mit der Analysesoftware Igor Pro 6.0 (Wave Metrics, Inc., Oregon, USA) durchgeführt. Um die experimentell erhaltenen Ströme von Vakuolen verschiedener Größen quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurden diese Ströme durch die Vakuolenmembrankapazität ( $C_m$ ) dividiert, die proportional zur Vakuolenoberfläche ist. D.h. die Stromstärke wurde dadurch einheitlich auf die Membrankapazität (pA/pF) normiert. Die Werte für  $C_m$  konnten mit Hilfe der Patch-Clamp-Software nach dem Abgleich von  $C_{slow}$  ermittelt werden (Kap. 2.4.1). Die durchschnittliche Größe der verwendeten Vakuolen lag zwischen ca. 15 und 40  $\mu\text{m}$ .

<sup>1</sup> Das Rampenprotokoll von -250 bis +100 mV wurde nur bei zwei Messungen als Anhaltspunkt für den Spannungsbereich des Umkehrpotentials angewendet



## 2.5 Die Vorzeichenkonvention

Die in dieser Arbeit vorgenommenen elektrophysiologischen Messungen wurden nach der Vorzeichenkonvention von Bertl et al. (1992) für Endomembranen durchgeführt. Nach dieser Konvention wird die Membranspannung ( $V_m$ ) als elektrisches Potential auf der cytosolischen Membranseite relativ zum extrazellulären Raum definiert und das extrazelluläre elektrische Potential auf null gesetzt. In Hinblick auf Vakuolen wird das Vakuoleninnere als extrazellulärer Raum betrachtet und demzufolge die Membranspannung weiterhin für das Cytosol relativ zum Vakuolenlumen angegeben. Die auftretenden Ionenströme werden auf das Cytosol bezogen. Dadurch sind aus dem Cytosol ausströmende positive Ladungen und ins Cytosol einströmende negative Ladungen als positiver Strom definiert. Ein Einstrom von Kationen ins Cytosol bzw. ein Ausstrom von Anionen aus dem Cytosol wird als negativer Strom dargestellt.

### 2.5.1 Nernstgleichung und Umkehrpotential

Das Nernstpotential beschreibt ein elektrochemisches Gleichgewichtspotential für eine Ionensorte, das sich zwischen zwei Kompartimenten bei bestimmten Konzentrationsverhältnissen einstellt. Dieses Potential kann für Kationen und Anionen mit Hilfe der nachfolgenden Nernstgleichung theoretisch berechnet werden und stellt somit das theoretische elektrische Potential für die jeweilige Ionenkonzentration dar, bei der kein Nettostromfluss über die Membran stattfindet (Hille, 2001). Das Umkehrpotential ( $E_{rev}$ ) dagegen ist das experimentell gemessene Nernstpotential, an dem kein Nettostromfluß zwischen zwei Kompartimenten mehr zu beobachten ist und an dem sich die Stromflussrichtung bzw. das Vorzeichen umkehrt. Der Vergleich von Nernst- und Umkehrpotential wird in der Praxis dazu verwendet, um beim passiven Transport durch Ionenkanäle die transportierte Ionenart der gemessenen Membranleitfähigkeit zu bestimmen. Je höher die Übereinstimmung zwischen theoretischem und gemessenen Potential, desto wahrscheinlicher ist die Leitfähigkeit für diese Ionenart.

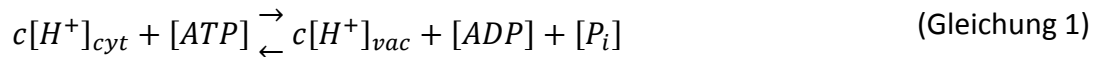
$$E_K^+ = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K_{\text{au\ss en}}]}{[K_{\text{innen}}]}; E_A^- = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[A^-_{\text{innen}}]}{[A^-_{\text{au\ss en}}]}$$

( $E_K^+$  = Nernstpotential für Kationen,  $E_A^-$  = Nernstpotential für Anionen,  $R$  = Gaskonstante,  $T$  = absolute Temperatur in Kelvin,  $z$  = Wertigkeit des Ions,  $F$  = Faraday-Konstante,  $[K^+]$  = Kationenkonzentration,  $[A^-]$  = Anionenkonzentration)

Im Gegensatz dazu können beim primär-aktiven Ionentransport keine Rückschlüsse anhand des Nernst- und Umkehrpotential auf die translozierte Ionenart gemacht werden, da das elektrochemische Gleichgewichtspotential aufgrund der aktiven Energiezuführung – zwecks eines (aktiven) Ionentransports gegen einen elektrochemischen Gradienten – verschoben ist. Am Beispiel der V-ATPase in Kapitel 3.1.2 kann diese Verschiebung, in Abhängigkeit der jeweiligen Lösungsbedingungen, bis zu -95 mV ausmachen. Demzufolge kann bei einem primär-aktiven Ionentransport über  $E_{\text{rev}}$  ermittelt werden, wie viele Ionen pro hydrolysiertes, energiereicher Verbindung (ATP bei V-ATPasen) transportiert werden (Kap. 2.6).

## 2.6 Theoretische Grundlagen zur Berechnung der V-ATPase-Protonenkopplungsrate

Da es keine Möglichkeit gibt, die Anzahl der pro ATP-Molekül transportierten Protonen der V-ATPase elektrophysiologisch direkt zu erfassen, wurde in dieser Arbeit deshalb ein thermodynamischer Ansatz gewählt. Dadurch war es möglich die Kopplungsrate der Protonenpumpe zu bestimmen (Briskin and Reynolds-Niesman, 1991; Davies et al., 1994; Rienmüller et al., 2012). Dieser Ansatz basiert auf der elektrophysiologischen Messung des Umkehrpotentials der V-ATPase in isolierten Mesophyllvakuolen (Kap. 3.1.2) und setzt voraus, dass die ATP-Hydrolyse eng mit dem Protonentransport gekoppelt ist und parallele Leitfähigkeiten, die als eine Art „Protonen-Kurzschluss“ über der Membran fungieren, vernachlässigbar gering sind (Davies et al., 1994; Kettner et al., 2003). Für die allgemeine Pumpreaktion V-ATPase gilt dann (Davies et al., 1994; Kettner et al., 2003; Rienmüller et al., 2012):



( $c$  = Protonenkopplungsrate,  $[X]$  = Chemische Konzentration von ATP bzw.  $H^+$  in Bad- oder Pipettenlösung, die Indizes „*cyt*“ bzw. „*vac*“ geben das cytosolische oder das vakuoläre Kompartiment an)

Diese Reaktion ist am Umkehrpotential der V-ATPase im Gleichgewichtszustand und kann durch folgende Gleichung beschrieben werden (Davies et al., 1994; Kettner et al., 2003; Rienmüller et al., 2012):

$$E_{rev} = \frac{RT}{cF} \cdot \ln \frac{[ADP] \cdot [P_i] \cdot [H^+]_{vac}^c}{K_{ATP} \cdot [ATP] \cdot [H^+]_{cyt}^c} \quad (\text{Gleichung 2})$$

( $E_{rev}$  = Umkehrpotential,  $R$  = Gaskonstante,  $T$  = absolute Temperatur in Kelvin,  $c$  = Protonenkopplungsrate,  $F$  = Faraday-Konstante,  $[X]$  = Chemische Konzentration des jeweiligen Reaktant in Bad- oder Pipettenlösung,  $K_{ATP}$  = Gleichgewichtskonstante der ATP-Hydrolyse, die Indizes „*cyt*“ bzw. „*vac*“ geben das cytosolische oder das vakuoläre Kompartiment an)

Anhand von Gleichung 2 kann dann mit den Werten für  $E_{rev}$ ,  $K_{ATP}$  und den verwendeten Konzentrationen der Variablen  $ATP$ ,  $ADP$ ,  $P_i$  und  $H^+$  in Bad- und Pipettenlösung die Protonenkopplungsrate  $c$  berechnet werden. Da bei den Versuchen in Kapitel 3.1.2 der Schwerpunkt auf einer sehr genauen charakterisierten Spannungsabhängigkeit der V-ATPase – ohne verfälschende makroskopische Kaliumströme – gelegt wurde, wurde Cäsium als Kaliumkanalblocker verwendet. Dadurch musste aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Dihydrogenphosphat (das anorganisches Phosphat bereitstellen sollte) und vermutlich Cäsium unter den verwendeten Lösungsbedingungen (Kap. 2.2.1.5) auf die Verwendung eines Gemisches aus ATP, ADP und  $P_i$  als grundlegender Bestandteil in den jeweiligen Bad- und Pipettenlösungen verzichtet werden<sup>2</sup>.

Da diese Bestandteile allerdings als Grundlage für eine möglichst genaue Abschätzung von  $K_{ATP}$  notwendig sind, konnte aufgrund der fehlenden Angabe genau definierter Konzentrationen eben dieser Bestandteile nur die relative Änderung der Protonenkopplungsrate in Abhängigkeit vom pH-Gradienten bestimmt werden. Dazu wurde Gleichung 2 wie folgt umgeformt:

<sup>2</sup> ausgenommen davon war ATP in der Applikationspipette

$$E_{rev} = \frac{RT}{cF} \cdot \left( \ln \frac{[ADP] \cdot [P_i]}{K_{ATP} \cdot [ATP]} + \ln \frac{[H^+]_{vac}^c}{[H^+]_{cyt}^c} \right)$$

$$\Rightarrow E_{rev} = \frac{RT}{cF} \cdot \ln \frac{[ADP] \cdot [P_i]}{K_{ATP} \cdot [ATP]} + \frac{RT}{cF} \cdot \ln \frac{[H^+]_{vac}^c}{[H^+]_{cyt}^c}$$

Es wird  $\frac{[ADP] \cdot [P_i]}{K_{ATP} \cdot [ATP]} = a$  ersetzt und führt zu:

$$E_{rev} = \frac{RT}{cF} \cdot \ln a + \frac{RT}{cF} \cdot \ln \frac{[H^+]_{vac}^c}{[H^+]_{cyt}^c}$$

$$\Rightarrow E_{rev} = \frac{RT}{cF} \cdot \ln a + \frac{RT}{cF} \cdot (\ln [H^+]_{vac}^c - \ln [H^+]_{cyt}^c)$$

$$\Rightarrow E_{rev} = \frac{RT}{cF} \cdot \ln a + \frac{RT}{cF} \cdot c \cdot (\ln [H^+]_{vac} - \ln [H^+]_{cyt})$$

$$\Rightarrow E_{rev} = \frac{RT}{cF} \cdot \ln a + \frac{RT}{F} \cdot \ln [H^+]_{vac} - \ln [H^+]_{cyt}$$

da für  $\ln = 2,303 \cdot \log_{10}$  gilt, folgt daraus:

$$E_{rev} = \frac{RT}{cF} \cdot \ln a + \frac{RT}{F} \cdot 2,303 \cdot (\log_{10} [H^+]_{vac} - \log_{10} [H^+]_{cyt})$$

anschließend wird  $\text{pH} = -\log_{10} [H^+]$  ersetzt:

$$E_{rev} = \frac{RT}{cF} \cdot \ln a + \frac{RT}{F} \cdot 2,303 \cdot (\text{pH}_{cyt} - \text{pH}_{vac})$$

Unter Lösungsbedingung 1<sup>3</sup> mit  $E_{rev1}$  und dem entsprechenden pH-Wert bzw. der Kopplungsrate  $c_1$  gilt dann:

$$E_{rev1} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 \cdot (pH_{cyt} - pH_{vac1}) = \frac{RT}{c_1 F} \cdot \ln a$$

$$\Rightarrow E_{rev1} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 \cdot (pH_{cyt} - pH_{vac1}) = \frac{1}{c_1} \cdot \frac{RT}{F} \cdot \ln a$$

für Lösungsbedingung 2<sup>4</sup> mit  $E_{rev2}$  und der entsprechenden Kopplungsrate  $c_2$  gilt analog:

$$E_{rev2} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 (pH_{cyt} - pH_{vac2}) = \frac{1}{c_2} \cdot \frac{RT}{F} \cdot \ln a$$

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ingo Dreyer (Universidad Politecnica, Madrid, Spanien) wurde dann die Annahme aufgestellt, dass unter den gegebenen Lösungsbedingungen 1 und 2 und bei konstanten cytosolischen Bedingungen der unbekannte Wert  $E_{ATP}$  konstant ist (Rienmüller et al., 2012):

$$E_{ATP} = \frac{RT}{F} \cdot \ln a = k \quad \text{(Gleichung 3)}$$

deshalb gilt für die folgenden Gleichungen:

$$E_{rev1} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 (pH_{cyt} - pH_{vac1}) = \frac{1}{c_1} \cdot k$$

und

$$E_{rev2} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 (pH_{cyt} - pH_{vac2}) = \frac{1}{c_2} \cdot k$$

<sup>3, 4</sup> Lösungsbedingung 1 und 2 sind Platzhalter für die luminalen Lösungsbedingungen, die bei den Experimenten in Kapitel 3.1.2 verwendet wurden (vgl. Kap. 4.1).

Wenn man beide Gleichungen in Beziehung zueinander setzt, ergibt sich daraus:

$$\frac{E_{rev1} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 (pH_{cyt} - pH_{vac1})}{E_{rev2} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 (pH_{cyt} - pH_{vac2})} = \frac{\frac{k}{c_1}}{\frac{k}{c_2}}$$

$$\Rightarrow \frac{E_{rev1} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 \cdot (pH_{cyt} - pH_{vac1})}{E_{rev2} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 \cdot (pH_{cyt} - pH_{vac2})} = \frac{c_2}{c_1}$$

Dadurch kann dann die relative Änderung der Protonenkopplungsrate  $r_c$  nach Gleichung 4 mit den in Kapitel 3.1.2 experimentell ermittelten, pH-abhängigen Umkehrpotentialen wie folgt berechnet werden (Rienmüller et al., 2012):

$$r_{c,1 \rightarrow 2} = \frac{c_2}{c_1} = \frac{E_{rev,pHvac1} - 2,303 \cdot \frac{RT}{F} \cdot (pH_{cyt} - pH_{vac1})}{E_{rev,pHvac2} - 2,303 \cdot \frac{RT}{F} \cdot (pH_{cyt} - pH_{vac2})} \quad (\text{Gleichung 4})$$

( $r_{c,1 \rightarrow 2}$  = relative Änderung der Kopplungsrate,  $E_{rev,pHvac}$  = Umkehrpotentiale bei verschiedenen vakuolären pH-Werten,  $R$  = Gaskonstante,  $T$  = absolute Temperatur in Kelvin,  $c$  = Protonenkopplungsrate,  $F$  = Faraday-Konstante. Die Indizes „cyt“ bzw. „vac“ bezeichnen das cytosolische oder das vakuoläre Kompartiment an)

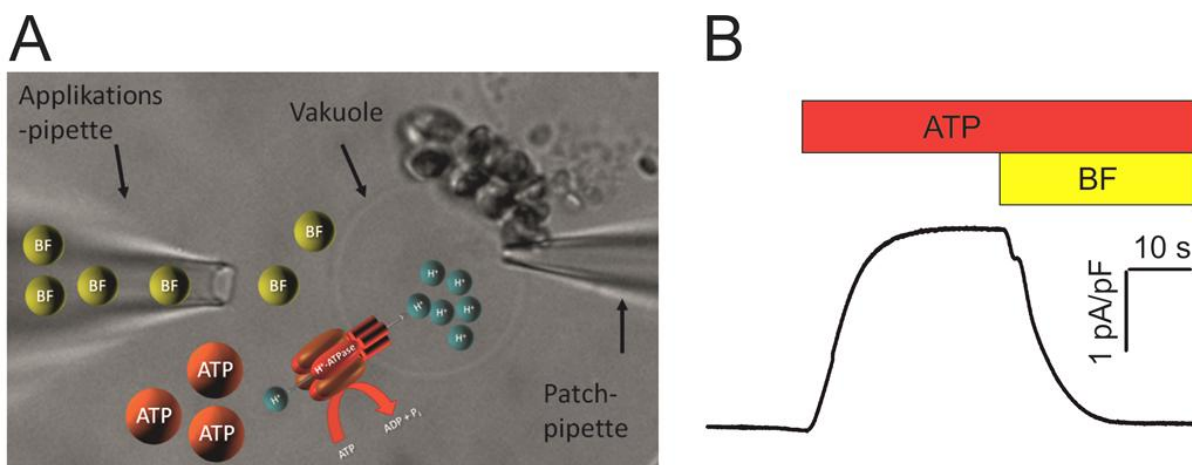
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der V-ATPase

##### 3.1.1 Methodik der elektrophysiologischen Untersuchung von V-ATPase-Strömen in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllvakuolen

Zur elektrophysiologischen Untersuchung von ATP-induzierten Protonenpumpströmen der V-ATPase wurde in der vorliegenden Arbeit die Patch-Clamp-Technik verwendet. Da diese Pumpströme mit einer Transportrate von 10 bis  $10^3$  Ionen/s im Vergleich zu Ionenkanälen ( $10^7$ - $10^8$  Ionen/s) sehr klein sind (Lodish et al., 2000; Kap. 1.2), konnten die V-ATPase-vermittelten Ströme nur auf makroskopischer Ebene durch die Aufzeichnung der „Summen“-Pumpströme aller in der Vakuolenmembran vorliegenden V-ATPasen erfasst werden. Zu diesem Zweck wurden die Patch-Clamp-Experimente an isolierten Mesophyllzellvakuolen in der *whole-vacuole* Konfiguration (Kap. 2.4.1) durchgeführt. Um darüber hinaus eine Überlagerung der zu charakterisierenden Pumpströme durch Ionenkanal- oder Transporterströme zu vermeiden bzw. zu eliminieren, wurden Messungen mit symmetrischen Bad- und Pipettenlösungen unter konstanten pH-Bedingungen (Kap. 2.2.1.4-5) bei einem Haltepotential von 0 mV durchgeführt. Es wurde somit in Abwesenheit eines chemischen (mit Ausnahme der Protonenkonzentration wenn es die experimentelle Fragestellung erforderlich machte; Kap. 3.1.2-5) und elektrischen Gradienten über der Membran und damit vorwiegend in Abwesenheit einer treibenden Kraft für den passiven Ionenfluss, vor allem durch Ionenkanäle, gearbeitet. Überlagerungen durch protonengekoppelte elektrogene Ionentransportprozesse, die von Symportern oder Antiportern (z.B. ClCs) vermittelt werden, konnten in Anwesenheit eines pH-Gradienten (Kap. 3.1.2-5) nicht gänzlich vermieden werden. Eine Verfälschung der V-ATPase-Pumpströme wurde jedoch dadurch verhindert, dass die pH-Bedingungen während des Experiments immer konstant gehalten wurden und damit auch mögliche pH-abhängige Hintergrundströme unverändert blieben. In Abbildung 3.1 ist exemplarisch eine repräsentative Messung von V-ATPase-Protonenpumpströmen gezeigt. Nach dem Durchbruch in die *whole-vacuole* Konfiguration und der Einstellung des Haltepotentials

(0 mV) stellte sich nach einer mehrminütigen Equilibrierungsphase des Messpipetteninhaltes mit dem vakuolären Lumen ein konstantes Ausgangsstromniveau ein (Abb. 3.1B). Zur Aktivierung der V-ATPase-vermittelten Protonenströme wurde in diesem Experiment die Standardbadlösung (SBL1-pH 7,5 in Abb. 3.1B) zusätzlich mit 5 mM ATP modifiziert und dann im Verlauf des Experiments mittels Badperfusion gegen die ursprüngliche Badlösung ausgetauscht (Abb. 3.1B, roter Balken; Kap. 2.2.1.7). Dies führte bei der in Abbildung 3.1B untersuchten Vakuole zu einer unmittelbaren Stromerhöhung um ca. 2,5 pA/pF<sup>5</sup>. Aufgrund der gewählten Lösungs- und Spannungsbedingungen in diesem Experiment, die einen passiven Ionenfluss unterbanden, konnte es sich bei den ATP-induzierten, positiven Strömen deshalb nur um auswärtsgerichtete, aktiv transportierte Kationen wie Protonen oder Calciumionen handeln. Um eine mögliche ATP-induzierte Aktivität von Ca<sup>+2</sup>-ATPasen oder potentiellen elektrogenen ABC-Transportern ausschließen zu können, wurden 500 nM des spezifischen V-ATPase-Inhibitors Bafilomycin (BF) eingesetzt (Kap. 2.2.1.7).



**Abbildung 3.1. Aufzeichnung von ATP-induzierten V-ATPase-Strömen an Mesophyllvakuolen.** (A) Illustration der Bafilomycin-Applikation zur Inhibition der V-ATPase-Pumpströme während einer Patch-Clamp-Messung in der *whole-vacuole* Konfiguration. In (B) ist der repräsentative, Stromverlauf unter symmetrischen pH-Bedingungen (pH 7,5) einer Wildtyp-Vakuole dargestellt. Infolge der Zugabe von 5 mM ATP mittels Badperfusion (roter Balken) ist ein Stromanstieg ausgehend vom Grundstromniveau zu verzeichnen, der bei Applikation von Bafilomycin (gelber Balken) auf sein Ausgangsniveau zurückfiel (aus Rienmüller et al., 2012).

<sup>5</sup> Die Ströme der Patch-Clamp-Messungen wurden zur Vergleichszwecken immer auf die jeweils gemessene Membrankapazität ( $C_m$ ) normiert (Kap. 2.4.7).



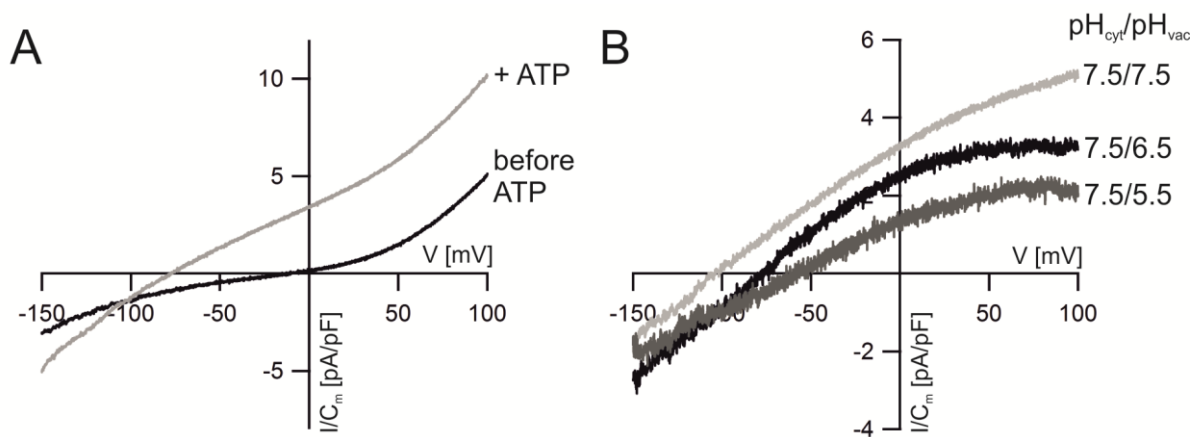
Nach dem Erreichen der maximalen Stromantwort bei kontinuierlicher Aufrechterhaltung der ATP-Badperfusion wurde BF mit Hilfe einer Applikationspipette direkt an die jeweilige Vakuole appliziert (Abb. 3.1A und 3.1B, gelber Balken). Dies führte zu einem sofortigen Rückgang des positiven Stromes auf das Ausgangsstromniveau vor der ATP-Zugabe (Abb. 3.1B). Damit konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass es sich bei den hier gemessenen positiven Strömen unter den verwendeten experimentellen Bedingungen um ATP-induzierte Protonenpumpströme der V-ATPase handelt. Aufgrund dieser eindeutigen Zuordnung der ATP-induzierten Pumpströme konnte in den nachfolgenden Experimenten zur Charakterisierung der V-ATPase auf die Verwendung von BF verzichtet werden.

### **3.1.2 Effekt des vakuolären pH-Werts auf die Spannungsabhängigkeit der V-ATPase**

Nachdem in früheren Untersuchungen zur Kopplungsrate der V-ATPase eine Transportrate von zwei Protonen pro hydrolysiertem ATP-Molekül angenommen wurde, sollten später hierzu abweichende Kopplungsraten mit bis zu vier Protonen pro ATP postuliert werden (Cross and Taiz, 1990; Davies et al., 1994; Müller et al., 1999; Yabe et al., 1999; Kettner et al., 2003; Rienmüller et al., 2012). Seitdem wird daher vermutet, dass die Protonenkonzentrationen im Cytosol und vakuolärem Lumen die Kopplungsrate beeinflussen (Kap. 1.4.1; Davies et al., 1994; Müller and Taiz, 2002). Zur Erstellung eines elektrophysiologischen Profils der V-ATPase, welches die Abhängigkeit der Protonenkopplungsrate von cytosolischen und luminalen pH-Werten in *A. thaliana* erfassen sollte, wurde in den folgenden Experimenten deshalb eine schrittweise Änderung der luminalen Protonenkonzentration erzeugt und deren Auswirkungen auf die Pumpaktivität untersucht. Da es mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik keine Möglichkeit gibt die Protonenkopplungsrate direkt zu messen wurde deshalb – basierend auf dem Vergleich der freien Energie der Substrathydrolyse mit dem Wert des maximalen elektrochemischen Protonengradienten – der Umweg über einen thermo-dynamischen Ansatz gewählt (Kap. 2.6; Briskin and Reynolds-Niesman, 1991; Schmidt and Briskin, 1993; Davies et al., 1994). Dafür war es allerdings notwendig, das Umkehrpotential der V-ATPase unter definierten Bedingungen anhand von kurzen Spannungsrampen zu bestimmen (Kap. 2.6). Deshalb

wurde die Patch-Clamp-Technik an isolierten Mesophyllvakuolen der *tpc1-2* Verlustmutante in der *whole-vacuole* Konfiguration angewandt. Da in dieser Mutante der spannungsabhängige SV-Kanal nicht mehr funktionell ist, sollten dadurch Überlagerungen der makroskopischen Kaliumströme aufgrund von Spannungsänderungen verhindert werden (Peiter et al., 2005; Rienmüller et al., 2012). Durch den Einsatz identischer Ionenkonzentrationen, mit 50 mM Cäsium als Kationenkanalblocker an Stelle von Kalium im Innen- und Außenmedium, sowie der Abwesenheit von Calcium als Ionenkanal-aktivierende Komponente und Substrat für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen oder Calciumtransporter (Kap. 1.2.2) sollte zusätzlich vermieden werden, dass andere Ionenströme am Tonoplasten die zu untersuchenden Protonenströme überlagern (Kap. 3.1.1). Dies war notwendig, da die Gefahr bestand, dass die angelegten Spannungsrampen potentielle treibende Kräfte für Kanäle oder Transporter geschaffen hätten, die dann die Messungen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit verfälscht hätten.

