

**Auswirkungen einer V-PPase-Überexpression
auf *Nicotiana benthamiana* Blattzellen
und deren physiologische Bedeutung unter Salzbelastung**



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

vorgelegt von

Dorothea Graus

geboren in Aschaffenburg

Würzburg, 2019

**Auswirkungen einer V-PPase-Überexpression
auf *Nicotiana benthamiana* Blattzellen
und deren physiologische Bedeutung unter Salzbelastung**



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

vorgelegt von

Dorothea Graus

geboren in Aschaffenburg

Würzburg, 2019

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Stressfaktor Natrium.....	9
1.2. Die Vakuole.....	11
1.2.1. Aufgaben pflanzlicher Vakuolen.....	11
1.2.2. Stofftransport über den Tonoplasten.....	15
1.3. Vakuoläre Protonenpumpen.....	18
1.3.1. Vakuoläre ATPase.....	19
1.3.2. Membranständige Pyrophosphatasen.....	22
Vorkommen und Charakteristika.....	22
Struktur und Funktionsweise.....	24
Physiologische Bedeutung.....	25
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	32
2. Material und Methoden	33
2.1. Identifikation der <i>NbVHP</i> -Sequenzen.....	33
2.2. Generierung der transient exprimierbaren PPase-Vektoren.....	34
2.2.1. Extrahieren von <i>NbVHP1</i> - und <i>NbVHP2</i> -Sequenz aus <i>N. benthamiana</i>	34
2.2.2. Erstellen des Vektors pCambia mit freiem GFP.....	36
2.2.3. Einfügen der PPase-Varianten in den Vektor pCambia mit freiem GFP.....	42
2.2.4. Erstellen des mGFP-NbVHP1-Konstruktes.....	43
2.2.5. Agrobakterientransformation.....	44
2.2.6. Herstellung von Agrobakterien-Glycerinstammkulturen.....	46
2.2.7. Sequenzierung.....	46
2.3. Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> Mesophyllzellen.....	46
2.3.1. Anzuchtbedingungen von <i>Nicotiana benthamiana</i>	46
2.3.2. Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> via <i>A. tumefaciens</i>	47
2.3.3. Präparation von Mesophyll-Protoplasten und Vakuolen.....	48
2.4. Genexpressionsanalysen.....	50
2.4.1. mRNA-Isolation aus Blattgewebe.....	50
2.4.2. mRNA-Isolation aus Protoplasten.....	51
2.4.3. cDNA – Reverse Transkriptase.....	53
2.4.4. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	53
2.5. Konfokale Laser Scanning-Mikroskopie (CLSM).....	57
2.6. Membranpotenzial-Messung.....	57

2.7. Patch-Clamp-Technik	59
2.7.1. Vorzeichenkonvention der Vakuolenmembranspannung	61
2.7.2. Elektroden	62
2.7.3. Applikationspipette	63
2.7.4. Patch-Clamp-Messplatz	63
2.7.5. Durchführung der Patch-Clamp-Messungen	65
2.7.6. Messlösungen und Liquid-Junction-Potential	67
2.7.7. Aufzeichnung und Auswertung der Messdaten	68
2.8. pH-Visualisierung in Cytosol und Vakuole.....	70
2.9. Atomabsorptionsspektrometrie.....	72
2.10. Apoplastenwaschung zur Osmolalitätsmessung.....	73
2.11. Puls-Amplituden-modulierende (PAM) Chlorophyll-Fluorometrie.....	74
2.12. PPase-Hydrolyseaktivitäts-Messung	77
2.13. Ionen- und Metabolit-Messung	78
3. Ergebnisse	80
3.1. Strategie und Übersicht der elektrophysiologischen und physiologischen Herangehensweise der V-PPase-Untersuchungen.....	80
3.2. Identifikation und Expressionnachweis von <i>NbVHP1</i> und <i>NbVHP2</i>	81
3.3. Transiente PPase-Überexpression in <i>Nicotiana benthamiana</i> Blättern.....	83
3.3.1. Fluoreszenznachweis transient transformierter Mesophyllzellen	84
3.3.2. Calcium-Abhängigkeit der V-PPasen	87
3.3.3. Funktionalität der V-PPasen in transformierten Mesophyll-Vakuolen.....	89
3.3.4. Hydrolyseaktivität der löslichen Zellkompartimente nach Transformation mit verschiedenen PPasen	91
3.4. Einfluss der <i>NbVHP</i> -Überexpression auf die Zellvitalität	92
3.4.1. Salzapplikationsvarianten auf <i>N. benthamiana</i> Blätter.....	92
3.4.2. Auswirkung der PPase-Überexpression und der Salzbehandlung auf die Blattvitalität.....	97
3.5. Einfluss der V-PPase-Überexpression auf den Stoffwechsel der Zelle.....	101
3.5.1. Endogene V-PPase Expression nach Salzbehandlung	101
3.5.2. Einfluss der PPase-Überexpression auf den Metabolismus der Zellen.....	102
3.5.3. Pumpaktivität von V-PPasen und V-ATPase in <i>N. benthamiana</i> Vakuolen nach Salzbehandlung	105
3.5.4. Auswirkung der <i>NbVHP1</i> -Überexpression auf den cytosolischen und vakuolären pH der Mesophyllzellen	107

3.5.5.	pH-Abhängigkeit der Pumpaktivität von AtVHP1 und NbVHP1	109
3.5.6.	Auswirkungen der NbVHP1-Überexpression auf das Membranpotential	111
4.	Diskussion	113
4.1.	Identifikation zweier endogener V-PPase von <i>N. benthamiana</i>	113
4.2.	Transiente Überexpression der PPasen in <i>N. benthamiana</i>	114
4.3.	Transporteigenschaften der V-PPasen	115
4.4.	Salzinjektion als Salzbehandlung	117
4.5.	Auswirkungen der Salzbehandlung auf die vakuoläre H ⁺ -Pumpaktivität	118
4.6.	Nekrosenbildung als Folge einer extremen V-PPase Überexpression	122
4.7.	Salzbehandlung verhindert V-PPase induzierte Nekrosen	126
4.8.	Die V-PPase – unterschätztes Protein der Vakuole	129
5.	Zusammenfassung	131
6.	Summary	133
7.	Anhang	135
7.1.	Ergänzende Ionen- und Metabolitdaten	135
7.2.	Literaturverzeichnis	138
7.3.	Abbildungsverzeichnis	156
7.4.	Tabellenverzeichnis	157
7.5.	Formelverzeichnis	157
7.6.	Abkürzungsverzeichnis	158
7.7.	Publikationen	162
7.8.	Lebenslauf	163
7.9.	Danksagung	164
7.10.	Eidesstattliche Erklärung	165

1. Einleitung

Die Entwicklung des Ackerbaus wird als Grundlage der heutigen menschlichen Zivilisation gesehen (Harlan 1992; Hillel 1992) und ermöglichte den Anstieg der Weltbevölkerung auf über acht Mrd. Dabei stellt sich zunehmend die Frage, wie die Ernährung der weiteranwachsenden Anzahl der menschlichen Population auch zukünftig gewährleistet werden kann. So wurden die bereits vorhandenen Ackerflächen auf aride und semi-aride Landabschnitte ausgeweitet. Die notwendige Bewässerung dieser neu gewonnenen Anbauflächen sorgt allerdings in absehbarer Zeit durch die einhergehende Anreicherung von Mineralien für eine Versalzung der Böden. Forscher der Universität der Vereinten Nationen (United Nations University, Tokyo) schätzten, dass in den letzten 20 Jahren pro Tag eine Fläche von 2000 Hektar auf der Erde versalzte. Betrug die versalzte Fläche 1990 noch 42 Mio Hektar, so stieg sie 2014 auf 62 Mio Hektar, was 20% der bewässerten Anbaufläche bzw. der Größe Frankreichs entspricht (Collins 2014; Qadir et al. 2014). Der erhöhte Salzgehalt des Bodens hemmt das Pflanzenwachstum und damit auch die Produktivität (Wang et al. 2001), wodurch es im Durchschnitt zu Ernteausfällen von bis zu über 50% kommt (Buchanan et al. 2002). In Anbetracht der Tatsache, dass für eine gesicherte Ernährung der Menschheit die Lebensmittelproduktion bis 2050 sich um 70% steigern muss, kann ein solcher Verlust von Ackerfläche nicht hingenommen werden (Collins 2014).

Neben der Regenerierung, also Entsalzung, dieser abgewirtschafteten Böden ist der Anbau salzresistenterer Pflanzen eine weitere Möglichkeit den Ertragsverlust zu minimieren. Der Mangel an salzresistenten Kulturpflanzen macht es notwendig, neue salztolerantere Ackerpflanzen zu finden bzw. zu züchten. Das stellt die Wissenschaftler vor die Herausforderung zunächst die natürlichen Reaktionen unterschiedlicher Pflanzen auf Salzstress zu erforschen. Die so gewonnenen Erkenntnisse können zur Erzeugung salztoleranterer Kulturpflanzen und somit zur Steigerung der Produktivität versalzter Böden genutzt werden.

1.1. Stressfaktor Natrium

Generell enthalten versalzten Ackerböden mehrere verschiedene Salze, die zwei unterschiedliche Stressfaktoren für Pflanzen bedeuten können. Zum einen verursacht die erhöhte Menge an osmotisch aktiven Teilchen in der Erde eine erschwerte Aufnahme von Wasser über die Wurzeln. Zum anderen können die Ionen wichtige metabolische Prozesse im Cytosol der Zelle beeinflussen (Blumwald et al. 2000). Für gewöhnlich ist NaCl das am stärksten angereicherte Salz in den betroffenen Böden (Zhang et al. 2009). Im Vergleich zu Chloridionen stellen Natriumionen die meist toxischeren Ionen für die Pflanze dar (Blumwald et al. 2000; Hasegawa et al. 2000; Kronzucker and Britto 2011; Munns and Tester 2008; White 2001). So können Natriumionen die Keimungsrate (Munns and James 2003; Munns et al. 2006), die Überlebensrate (Munns and James 2003; Yeo and Flowers 1986), das Wachstum (Yeo and Flowers 1986), den Ertrag (Munns and James 2003; Munns et al. 2006; Cuin et al. 2009) und den Chlorophyllgehalt (James et al. 2002; Cuin et al. 2012) negativ beeinflussen (Wu 2018). Aus diesem Grund wird in der Wissenschaft schon seit Jahrzehnten verstärkt der Fokus auf Natrium und dessen Toxizität und Transport in der Pflanze gelegt (Kronzucker and Britto 2011).

Die Toxizität der Natriumionen hängt direkt mit der lebensnotwendigen Funktion der Kaliumionen in der Pflanze zusammen. Da der Radius von hydratisierten Kalium- und Natriumionen ähnlich ist, gelangen die Natriumionen über Kaliumkanäle und -transporter (wie z.B. AKT1, HKT1) oder über nicht selektive Kationenkanäle (NSCC = engl. *Non Selective Cation Channels*) über die Plasmamembran in das Cytosol der Zelle (Blumwald et al. 2000; Kronzucker and Britto 2011). Dieser Einstrom wird durch den Konzentrationsgradienten und das negative Membranpotential (ca. -110 bis -150 mV; Roelfsema et al. 2001; Thiel et al. 1992) verstärkt, wodurch es zu einer Anreicherung von Natrium im Cytoplasma und damit zu einer Verschiebung des K^+/Na^+ -Verhältnisses kommt. Die Natriumionen verdrängen die Kaliumionen von deren Bindungsstellen und blockieren so u.a. die Proteinsynthese, was wiederum einen toxischen Effekt ausübt (Blumwald et al. 2000).

In der Literatur ist die toxische Natriumkonzentrationsschwelle für Pflanzen ein viel diskutiertes und forschungsbedürftiges Feld (Flowers et al. 2015; Kronzucker and Britto 2011; Wu 2018). Für die Toxizität von Natriumionen wurden Messungen sowohl an verschiedenen Pflanzenarten als auch Geweben durchgeführt. Jedoch konnte bis heute keine einheitliche Aussage über die toxische Natriumkonzentrationsschwelle getroffen werden. Die Schwierigkeit besteht in der diffizilen Erhebung der Natriumkonzentrationen im Cytosol aufgrund seines

geringen Volumens und der möglichen Kontamination mit dem Vakuoleninhalt (Flowers et al. 2015). Da in manchen Wurzel- und Sprossspitzen nur kleine bzw. keine Vakuolen existieren, werden diese Zellen für Natriumbestimmungen vermehrt herangezogen (Flowers et al. 2015). Bei diesen Messungen zeigte sich, dass die Natriumkonzentration bei Halophyten von 150-200 mM (Flowers et al. 2015) liegen kann, während für Glycophyten wie Gerste eine Konzentration zwischen 10 bis 30 mM (Carden et al. 2003; Kronzucker et al. 2006) und der Ackerschmalwand von unter 65 mM Na⁺ (Halperin and Lynch 2003) gemessen wurden. Bei diesen Werten muss allerdings bedacht werden, dass sowohl der für das K⁺/Na⁺-Verhältnis wichtige zellulären Kaliumgehalt, die Messmethode als auch die applizierte NaCl-Konzentration meist variierte. Zudem erschwert das Fehlen einer einheitlichen Definition einer „salzgestressten“ Pflanze die Vergleichbarkeit dieser Messwerte. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich nur mit Gewissheit sagen, dass die Toxizität von Natriumionen im Cytosol von vielen Faktoren, wie der Pflanzenart, der Kaliumkonzentration, dem Zelltyp und dem Zellalter abhängt (Kronzucker and Britto 2011).

Zur Verhinderung der toxischen Natriumanreicherung im Cytosol der Wurzeln stehen der Zelle verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Natrium kann mit Hilfe von SOS1 (*Salt Overly Sensitive 1*), einem Na⁺/H⁺-Antiporter, über die Plasmamembran aus der Zelle transportiert werden, wodurch es entweder in den Apoplasten oder nachfolgend von dort weiter in das Xylem gelangen kann. Die Abgabe an den Apoplasten ist nur teilweise sinnvoll, da die Natriumionen auf den bereits erwähnten Wegen wieder in das Cytosol gelangen kann. Der Transport der Natriumionen über das Xylem in die Blätter verlagert dagegen das Problem nur, wodurch nicht nur Wurzelzellen, sondern auch Blattzellen hohe Natriumkonzentrationen bewältigen müssen. Während nur wenige Pflanzen wie Quinoa (*Chenopodium quinoa*) elegant das Natrium in sogenannten „bladder cells“ (dt.: Blaszellen) auf der Blattoberfläche „auslagern“ (Kiani-Pouya et al. 2017), reichern Pflanzen wie die Ackerschmalwand, Tabak, Tomate, Mais, Reis und Gerste das Natrium in der Vakuole der Zelle mittels Na⁺/H⁺-Antiporter an (Pardo and Quintero 2002; Rodríguez-Rosales et al. 2009; Wu 2018). Trotz aller Toxizität des Natriums für die Zelle konnte auch ein positiver Aspekt durch die Natriumakkumulation in der Vakuole festgestellt werden. Durch die Einlagerung des Natriums in die Vakuole wird vermehrt Kalium als Ausgleich in das Cytosol entlassen und steht daher leichter für den Metabolismus im Cytosol zur Verfügung (Mäser et al. 2002; Rodríguez-Navarro and Rubio 2006; Wu 2018). Dieser Ausgleichsvorgang kann gerade unter Kaliummangel vorteilhaft das Wachstum vieler Pflanzen fördern (Schulze et al. 2012). Neben der nicht nur effektiven, sondern auch der für die Zelle vorteilhaften Lagerung der Natriumionen in der Vakuole, wird auch über einen Rücktransport

von Natrium aus dem Blattgewebe zur Wurzel diskutiert. Allerdings wirft dieser Rückweg momentan noch mehr Fragen als Antworten auf. So können die Plasmamembranproteine SOS1 und HKT zwar auch Natrium aus der Zelle auslagern. Ob es daraufhin im Xylem zu anderen Blattbereichen oder im Phloem zurück in die Wurzel abtransportiert wird, ist bisher nicht geklärt. Eine weitere Frage ist, ob sich bereits in der Vakuole befindliches Natrium wieder zurück transportieren lässt. NHX ist unter den physiologischen Gegebenheiten ausschließlich in der Lage, Na^+ in die Vakuole einzulagern und auch Na^+ -leitende Kanäle wie TPC1 werden durch hohe vakuoläre Natriumkonzentrationen blockiert, wodurch ein Austreten des vakuolären Natriums nach heutigem Wissensstand unwahrscheinlich ist (Almeida et al. 2017; Hedrich et al. 2018; Ivashikina and Hedrich 2005; Pérez et al. 2008; Wu 2018). Obwohl die Existenz und die Funktionsweise dieses Natriumrücktransport noch zu erforschen ist, wäre der positive Nutzen dieser Natriumreduktion für die salzsensitiveren Blätter und das junge, wachsende Gewebe unumstritten (Wu 2018). Die Rücknahme des Natriums der Wurzelzellen führt allerdings zu der weiteren Frage, wie die Wurzeln die doppelte Belastung mit Natrium (von Boden und Phloem/Xylem) handhaben bzw. ob diese Rücknahme wirklich ein Vorteil für die Pflanze darstellen würde. Letztendlich bleiben die effektivsten Methoden zur Steigerung der Salztoleranz für Pflanzen die Ionenselektionsfähigkeit der Wurzeln, aber auch die Speicherkapazitäten der gesamten pflanzlichen Vakuolen.

1.2. Die Vakuole

1.2.1. Aufgaben pflanzlicher Vakuolen

Das mit Abstand größte Organell der pflanzlichen Zelle ist die Vakuole, welche in ausdifferenzierten Zellen bis zu 90 % des Zellvolumens einnehmen kann (Wink 1993; Winter et al. 1993, 1994). Dabei stellt die Vakuole ein Kompartiment dar, das über eine Membran (dem Tonoplast) sich gegen das Cytosol abgrenzt. Entgegen der Vermutung seines Namensgebers Felix Dujardin (1872) handelt es sich nicht um einen „leeren“ Raum, sondern um ein Kompartiment, das mit Wasser, Zucker, Ionen für den Metabolismus und unter Umständen sogar Giftstoffen gefüllt ist (Dujardin 1841; De 2000; Viotti 2014). Allerdings kann die Aufgabe der Vakuole nicht pauschalisiert werden, da sie ihre Aufgabe je nach Pflanzenart, Zelltyp und Entwicklungszustand anpasst. Dabei können selbst innerhalb einer Zelle mehrere Vakuolen-Typen wie lytische Vakuole und Speichervakuole gleichzeitig vorliegen (Epimashko et al. 2004; Evert 2009; Martinoia et al. 2007; Marty 1999).

Die Speichervakuole ist mit einer Vielzahl an Transmembranproteinen ausgestattet, die verschiedene Aufgaben übernehmen: Zum einen regeln sie den Stoffaustausch zwischen Cytoplasma und Vakuolenlumen, zum anderen wird durch sie die luminale Einlagerung von wertvollen metabolischen Stoffen wie Mono- und Disaccharide zwischen Cytoplasma und Vakuolenlumen gesteuert. Die energiereiche, photosynthetisch hergestellten Kohlenhydratverbindungen werden als Glucose, Fructose oder Saccharose über H^+ -gekoppelte Antiporter wie den TMTs (*Tonoplast Monosaccharid Transporter*) oder VGT1 (*Vacuolar Glucose Transporter*) in der Vakuole akkumuliert (Aluri and Büttner 2007; Martinoia 2018; Schulz et al. 2011). Der vakuoläre Antiporter AtTMT1 aus *A. thaliana* ist fähig, sowohl Glucose als auch Saccharose im Austausch gegen ein Proton zu transportieren (Schulz et al. 2011), während der zu AtTMT1/2 homologe Zuckerrüben-Transporter BvTST2.1 für die starke Anreicherung von Saccharose in der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) verantwortlich gemacht wird (Jung et al. 2015). Die Entlassung der Kohlenhydrate in das Cytosol kann z.B. durch die Protonen-Symporter der SUC/SUT-Familie (engl. *Sucrose-Carrier/-Transporter*; Bsp.: AtSUC4; Schulz et al. 2011) oder ERDL-Familie vermittelt werden (engl. *Early Responsive to Dehydration Like*; Bsp.: AtERDL6; Klemens et al. 2014; Martinoia 2018).