Nach der Equilibrierungsphase und dem Erreichen eines konstanten Ausgangsstromniveaus wurde zur Bestimmung der spannungsabhängigen Hintergrundströme fünfmal aufeinander folgende (im Abstand von 5 s) Rampenpulsprotokolle ausgeführt. Dabei wurde die Spannung von -180 bis +100 mV (= 1 mV/ms), ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV, in Abwesenheit von ATP verändert und die korrespondierenden Stromantworten aufgezeichnet. Anschließend wurden 5 mM ATP zur Aktivierung der Pumpaktivität mit Hilfe der Applikationspipette an die Vakuole gebracht und nach dem Erreichen eines konstanten Pumpstromes (Abb. 3.1) erneut fünf Spannungsrampen angelegt. Die Stromantworten auf die fünf Spannungsrampen wurden herangezogen, um zunächst die mittleren spannungsabhängigen Stromantworten einer individuellen Vakuole in Ab- (=  $I/C_{m-ATP}(V)$ ) und Anwesenheit von ATP (=  $I/C_{m+ATP}(V)$ ) zu bestimmen (Abb. 3.2A). Es wurde daraufhin aus der Differenz dieser mittleren Stromantworten ( $I/C_{m+ATP}(V) - I/C_{m-ATP}(V)$ ) der reine, ATP-induzierte Protonenstrom der V-ATPase (auf  $C_m$  normiert) als Funktion der Membranspannung bei verschiedenen vakuolären pH-Werten ermittelt (Abb. 3.2B). Unter symmetrischen pH-Bedingungen (pH = 7,5, festgelegt durch die Lösungen SBL4/CsCl-pH 7,5 und SPL4/CsCl-pH 7,5; Kap. 2.2.1.5) und der damit verbundenen Abwesenheit eines pH-Gradienten wurde bei Zugabe von 5 mM ATP ein positiver Netto-Strom von ca. 2,9 pA/pF (SE = 0,3 pA/pF; n = 5) bei 0 mV aufgezeichnet (Abb. 3.2B).



**Abbildung 3.2. Änderung der spannungsabhängigen V-ATPase-Pumpströme bei variierenden luminalen pH-Bedingungen.** (A) zeigt jeweils die auf  $C_m$  normierte, durchschnittliche Stromantwort aus fünf Spannungsrampen (von -180 bis +100 mV) einer einzelnen *tpc1-2* Vakuole vor (schwarze Kurve) und nach (graue Kurve) der Applikation von 5 mM ATP ( $\text{pH}_{\text{cyt}}/\text{pH}_{\text{vac}} = 7,5$ ). In (B) sind repräsentative, normierte, spannungsabhängige Nettopumpströme bei einem cytosolischen pH-Wert von 7,5 und drei verschiedenen vakuolären pH-Werten ( $\text{pH } 7,5_{\text{vac}} = \text{hellgrau}$  ( $n = 5$ ),  $\text{pH}_{\text{vac}} 6,5 = \text{schwarz}$  ( $n = 5$ ) und  $\text{pH } 5,5_{\text{vac}} = \text{dunkelgrau}$  ( $n = 3$ )) abgebildet. Die Nettopumpströme wurden aus der Differenz der Stromantworten auf die Spannungsrampe in Ab- und Anwesenheit von ATP berechnet. Der Schnittpunkt der Kurven mit der x-Achse repräsentiert das Umkehrpotential der Protonenpumpströme (aus Rienmüller et al., 2012).

Aufgrund der Abwesenheit von Calciumionen und eines elektrochemischen Gradienten kann es sich bei diesem Strom nur um einen Protonenausstrom aus dem Cytosol in das Vakuolenlumen handeln, der durch den aktiven Pumptransport der V-ATPase erzeugt wird (vgl. 3.1.1). Ferner zeigte die korrespondierende Strom-Spannungs-Kennlinie im aufgezeichneten Spannungsbereich von -150 und +100 mV einen nahezu linearen Verlauf und ein Umkehrpotential ( $E_{\text{rev}}$ ) von -94,5 mV (SE = 14,0 mV,  $n = 5$ , hellgraue Kurve, Abb.3.2B). Negative Netto-Pumpströme, die bei Spannungen negativer als das Umkehrpotential registriert worden sind, deuten auf einen Protoneneinstrom ins Cytosol hin. Die schrittweise Erhöhung der vakuolären Protonenkonzentration um das 10- bzw. 100-fache führte zu einem pH-Gradienten, der zunehmend die physiologischen pH-Bedingungen innerhalb der Pflanzenzelle imitierte (Krebs et al., 2010). Trotz der erhöhten Protonenkonzentrationen innerhalb der Vakuole konnte weiterhin bei 0 mV ein positiver Netto-Strom und somit ein in die Vakuole gerichteter Protonenpumpstrom beobachtet werden. Demzufolge reicht die aus der ATP-Hydrolyse gewonnene Energie offenbar aus, Protonen auch gegen den pH-Gradienten zu transportieren. Im Vergleich zu  $\text{pH}_{\text{vac}} = 7,5$  (2,9

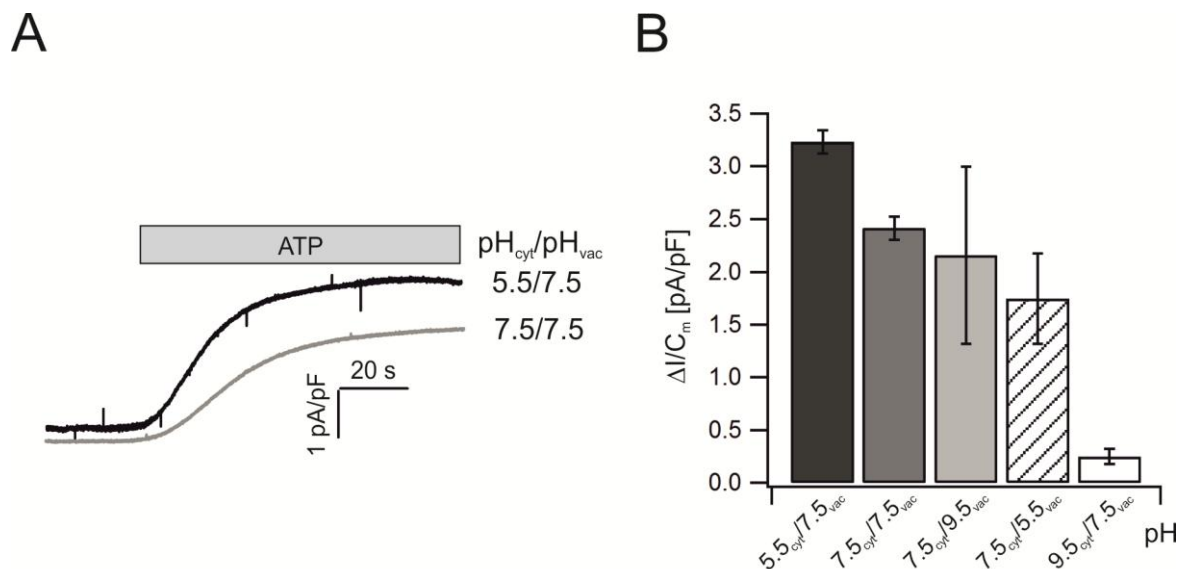
pA/pF, SE = 0,3 pA/pF; n = 5) fielen allerdings die Pumpströme (bei 0 mV) bei  $\text{pH}_{\text{vac}} = 6,5$  mit 1,9 pA/pF (SE = 0,1 pA/pF, n = 5; Kap. 2.2.1.5: SPL5/CsCl-pH 6,5) um 35% und bei  $\text{pH}_{\text{vac}} = 5,5$  mit 1,1 pA/pF (SE = 0,1 pA/pF, n = 3; Kap. 2.2.1.5: SPL6/CsCl-pH 5,5) um ca. 62% niedriger aus (Abb. 3.2B). Im Gegensatz zu den symmetrischen pH-Bedingungen wurde in Gegenwart eines pH-Gradienten ein linearer Verlauf der Strom-Spannungs-Kennlinie nur zwischen -150 und 0 mV verzeichnet (Abb.3.2B). Bei Spannungen positiver von 0 mV zeigte sich für beide asymmetrischen pH-Bedingungen eine asymptotische Tendenz der Ströme. Da der Protonenausstrom durch das Anlegen einer positiven Membranspannung thermodynamisch eigentlich gefördert werden sollte, deuten die ähnlichen Stromamplituden bei Spannungen über +50 mV auf eine Sättigung der V-ATPase-Pumpaktivität hin. Die schrittweise Reduzierung des vakuolären pH-Wertes bewirkte gleichzeitig auch eine Verschiebung der Umkehrpotentiale von -94,5 mV ( $\text{pH}_{\text{vac}} = 7,5$ ) zu -67,5 mV mit  $\text{pH}_{\text{vac}} = 6,5$  (SE = 10,6 mV, n = 5; schwarze Kurve) und -49,6 mV (SE = 3,9 mV, n = 3; dunkelgraue Kurve) unter physiologischen pH-Bedingungen bei  $\text{pH}_{\text{vac}} = 5,5$  (dunkelgraue Kurve, Abb. 3.2B). Anhand der erfassten Daten kann beobachtet werden, dass eine 10- und 100-fach erhöhte luminaire Protonenkonzentration zu einer Reduktion der V-ATPase-Protonenpumpströme bei einer gleichzeitigen Verschiebung der Umkehrpotentiale hin zu positiveren Werten führt (Abb. 3.2B). Unter Berücksichtigung der theoretischen Grundlagen zur Berechnung der Protonenkopplungsrate (Kap. 2.6, Gleichung 4) würde eine Änderung der Umkehrpotentiale zusätzlich auf eine Variation in den Protonentransportraten pro hydrolysiertem ATP hindeuten.

### **3.1.3 pH-Abhängigkeit von ATP-induzierten Protonenauswärtsströmen in Wildtyp-Mesophyllvakuolen**

Die vorangegangenen Experimente zur Spannungsabhängigkeit bei einem cytosolischen pH-Wert von 7,5 und variierenden pH-Bedingungen im Vakuolenlumen (pH 7,5 bis 5,5) haben einen ersten Einblick in die pH-Abhängigkeit der V-ATPase geliefert. Um allerdings ein vertieftes Verständnis der komplexen, pH-abhängigen Regulation der Protonenpumpe zu erlangen, wurden in weiterführenden Versuchsreihen neben den vakuolären auch die cytosolischen pH-Werte über einen größeren pH-Bereich verändert. Die pH-Werte wurden

dabei so gewählt, dass für die Protonenpumpaktivität sowohl thermodynamisch vorteilhafte (Protonengradient ist in die Protonentransportrichtung gerichtet) als auch nachteilige (Protonengradient ist gegen die Protonentransportrichtung gerichtet) und extrem unphysiologische pH-Konstellationen geschaffen wurden. Die Auswirkungen der verschiedenen Kombinationen aus vakuolären und cytosolischen pH-Werten auf die V-ATPase-Pumpaktivität wurden über die ATP-induzierten Protonenströme im Gleichgewichtszustand quantifiziert. Hierzu wurden die V-ATPase-Pumpströme von Wildtyp-Mesophyllvakuolen zunächst bei 5 mM cytosolischem ATP und verschiedenen pH-Bedingungen (Abb. 3.3) mit der Patch-Clamp-Technik (in der Ganzzelleableitung) bei 0 mV Haltepotential untersucht (Kap. 3.1.1). Nach Equilibrierung und Zugabe von ATP wurde analog zu Kapitel 3.1.1 die maximale Auslenkung der auswärts gerichteten, auf  $C_m$  normierten Pumpströme vermessen (Abb. 3.3A). Bei Protonentransport-unterstützenden pH-Bedingungen, wie sie bei einem in die Vakuole gerichteten 100-fachen Protonenkonzentrationsgefälle mit  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 5,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 7,5$  (Kap. 2.2.1.4: SBL2-pH 5,5/SPL1-pH 7,5) vorzufinden waren, ergaben sich maximale Protonenströme von ca. 3,2 pA/pF (SE = 0,1 pA/pF; n = 3, Abb. 3.3). Bei einem gleichwertigen, in die Vakuole gerichteten pH-Gradienten, bei dem die Protonenkonzentration im Innen- und Außenmedium jeweils um den Faktor 100 reduziert war ( $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5$  und  $\text{pH}_{\text{vac}} = 9,5$ ; Kap. 2.2.1.4: SBL1-pH 7,5/SPL3-pH 9,5), betrug die Stromdichte nur noch 2,2 pA/pF (SE = 0,8 pA/pF; n = 4; Abb. 3.3). Unter symmetrischen pH-Bedingungen von 7,5 (Kap. 2.2.1.4: SBL1-pH 7,5/ SPL1-pH 7,5) und der damit verbundenen Abwesenheit eines pH-Gradienten konnte eine Stromdichte von 2,4 pA/pF (SE = 0,1 pA/pF; n = 6) gemessen werden (Abb. 3.3B). Dies entsprach annähernd dem Wert, der schon bei  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 9,5$  erfasst wurde, obwohl unter diesen symmetrischen Bedingungen (pH 7,5) kein auswärts gerichteter Protonengradient wie bei  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 9,5$  vorlag und somit der Protonentransport nicht über das Konzentrationsgefälle thermodynamisch gefördert wurde. Unter Bedingungen, die wegen eines einwärts gerichteten Protonengradienten ungünstig für den Protonentransport waren, konnte unter physiologischen Bedingungen ( $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 5,5$ ; Kap. 2.2.1.4: SBL1-pH 7,5/SPL1-pH 5,5) eine Stromdichte von 1,8 pA/pF (SE = 0,4 pA/pF; n = 4) beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardfehler ähnelten diese Stromdichten damit jenen, die unter  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 9,5$  gemessen wurden. Im Gegensatz dazu konnte bei der zweiten, ins Cytosol gerichteten Protonengradienten-Konstellation von  $\text{pH}_{\text{cyt}} =$

9,5/pH<sub>vac</sub> = 7,5 (Kap. 2.2.1.4: SBL3-pH 9,5/ SPL1-pH 7,5) – und damit im Vergleich zu pH<sub>cyt</sub> = 7,5/pH<sub>vac</sub> = 5,5 eine um den Faktor 100 reduzierte Protonenkonzentration im Cytosol und in der Vakuole vorhanden waren – eine Stromdichte von 0,3 pA/pF (SE = 0,1 pA/pF; n = 6) beobachtet werden (Abb.3.3B).



**Abbildung 3.3. ATP-induzierte Auswärtsströme der V-ATPase bei unterschiedlichen pH-Konstellationen in Mesophyllvakuolen.** (A) Der Anstieg der Auswärtspumpströme bei der Zugabe von 5 mM ATP (grauer Balken) ist bei unterschiedlichen cytosolischen pH-Bedingungen (pH = 5,5 und 7,5) dargestellt, während der luminalen pH-Wert mit 7,5 unverändert blieb. In Grafik (B) wurden die Pumpstromdichten bei variierenden cytosolischen und vakuolären pH-Bedingungen nach Zugabe von 5 mM ATP miteinander verglichen. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte ( $\pm$  SE) der auf  $C_m$  normierten maximalen Protonenpumpstrom-Antworten im Wildtyp dar. Die Anzahl der Experimente betrug von links nach rechts n = 3, 6, 4, 4, 6 (aus Rienmüller et al., 2012).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Veränderung der V-ATPase-Pumpleistung bei 5 mM ATP sehr wahrscheinlich nicht nur vom Protonenkonzentrationsgefälle über der Vakuolenmembran abhängig ist. So konnte zum Beispiel bei pH<sub>cyt</sub> = 5,5/pH<sub>vac</sub> = 7,5 eine Zunahme der Stromdichten um 45% im Vergleich zu pH<sub>cyt</sub> = 7,5/pH<sub>vac</sub> = 9,5 gemessen werden. War das Konzentrationsgefälle der Protonen dagegen ins Cytosol gerichtet (pH<sub>cyt</sub> = 7,5/pH<sub>vac</sub> = 5,5 und pH<sub>cyt</sub> = 9,5/pH<sub>vac</sub> = 7,5), zeigte sich hier eine Abnahme der Pumpstromdichten um ca. 83% zwischen den zwei pH-Konstellationen. Somit könnte die absolute Protonenkonzentration im Cytosol und/oder der Vakuole eine Rolle bei der Regulation der V-ATPase-Aktivität spielen. Darüber hinaus ergaben sich ähnliche

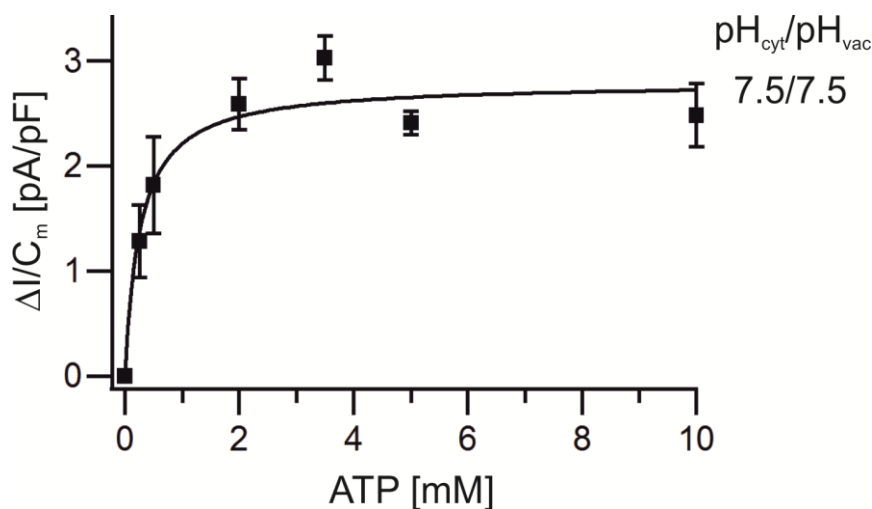
Stromstärken bei allen Versuchsbedingungen in denen ein cytosolischer pH-Wert von 7,5 verwendet wurde. Da die Stromdichten bei diesen konstanten cytosolischen pH-Bedingungen und einer gleichzeitigen Änderung im Lumen ( $\text{pH}_{\text{vac}}$  9,5, 7,5, 5,5) kaum voneinander abweichen, obwohl der pH-Gradient geändert wurde, scheint der cytosolische pH-Wert, im Vergleich zum Lumen, einen größeren Einfluss auf die Pumpaktivität auszuüben.

### **3.1.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Protonentransportkapazität und ATP-Affinität der V-ATPase in Mesophyllvakuolen**

Die in Kapitel 3.1.3 vorgestellten Daten weisen daraufhin, dass die Protonenpumpstromdichte zum einen vom Protonenkonzentrationsgefälle über der Membran abhängt. Zum anderen scheinen auch die absoluten Protonenkonzentrationen im Cytosol und der Vakuole regulierend auf die V-ATPase-Funktion zu wirken. Aufgrund dessen stellte sich die Frage, inwiefern unterschiedliche pH-Werte und -Gradienten innerhalb der Zelle einen Einfluss auf die ATP-Affinität ( $K_m$ ) und maximale Transportkapazität ( $v_{\text{max}}$ ) des Pumpenzym ausüben und dadurch an der Regulation der V-ATPase mitwirken. So könnte die Kenntnis über diese Parameter helfen, die Variationen der in Kapitel 3.1.3 beobachteten Pumpströme zu erklären und damit einen tieferen Einblick in die Mechanik des Protonentransports und die komplexe Regulation der V-ATPase zu gewähren. In Analogie zu Kapitel 3.1.3 wurden daher in der Ganzzell-Patch-Clamp-Ableitung die V-ATPase-Pumpströme im Wildtyp bei 0 mV Haltepotential und verschiedenen ATP- und Protonenkonzentrationen aufgezeichnet. Hierzu wurde nach Einstellung des stabilen Ausgangsstromniveaus jeweils an separaten Mesophyllvakuolen die entsprechende cytosolische ATP-Konzentration (0,25 mM/0,5 mM/2,0 mM/3,5 mM/5,0 mM und 10,0 mM ATP) mittels Applikationspipette hinzugegeben<sup>6</sup>. Anschließend wurden die arithmetischen Mittelwerte ( $\pm$  SE,  $n = 4-5$ ) der auf  $C_m$  normierten, maximalen Stromdichten gegen die ATP-Konzentration bei den entsprechenden pH-Bedingungen aufgetragen (Abb. 3.4 bis 3.6).

<sup>6</sup> Es wurden keine Messungen für 0 mM ATP durchgeführt, da aufgrund der Experimente in Kap. 3.1.1 sichergestellt war, dass ohne ATP kein V-ATPase-Strom vorhanden war.

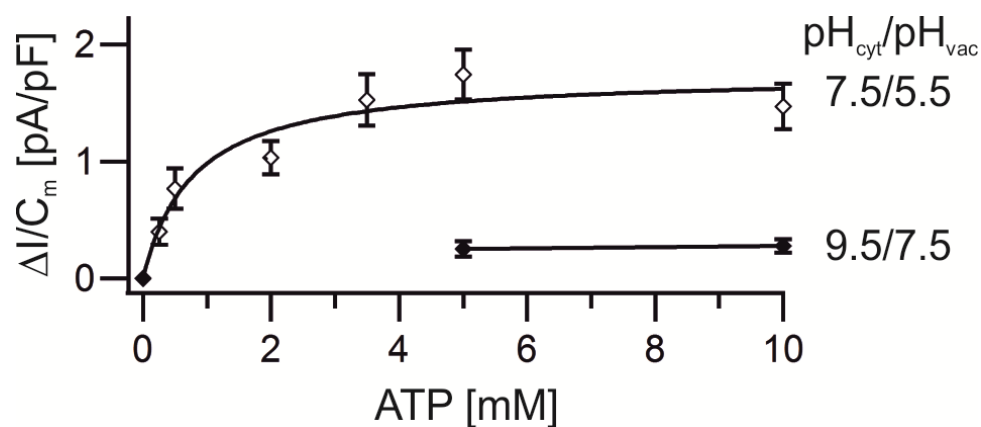
Bei einer symmetrischen, gradientenfreien pH-Konstellation von pH 7,5 im Innen- und Außenmedium (Abb. 3.4; Kap.2.2.1.4: SBL1-pH 7,5/SPL1-pH 7,5) stiegen die ermittelten Stromdichten bei einer Konzentration von 0,25 und 0,5 mM ATP sehr stark an. Bei höheren Konzentrationen (2 und 3,5 mM) fiel die weitere Zunahme der ATP-induzierten Stromdichten dagegen geringer aus, um dann bei 5 mM eine Sättigung zu erreichen. Aufgrund des hyperbolischen Verlaufs der ermittelten Datenpunkte (Abb. 3.4) wurden diese mit einer Michaelis-Menten-Funktion interpoliert. Die darüber abgeleiteten Parameter ( $K_m$ - und  $v_{max}$ -Wert) wurden als Maß für die ATP-Affinität und die maximale Protonentransportkapazität herangezogen, um die Beziehung zwischen Pumpstromdichte und ATP-Dosis quantitativ zu erfassen. In Gegenwart eines symmetrischen pH-Wertes von 7,5 wurde dabei für die ATP-Affinität ein  $K_m$ -Wert von 0,3 mM und für die maximale Protonentransportkapazität ein  $v_{max}$ -Wert von 2,8 pA/pF ermittelt.



**Abbildung 3.4. V-ATPase-Aktivität in Wildtyp-Mesophyllvakuolen unter verschiedenen ATP-Konzentrationen und einem pH-Wert von 7,5 im Innen- und Außenmedium.** Die auf  $C_m$  normierten arithmetischen Mittelwerte ( $\pm$  SE) der Auswärtsströme wurden gegen die unterschiedlichen ATP-Konzentrationen aufgetragen. Die Interpolation der Datenpunkte mittels einer Michaelis-Menten-Funktion lieferte einen  $K_m$ -Wert von 0,3 mM und  $v_{max}$ -Wert von 2,8 pA/pF. Die Anzahl der Experimente für die ATP-Konzentrationen von 0,25 bis 10 mM ATP betrug von links nach rechts  $n = 4, 5, 5, 5, 5$  und 5 (aus Rienmüller et al., 2012).



Unter physiologischen pH-Bedingungen mit  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 5,5$  (Kap.2.2.1.4: SBL1-pH 7,5/SPL2-pH 5,5) und damit mit einem ins Cytosol gerichteten Protonengradienten (Abb. 3.5) wurde ebenfalls bei niedrigen ATP-Konzentrationen (0,25 und 0,5 mM) ein starker Anstieg in den Stromdichten verzeichnet. Mit höheren Konzentrationen fiel die weitere Zunahme in den Stromdichten schwächer aus, um dann ab 5 mM ATP eine Stromsättigung zu erreichen. Die Beschreibung des hyperbolischen Verlaufs der Messdaten mittels einer Michaelis-Menten-Funktion lieferte einen  $K_m$ -Wert von ca. 0,8 mM und für  $v_{\text{max}}$  ca. 1,7 pA/pF. Beim Vergleich der beiden Bedingungen  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 5,5$  und  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 7,5$  konnte bei symmetrischen Bedingungen eine Sättigung der Stromdichten schon bei 2,0 mM ATP festgestellt werden. Zusätzlich führte die Erniedrigung des luminalen pH-Wertes fast zu einer Verdreifachung des  $K_m$ -Wertes, während  $v_{\text{max}}$  um fast 40% kleiner wurde. Mit  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 9,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 7,5$  (SBL3-pH 9,5/SPL1-pH 7,5) wurde eine zweite pH-Konstellation mit einem einwärtsgerichteten Protonengradienten, aber einer 100-fach geringeren cytosolischen und luminalen Protonenkonzentration erzeugt (Abb. 3.5).