Allerdings geht die Funktion der Speichervakuole weit über die bloße Lagerung von energiereichem Zucker hinaus. Sie reguliert den cytosolischen pH, die zelluläre Ionenhomöostase (H^+ , Ca^{2+} , K^+), entsorgt den zellulären Abfall und detoxifiziert somit das Cytosol, trägt zur Pathogenabwehr bei und kann negative Auswirkungen abiotischer Stressfaktoren mildern (Martinoia 2018; Viotti 2014). Zudem wird über die Vakuole der Turgordruck, der zwischen 2 und 50 bar betragen kann (Roelfsema and Hedrich 2005; Taiz and Zeiger 2006; Zimmermann et al. 1980) als treibende Kraft für die Zellausdehnung und damit für das Wachstum der Pflanze aufgebaut (Viotti 2014). Vor allem die Funktion der Stomata basiert auf der Bildung des Turgordrucks über die Vakuole: Eine Turgorabnahme in den Schließzellen führt zum Schluss der Stomata, während eine Wiederherstellung des Turgordrucks über eine osmotisch getriebene rasche Aufnahme von Wasser die Stomata erneut öffnet (Hedrich 2012; Martinoia et al. 2007).

Eine Aufrechterhaltung des Turgordrucks über die Vakuole hängt mit der Einlagerung von Wasser und dieses wiederum mit der Einlagerung osmotisch aktiver Teilchen zusammen. Der Transport dieser Teilchen geschieht dabei oft im Austausch mit Protonen über spezielle Membrantransportproteine. Es wird vermutet, dass der vakuoläre Protonentransport einen wichtigen Beitrag in der Regulation des cytosolischen pH-Wertes spielt (Pittman 2012). Die

pH-Homöostase des Cytosols bildet die Grundlage für die Funktionalität vieler cytosolischer Enzyme und metabolischer Vorgänge selbst unter Stressbedingungen (Pittman 2012; Raven and Smith 1978). Daher reguliert die Zelle nicht nur über Membranproteine, sondern auch zusätzlich durch Malatreduktion und -oxidation und damit über die Freisetzung von OH^- ihren cytosolischen pH. Die Einlagerung des reduzierten Malats bzw. die Bereitstellung des Malats für die Oxidation übernimmt dabei die Vakuole (Gerhardt and Heldt 1984; Smith and Raven 1979). Es konnte bereits AtMDT als ein Malat/ H^+ -Transporter zur Akkumulation des Malats in der Vakuole und der Kanal ALMT9 zur Freisetzung des Malats in das Cytosol identifiziert werden (De Angeli et al. 2013; Emmerlich et al. 2003; Hurth et al. 2005). Auf diese Weise ist die Vakuole durch ihre Protonen/Malattransporter direkt und indirekt an der pH-Homöostase des Cytosols beteiligt (Martinoia et al. 2007).

Aber nicht nur innerhalb der Zelle spielt die Vakuole eine enorme Rolle, sondern trägt durch die Bereitstellung von Calcium-Ionen als „*Second-Messenger*“ zur Signalweitergabe und damit Kommunikation zwischen Zellen bei. Dafür lagert die Vakuole Calcium in hohen Konzentrationen ein und schüttet es bei Bedarf ins Cytosol aus, wo das Kation in viele Signalwege innerhalb und zwischen der Zelle involviert ist (Hedrich et al. 1990; Poole 1993). Für die Einlagerung des Calciums in die Vakuole werden Transmembranproteine wie der $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter CAX1 (Hirschi 2004; Hirschi et al. 1996) und die Ca^{2+} -Pumpen wie die P-typ-ATPasen (Geisler et al. 2000a, 2000b) verantwortlich gemacht. Die cADPRibose-aktivierte-, IP_x - und weiteren spannungsabhängigen Kanäle gelten als mögliche Kandidaten für den Rücktransport des Calciums in das Cytosol (Martinoia et al. 2007). Neben Ca^{2+} wird auch Stickstoff in Form von Nitrat und Ammonium in der Vakuole für den späteren metabolischen Gebrauch gespeichert. Während Nitrat unter anderem durch einen CLC-Transporter protonengekoppelt in die Vakuole gelangt (De Angeli et al. 2006), kann die im Cytosol deprotonierte Form von Ammoniak NH_3 direkt durch den Tonoplast in die Vakuole diffundieren (Martinoia et al. 2007). Für eine effiziente Senkung des cytosolischen Ammoniakgehalts sind allerdings Transportproteine wie AtTIP2.1 und AtTIP2.3 erforderlich, welche das Ammoniak in der Vakuole anreichern (Loqué et al. 2005). Aufgrund des sauren pH-Wertes der Vakuole wird der Ammoniak von NH_3 zu NH_4^+ protoniert und ein neues Gleichgewicht etabliert. Dadurch entsteht ein 100-faches Konzentrationsgefälle für Ammoniak zwischen Cytosol und Vakuole. Nur 20 μM der insgesamt 2 mM Ammoniakmenge der Zelle liegt dabei im Cytosol vor und wird erst nach Verbrauch z.B. durch Aminosäuren- oder Proteinsynthese über vakuoläres Ammoniak aufgefüllt (Martinoia et al. 2007).

Neben der Speicherung essenzieller metabolischer Stoffe dient die Vakuole auch als Aufbewahrungsort toxischer Substanzen. Die Cytotoxizität einer Substanz in der Zelle hängt meist mit deren Konzentration zusammen. So werden die Schwermetalle Eisen und Zink in geringen Mengen als Mikronährstoffe in der Pflanze gebraucht. In größeren Konzentrationen inhibieren sie allerdings den Metabolismus und werden daher für mögliche spätere Engpässe z.B. über MTP-Transporter (*Metal*tolerantes *Protein*) in die Vakuole eingelagert (Martinoia 2018). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit diesen Mikronährstoffen werden Cadmium, Blei, Quecksilber und Aluminium zum Teil auch aus dem Boden aufgenommen. Im Gegensatz zu den Mikronährstoffen Eisen und Zink sind diese Stoffe allerdings selbst in geringen Konzentrationen toxisch (Martinoia 2018). Um die Pflanze vor einer Vergiftung zu bewahren, erfolgt die Entsorgung dieser Metalle aus dem Cytosol in die Vakuole über Transporter, wie z.B. AtABCC1/2 oder HMA3 unter ATP-Verbrauch (Krämer and Clemens 2006; Martinoia 2018; Martinoia et al. 2000; Mäser et al. 2001; Rea et al. 1998; Song et al. 2003; Zaal et al. 1999). Das Wachstum der Pflanze und deren Vitalität wird auch bei Salzstress durch Natrium gehemmt (Kap. 1.1). Über den Boden werden die Natriumionen aufgenommen und gelangen in das Cytosol der Zellen. NHX-Typ-Transporter leiten die Natriumionen im Austausch gegen Protonen über den Tonoplasten in die Vakuole (Apse et al. 1999). Es ist bekannt, dass eine Überexpression von NHX1, z.B. in *Arabidopsis thaliana* (Apse et al. 1999) oder *Helianthus tuberosus* (Topinambur; Zeng et al. 2018), in einer erhöhten Salztoleranz der Pflanzen resultiert. Die Einlagerung von toxischen Sekundärmetaboliten in der Vakuole, kann aber auch dem gezielten Schutz der Pflanze vor Fressfeinden dienen. Cyanogene Glycoside und Glucosinolate werden eingelagert und erst bei Beschädigung der Zelle z.B. durch Pathogene und Herbivore hydrolysiert und damit toxisch (Martinoia 2018; Martinoia et al. 2007; Shitan and Yazaki 2013).

Die hier beschriebene Funktionsvielfalt der Speichervakuole, gründet sich auf die mannigfaltigen und spezifizierten Membrantransportproteine. Ein großer Teil dieser Proteine nutzt dabei den hohen Protonengradienten zwischen Cytosol (pH 7,0 bis 7,5) und Vakuole (pH 5,5) als Triebkraft für ihre Transportprozesse. Ein derart hoher chemischer Gradient von 2 pH Einheiten übt zudem einen wichtigen Einfluss auf den elektrischen Gradienten des Tonoplasten aus (Krebs et al. 2010; Martinoia et al. 2000, 2007; Rienmüller et al. 2012). Die Effektivität vieler Sym- und Antiportmechanismen sowie die pH- oder spannungsabhängigen Kanäle des Tonoplasten hängen stark von diesen Gradienten ab. Die Aufrechterhaltung dieses Protonenkonzentrationsgefälles ist daher für die Pflanze essenziell und wird unter

Energieverbrauch mit Hilfe von membranständigen Protonenpumpen wie der V-ATPase und der V-PPase aufrechterhalten.

1.2.2. Stofftransport über den Tonoplasten

Die Vakuolen der Pflanze übernehmen eine Vielzahl an Funktionen, wie z.B. als „Vorratslager“ für metabolisch essenzielle Stoffe oder als „Mülldeponie“ für Giftstoffe, die in direktem Zusammenhang mit der Stofftransportleistung über die Vakuolenmembran steht. Doch die gezielte Auf- und Abgabe von Stoffen auch gegen elektrische sowie chemische Gradienten ist nur durch die in den Tonoplasten integrierten Transportproteine und ihren jeweiligen spezifischen Eigenschaften möglich. Wie alle natürlichen Membranen besteht auch die Vakuolenmembran aus einer Lipiddoppelschicht, welche eine einfache Diffusion von Gasen (z.B. O₂, CO₂), kleinen polaren Molekülen (z.B. H₂O, Ethanol) oder hydrophoben Molekülen (z.B. Benzene), aber nicht von geladenen und/oder großen Molekülen (z.B. Zucker, Ionen, Aminosäuren) erlaubt (Taiz and Zeiger 2006). Das Passieren der Membran für Ionen oder große Moleküle wie Zucker bedarf somit spezifischer Transmembranproteine, welche in drei verschiedene Typen unterteilt werden: Kanäle, Transporter (*engl. Carrier*) und Pumpen (Taiz and Zeiger 2006; Abbildung 1). Während eine Pumpe in der Lage ist 10^{-10} - 10^{-3} Ionen·sec⁻¹ und ein Transporter 10^{-2} - 10^{-4} Ionen·sec⁻¹ zu transportieren, kann ein Kanal 10^7 - 10^8 Ionen·sec⁻¹ durch die Membran schleusen (Lodish et al. 2000). Aufgrund dieser unterschiedlichen Transporteigenschaften und -geschwindigkeiten kommt es zu ungleichmäßigen Verteilungen der Ionen und Moleküle auf beiden Seiten der Membran. Die Summe der dadurch entstandenen elektro-chemischen Potentialdifferenzen der verteilten Ionen bildet das für die Zelle essenzielle Membranpotential. Während eines stabilen Membranpotentials ist für einzelne Ionenarten weiterhin ein Nettostrom, aber kein Nettosummenstrom aller Ionen über die Membran zu verzeichnen. Die Membranspannungen der Plasmamembran einer Pflanzenzelle liegt in der Regel zwischen -110 bis -150 mV (Roelfsema et al. 2001; Thiel et al. 1992) und die der Vakuolenmembran bei etwa -30 mV (Bethmann et al. 1995; Walker et al. 1996; Wang et al. 2015). Eine Potentialverschiebung durch Änderung in der Aktivität von Pumpen und Kanälen ist in der Lage, weitreichende Prozesse für Zelle und Pflanzen in Gang zu setzen. So führt z.B. eine kanalabhängige Depolarisation in Schließzellen zum Stomaschluss (Hedrich 2012).

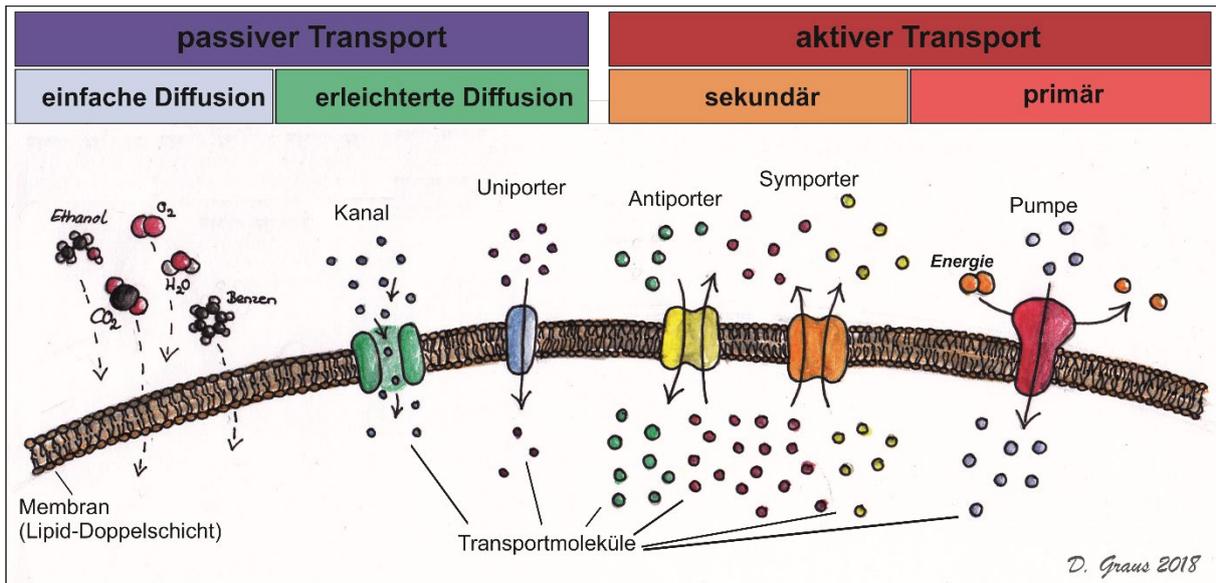


Abbildung 1: Transportmechanismen an der Membran

Der Transport von Molekülen kann sowohl passiv als auch aktiv über die Membran geschehen. Beim passiven Transport wandern Moleküle immer entlang ihres Gradienten entweder durch einfache Diffusion durch die Membran (bei kleinen, ungeladenen Molekülen) oder durch eine erleichterte Diffusion mittels Kanäle und Uniporter. Der aktive Transport zeichnet sich durch eine Bewegung der Transportmoleküle entgegen ihres Gradienten über die Membran aus. Geschieht dies unter direktem Verbrauch von Energie wie bei Pumpen wird von primär aktivem Transport gesprochen. Ein Transport von zwei Molekülen in gleicher (Symporter) oder entgegengesetzter (Antiporter) Richtung wird sekundär aktiver Transport genannt, da er indirekt die Energie des primär aktiven Transportes nutzt.

(Graphik: D. GRAUS 2018 in Anlehnung an Taiz and Zeiger 2006)

Passiver Transport:

Der passive Transport wird in einfache und erleichterte Diffusion unterteilt. Kleine ungeladene Teilchen sind fähig sich durch einfache Diffusion entlang ihres Gradienten durch die Membran zu bewegen. Eine erleichterte Diffusion liegt dagegen vor, wenn mit Hilfe eines Kanals Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten die Membran passieren können. Die Selektivität des Ionenkanals hängt in der Regel vom Durchmesser und der Ladung seiner Pore des Kanals ab, während die Öffnung des hydrophilen Transportweges durch Liganden, Phosphorylierungsstellen, der Membranspannung und/oder den pH-Wert erfolgen kann (Hedrich 2012; Taiz and Zeiger 2006). Da die Antriebskraft für den Ionenstrom vom vorliegenden elektrochemischen Gradienten abhängt, übt der Kanal nach seiner Öffnung keine Kontrolle auf die Anzahl und Richtung der Ionen aus. Als Beispiel für einen vakuolären Kalium-permeablen Kanal kann TPC1 (*engl. Two pore channel*) genannt werden, welcher über cytosolisches Calcium als auch über die Membranspannung in seinem Öffnungs-/Schließverhalten gesteuert wird (Hedrich and Neher 1987; Hedrich 2012; Hedrich et al. 2018).

Aktiver Transport:

Sekundär aktive Membranproteine können einen Stoff gegen den Gradienten transportieren, indem sie gleichzeitig einen anderen Stoff entlang seines Gradienten befördern. Je nach Molekül und Transportrichtung gibt es Sym- oder Antiporter. Werden die beförderten Moleküle bei einem Symporter auf die gleiche Seite der Membran geleitet, so werden die des Antiporters auf entgegengesetzten Membranseiten verteilt. Saccharose wird maßgeblich durch den H^+ /Saccharose-Antiporter BvTST2.1 in die Vakuole der Zuckerrübe transportiert und bei Bedarf über H^+ /Saccharose-Symporter wie den SUCs dem Cytosol wieder zur Verfügung gestellt (Hedrich et al. 2015; Jung et al. 2015; Martinoia 2018; Schulze et al. 2012). Auch Antiporter wie NHX, CAX und CLC nutzen den Protonengradienten als Energiequelle zur Akkumulation von Natriumionen, Calciumionen bzw. Chlorid und Nitrat im Vakuolenlumen (Apse et al. 1999; Carpaneto et al. 2017; Hirschi et al. 1996; Martinoia 2018).

Der sekundäre Transport eines Stoffes basiert auf der Nutzung des bereits vorhandenen Gradienten eines anderen Teilchens. In Pflanzen handelt es sich bevorzugt um den Protonengradienten. Beim primär aktiven Transport wird hingegen direkt Energie zum Transport eines Stoffes gegen dessen Gradienten genutzt. Pumpen beziehen diese Energie direkt aus der Hydrolyse energiereicher Moleküle wie ATP oder PP_i . Beispiele solcher ATP-getriebener Pumpen sind ABC-Transporter (*engl. ATP-Binding Cassette*), welche große Moleküle wie Anthocyane und Glucuronide in die Vakuole transportieren können (Li et al. 1997; Lu et al. 1998; Martinoia 2018; Martinoia et al. 2007; Tommasini et al. 1998). Ebenso nutzen MTP- oder HMA3-Transporter (*engl. Heavy Metal Associated*) die aus der ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie allerdings zur Entgiftung des Cytosols von Zink und Cadmium (Chao et al. 2012; Krämer and Clemens 2006; Martinoia 2018; Morel et al. 2009). Zu den wahrscheinlich wichtigsten vakuolären Pumpen gehören die V-ATPase und V-PPase (Pyrophosphatase), indem sie Protonen im Lumen der Vakuole aktiv unter Energieverbrauch anreichern. Diese Anreicherung sorgt nicht nur für eine Senkung des pH-Wertes in der Vakuole gegenüber dem Cytosol, sondern hat auch gleichzeitig durch die Verschiebung dieses Kations einen Einfluss auf das Membranpotenzial (Martinoia 2018; Martinoia et al. 2007; Taiz and Zeiger 2006). Die Stärke dieser erzeugten protonenmotorischen Kraft (*engl. Proton Motive Force*; kurz: PMF) übt dabei einen Einfluss auf die Transportrate vieler sekundär aktiver Transporter aus (wie z.B. AtSUC4, BvTST1, AtNHX1; Apsse et al. 1999; Jung et al. 2015; Schulz et al. 2011). Die Aktivierung spannungs- und/oder pH-abhängiger Kanäle (wie z.B. AtTPC1, AtALMT6) unterliegt zudem auch direkt oder indirekt der PMF (Jaślan et al. 2016; Meyer et al. 2011). Ohne Protonenpumpen, wie der V-ATPase und V-PPase, wäre die Aufrechterhaltung dieser

PMF nicht möglich und die gezielte Lagerung und Freigabe von Stoffen durch Transporter des Tonoplasten könnte nicht mehr erfolgen. Durch die Anreicherung von Stoffen im Cytosol würde der Metabolismus stark beeinträchtigt und das Wachstum erheblich reduziert werden, wie es an der V-PPase-V-ATPase-Verlustmutante *fugu5-1 vha-a2 vha-a3* von *A. thaliana* zu beobachten ist (Kriegel et al. 2015).

1.3. Vakuoläre Protonenpumpen

Es gibt drei Arten von Protonenpumpen im Tonoplasten: Die V-ATPase, die V-PPase und die P-Typ-ATPase (PH5) (Maeshima 2000; Martinoia et al. 2007; Schumacher and Krebs 2010; Verweij et al. 2008). Die Gemeinsamkeit dieser Pumpen beschränkt sich auf ihre Lokalisation und ihr Protonentransportfähigkeit, während sie sich hingegen in ihrer Energiegewinnung, in ihrem Aufbau und ihrer Expression allerdings unterscheiden. Nutzen V-ATPase und P-Typ-ATPase die Energie aus der ATP-Hydrolyse, so nutzt die V-PPase die Energie aus der PP_i-Hydrolyse. Im Aufbau stellt die V-ATPase sich als ein sehr komplexes, aus mehreren verschiedenen Untereinheiten zusammengesetztes Protein heraus. Die V-PPase und P-Typ-ATPase bestehen dagegen nur aus einem einfachen Polypeptid (Gaxiola et al. 2007; Lin et al. 2012; Pedersen et al. 2012; Shi et al. 2015).