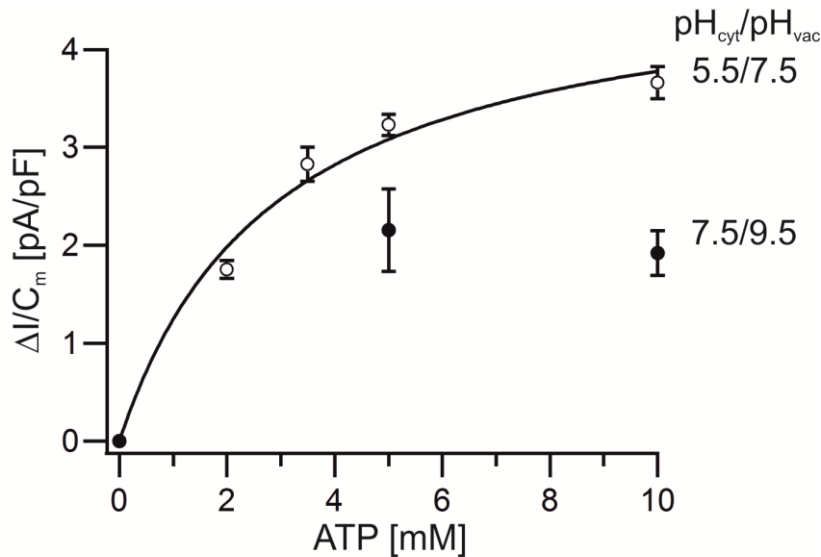


**Abbildung 3.5. V-ATPase-Aktivität in Wildtyp-Mesophyllvakuolen bei verschiedenen ATP-Konzentrationen und einem aus der Vakuole ins Cytosol gerichteten Protonengradienten (pH 7,5<sub>cyt</sub>/5,5<sub>vac</sub> und pH 9,5<sub>cyt</sub>/7,5<sub>vac</sub>).** Die auf  $C_m$  normierten Auswärtsströme sind in Abhängigkeit der unterschiedlichen ATP-Konzentrationen dargestellt. Die einzelnen Symbole geben die Mittelwerte ( $\pm$  SE) an. Die Kurve spiegelt die Interpolation der verschiedenen Datenpunkte mittels einer Michaelis-Menten-Funktion wieder. Für die pH-Bedingungen 7,5<sub>cyt</sub>/5,5<sub>vac</sub> wurde ein  $K_m$ -Wert von 0,8 mM und  $v_{\text{max}}$ -Wert von 1,7 pA/pF ermittelt. Für pH 9,5<sub>cyt</sub>/7,5<sub>vac</sub> konnte ein  $v_{\text{max}}$ -Wert von ca. 0,3 pA/pF bestimmt werden. Für 7,5<sub>cyt</sub>/5,5<sub>vac</sub> wurden von links nach rechts  $n = 3, 5, 4, 4, 4$  und 5 Versuche durchgeführt, bei pH 9,5<sub>cyt</sub>/7,5<sub>vac</sub> jeweils  $n = 6$  (aus Rienmüller et al. 2012).

Aufgrund der extrem unphysiologischen pH-Bedingungen konnten die Stromdichten allerdings nur für 5 und 10 mM ATP gemessen werden, die sich dort schon in der Sättigung befanden (Abb.3.5). Durch lineare Interpolation ergab sich dafür ein  $v_{\max}$ -Wert von ca. 0.3 pA/pF, der nur noch ca. 18% von der Transportkapazität unter physiologischen Bedingungen ( $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 5,5$ ) betrug.

In Analogie zu Kapitel 3.1.3 sollte auch unter einem mit  $\text{pH } 7,5_{\text{cyt}}/9,5_{\text{vac}}$  (Kap. 2.2.1.4: SBL1- $\text{pH } 7,5/\text{SPL3-}\text{pH } 9,5$ ) in die Vakuole gerichteten pH-Gradienten, die Stromdichte der V-ATPase bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen untersucht werden (Abb. 3.6). Aufgrund des sehr unphysiologischen luminalen pH-Wertes konnte ebenfalls nur für 5 und 10 mM ATP Datenpunkte generiert werden, bei denen bereits eine Sättigung der Pumpströme vorlag. Die lineare Interpolation ergab dadurch einen  $v_{\max}$ -Wert von ca. 2 pA/pF. Mit  $\text{pH } 5,5_{\text{cyt}}/7,5_{\text{vac}}$  (Kap. 2.2.1.4: SBL2- $\text{pH } 5,5/\text{SPL1-}\text{pH } 7,5$ ) wurden Bedingungen geschaffen (Abb.3.6), die eine Pumpaktivität der V-ATPase aufgrund eines in die Vakuole gerichteten Protonenkonzentrationsgefälles ebenfalls unterstützen sollten. Die Dosis-Abhängigkeit der Pumpströme wurde über Applikation von 2 mM, 3,5 mM, 5 mM und 10 mM ATP untersucht ( $n = 3-5$ ). Die Messdaten zeigten einen durchgehend hyperbolischen Verlauf, d.h. es war in diesem Fall auch bei 10 mM noch keine Sättigung der Pumpstromdichte zu beobachten.

Die Interpolation mittels einer Michaelis-Menten-Funktion ergab schließlich einen  $K_m$ -Wert von 2,9 mM und mit 4,9 pA/pF eine mehr als doppelt so hohe Transportkapazität im Vergleich zu  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 9,5$ . Die unter diesen Bedingungen ermittelten Werte waren damit die größten für  $K_m$  und  $v_{\max}$ . Insgesamt betrachtet scheint eine cytosolische Ansäuerung damit eine höhere Transportkapazität der V-ATPase für Protonen zu ermöglichen. Gleichzeitig führt ein Anstieg der cytosolischen Protonenkonzentration aber auch zu einer niedrigen ATP-Affinität der Protonenpumpe. Zusätzlich wird der  $K_m$ -Wert anscheinend auch noch durch den vakuolären pH-Wert und/oder den pH-Gradienten über der Vakuolenmembran beeinflusst, da sich bei unterschiedlichen pH-Werten im vakuolären Lumen ( $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5$ ) Abweichungen für  $K_m$  beobachten lassen.



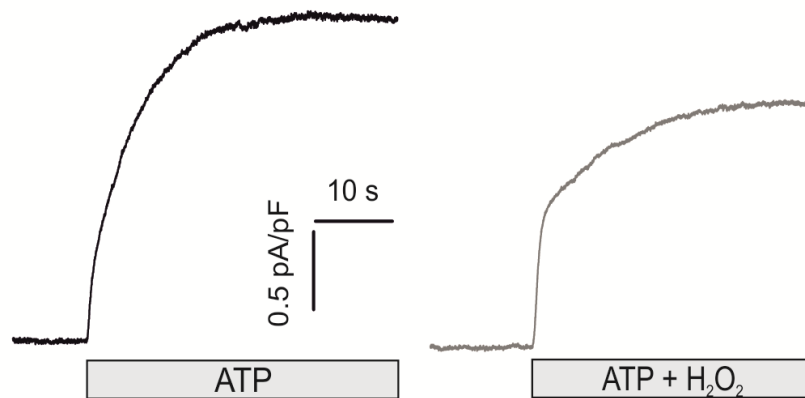
**Abbildung 3.6. V-ATPase-Aktivität in Wildtyp-Mesophyllvakuolen bei verschiedenen ATP-Konzentrationen und einem vom Cytosol in die Vakuole gerichteten Protonengradienten (pH 5,5<sub>cyt</sub>/7,5<sub>vac</sub> und pH 7,5<sub>cyt</sub>/9,5<sub>vac</sub>).** Die Datenpunkte geben die auf  $C_m$  normierten Mittelwerte ( $\pm$  SE) an. Die verschiedenen Messpunkte wurden mittels einer Michaelis-Menten-Funktion interpoliert. Bei pH-Bedingungen von pH 5,5<sub>cyt</sub>/7,5<sub>vac</sub> wurden ein  $K_m$ -Wert von 2,9 mM und ein  $v_{max}$ -Wert von 4,9 pA/pF bestimmt, während der  $v_{max}$ -Wert bei pH 7,5<sub>cyt</sub>/9,5<sub>vac</sub> bei etwa 2 pA/pF  $v_{max}$  lag. Für pH 5,5<sub>cyt</sub>/7,5<sub>vac</sub> wurden für die ATP-Konzentrationen zwischen 2 und 10 mM  $n = 4, 3, 3$  und 5 Experimente durchgeführt. Für pH 7,5<sub>cyt</sub>/9,5<sub>vac</sub> jeweils  $n = 4$  Versuche durchgeführt. Die dargestellten Werte für pH 5,5<sub>cyt</sub>/7,5<sub>vac</sub> wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit 2009 von Florian Rienmüller an der Universität Würzburg erarbeitet (aus Rienmüller et al. 2012).

### 3.1.5 Regulation der V-ATPase-Pumpaktivität durch Oxidationsmittel in Mesophyllvakuolen

*In vitro* Studien in Säugetieren, Pilzen und Pflanzen haben gezeigt, dass die V-ATPasen durch Oxidationsmittel, wie z.B. Wasserstoffperoxid, oxidiertes Glutathion oder Nitrat reversibel inaktiviert werden können, während Reduktionsmittel wie DTT die Aktivität der Protonenpumpe wiederherstellen können (Hager and Lanz, 1989; Feng and Forgac, 1992b; Dschida and Bowman, 1995; Tavakoli et al., 2001; Seidel et al., 2012, Kap. 1.4.2.1). Es wird angenommen, dass drei in allen Eukaryoten konservierte Cysteinreste und ihre assoziierten Disulfidbrücken in der Untereinheit VHA-A im cytosolischen ATP-Hydrolyse-Komplex  $V_1$  dafür verantwortlich sind (Seidel et al., 2012; Kap. 1.4.2.1). Dabei wirken Oxidationsmittel bei *A. thaliana* auf die Disulfidbrücke zwischen dem Cysteinrest an der Position 256, ein Bestandteil

des Nukleotid-bindenden *P-loop*-Motivs, und an Position 535. Für die Disulfidanordnung zwischen den Cysteinen an Position 279 und 535 hingegen wird angenommen, dass sie für die Wiederherstellung der Aktivität wichtig sind bzw. den aktiven Zustand der V-ATPase darstellen (Feng and Forgac, 1992a, 1992b; Feng, Y., Forgac, 1994; Forgac, 1999; Seidel et al., 2012). Um die Transportfunktion der V-ATPase in Bezug auf ihre Redox-Regulation im intakten Pflanzensystem weiterführend zu charakterisieren, wurden von den Arbeitsgruppen um Juniorprof. Dr. Thorsten Seidel (Universität Bielefeld, Deutschland) und Prof. Dr. Karin Schumacher (Universität Heidelberg, Deutschland) zusätzliche *VHA-A*-Cystein-Mutanten mit Col-0 Hintergrund (*VHA-A C256S*, und *VHA-A C535S*) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bei diesen Mutanten wurden in der *VHA-A*-Untereinheit Cys<sup>256</sup>, Cys<sup>279</sup> und Cys<sup>535</sup> mittels zielgerichteter Mutagenese gegen Serinreste ausgetauscht (Seidel et al., 2012). Vorausgehende biochemische Versuche mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatten gezeigt, dass die ATP-Hydrolyseaktivität der V-ATPase sowohl in Wildtyp als auch in den *C535S*- und *C279S*-Mutanten im Vergleich zur *C256S*-Mutante deutlich reduziert waren (Seidel et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb unter Verwendung der Patch-Clamp-Technik untersucht werden, ob sich die Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch auf die Protonenpumpströme der V-ATPase in Mesophyllvakuolen auswirkt. Da Seidel et al. (2012) deutliche Auswirkungen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die ATP-Hydrolyse in den *C535S*- und *C256S*-Mutanten gefunden hatten, wurden die Patch-Clamp-Experimente an diesen Mutanten mit Col-0 Wildtyp-Pflanzen als Kontrollgruppe durchgeführt. Die Aufzeichnung der V-ATPase-vermittelten Protonenauswärtsströme erfolgte in der Ganzzelleableitung unter Standardlösungsbedingungen (Kap. 2.2.1.4, 2.2.1.6: SBL1-pH 7,5/SPL2-pH 5,5) in Gegenwart eines physiologischen pH-Gradienten (pH 7,5<sub>cyt</sub>/5,5<sub>vac</sub>). Sowohl 5 mM ATP als auch das Gemisch aus 5 mM ATP und 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> waren in SBL1-pH 7,5 gelöst und wurden jeweils direkt an der cytosolischen Vakuolenmembranseite individueller Vakuolen mittels einer Applikationspipette appliziert. Dabei wurde unter beiden Versuchsbedingungen bei einem Haltepotential von 0 mV durch die ATP-Applikation ein Protonenauswärtsstrom ausgelöst (vgl. Kap. 3.1.1). Der Vergleich V-ATPase-typischer Protonenströme in An- und Abwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte, dass die Applikation des starken Oxidationsmittels zu einer deutlichen Reduktion der Protonenauswärtsströme führte (Abb. 3.7, 3.8). So ist beispielsweise anhand der in Abbildung 3.7 dargestellten repräsentativen Stromspuren exemplarisch zu sehen, dass die ATP-Applikation

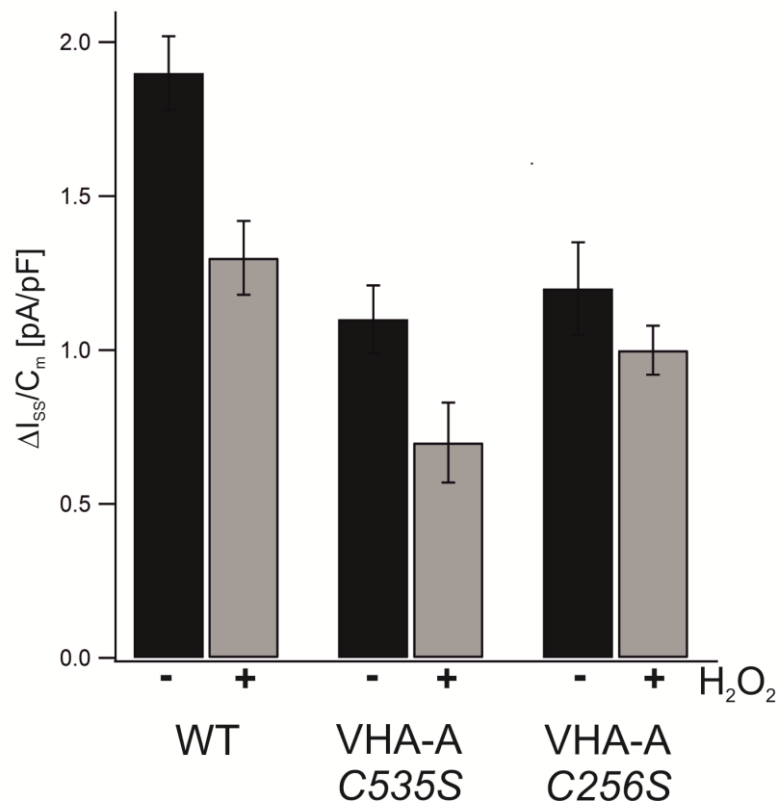
zu einem Anstieg des Pumpstromes auf ca. 2,1 pA/pF führt, während bei ATP in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lediglich ein Anstieg von ca. 1,6 pA/pF zu beobachten war.



**Abbildung 3.7. Repräsentative, ATP-induzierte V-ATPase-Auswärtsströme von Wildtyp-Mesophyllvakuolen in An- und Abwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Es sind die auf C<sub>m</sub> normierten Protonenauswärtsströme in An- und Abwesenheit von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Cytosol während der Applikation von 5 mM ATP gezeigt. Die grauen Balken geben den Zeitraum der ATP- bzw. ATP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Applikation an (aus Seidel et al. 2012).

Patch-Clamp-Messungen an C535S und C256S ergaben, dass im Vergleich zum Wildtyp (n = 4) mit ca. 1,9 pA/pF (SE = 0,12 pA/pF) die Ströme in beiden Mutanten schon bei der Applikation von 5 mM ATP – in Abwesenheit eines Oxidationsmittels – deutlich niedriger waren (Abb. 3.8). So erreichten die durchschnittlichen Protonenstromdichten bei C535S einen Wert von ca. 1,1 pA/pF (SE = 0,11 pA/pF, n = 5) und damit nur ca. 58% des Wildtyp-Stromniveaus. Bei der Mutante C256S waren es mit ca. 1,2 pA/pF (SE = 0,15 pA/pF, n = 3) noch ca. 63% der Wildtyp-Stromdichte. Bei der Verwendung von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zusätzlich zu 5 mM ATP konnte außerdem beobachtet werden, dass bei allen drei verwendeten Pflanzenlinien eine Verminderung der Pumpströme auftrat. Die Pumpstromdichte in Wildtyp-Vakuolen war mit ca. 1,3 pA/pF (SE = 0,12 pA/pF, n = 6) um 32% gegenüber den durchgeführten Kontrollmessungen in Abwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert. Mit ca. 0,7 pA/pF (SE = 0,13 pA/pF, n = 5) wurde in der C535S-Mutante mit Oxidationsmittel 36% weniger Strom gemessen werden. In C256S konnte mit 1 pA/pF (SE = 0,08 pA/pF, n = 4) eine deutlich geringere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Abnahme um nur 17% ermittelt werden (Abb. 3.8). Die Daten zeigten, dass es aufgrund des Oxidationsmittels zu einer ähnlich starken Verminderung der Transportrate in WT und C535S kommt (ca. 32% und 36%). Zusätzlich war bei der Mutante

allerdings auch schon die Ausgangstromdichte erheblich reduziert. Bei der *C256S*-Mutante betrug die Verringerung der Protonentransportrate aufgrund einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Applikation mit 17% nur gut die Hälfte im Vergleich zu Col-0 und *C535S*.



**Abbildung 3.8.**  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Effekt auf die V-ATPase-Pumpaktivität in Mesophyllvakuolen von Wildtyp-Pflanzen und den VHA-A-Mutanten *C535S* und *C256S*. Dargestellt sind die durch 5 mM ATP induzierten, maximalen Protonenauswärtsströme in Abwesenheit ((-), schwarzer Balken) und Anwesenheit von 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ((+), grauer Balken). Die makroskopische Stromaufzeichnung erfolgte bei einem Haltepotential von 0 mV. Die Stromdichten entsprechen den Mittelwerten ( $\pm$  SE) aus der folgenden Anzahl von Experimenten:  $n = 4, 6, 5, 5, 3$  und  $4$  (von links nach rechts). In den Experimenten wurde SBL1-pH 7,5 und SPL2-pH 5,5 als Bad- und Pipettenlösung verwendet (aus Seidel et al.2012).

### **3.2 Elektrophysiologische *in vivo* Untersuchungen von vakuolären Membranleitfähigkeiten in *Arabidopsis thaliana* Wurzeln mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme**

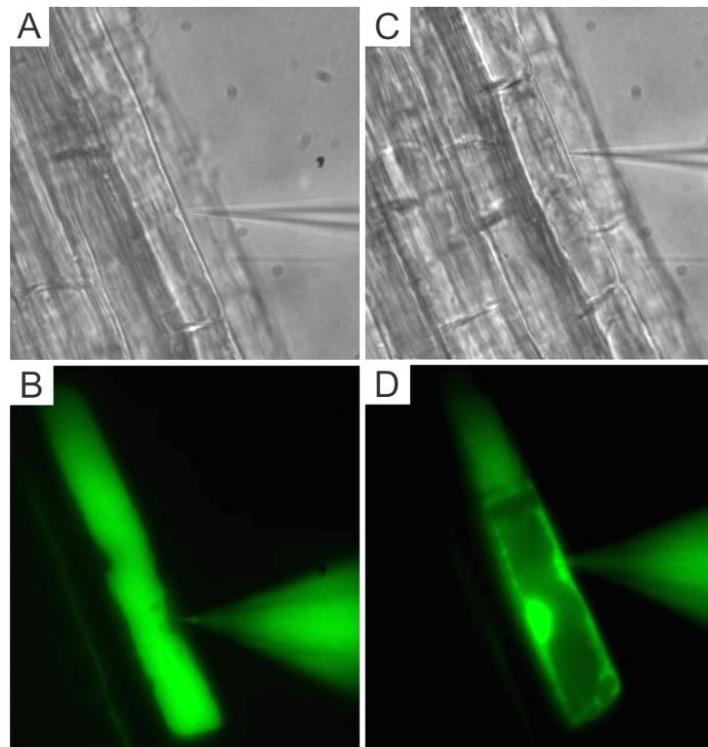
Neben den vielen Vorteilen, die die Patch-Clamp-Technik in Bezug auf elektrophysiologische Messungen an Vakuolen auszeichnet, wie zum Beispiel definierte Lösungsbedingungen im Innen- und Außenmedium oder die Möglichkeit von Einzelkanalmessungen (Kapitel 2.4), hat diese Methode allerdings auch einen Nachteil. Cytosolische Regulationsfaktoren, die nicht mit der Vakuolenmembran assoziiert sind, werden bei der Vakuolenisolierung (Kapitel 2.1.2) höchstwahrscheinlich ausgewaschen. Die Abwesenheit dieser Faktoren könnte zum Beispiel die Aktivität, Leitfähigkeit oder die Kinetik von Ionentransportproteinen entscheidend beeinflussen. Um dennoch einen Einblick zu erhalten, wie sich die vakuolären Membranleitfähigkeiten *in vivo* tatsächlich darstellen, kann die Mikroelektroden-Einstich-Technik verwendet werden (Kap. 2.3). Durch diese minimalinvasive Methode können elektrophysiologische Untersuchungen mit Hilfe von intrazellulären Glasmikroelektroden direkt an ganzen intakten Pflanzen oder Pflanzenteilen vorgenommen werden. Da die pflanzlichen Zellen dabei bis auf die Einstichstelle unverletzt sind und in ihrer *in vivo* Umgebung verbleiben, ist das Cytosol und somit potentielle Regulationsfaktoren intakt.

In früheren Arbeiten an Vakuolen von intakten Pflanzen bzw. Teilen davon – unter anderem von Goldsmith und Cleland (1978), Walker (1996) oder Lew (2004), – konnten bereits einige elektrische Eigenschaften der Vakuolenmembran (Membranpotentiale und Änderungen der Ionenleitfähigkeiten durch hyperosmotische Medien) mit Hilfe des Einstiches von intrazellulären Mikroelektroden untersucht werden. Darauf aufbauend sollte nun eine Methode entwickelt werden, um die Mikroelektroden zuverlässig in die Vakuole von *A. thaliana* Rhizodermiszellen einstechen und die Membranleitfähigkeiten der Vakuole untersuchen zu können.

### 3.2.1 Lokalisation der Mikroelektroden in Wildtyp-Wurzelrhizodermiszellen

Bevor Messungen zu den vakuolären Membranleitfähigkeiten von Wurzeln an *A. thaliana* Keimlingen (Kap. 2.1.5) mit Hilfe der Mikroelektroden-Einstich-Technik durchgeführt werden konnten, musste gewährleistet werden, dass die Spitze der Mikroelektroden je nach experimenteller Fragestellung zuverlässig im Cytosol oder der Vakuole platziert wurde. Dazu wurde als Vorarbeit von Yi Wang (Key Laboratory, Agricultural University of Beijing, China und Universität Würzburg, 2012; persönliche, unveröffentlichte Notiz) der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow mit Hilfe einer *triple-barreled* Elektrode in Atrichoblasten injiziert. Diese Zellen eigneten sich sowohl aufgrund der Abwesenheit von Chloroplasten (Abb. 3.9A und C) und der dadurch nicht vorhandenen, störenden Chlorophyllfluoreszenz (Abb. 3.9 B und D) als auch wegen der exponierten äußeren Lage an der Wurzel besonders gut für die Einstich-Experimente. Dabei war eine Elektrode mit Farbstoff gefüllt, während die verbliebenen, KCl-gefüllten Elektroden der Strom- und Spannungsaufzeichnung dienten. Dadurch war eine Ortsbestimmung der Elektrodenspitze mittels Fluoreszenz möglich. Zusätzlich gelang es Wang für die Plasmamembran ein Potential von  $-172$  mV (SE = 3 mV, n = 8) zu bestimmen (persönliche, unveröffentlichte Notiz, 2012). Beim Einstich in die Vakuole konnte Yi Wang zusätzlich ein freilaufendes Potential ( $E_m$ ) von  $-141$  mV (SE = 4 mV, n = 16) aufzeichnen (Key Laboratory, Agricultural University of Beijing, China und Universität Würzburg, 2012; persönliche, unveröffentlichte Notiz). Da aufgrund der Fragestellung zur Untersuchung der vakuolären Leitfähigkeiten (Kap. 3.2.3) in der vorliegenden Arbeit der calciumsensitive Fluoreszenzfarbstoff FURA-2 (Kap. 2.3.5) im Cytosol eingesetzt wurde, konnte die korrekte Lokalisation der Farbstoff-injizierenden Mikroelektrode bei den entsprechenden Experimenten über die FURA-2-Fluoreszenz eindeutig bestimmt werden (Abb. 3.9). Bei der Verwendung von *double-barreled* Elektroden ohne Fluoreszenzfarbstoff (Kap. 3.2.2) wurde die Ortsbestimmung der Strom-Spannungselektroden stattdessen über die gemessenen freilaufenden Potentiale beim Einstich in die Vakuole vorgenommen. Dabei dienten die von Yi Wang ermittelten Potentiale ( $-141$  mV) als Anhaltspunkt.