Die P-Typ-ATPase wird zelltypspezifisch exprimiert, wie beispielsweise in Zitrusfrüchten (*Citrus limon*), wo sie deren extrem starke Ansäuerung bewirkt, oder in Blütenzellen von Petunien (*Petunia hybrida*), wo ihre Aktivität die pH-abhängige Blütenfarbe bestimmt (Aprile et al. 2011; Verweij et al. 2008). Der zelltypspezifischen Expression der P-Typ-ATPase steht die ubiquitinäre Expression sowohl der V-PPase als auch der V-ATPase gegenüber. Eine Regulation der beiden letztgenannten Pumpen findet dabei unter anderem über die Stärke der Genexpression statt und kann durch äußere Stressfaktoren, die Entwicklung der Pflanze und den Zelltyp variieren (Fukuda et al. 2004; Kabała and Kłobus 2008; Lerchl et al. 1995; Maeshima 2000; Segami et al. 2014; Shiratake et al. 1997). Trotz dieser Schwankungen gehören diese Protonenpumpen zu den am meisten vorkommenden Proteine im Tonoplasten (Abbildung 2; Carter et al. 2004; Jaquinod et al. 2007; Schumacher and Krebs 2010). Eine Beeinflussung der Aktivität von V-ATPase und/oder V-PPase kann demzufolge weitreichende Folgen generell für den Transport über den Tonoplasten, für die Entwicklung und für die Stresstoleranz der Pflanze haben. Es ist daher nachvollziehbar, dass bei der Bildung neuer stressresistenterer/-toleranterer oder ertragreicherer Pflanzen der Fokus auch auf diesen beiden Protonenpumpen liegt.

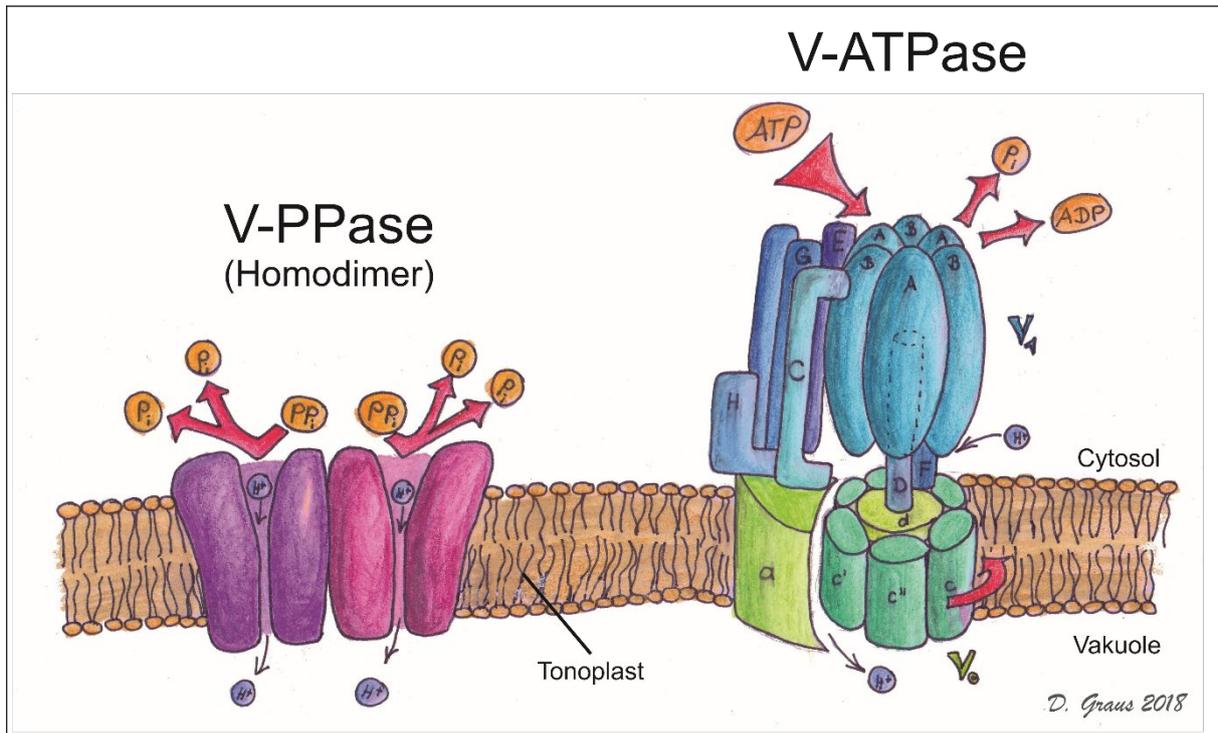


Abbildung 2: Vakuoläre PPase und ATPase

Die vakuoläre PPase (V-PPase) und die vakuoläre ATPase (V-ATPase) sind in der Lage durch die freigewordene Energie aus der Hydrolyse von PP_i- bzw. ATP Protonen gegen deren Gradienten vom Cytosol in das vakuoläre Lumen zu pumpen. Die V-PPase weist einen simplen Aufbau in Form eines Homodimers auf und hydrolysiert PP_i auf cytosolischer Seite, wodurch es zur Konformationsänderung und damit Öffnung des Protonen-Transportweges kommt. Der Aufbau der V-ATPase ist im Vergleich wesentlich komplexer und besteht aus mehreren Untereinheiten. Der V₀-Komplex bestehend aus neun Einheiten (a, c, c', c'', d, e), ist in der Membran verankert und durch Rotation für den Protonentransport verantwortlich. Der V₁-Komplex besteht dagegen aus 13 Einheiten (A, B, C, D, E, F, G, H), ragt in das Cytosol und ist für die ATP-Hydrolyse zuständig.

(Graphik: D. GRAUS 2018; Angelehnt an Gaxiola et al. 2007 und Lin et al. 2012)

1.3.1. Vakuoläre ATPase

Membranständige ATPasen sind in der Natur in jeder Domäne vertreten und essentiell für den jeweiligen Organismus. Dabei ist zwischen ATP-Synthasen (F-Typ-ATPase; A-Typ-ATPase) oder Protonenpumpen (V-Typ-ATPase, P-Typ-ATPase) zu unterscheiden (Gaxiola et al. 2007; Palmgren 2001; Taiz and Zeiger 2006). Während die plasmamembranständige Protonenpumpe AHA zu den P-Typ-ATPasen zuzuordnen ist (Gaxiola et al. 2007), zeigt die vakuoläre ATPase, eine V-Typ-ATPase, starke strukturelle Homologien zu den F- und A-Typ-ATP-Synthasen auf. Diese funktionelle Ähnlichkeit führt dazu, dass bei F- bzw. A-Typ-ATPasen auch von reverser ATP-Hydrolyse gesprochen wird (Taiz and Zeiger 2006). In die Reihe der membranständigen ATPasen reiht sich zudem auch noch die Na⁺/K⁺-ATPase ein, welche sowohl Natrium als auch Kalium gegen deren jeweiligen Gradienten aktiv transportieren kann, deren Existenz allerdings noch nie in höheren pflanzlichen Organismen nachgewiesen werden konnte (Lingrel 1992; Skou and Esmann 1992). So verschieden die Na⁺/K⁺-ATPase, V-Typ-

und P-Typ-ATPase auch sein mögen, sie nutzen alle die Energie von $-32 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, die durch die Hydrolyse von ATP freigesetzt wird (Formel 1; Heinonen 2001), um ihr Substrat gegen einen elektrisch-chemischen Gradienten über eine Membran zu transportieren.

Formel 1 Hydrolyse von ATP



$$\Delta G = - 32 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

ATP: Adenosintriphosphat ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$)

ADP: Adenosindiphosphat ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2$)

P_i : Phosphat (H_3PO_4)

Die vakuoläre ATPase, die in der Literatur auch als VHA bezeichnet wird, gehört zu den V-Typ-ATPasen und ist somit von den drei in der Vakuole lokalisierten Protonenpumpen die älteste und komplexeste (Gaxiola et al. 2007; Marshansky et al. 2014). Das Protein lässt sich in zwei funktionelle Domänen unterteilen: der ATP-Hydrolyse-Motor V_1 -Komplex, der aus den Untereinheiten VHA-A bis VHA-H aufgebaut wird und der Protonen-Turbine V_0 , der sich aus den Untereinheiten VHA-a, -c', -c'', -c''', -d und -e zusammensetzt. Der zentrale-Teil der V_1 -Domäne besteht aus je drei VHA-A und VHA-B- Einheiten, welche über eine Welle aus VHA-d, VHA-D und VHA-F Einheiten mit der membranverankerten V_0 -Domäne verbunden sind. Der c-Ring (aus c, c' und c''-Einheiten) rotiert durch die freigesetzte ATP-Hydrolyseenergie gegen die VHA-a- Einheit und transportiert turbinenartig Protonen über die Membran. Zur Verankerung der Membran und zur Verhinderung der Rotation des V_1 -Komplexes dienen die Untereinheiten VHA-a, -E, -G, C, und H (Cipriano et al. 2008; Gaxiola et al. 2007; Krebs et al. 2010; Marshansky et al. 2014; Taiz and Zeiger 2006).

In der Pflanze werden die verschiedenen Untereinheiten der ATPase nicht von einem einzelnen Gen kodiert, sondern innerhalb von Genfamilien. *A. thaliana* besitzt für die 13 Untereinheiten (VHA-c' existiert in Pflanzen nicht) der V-ATPase 27 Gene, da für einige Untereinheiten mehrere Isoformen vorliegen. Werden diese Isoformen für den Aufbau der V-ATPase berücksichtigt, ergeben sich Hunderte von Kombinationsmöglichkeiten für die Zelle (Gaxiola et al. 2007; Sze et al. 2002). Manche dieser Isoformen werden nur in spezifischen Geweben exprimiert, unterscheiden sich aber nicht in der Funktion. Andere Isoformen werden in einer

Zelle exprimiert und beeinflussen die Aktivität oder die Lokalisierung des Proteins. In *A. thaliana* wird die VHA-c1-Untereinheit gewebeunspezifisch exprimiert, VHA-c3 hingegen nur in Wurzeln (Gaxiola et al. 2007). Die Untereinheit a bestimmt dagegen die Lokalisation der V-ATPase innerhalb der Zelle. So werden Pumpproteine mit der Untereinheit a2 oder a3 in den Tonoplasten, während die mit der Untereinheit a1 in das Trans-Golgi Netzwerk oder in frühe Endosomen eingebaut (Brux et al. 2008; Krebs et al. 2010). Aufgrund dieser komplexen Struktur und Genvielfalt lässt sich die V-ATPase mit dem heutigen Stand der Wissenschaft nur bedingt klonieren oder gezielt modifizieren. Das vollständige Eliminieren der V-ATPase, wie in einer Null-Allel-V-ATPase Mutante, resultiert in *A. thaliana* in lethale männliche Gametophyten und Embryonen (Dettmer et al. 2005; Strompen et al. 2005). Krebs et al. (2010) konnte jedoch durch Insertionen in die Gensequenz für *a2* und *a3* gezielt eine *A. thaliana*-Linie herstellen (*vha-a2 vha-a3*), welche eine funktionsfähige V-ATPase im Golgi-Apparat, aber nicht in der Vakuolenmembran aufweist. Im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen ist die *vha-a2 vha-a3*-Verlustmutante sehr klein und besitzt einen um 0,5 erhöhten vakuolären pH-Wert, einen 75 % reduzierten Nitratgehalt, einen 50 % reduzierten Calciumgehalt sowie eine erhöhte Zinksensibilität. Das Fehlen einer erhöhten Salzsensibilität der *vha-a2 vha-a3*-Mutante (Krebs et al. 2010) ist dabei aus zwei Gründen bemerkenswert: Zum einen sollte die verringerte Protonenkonzentration in der Vakuole die PMF schwächen und somit auch die Effektivität des Na^+/H^+ -Antiporter NHX (Apse et al. 1999). Zum anderen wird Natrium ein stimulierender Einfluss auf die Expression und Aktivität der V-ATPase zugesprochen (Batelli et al. 2007; Hanitzsch et al. 2007; Popova and Golldack 2007; Schumacher and Krebs 2010). In der V-ATPase-Verlustmutante bleibt dieser Expressionseinfluss unter Natriumbelastung der Pflanze zusätzlich aus und sollte demzufolge zu einer gesteigerten Sensibilisierung der Verlustmutante bei einer Salzzugabe führen.

Während dieser komplizierte Aufbau aus Untereinheiten der V-ATPase die Wissenschaftler vor Herausforderungen bei der Herstellung von Mutanten stellt, bietet er der Pflanze zusätzliche Regulationsmöglichkeiten, wie die Anpassung der pH-abhängigen Kopplungsrate. Es konnte gezeigt werden, dass die Kopplungsrate, also das Verhältnis von hydrolysiertem ATP und transportierten Protonen, um 25 % durch die Ansäuerung der Vakuole um eine pH-Einheit reduziert werden konnte. Rienmüller et al. (2012) spekuliert, dass in Abhängigkeit zu den umgebenden Protonenkonzentrationen einige gebundene Protonen den c-Ring nicht verlassen und stattdessen „noch eine Runde drehen“.

Die V-ATPase mit ihren Untereinheiten bildet eine Struktur mit vielen Adaptionenmöglichkeiten an die sich veränderten Umweltbedingungen für die Pflanze und verdeutlicht

gleichzeitig den noch bestehenden Forschungsbedarf hinsichtlich ihrer Bedeutung und Regulation.

1.3.2. Membranständige Pyrophosphatasen

Vorkommen und Charakteristika

Membranständige Protonen-Pyrophosphatasen (kurz: H^+ -PPase) sind in der Natur weit verbreitet und kommen in allen drei Domänen des Lebens vor, wobei sie keine Sequenzhomologien zu anderen Proteinfamilien aufweisen (Baltscheffsky et al. 1966; Baltscheffsky 1967; Serrano et al. 2007; Luoto et al. 2011). So konnten in Archaea-Bakterien (z.B. *Methanosarcina thermophila* und *Pyrobaculum aerophilum*), Eubakterien (z.B. *Rhodospirillum rubrum* und *Caulobacter crescentus*), aber auch in Eukaryoten wie einzellige Parasiten (z.B. *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* und *Leishmania major*), Algen (*Acetabularia mediterranea* und *Chara corallina*) und Gefäßpflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Beta vulgaris*, *Vigna radiata* und *Nicotiana tabaccum*) eine oder mehrere H^+ -PPase -Isoformen nachgewiesen werden (Maeshima 2000; Drozdowicz and Rea 2001; Mimura et al. 2004; Kajander et al. 2013). Dabei ist zu beachten, dass die H^+ -PPase hauptsächlich in allen höheren Pflanzen aber nur in einigen Protozoen und vereinzelt in Archae- und Eubakterien zu finden sind (Drozdowicz and Rea 2001; Gaxiola et al. 2007). Die Aufgabe des Proteins ist allerdings in allen Organismen das Ansäuern eines Organells durch den Import von Protonen über eine Membran (Maeshima 2000; Drozdowicz and Rea 2001; Serrano et al. 2007), wobei die dafür benötigte Energie aus der Hydrolyse von Pyrophosphat ($H_4P_2O_7$; PP_i) zu Phosphat (H_3PO_4 ; P_i) gewonnen wird (Formel 2; Heinonen 2001).

Das vorwiegend auf diese Weise angesäuerte Organell der Pflanzen ist die Vakuole, deren sekundäre H^+ -gekoppelte Transporter den generierten pH-Gradienten und das daraus resultierende elektrisch-negative Potenzial nutzen können (Sze 1985; Blumwald 1987). Dabei ist es der vakuolären PPase möglich, eine gleiche H^+ -elektrochemische Potentialdifferenz aufzubauen wie ihre Funktionsverwandte, die vakuoläre ATPase (Pope and Leigh 1987; Maeshima and Yoshida 1989; Johannes and Felle 1990; Rea et al. 1992b; Baykov et al. 1993). Da der Protonengradient zwischen Vakuole und Cytosol für normale physiologische und biochemische Reaktionen der Pflanzenzelle äußerst wichtig ist (Hafke et al. 2001), ist die hohe V-PPase-Menge von 1-10 % der Vakuolenproteine (Maeshima and Yoshida 1989; Rea et al. 1992b) nicht überraschend, sondern bestätigt die Bedeutung dieses Enzyms für Zelle und Pflanze. Bei der Betrachtung des Aufbaus der V-PPase und der V-ATPase, sticht die

vollkommen andersartige und relativ einfache Beschaffenheit der V-PPase auf: Sie wird über ein einzelnes Gen exprimiert (z.B. *AVP1 = AtVHP1* in *A. thaliana*; At1g15690), hat ein Gewicht von 70-81 kDa (Drozdowicz et al. 2000; Maeshima 2000) und wird in die Membran als Homodimer eingebaut (Maeshima 2000; Lin et al. 2012). Alle H⁺-PPasen zeigen eine Aktivierung durch Magnesiumionen sowie eine Inhibierung durch Calcium-, Natrium- und Fluoridionen (Baykov et al. 1993; Drozdowicz et al. 2000; Maeshima 2000; Nakanishi et al. 2003; Rea and Poole 1985). Aufgrund der vielfältigen Bindungsmöglichkeiten des PP_i mit Magnesium (MgHP₂O₇, Mg₂P₂O₇), Kalium (K₂H₂P₂O₇, K₄P₂O₇), Natrium (Na₂H₂P₂O₇, Na₄P₂O₇) und Calcium (CaHP₂O₇, Ca₂P₂O₇) erwies sich eine Identifikation des exakten Substrates der H⁺-PPasen als schwierig. Jedoch gelang es durch gezielte Experimente und Berechnungen Magnesiumpyrophosphat (Mg₂P₂O₇) als wahrscheinlichstes Substrat zu bestimmen (Baykov et al. 1993; Rea and Poole 1993; Maeshima 2000; Nakanishi et al. 2003).

Formel 2 Hydrolyse von Pyrophosphat



$$\Delta G = - 20\text{-}25 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

PP_i: Pyrophosphat (H₄P₂O₇)

P_i: Phosphat (H₃PO₄)

Auf Basis der sich unterscheidenden Kaliumabhängigkeit werden die membranständigen PPasen in zwei Typen unterteilt. TypI sind vakuoläre PPasen, für deren Aktivität Kalium unerlässlich ist. Der bekannteste Vertreter dieses Typs ist AVP1 (auch AtVHP1 genannt; At1g15690). TypII wurde in der Membran des Golgi-Apparates lokalisiert und kann nicht durch Kalium stimuliert werden. In *A. thaliana* existieren zwei Gene für diesen Typ: AVP2 (auch AtVHP2.1 genannt; At1g78920) und AVP3 (auch AtVHP2.2 genannt; At1g16780). Allerdings wird AVP3 wesentlich schwächer exprimiert als AVP2 (Drozdowicz and Rea 2001; Segami et al. 2010). Während die Proteinsequenzen der TypI-H⁺-PPasen zwischen verschiedenen Pflanzenarten mindestens zu 85% identisch sind (Drozdowicz and Rea 2001), weisen AVP1 und AVP2 „nur“ eine 51%ige Übereinstimmung in ihrer Sequenz auf (Drozdowicz et al. 2000). Trotz dieser Abweichungen in der Aminosäuresequenz zeigen beide Pumptypen eine Magnesiumabhängigkeit, sowie eine Calciuminhibierung und unterscheiden sich

charakteristisch nur durch ihre Lokalisation und Kaliumabhängigkeit. Durch den Austausch des Alanins an Position 460 mit einem Lysin konnte Belogurov und Lahti (2002) die TypI-H⁺-PPase von *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* in eine TypII-Pumpe transformieren und damit die Kaliumabhängigkeit der PPasen auf eine einzelne Aminosäure zurückführen. Luoto et al. (2011) postuliert, dass der evolutionäre Ursprung der H⁺-PPasen die membrangebundene Na⁺-PPase ist. Die beiden H⁺- und Na⁺-PPasen sind sich strukturell ähnlich, wobei beide durch Kalium, aber nur die Na⁺-PPase durch Natrium, aktiviert werden (Belogurov et al. 2005; Segami et al. 2010). Durch gezielte Mutation in der Transmembranhelix 6 (E242D; *Chlorobium limicola* Numerierung) gelang es bereits, die Natriumselektivität der Na⁺-Pumpe aufzuheben und sie in eine H⁺-Pumpe des TypI zu wandeln (Luoto et al. 2011). Da in der Natur keine kaliumunabhängige Na⁺-PPase bis heute gefunden wurde, schließt Luoto et al. (2011) daraus, dass die TypII-PPase aus der TypI-PPase entstanden sein muss und alle kaliumunabhängigen membranständigen PPasen H⁺-PPasen sein müssen.

Aufgrund des Fokus auf die vakuoläre PPase des TypI in dieser Arbeit beschränken sich die weiteren Beschreibungen und Erkenntnisse auf diesen PPase-Typ.

Struktur und Funktionsweise

Während die H⁺-PPasen des TypII im Vergleich zu TypI selten im Interesse der Forschung standen, wurden mit wachsendem Interesse TypI-Pumpen in den letzten 30 Jahren untersucht. So wurde bereits 1989 die H⁺-PPase -Aktivität mittels *Patch-Clamp*-Technik in *Beta vulgaris* Vakuolen aufgezeichnet (Hedrich et al. 1989), 1991 die Kaliumsensitivität der H⁺-PPase beschrieben (Davies et al. 1991) und 1992 das *AtVHPI*-kodierende Gen erfolgreich kloniert (Sarafian et al. 1992). Darüber hinaus konnten auch viele strukturell relevante Aminosäuren und auch Transmembranen und – helices identifiziert werden (Nakanishi et al. 2001; Van et al. 2005). Doch erst 2012 wurde die vollständige Protein-Kristallstruktur der vakuolären H⁺-PPasen von *Vigna radiata* (Mungbohne) veröffentlicht (Lin et al. 2012). Es zeigte sich die rosettenartige Struktur der VrPPase, die aus 16 Transmembrandomänen besteht, von denen die transmembranen Helices 5, 6, 11, 12, 15 und 16 eine innere „Wand“ zur Substratbindung und die transmembranen Helices- 1-4, 7-10, 13 und 14 eine äußere „Wand“ für die strukturelle Integrität des Proteins bilden. Durch den PP_i-Ersatz Imidophosphat (kurz: IDP) konnte ohne einsetzende Hydrolyse die Lage des Substrates in einer Umgebung von 13 sauren Aminosäuren (12 Asparaginsäuren und eine Glutaminsäure) erfasst werden. Das Halten des IDP in dieser sauren Bindungstasche erfolgte durch Wasserstoffbrückenbindungen dreier Lysine und durch

ein Kalium- und fünf Magnesiumionen, welche zwischen den Asparaginsäuren und dem IDP detektiert wurden. Auch ein möglicher Protonentransportweg durch das Protein in das vakuoläre Lumen konnte zwischen den inneren 6 Transmembrandomänen ermittelt werden. Am vakuolären Ende dieses Transportweges sind zwei Leucine, ein Alanin und ein Valin positioniert, welche ein hydrophobes Tor bilden. Auf Basis ihrer Daten entwickelte Lin et al. (2012) ein Modell für die Funktionsweise der V-PPasen (Abbildung 3). Zu Beginn befindet sich die V-PPase ohne Substratbindung im „Ruhezustand“ (*engl. resting state*) ohne Substratbindung, aber einer zur cytosolischen Seite geöffneten Bindungstasche. Im „Initiierungszustand“ (*engl. initiated state*) wird das PP_i mit Hilfe von einem Kalium- und fünf Magnesiumionen und zusätzlichen Lysin in der sauren Bindungstasche stabilisiert und gebunden, wodurch es zu einer Konformationsänderung und damit einer Schließung der Tasche kommt. Mit der Hydrolyse des PP_i zu P_i wird das bereits vorliegende Proton im „Übergangszustand“ (*engl. transient state*) über die Protonentransportkette stafettenartig bis zum Ende des Weges weitergegeben. Der Protonentransportweg öffnet sich zum vakuolären Lumen und entlässt das weitergeleitete Proton. Durch die Freigabe des P_i in das Cytosol kehrt die V-PPase wieder in den anfänglichen Ruhzustand zurück (Lin et al. 2012). Die Kalium- und Magnesiumabhängigkeit lassen sich durch dieses Modell ebenfalls erklären, da eine Substratbindung an die Pumpe nur durch die stabilisierende Wirkung dieser Ionen möglich ist.

Physiologische Bedeutung

Die Betrachtung der vakuolären H^+ -PPasen mit dem überwiegenden Fokus auf die Vakuolenansäuerung, lässt aufgrund der scheinbar bedeutenderen V-ATPase (Kriegel et al. 2015) den physiologischen Nutzen der V-PPase für die Pflanze anzweifeln. Eine Deaktivierung der V-ATPase in *A. thaliana* (*vha-a2 vha-a3*) hat einen Anstieg des vakuolären pH-Wertes (um ca. 0,5 pH) und einen starken Wachstumsphänotyp zur Folge (Krebs et al. 2010; Kriegel et al. 2015). Die AtVHP1-Verlustmutante *fugu5* von *A. thaliana* weist nur als Keimling eine geringe Zellzahl bzw. eine gehemmte Zellteilung auf, was durch schmalere Blätter sichtbar wird. Im Laufe der Entwicklung kompensiert die Pflanze den V-PPase-

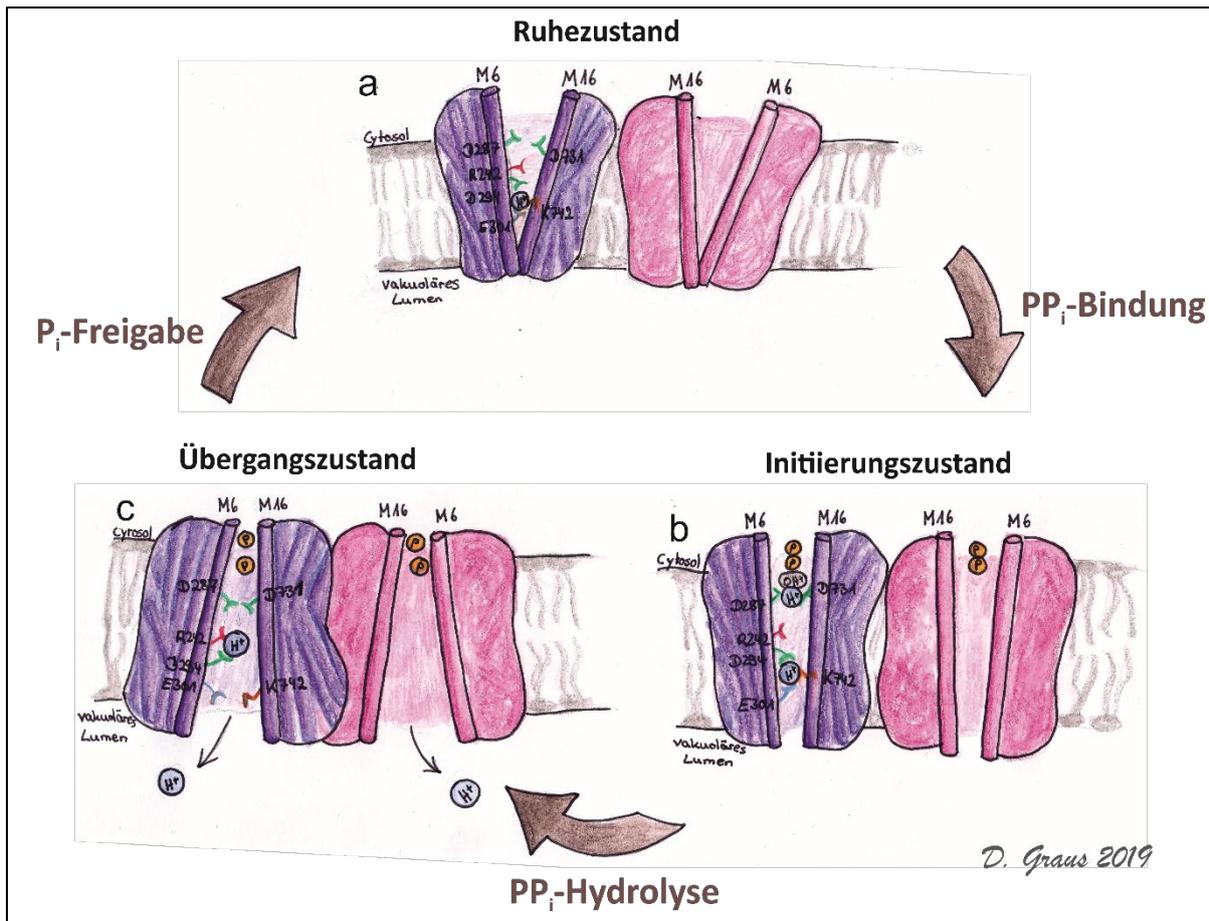


Abbildung 3: Funktionsweise des Homodimers V-PPase aus Lin et al. (2012)

(a) Ruhezustand: V-PPase liegt ohne Substratbindung mit offener Bindungstasche vor; (b) Initiierungszustand: PP_i -Bindung an der cytosolischen Seite verursacht Konformationsänderung; (c) Übergangszustand: PP_i -Hydrolyse startet Protonentransportkette mit Abgabe des Protons ins Vakuolenlumen und anschließender Rückkehr in den Ruhezustand. D287 und D731 stellen zwei der zwölf Asparaginsäuren, für die Bildung der sauren Substratbindungstasche, dar; R242, D294, E301 und K742 bilden den Protonentransportweg. Nummerierung nach *Vigna radiata*.

(Graphik: D. GRAUS 2018; Angelehnt an Lin et al. 2012)

Verlust jedoch, weswegen kein sichtbarer Phänotyp im adulten Stadium unter Standardbedingungen zu beobachten ist (Ferjani et al. 2011). Ferner fiel die Alkalisierung der Vakuole in *fugu5*-Pflanzen im Vergleich zu der V-ATPase-Verlustmutante *vha-a2 vha-a3* um 0,25 pH geringer aus (Ferjani et al. 2011), was für eine stärkere Rolle der V-ATPase in der vakuolären Ansäuerung sprechen würde (Kriegel et al. 2015). Doch die physiologische Bedeutung der V-PPase für die Zelle beschränkt sich nicht nur auf ihre Fähigkeit, Protonen zu transportieren, sondern auch PP_i zu P_i zu hydrolysieren. So zeigt *fugu5* einen 2,5fach erhöhten PP_i - und einen 50 % geringeren Saccharose-Gehalt als Wildtyp-Pflanzen. Der Phänotyp von *fugu5* kann erfolgreich durch die zusätzliche Expression der löslichen Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* (IPP1; Lundin et al. 1991) oder durch eine entkoppelte V-PPase (Asaoka et al. 2016) kompensiert werden. Da diese Proteine ausschließlich zur Hydrolyse von PP_i zu P_i im Stande sind und ein zusätzlicher Transport von Protonen oder anderen Ionen in die

Vakuole ausgeschlossen wird, erhärtet die erfolgreiche Komplementierung von *fugu5* das Fehlen der Hydrolyseaktivität der V-PPase als Ursprung des Phänotyps. Da allerdings PP_i ein Nebenprodukt der Zelle ist, stellt sich die Frage, wie eine Anreicherung dieses Stoffes einen Phänotyp wie den von *fugu5* hervorbringen kann? Generell ist PP_i ein energiereiches Nebenprodukt von an die 200 anabolischen Reaktionen der Zelle (Maeshima 2000; Heinonen 2001; Ferjani and Maeshima 2016), wie bei der DNA- und RNA-Synthese, der Beladung der tRNA-Molekülen mit einer Aminosäure, der Stärke-, Cellulose- und Saccharose-Synthese und der Bildung von Acyl-CoenzymA (Maeshima 2000; Heinonen 2001; Ferjani et al. 2011). PP_i ist dabei ein relativ energiereiches Molekül ($\Delta G = -20$ bis $-25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; Formel 2), welches bei verstärkter Anreicherung eine Störung des chemischen Gleichgewichtes der genannten Prozesse verursacht. Eine erhöhte PP_i-Konzentration im Cytosol ist äußerst toxisch für die Zelle, da sie nicht nur die Saccharose-Bildung hemmt, sondern auch die Synthese von DNA, RNA und Proteinen und damit das Wachstum unterbinden kann, wie es in *fugu5*-Keimlingen zu beobachten ist. Um diese PP_i-Vergiftung zu verhindern, hydrolysieren PPasen das PP_i zu P_i in den Zellen (Maeshima 2000; Heinonen 2001; Ferjani et al. 2011; Kajander et al. 2013).

Im vorangegangenen Paragrafen wurde die physiologische Bedeutung der V-PPase unter normalen ungestressten Bedingungen für die Pflanze betrachtet. Die wahren Aufgaben für die V-PPase scheinen hingegen in besonderen Lebensphasen und Stresssituationen der Pflanze zu liegen. Während der Keimung von Samen und des raschen Wachstums von jungen Pflanzen wird viel Energie verbraucht und dabei gleichzeitig viel PP_i gebildet. Daher wird vermutet, dass für die maximale Ausnutzung der vorhandenen Energiereserven und zur Verhinderung einer PP_i-Vergiftung der Zelle, die H⁺-PPasen in Pflanzen gerade in jungem Gewebe exprimiert werden (Maeshima 2000; Martinoia et al. 2007; Ferjani et al. 2011; Segami et al. 2014). So wurde gezeigt, dass im stark wachsenden Hypokotyl der Mungbohnen-Keimlinge die V-PPase-Konzentration bei $0,57 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ pro Vakuole (Maeshima and Yoshida 1989), die V-ATPase-Konzentration hingegen bei $0,15 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ pro Vakuole liegt (Matsuura-Endo et al. 1990; Maeshima et al. 1996; Maeshima 2000). Während der zügigen Entwicklung und Reifung einer Birnenfrucht konnte (Shiratake et al. 1997) zu Beginn ein Hydrolyseverhältnis von V-PPase zu V-ATPase von 5,2 messen, welches sich im Laufe des Reifeprozesses durch Angleichen der Proteinmenge auf eins absenkte. Segami et al. (2014) zeigte zudem das verstärkte Auftreten der AtVHP1 in *A. thaliana* Wurzelspitzen, während des sekundären Wachstums im Gefäßbündel der Wurzel, im wachsenden Hypokotyl, in jungen Kotyledonen und in Blütenblättern. Zusätzlich konnte im Funiculus (der Verbindung der Fruchtblätter zur Samenanlage), in den Nektarien, im Blattmesophyll und in den Phloemgeleitzellen AtVHP1 nachgewiesen werden.

Die Expression von H^+ -PPase in der Plasmamembran der Phloemgeleitzellen oder anderen Geweben (Robinson et al. 1996; Langhans et al. 2001; Paez-Valencia et al. 2011; Gaxiola et al. 2012) konnte Segami et al. (2014) jedoch nicht bestätigen. Lediglich bei einer extremen Überexpression von *AtVHP1* in der Pflanze konnte das Protein in der Plasmamembran lokalisiert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die V-PPase nur von einem Gen kodiert wird und ihre Homodimerstruktur im Gegensatz zur V-ATPase sehr simpel ist, bot und bietet sich dieses Gen für eine Reihe von Überexpressionsversuchen an (Tabelle 1). Gaxiola et al. (2001) zeigte bereits 2001, dass eine Überexpression von *AtVHP1* in *A. thaliana* die Pflanzen salz- und trockenresistenter werden lässt. Diese erhöhte Salztoleranz wurde versucht durch Überexpression von H^+ -PPasen aus Halophilen wie *Thellungiella halophila* oder *Suada salsa* (Guo et al. 2006) nochmals zu steigern. Das Ausbleiben einer zusätzlichen Steigerung der Salztoleranz in diesen Versuchen untermauert die Tatsache, dass die H^+ -PPasen der Pflanzen hoch konserviert und homolog sind und sie sich weniger in ihrer Funktion, als in ihrer Expression unterscheiden. Neben der verbesserten Salz- und Trockentoleranz in H^+ -PPasen-Überexpressionspflanzen konnte auch eine erhöhte Kälte- und Phosphatmangeltoleranz, eine gesteigerte Wurzel- und Fruchtbiomasse und eine verbesserte Cadmiumtoleranz und -aufnahme festgestellt werden (Tabelle 1; Gao et al. 2006; Khadilkar et al. 2016; Khoudi et al. 2012; Park et al. 2005; Pasapula et al. 2011; Pei et al. 2012; Zhang et al. 2011). Diese Effekte können entweder auf den verstärkten PPase-vermittelten Protonentransport in die Vakuole oder auf die vermehrte Hydrolyse des toxischen PP_i zu P_i zurückgeführt werden. Eine höhere Protonenkonzentration in der Vakuole begünstigt die H^+ -gekoppelte Aufnahme von Stoffen wie Ionen und Zucker, welche unter Trockenstress für eine Bindung des Wassers an die Zelle sorgen. Des Weiteren wirkt die Lagerung von toxischen Stoffen, wie Natrium und Cadmium, einer Beeinträchtigung des Metabolismus und der Photosynthese entgegen (Gao et al. 2006; Gaxiola et al. 2001; Khoudi et al. 2012; Pasapula et al. 2011).

Allerdings kann sich die vermehrte Hydrolyse von PP_i zu P_i unter einer Überexpression der H^+ -PPase auch positiv auf den Metabolismus der Pflanze auswirken. So steht der Zelle durch die Spaltung von PP_i wieder P_i für die Bildung von z.B. energiereichem ATP zur Verfügung, welches wiederum für viele Stoffwechselprozesse wichtig ist. Diese Bereitstellung von P_i für die Pflanze erhält eine große Bedeutung, wenn die begrenzte Verfügbarkeit von P_i im Boden für die Pflanze, trotz künstlicher Düngung, bedacht wird (Palma et al. 2000). Tatsächlich greifen Pflanzen unter P_i -Mangel oder anaeroben Stress vermehrt auf PP_i statt auf ATP als Phosphatquelle zurück. Ein Beispiel ist der erhöhte Einsatz des PP_i -abhängigem Saccharose-

Tabelle 1: Publikationsauswahl stabiler V-PPase-Überexpressionslinien und deren Phänotyp

Empfänger-Pflanze	V-PPase-Gen	Effekt	Quelle
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)	ATVHP1 (<i>Arabidopsis thaliana</i> ; Ackerschmalwand)	Erhöhte Salz- und Trockentoleranz	Gaxiola et al. (2001)
		Verstärktes Wachstum	Vercruyssen et al. (2011)
		Erhöhte Biomasse, verbesserte Phloembeladung und verbesserter Transport	Khadilkar et al., (2016)
		Erhöhte Biomasse und Blattoberfläche	Asaoka et al. (2016)
	SsVP (<i>Suaeda Salsa</i> Sodengewächs)	Erhöhte Salz- und Trockentoleranz	Guo et al. (2006)
	TVP1 (<i>Triticum aestivum</i> ; Weichweizen)	Verbesserte Trocken- und Salztoleranz	Brini et al. (2006)
	ScVP (<i>Suaeda corniculata</i> ; Sodengewächs;)	Verbesserte Trocken- und (Alkali-)Salz- toleranz	Liu et al. (2011)
<i>Gossypium hirsutum</i> (Baumwolle)	TsVP (<i>Thellungiella halophila</i> ; Salzkresse)	Verbesserte Salztoleranz und Wachstum und Photosyntheseleistung	Lv et al. (2008)
		Verbesserter Trockenstress- Toleranz	Lv et al. (2009)
	ATVHP1 (<i>Arabidopsis thaliana</i> ; Ackerschmalwand)	Erhöhte Trocken- und Salztoleranz; Erhöhte Faserernte unter Salzstress	Pasapula et al. (2011)
<i>Hordeum vulgare</i> (Gerste)	ATVHP1 (<i>Arabidopsis thaliana</i> ; Ackerschmalwand)	Erhöhte Biomasse und Salztoleranz	Schilling et al. (2014)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate)	ATVHP1 (<i>Arabidopsis thaliana</i> ; Ackerschmalwand)	Erhöhte Wurzelbiomasse und bessere Erholung von Trockenstress	Park et al. (2005)