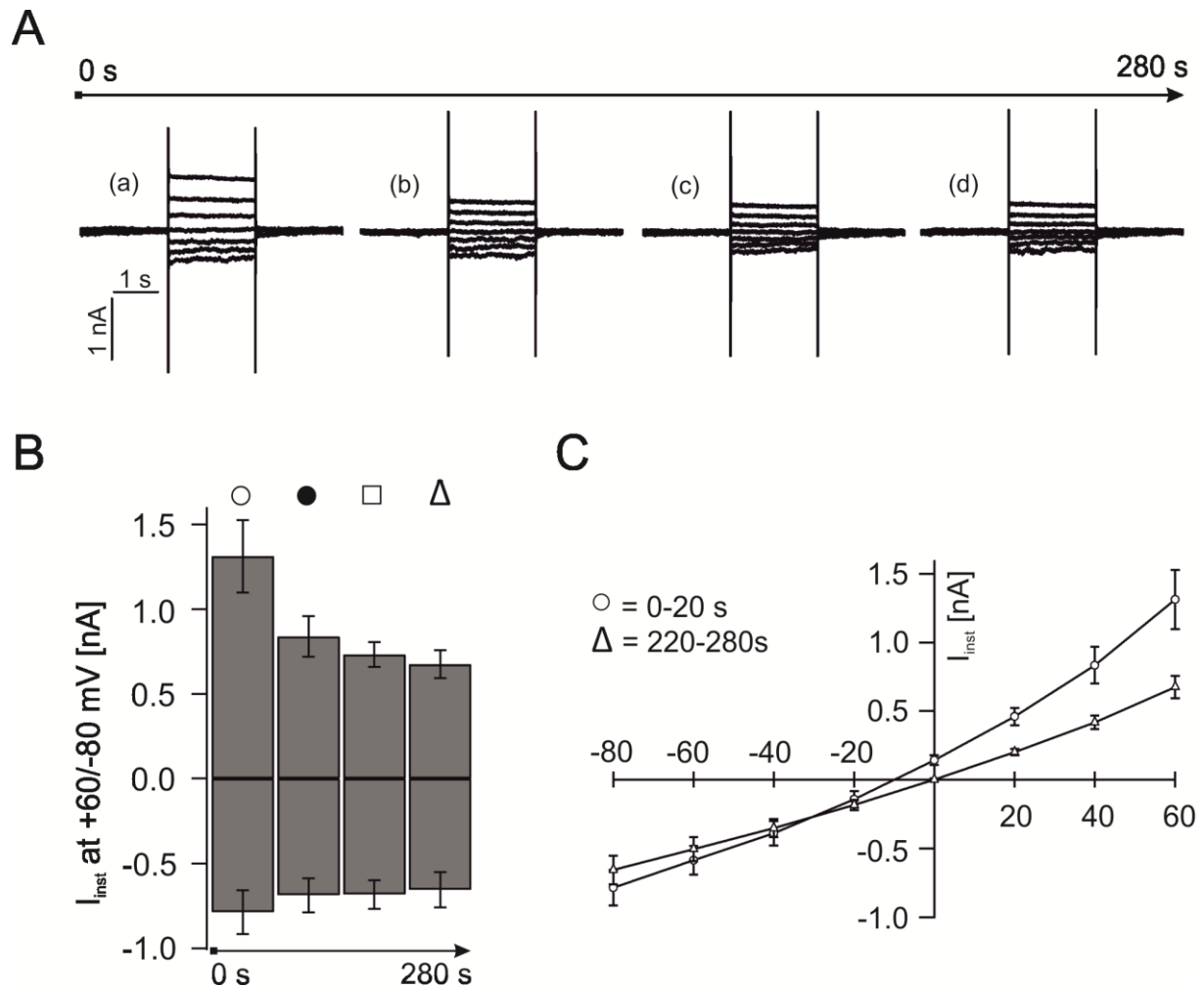


**Abbildung 3.9. FURA-2-Beladung von *A. thaliana* Wurzelrhizodermiszellen.** In Bild (A) ist die Durchlichtaufnahme eines Atrichoblasten (Col-0) abgebildet, bei der eine *single-barreled* Elektrode in die Vakuole eingestochen wurde. (B) zeigt die iontophoretische vakuoläre Beladung der Zelle aus Abbildung A mit 20 mM FURA-2 ( $I_{\text{inject}} = -1$  nA für ca. 1 min). In der Durchlichtaufnahme von (C) ist eine *single-barreled* Elektrode dargestellt, die in das Cytosol einer Wurzelrhizodermiszelle eingestochen wurde. In (D) wurde das Cytosol der Zelle aus Abbildung C durch die Beladung mit 20 mM FURA-2 ( $I_{\text{inject}} = -1$  nA für ca. 1 min) sichtbar gemacht. Für die Experimente wurde die Standardlösung SBL5-0.1KCl pH7 verwendet.

### 3.2.2 Änderungen der Membranleitfähigkeiten nach dem Einstich von *double-barreled* Elektroden in Wurzelrhizodermisvakuolen

Die Untersuchung der Membranleitfähigkeiten wurde an den Vakuolen der Atrichoblasten von intakten *A. thaliana* Wildtyp-Keimlingen durchgeführt. Nach dem Einstich der *double-barreled* Elektroden (unter Verwendung der Standardlösung, Kap. 2.2.2.3: SBL5-0.1KCl pH7) und Überprüfung der Elektroden-Lokalisation im Vakuolenlumen wurden kontinuierliche Pulsprotokolle ausgehend vom jeweiligen freilaufenden Potential der Vakuole, welches als Haltepotential eingestellt wurde ( $E_m = -133$  mV  $\pm$  SE = 6 mV, n = 10), angelegt. Dabei wurden jeweils im Abstand von rund 50 s die Membranspannung immer in 20 mV-Schritten im Bereich zwischen -80 mV und +60 mV relativ zum Haltepotential geändert (Kap. 2.3.6). Bei

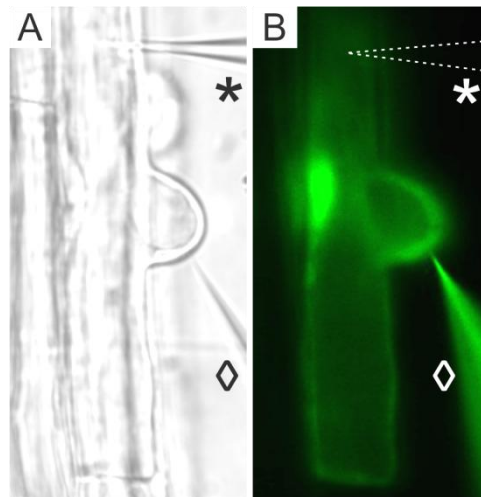
der Analyse der daraus resultierenden, annähernd linearen Ströme waren die instantanen Ströme bei den einzelnen Messzeitpunkten (Abb. 3.10A, a-d) dabei immer minimal größer als die *steady state* Ströme (3.10A) und es konnte eine Abnahme der Stromantworten über die gesamte Dauer von 280 s verzeichnet werden. Im Rahmen einer statistischen Analyse der instantanen Ströme ( $n = 10$ ) wurden diese bei -80 bzw. +60 mV entsprechend ihres Aufzeichnungszeitpunktes verschiedenen Zeiträumen zugeordnet: ( $\circ$ ) = 0-20 s, ( $\bullet$ ) = 75-100 s, ( $\square$ ) = 150-180 s, ( $\Delta$ ) = 220-280 s (Abb. 3.10B). Dadurch konnte beobachtet werden, dass die Leitfähigkeiten für die betrachteten Spannungen über die gesamte Dauer kontinuierlich abnahmen. Konnten bei 0-20 s noch 1,3 nA (SE = 0,2 nA) bei +60 mV verzeichnet werden, waren es bei 220-280 s nur noch 0,7 nA (SE = 0,1 nA). Bei -80 mV fiel der Stromrückgang, ausgehend von einer insgesamt geringeren Ausgangsstromstärke, von -0,8 nA am Anfang (SE = 0,1 nA) zu -0,7 nA (SE = 0,1 nA) am Ende des Messzeitraumes im Vergleich dazu sehr gering aus. Zusätzlich konnte bei der Auftragung der Ströme über den gesamten Spannungsbereich (von -80 bis +60 mV) bei zehn Experimenten zum Zeitpunkt 0-20 s und 220-280 s (Abb. 3.10C) beobachtet werden, dass es neben den nahezu linearen Strom-Spannungsverläufen zwischen 0 und +60 mV einen deutlichen Rückgang der Ströme zwischen den beiden Zeiträumen gab, während bei negativen Spannungen keine großen Veränderungen beobachtet werden konnten. Gleichzeitig konnte eine Verschiebung des Umkehrpotentials  $E_{rev}$  von -10 zu 0 mV verzeichnet werden. Dieser systematisch auftretende Rückgang der positiven Ströme um fast 50%, die immer kurz nach dem Einstich der Glasmikroelektroden auftrat, könnte ein Hinweis auf eine durch die Einstich-Verwundung hervorgerufene, stressbedingte Regulation der vakuolären Leitfähigkeiten sein.



**Abbildung 3.10. Zeitliche Abnahme von Ionenströmen nach Einstich einer *double-barreled* Elektrode in Wurzelrhizodermiszellen von *Col-0*.** In (A) sind Stromantworten der vakuolären Membranleitfähigkeiten eines Atrichoplasten bei verschiedenen Zeitpunkten (a-d; der zeitliche Abstand zwischen den abgebildeten Rohspuren betrug ca. 50 s) während einer Gesamtmessdauer von 280 s wiedergegeben. Dabei wurde im Spannungsbereich von +60 mV bis -80 mV (in 20 mV-Schritten), ausgehend vom Haltepotential zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Einstich der *double-barreled* Elektrode gemessen. (B) Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittlichen instantanen Membranleitfähigkeiten von zehn Atrichoplastenvakuolen zwischen null und 280 s nach dem Einstich bei +60 bzw. -80 mV. Die Symbole repräsentieren die Zeiträume, in denen die verschiedenen Messungen nach dem Einstich der Elektrode vorgenommen wurden: (○) = 0-20 s, (●) = 75-100 s, (□) = 150-180 s, (Δ) = 220-280 s. (C) Das Strom-Spannungsdiagramm zeigt die durchschnittlichen instantanen ( $I_{\text{inst}}$ ) Stromantworten ( $n = 10$ ) im Bereich von -80 bis +60 mV im Zeitraum von 0-20 (○) bzw. 220-280 s (Δ) aus (B). Bei den in (A-C) angegebenen Strömen und Spannungen wurde die Vorzeichenkonvention für Endomembranen (Bertl et al., 1992) berücksichtigt.

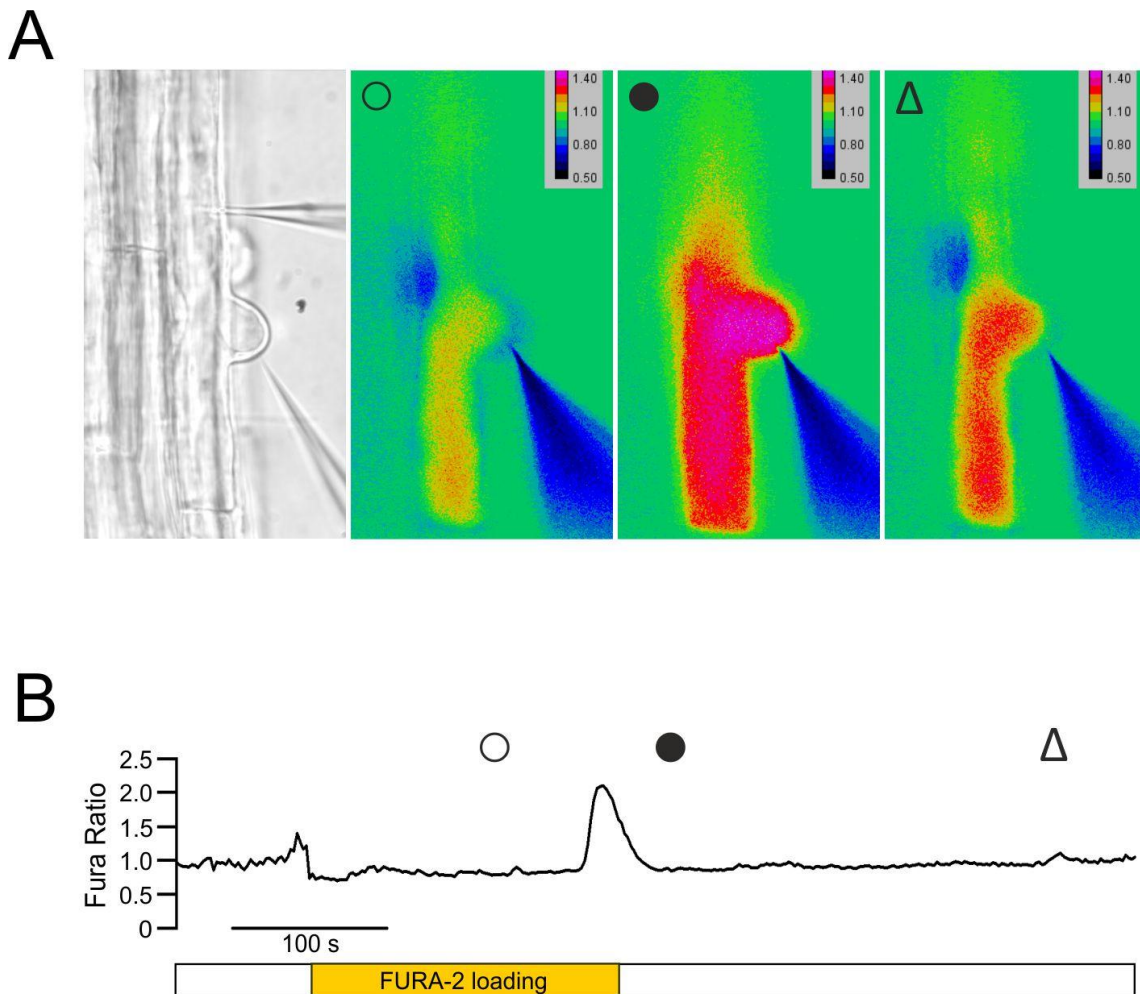
### 3.2.3 Untersuchung der calciumabhängigen Regulation vakuolärer Membranleitfähigkeiten mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 in Trichoblasten

Calcium spielt in Pflanzen unter anderem eine wichtige Rolle bei Zellverwundung oder der Regulation vakuolärer Ionenkanalaktivitäten (siehe Kap. 1.3) wie z.B. beim TPC1-Kanal (Hedrich and Neher, 1987; Beyhl et al., 2009; Dadacz-Narloch et al., 2011; Rienmüller et al., 2010) oder TPK1-Kanal (Bihler et al., 2005; Gobert et al., 2007; Latz et al., 2007). Deshalb wurde aufgrund der in Kapitel 3.2.2 vorgestellten Ergebnissen die Arbeitshypothese aufgestellt, dass cytosolisches Calcium möglicherweise an den Änderungen der vakuolären Membranleitfähigkeiten beteiligt ist. Dieser Aspekt sollte an den Wurzeln von *A. thaliana* Col-0 Keimlingen durch die Beladung des Cytosols mit dem calciumsensitiven Farbstoffs FURA-2 geprüft werden. Mit Hilfe einer Kombination aus *single-* und *double-barreled* Elektroden (SBL5-0.1KCl pH7, Kap. 2.2.2.3) sollten dabei sowohl Veränderungen der Calciumkonzentration als auch der Membranleitfähigkeiten aufgezeichnet werden. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Experimenten (Kap. 3.2.1 und 3.2.2) wurden diese Untersuchungen an Trichoblasten durchgeführt, da sich dieser Zelltyp aufgrund des ausgeprägten Cytosol-Pools an der Wurzelhaarspitze besser für das Einstechen einer zweiten Mikroelektrode eignete (Abb. 3.11). Die *double-barreled* Elektrode wurde in die Vakuole eingestochen (Abb. 3.11 (\*)) und ermöglichte vakuoläre Leitfähigkeiten elektrophysiologisch zu erfassen. Um den intrazellulären Calciumlevel simultan aufzeichnen zu können, wurde anschließend immer eine *single-barreled* Elektrode ins Cytosol eingeführt (Abb. 3.11 (◇)) und der darin enthaltene calciumsensitive Farbstoff (20 mM) FURA-2 iontophoretisch injiziert (Abb. 3.11). Dadurch konnten mögliche Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentrationen anhand von Veränderungen der FURA-2-Absorptionskoeffizienten bei gleichzeitiger Erfassung der vakuolären Membranleitfähigkeiten am Trichoblasten aufgezeichnet werden.



**Abbildung 3.11. FURA-2-Beladung eines *A. thaliana* Col-0 Trichoblasten.** (A) stellt die Durchlichtaufnahme eines Trichoblasten dar. In der oberen Hälfte ist die *double-barreled* Elektrode (\*) zu sehen, die in die Vakuole eingestochen wurde. In der Bildmitte ist die *single-barreled* Elektrode (◇) abgebildet, die in das Cytosol eingeführt wurde. (B) zeigt die cytosolische Beladung des Trichoblasten mit 20 mM FURA-2 Farbstoff ( $I_{\text{inject}} = -1$  nA für ca. 3 min). In der oberen Bildhälfte ist dabei die Position der zweiten Elektrode (\*) schematisch dargestellt.

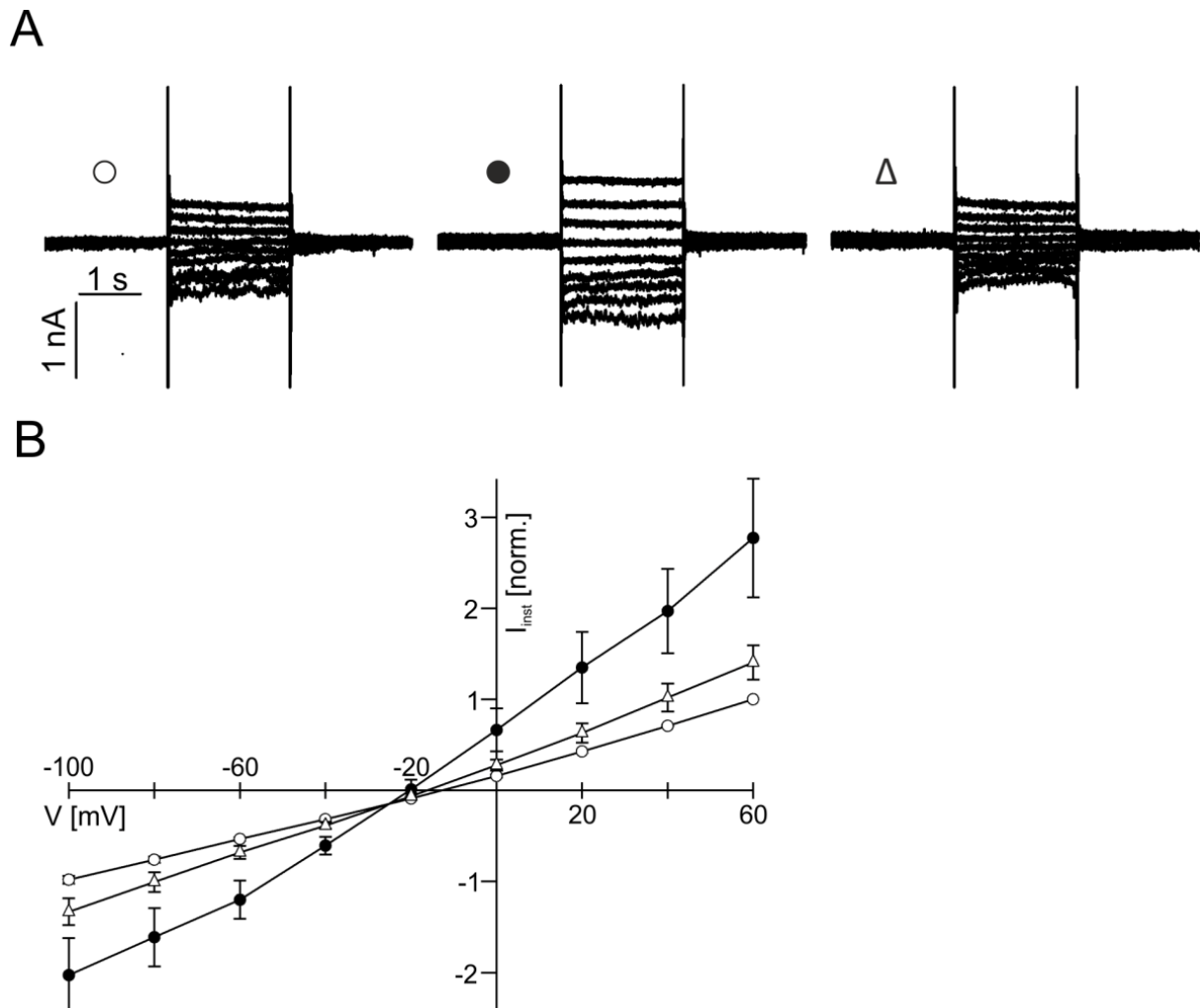
Da in den vorhergehenden Untersuchungen (Kapitel 3.2.2) herausgearbeitet werden konnte, dass die Membranleitfähigkeiten nach dem Einstich langsam abnahmen und dies möglicherweise auf eventuelle Veränderungen der Calciumkonzentration zurückzuführen ist, wurde das Abklingen dieser Reaktion zunächst abgewartet. Dazu wurde erst sechs Minuten nach dem Einstich beider Elektroden mit den eigentlichen Messungen potentieller Calciumänderungen begonnen. Hierzu wurde FURA-2 für drei Minuten bei -1 nA in das Cytosol injiziert (Abb. 3.12 und Kap. 2.3.5). In drei Zellen konnte daraufhin insgesamt fünf Mal eine spontane kurzzeitige Zunahme des FURA-2-Ratios um durchschnittlich 1,3 (SE = 0,2; n = 5; Abb. 3.12) bestimmt werden, was einer cytosolischen Calciumerhöhung entspricht. Um die Effekte dieser Calciumzunahme auf die vakuoläre Membranleitfähigkeit untersuchen zu können, wurden simultan zur Fluoreszenzmessung, ausgehend vom jeweiligen freilaufenden Potential der Vakuole  $E_m$  (Kap. 3.2.1), Spannungspulsprotokolle von -100 bis +60 mV in 20 mV-Schritten für jeweils 2 s angelegt (Kap. 2.3.6, Abb. 2.3B). Die Leitfähigkeitsmessungen wurden dazu bei einem niedrigen Calciumspiegel (Abb. 3.12, (○)), sofort nach dem Anstieg (Abb. 3.12, (●)) und nach einer längeren Calcium-Abklingphase (Abb. 3.12, (Δ)) durchgeführt.



**Abbildung 3.12. Aufzeichnung der Änderungen im cytosolischen Calciumspiegel von intakten Wildtyp-Trichoblasten mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2.** (A) präsentiert die Momentaufnahmen der FURA-2-Ratio-Änderungen während des Anstiegs und Abfalls des cytosolischen Calciumniveaus in einem Trichoblasten unter Verwendung von 20 mM FURA-2. Der Farbstoff wurde iontophoretisch mittels einer *single-barreled* Elektrode ins Cytosol injiziert. Von links nach rechts dargestellt sind: Durchlichtaufnahme eines Trichoblasten mit zwei intrazellulären Mikroelektroden, FURA-2-Ratio vor dem Calciumanstieg (o), sofort nach dem kurzzeitigen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration (●) und nach einer kurzen Calcium-Abklingphase (Δ). Abbildung (B) zeigt einen Ausschnitt des Fura-2-Ratio-Verlaufs über 25 Minuten, inklusive FURA-2-Beladung (gelber Balken), während die Symbole (o, ●, Δ) den Zeitpunkt der angelegten Pulsprotokolle (-100 bis +60 mV) wiedergeben.

Dadurch konnte beobachtet werden, dass die durch die Spannungsklemmtechnik aufgezeichneten Ströme der Trichoblasten (Abb. 3.13A) bei den einzelnen Spannungsschritten zwischen -100 und +60 mV jeweils nahezu lineare Stromantworten aufwiesen. Weiterhin konnte nach einem transienten Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration (Abb. 3.12, (●)) auch eine Vergrößerung der Ströme beobachtet

werden (Abb. 3.13, (●)). Etwa 250 s nach dem Rückgang des Calciumspiegels auf das ursprüngliche Level waren die Stromstärken ebenfalls reduziert und lagen damit fast wieder auf dem Ausgangsniveau (Abb. 3.12, 3.13, (Δ)).



**Abbildung 3.13. Calcium-induzierte Ströme in der Vakuole von intakten Trichoblasten.** In (A) sind repräsentative Ein- und Auswärtsströme einer Trichoblastenvakuole im Spannungsbereich von -100 bis +60 mV, ausgehend vom Haltepotential, abgebildet. In Analogie zu Abbildung 3.12 geben die Symbole den Zeitpunkt der applizierten Spannungspulse an: ○/Δ = niedriger Calciumlevel, ● = kurz nach dem Anstieg der Calciumkonzentration. Die in (B) aufgetragenen instantane Strom-Spannungskennlinien sind in Abhängigkeit der durchschnittlichen Stromstärken ( $\pm$  SE,  $n = 5$ ) bei +60 mV vor dem Calciumanstieg (Δ) aufgetragen worden. Bei den angegebenen Strömen und Spannungen wurde die Vorzeichenkonvention für Endomembranen (Bertl et al., 1992) berücksichtigt.

Zur statistischen Analyse (Abb. 3.13B) wurden die durchschnittlichen Stromstärken bei +60 mV als Referenzpunkt herangezogen und die anderen Stromantworten im Verhältnis dazu aufgetragen. Daraus ergab sich dann eine durch Calcium ausgelöste Zunahme der

vakuolären Membranleitfähigkeiten bei +60 mV von 1 (SE = 0,7, n = 5) auf 2,8 um. Bei -100 mV vergrößerten sich die Ströme von -1 auf ca. -2 (SE = 0,4, n = 5). Mit 1,4 (SE = 0,2, n = 5) und -1,3 (SE = 0,1, n = 5) erreichten die Ströme 250 s nach dem temporären Anstieg des Calciumspiegels bei  $\pm 60$  mV fast wieder ihr Ausgangsniveau (Abb. 3.13B). Diese Ergebnisse belegen, dass eine erhöhte cytosolische Calciumkonzentration unmittelbar zu einer deutlichen Erhöhung der vakuolären Leitfähigkeiten bei gleichzeitig nahezu unveränderten Umkehrpotentialen führt. Aufgrund dessen werden die Veränderungen in den Stromamplituden wahrscheinlich durch Membranleitfähigkeiten für die gleichen Ionenarten hervorgerufen.



## 4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten die Auswirkungen von intrazellulären pH-Wert-Änderungen und die eines Oxidationsmittels auf die Pumpaktivität der V-ATPase in *A. thaliana* mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch aufgeklärt werden. Darüber hinaus konnten *in vivo* Studien an Wurzelrhizodermiszellen von *A. thaliana* Keimlingen eine calciumabhängige Regulation von vakuolären Membranleitfähigkeiten durch die Kombination aus intrazellulären Mikroelektroden und fluoreszenzmikroskopischen Techniken nachweisen.