<i>Malus domestica</i> B. (Apfel)	<i>MdVHP1</i> (<i>Malus domestica</i> B.; Apfel)	Verbesserte Trocken- und Salztoleranz	Dong et al. (2011)
<i>Medicago sativa</i> (Schneckenklee)	<i>ATVHP1</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i> ; Ackerschmalwand)	Erhöhte Salz- und Trockentoleranz	Bao et al. (2009)
<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabak)	<i>TsVP</i> (<i>Thellungiella halophila</i> ; Salzkresse)	Erhöhte (Wurzel-) Biomasse und Natriumaufnahme unter Salzstress	Gao et al. (2006)
	<i>ATVHP1</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i> ; Ackerschmalwand)	Verbesserte Salztoleranz	Duan et al. (2007)
	<i>ATVHP1</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i> ; Ackerschmalwand)	Erhöhtes Wachstum und Trockentoleranz	Arif et al. (2013)
	<i>TaVP1</i> (<i>Triticum aestivum</i> ; Weichweizen)	Erhöhte Aufnahme und Toleranz von Cadmium	Khoudi et al. (2012)
<i>Oryza sativa</i> (Reis)	<i>ATVHP1</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i> ; Ackerschmalwand)	Erhöhte Salztoleranz	Zhao et al. (2006)
	<i>SsNHX1</i> (<i>Suada Salsa</i>)		
	<i>OVP1</i> (<i>Oryza sativa</i> L.; Reis)	Verbesserte Kältetoleranz	Zhang et al. (2011)
<i>Populus trichocarpa</i> (Balsam Pappel)	<i>PtVP1.1</i> (<i>Populus trichocarpa</i> ; Balsam Pappel)	Erhöhte Salztoleranz	Yang et al. (2015)
<i>Zea mays</i> (Mais)	<i>TsVP</i> (<i>Thellungiella halophila</i> ; Salzkresse)	Verbesserte Trockentoleranz	Li et al. (2008)
		Erhöhte Phosphatmangel- toleranz	Pei et al. (2012)

Synthase-Reaktionsweges anstelle des ATP-abhängigen Invertase-Reaktionsweges zur Herstellung von Hexose-Phosphat aus Saccharose. Ein weiteres Beispiel stellt die verstärkte Phosphorylierung von Fructose-6-P zu Fructose-1,6-P₂ durch die PP_i:fructose-6-P-1-phosphat-transferase als Ersatz für die ATP:fructose-6-P-1-phosphattransferase dar. In die Reihe dieser „Notfall-Enzyme“ gehört auch die H⁺-PPase, welche unter Phosphat- und dem daraus folgenden ATP-Mangel auch die Ansäuerung der Vakuole stellvertretend für die V-ATPase aufrechterhalten kann (Carswell et al. 1997; Carystinos et al. 1995; Duff et al. 1989; Kasai et

al. 1998; Murley et al. 1998; Plaxton 1996; Stitt 1998). Demzufolge stellt sich die Bedeutung der H⁺-PPase der Pflanzen trotz ihrer vergleichbar simplen Struktur und Funktionsweise als komplex und vielseitig heraus, da sie sowohl in der Entwicklung der Pflanzen als auch unter ganz unterschiedlichen abiotischen Stressfaktoren eine tragende Rolle spielt.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Vakuoläre PPasen in Landpflanzen sind nicht nur hoch konserviert (Maeshima 2000), sie erfüllen zudem in Pflanzenzellen zwei Aufgaben: Den Transport von Protonen in die Vakuole, wodurch ein elektrochemischer Gradient aufgebaut wird, als auch die Hydrolyse des cytosolisch toxischen PP_i zu P_i . Die verstärkte Anreicherung von Protonen in der Vakuole durch Überexpression der V-PPase könnte dabei für die Effektivität der protonengekoppelten-Transporter, wie z.B. TMTs, SUCs, INTs oder NHXs (Schulz et al. 2011; Jung et al. 2015; Schneider et al. 2008; Apse et al. 2003), von Vorteil sein. Es wurde bereits in V-PPase-Überexpressionslinien verschiedenster Pflanzen eine erhöhte Biomasse (von der Wurzel bis zur Frucht), sowie verbesserte Trocken-, Hitze- Kälte- und Salz-Toleranz gezeigt (Arif et al. 2013; Gao et al. 2006; Gaxiola et al. 2001; Guo et al. 2006; Khadilkar et al. 2016; Park et al. 2005; Pasapula et al. 2011; Zhang et al. 2011). Diese Studien differenzieren allerdings bislang nicht oder kaum zwischen Hydrolyse und Protonentransport der V-PPasen, weswegen keine eindeutigen Rückschlüsse auf die spezifischere Ursache dieser Phänotypen getroffen werden kann. Des Weiteren waren die Untersuchungsobjekte stabil transformierte Pflanzen, bei denen eine Adaption oder eine pleiotropische Effekt des Gens nicht auszuschließen ist.

In der vorliegenden Dissertation sollte durch transiente Transformation der V-PPase potenzielle pleiotropische Anpassungen der Pflanzen vermieden und über gezielte Protonentransportmessungen die Ursachen der Effekte der PPase-Überexpression zugeordnet werden. Zusätzlich sollte eine an das kurze Transformationszeitfenster angepasste Salzapplikation direkt in das Blattgewebe weitere Einflussbereiche der V-PPase aufgezeigt und dargelegt werden. Auf diese Weise sollte der Effekt der transient überexprimierten V-PPasen auf die Blattvitäilität ohne Einfluss entwicklungsabhängiger Adaptionen auch unter Salzbehandlung beschrieben werden. Die dabei entdeckten Auswirkungen sollten auf ihren Ursprung in der Hydrolyseaktivität oder im Protonentransport der V-PPase mit Berücksichtigung der angewandten Salzbehandlung untersucht werden, wobei der Fokus auf den direkten Protonentransport mit dessen Auswirkung auf den zellulären pH, das Membranpotential sowie auf den Metabolismus lag.

2. Material und Methoden

2.1. Identifikation der *NbVHP*-Sequenzen

Die direkte Identifikation der DNA-Sequenz der vakuolären Pyrophosphatase(n) (V-PPase) in *Nicotiana benthamiana* stellte sich als schwierig heraus, da das Genom dieser Pflanze zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vollständig sequenziert bzw. analysiert war. Deswegen wurde die Sequenz der V-PPase von *Arabidopsis thaliana* (AtVHP1; TAIR10, Lamesch et al. 2012) als Ansatz genutzt, um durch eine bedingt reziproke „BEST BLAST“-Suche homologer Sequenzen im bereits bekannten *N. benthamiana* Genom zu identifizieren. Nach dieser Untersuchung wurden acht putative V-PPasen-Sequenzen in Betracht gezogen:

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| 1) NbS00030505g0009.1 | 5) NbS00009733g0024.1 |
| 2) NbS00040188g0002.1 | 6) NbS00059018g0004.1 |
| 3) NbS00005939g0108.1 | 7) NbS00025104g0012.1 |
| 4) NbS00024485g0009.1 | 8) NbS00056299g0007.1 |

Die Gene unterschieden sich nur in einzelnen Positionen und wiesen den typischen Exon-Intron-Aufbau auf. Die Vollständigkeit der Sequenzen konnte jedoch nicht bestätigt bzw. mögliche Pseudogene nicht ausgeschlossen werden. Da eine vorhandene Genomsequenz noch keine Aussage über die wirkliche Expression des Genes wiedergibt, wurden RNA-Sequenzierungsdaten (SRR685298, SRR696884, SRR696915, SRR696938, SRR696940, SRR696961, SRR696988, SRR696992, SRR697013) vom „NCBI Sequence Read Archive“ heruntergeladen und zur Identifikation der V-PPase herangezogen. Nachdem diese Sequenzen mit SKEWER (Version 0.1.99, -Q 30 -q 30 -l 60 -m pe, 10.1186/1471-2105-15-182) angepasst wurden, wurden sie mit Hilfe des Programmes TRINITY (Release 2013-02-25, --jaccard_clip --group_pairs_distance 500 --path_reinforcement_distance 75 --min_kmer_cov 2; Grabherr et al. 2011) assembliert. Der Vergleich aller acht möglichen genomischen Sequenzen mit allen Ergebnissen aus der Transkriptsuche (241.752 Isoformen und 125.729 Einzelgene; TRANSDCODER) resultierte in zwei Gensequenzen (durchsucht mit dem Pfam Profil PF03030). Diese sollten mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl vollständig als auch im Blattgewebe exprimiert werden (HMMSEARCH, Version 3.0, Eddy 2011):

- 1) NbS00030505g0009.1 im weiteren NbVHP1
- 2) NbS00040188g0002.1 im weiteren NbVHP2

Diese Sequenzanalysen und Identifikation der beiden NbVHP-Sequenzen wurden freundlicherweise von Dr. Felix Bemm vom Lehrstuhl für Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt.

2.2. Generierung der transient exprimierbaren PPase-Vektoren

Zur Klonierung eines Gens aus einer Pflanze wird bevorzugt die mRNA genutzt, um eine bereits gespleißte, also eine Intron-freie DNA-Sequenz (cDNA) zu erhalten. Das direkte Klonieren eines speziellen Gens einer Genfamilie kann sich allerdings aufgrund der starken Homologie der Sequenzen als schwierig herausstellen, weswegen auf die wesentlich variableren und somit spezifischeren untranslatierten Regionen (UTR) vor und nach der Gensequenz zurückgegriffen wird. Diese Strategie wurde auch für die Klonierung der endogenen, vakuolären Pyrophosphatasen von *Nicotiana benthamiana* (*NbVHP1* und *NbVHP2*) verfolgt. Anschließend wurden die cDNA-Sequenzen der verschiedenen PPasen (*AtVHP1*, *IPPI*, *NbVHP1* und *NbVHP2*) in bivalente Vektoren (pCambia) eingefügt. Diese Vektoren waren für eine transiente Transformation von *N. benthamiana* Blätter über Agrobakterien geeignet.

2.2.1. Extrahieren von *NbVHP1*- und *NbVHP2*-Sequenz aus *Nicotiana benthamiana*

Die Isolierung der mRNA aus *Nicotiana benthamiana* Blättern erfolgte wie unter Kapitel 2.4.1 detailliert beschrieben und wurde wie unter Kapitel 2.4.3 aufgeführt in cDNA umgewandelt.

Die für die erste Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction* = PCR) erforderlichen UTR-Primer wurden zuvor am Computer so generiert, dass sie nur einmal im gesamten *Nicotiana benthamiana* Genom kurz vor bzw. nach dem entsprechenden NbVHP-Gen aufsitzen sollten. Durch die Nutzung dieser speziellen UTR-Primer auf der gesamten isolierten cDNA konnten die jeweiligen NbVHP-Sequenzen im Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) vervielfältigt werden.

UTR-Primer:

(Tib Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin Deutschland)

NbVHP1 fwd: 5'-GCACATTTACACAAAATCTCC-3'

NbVHP1 rev: 5'-ACAGCCCACATTCTAGCAA-3'

NbVHP2 fwd: 5'-GCTTCTGTACTTTCCGGCTA-3'

NbVHP2 rev: 5'-TAACTTGGAACCCCATGCTT-3'

Auf die erfolgreiche UTR-PCR folgte eine PCR mit sogenannten USERTM-Primern, die exakt am Beginn bzw. Ende der V-PPase-kodierenden Gensequenz aufsetzten und einen spezifischen Überhang den sogenannten USER-Überhang für das spätere Einfügen in den Vektor besaßen (Kap.2.2.3).

Im Folgenden sind der PCR-Reaktionsansatz und das PCR-Programm aufgeführt, welche unter Berücksichtigung der Primer oder der PCR-Produktlänge auch angepasst für alle weiteren beschriebenen PCRs angewendet wurden:

PCR-Reaktionsansatz:	
1 µl Template (Vektor bzw. cDNA aus <i>Nicotiana benthamiana</i>)	
1 µl Primer fwd (10 µM)	
1 µl Primer rev (10 µM)	
1 µl Polymerase (Phusion F530, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)	
10 µl Puffer (PhysionCx-Puffer (5x), Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)	
1 µl dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 10 mM; Fermentas)	
35 µl H ₂ O	

Tabelle 2: PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Denaturierung	98 °C	60 s	} 30x
Denaturierung	98 °C	20 s	
Annealing	58 °C	20 s	
Elongation	72 °C	120 s	
Elongation	72 °C	120 s	
Lagerung	4 bis -20 °C		

Agarose-Gel:

Die Länge der PCR-Produkte wurde über Auftrennung mittels eines 1 %-igem Agarose-Gels kontrolliert (Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) mit 1 % Agarose (Universal Agarose, Bio&Sell GmbH, Feucht/Nürnberg, Deutschland)). Für die Visualisierung der DNA unter UV-Strahlung wurden 20 µl *Gel Green* (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA), ein Fluoreszenz-DNA-Marker, hinzugefügt. Die DNA-Proben wurden mit 5x DNA Probenpuffer versehen und auf das Agarose-Gel parallel mit dem λ-PstI DNA-Marker aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug zwischen 80-100 mV. Unter der UV-Lampe (Intas UV Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) konnte die DNA durch die Interkalierung mit *Gel Green* visualisiert und über den Vergleich mit dem Marker deren Länge erfasst werden. Eine genauere Kontrolle (Kap. 2.2.7) des PCR-Produktes wurde nach Insertion in den Vektor (Kap. 2.2.3) durch Sequenzierung vorgenommen.

5x DNA Probenpuffer

0,25 % (w/v) Bromophenol Blau (Serva, Heidelberg, Deutschland)

0,25 % (w/v) Xylencyanol FF (Carl Roth GmbH& Co.Kg, Karlsruhe, Deutschland)

100 mM EDTA (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

50 % (w/v) Glycerin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

25x TAE-Puffer (4 l)

484 g Tris

14,2 ml Eisessig

74,4 g Na₂EDTA 2 H₂O

alle Chemikalien von AppliChem (Darmstadt, Deutschland).

2.2.2. Erstellen des Vektors pCambia mit freiem GFP

USERTM-Methode

Für die Zusammenstellung der Vektoren und das Einfügen der Gensequenzen wurde die 2006 von Nour-Eldin beschriebene sogenannte „USERTM Methode“ (engl. *Uracil Specific Excision Reagent*) verwendet (Nour-Eldin et al. 2006). Das Entscheidende dieser Methode ist das Generieren einer USERTM-Kassette, die durch den Restriktionsverdau mit Pacl und Nt.BtvCl zu 8 bp-langen Überhängen („sticky ends“) führt. Mit entsprechend komplementären

Überhängen, die z.B. durch entsprechende „USERTM-Primer“ erzeugt werden, kann nun eine DNA-Sequenz anstelle der USERTM-Kassette wie ein Puzzleteil in den Vektor eingefügt werden. Bei geeigneter Wahl von Überhangsequenzen ist sogar ein Aneinanderreihen von mehreren DNA-Fragmenten in einem Schritt möglich.

Eigenschaften von pCambia 2300

Die Anforderungen an den Vektor für die Expression von V-PPasen in *Nicotiana benthamiana* waren vielseitig. Grundsätzlich musste er zur Vermehrung in *Escherichia coli* kompatibel sein, aber auch vom *Agrobacterium tumefaciens* aufgenommen und an die nächsten Generationen weitergegeben werden. Hierzu dienten die Replikationsursprünge (*engl. Replication Origins*), an denen die Polymerasen der Bakterien zur Plasmid-Duplikation aufsetzen konnten. Für die Selektion der Vektor-tragenden Bakterien wies er eine Kanamycin-Resistenz-Sequenz auf. Die *t-DNA Right-* und *Left-Border* (dt. tDNA rechte und linke Ränder) definierten den für die Pflanze exprimierbaren DNA-Bereich. Diese Zusammenstellung an Eigenschaften existierte bereits unter dem Namen pCambia 2300 (Cambia, Canberra Australien; Modulationen Abbildung 4A). Da nur Sequenzen, die zwischen den t-DNA-Rändern lagen, vom Agrobakterium in die Pflanzenzelle übertragen wurden, mussten alle Gene, die von der Pflanze exprimiert werden sollten, dazwischen platziert werden. Aus diesem Grund lagen sowohl die GFP-cDNA (*engl.: Green Fluorescent Protein*; dt.: Grün-fluoreszierendes Protein) als auch die PPase-cDNA mit ihren jeweiligen Promotoren und Terminatoren innerhalb dieser Region. In Abbildung 4C ist der fertig zusammengestellte Vektor gezeigt.

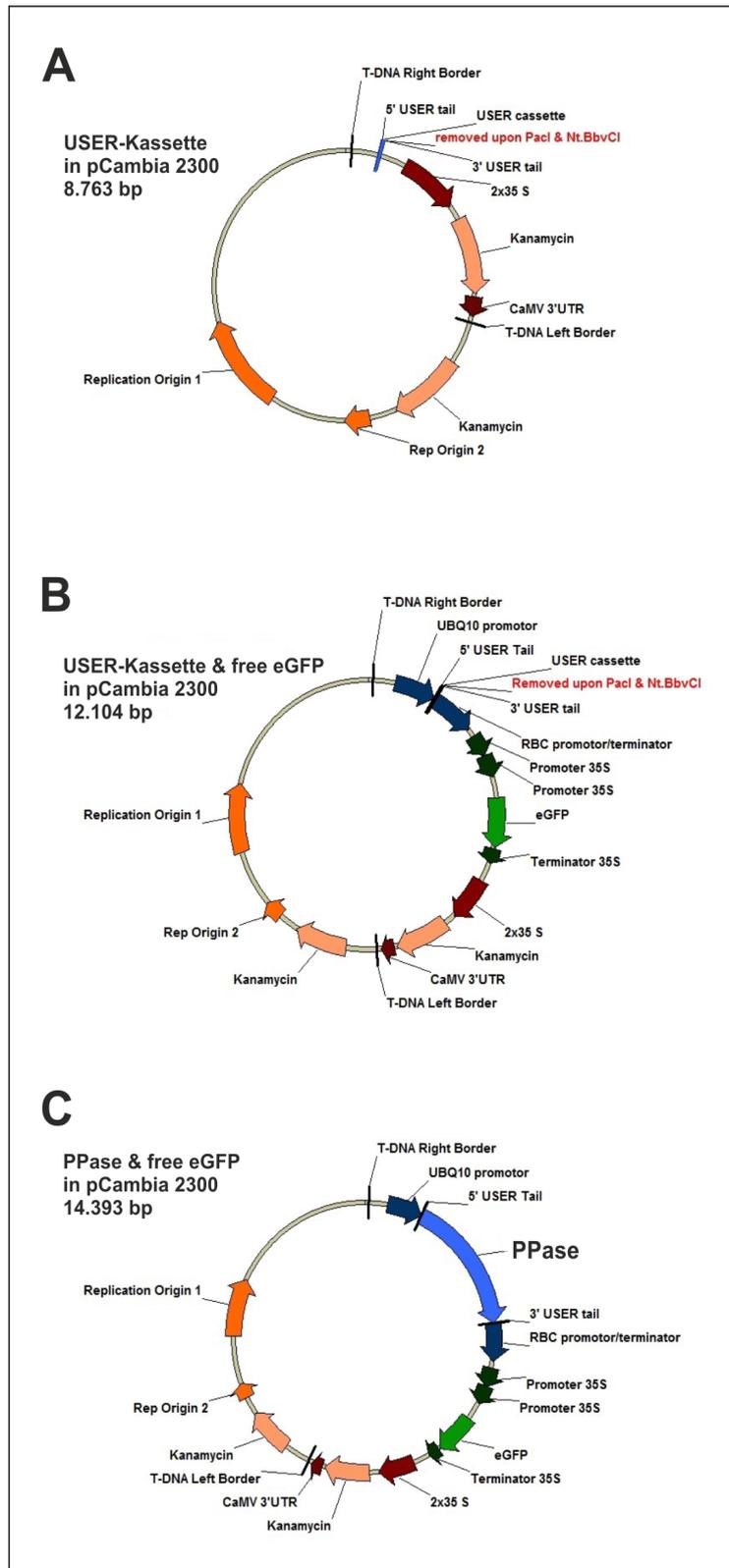


Abbildung 4: Zusammensetzung des Vektors PPase & free eGFP pCambia 2300

(A) Originalvektor pCambia 2300 mit USER-Kassette; (B) pCambia 2300 mit freiem eGFP (unter 2x35S-Promotor) und USER-Kassette zwischen UBQ10 Promotor und RBC-Terminator (\triangleq Kontroll-Vektor); (C) Vektor wie in B) mit eingefügtem PPase-Gen

Graphik: D. GRAUS 2018

USERTM-PCR mit pSAT-Vektor

Neben dem bereits vorhandenen Grundvektor pCambia 2300 mit USERTM-Kassette und Kanamycin-Resistenz stand auch der Vektor pSAT (Tzfira et al. 2005) zur Verfügung. Dieser pSAT-Vektor besaß eine USER-Kassette zwischen einem UBQ10-Promotor (Promotor von polyubiquitin 10) und einem RBC-Terminator (Terminator der Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) und beinhaltete zudem eine eGFP-Sequenz unter einem 2xCaMV-35s-Promotor (Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus). Zunächst wurde eine USERTM-PCR mit den USERTM-Primern UBQ10-USERTM-fwd (5'- GGC TTA AUA CCC GAC GAG TCA GTA ATA AAC GG- 3') und 35s-term-rev (5'- GGT TTA AUG TCA CTG GAT TTT GGT TTT AGG AAT TAG- 3') auf den pSAT-Vektor durchgeführt. Das in Abbildung 5 dargestellte Produkt dieser PCR hatte eine Länge von 3323 bp und wird im weiteren Verlauf „pSAT-Fragment“ genannt. Das PCR-Protokoll kann in Kapitel 2.2.1 nachgelesen werden.