### 4.1. Die Protonenkopplungsrate der V-ATPase in Abhängigkeit von luminalen pH-Werten

Bis Anfang der 1990er Jahre wurde für die V-ATPase immer eine feste Protonenkopplungsrate postuliert. So wurde aufgrund der Enzymstruktur – mit drei katalytischen ATP-Bindungsstellen und sechs protonenbindenden c-Untereinheiten – und der evolutionären Verwandtschaft zur F-ATPase angenommen, dass immer zwei Protonen pro hydrolysiertem ATP aus dem Cytosol in das Vakuolenlumen gepumpt werden (Bennett and Spanswick, 1984; Guern et al., 1989; Cross and Taiz, 1990; Schmidt and Briskin, 1993; Müller and Taiz, 2002; Rienmüller et al., 2012). Später wurde für *Beta vulgaris*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Citrus limon* L. (var. Schaub Rough Lemon) postuliert, dass sich die V-ATPase im Gegensatz zur Plasmamembran-H<sup>+</sup>-ATPase durch eine variable Kopplungsrate für den Protonentransport pro ATP auszeichnet (Briskin and Reynolds-Niesman, 1991; Davies et al., 1994; Briskin et al., 1995; Yabe et al., 1999; Müller and Taiz, 2002; Kettner et al., 2003; Rienmüller et al., 2012). Es wurde angenommen, dass die Variationen in der Protonentransportrate pro hydrolysiertem ATP sowohl durch die Protonenkonzentration auf beiden Seiten der Vakuolenmembran, als auch durch das Membranpotential beeinflusst werden würden (Davies et al., 1994; Müller and Taiz, 2002; Kettner et al., 2003). Diese Annahme wurde in der vorliegenden Arbeit an der V-ATPase von *tpc1-2* Verlustmutanten von *A. thaliana* durch die in Kapitel 3.1.2 durchgeführten Experimente überprüft. Dazu wurde der vakuoläre pH-Wert verändert und mit Hilfe eines

thermodynamischen Ansatzes die Protonenkopplungsrate berechnet (Kap. 2.6). Bei einem luminalen pH-Wert von pH 7,5 konnte das zur Berechnung benötigte Umkehrpotential bei -94,5 mV (SE = 14.0 mV) erfasst werden. Bei einer Änderung der Protonenkonzentration von pH 7,5 auf 6,5 ergab sich eine Verschiebung des Umkehrpotentials auf -67,5 mV (SE = 10,6 mV). Bei einer weiteren Erhöhung der Protonenkonzentration ( $\text{pH}_{\text{vac}} = 5,5$ ) konnte abschließend ein Umkehrpotential von -49,6 mV (SE = 3,9 mV) ermittelt werden (Rienmüller et al., 2012). Demzufolge konnte bei einer schrittweisen Ansäuerung des Vakuolenlumens aufgrund der theoretischen Grundlagen zur Berechnung der Protonenkopplungsrate aus Kapitel 2.6, jeweils eine Reduzierung der Protonenkopplungsrate um rund ein Viertel berechnet werden:  $r_{c, 7.5 \rightarrow 6.5} = 0,75 \pm 0,17$ ;  $r_{c, 6.5 \rightarrow 5.5} = 0,75 \pm 0,08$ . Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dadurch herausgearbeitet werden, dass die Ansäuerung des Vakuolenlumens um zwei pH-Einheiten eine Abnahme der transportierten Protonen pro hydrolysiertem ATP-Molekül um rund 50% bewirkt (Rienmüller et al., 2012).

In Analogie zur V-ATPase in *B. vulgaris*, *S. cerevisiae* und *C. limon L.* (Davies et al., 1994; Müller and Taiz, 2002; Kettner et al., 2003) ist somit bewiesen worden, dass die V-ATPase auch in *A. thaliana* Mesophyllvakuolen durch eine pH-abhängige, variable Kopplungsrate charakterisiert ist (Rienmüller et al., 2012). Weiterhin konnte in Übereinstimmung mit den Daten der vakuolären ATPasen von *B. vulgaris* und *S. cerevisiae* für *A. thaliana* ebenfalls eine Reduzierung der Kopplungsraten bei einer Ansäuerung des Vakuolenlumens beobachtet werden (Davies et al., 1994; Kettner et al., 2003; Rienmüller et al., 2012). Im Vergleich mit der Protonenpumpe in *S. cerevisiae* wurden in Arabidopsis ähnliche prozentuale Rückgänge beobachtet, während in *B. vulgaris* nur sehr geringe Reduktionen ermittelt wurden. Aufgrund der sehr unterschiedlichen experimentellen Bedingungen, in Bezug auf die pH-Werte und Lösungsbedingungen, ist allerdings nur ein tendenzieller Vergleich möglich.

Der Vorteil einer variablen Kopplungsrate im Vergleich zu einer festen Anzahl an Protonen/ATP besteht darin, dass das Enzym flexibel auf Veränderungen der intrazellulären Protonenkonzentrationen reagieren kann. Dadurch wird es der Protonenpumpe gestattet ihre Aktivität entsprechend den physiologischen Umständen anzupassen. Eine mögliche Erklärung für diese Variabilität besteht darin, dass nicht alle am c-Ring gebundenen Protonen bei einer vollständigen Drehung ins Vakuolenlumen entlassen werden müssen (Müller and Taiz, 2002; Kettner et al., 2003; Rienmüller et al., 2012). Das würde bedeuten, dass mit einer zunehmenden Ansäuerung des vakuolären Lumens weniger Protonen vom c-Ring

dissoziieren als zum Beispiel bei einem neutralen pH-Wert (Kettner et al., 2003; Rienmüller et al., 2012). Ein weiteres Indiz für die flexible Kopplungsrate könnte das geringe Membranpotential von ca. -30 mV am Tonoplasten sein, während an der Plasmamembran ein Potential von ca. 110-150 mV besteht (Blatt, 1992; Lohse, G., and Hedrich, 1992; Bethmann et al., 1995; Walker et al., 1996; Martinoia et al., 2007; Buch-Pedersen et al., 2009; Hedrich, 2012). Dies spricht dafür, dass die V-ATPase die Hydrolyse-Energie von einem ATP für den Transport von mehreren Protonen verwenden kann. Dies steht im Gegensatz zur 1:1-Stöchiometrie ( $H^+/ATP$ ) der Plasmamembran-ATPase, die dafür die Überwindung eines höheren elektrischen Gradienten erlaubt (Cross and Taiz, 1990; Briskin and Hanson, 1992; Briskin et al., 1995). Aufgrund der höheren Kopplungsrate scheint die vakuoläre ATPase deshalb evolutionär auch mehr mit einer ATP-Synthase verwandt zu sein (Cross and Taiz, 1990; Cross and Müller, 2004; Rienmüller et al., 2012). Diese ähneln sich in der Struktur als rotierender Motor und Multi-Untereinheiten-Enzym. Ihre jeweilige Funktion ist im Prinzip – in Analogie zu F-ATPase in Bakterien – auch reversibel (Cross and Taiz, 1990; Gambale et al., 1994; Grabe et al., 2000; Beyenbach and Wieczorek, 2006). Diese Reversibilität konnte für die V-ATPase auch schon unter einem entsprechenden pH-Gradienten und dem Einsatz von ADP und  $P_i$  als Substrat gezeigt werden (Gambale et al., 1994). Dadurch wird gleichzeitig auch eine Erklärung für die negativen Protonenströme, bei Spannungen negativer als die jeweiligen Umkehrpotentiale, in Abbildung 3.2 geliefert. Die Protonen könnten in diesem Fall durch die stark negativen Spannungen in umgekehrter Richtung durch die V-ATPase in das Cytosol „gepresst“ werden, was aber nicht zwangsläufig bedeuten muss, dass auch ATP erzeugt wird. Dazu müssten mit ADP und  $P_i$  auch die benötigten Substrate in ausreichender Konzentration – bei den beobachteten Stromstärken vermutlich in der Größenordnung von mehreren Millimolar – vorliegen (vgl. Gambale et al., 1994). Da unter den verwendeten Lösungs- und Versuchsbedingungen (Kap. 3.1.2) kein ADP bzw.  $P_i$  extern zugesetzt wurde, könnten diese (i) durch die Pumpaktivität und der damit verbundenen ATP-Hydrolyse am Enzym entstanden sein. Wegen der ständigen Perfusion von ATP erscheint eine solche Anreicherung beider Stoffe in der notwendigen Größenordnung jedoch nicht realistisch. (ii) Aufgrund von durch den Hersteller nicht ausgewiesene Verunreinigungen des verwendeten ATPs könnten ADP und  $P_i$  in der Lösung ebenfalls theoretisch vorhanden sein, was in den oben angesprochenen, notwendigen Konzentrationen aber ebenfalls als unwahrscheinlich

erscheint. Deshalb kann angenommen werden, dass keine ATP-Erzeugung durch die V-ATPase unter den gegebenen Bedingungen stattfindet.

Ein Nachteil der großen Anzahl an transportierten Protonen pro ATP liegt darin, dass schon ein kleiner elektrischer Gradient die Pumpaktivität negativ beeinflussen kann (Pittman, 2012; Rienmüller et al., 2012). Im Prinzip wird die Hydrolyseenergie für den Transport einer größeren Anzahl an Protonen aufgebracht und somit stehen keine Energiereserven zur Verfügung, um ein stärkeres elektrisches Feld zu überwinden. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass dieser elektrische Gradient schon während der ersten Sekunden des Protonentransportes aufgebaut wird, während sich der pH-Gradient erst nach mehreren Minuten etabliert (Müller and Taiz, 2002). Dadurch ist die Erzeugung eines größeren pH-Gradienten für sekundär-aktive Transportproteine eigentlich nur möglich, wenn das elektrische Feld sofort von anderen Transportprozessen neutralisiert wird (Pittman, 2012). Dies könnten sowohl Protonen-gekoppelte Transporter wie NHX, CHX oder CLC (Kap. 1.4.3), oder auch eine Art „Protonenkurzschluss“ durch die V-ATPase ermöglichen (Rienmüller et al., 2012). Allerdings würde dadurch auch der benötigte Protonengradient sofort wieder abgebaut werden. Das elektrische Feld könnte deshalb zusätzlich oder alternativ von einem Kationenausstrom aus der Vakuole oder einem Anioneinstrom neutralisiert werden (Kap. 1.4.3), wie er zum Beispiel von TPC-, TPK- oder ALMT-Kanälen vermittelt werden könnte (Hedrich and Marten, 2011; Meyer et al., 2011; Pittman, 2012; Rienmüller et al., 2012; De Angeli et al., 2013). Aufgrund der Tatsache, dass es bei den hier durchgeführten Experimenten keine Anzeichen dafür gibt, dass die V-ATPase selbst für einen solchen Ladungsausgleich oder „Protonenkurzschluss“ sorgt, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die V-ATPase thermodynamisch sehr eng mit den anderen Transportprozessen in der Vakuolenmembran verknüpft sein muss (Rienmüller et al., 2012).

## **4.2 pH-abhängige Parameter der V-ATPase-Aktivität**

Aufgrund der beobachteten pH-Abhängigkeit der Protonenkopplungsrate der V-ATPase (Kap. 4.1) wurde in weiterführenden Untersuchungen in Mesophyllvakuolen (Col-0) die Abhängigkeit der V-ATPase-Pumpaktivität von cytosolischen und vakuolären Protonenkonzentrationen weiter aufgeklärt (Rienmüller et al., 2012). Die hierzu bei einer

ATP-Konzentration von 5 mM erfassten Gleichgewichtsströme (Kap. 3.1.3) sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

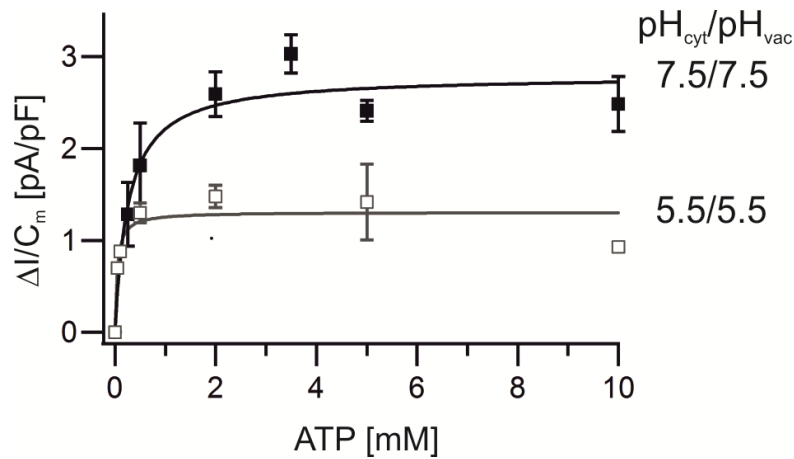
**Tabelle 4.1. Maximale ATP-induzierte Protonenstromdichten bei verschiedenen pH-Bedingungen.** Dargestellt sind die maximalen Stromantworten aus Kapitel 3.1.3 (Abb. 3.3B), die nach der Applikation von 5 mM ATP bei unterschiedlichen cytosolischen und vakuolären pH-Werten aufgezeichnet und auf die Membrankapazität normiert wurden.

$\text{pH}_{\text{cyt}}/\text{pH}_{\text{vac}}$	$\Delta I/C_m$ [pA/pF]
5,5/7,5	$3,2 \pm 0,1$
7,5/7,5	$2,4 \pm 0,1$
7,5/9,5	$2,2 \pm 0,8$
7,5/5,5	$1,8 \pm 0,4$
9,5/7,5	$0,3 \pm 0,1$

Anhand der gemessenen, ATP-induzierten Ströme konnte beobachtet werden, dass bei einem konstanten cytosolischen pH-Wert von 7,5 die Änderung des pH-Wertes in der Vakuole von 7,5 zu 5,5 bzw. zu 9,5 nur zu sehr geringfügigen Abweichungen der Protonenströme von führte, obwohl die V-ATPase hier ohne, gegen oder mit einem Protonengradienten arbeiten musste und damit sehr unterschiedlichen thermodynamischen Bedingungen ausgesetzt waren (Abb.3.3, Rienmüller et al., 2012). Zusätzlich wurde die Pumpkapazität auch bei absolut unphysiologischen cytosolischen pH-Werten von 9,5 und 5,5 ermittelt, um die Grenzen der V-ATPase-Aktivität auszuloten (Rienmüller et al., 2012). Aus der Änderung von  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5$  (bei  $\text{pH}_{\text{vac}} = 7,5$ ) zu 9,5 resultierte eine starke Abnahme der Pumpströme (Tab. 4.1, Abb. 3.3B). Obwohl hier der gleiche Protonengradient wie bei  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 5,5$  herrschte, waren die Pumpströme deutlich verkleinert. Dieser Effekt könnte auf einer deutlich reduzierten Protonenverfügbarkeit im Cytosol beruhen. Bei Bedingungen, die mit  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 5,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 7,5$  konträr zu den physiologischen waren, ist die Stromdichte etwa doppelt so groß wie bei  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 5,5$  (Abb.3.3B; Rienmüller et al., 2012). Daraus lässt sich schließen, dass die Pumpströme größer werden wenn die Protonenverfügbarkeit im Cytosol ansteigt. Betrachtet man die Bedingungen, bei denen jeweils ein cytosolischer pH-Wert von 7,5 verwendet wurde fällt zusätzlich auf, dass trotz der Variation der vakuolären pH-Werte und eine damit verbundene Richtungsänderung des pH-Gradienten,

die Pumpstromdichten bei allen drei pH-Konstellationen annähernd gleich waren (Tab. 4.1). Hinsichtlich der Pumpaktivität hat der cytosolische pH-Wert deshalb einen größeren regulatorischen Einfluss auf die V-ATPase als der vakuoläre pH-Wert.

Da die Variationen in den Pumpstromstärken alleine durch unterschiedliche pH-Konstellationen, Protonenverfügbarkeit und Protonengradienten nicht hinreichend erklärt werden konnten, wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die ATP-Affinität ( $K_m$ ) und die maximale Protonentransportkapazität ( $v_{max}$ ) der V-ATPase im Detail untersucht (Rienmüller et al., 2012). Zu diesem Zweck wurde der ATP-Dosis-Effekt auf die Pumpstrom-Amplituden bei einem symmetrischen pH-Wert von 7,5, bei einem physiologischen und einem invertierten pH-Gradienten ermittelt (Kap. 3.1.4). Um einen umfassenden Vergleich der  $K_m$ - und  $v_{max}$ -Werte zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine Dosis-Effekt-Kurve herangezogen, die bei einem symmetrischen pH-Wert von 5,5 und ATP-Konzentrationen von 0,25 bis 10 mM von A. Schulz im Rahmen seiner Dissertation erstellt wurde (aus der Dissertation von Alexander Schulz, Universität Würzburg 2012, Kap. 3.2, Abb. 3.1 und Rienmüller et al., 2012). Unter diesen pH-Bedingungen (Kap. 2.2.1.4, SBL2-pH 5,5/ SPL2-pH 5,5) konnte zwischen 0,05 und 0,1 mM ATP ein sehr steiler, linearer Anstieg verzeichnet werden, der schon ab 0,5 mM ATP eine Stromsättigung erreichte (Abb. 4.1). Die Interpolation der Sättigungskurve mit einer Michaelis-Menten-Funktion ergab eine maximale Protonentransportkapazität von  $v_{max} = 1,3$  pA/pF und eine ATP-Affinität von  $K_m = 0,04$  mM (Rienmüller et al., 2012). Aus der Gegenüberstellung der erzielten Parameter (Kap. 3.1.4, Tab. 4.2) wird ersichtlich, dass sich die Werte für die maximale Transportkapazität  $v_{max}$  unter den Bedingungen  $pH_{cyt} = 5,5/pH_{vac} = 5,5$  und  $pH_{cyt} = 7,5/pH_{vac} = 5,5$  nur wenig voneinander unterscheiden. Im Gegensatz dazu zeigt der Vergleich der symmetrischen pH-Konstellation von 5,5 mit  $pH_{cyt} = 5,5/pH_{vac} = 7,5$  einen fast viermal so hohen  $v_{max}$ -Wert und eine ca. 70-fache Differenz bei den  $K_m$ -Werten (siehe Tab. 4.2). Änderungen der cytosolischen Protonenkonzentration um das 100-fache bewirkten dagegen nur eine 10- oder 20-fache Abweichung des  $K_m$ -Wertes bei vakuolären pH-Werten von 5,5 oder 7,5 (Rienmüller et al., 2012). Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.3 und 3.1.4 belegen, dass die luminale Ansäuerung einen wesentlich stärkeren Effekt auf  $v_{max}$  und  $K_m$  bei einem cytosolischen pH-Wert von 5,5 als bei pH 7,5 hat.



**Abbildung 4.1. Vergleich der V-ATPase-Pumpstromdichten bei verschiedenen ATP-Konzentrationen und symmetrischen pH-Werten von 7,5 oder 5,5 in Wildtyp-Mesophyllvakuolen.** Die ATPase-Auswärtsströme wurden gegen die unterschiedlichen ATP-Konzentrationen aufgetragen und mit einer Michaelis-Menten-Funktion interpoliert. Die schwarzen Vierecksymbole repräsentieren die Mittelwerte ( $\pm$  SE) der ATP-induzierten Stromamplituden bei der Verwendung von 0,25 mM bis 10 mM ATP bei pH 7,5 (Kap. 3.1.4). Die weißen Vierecksymbole zeigen die Mittelwerte (von links  $n = 5, 5, 4, 5, 3$  und  $5$ ) der Ströme für 0,05 bis 10 mM ATP bei einem pH-Wert von 5,5. Die Interpolation ergab für  $v_{\max} = 1,3$  pA/pF ( $\text{pH}_{7,5_{\text{cyt}}}/\text{pH}_{7,5_{\text{vac}}} = 2,8$  pA/pF) und für  $K_m = 0,04$  mM ( $\text{pH}_{7,5_{\text{cyt}}}/\text{pH}_{7,5_{\text{vac}}} = 0,3$  mM). Die Daten für  $\text{pH } 5,5_{\text{cyt}}/5,5_{\text{vac}}$  wurde von Alexander Schulz erhoben (Dissertation, Universität Würzburg 2012; aus Rienmüller et al., 2012).

**Tabelle 4.2. ATP-Abhängigkeit der V-ATPase-Pumpströme unter verschiedenen pH-Bedingungen.**  $v_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte wurde mittels einer Michaelis-Menten-Funktion durch die Interpolation der Datenpunkte in den Abbildungen 3.4-3.6 (Kap. 3.1.4) bestimmt.

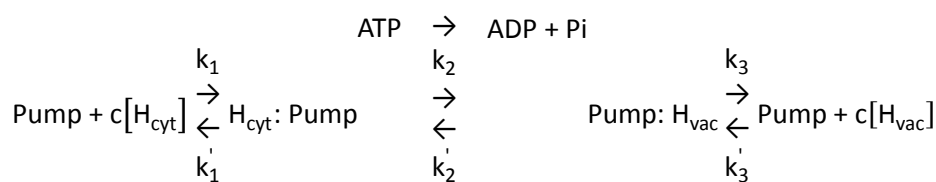
$\text{pH}_{\text{cyt}}/\text{pH}_{\text{vac}}$	$v_{\max}$ [pA/pF]	$K_m$ [mM]
7,5/7,5	2,8	0,3
7,5/5,5	1,7	0,8
9,5/7,5	0,3	–
5,5/7,5	4,9	2,9
7,5/9,5	2,0	–
5,5/5,5	1,3	0,04

Das bedeutet, dass die V-ATPase bei einem pH-Wert von 5,5 in der Vakuole eine hohe Affinität für ATP besitzt (Rienmüller et al., 2012). Dadurch kann die Pumpe schnell die maximale Pumpkapazität erreichen. Diese Eigenschaft der V-ATPase ermöglicht der Zelle eine schnellen Anpassung oder Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes zum

Beispiel bei einer cytosolischen Ansäuerung (Rienmüller et al., 2012). Die V-ATPase gleicht daher einem flexiblen molekularen Motor, der je nach Bedarf eine unterschiedliche Anzahl an Protonen über die Vakuolenmembran transportieren kann.

#### 4.2.1 Entwicklung eines qualitativen Modells der V-ATPase Pumpaktivität unter Berücksichtigung der ermittelten $K_m$ - und $v_{max}$ -Werte

Um ein tieferes Verständnis der V-ATPase-Funktion zu erzielen, wurde unter Berücksichtigung der ermittelten  $v_{max}$ - und  $K_m$ -Werte der hier untersuchten Bedingungen ein einfaches mechanistisches Modell (Abb. 4.2; Rienmüller et al., 2012) für den Pumpzyklus von Prof. Dr. Ingo Dreyer (Universidad Politecnica, Madrid, Spanien) erstellt.



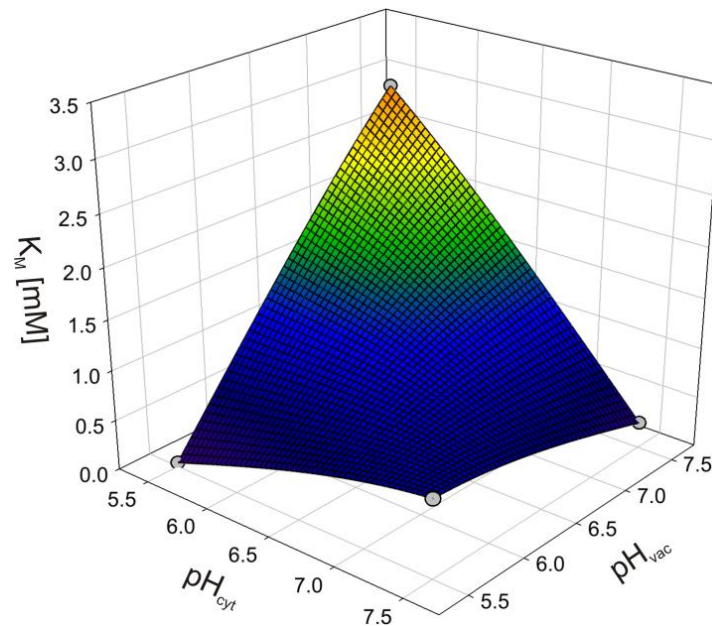
**Abbildung 4.2. Einfaches mechanistisches Schema des V-ATPase Pumpzyklus.**  $H_{\text{cyt}} : \text{Pump}$  = Protonen, die mit der V-ATPase auf cytosolischer Seite assoziiert sind.  $H_{\text{vac}} : \text{Pump}$  = Protonen, die vom Pumpenzym ins Vakuolenlumen transportiert werden. Die Konstanten  $k_1, k_1', k_2, k_2', k_3$  und  $k_3'$  geben die Reaktionsraten an (aus Rienmüller et al., 2012).

In diesem Zyklus werden die Protonen auf cytosolischer Seite mit dem Pumpprotein assoziiert ( $H_{\text{cyt}} : \text{Pump}$ ) und dann unter Ausnutzung der ATP-Hydrolyseenergie in das Vakuolenlumen transportiert ( $H_{\text{vac}} : \text{Pump}$ ). Dort dissoziieren die Protonen dann wieder vom Pumpprotein (Rienmüller et al., 2012). Dieser Zyklus ist im Prinzip auch reversibel. Dadurch kann umgekehrt ATP unter Ausnutzung eines Protonengradienten und beim Vorhandensein entsprechender Substrate durch die V-ATPase erzeugt werden (Gambale et al., 1994; Rienmüller et al., 2012). Für die mathematische Überprüfung der pH-Abhängigkeit der Reaktionsraten-Konstanten  $k_1, k_1', k_2, k_2', k_3$  und/oder  $k_3'$  im Rahmen der Modellentwicklung wurde zuerst die Hypothese aufgestellt, dass all diese Konstanten pH-unabhängig sind. Im



Rahmen einer mathematischen Beweisführung (siehe Appendix in Rienmüller et al., 2012) hat Prof. Dreyer daraufhin gezeigt, dass die V-ATPase unter den gegebenen experimentellen Bedingungen vorzugsweise Protonen vom Cytosol in die Vakuole transportiert. Dies kann allerdings nur geschehen, wenn mindestens eine der Reaktionsraten-Konstanten pH-abhängig ist. Die anfänglich aufgestellte Hypothese der pH-Unabhängigkeit der Reaktionsraten-Konstanten wurde damit widerlegt (Rienmüller et al., 2012).

Aufgrund der physiologischen Grenzen des hier verwendeten pflanzlichen Systems konnten nur wenige Messwerte für die Pumpaktivität der V-ATPase unter extremen, unphysiologischen pH-Bedingungen erhoben werden, die für die Berechnung eines umfangreicheren Modells jedoch notwendig gewesen wären (Rienmüller et al., 2012). Damit waren keine zuverlässigen Vorhersagen für die freien Parameter des Modells möglich. Allerdings konnte zumindest eine qualitative Interpretation des Modells vorgenommen werden (Rienmüller et al., 2012). Dazu wurden die im Kapitel 3.1.4 durch die Interpolation einer Michaelis-Menten-Funktion ermittelten  $K_m$ -Werte in einer dreidimensionalen Grafik (Abb. 4.3) aufgetragen. Die Grafik ermöglicht die Voraussage der ATP-Affinität der V-ATPase bei unterschiedlichen pH-Konstellationen. Ausgehend von physiologischen pH-Bedingungen ( $\text{pH}_{\text{cyt}} = 7,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 5,5$ ) führte die Erhöhung des vakuolären pH-Wertes um zwei pH-Einheiten zu einer Abnahme des  $K_m$ -Wertes von 0,8 mM auf 0,3 mM (Rienmüller et al., 2012). Unter der Annahme, es gäbe pH-unabhängige Konstanten im Modell, könnte eine solche Reduzierung des  $K_m$ -Wertes aufgrund einer verringerten Protonenkonzentration im Vakuolenlumen nur erklärt werden, wenn  $k_1' > k_3$  wäre (Rienmüller et al., 2012). Ansonsten müsste der  $K_m$ -Wert unter diesen Bedingungen konstant sein ( $k_1' = k_3$ ) oder zunehmen ( $k_1' < k_3$ ). Die Beziehung  $k_1' > k_3$  wäre allerdings widersprüchlich zum größer werdenden  $K_m$ -Wert bei einer Änderung des symmetrischen pH-Wertes von 5,5 zu  $\text{pH}_{\text{cyt}} = 5,5/\text{pH}_{\text{vac}} = 7,5$  (Rienmüller et al., 2012). Wenn  $k_1' > k_3$  Gültigkeit hätte, müsste der  $K_m$ -Wert eigentlich kleiner werden (siehe Appendix in Rienmüller et al., 2012). Dadurch kann erneut bestätigt werden, dass die anfängliche Hypothese, nach der alle Reaktionsraten-Konstanten ( $k_1, k_1', k_2, k_2', k_3$  und  $k_3'$ ) pH-unabhängig sind, falsch ist (Rienmüller et al., 2012).



**Abbildung 4.3. pH-Abhängigkeit des  $K_m$ -Wertes.** Dreidimensionale Auftragung der pH-abhängigen  $K_m$ -Werte (graue Kreise) der Protonenpumpe aus Kapitel 3.1.4. Die sphärische Oberfläche wurde zur besseren Übersicht der räumlichen Positionen der  $K_m$ -Werte überlagert. Die x-Achse beschreibt dabei die cytosolischen pH-Werte, während die y-Achse die vakuolären pH-Bedingungen angibt. Auf der z-Achse sind die Konzentrationen der  $K_m$ -Werte aufgetragen (erstellt von Prof. Dr. Ingo Dreyer, Universidad Politecnica, Madrid, Spanien; aus Rienmüller et al., 2012).

Um die unterschiedlichen Ergebnisse aus Kapitel 3.1.4 trotz der wenigen Messergebnisse für extreme pH-Bedingungen dennoch miteinander in Einklang bringen zu können, muss folgende Voraussetzung erfüllt sein:  $k_1'$  wird durch eine Abnahme des cytosolischen pH-Wertes kleiner (und/oder  $k_1$  nimmt zu), während  $k_3$  durch eine Vergrößerung des vakuolären pH-Wertes zunimmt (und/oder  $k_3'$  abnimmt). Physiologisch können die Änderungen der Konstanten  $k_1'$  ( $k_1$ ) und  $k_3$  ( $k_3'$ ) aufgrund von pH-Veränderungen im Cytosol bzw. Vakuolenlumen Folgendes bedeuten (Rienmüller et al., 2012): Die V-ATPase ist in der Lage, cytosolische und vakuoläre pH-Werte, zum Beispiel durch die Protonierung des Enzyms, festzustellen. Dadurch ist die Dissoziation der transportierten Protonen größer, wenn der pH-Wert in der Umgebung der Pumpe alkalischer wird, während bei einer höheren Protonenkonzentration in der Umgebung des Enzyms die Dissoziation der transportierten Protonen geringer ausfällt (Rienmüller et al., 2012).

Die genauere Betrachtung der pH-Abhängigkeit offenbart noch weitere komplexe Regulationen der V-ATPase durch cytosolische und vakuoläre pH-Werte. So konnte ebenfalls beobachtet werden, dass solange sich die cytosolische Protonenkonzentration im

physiologischen Rahmen bewegte (z.B. bei pH 7,5), Abweichungen im vakuolären pH-Wert nur geringe Auswirkungen auf die  $K_m$ - und  $v_{max}$ -Werte haben, während dagegen die Kopplungsrate um 25% pro reduzierter pH-Einheit sinkt (Abb. 3.2; Rienmüller et al., 2012). Bei einer Ansäuerung des Cytosols (z.B. auf pH 5,5) dagegen hatten Veränderungen der vakuolären Protonenkonzentration enorme Auswirkungen auf die  $K_m$ - und  $v_{max}$ -Werte. Anhand dieser Ergebnisse kann daher die Hypothese aufgestellt werden, dass der cytosolische pH-Wert kontrolliert, wie stark sich pH-Veränderungen in der Vakuole auf die V-ATPase-Funktion auswirken (Rienmüller et al., 2012). Überraschenderweise zeigte sich, dass Abweichungen des vakuolären pH-Wertes wesentlich stärkere Auswirkungen auf die Bindungsaffinität der cytosolischen ATP-Bindungsstellen des Enzyms haben können, als die Veränderungen des pHs auf der cytosolischen Membranseite (Tab. 4.2). D.h. die vakuolären pH-Werte beeinflussen auch die ATP-Bindungsstellen im  $V_1$ -Komplex auf der cytosolischen Seite, die immerhin 10 nm weit weg sind (Rienmüller et al., 2012). Das bedeutet, dass Änderungen in der Protonenkonzentration – unerheblich auf welcher Membranseite diese vorkommen – das ganze Membran-durchquerende Enzym beeinflussen und dadurch auch auf die jeweilige andere Membranseite des Proteins weitergegeben werden können (Rienmüller et al., 2012). In diesem Zusammenhang ist deshalb auch erwähnenswert, dass erst kürzlich gezeigt werden konnte, dass die lysosomale V-ATPase in menschlichen Zellen eine Anhäufung von Aminosäuren im Inneren des Lysosoms an die Außenseiten melden kann (Zoncu et al., 2011).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorherrschenden Protonenkonzentrationen auf beiden Seiten des Tonoplasten die Funktion der V-ATPase durch einen Rückkopplungsmechanismus beeinflussen (Rienmüller et al., 2012). Im Falle eines niedrigen Protonengradienten arbeitet die Pumpe dabei an ihrem physiologischen Limit und transportiert so viele Protonen wie möglich über die Membran in die Vakuole. Wenn der Protonenkonzentrationsgradient über der Membran aber größer wird, würde die V-ATPase Gefahr laufen, in umgekehrter Richtung zu arbeiten (Gambale et al., 1994; Rienmüller et al., 2012). Eine pH-abhängige, reduzierte Dissoziation der Protonen vom c-Ring würde dann verhindern, dass die V-ATPase – aufgrund sich verändernder physiologischer Bedingungen – unplanmäßig zur ATP-Synthase umfunktioniert wird (Müller et al., 1999; Rienmüller et al., 2012). Dieser Rückkopplungsmechanismus versetzt die Protonenpumpe deshalb in die Lage, in einem fein regulierten Umfeld aus Transport-, Pump-, und Kanalproteinen effizient zu

agieren (Rienmüller et al., 2012). Diese Theorie kann anhand eines Beispiels zusätzlich untermauert werden. So kann die V-ATPase in den Früchten von *Citrus limon L.*, obwohl während der Fruchtreife der luminaire pH-Wert von 6,5 zu 2,2 abnimmt, weiterhin Protonen in die Vakuole transportieren (Müller et al., 1996, 1997). Die Pumpe in den Früchten von *C. limon* weist zwar einige zusätzliche Besonderheiten im Vergleich zu *A. thaliana* auf (z.B. weniger sensitiv gegenüber Inhibitoren und Regulatoren), dennoch erlaubt vermutlich erst die variable Reduzierung der Kopplungsrate auf ein Proton pro ATP diese starke Ansäuerung (Müller and Taiz, 2002). Das könnte daran liegen, dass eine reduzierte Kopplungsrate aus Gründen der Thermodynamik die Überwindung eines größeren elektrochemischen Gradienten bei gleichbleibender Hydrolyseenergie ermöglicht (Cross and Taiz, 1990; Ratajczak, 2000) und gleichzeitig die ständige Gefahr für die Pumpe als ATP-Synthase arbeiten zu müssen eliminiert wird.

### 4.3 Redox-Regulation der V-ATPase-Pumpaktivität

Die Kontrolle der V-ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von intrazellulären Bedingungen und äußeren Umweltfaktoren ist eine wichtige Voraussetzung für eine funktionierende Zellhomöostase (Seidel et al., 2012; Kap. 1.4.2.1) Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Transportaktivität ist neben den intrazellulären pH-Werten die reversible Redox-Kontrolle des Pumpenzym (Hager and Lanz, 1989; Davies et al., 1994; Dschida and Bowman, 1995; Dietz et al., 2001; Tavakoli et al., 2001; Rienmüller et al., 2012; Seidel et al., 2012). So können verschiedene Oxidationsmittel die V-ATPase reversibel inaktivieren, während Reduktionsmittel die Pumpe wieder aktivieren (Hager and Lanz, 1989; Feng and Forgac, 1992b; Dschida and Bowman, 1995; Seidel et al., 2012). Da bereits bekannt war, dass intramolekulare Disulfidbrücken zwischen drei hochkonservierten Cysteinresten an den Positionen 256, 279 und 535 in der Untereinheit VHA-A in *A. thaliana* in diesem Zusammenhang vermutlich eine wichtige Rolle spielen, wurde die posttranslationale Veränderung des Redoxzustandes der Protonenpumpe untersucht (Feng and Forgac, 1992a, 1992b; Feng and Forgac, 1994; Forgac, 1999; Seidel et al., 2012). Die in Kapitel 3.1.5 durchgeführten Patch-Clamp-Experimente zeigen, dass die durchschnittliche Pumpstromdichte im Wildtyp durch die Applikation des Oxidationsmittels um 32%, im

Vergleich zum reinen ATP-Strom zurückging, während die Ströme der *C535*-Mutante durch  $H_2O_2$  um 36% reduziert wurden. Bei der *C256*-Mutante war das Stromniveau durch die Anwesenheit des Oxidationsmittels um 17% verringert (Seidel et al., 2012). Bei den Messungen wurde darüber hinaus festgestellt, dass in beiden verwendeten Mutanten die Pumpströme der V-ATPase schon beim ausschließlichen Einsatz von ATP von vornherein im Vergleich zu Col-0 um ca. 40% deutlich vermindert waren. Das war insofern ungewöhnlich, da vorausgegangene biochemische Messungen der ATPase-Hydrolyse Aktivität von T. Seidel und Mitarbeitern (2012) keinen Unterschied zwischen Wildtyp und den Mutanten zeigten. Dort wurde erst in Anwesenheit von 2 mM  $H_2O_2$  in Wildtyp und *C535* eine um ca. die Hälfte verringerte ATP-Hydrolyse nachgewiesen, gleichzeitig konnte bei *C256* nur ein minimaler Rückgang beobachtet werden (Seidel et al., 2012). Die ermittelten, deutlich verringerten Pumpströme bei gleichbleibender ATP-Hydrolyse-Aktivität zeigen, dass bei konstanter Pumpproteinindichte (die unveränderte Hydrolyserate aus Seidel et al. (2012) weist darauf hin) in der Membran der Austausch der Cysteinreste gegen Serin die Protonentranslokation beeinflusst haben könnte. So kann eine Reduzierung der Protonenströme bei gleichbleibender Hydrolyse-Aktivität durch eine Verminderung der Protonen/ATP-Kopplungsrate in den beiden Mutanten erklärt werden (Seidel et al., 2012). Das würde bedeuten, dass sich die Mutation von Cystein zu Serin und der damit verbundene Wegfall der Disulfidbrücken in der Untereinheit VHA-A im  $V_1$ -Komplex anscheinend stark auf den Protonenpumpmechanismus im  $V_2$ -Komplex auswirkt, da die ATP-Hydrolyse unverändert bleibt. Parallel dazu führte die beobachtete, weitaus stärkere Reduktion der Pumpströme in *C535S* (mit 36% leicht größer wie im Wildtyp) – im Vergleich zu *C256S* (17%) – zu dem Schluss, dass in letzterer Mutante nur eine sehr schwache Inhibierung durch  $H_2O_2$  vorlag. Schlussendlich zeigen die hier ermittelten Daten im Kontext der Arbeit von Seidel und Mitarbeitern (2012), dass die oxidative Inhibierung in *A. thaliana* nicht auf der Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken bei Cys<sup>535</sup> in der Untereinheit VHA-A beruht, da der Austausch gegen einen Serinrest trotzdem zu reduzierten Strömen führte (Seidel et al., 2012). Dadurch, dass die *C256S*-Mutante durch die Änderung von Cystein zu Serin nur minimal von der Hemmung betroffen war, sind im Umkehrschluss Disulfidbrücken an Cys<sup>256</sup> für die oxidative Inhibierung notwendig (Seidel et al., 2012). Zusätzlich scheint die Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen den Aminosäuresten an der Position 535 und 256 direkte Auswirkungen auf die Kopplungsrate der V-ATPase zu haben. Die physiologische

Bedeutung einer reversiblen Redox-Regulation der Protonenpumpe könnte darin bestehen, dass zum Beispiel bei biotischen oder abiotischen Stress ( $\text{H}_2\text{O}_2$  fungiert in Pflanzen dabei in geringen Konzentrationen als Signalmolekül) eine kurzfristige Veränderung der Energetisierung der Vakuolenmembran oder Alkalisierung des Vakuolenlumens notwendig werden könnte (Gill and Tuteja, 2010; Seidel et al., 2012). Dies würde dann durch eine Änderung der V-ATPase-Aktivität bewirkt werden (Hager and Lanz, 1989; Dschida and Bowman, 1995; Merzendorfer et al., 1997; Dietz et al., 2001; Tavakoli et al., 2001; Nishi and Forgac, 2002; Gill and Tuteja, 2010; Seidel et al., 2012). Allerdings konnte die Bedeutung dieser Redox-Regulation für die Physiologie *in vivo* bisher nicht konkret bestimmt werden und bedarf deshalb weiterer Aufklärung (Seidel et al., 2012). Die hier erhaltenen Daten ergeben aber einen weiteren Anhaltspunkt, durch welche Prozesse die äußerst komplexe Regulation der V-ATPase gesteuert werden könnte. Eine Redox-gesteuerte Änderung der Kopplungsrate wäre, neben der vom pH-Wert gesteuerten, folglich eine weitere Anpassungsmöglichkeit der Pumpe zur Regulation des Protonen/ATP-Transportverhältnisses. Weiterführende Experimente zur Spannungsabhängigkeit der beiden verwendeten V-ATPase-Mutanten unter den in Kapitel 3.1.2 angewandten pH-Konditionen, könnten deshalb ein noch besseres Verständnis für die Mechanismen der Protonenkopplungsrate erreichen. In Kombination mit weiteren Experimenten zur Transportkapazität und ATP-Affinität könnte dann ein noch umfangreicheres Modell zur V-ATPase-Aktivität entwickelt werden, das in Zukunft noch genauere Vorhersagen zur Aktivität der Protonenpumpe ermöglicht.

#### **4.4 Calciuminduzierte Veränderungen in der Leitfähigkeit der Vakuolenmembran in intakten Trichoblasten *in vivo***

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der elektrophysiologischen Untersuchung von Membranleitfähigkeiten in Wurzelrhizodermisvakuolen von intakten *A. thaliana* Keimlingen mit Hilfe intrazellulärer Mikroelektroden. Anhand der in Kapitel 3.2.2 durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass nach dem Einstich einer *double-barreled* Elektrode die instantane Stromkomponente der vakuolären Leitfähigkeiten bei einer Spannung von +60 mV bereits nach 20 s abfielen und nach 220 s um fast 50% reduziert waren. Im Gegensatz dazu war bei -80 mV der beobachtete Stromrückgang über den

Messzeitraum mit 13% sehr gering. Die Betrachtung des gesamten Strom-Spannungsverlaufes bei 0-20 und 220-280 s (Abb. 3.10C) zeigt, dass die Leitfähigkeiten nur im positiven Spannungsbereich zurückgegangen sind, während bei negativen Spannungen keine Veränderungen aufgezeichnet werden konnten. Die beobachtete Änderung in der Membranleitfähigkeit könnte dabei durch den Einstich der Mikroelektroden herbeigeführt worden sein, die eine intrazellulären Stressreaktion durch Zellverwundung des Atrichoblasten bewirkt (vgl. Kap. 1.3) und damit zu einer Calciumänderung im Cytosol führt (Knight et al., 1997; Kiegle et al., 2000; White and Broadley, 2003). Diese Calciumkonzentrationsänderung könnte dann entweder direkt oder über eine Signalkaskade auf die vakuolären Membranleitfähigkeiten regulatorisch wirken. Die aufgezeichneten Ergebnisse lassen nun zwei mögliche Schlussfolgerungen zu: (i) Zum einen könnte der Einstichstress zu einer Erniedrigung der anfänglich hohen Membranleitfähigkeiten ausschließlich bei positiven Spannungen führen (Abb. 3.10, Kap. 3.2.2). (ii) Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, dass die Zellen auf das Einstechen der Glasmikroelektrode sofort mit einer kurzen, transienten Erhöhung der vakuolären Leitfähigkeiten im positiven Spannungsbereich reagieren könnten. Dann würde der beobachtete Rückgang der Stromantworten nach Einführen der Messelektroden nur das Abklingen einer durch den Stress ausgelösten Leitfähigkeit bedeuten. Dies würde die sehr konstanten, auf einem niedrigen Stromniveau verbleibenden Membranleitfähigkeiten nach 75 s erklären. Aufgrund der fehlenden Möglichkeiten bei diesen Experimenten die Vakuolenleitfähigkeiten vor dem Einstich der Mikroelektroden nicht-invasiv zu überwachen bleibt diese zweite Hypothese allerdings unbestätigt. Die Einführung einer weiteren Mikroelektrode könnte zeigen, ob die Membranleitfähigkeiten durch den erneuten Einstichstress wiederum erhöht wären. Damit könnte letztere Hypothese dann bestätigt werden.

Eine weitere Eigenschaft der Membranleitfähigkeiten ergibt sich aus den in Abbildung 3.10C aufgetragenen Strom-Spannungskurven. Aus Ihrem nahezu linearen Verlauf zwischen -80 und +60 mV kann abgeleitet werden, dass diese Leitfähigkeiten spannungsunabhängig sind. Die offensichtliche Verschiebung des  $U_{rev}$  um 10 mV vor und nach dem Einstich (Kap. 3.2.2, Abb. 3.10C) deutet normalerweise auf eine Veränderung in der Ionenleitfähigkeit der Membran hin. In diesem konkreten Fall kann dies allerdings nicht berücksichtigt werden. Da bei den Versuchen in Kapitel 3.2.2 keine Plasmamembranpotentiale simultan aufgezeichnet wurden, aber eine elektrische Kopplung zwischen Plasma- und Vakuolenmembran unter

diesen experimentellen Bedingungen besteht, können die Änderungen in  $U_{rev}$  deshalb nicht eindeutig den vakuolären Leitfähigkeiten zugeordnet werden. Die Experimente aus Kapitel 3.2.2 zeigen offenbar grundsätzlich mindestens zwei verschiedene Arten von ionenleitenden Komponenten der Vakuolenmembran in den Atrichoblasten, da eine Verringerung der Ströme über die Zeit in diesen Vakuolen nur bei positiven Spannungen beobachtet werden konnte, während die negativen Stromantworten dagegen unverändert bleiben. Da Calcium in Pflanzen sowohl bei der Regulation von vakuolären Ionenkanälen (Bihler et al., 2005; Beyhl et al., 2009; Hedrich and Marten, 2011; Meyer et al., 2011; Hedrich, 2012; Sharma et al., 2013) als auch bei Stressantworten und Verwundung (León et al., 2001; Chico et al., 2002; White and Broadley, 2003; Martinoia et al., 2007; Hashimoto and Kudla, 2011; Kap. 1.3.) eine wichtige Rolle spielt, lag die Vermutung nahe, dass eine Calcium-gesteuerte Änderung der Leitfähigkeit vorliegen könnte. Bei der *in vivo* Überprüfung dieser Hypothese an Trichoblasten (Kapitel 3.2.3) konnte schließlich tatsächlich ein Zusammenhang zwischen den erhöhten Membranleitfähigkeiten und Änderungen des cytosolischen Calciums – repräsentiert durch die FURA-2-Ratioänderungen – nachgewiesen werden. So waren die Ströme nach einem kurzzeitigen Anstieg des cytosolischen Calciumlevels (Abb. 3.12B, (●)) bei einer Spannung von +60 mV um 180% erhöht, während bei -100 mV eine Zunahme der Ströme um 100% beobachtet wurde (Abb. 3.13B, (●)). Nach Rückgang der cytosolischen Calciumkonzentration auf das Ausgangsniveau konnten hingegen deutlich verringerte Ströme verzeichnet werden (Abb. 3.13, (Δ)). Als Schlussfolgerung daraus ergibt sich, dass ein kurzzeitig erhöhter Calciumlevel eine reversible Vergrößerung der Membranleitfähigkeiten auslösen kann. Durch diese Experimente konnte deshalb ein direkter Beweis an intakten Trichoblasten *in vivo* erbracht werden, dass die hier untersuchten spannungsunabhängigen vakuolären Leitfähigkeiten durch Calcium reguliert sein müssen. Im Vergleich zu den Experimenten an Atrichoblasten (Abb. 3.10, Kap. 3.2.2), bei denen keine Veränderungen der Ströme bei negativen Spannungen nach Einstich einer *double-barreled* Elektrode über die Zeit beobachtet wurden, konnte bei den Trichoblasten sowohl bei +60 mV als auch bei -100 mV ein deutlicher Unterschied der Stromstärke durch Calcium erfasst werden. Diese Abweichung ist entweder auf eine Modulation der Calciumantwort in Wurzelhaaren zurückzuführen oder es sind zusätzlich, im Vergleich zu Kapitel 3.2.2, noch andere Ionenkanäle oder Transporter an der erhöhten Leitfähigkeit beteiligt gewesen. Aufgrund der *in vivo* Umgebung und der damit verbundenen in den Experimenten nahezu unbekannt



Zusammensetzung der intrazellulären Ionenbedingungen, kann allerdings keine Aussage über die transportierte Ionenart gemacht werden. Die hier erfassten Leitfähigkeiten könnten dabei sowohl durch einen Kationen- oder Anionenfluss bzw. auch durch eine Kombination von beiden Ionenarten erzeugt werden. Dadurch sind in Bezug auf die Ionenflüsse nur quantitative Aussagen möglich.

Um die Frage nach dem Ursprung der hier erfassten Ströme letztendlich abschließend aufklären zu können, ist es nötig, die gemessenen Stromantworten schon bekannten Transport- oder Ionenkanalproteinen zuzuordnen zu können. Dies könnte durch die gezielten Untersuchungen von verschiedenen Ionenkanal- bzw. Transporter-Verlustmutanten oder Überexprimierern geschehen.

Als potentielle Kandidaten könnten die Mitglieder der anionenleitenden ALMT-Familie, wie zum Beispiel die Kanäle ALMT9 oder ALMT6 diese Ströme verursachen. Allerdings wurde für den vakuolären ALMT9 eine cytosolische Calciumregulierung zumindest an isolierten Mesophyllvakuolen von *N. benthamiana* ausgeschlossen (De Angeli et al., 2013). Dagegen wird ALMT6, zwar durch Calcium im Cytosol reguliert, aber vor allem in Schließzellvakuolen und in Blütengewebe gefunden und kaum in der Wurzel exprimiert (Kovermann et al., 2007; Meyer et al., 2011; Hedrich, 2012; Martinoia et al., 2012; De Angeli et al., 2013). Allerdings gibt es darüber hinaus noch andere Mitglieder der ALMT Familie, z.B. ALMT4 und -5, die auch im Tonoplasten lokalisiert sind, über deren Eigenschaften allerdings nichts weiter bekannt ist (Martinoia et al., 2012). Auch ein oder mehrere Nitrat- und Chloridtransporter der AtCLC-Familie sind im Tonoplasten zu finden (AtCLCa -b, -c und -g; Kap. 1.2.1) und könnten eventuell als Verursacher der untersuchten Leitfähigkeiten in Frage kommen (De Angeli et al., 2009; Zifarelli and Pusch, 2010; Martinoia et al., 2012). Obwohl in Pflanzen bisher keine Calciumregulation der AtCLC-Familie bekannt ist, lassen verschiedene Beispiele von CLCs beim Menschen eine calciumabhängige Steuerung, unter anderem durch Calciumsensorproteine, im pflanzlichen Organismus nicht gänzlich unwahrscheinlich erscheinen. Zum Beispiel hat hsCLC-K – ein Chlorid-Kanal der in Nieren und Ohren exprimiert wird – eine regulatorische Bindungsstelle für Calcium und wird durch extrazelluläres Calcium stimuliert (Gradogna et al., 2010). Für den spannungsgesteuerten Chloridkanal CLC-3 aus der Plasmamembran menschlicher Glioma Zellen ist ebenfalls eine Regulation durch Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen nachgewiesen worden (Cuddapah and Sontheimer, 2010).

Da Kalium das am häufigsten auftretende Kation in Pflanzen ist und an vielen intrazellulären Prozessen beteiligt ist (Kap. 1.2.2 und 1.4.3), muss das Kation ebenfalls als Verursacher der beobachteten vakuolären Leitfähigkeiten in Betracht gezogen werden. Als mögliche Kaliumtransportierende Proteine kommen dabei die Antiporter AtNHX1 und AtNHX2 in Frage (Kap. 1.2.2 und 1.4.3). Allerdings ist bei diesen nach heutigem Kenntnisstand keine Calciumregulation bekannt. Aussichtsreichere Kandidaten wären zum Beispiel TPC1- oder TPK-Kationenkanäle, die beide calciumgesteuert sind (Bihler et al., 2005; Beyhl et al., 2009; Dadacz-Narloch et al., 2011; Hedrich and Marten, 2011; Hedrich, 2012). Im Gegensatz zu den spannungsunabhängigen TPK-Kanälen, ist TPC1 allerdings spannungsgesteuert (Dreyer and Uozumi, 2011; Hedrich, 2012). Für TPK1 konnte zum Beispiel auch gezeigt werden, dass er eine wichtige Rolle bei der Adaption von Salzstress spielt und dabei Ziel eines calciumregulierten Stress-Signalweges ist (Latz et al. 2013). Durch die Calciumabhängigkeit in Kombination mit der Spannungsunabhängigkeit und der Expression in den Vakuolen von Wurzeln (Latz et al., 2007; Hedrich, 2012; Latz et al., 2013; Sharma et al., 2013; Kap. 1.2.2) zählen damit TPK1, -2, und -3 zu den aussichtsreichsten Kandidaten, falls es sich hier um Kalium Ströme handeln sollte.