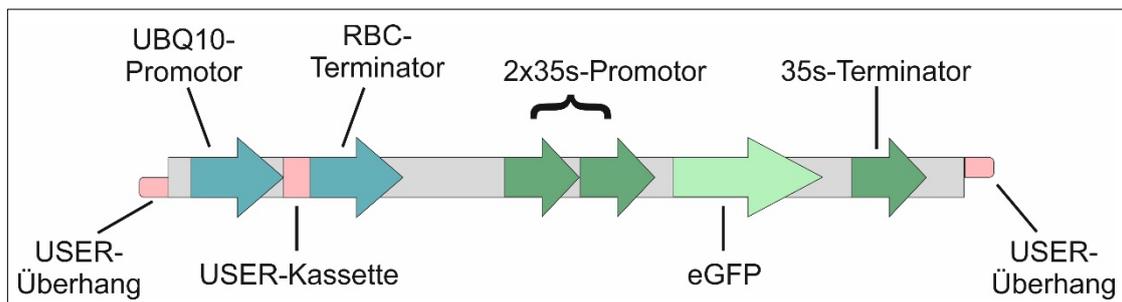


Abbildung 5: Schema des pSAT-Fragmentes

PCR-Produkt nach USERTM-PCR auf einem modifizierten pSAT-Vektor. Die USER-Kassette liegt zwischen UBQ10-Promotor und RBC-Terminator, während die eGFP-Sequenz hinter zwei 35s-Promotoren und vor einem 35s-Terminator platziert ist.

Graphik: D. GRAUS 2018

DPN1-Verdau:

Bevor ein PCR-Produkt in einen neuen Vektor eingefügt werden kann, sollte der alte als Template genutzte Vektor (in diesem Fall pSAT) zerstört werden, um eine spätere mögliche Transformation der Bakterien mit dem Ursprungsvektor zu verhindern. Durch das Enzym DPN1 (Fermentas, Erlangen, Deutschland) konnte gezielt der aufgrund der bakteriellen Herstellung methylierte Vektor verdaut werden, ohne die unmethylierten PCR-Produkte zu beeinträchtigen. Hierfür wurde 1 µl des Enzyms dem PCR-Ansatz für 1 h bei 37 °C hinzugefügt und anschließend durch Erhitzen auf 80 °C für 20 min deaktiviert.

Schneiden eines Vektors mit USERTM-Kassette:

Für das Aufschneiden und Erzeugen der USERTM-Überhänge bei einem Vektor mit USERTM-Kassette (hier für pCambia2300 verwendet) waren die Enzyme Nt.BbvCI (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland) und PacI (Fermentas, Erlangen, Deutschland) notwendig. Um eine brauchbare Konzentration an geschnittenen Vektoren am Ende zu erhalten, wurden mindestens 5000 ng Vektor-DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt.

Reaktionsansatz:

50 µl Vektor-DNA (mindestens 100 ng·µl⁻¹)
8 µl PACI (Fermentas, Erlangen, Deutschland)
20 µl NEB1-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland)
2 µl 100xBSA (10 mg·ml⁻¹) (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland)
120 µl H₂O

Nachdem dieser Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert, wurden 2 µl PacI und 4 µl Nt.BbvCI hinzugefügt. Es folgte eine weitere 2-stündige Inkubation bei 37 °C. Die anschließende Aufreinigung erfolgte exakt nach Herstellerangaben durch das QIAprep® Spin Miniprep Kit (Cat No./ID 27106; Qiagen, Hilden, Deutschland). Zur Lagerung wurde der geschnittene Vektor 1:1 mit Glycerol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) versehen und bei -20 °C aufbewahrt. Ein erfolgreiches und vollständiges Schneiden des Vektors konnte mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.2.1) kontrolliert werden, da ringförmige DNA-Fragmente gegenüber gleich großen, aufgeschnittenen DNA-Fragmente schneller durch das Gel wandern.

USERTM-Reaktion:

Im nächsten Schritt wurden der pCambia-Vektor und das pSAT-Fragment vermischt und mit Hilfe des USERTM-Enzyms zusammengefügt.

USERTM-Ansatz:

3 µl pCambia2300 (geschnitten)
1 µl USERTM-PCR (pSAT-Fragment) (bei einer Konzentration von ca. 400 ng·µl⁻¹)
5 µl TE-Puffer
1 µl USERTM-Enzym-Mix (Uracil-DNA-Glykosylase und DNA-Glykosylase-Lyase EndoVIII; New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)

Dieser USERTM-Ansatz wurde für 30 min auf 37 °C erwärmt, um ihn direkt anschließend weitere 30 min bei 25 °C inkubieren zu lassen. Der dabei entstandene Vektor entspricht Abbildung 4B und wird im weiteren Verlauf „pCambia2300 freies GFP“ oder auch Kontroll-Vektor genannt.

Transformation von *Escherichia coli*:

In der Molekularbiologie werden Bakterien eingesetzt, um Plasmide zu vervielfältigen. Die zunächst rekombinationsdefizienten *Escherichia coli* des Typs XL-1 MRF⁺ Blue (Stratagene, Santa Clara, USA) wurden kompetent gemacht und bei -80 °C gelagert. Die gesamte USER-Reaktion des Vektors pCambia 2300 freies eGFP wurde auf die noch gefrorenen MRF⁺ gegeben und für 10 min im Eis angetaut. Das Bakterien-Vektor-Gemisch wurde für 45 sec einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und danach wieder für 10 min auf Eis gestellt. Da die Bakterien Zeit für die Expression der Kanamycinresistenz benötigen, wurden die nun transformierten *E. colis* für 30 min bei 37 °C mit 300 µl SOC (engl. *Super Optimal Broth with Catabolite Repression*; dt.: super, optimale Brühe mit Katabolit-Unterdrückung) inkubiert, um sie danach auf einer LB-Agaroseplatte (engl. *Lysogeny Broth*; dt. lysogene Brühe) über Nacht wachsen zu lassen. Aus den gewachsenen Kolonien wurden 3-5 ausgewählt und jede davon in 5 ml LB-Medium über Nacht unter ständigem Schütteln bei 37 °C herangezogen.

SOC-Lösung:

20 g·l⁻¹ Tryptone

5 g·l⁻¹ Hefe-Extrakt

0,5 g·l⁻¹ NaCl

5 g·l⁻¹ MgSO₄ 7·H₂O

(alle Chemikalien von AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

LB-Medium/-Agarplatten:

20 g·l⁻¹ Tryptone

5 g·l⁻¹ Hefe-Extrakt

10 g·l⁻¹ NaCl

(alle Chemikalien von AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

Zusätzlich für Platten: 15 g·l⁻¹ Agar

(Agar-Agar Kobe1, Carl Roth GmbH& Co.Kg, Karlsruhe, Deutschland)

Das LB-Medium/LB-Agar wurde im Autoklav sterilisiert und gelöst. Aufgrund der Vektorresistenz beinhalteten das LB-Medium und die Platten noch 50 µg·ml⁻¹ Kanamycin (Kanamycinsulfat, AppliChem, Darmstadt, Deutschland), welche erst nach der Sterilisation hinzugefügt wurden.

Isolation der Vektor-DNA

Für die Isolation und Anreicherung der Vektor-DNA wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit (Cat No./ID 27106; Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Für die maximale Ausbeute wurde die gesamte 5 ml Bakterien-Übernachtskultur verwertet und der Vektor in 40 µl H₂O eluiert. Da der pCambia2300 ein großer Vektor von über 8000 bp ist, überschritten alle Zentrifugationsschritte nicht 10.000 xg (Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), um ein Zerreißen des Vektors aufgrund der Zentrifugalkraft zu vermeiden.

2.2.3. Einfügen der PPase-Varianten in den Vektor pCambia mit freiem GFP

Die USER™-Methode ermöglichte ein schnelles und gezieltes Einfügen der *NbVHP1*, *NbVHP2*, *AtVHP1*¹ und *IPP1*² in den zuvor erstellten und geschnittenen Vektor „pCambia 2300 freies eGFP“. Dafür wurden die Konstrukte über USER™-PCR mit USER™-Überhängen versehen und in den Vektor eingefügt (Protokolle und Vektor siehe Kap. 2.2.2).

USER-Primer:

NbVHP1-USER-fwd: 5'-GGC TTA AUA TGG GAG CGC AAA TTT TAT CAG-3'

NbVHP1-USER-rev: 5'-GGT TTA AUT TAA AAT AGC TTG AAG AGA AGA CCA CC-3'

NbVHP2-USER-fwd: 5'-GGC TTA AUA TGG GGG CGG CGT TG-3'

NbVHP2-USER-rev: 5'-GGT TTA AUT TAA AAA ATC TTG AAA AGC AGA CCA C-3'

IPP1-USER-fwd: 5'-GGC TTA AUA TGA CCT ACA CTA CCA GAC AAA TTG-3'

IPP1-USER-rev: 5'-GGT TTA AUT TAA ACA GAA CCG GAG ATG AAG A-3'

AtVHP1-USER-fwd: 5'-GGC TTA ATU ATG GTG GCG CCT GCT TTG TTA-3'

AtVHP1-USER-rev: 5'-GTA TCC TTT TCA AGT ACT TCT AAU ATT AAA CC-3'

¹ zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Karin Schumacher Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

² zur Verfügung gestellt von Dr. Ali Ferjani, Tokyo Gakugei University, Koganei

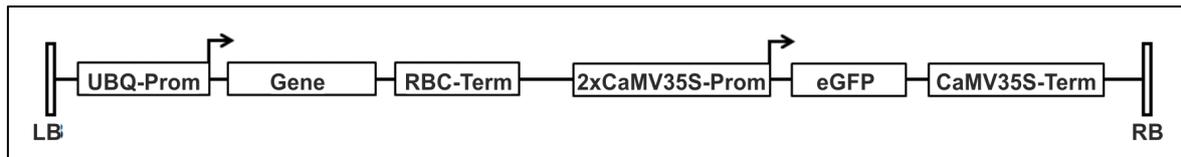


Abbildung 6: t-DNA-Modell der PPasen mit freiem eGFP

Es ist der Aufbau der DNA-Sequenz zwischen linkem und rechtem Rand (*engl.* Left and Right Border; *kurz* LB und RB) des pCambia 2300 free GFP-Vektors nach PPase-Insertion gezeigt. Während das PPase-Gen unter der Expressionskontrolle des UBQ10-Promotors stand, war das freie eGFP durch einen doppelten CaMV35s-Promotor und Terminator flankiert.

2.2.4. Erstellen des mGFP-NbVHP1-Konstruktes

2014 konnte Segami et al. (2014) zeigen, dass ein Markieren von AVP1 (= AtVHP1) durch N- oder C-terminale Bindung eines GFPs zu Strukturveränderungen der Vakuole und sogar einem Funktionsverlust der V-PPase führen kann. Diese negativen Auswirkungen konnten jedoch durch das Einfügen eines monomeren GFPs (*kurz*: mGFP) in die erste cytosolische Schlaufe (*Loop1*) des Proteins verhindert werden. Für die Nachbildung dieses Konstruktes mit NbVHP1 wurde zunächst die bereits im Labor vorhandene eGFP-DNA-Sequenz durch eine gezielte Punktmutation mittels USER-Primers (mGFP-mut-fwd: 5'-TGA GCA CCC AGU CCA AAC TGA-3'; mGFP-mut-rev: 5'-GGG GTC TTT GCU CAG TTT GGA-3') und USER-PCR in ein mGFP umgewandelt. Die Erstellung der neuen mGFP-markierten NbVHP1-Version geschah danach in zwei Schritten:

- 1) Es wurde auf die generierte mGFP-Sequenz eine Volllängen-USER-PCR durchgeführt (mGFP-Link-fwd; GFP-rev). Auf die NbVHP1-Sequenz wurden dagegen zwei USER-PCRs (Kap. 2.2.2) durchgeführt, wobei die eine von Beginn bis zum 159. bp (NbVHP1-USER-fwd; VHP1-GFPNT-rev) und die zweite vom 160. bp bis zum Ende (VHP1-GFPCT-fwd; NbVHP1-USER-rev) ging.
- 2) Die USER-PCR-Fragmente wurden in der bereits beschriebenen USER-Reaktion (Kap. 2.2.2) in einen pNBI#16-Vektor zusammengefügt. Die vollständige NbVHP1-mGFP-Sequenz wurde wie unter Kapitel 2.2.3 beschrieben in einen Vektor pCambia 2300 zwischen dessen UBQ-Promotor und RBC-Terminator eingefügt.

Es ist anzumerken, dass mittels der Primer eine Linkersequenz (5'-GGC GGC GGA GGT TCA GGT GGT GGC GGG TCT -3' = [Gly₄Ser]₂) vor die mGFP-Sequenz eingefügt wurde, um die korrekte Faltung der Proteine zu gewährleisten (Abbildung 7; Segami et al. 2014).

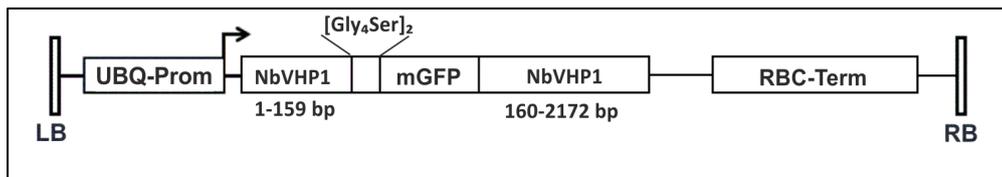


Abbildung 7: t-DNA-Modell der mGFP-markierten NbVHP1

Gezeigt ist der Aufbau der DNA-Sequenz zwischen linkem und rechtem Rand (*engl. Left and Right Border*; kurz LB und RB) des pCambia 2300-Vektors. Die Sequenz des monomere mGFPs ist in der Sequenz des ersten cytosolischen Loops von NbVHP1-zwischen einem UBQ10-Promotor und einem RBC-Terminator plaziert. Die Linkersequenz (5'-GGC GGC GGA GGT TCA GGT GGT GGC GGG TCT -3' = [Gly₄Ser]₂) direkt vor dem mGFP begünstigt eine spätere korrekte Faltung des Proteins.

Verwendete Primer:

mGFP-Link-fwd:

5'-AGG TTC AGG TGG UGG CGG GTC TGC TGT GAG CAA GGG CGA GG-3'

GFP-rev:

5'-AGA TGC CTT GUA CAG CTC GTC CAT GCC GTG A-3'

NbVHP1-USER-fwd:

5'-GGC TTA AUA TGG GAG CGC AAA TTT TAT CAG-3'

VHP1-GFPNT-rev:

5'-ACC ACC TGA ACC UCC GCC GCC TGA CTT TTC AGC ACT GAG CGT C-3'

VHP1-GFPCT-fwd:

5'-ACA AGG CAT CUG GAG CAG CAG ACG ATA AGA ATG G-3'

NbVHP1-USER-rev:

5'-GGT TTA AUT TAA AAT AGC TTG AAG AGA AGA CCA CC-3'

2.2.5. Agrobakterientransformation

Die Agrobakterientransformation geschah durch Elektroporation. Bei dieser Technik werden die Zellen bzw. die Bakterien durch Anlegen einer Spannung in einer Kammer aufgeladen. Wird die Spannung über 1 Volt erhöht, so überschreitet man eine kritische Feldstärke und es bilden sich Poren in der Zellmembran. Die Durchbruch-Feldstärke beträgt 10^3 - 10^4 V·cm⁻¹. Doch aufgrund der kurzen Applikationsdauer von 10-100 µs ist es der Zelle möglich, sich zu regenerieren und die Poren wieder zu schließen. Die in der Lösung hinzugefügten Plasmide können dabei durch die Poren in das Zellinnere gelangen und dort anschließend vervielfältigt oder exprimiert werden.

Für die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV3101) wurden die Bakterien zunächst in YEB-Medium (*engl. Yeast Extract Broth*; dt. Hefeextraktbrühe) über

Nacht herangezogen und anschließend in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 8000 g zentrifugiert (Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Pellet wurde drei Mal mit 1 ml H_2O gewaschen und zum Schluss in 50 μ l H_2O resuspendiert. Zu dieser Bakteriensuspension wurde 100 ng isolierte und aufgereinigte Vektor-DNA (*NbVHP1*, *NbVHP2*, *IPPI* bzw. *AtVHP1* in pCambia 2300 freies eGFP) hinzugefügt und in eine Elektroporations-Küvette überführt. Nachdem die Zellen in einem Elektroporator (Typ 2510, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) einen Spannungspuls von 2500 mV ausgesetzt wurden, wurde der Küvetteninhalt mit 250 μ l SOC-Medium (Kap. 2.2.2) vermischt und dann in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Eine Stunde nach Inkubation in einem 28 °C-Schüttler (Inova 4230, New Brunswick Scientific, Edison NJ, USA) wurden die Agrobakterien auf YEB-Platten für zwei Tage bei 28 °C kultiviert. Von den gewachsenen Kolonien wurden YEB-Übernachtulturen angelegt und ggf. mittels PCR (Kap. 2.2.1) auf das transferierte Konstrukt getestet.

YEB-Medium und -Platten:

0,5 % (w/v) Tryptone
0,5 % (w/v) Hefe Extrakt
0,5 % (w/v) Saccharose
50 mM $MgSO_4$
alle Chemikalien von AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

Zusätzlich für YEB-Agar-Platten: 15 $g \cdot l^{-1}$ Agar
(Agar-Agar Kobe1, Carl Roth GmbH& Co.Kg, Karlsruhe, Deutschland)

Da der genutzte Stamm GV3101 bereits die Resistenzen für Gentamycin und Rifampicin aufweist, wurden dem YEB-Medium grundsätzlich beide Antibiotika hinzugefügt: 25 $mg \cdot ml^{-1}$ Gentamycin (Gentamycinsulfat, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und 10 mg/ml Rifampicin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) Für die Selektion der transformierten Agrobakterien GV3101 wurde das YEB-Medium mit Kanamycin (100 $mg \cdot ml^{-1}$ Kanamycinsulfat, AppliChem, Darmstadt, Deutschland), dessen Resistenz auf dem Vektor pCambia2300 lag, ergänzt.

2.2.6. Herstellung von Agrobakterien-Glycerinstammkulturen

Durch das Anlegen von Agrobakterien-Glycerinstock-Stammkulturen ist es möglich die transformierten Bakterien – ohne den Aufwand einer erneuten Transformation - nach längerer Zeit wieder zu verwenden. Hierfür wurde 1 ml der transformierten Agrobakterien-Übernachtskultur (OD₆₀₀ von 2-3) bei 8000 xg für 1 min zentrifugiert (Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und das alte Medium abgenommen. Das Pellet wurde mit 500 µl YEB (Kap. 2.2.5) resuspendiert, mit 250 µl 87 %-Glycerol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) vermischt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Auf diese Weise ließen sich die Agrobakterien GV3101 über mehrere Monate bei -80 °C lagern.

2.2.7. Sequenzierung

Die erstellten Vektoren und isolierten Gene wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) mit passend ausgewählten Primern mit der Sanger-Sequenzierungsmethode sequenziert. Mutationen und Varianzen wurden durch Vergleich mit entsprechend zusammengestellten Vektorkarten im Programm Vektor NTI® 10.3.0 (Jul. 31, 2006; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) kontrolliert.

2.3. Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* Mesophyllzellen

2.3.1. Anzuchtbedingungen von *Nicotiana benthamiana*

Die Kultivierung der *Nicotiana benthamiana* Pflanzen erfolgte durch die institutseigenen Gärtner im Gewächshaus bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 % und einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 14 h/10 h. Dabei wurde die Temperatur am Tag auf 26 °C erhöht, während sie in der Nacht auf 22 °C gesenkt wurde. Die Tabaksamen keimten zunächst 14 Tage in Einheitsherde Typ P (Patzner GmbH & Co. KG, Sinntal- Altengronau, Deutschland) bevor die Keimlinge pikiert und in Einheitserde Typ T (Patzner GmbH & Co. KG, Sinntal- Altengronau, Deutschland) umgesetzt wurden. Der Tabak wuchs bei einer Lichtintensität von 168,31 µmol m⁻² s⁻² (400 Watt Natriumdampflampen, SON-T Agro, Massive Grow, Bochum, Deutschland, ergänzend zum Sonnenlicht) auf. Für alle Experimente wurden 4-6 Wochen alte *Nicotiana benthamiana* ausgewählt, wobei auf ein ähnliches Entwicklungsstadium bei den experimentell eingesetzten Pflanzen geachtet wurde (Abbildung 8).

2.3.2. Transiente Transformation von *N. benthamiana* via *Agrobacterium tumefaciens*

Nicotiana benthamiana Pflanzen eignen sich gut für die transiente Transformation von Blattzellen durch *Agrobacterium tumefaciens*, da sie im Gegensatz z.B. zu *Arabidopsis thaliana* für Pathogene anfälliger sind (Goodin et al. 2008). Nach Transformation der Bakterien mit den erstellten Vektoren dienten diese dann als Genfähren und damit der gezielten Einschleusung der PPase- und GFP-DNA-Sequenzen in die *N. benthamiana* Mesophyllzellen. Infolgedessen konnten die Wunschgene in ausdifferenzierten Blattzellen (über-)exprimiert und deren Lokalisation (bei geeignetem Fluoreszenzanhang) und Funktion studiert werden.

Für den Gentransfer wurden die bereits transformierten Agrobakterien (Kap. 2.2.5) für mindestens 12 h bei 28 °C im Schüttler in 5 ml YEB-Medium in einem 50 ml-Falcon (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) inkubiert. Die Agrobakterienkulturen wurden daraufhin in leere 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und einmalig mit „Agromix“-Puffer eine Minute bei 8000 xg gewaschen (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Danach wurde die Bakteriensuspension in ein frisches 50 ml-Falcon transferiert und pro eingesetzte 3 ml Agrobakterienkultur einen weiteren Milliliter Agromix-Puffer hinzugefügt. Das im Agromix-Puffer enthaltene Acetosyringone erhöhte die Virulenz der Agrobakterien, wodurch die Transformationsrate gesteigert wurde (Kapila et al. 1997). Zur Regeneration der bakteriellen Flagellen nach den Zentrifugations-Schritten wurden die gewaschenen Bakterien für 2-4 h bei 28 °C geschüttelt. Die optische Dichte (OD600) jeder Bakterienkultur wurde am Spektrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, Erlangen, Deutschland) kontrolliert und mit Agromix auf eine OD600 von 0,5 verdünnt. Bei den Salzstressexperimenten wurde zusätzlich in die Agromixlösung 200 mM NaCl (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Mit Hilfe einer 1 ml Spritze (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) wurde die Agrobakterien-Suspension über die offenen Stomata der Blattunterseite in das Mesophyllgewebe der *N. benthamiana* Blätter injiziert (Abbildung 8). Eine optimale Transformationsrate wurde dabei erreicht, indem eine weitere Agrobakterien-Linie mit dem Hilfsvektor 19K (Te et al. 2005; White and Cipriani 1990) auf die gleiche Weise behandelt und gleichzeitig mit den pCambia-transformierten Agrobakterien 1:1 coinfiltriert wurde. Bei der Mischung der beiden Agrobaktierensorten wurde darauf geachtet, dass ihre jeweilige Infiltrationsdichte den OD600 von 0,5 in der Lösung betrug. Alle nachfolgenden Experimente wurden 48-72 h nach Infiltration der Agrobakterien durchgeführt.

Agromix-Puffer (nach Goodin et al. 2008):

10 mM MgCl₂ (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

10 mM MES (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) eingestellt auf pH 5,6 mit KOH

150 µM Acetosyringone (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)

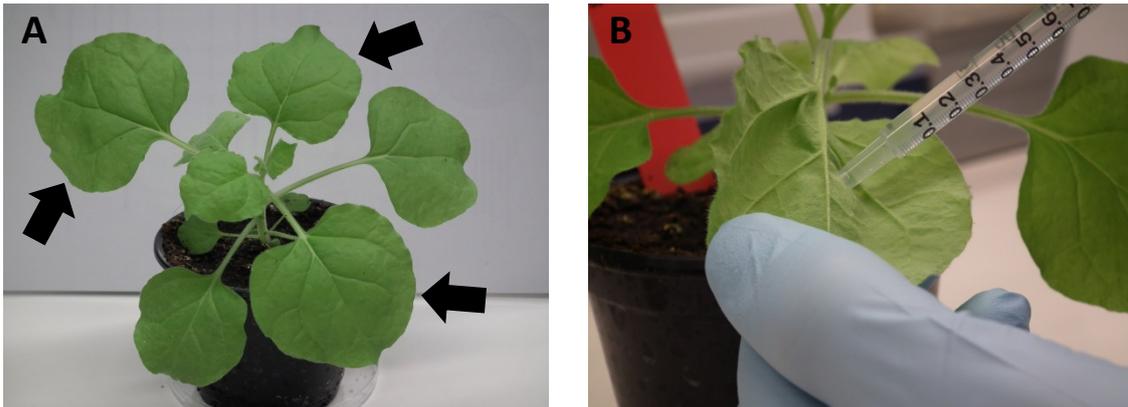


Abbildung 8: *Nicotiana benthamiana* Agrobakterien-Infiltration

(A) Eine 5 Wochen alte *Nicotiana benthamiana* Pflanze, deren voll entwickelten Blätter (Pfeile) zur Infiltration genutzt wurden. (B) Infiltration der Agrobakterien-Suspension ins Blatt über die offenen Stomata der Blattunterseite mittels einer 1 ml-Spritze.

Fotos: D. GRAUS 2014

2.3.3. Präparation von Mesophyll-Protoplasten und Vakuolen

Isolierte Mesophyll-Protoplasten wurden für viele der hier durchgeführten Experimente verwendet: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (Kap.2.5), Genexpressionsanalysen (Kap. 2.4) und *Patch-Clamp*-Technik (Kap. 2.6). Zunächst wurden 48-72 h nach Agrobakterien-Behandlung die infiltrierten Blattbereiche von *Nicotiana benthamiana* ausgeschnitten und die untere Epidermis vorsichtig mit Hilfe von Sandpapier entfernt. Die Unterseite des Blattes wurde danach für 60 min bei leichtem Schütteln (GFL, Burgwedel, Deutschland) in eine Enzymlösung zum Zellwandabbau und Herauslösen der Protoplasten inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch ein Gazenetz (Maschenweite = 50 µm, A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland) in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) mittels Waschlösung filtriert und anschließend für 7 min und 4 °C bei 60 xg (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ohne Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Nachdem der Überstand weitestgehend abgenommen worden war, konnten die Protoplasten in der verbleibenden Lösung (ca. 2 ml) für einige Stunden auf Eis gelagert werden.

Enzymlösung:

1% (w/v) BSA (*engl.: Bovine Serum Albumine*)

(Albumin Fraction V, AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

0,05 % (w/v) Pectolyase Y23 (Kyowa, Osaka, Japan)

0,5 % (w/v) Zellulase R-10 (Yakult, Tokyo, Japan)

0,5 % (w/v) Mazerozym R-10 (Yakult, Tokyo, Japan)

1 mM CaCl₂ (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

10 mM MES/Tris, pH 5,6 (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

500 mosmol kg⁻¹ mit Sorbitol eingestellt

(Carl Roth GmbH& Co.Kg, Karlsruhe, Deutschland)

Waschlösung:

1 mM CaCl₂ (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

500 mosmol kg⁻¹ mit Sorbitol eingestellt

(Carl Roth GmbH& Co.Kg, Karlsruhe, Deutschland)

Für die Isolation der Vakuolen wurde der hypotonische Effekt genutzt, indem die Protoplastensuspension mit Wasser bzw. Lysispuffer versetzt wurde, um das Aufplatzen der Plasmamembran und die Freigabe der Vakuole durch den osmotischen Schock zu bewirken.

Lysispuffer:

10 mM EGTA (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

10 mM HEPES (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA)

pH 7,5 mit Tris (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) eingestellt

270 mosmol kg⁻¹ mit Sorbitol eingestellt

(Carl Roth GmbH& Co.Kg, Karlsruhe, Deutschland)

Die hier beschriebenen Lösungen werden seit Jahren erfolgreich zur Protoplastierung und Isolierung der Vakuolen von *A. thaliana* im Labor der Botanik I der Julius-Maximilians-Universität eingesetzt (Schulz et al. 2011; Rienmüller et al. 2012) und wurden für diese Arbeit in ihrer Osmolalität an *N. benthamiana* angepasst.

2.4. Genexpressionsanalysen

Genexpressionsanalysen basieren auf der quantitativen mRNA-Bestimmung eines Genes in Bezug auf ein „Haushalts-Gen“ (wie z.B. Aktin). Da mRNA durch RNAsen schnell abgebaut werden kann, wird die gesamte mRNA nach Isolation aus dem Gewebe in stabilere cDNA umgeschrieben. Dabei bleibt das Verhältnis der unterschiedlichen mRNAs nach reverser Transkription erhalten, wodurch Rückschlüsse auf die Genexpression durch Relation zu einem Haushalts-Gen gezogen werden können.

Die Analyse der cDNA erfolgt mit genspezifischen Primern mittels der quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (kurz qRT-PCR). Diese Technik beruht auf Farbstoffen, deren Emissionsintensität mit der doppelsträngigen PCR-Produkt-Menge korreliert und dementsprechend Rückschlüsse auf die eingesetzte Templatemenge zulässt. In den hier durchgeführten Experimenten wurde der Farbstoff Sybr®Green verwendet, welcher in doppelsträngiger DNA interkaliert und dadurch in der Lage ist blaues Licht ($\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$) zu absorbieren und grünes Licht ($\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$) zu emittieren. Die Intensität der Emission von Sybr®Green wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen und erhöht sich mit der Menge an doppelsträngiger DNA in der Probe. Anhand dieser Emissionswerte und der Länge des PCR-Fragmentes kann jedes Gen in Relation mit den jeweiligen Emissionswerten von einem Haushalts-Gen gesetzt und verglichen werden.

Generell sei angemerkt, dass für alle weiteren Arbeiten an mRNA und cDNA RNase-freies H₂O (HPLC, Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe, Deutschland) verwendet wurde.

2.4.1. mRNA-Isolation aus Blattgewebe

Für die generelle Bestimmung der endogenen NbVHP-Expression wurde die mRNA aus Wildtyp *Nicotiana benthamiana* Blättern isoliert, während für alle weiteren Experimente die mRNA-Isolation an Blattstücken 48 h nach Agrobakterien-Infiltration erfolgte. Die Blattstücke (ca. 0,5 cm²) wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) überführt und sofort in flüssigem Stickstoff zur Verhinderung der mRNA-Degeneration eingefroren. Das Gewebe wurde mechanisch in einer Kugelmühle (1 min, 75 Hz; Tissue Lyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) in tiefgefrorenem Zustand pulverisiert und sofort wieder weggefroren. Die Extraktion der mRNA erfolgte per „Plant RNA Kit“ (R6827-02, Omega biotec, Norcross, USA), wodurch allerdings nicht die Pflanzen-DNA entfernt werden konnte. Hierfür war ein separater DNase-Verdau nötig.

DNase-Verdau-Ansatz:

2 µg mRNA Extraktion
1 µl DNase I (1 U·µl⁻¹)
1 µl 10x DNase Puffer mit MgCl₂
0,5 µl RNase Inhibitor Ribolock (40 U·µl⁻¹)
auf 10 µl H₂O aufgefüllt
(alle Reagenzien stammen von Thermo Scientific, Erlangen, Deutschland)

Im Rahmen dessen wurde der mRNA-Extrakt zunächst für 40 min bei 37 °C im DNase-Verdau-Ansatz (siehe oben) inkubiert und anschließend auf 100 µl Gesamtvolumen mit H₂O aufgefüllt. Neben 1 µl Glykogen (20 mg·ml⁻¹; Thermo Scientific, Erlangen, Deutschland) und 10 µl Ammoniumacetat (CH₃CO₂NH₄; 5 M) wurden noch 75 µl Isopropanol hinzugefügt und mindestens 1 h bei -20 °C die mRNA gefällt. Danach wurde die Probe für 45 min bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit ($\geq 14.000 \text{ xg}$; Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und erneut 30 min bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das mRNA-Pellet bei 37 °C auf dem Heizblock (Labnet international, inc., Edison, NJ, USA) getrocknet und anschließend in 14 µl H₂O gelöst und bei -20 °C weggefroren.

2.4.2. mRNA-Isolation aus Protoplasten

Da die mRNA-Menge aus zuvor präparierten Mesophyllprotoplasten (Kap. 2.3.3) von *Nicotiana benthamiana* geringer war als aus dem Blattgewebe, wurde für diese Isolation die „Dynabead“-Methode (Dynabeads Oligo (dT)25, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) angewandt. Auf der Oberfläche dieser magnetischen Kugeln (*engl. beads*) haften einzelsträngige Tyrosinketten, an denen die mRNA über ihre PolyA-Schwänze – im Gegensatz zur genomischen DNA – binden können. Durch diese PolyA-Selektion der mRNA ist ein DNase-Verdau, der für einen hohen Verlust an mRNA verantwortlich ist, nicht notwendig.

Für die mRNA-Extraktion wurden zunächst die Protoplasten, wie unter Kapitel 2.3.3 beschrieben, hergestellt, 150 µl der Protoplastensuspension mit 300 µl Lysis-Bindungs-Puffer vermischt und in flüssigem Stickstoff zum Erhalt der mRNA sofort eingefroren. Nach Auftauen der Protoplastensuspension wurde sie mit 30 µl *Dynabeads* (Dynabeads Oligo (dT)25, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler (Rotator Mixer RM-Multi1, StarLab GmbH, Milton Keyens, United

Kingdom) gemischt. Anschließend wurde die magnetische Eigenschaft der *Dynabeads* mit einem Magnetständer genutzt, um die Kugeln mit 150 μl „*Dynabead*-Wasch-Puffer mit LiDS“ (Lithiumdodecylsulfat) zweimal zu spülen. Das LiDS wurde im Lysis-Bindungs-Puffer als auch im ersten Waschschrift im Waschpuffer zur Unterdrückung möglicher enzymatischer Reaktionen verwendet. Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, allerdings mit 150 μl „*Dynabead*-Wasch-Puffer ohne LiDs“. Die Kugeln wurden in 50 μl Elutionspuffer (0,1 mM Tris; AppliChem, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen, für 2 min auf 70 °C erhitzt und 50 μl 2-facher-Bindungs-Puffer hinzugefügt. Nach 15 min im Überkopfschüttler wurden die Kugeln noch zweimal mit 150 μl „*Dynabead*-Wasch-Puffer ohne LiDs“ gewaschen und die mRNA durch Erhitzen auf 70 °C für 2 min in 15 μl Elutionspuffer von den Dynabeads abgelöst. 14 μl der mRNA-Elutionslösung wurden zügig abgenommen und in ein frisches 0,5 μl Reaktionsgefäß (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) übertragen.

Lysis-Bindungs-Puffer:

100 mM Tris (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
500 mM LiCl (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
10 mM EDTA (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
1 % (w/v) LiDS (Lithiumdodecylsulfat; Carl Roth GmbH& Co.Kg, Karlsruhe, Deutschland)
5 mM DTT (Dithiotreitol) (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)

Dynabead-Wasch-Puffer (mit und ohne LiDs):

10 mM Tris (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
150 mM LiCl (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
1 mM EDTA (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
ggf. 0,1 % (w/v) LiDS (Lithiumdodecylsulfat) hinzufügen

2-facher-Bindungs-Puffer:

20 mM Tris

1 mM LiCl

2 mM EDTA

alle Chemikalien von AppliChem (Darmstadt, Deutschland).

2.4.3. cDNA – Reverse Transkriptase

Nach erfolgreicher Isolation der mRNA direkt aus dem Blattgewebe oder aus Mesophyllprotoplasten bestand der nächste Schritt im Umschreiben der mRNA in die stabilere Form der cDNA durch das Enzym „reverse Transkriptase“.

Dafür wurden je 14 µl isolierter mRNA-Probe die Basis-Mischung für die reverse Transkription hinzugefügt:

Basis-Mischung für die reverse Transkription:

0,8 µl oligo dT Primer (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)

1 µl dNTPs (Fermentas, Erlangen, Deutschland)

0,5 µl RNase Inhibitor (Thermo Scientific, Erlangen, Deutschland)

4 µl 5-Fach-RT-Puffer (Promega Corporation, Wisconsin, USA)

Die mRNA-Basis-Mischung wurde bei 70 °C für 2 min inkubiert und für die gleiche Zeit auf Eis gestellt, um ein Aufsetzen der oligo dT Primer auf die mRNA zu gewährleisten. Das Umschreiben der mRNA in cDNA geschah durch die Zugabe von 0,8 µl M-MLV „Reverse Transkriptase“ (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; Promega Corporation, Wisconsin, USA) und durch die Erwärmung der Proben auf 42 °C für eine Stunde. Die entstandene cDNA konnte anschließend bei -80 °C gelagert werden.

2.4.4. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (kurz qRT-PCR) ist eine sehr sensitive Methode, mit der selbst einzelne DNA-Moleküle nachgewiesen werden können. Für eine so genaue qualitative Bestimmung wird allerdings eine Eich- bzw. Standardkurve für jedes genutzte Primerpaar benötigt. Diese Eichkurve wird mit Hilfe von vier „Standards“ erzeugt, die eine definierte Menge der Gensequenz aufweisen und zeitgleich mit den Proben vermessen

werden. Mit diesen erhaltenen Werten wird eine Eichgerade erstellt und die gemessenen Probenwerte damit verglichen.

Herstellung der Standards:

Für die Erzeugung der Standardproben wurde zunächst eine normale PCR mit den jeweiligen Primerpaaren auf der zuvor extrahierten cDNA durchgeführt (Kap. 2.2.1) und danach mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Cat No./ID 27106; Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Die Konzentration der PCR wurde mit dem Spektrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, Erlangen, Deutschland) gemessen und auf dieser Basis die folgenden Standards über eine Verdünnungsreihe mit H₂O (versetzt mit t-RNA; Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) in „DNA-LoBind“ Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) hergestellt:
1: 10 ng·µl⁻¹; **3:** 100 pg·µl⁻¹; **5:** 1 pg·µl⁻¹; **7:** 10 fg·µl⁻¹; **8:** 1 fg·µl⁻¹; **9:** 0,1 fg·µl⁻¹;
10: 0,01 fg·µl⁻¹

Für die qRT-PCR-Messungen wurden in *96-Well* Platten (Eppendorf twin.tec® PCR Plates, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) der Reaktionsmix für die Proben und die Standards 7, 8, 9 und 10 vorgelegt, während für die Negativkontrolle ein *Well* mit dem Reaktions-Mix ohne cDNA-Zugabe befüllt wurde.

Reaktions-Mix:

2 µl cDNA (1:20 verdünnt) / oder Standard 7, 8, 9 oder 10

8 µl Primer Mix

10 µl Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix

(ABgene Advanced Biotechnologie, Hamburg, Deutschland)

Primer-Mix:

12 µl Primer-fwd (50 µM) + 12 µl Primer-rev (50 µM) + 374 µl H₂O (+ tRNA)

Die qRT-PCR fand im „Mastercycler ep realplex2“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit dem Programm aus Tabelle 3 statt.

Tabelle 3: qRT-PCR Standard-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	} 40x
<i>Annealing</i>	T _m (56 °C bzw. 60 °C)	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Fluoreszenzmessung	79 °C	20 s	
Denaturierung	95 °C	15 s	
Schmelzkurve	70-95 °C (Δ 0,3 °C)	60 s	
Reassoziation	40 °C	120 s	
Lagerung	4 °C		

Für jedes Primerpaar wurde im Vorfeld die *Annealing*-Temperatur T_m bestimmt, die für die durchgeführten qRT-PCRs für das Aktin- und NbVHP1-Primerpaar bei 56 °C und für das NbVHP2-Primerpaar bei 60 °C lag. Die ermittelte Schmelzkurve diente zur Kontrolle der Reinheit des Produkts, da ein Gemisch aus verschiedenen PCR-Produkten auch unterschiedliche Schmelzpunkte aufweist.