Um allerdings endgültige Aussagen über die hier beobachteten calciumabhängigen Leitfähigkeiten in Bezug auf die translozierten Ionen und die daran beteiligten Transportproteine machen zu können, müssten mit Hilfe von Verlustmutanten für die jeweiligen potentiellen Kandidaten Schritt für Schritt die ermittelten Leitfähigkeiten aufgeschlüsselt werden. Auch die Verwendung spezifischer Kanalblocker könnte zur Aufklärung beitragen. Demzufolge könnten dann die gemessenen Ströme einzelnen oder mehreren Transportproteinen zugeordnet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode zur simultanen Aufzeichnung von intrazellulären Calciumänderungen und elektrischen Membranleitfähigkeiten könnte dann in Zukunft dazu beitragen, die Auswirkungen von Calciumänderungen auf Transportproteine an der Vakuolenmembran *in vivo* zielgerichtet elektrophysiologisch untersuchen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten neue Erkenntnisse zur oxidativen, pH- und ATP-abhängigen Regulation der V-ATPase-Funktion in Mesophyllvakuolen von *A. thaliana* erarbeitet werden. Dazu wurden Patch-Clamp-Experimente an der vakuolären Protonen-ATPase durchgeführt, die eine elektrophysiologische Untersuchung der Protonentransporteigenschaften und deren Regulation ermöglichten. Zusätzlich gestattete die Anwendung von intrazellulären Mikroelektroden zusammen mit einem Fluoreszenz-Bildgebungsverfahren an intakten Wurzelrhizodermiszellen von *A. thaliana* Keimlingen die *in vivo* Untersuchung von vakuolären Membranleitfähigkeiten und deren Regulation durch cytosolisches Calcium.

Durch die Patch-Clamp-Technik konnte die Spannungsabhängigkeit der V-ATPase bei verschiedenen luminalen pH-Werten erfasst werden. Mit Hilfe thermodynamischer Berechnungen konnte daraus eine Abnahme der Protonentransportrate pro hydrolysiertem ATP-Molekül bei gleichzeitigem Anstieg der vakuolären Protonenkonzentration berechnet werden. Durch die Kombination verschiedener pH-Werte in Cytosol bzw. Vakuole und zusätzlich ansteigenden ATP-Konzentrationen konnten tiefere Einblicke in die pH-abhängige Regulation der V-ATPase-Aktivität erlangt werden. Es konnte aufgezeigt werden, dass eine Abweichung des vakuolären pH-Wertes wesentlich stärker auf die ATP-Bindungsaffinität und Transportkapazität des Enzyms wirkt, als Änderungen der Protonenkonzentration auf cytosolischer Seite. Daraus konnte abgeleitet werden, dass cytosolische bzw. lumenale pH-Änderungen auf das gesamte Membran-durchquerende Enzym wirken und jeweils auf die andere Membranseite der V-ATPase weitergegeben werden. Zusätzlich wurden die in dieser Arbeit erhobenen Daten zur V-ATPase im Rahmen einer Zusammenarbeit von Prof. Dr. Ingo Dreyer (Universidad Politecnica, Madrid, Spanien) für die Erstellung eines mathematischen Modells genutzt. Es untermauert einen Rückkopplungsmechanismus der Protonenkonzentration auf die maximale Protonentransportrate ( $v_{max}$ ) und die ATP-Affinität ( $K_m$ ) und schlägt eine pH-abhängige Dissoziation der Protonen von der V-ATPase, auch unter ungünstigen intrazellulären Bedingungen, vor. Die Ausweitung der Regulationsstudien unter Einbeziehung verschiedener Mutanten konnte in Zusammenarbeit mit Jun. Prof. Dr. Thorsten Seidel und Mitarbeitern (Universität Bielefeld, Deutschland) eine oxidative Inhibierung der V-ATPase-Aktivität durch den Wegfall von Disulfidbrücken innerhalb des

Pumpproteins erfassen und mögliche Auswirkungen von Disulfidbindungen auf die Protonenkopplungsrate aufzeigen.

Mit Hilfe von intrazellulären Mikroelektroden konnte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass vakuoläre Leitfähigkeiten von Atrichoblasten in *A. thaliana* durch Stressfaktoren – verursacht durch den Einstich von intrazellulären Mikroelektroden – deutliche Veränderungen zeigen. Durch die Kombination der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme mit einem Fluoreszenz-Bildgebungsverfahren konnte eine Methode zur simultanen Aufzeichnung von Calciumänderungen und elektrischen Membranleitfähigkeiten an Trichoblastenvakuolen entwickelt werden. Dadurch konnte in weiterführenden Untersuchungen *in vivo* nachgewiesen werden, dass ein transienter Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration zu einer reversiblen Zunahme der Ströme von vakuolären Membranleitfähigkeiten führt, deren unbekannter Ursprung allerdings bereits bekannten Transportproteinen noch zugeordnet werden muss.

## 6. Summary

This dissertation provides new insights into the oxidative, pH- and ATP-dependent regulation of the V-ATPase function in *A. thaliana*. For this purpose the proton transport and its regulation was examined electrophysiologically by patch-clamp experiments on mesophyll cells. Additionally intracellular microelectrodes combined with the application of fluorescence imaging on intact root epidermal cells of *A. thaliana* seedlings allowed investigation of vacuolar membrane conductance and their regulation via cytosolic calcium *in vivo*.

The voltage dependency of the V-ATPase was recorded at various luminal pH values by the patch-clamp technique. Furthermore thermodynamic calculations showed a decrease of the proton transport rate per hydrolyzed ATP molecule due to an increase of the vacuolar proton concentration. Different cytosolic and vacuolar pH-values combined with increasing ATP-concentrations also provided deeper insights into the principles of the pH dependent regulation of the V-ATPase activity.

Changes in the cytosolic and luminal pH values on either side of the membrane were found to affect the entire function of the enzyme and thus seem to be transferred to the other side within the V-ATPase. Additionally the data of this dissertation was used by Prof. Dr. Ingo Dreyer (University Politecnica, Madrid, Spain) in the context of cooperation to create a mathematic model. It confirms a feedback system of the proton concentration on the maximum proton transport rate ( $v_{max}$ ) and the ATP binding affinity ( $K_m$ ). This model proposes a pH-dependent dissociation of the protons from the V-ATPase also under unfavorable intracellular conditions. Further examinations of the V-ATPase regulation with different mutants in collaboration with Jun. Prof. Dr. Thorsten Seidel and co-workers (University of Bielefeld, Germany) revealed oxidative inhibition of V-ATPase activity due to the removal of disulfide-bond formation within the pump protein. Additionally a possible effect of disulfide-bridge formation on proton coupling rate was shown.

The intracellular microelectrode measurements on intact root cells in the second part demonstrate that changes in the vacuolar membrane conductance of *A. thaliana* atrichoblasts are related to stress factors caused by the impalement of the electrodes. Further studies by a new method combining the application of fluorescence imaging with the two-electrode voltage-clamp allowed recording of calcium changes and electric membrane conductance within trichoblasts simultaneously. As a result it could be shown that a

transient rise of cytosolic calcium is linked to increasing currents of vacuolar membrane conductances *in vivo*. The unknown origin of these conductances however has to be dedicated to known transport proteins.

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1.</b> Übersicht aktiver und passiver Transportsysteme in der Vakuole .....	4
<b>Abbildung 1.2.</b> Schematisches Modell der V-ATPase .....	15
<b>Abbildung 1.3</b> Schematische Darstellung des Protonentransportes über die Vakuolenmembran .....	16
<b>Abbildung 2.1.</b> Anzucht der <i>A. thaliana</i> Keimlinge für Einstich-Experimente im Phytotron.....	28
<b>Abbildung 2.2.</b> Einfache schematische Darstellung eines Schaltbildes der Zwei-Elektroden Spannungsklemme .....	36
<b>Abbildung 2.3.</b> Spannungspulsprotokolle für Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Experimente an intakten Wurzelrhizodermiszellen.....	40
<b>Abbildung 2.4.</b> Schematische Darstellung der Etablierung verschiedener Patch-Clamp-Messkonfigurationen .....	44
<b>Abbildung 2.5.</b> Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers.....	46
<b>Abbildung 2.6.</b> Rampenpulsprotokoll .....	51
<b>Abbildung 3.1.</b> Aufzeichnung von ATP-induzierten V-ATPase-Strömen an Mesophyllvakuolen .....	59
<b>Abbildung 3.2.</b> Änderung der spannungsabhängigen V-ATPase-Pumpströme bei variierenden luminalen pH-Bedingungen .....	62
<b>Abbildung 3.3.</b> ATP-induzierte Auswärtsströme der V-ATPase bei unterschiedlichen pH-Konstellationen in Mesophyllvakuolen .....	65
<b>Abbildung 3.4.</b> V-ATPase-Aktivität in Wildtyp-Mesophyllvakuolen unter verschiedenen ATP-Konzentrationen und einem pH-Wert von 7,5 im Innen- und Außenmedium .....	67
<b>Abbildung 3.5.</b> V-ATPase-Aktivität in Wildtyp-Mesophyllvakuolen bei verschiedenen ATP-Konzentrationen und einem aus der Vakuole ins Cytosol gerichteten Protonengradienten (pH 7,5 <sub>cyt</sub> /5,5 <sub>vac</sub> und pH 9,5 <sub>cyt</sub> /7,5 <sub>vac</sub> ).....	68
<b>Abbildung 3.6.</b> V-ATPase-Aktivität in Wildtyp-Mesophyllvakuolen bei verschiedenen ATP-Konzentrationen und einem vom Cytosol in die Vakuole gerichteten Protonengradienten (pH 5,5 <sub>cyt</sub> / 7,5 <sub>vac</sub> und pH 7,5 <sub>cyt</sub> /9,5 <sub>vac</sub> ).....	70

<b>Abbildung 3.7.</b> Repräsentative, ATP-induzierte V-ATPase-Auswärtsströme von Wildtyp-Mesophyllvakuolen in An- und Abwesenheit von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	72
<b>Abbildung 3.8.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Effekt auf die V-ATPase-Pumpaktivität in Mesophyllvakuolen von Wildtyp-Pflanzen und den VHA-A-Mutanten C535S und C256S.....	73
<b>Abbildung 3.9.</b> FURA-2-Beladung von <i>A. thaliana</i> Wurzelrhizodermiszellen.....	76
<b>Abbildung 3.10.</b> Zeitliche Abnahme von Ionenströmen nach Einstich einer <i>double-barreled</i> Elektrode in Wurzelrhizodermiszellen von Col-0 .....	78
<b>Abbildung 3.11.</b> FURA-2-Beladung eines <i>A. thaliana</i> Col-0 Trichoblasten .....	80
<b>Abbildung 3.12.</b> Aufzeichnung der Änderungen im cytosolischen Calciumspiegel von intakten Wildtyp-Trichoblasten mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 .....	81
<b>Abbildung 3.13.</b> Calcium-induzierte Ströme in der Vakuole von intakten Trichoblasten.....	82
<b>Abbildung 4.1.</b> Vergleich der V-ATPase-Pumpstromdichten bei verschiedenen ATP-Konzentrationen und symmetrischen pH-Werten von 7,5 oder 5,5 in Wildtyp-Mesophyllvakuolen .....	90
<b>Abbildung 4.2.</b> Einfaches mechanistisches Schema des V-ATPase Pumpzyklus .....	91
<b>Abbildung 4.3.</b> pH-Abhängigkeit des K <sub>m</sub> -Wertes .....	93

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1.</b> Durchschnittliches Alter der für Patch-Clamp-Experimente verwendeten <i>A. thaliana</i> Pflanzen .....	25
<b>Tabelle 4.1.</b> Maximale ATP-induzierte Protonenstromdichten bei verschiedenen pH-Bedingungen.....	88
<b>Tabelle 4.2.</b> ATP-Abhängigkeit der V-ATPase-Pumpströme unter verschiedenen pH-Bedingungen.....	90



### 7.3 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* 5th ed. (Garland science, Taylor & Francis Group).
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.M., Thomine, S., Gambale, F., and Barbier-Brygoo, H. (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442: 939-942.
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.-M., Thomine, S., Gambale, F., and Barbier-Brygoo, H. (2009). Review. CLC-mediated anion transport in plant cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364: 195-201.
- De Angeli, A., Zhang, J., Meyer, S., and Martinoia, E. (2013). AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 4: 1804.
- Apse, M.P. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in Arabidopsis. *Science*. 285: 1256-1258.
- Apse, M.P., Sottosanto, J.B., and Blumwald, E. (2003). Vacuolar cation/H<sup>+</sup> exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Plant J.* 36: 229-239.
- Barbier-Brygoo, H., Renaudin, J.P., and Guern, J. (1986). The vacuolar membrane of plant cells: A newcomer in the field of biological membranes. *Biochimie* 68: 417-425.
- Barkla, B.J. and Pantoja, O. (1996). Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 159-184.
- Barragán, V., Leidi, E.O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J. a, Cubero, B., and Pardo, J.M. (2012). ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 1127-42.
- Batistič, O. and Kudla, J. (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1820: 1283-1293.
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K.M., and McKay, D.B. (1993). Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: A two domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J.* 12: 3357-3364.
- Bennett, A.B. and Spanswick, R.M. (1984). H<sup>+</sup>-Atpase activity from storage tissue of *Beta vulgaris*: ii. H<sup>+</sup>/ATP stoichiometry of an anion-sensitive H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 74: 545-548.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 11-21.

- Bertl, A., Blumwald, E., Coronado, R., Eisenberg, R., Findlay, G., Gradmann, D., Hille, B., Köhler, K., Kolb, H.A., and MacRobbie, E. (1992). Electrical measurements on endomembranes. *Science*. 258: 873-874.
- Bethmann, B., Thaler, M., Simonis, W., and Schönknecht, G. (1995). Electrochemical potential gradients of  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , and  $Cl^-$  across the tonoplast of the green alga *Eremosphaera viridis*. *Plant Physiol.* 109: 1317-1326.
- Beyenbach, K.W. and Wieczorek, H. (2006). The V-type  $H^+$ -ATPase: Molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* 209: 577-589.
- Beyhl, D., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., Farmer, E.E., Fromm, J., Marten, I., and Hedrich, R. (2009). The *fou2* mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium. *Plant J.* 58: 715-23.
- Bickel-sandkötter, S., Wagner, V., Schumann, D., and Düsseldorf, D.P.D.H. (1998). ATP-synthesis in archaea: Structure-function relations of the halobacterial A-ATPase. *Photosynthesis Research.* 57. 335-345.
- Bihler, H., Eing, C., Hebeisen, S., Roller, A., Czempinski, K., and Bertl, A. (2005). TPK1 Is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar cation channel. *Plant Physiol.* 139: 417-424.
- Blatt, M.R. (1992).  $K^+$  channels of stomatal guard cells. Characteristics of the inward rectifier and its control by pH. *J. Gen. Physiol.* 99: 615-644.
- Bose, J., Pottosin, I.I., Shabala, S.S., Palmgren, M.G., and Shabala, S. (2011). Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. *Front. Plant Sci.* 2: 1-17.
- Brett, C.L., Donowitz, M., Rao, R., and Christopher, L. (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 21205: 223-239.
- Brette, R. and Destexhe, A. (2012). *Handbook of neural activity*. Cambridge University Press. 44-91.
- Briskin, D.P., Basu, S., and Assmann, S.M. (1995). Characterization of the red beet plasma membrane  $H^+$ -ATPase reconstituted in a planar bilayer system. *Plant Physiol.* 108: 393-398.
- Briskin, D.P. and Reynolds-Niesman, I. (1991). Determination of  $H^+$ /ATP Stoichiometry for the plasma membrane  $H^+$ -ATPase from red beet (*Beta vulgaris L.*) storage tissue. *Plant Physiol.* 95: 242-50.
- Briskin, D.P. and Hanson, J.B. (1992). How Does the Plant Plasma Membrane  $H^+$ -ATPase Pump Protons? *J. of Exp. Bot.* 43: 269-289.
- Buch-Pedersen, M.J., Pedersen, B.P., Veierskov, B., Nissen, P., and Palmgren, M.G. (2009). Protons and how they are transported by proton pumps. *Pflugers Arch.* 457: 573-579.

- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T., and Raikhel, N. V (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 16: 3285-3303.
- Casey, J.R., Grinstein, S., and Orlowski, J. (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 50-61.
- Chico, M.J., Raices, M., Tellez, T.M., and Ulloa Rita Maria (2002). A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Cell* 128: 256-270.
- Chopin, F., Orsel, M., Dorbe, M.-F., Chardon, F., Truong, H.-N., Miller, A.J., Krapp, A., and Daniel-Vedele, F. (2007). The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell* 19: 1590-1602.
- Cipriano, D.J., Wang, Y., Bond, S., Hinton, A., Jefferies, K.C., Qi, J., and Forgac, M. (2008). Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 599-604.
- Clarkson, D.T. and Hanson, J.B. (1980). The mineral nutrition of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 239-298.
- Cross, R.L. and Müller, V. (2004). The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: Reversals in function and changes in the H<sup>+</sup>/ATP coupling ratio. *FEBS Lett.* 576: 1-4.
- Cross, R.L. and Taiz, L. (1990). Gene duplication as a means for altering H<sup>+</sup>/ATP ratios during the evolution of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPases and synthases. *FEBS Lett.* 259: 227-229.
- Cuddapah, V.A. and Sontheimer, H. (2010). Molecular interaction and functional regulation of ClC-3 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in human malignant glioma. *J. Biol. Chem.* 285: 11188-96.
- Dadacz-Narloch, B., Beyhl, D., Larisch, C., López-Sanjurjo, E.J., Reski, R., Kuchitsu, K., Müller, T.D., Becker, D., Schönknecht, G., and Hedrich, R. (2011). A novel calcium binding site in the slow vacuolar cation channel TPC1 senses luminal calcium levels. *Plant Cell* 23: 2696-707.
- Davies, J.M. (1997). Vacuolar energization: pumps, shunts and stress. *J. Exp. Bot.* 48: 633-641.
- Davies, J.M., Hunt, I., and Sanders, D. (1994). Vacuolar H<sup>+</sup>-pumping ATPase variable transport coupling ratio controlled by pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 8547-8551.
- Davies, J.M., Poole, R.J., Rea, P. a, and Sanders, D. (1992). Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 11701-11705.

- Davies, J.M., Sanders, D., and Gradmann, D. (1996). Reaction kinetics of the vacuolar H<sup>+</sup> - pumping ATPase in *Beta vulgaris*. *J. Membr. Biol.* 241: 231-241.
- Dettmer, J., Hong-hermesdorf, A., Stierhof, Y., and Schumacher, K. (2006). Vacuolar H<sup>+</sup> - ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 715-730.
- Diepholz, M., Venzke, D., Prinz, S., Batische, C., Flörchinger, B., Rössle, M., Svergun, D.I., Böttcher, B., and Féthière, J. (2008). A different conformation for EGC stator subcomplex in solution and in the assembled yeast V-ATPase: Possible implications for regulatory disassembly. *Structure* 16: 1789-1798.
- Dietz, K.J., Heber, U., and Mimura, T. (1998). Modulation of the vacuolar H<sup>+</sup> -ATPase by adenylates as basis for the transient CO<sub>2</sub>-dependent acidification of the leaf vacuole upon illumination. *Biochim. Biophys. Acta.* 1373: 87-92.
- Dietz, K.J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S.S., Harris, G.C., Chardonnens, a N., and Golldack, D. (2001). Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J. Exp. Bot.* 52: 1969-1980.
- Dodd, A.N., Kudla, J., and Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 593-620.
- Dreyer, I. and Uozumi, N. (2011). Potassium channels in plant cells. *FEBS J.* 278: 4293-4303.
- Dschida, W. and Bowman, B. (1995). The vacuolar ATPase: Sulfite stabilization and the mechanism of nitrate inactivation. *J. Biol. Chem.* 270: 1557-1563.
- Edmond, C., Shigaki, T., Ewert, S., Nelson, M.D., Connorton, J.M., Chalova, V., Noordally, Z., and Pittman, J.K. (2009). Comparative analysis of CAX2-like cation transporters indicates functional and regulatory diversity. *Biochem. J.* 418: 145-154.
- Etxeberria, E., Pozueta-Romero, J., and Gonzalez, P. (2012). In and out of the plant storage vacuole. *Plant Sci.* 190: 52-61.
- Faraco, M., Spelt, C., Bliet, M., Verweij, W., Hoshino, A., Espen, L., Prinsi, B., Jaarsma, R., Tarhan, E., de Boer, A.H., Di Sansebastiano, G.-P., Koes, R., and Quattrocchio, F.M. (2014). Hyperacidification of vacuoles by the combined action of two different P-ATPases in the tonoplast determines flower color. *Cell Rep.* 6: 32-43.
- Von der Fecht-Bartenbach, J., Bogner, M., Dynowski, M., and Ludewig, U. (2010). CLC-mediated NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles. *Plant Cell Physiol.* 51: 960-968.
- Felle, H.H. (2001). pH: Signal and messenger in plant cells. *Plant Biol.* 3: 577-591.

- Feng, Y. and Forgac, M. (1992a). A novel mechanism for regulation of vacuolar acidification. *J. Biol. Chem.* 267: 19769-19772.
- Feng, Y. and Forgac, M. (1992b). Cysteine 254 of the 73-kDa A subunit is responsible for inhibition of the coated vesicle H<sup>+</sup>-ATPase upon modification by sulfhydryl reagents. *J. Biol. Chem.* 267: 5817-5822.
- Feng, Y., Forgac, M. (1994). Inhibition of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase by disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* 269: 13224-13230.
- Forgac, M. (1998). Structure, function and regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. *FEBS Lett.* 440: 258-263.
- Forgac, M. (1999). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase of clathrin-coated vesicles is reversibly inhibited by S-nitrosoglutathione. *J. Biol. Chem.* 274: 1301-1305.
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 917-929.
- Gambale, F., Kolb, H.A., Cantu, A.M., and Hedrich, R. (1994). The voltage-dependent H<sup>+</sup>-ATPase of the sugar beet vacuole is reversible. *Eur. Biophys. J.* 22: 399-403.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K. a S., Romeis, T., and Hedrich, R. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 21425-21430.
- Gill, S.S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.
- Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K., and Maathuis, F.J.M. (2007). The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K<sup>+</sup> conductance and plays a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 10726-10731.
- Goldsmith, M.H.M. and Cleland, R.E. (1978). Contribution of tonoplast and plasma membrane to electrical properties of a higher-plant cell. *Planta* 143: 261-265.
- Grabe, M., Wang, H., and Oster, G. (2000). The mechanochemistry of V-ATPase proton pumps. *Biophys. J.* 78: 2798-2813.
- Gradogna, A., Babini, E., Picollo, A., and Pusch, M. (2010). A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of CLC-K kidney chloride channels. *J. Gen. Physiol.* 136: 311-323.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.

- Guern, J., Mathieu, Y., Kurkdjian, A., Manigault, P., Manigault, J., Gillet, B., Beloeil, J.C., and Lallemand, J.Y. (1989). Regulation of Vacuolar pH of Plant Cells: II. A  $^{31}\text{P}$  NMR study of the modifications of vacuolar pH in isolated vacuoles induced by proton pumping and cation/ $\text{H}^+$  exchanges. *Plant Physiol.* 89: 27-36.
- Hager, A. and Lanz, C. (1989). Essential sulfhydryl groups in the catalytic center of the tonoplast  $\text{H}^+$ -ATPase from coleoptiles of *Zea mays L.* as demonstrated by the biotin-streptavidin-peroxidase. *Planta* 180: 116-122.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 391: 85-100.
- Hanitzsch, M., Schnitzer, D., Seidel, T., Gollack, D., and Dietz, K.-J. (2007). Transcript level regulation of the vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase subunit isoforms VHA-a, VHA-E and VHA-G in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Membr. Biol.* 24: 507-518.
- Hashimoto, K. and Kudla, J. (2011). Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie* 93: 2054-2059.
- Hedrich, R. (2012). Ion channels in plants. *Physiol. Rev.* 92: 1777-1811.
- Hedrich, R., Barbier-Brygoo, H., Felle, H., Flügge, U.I., Lüttge, U., Maathuis, F.J.M., Marx, S., Prins, H.B.A., Raschke, K., Schnabl, H., Schroeder, J.I., Struve, I., Taiz, L., and Ziegler, P. (1988). general mechanisms for solute transport across the tonoplast of plant vacuoles: A patch-clamp survey of ion channels and proton pumps. *Bot. Acta* 101: 7-13.
- Hedrich, R., Flügge, U.I., and Fernandez, J.M. (1986). Patch-clamp studies of ion transport in isolated plant vacuoles. *FEBS Lett.* 204: 228-232.
- Hedrich, R., Kurkdjian, a, Guern, J., and Flügge, U.I. (1989). Comparative studies on the electrical properties of the  $\text{H}^+$  translocating ATPase and pyrophosphatase of the vacuolar-lysosomal compartment. *EMBO J.* 8: 2835-2841.
- Hedrich, R. and Kurkdjian, A. (1988). Characterization of an anion-permeable channel from sugar beet vacuoles: Effect of inhibitors. *EMBO J.* 7: 3661-3666.
- Hedrich, R. and Marten, I. (2011). TPC1–SV channels gain shape. *Mol. Plant:* 1-14.
- Hedrich, R. and Schroeder, J.I. (1989). The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 539-569.
- Hedrich, R. and Neher, E. (1987). Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature* 329: 833-836.
- Heizmann, C.W. and Hunziker, W. (1991). Intracellular calcium-binding proteins: More sites than insights. *Trends Biochem. Sci.* 16: 98-103.
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd ed. Palgrave Macmillian. 1-22

- Hirschi, K.D. (2004). The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiol.* 136: 2438-2442.
- Hirschi, K.D., Zhent, R., Cunningham, K.W., Reat, P.A., and Fink, G.R. (1996). CAX1, an H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 8782-8786.
- Hong-Hermesdorf, A., Brüx, A., Grüber, A., Grüber, G., and Schumacher, K. (2006). A WNK kinase binds and phosphorylates V-ATPase subunit C. *FEBS Lett.* 580: 932-939.
- Hurth, M.A., Suh, S.J., Kretschmar, T., Geis, T., Bregante, M., Gambale, F., Martinoia, E., Neuhaus, H.E., Kaiserslautern, D., and Germany, M.A.H. (2005). Impaired pH homeostasis in Arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast *Plant Physiol.* 137: 901-910.
- Jammes, F., Hu, H.-C., Villiers, F., Bouten, R., and Kwak, J.M. (2011). Calcium-permeable channels in plant cells. *FEBS J.* 278: 4262-4276.
- Jauh, G., Phillips, T., and Rogers, J. (1999). Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* 11: 1867-1882.
- Jossier, M., Kroniewicz, L., Dalmas, F., Le Thiec, D., Ephritikhine, G., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H., Vavasseur, A., Filleur, S., and Leonhardt, N. (2010). The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *Plant J.* 64: 563-576.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., and Martinoia, E. (2011). Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* 9: e0153.
- Kaplan, B., Davydov, O., Knight, H., Galon, Y., Knight, M., R, F., and Fromm, H. (2006). Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients reveal ABRE-related sequences as Ca<sup>2+</sup>-responsive cis elements in Arabidopsis. *Plant Cell.* 18: 2733-2748.
- Kettner, C. (2003). Inhibition of the yeast V-type ATPase by cytosolic ADP. *FEBS Lett.* 535: 119-124.
- Kettner, C., Bertl, A., Obermeyer, G., Slayman, C., and Bihler, H. (2003). Electrophysiological analysis of the yeast V-type proton pump: Variable coupling ratio and proton shunt. *Biophys. J.* 85: 3730-3738.
- Kiegle, E., Moore, C. a, Haseloff, J., Tester, M. a, and Knight, M.R. (2000). Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the Arabidopsis root. *Plant J.* 23: 267-278.
- Kinosita, K., Yasuda, R., and Noji, H. (2000). F<sub>1</sub>-ATPase: A highly efficient rotary ATP machine. *Essays Biochem.* 35: 3-18.
- Kluge, C., Lahr, J., Hanitzsch, M., Bolte, S., Gollmack, D., and Dietz, K.-J. (2003). New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35: 377-388.

- Knight, H., Trewavas, a J., and Knight, M.R. (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12: 1067-1078.
- Knight, M.R., Read, N.D., Campbell, a K., and Trewavas, a J. (1993). Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins. *J. Cell Biol.* 121: 83-90.
- Kovermann, P., Meyer, S., Hörtensteiner, S., Picco, C., Scholz-Starke, J., Ravera, S., Lee, Y., and Martinoia, E. (2007). The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant J.* 52: 1169-80.
- Krebs, M., Beyhl, D., Görlich, E., Al-Rasheid, K. a S., Marten, I., Stierhof, Y.-D., Hedrich, R., and Schumacher, K. (2010). *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 3251-3256.
- Latz, A., Becker, D., Hekman, M., and Mu, T. (2007). TPK1, a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore  $\text{K}^+$  channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J.* 52: 449-459.
- Latz, A., Mehlmer, N., Zapf, S., Mueller, T.D., Wurzinger, B., Pfister, B., Csaszar E., Hedrich, R., Teige, M., Becker, D. (2013). Salt stress triggers phosphorylation of the *Arabidopsis* vacuolar  $\text{K}^+$  channel TPK1 by calcium-dependent protein kinases (CDPKs). *Molecular Plant* 6: 1274-1289.
- Lee, S.M., Kim, H.S., Han, H.J., Moon, B.C., Kim, C.Y., Harper, J.F., and Chung, W.S. (2007). Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (ACA11) that is localized to vacuole membranes in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 581: 3943-3949.
- Leigh, R. and Jones, R. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol.* 97: 1-13.
- León, J., Rojo, E., and Sánchez-Serrano, J.J. (2001). Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 52: 1-9.
- Lew, R.R. (2004). Osmotic effects on the electrical properties of *Arabidopsis* root hair vacuoles in situ. *Plant Physiol.* 134: 352-360.
- Lewit-Bentley, A. and Réty, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 637-643.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4th ed. W. H. Freeman & Co. 579-615
- Lohse, G., and Hedrich, R. (1992). Characterization of the plasma-membrane  $\text{H}^+$ -ATPase from *Vicia faba* guard cells. *Planta* 188: 206-214.
- Ma, B., Xiang, Y., and An, L. (2011). Structural bases of physiological functions and roles of the vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase. *Cell. Signal.* 23: 1244-1256.



- Maeshima, M. (2001). Tonoplast transporters: Organization and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 469-497.
- Maresova, L. and Sychrova, H. (2005). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Mol. Microbiol.* 55: 588-600.
- Marmagne, A., Vinauger-Douard, M., Monachello, D., de Longevialle, A.F., Charon, C., Allot, M., Rappaport, F., Wollman, F.-A., Barbier-Brygoo, H., and Ephritikhine, G. (2007). Two members of the Arabidopsis CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *J. Exp. Bot.* 58: 3385-3393.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press. 229-299.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, Ü., Müller-Röber, B., and Schulz, B. (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* 214: 345-355.
- Martinoia, E., Maeshima, M., and Neuhaus, H.E. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J. Exp. Bot.* 58: 83-102.
- Martinoia, E., Meyer, S., De Angeli, A., and Nagy, R. (2012). Vacuolar transporters in their physiological context. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 183-213.
- Martiny-Baron, G., Manolson, M.F., Poole, R.J., Hecker, D., and Scherer, G.F.E. (1992). Proton transport and phosphorylation of tonoplast polypeptides from zucchini are stimulated by the phospholipid platelet-activating factor. *Plant Physiol.* 99: 1635-1641.
- Marty, A. and Neher, E. (1995). Tight-seal whole-cell recording. In single-channel recording. Plenum Press. New York: 31-51.
- Marty, F. (1999). Plant vacuoles. *Plant Cell* 11: 587-599.
- Mei, H., Zhao, J., Pittman, J.K., Lachmansingh, J., Park, S., and Hirschi, K.D. (2007). In planta regulation of the Arabidopsis  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter CAX1. *J. Exp. Bot.* 58: 3419-3427.
- Merzendorfer, H., Gräf, R., Huss, M., Harvey, W.R., and Wiczorek, H. (1997). Regulation of proton-translocating V-ATPases. *J. Exp. Biol.* 200: 225-235.
- Meyer, S., De Angeli, A., Fernie, A.R., and Martinoia, E. (2010). Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends Plant Sci.* 15: 40-7.
- Meyer, S., Scholz-Starke, J., De Angeli, A., Kovermann, P., Burla, B., Gambale, F., and Martinoia, E. (2011). Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *Plant J.* 67: 247-257.
- Muench, S.P., Huss, M., Song, C.F., Phillips, C., Wiczorek, H., Trinick, J., and Harrison, M. a. (2009). Cryo-electron microscopy of the vacuolar ATPase motor reveals its mechanical and regulatory complexity. *J. Mol. Biol.* 386: 989-999.

- Müller, M.L., Irkens-Kiesecker, U., Kramer, D., and Taiz, L. (1997). Purification and reconstitution of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases from lemon fruits and epicotyls. *J. Biol. Chem.* 272: 12762-12770.
- Müller, M.L., Irkens-Kiesecker, U., Rubinstein, B., and Taiz, L. (1996). On the mechanism of hyperacidification in lemon: Comparison of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activities of fruits and epicotyls. *J. Biol. Chem.* 271: 1916-1924.
- Müller, M.L., Jensen, M., and Taiz, L. (1999). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase of lemon fruits is regulated by variable H<sup>+</sup>/ATP coupling and slip. *J. Biol. Chem.* 274: 10706-10716.
- Müller, M.L. and Taiz, L. (2002). Regulation of the lemon-fruit V-ATPase by variable stoichiometry and organic acids. *J. Membr. Biol.* 185: 209-20.
- Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A.G.W., and Walker, J.E. (2005). Structure of the rotor of the V-Type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science* 308: 654-659.
- Nalefski, E. a and Falke, J.J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5: 2375-2390.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1992). The patch clamp technique. *Sci.Am.* 266: 44-51.
- Nelson, N. (1988). Structure, function, and evolution of proton-ATPases. *Plant Physiol.* 86: 1-3.
- Nelson, N. (1992). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-one of the most fundamental ion pumps in nature. *J. Exp. Biol.* 172: 19-27.
- Nelson, N., Beltrán, C., Supek, F., and Nelson, H. (1992). Cell biology and evolution of proton pumps. *Cell. Physiol. Biochem.* 2: 150-158.
- Neuhaus, H.E. (2007). Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Lett.* 581: 2223-2226.
- Nishi, T. and Forgac, M. (2002). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases-nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 94-103.
- Numberger, M. and Draguhn, A. (1996). Patch-Clamp-Technik. 1.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag: 3-113
- Okuno, D., Iino, R., and Noji, H. (2011). Rotation and structure of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase. *J. Biochem.* 149: 655-64.
- Orij, R., Brul, S., and Smits, G.J. (2011). Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1810: 933-44.

- Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L., and Rogers, J.C. (1996). Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* 85: 563-72.
- Peiter, E., Maathuis, F.J.M., Mills, L.N., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A.M., and Sanders, D. (2005). The vacuolar Ca<sup>2+</sup>-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434: 404-408.
- Pérez-Sayáns, M., Suárez-Peñaranda, J.M., Barros-Angueira, F., Diz, P.G., Gándara-Rey, J.M., and García-García, A. (2012). An update in the structure, function, and regulation of V-ATPases: The role of the C subunit. *Brazilian J. Biol.* 72: 189-198.
- Pittman, J.K. (2012). Multiple transport pathways for mediating intracellular pH homeostasis: The contribution of H<sup>+</sup>/ion exchangers. *Front. Plant Sci.* 3: 1-8.
- Pusch, M. and Neher, E. (1988). Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch.* 411: 204-211.
- Randall, S.K. and Sze, H. (1986). Properties of the partially purified tonoplast H<sup>+</sup>-pumping ATPase from oat roots. *J. Biol. Chem.* 261: 1364-1371.
- Ratajczak, R. (2000). Structure, function and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-translocating ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 17-36.
- Rienmüller, F., Beyhl, D., Lautner, S., Fromm, J., Al-rasheid, K.A.S., Ache, P., Farmer, E.E., Marten, I., and Hedrich, R. (2010). Guard cell-specific calcium sensitivity of high density and activity SV/TPC1 channels. *Plant Cell* 51: 1548-1554.
- Rienmüller, F., Dreyer, I., Scho, G., Schulz, A., Schumacher, K., Martinoia, E., Marten, I., and Hedrich, R. (2012). Luminal and cytosolic pH feedback on proton pump activity and ATP affinity of V-type ATPase from Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 287: 8986-8993.
- Roelfsema, M.R.G. and Hedrich, R. (2010). Making sense out of Ca<sup>2+</sup> signals: Their role in regulating stomatal movements. *Plant. Cell Environ.* 33: 305-321.
- Scherer, G.F., Martiny-Baron, G., and Stoffel, B. (1988). A new set of regulatory molecules in plants: A plant phospholipid similar to platelet-activating factor stimulates protein kinase and proton-translocating ATPase in membrane vesicles. *Planta* 175: 241-253.
- Scherer, G.F. and Stoffel, B. (1987). A plant lipid and the platelet-activating factor stimulate ATP-dependent H<sup>+</sup> transport in isolated plant membrane vesicles. *Planta* 172: 127-130.
- Schmidt, A.L. and Briskin, D.P. (1993). Energy transduction in tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris L.*) storage tissue: H<sup>+</sup>/substrate stoichiometries for the H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 301: 165-173.
- Schönknecht, G. (2013). Calcium signals from the vacuole. *Plants* 2: 589-614.
- Schroeder, J.I. and Hedrich, R. (1989). Involvement of ion channels and active transport in osmoregulation and signaling of higher plant cells. *Trends Biochem. Sci.* 14: 187-192.

- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., Büttner, M., Schneider, S., Sauer, N., and Hedrich, R. (2011). Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *Plant J.* 68: 129-136.
- Schulze, C., Sticht, H., Meyerhoff, P., and Dietrich, P. (2011). Differential contribution of EF-hands to the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation in the plant two-pore channel TPC1. *Plant J.* 68: 424-432.
- Schumacher, K. (2006). Endomembrane proton pumps: Connecting membrane and vesicle transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 595-600.
- Schumacher, K. and Krebs, M. (2010). The V-ATPase: Small cargo, large effects. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 724-730.
- Seidel, T., Schnitzer, D., Golldack, D., Sauer, M., and Dietz, K.-J. (2008). Organelle-specific isoenzymes of plant V-ATPase as revealed by in vivo-FRET analysis. *BMC Cell Biol.* 9: 1-14.
- Seidel, T., Scholl, S., Krebs, M., Rienmüller, F., Marten, I., Hedrich, R., Hanitzsch, M., Janetzki, P., Dietz, K., and Schumacher, K. (2012). Regulation of the V-type ATPase by redox modulation. *Biochem. J.* 251: 243-251.
- Sharma, T., Dreyer, I., and Riedelsberger, J. (2013). The role of  $\text{K}^+$  channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant. Sci.* 4: 1-16.
- Shigaki, T. and Hirschi, K.D. (2006). Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/ $\text{H}^+$  exchangers in plants. *Plant Biol.* 8: 419-429.
- Shigaki, T., Pittman, J.K., and Hirschi, K.D. (2003). Manganese specificity determinants in the *Arabidopsis* metal/ $\text{H}^+$  antiporter CAX2. *J. Biol. Chem.* 278: 6610-6617.
- Stange, A., Hedrich, R., and Roelfsema, M.R.G. (2010).  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of guard cell anion channels, triggered by hyperpolarization, is promoted by prolonged depolarization. *Plant J.* 62: 265-276.
- Sze, H., Li, X., and Palmgren, M. (1999). Energization of plant cell membranes by  $\text{H}^+$ -pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11: 677-690.
- Sze, H., Schumacher, K., Müller, M.L., Padmanaban, S., and Taiz, L. (2002). A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase. *Trends Plant Sci.* 7: 157-161.
- Sze, H., Ward, J., Lai, S., and Perera, I. (1992). Vacuolar-type  $\text{H}^+$ -translocating ATPases in plant endomembranes: Subunit organization and multigene families. *J. Exp. Biol.* 172: 123-135.
- Taiz, B.Y.L. (1992). The plant vacuole. *J. Exp. Biol.* 172: 113-122.

- Tavakoli, N., Kluge, C., Gollack, D., Mimura, T., and Dietz, K.J. (2001). Reversible redox control of plant vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity is related to disulfide bridge formation in subunit E as well as subunit A. *Plant J.* 28: 51-59.
- The Axon Guide (2008). *The Axon Guide. A guide to electrophysiology & biophysics laboratory techniques.* 3rd Edit. Axon Instruments. 27-84.
- Tomashek, J.J. and Brusilow, W.S. (2000). Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: A history of variability. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32: 493-500.
- Trentmann, O. and Haferkamp, I. (2013). Current progress in tonoplast proteomics reveals insights into the function of the large central vacuole. *Front. Plant Sci.* 4: 1-10.
- Tsien, R.Y. (1989). Fluorescent probes of cell signaling. *Annu. Rev. Neurosci.* 12: 227-253.
- Walker, D.J., Leigh, R.A., and Miller, A.J. (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 10510-10514.
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., and Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 7370-7390.
- Wang, Y. and Wu, W.-H. (2013). Potassium transport and signaling in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 451-76.
- Ward, J.M., Reinders, A., Hsu, H.-T., and Sze, H. (1992). Dissociation and reassembly of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase complex from oat roots. *Plant Physiol.* 99: 161-169.
- Ward, J.M. and Schroeder, J.I. (1994). Calcium-activated K<sup>+</sup> channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* 6: 669-683.
- White, P.J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Science.* 1465: 171-189.
- White, P.J. and Broadley, M.R. (2003). Calcium in plants. *Ann. Bot.* 92: 487-511.
- Wink, M. (1993). The plant vacuole: A multifunctional compartment. *J. Exp. Bot.* 44: 231-246.
- Yabe, I., Horiuchi, K., Nakahara, K., Hiyama, T., Yamanaka, T., Wang, P.C., Toda, K., Hirata, a, Ohsumi, Y., Hirata, R., Anraku, Y., and Kusaka, I. (1999). Patch clamp studies on V-type ATPase of vacuolar membrane of haploid *Saccharomyces cerevisiae*. Preparation and utilization of a giant cell containing a giant vacuole. *J. Biol. Chem.* 274: 34903-34910.
- Yoshida, K., Kawachi, M., Mori, M., Maeshima, M., Kondo, M., Nishimura, M., and Kondo, T. (2005). The involvement of tonoplast proton pumps and Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchangers in the change of petal color during flower opening of morning glory, *Ipomoea tricolor cv. Heavenly Blue*. *Plant Cell Physiol.* 46: 407-415.

Zifarelli, G. and Pusch, M. (2010). CLC transport proteins in plants. *FEBS Lett.* 584: 2122-217.

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Science.* 334: 678-683.

## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
%	Prozent
Ω	Ohm (elektrischer Widerstand)
[X]	Konzentration des Stoffes X
μ	Mikro
μm	Mikrometer
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
Δt	Zeitdifferenz
Δt(V <sub>H1/H2</sub> )	Zeitraum der applizierten Haltespannungen
¼ MS	Spezielles Nährmedium
A-ATPase	Archae-ATPase aus Archaeobakterien
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ACA	P-Typ-Calcium-ATPase
ADP	Adenosindiphosphat
Abb.	Abbildung
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
<i>ALMT</i>	<i>Aluminium-activated malate transporter</i>
NRT2.7	Nitrattransporter
ATP	Adenosintriphosphat
BF	Bafilomycin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bzw.	Beziehungsweise
C°	Grad Celsius
C <sup>256</sup>	Cysteinrest an der Stelle 256 in VHA-A
C <sup>279</sup>	Cysteinrest an der Stelle 279 in VHA-A
C <sup>535</sup>	Cysteinrest an der Stelle 535 in VHA-A
C256	Mutante bei der Cystein an der Stelle 256 in VHA-A gegen Serin ausgetauscht wurde

---

C535	Mutante bei der Cystein an der Stelle 535 in VHA-A gegen Serin ausgetauscht wurde
C	Kapazität
c	Protonenkopplungsrate
C-Fast	Schnelle Kapazität
C-Slow	Langsame Kapazität
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
ca.	Circa
CaM	Calmodulin
CAX	<i>Calcium exchanger</i>
CBL	<i>Calmodulin-B-like protein</i>
CDPK	<i>Calcium-dependent protein kinase</i>
C <sub>fast</sub>	Schnelle Kapazität
CHX	Kalium-Natrium/Protonen Transporter
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
CLC	<i>Chloride channel</i>
C <sub>m</sub>	Membrankapazität
cm	Zentimeter
CML	<i>Calmodulin-like protein</i>
CNGC	<i>Cyclic nucleotide gated channel</i>
Col 0	Ökotyp Columbia 0
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cs <sup>+</sup>	Cäsiumion
C <sub>slow</sub>	Langsame Kapazität
cyt	Cytosol
DA/AD	Digital-Analog/Analog-Digital-Wandler
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
e <sup>-</sup>	Elektron
E <sub>A</sub> <sup>-</sup>	Nernstpotential für Anionen
EF-Hand	Spezifisches Aminosäuremotiv
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure



---

$E_K^+$	Nernstpotential für Kationen
$E_m$	Freilaufendes Potential der Vakuole
$E_{rev}$	Umkehrpotential
F	Faraday-Konstante
F-ATPase	$F_0F_1$ -ATPase, ATP-Synthase
g	Erdbeschleunigung
GLR	<i>Glutamate-like receptor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
G $\Omega$	Gigaohm
H <sup>+</sup>	Proton
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hz	Herz
I	Strom
$I_{inject}$	Beladungsstrom
$I_{max}$	Maximaler Strom
$I_{min}$	Minimaler Strom
ln	Natürlicher Logarithmus
$I_{net}$	Nettostrom
log <sub>10</sub>	Logarithmus mit der Basis 10
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphate
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Kha	CHX-Transporter
kHz	Kilohertz
K <sub>ir</sub>	Kaliumkanal
$K_m$	$K_m$ -Wert
M $\Omega$	Megaohm
m	Meter

---

mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nA	Nanoampere
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
M	Molar
Mes	Morpholinoethansulfonsäure
MgATP	Magnesium-ATP
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mosmol	Milliosmol
ms	Millisekunden
MSCC	Mechanosensitiver, calciumpermeabler MSCC-Ionenkanal
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mV	Millivolt
NHX	Natrium-Protonen <i>exchanger</i>
nM	Nanomolar
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat-Ion
O <sub>2</sub>	Molekularer Sauerstoff
OPA	Operationsverstärker
pA	Picoampere
pF	Picofarad
pH	Maß für die Säure-Base-Stärke
PMF	Proton-motive force
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
R	Gaskonstante
R <sub>f</sub>	Rückkopplungswiderstand
R <sub>m</sub>	Membranwiderstand

---

RT	Raumtemperatur
$R_{p1/2}$	Widerstand der Messelektrode ME1 oder ME2
s	Sekunden
SE	<i>Standard error</i>
SUC	<i>Sucrose symporter</i>
SV	<i>Slow vacuolar</i>
T	Absolute Temperatur in Kelvin
tDT	Dicarboxylattransporter
TIP	<i>Tonoplast intrinsic proteins</i>
TPC	<i>Two-pore channel</i>
TPK	<i>Two-pore K<sup>+</sup></i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
$U_{aus}$	Ausgangsspannung
U/min	Umdrehungen pro Minute
$U_{pip}$	Pipettenspannung
$U_{soll}$	Sollspannung
V	Volt
vac	Vakuole
$V_{cmd}$	Sollspannung
V-ATPase	Vakuoläre Protonen-ATPase
V-PPase	Vakuoläre Pyrophosphatase
vgl.	Vergleiche
$V_H$	Haltespannung
VHA-	Untereinheit der vakuolären Protonen-ATPase in <i>A. thaliana</i>
$V_{LJP}$	<i>Liquid junction potential</i>
$V_m$	Membranpotential
$v_{max}$	$v_{max}$ -Wert
$V_T$	Testspannung
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 7.5 Publikationen

**Rienmüller F.**, Beyhl D., Lautner S., Fromm J., Al-Rasheid K.A., Ache P., Farmer E.E., Marten I., Hedrich R.

Plant Cell Physiol. 2010; 51 (9): 1548-54.

*Guard cell-specific calcium sensitivity of high density and activity SV/TPC1 channels.*

**Rienmüller F.**, Dreyer I., Schönknecht G., Schulz A., Schumacher K., Nagy R., Martinoia E., Marten I., Hedrich R.

J. Biol. Chem. 2012; 287 (12): 8986-93.

*Luminal and Cytosolic pH Feedback on Proton Pump Activity and ATP Affinity of V-type ATPase of Arabidopsis.*

Seidel T., Scholl S., Krebs M., **Rienmüller F.**, Marten I., Hedrich R., Hanitzsch M., Janetzki P., Dietz K.J., Schumacher K.,

Biochem. J. 2012; 448 (2): 243-51.

*Regulation of the V-Type ATPase by Redox-Modulation.*

## 7.6 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Florian Christian Rienmüller

Geburtsdatum: 20.11.1980

Geburtsort: Stuttgart

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

### Schulbildung

1987-1991 Grundschule Oberdorf-Bopfingen

1991-2001 Ostalbgymnasium Bopfingen

20.06.2001 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulausbildung

**2003-2005** Studium der Biologie (Vordiplom) an der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

**2005-2009** Studium der Biologie (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit den Schwerpunktfächern Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Biochemie und Biotechnologie.

Abschluss mit der Note: Gut

**23.06.2008-22.04.2009** Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von apl. Prof. Dr. Irene Marten zum Thema: „Elektrophysiologische Untersuchung elektrogener Ionen-transportproteine an *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellvakuolen“ am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

**01.06.2009-30.04.2013** Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Leitung von Prof. Dr. Rainer Hedrich.

**Posterpräsentation:**

F. Rienmüller, D. Beyhl, I. Marten, M.R.G. Roelfsema, R. Hedrich

*“Role of Vacuolar Ion Channels and Pumps in Lipid Signaling”*

Sommersymposium des Graduiertenkolleg 1342 (Pommersfelden, 2010)

F. Rienmüller, I. Dreyer, A. Schulz, I. Marten, M.R.G. Roelfsema, R. Hedrich

*“Role of Vacuolar Ion Channels and Pumps in Lipid Signaling”*

Sommersymposium des Graduiertenkolleg 1342 (Würzburg, 2011)

F. Rienmüller, I. Dreyer, A. Schulz, I. Marten, R. Hedrich

*“pH feedback on proton pump activity of the V-type ATPase from Arabidopsis”*

Deutsche Botanikertagung (Berlin, 2011)

F. Rienmüller, I. Dreyer, A. Schulz, I. Marten, R. Roelfsema, R. Hedrich

*“pH feedback on proton pump activity of the V-type ATPase from Arabidopsis”*

Joint Symposium 2012, Graduiertenkolleg 1342 und iGRAD plant (Düsseldorf, 2012)

**Vorträge:**

Klausurtagung des SFB 487 (Bad Brückenau, 2010):

*“Regulation and targeting of two pore channels in Arabidopsis”*

Progress - Meeting im Rahmen der Forschergruppe 1061 (Würzburg, 2011):

*„Elektrophysiologische Charakterisierung der vakuolären ATPase in Arabidopsis thaliana Mesophyllzellen“*

## 7.7 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Rainer Hedrich bedanken, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation unter seiner Anleitung am Institut für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg anzufertigen. Die Bedingungen, unter denen ich seinem Labor arbeiten durfte, hätten nicht besser sein können.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Prof. Dr. Irene Marten für die ausgezeichnete und unermüdliche Betreuung meiner Arbeit. Ohne ihre fortwährende Unterstützung und Motivation in allen Phasen der Arbeit, ihre konstruktive Kritik, ihre Ideen, Erklärungen und Fragen und die netten Gespräche wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt auch PD Dr. Rob Roelfsema für die Betreuung des zweiten Teils dieser Arbeit. Ich möchte mich für die vielen Ideen, die Hilfestellung und Unterstützung, konstruktive Kritik und für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für sein Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Patrick Mumm und Dr. Alexander Schulz, mit denen ich als Kollegen und Freunde viele nette und konstruktive Gespräche hatte und die auch an der Korrektur beteiligt waren. Ich möchte mich darüber hinaus auch bei allen anderen Kollegen und Freunden für die schöne Zeit am Institut bedanken.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere Joachim, Rainer, Thomas und Thomas danke ich herzlichst für ihre Hilfe bei der Pflanzenanzucht, der Reparatur/Konstruktion verschiedenster Dinge und bei den Wirren des Laboralltags. Durch die Hilfsbereitschaft aller Mitarbeiter und die nette Atmosphäre am Institut hat es sehr viel Freude gemacht dort zu arbeiten.

Diese Dissertation und mein ganzes Studium wären ohne die Unterstützung meiner Familie so nicht möglich gewesen. Daher auch ein riesiges Dankeschön an meine Eltern und meinen Bruder.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Freundin Beatrice, die mich in allen Phasen vom Studium bis zur Dissertation mit ihrer Liebe immer unterstützt hat und mir bei Schwierigkeiten immer aufmunternd zur Seite stand.

## 7.8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbstständig und ohne die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich versichere, dass ich die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt bekommen habe und insbesondere keine Person oder Organisation eingeschaltet habe, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung der Dissertation sucht.

Ich erkläre hiermit, dass in der vorliegenden Dissertation die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich habe bisher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, weder weitere akademische Grade erworben, noch zu erwerben versucht.

Himberg in Österreich

.....

Florian Rienmüller