Auswertung:

Anhand der Standards konnte eine Eichkurve erstellt werden, wonach die ursprünglich vorhandene cDNA-Menge (in fg) des entsprechenden Gens jeder Probe ermittelt werden konnte. Eine Variation der cDNA-Konzentration in den unterschiedlichen Proben wurde durch das Messen des Haushalts-Gens Aktin, das in jeder Zelle gleich stark exprimiert wird (Joseph et al. 2018), berücksichtigt und ausgeglichen. Auf der Basis, dass (i) 1 fg 910 dsDNA-Moleküle von 1000 bp (Giulietti et al. 2001) entspricht und (ii) das qRT-PCR-Fragment von *NbAktin* eine Länge von 275 bp hat, wurde folgende Berechnung durchgeführt:

$$1\text{fg NbAktin Fragment} \cong (1000\text{ bp} \cdot 910\text{ Moleküle})/275\text{ bp} = 3309\text{ Moleküle}$$

Nach dieser Formel konnte nun das Gewicht von 10.000 Aktin-DNA-Molekülen, der sogenannte Aktin-Faktor (kurz AKT-Faktor) ermittelt werden:

$$\text{AKT-Faktor} = \frac{10\ 000\ \text{Moleküle}}{3309\ \text{Moleküle/fg}} = 3,02\ \text{fg}$$

Mittels dieses Faktors ließ sich nun für jedes untersuchte Gen die Molekülzahl pro 10 000 Aktin berechnen:

$$\frac{\text{Anzahl Transkripte}}{10\,000 \text{ Transkripte Aktin}} = \frac{\text{Fragmentmenge [fg]} \cdot 1000 \text{ bp} \cdot 910 \text{ Moleküle}}{\text{Fragmentlänge [bp]}} \cdot \frac{\text{AKT - Faktor}}{\text{Aktinmenge [fg]}}$$

Die erhaltenen Verhältnisse für die einzelnen Bedingungen wurden gemittelt und der Standard-Fehler bzw. die Standardabweichung errechnet.

Die Expression der NbVHPs in Wildtyp-Pflanzen wurde auf Aktin normiert. Da aber bei einer transienten Transformation die Expressionsrate zwischen den Blättern und auch der dadurch entstehende Effekt variieren konnte, wurden die qRT-PCR-Werte der untersuchten Gene mit dem Wert für das transient exprimierte eGFP normiert.

Primer für qRT-PCR:

(Tib Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin Deutschland)

NbVHP1LCfw: 5'-GTT GGA ATC TTG TTT GGC-3'

NbVHP1LCrv: 5'-GTA GGA GTG GTA TTC GTT-3'

Fragmentlänge: 354 bp

NbVHP2LCfw: 5'-CCT CAT AGT TGG GAT TTT C-3'

NbVHP2LCrv: 5'-GAA TGC CTC CCA ACA AGC TC-3'

Fragmentlänge: 364 bp

NbAktinLCfw: 5'-CCC AGA AGT CCT CTT-3'

NbAktinLCrv: 5'-GGG ATG CGA GGA T-3'

Fragmentlänge: 275 bp

eGFPLCfw: 5'-CCT GAA GTT CAT CTG CAC CA-3'

eGFPLCrv: 5'-TGC TCA GGT AGT GGT TGT CG-3'

Fragmentlänge: 479 bp

(eGFP-Primer aus Gaddam et al. (2013))

2.5. Konfokale Laser Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die in dieser Arbeit präsentierten Fluoreszenzbilder wurden 48-72 h nach Infiltration der Agrobakterien angefertigt und dienten zur Lokalisation von NbVHP1-mGFP als auch zum Nachweis der eGFP-Expression in der Epidermis, in isolierten Protoplasten und Vakuolen von *Nicotiana benthamiana*. Für die Epidermis-Fluoreszenzbilder wurde ein Stück des intakten, infiltrierten Blattes ausgeschnitten und auf einem Objektträger mit H₂O überführt. Die Protoplasten und die Vakuolen wurden wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben hergestellt und gleichfalls auf einen Objektträger in Waschlösung transferiert.

Für die Fluoreszenz-Aufnahmen wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM Leica TCS SP5II, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet und sowohl das GFP als auch die Chloroplasten mit Hilfe eines Argon-Lasers mit 488 nm Wellenlänge angeregt. Die Emission von GFP lag bei 505-530 nm, während die Eigenfluoreszenz der Chloroplasten bei 580-620 nm aufgezeichnet wurde. Die Vergrößerung erfolgte mit einem 20x Objektiv (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), wurde aber am Computer zusätzlich an das Untersuchungsobjekt angepasst und die Skalierung direkt vom LSM-Software-Programm übernommen (Leica LAS AF Lite, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland). Für einen besseren räumlicheren Effekt der LSM-Bilder wurde in einem festgesetzten Abstand der z-Achse (Äquatorebene bis Pol der Vakuole/des Protoplastens) in 18 Teilebenen Schnittbilder aufgenommen und mit Hilfe des LSM-Programms übereinandergelegt, wodurch ein dreidimensionaler Effekt entstand. Für die Co-Lokalisations-Untersuchung von NbVHP1-mGFP und dem Plasmamembranmarker FM4-64TM (Thermo Scientific, Erlangen, Deutschland) wurden die isolierten Protoplasten in 10 µM FM4-64TM kurze Zeit inkubiert. Die Anregungswellenlänge des Membranmarkers lag bei 514 nm, während die Emission zwischen 625-690 nm abgegriffen wurde.

2.6. Membranpotenzial-Messung

Das Messen des Membranpotenzials kann mit Hilfe der Mikroelektroden-Einstich-Technik an intakten Pflanzen oder Pflanzenfragmenten erfolgen, indem mit sehr spitzen Glasmikroelektroden durch die Zellwand und Plasmamembran in die Zelle eingestochen wird. Es ist zudem auch möglich, weiter durch den Tonoplasten zu stoßen und das Potential der Vakuolenmembran zu messen. Die Schwierigkeit besteht im Differenzieren des Plasmamembran- und Vakuolenmembranpotentials. Wang et al. (2015) zeigte an *A. thaliana*

Wurzelzellen, dass anhand der gemessenen Leitfähigkeit auf die Lokalisation der Messelektrode im Zellinneren geschlossen werden kann. Für *N. benthamiana* wurden analoge Experimente an Epidermis und Mesophyllzellen des Blattes durchgeführt (Daten nicht gezeigt), indem zunächst mittels eingeführten doppel-läufigen (*engl. double-barreled*) Elektroden die Membranleitfähigkeit durch Anlegen eines Spannungspulsprotokolls ermittelt wurde. Allerdings konnte keine Konvergenz zwischen Leitfähigkeit und gemessener Membranspannung nachgewiesen werden. Daher wurde das eingestochene Zellkompartiment visuell mittels dem Fluoreszenzfarbstoff „*Lucifer-Yellow*“ identifiziert. Der Einsatz von 1 mM *Lucifer-Yellow* war, wegen der Detektierung nur an der ersten Zellschicht, also den Epidermiszellen, möglich und resultierte für alle durchgeführten Versuche (n = 9; Daten nicht gezeigt) in der Anfärbung des Cytosols. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde in den anschließenden Experimenten die gemessenen Spannungen auf die Plasmamembran zurückgeführt.

Für die Potentialmessungen wurden aus transient transformierten *N. benthamiana* Blättern (Kap. 2.3.2) 2-3 Tage nach Behandlung kleine Areale (ca. 0,5-1 cm²) herausgeschnitten, mit der Unterseite nach oben mit doppelseitigen Klebeband (Tesa SE, Norderstedt, Deutschland) in einer Petrischale fixiert und anschließend mit Badlösung (5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM MES, pH 6.0; alle Chemikalien von AppliChem, Darmstadt, Deutschland) bedeckt. Die verwendeten *Double-barreled* Elektroden wurden aus Borosilicat-Glas (0,58 mm Innen- und 1,0 mm Außendurchmesser; Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) hergestellt, indem sie an einem vertikalen Ziehgerät (L/M-3P-A, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) zunächst erhitzt und um 360°C ineinander verdreht wurden. Im Anschluss wurden mittels eines horizontalen Laser-Glaskapillar-Ziehgerät (P2000, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) die Kapillaren voneinander getrennt und feine scharfe Spitzen gebildet.

Die Referenzelektrode bestand aus einer einfachen Borosilicat-Glaskapillare, die einen Pfropfen aus 2%-Agarose mit 300 mM KCl an einem Ende besaß. Sowohl die Glaskapillaren für die Referenzelektrode als auch für die Messelektrode wurden mit 300 mM KCl-Lösung gefüllt, während die eingeführten Elektroden aus chlorierten Silberdrähten bestanden. Die Messapparatur bestand aus einem Mikroskop (Axioskop 2FS, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), einem Mikromanipulator (MM3A, Kleindiek Nano-Technik, Reutlingen, Germany), einem Verstärker für die Potentialmessung (VF-102, BioLogic, Seyssinet-Pariset, Frankreich) und einem Low-Pass Bessel Filter (LPF 202A; Warner Instruments Corp., Hamden, CT, USA). Nach Nullwertabgleich der Elektroden in der Badlösung und anschließendem direkten Einstechen der *Double-barreled* Elektrode in die Epidermisschicht

des Blattstückes, konnte die Membranspannung direkt am Verstärker abgelesen werden. Durch das Anlegen eines Spannungspuls-Protokolls (Abbildung 9) wurde die Leitfähigkeit kontrolliert und eine Fehlmessung außerhalb einer Zelle ausgeschlossen. Die erhaltenen Potenziale wurden mit Origin Pro 2016G (OriginLab, Northampton, MA, USA) gemittelt und in einem *Boxplot*-Diagramm (dt. Kastengraphik) dargestellt.

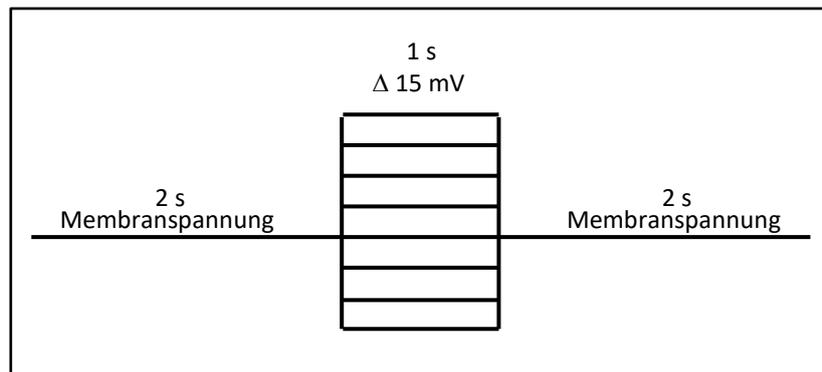


Abbildung 9: Spannungspulsprotokoll zur Ermittlung der Leitfähigkeit

Die Membranspannung wurde für zwei Sekunden gehalten, bevor die Spannung für eine Sekunde auf 45 mV unterhalb des Membranpotentials wechselte und wieder auf das ursprüngliche Membranpotential zurückkehrte. Diese Abfolge wurde sieben Mal wiederholt, wobei sich bei jedem Durchgang die wechselnde Spannung um 15 mV erhöhte.

Graphik: D. GRAUS 2017

2.7. Patch-Clamp-Technik

Für die direkte Messung eines Ionenaustausches über eine Membran sind die *Patch-Clamp* Technik und die Mikroelektroden-Einstich-Technik geeignet. Während bei der Einstich-Technik mit einer spitzen Glasmikroelektrode durch die Membran in das Zellinnere oder ein Zellkompartiment gestochen wird (Kap. 2.6), wird in der *Patch-Clamp*-Technik eine abgerundete Glaselektrode auf die Membran aufgesetzt. Je nach zu untersuchenden Membrantransportproteinen wie Kanal, Pumpe oder Transporter, der transportierten Ionen und der biologischen Membran kann die *Patch-Clamp*-Messung unter verschiedenen Konfigurationen stattfinden und so der Fragestellung angepasst werden: der „*Cell-/Vacuole-attached*“-Modus (dt: Vakuolen-Anheftungs-Konfiguration), der „*Inside-out*“-Modus (dt: Innenseite-außen-Konfiguration), der „*Outside-out*“-Modus (dt: Außenseite-außen-Konfiguration) und der „*Whole-Cell-/Vacuole*“-Modus (dt: Ganz-Zell-/Vakuolen-Konfiguration).

In Anbetracht der Tatsache, dass in dieser Arbeit die vakuolären Protonenpumpen, die V-PPase und V-ATPasen, im Vordergrund standen, wird im Weiteren Verlauf der Überblick über die *Patch-Clamp*-Technik beispielhaft nur bei Anwendung für die Vakuole gegeben. Es ist

dennoch zu betonen, dass die Messkonfigurationen gleichermaßen auch an anderen Membranen etabliert werden können.

Im *Vacuole-attached*-Modus heftet die Messpipette mit einem Abdichtwiderstand im Gigaohmbereich an der Außenseite der Vakuole an, ohne die Membran zu durchbrechen. In dieser Konfiguration behält die Vakuole ihre physiologische Lumenzusammensetzung, wodurch zwar wichtige luminaire Substanzen erhalten werden, der Messbereich sich allerdings auf die geringe Membranfläche, die die Messpipettenöffnung umschließt, beschränkt. In der *Inside-out*-Konfiguration wird diese Membranfläche herausgetrennt und liegt somit von der restlichen vakuolären Membran getrennt vor. Die vakuoläre Seite der Membran wird nun vom Badmedium, die cytosolische Seite, wie schon bei der *Vacuole-attached*-Konfiguration, von der Pipettenlösung umspült. Die *Outside-out*-Konfiguration unterscheidet sich nur in der Ausrichtung der Membran von der *Inside-out*-Konfiguration, da die Messpipette nun an der vakuolären Membranseite haftet und die cytosolische Seite der Badlösung zugewandt ist. In den bisher beschriebenen Konfigurationen ist die Messung auf den geringen separierten Membranbereich, der die Messpipettenöffnung verschließt, beschränkt. Vom *Vacuole-attached*-Modus kann durch Unterdruck und einem kurzen Spannungspuls die Membran durchbrochen werden und die *Whole-Vacuole*-Konfiguration etabliert werden. Das Vakuolenlumen wird dabei von der Pipettenlösung ersetzt, während das Badmedium weiterhin auf der cytosolischen Seite vorliegt. Das Alleinstellungsmerkmal der *Whole-Vacuole*-Konfiguration ist die Möglichkeit über die gesamte Vakuolenmembran die Ionenbewegungen als Summenstrom aufzuzeichnen (Abbildung 10; Numberger and Draguhn 1996).

Die Wahl der geeigneten Messkonfiguration hängt stark vom untersuchten Membrantransportprotein ab. Ein Kanal ist in der Lage, 10^7 - 10^8 Ionen pro Sekunde, eine Pumpe oder *Carrier* 10^3 Ionen pro Sekunde passieren zu lassen (Lodish et al. 2000). Bei der Untersuchung kleiner Membranflächen wie bei dem *Vacuole-attached*-, *Outside-out* oder *Inside-out*-Modus befinden sich nur wenige Membrantransportproteine im Messbereich und die erzeugten Stromantworten von *Carrier* und Pumpen unterhalb der Auflösungsgrenze der *Patch-Clamp*-Technik von ca. 1 pA. Aufgrund ihrer hohen Durchflussrate ist in diesen Modi nur die Aktivität von einzelnen Ionenkanälen in sogenannten Einzelkanalmessungen erfassbar. In der *Whole-Vacuole*-Konfiguration werden die Ionenbewegungen über die gesamte Vakuolenmembran detektiert, wodurch auch die Pump- oder Carrieraktivitäten als Summenströme aufgezeichnet werden können. Der Fokus dieser Arbeit lag auf den Protonenpumpen der Vakuole, weswegen ausschließlich in der *Whole-Vacuole*-Konfiguration gemessen wurde (Abbildung 10).

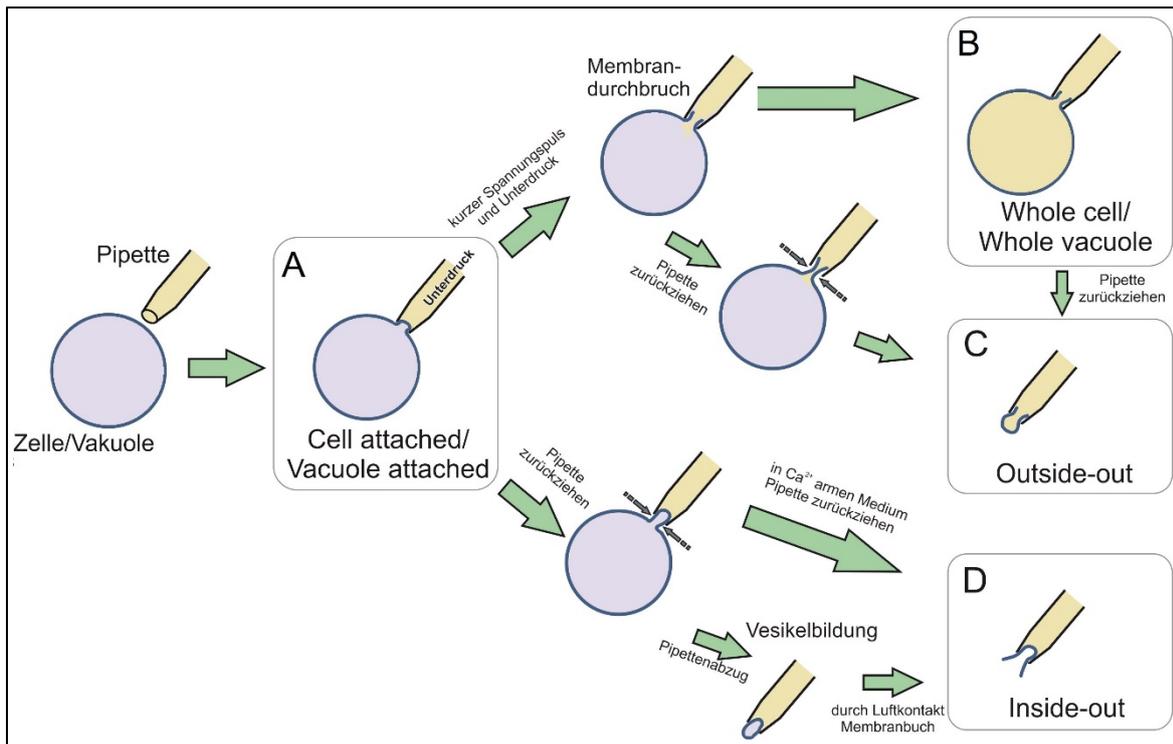


Abbildung 10: Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik

(A) Die *Cell-/vacuole-attached*-Konfiguration entsteht indem die Pipette gefüllt mit Pipettenlösung (hellbraun) mit einem hohen Abdichtwiderstand auf der Membran (dunkelblau) ohne die Membran zu durchbrechen aufliegt. Nach einem kurzen Spannungspuls und Unterdruck kommt es zum Durchbruch der Membran. Darauf wird sukzessiv das Lumen (hellblau) mit Pipettenlösung vollständig ersetzt und der (B) *Whole-cell-/vacuole-* Modus etabliert. Durch Zurückziehen der Pipette wird ein Stück der Membran isoliert und der (C) *Outside-out*-Modus hergestellt. Ein direktes Zurückziehen der Pipette nach dem (A) *Cell-/Vacuole-attached*-Modus führt hingegen zur (D) *Inside-out*-Konfiguration.

Graphik: D. GRAUS 2016 angelehnt an Numberger and Draguhn (1996)

2.7.1. Vorzeichenkonvention der Vakuolenmembranspannung

In dieser Arbeit wurde die Vorzeichenkonvention nach Bertl et al. (1992) angewendet. Die Vorzeichenkonvention definiert, dass die Membranspannung einer Endomembran immer die Differenz der Spannung auf cytosolischer und der entsprechenden nicht-cytosolischen Seite ist (Formel 3). Die Vakuole stellt den nicht-cytosolischen Teil dar und wird in der Formel dementsprechend ersetzt. Daraus abgeleitet bedeutet ein positiver Stromwert einen Einstrom von Kationen in die Vakuole bzw. einen Ausstrom von Anionen aus der Vakuole. Für einen negativen Stromwert verhält es sich genau umgekehrt.

Formel 3: Vorzeichenkonvention nach Bertl et al. (1992)

$$V_{\text{Endomembran}} = V_{\text{Cytosol}} - V_{\text{nicht-cytosol}}$$

2.7.2. Elektroden

Die Messelektrode als auch die Referenzelektrode bestanden aus einem chloriertem Silber-/Silberchlorid-Draht (Rienmüller 2014). Die Chlorierung erfolgte elektrolytisch nach Eintauchen des Silberdrahtes (Ag^+) in eine 0,5 M KCl-Lösung und anschließendem Anlegen einer Gleichspannung. Für die Referenzelektrode wurde ein Polyethylenschlauch einseitig mit einem Agarosepfropfen (3 M KCl, 2% Agarose) versehen und zur Hälfte mit 3 M KCl befüllt und über den chlorierten Silberdraht gesteckt. Durch den Agarosepfropfen wurde ein späteres Vermischen der KCl-Lösung und der Silberionen mit der Badlösung vermieden während die elektrische Leitfähigkeit aber nicht beeinträchtigt wurde.

Für die Messelektrode wurde eine Glaspipette (Patch-Pipette) präpariert, indem zunächst Glaskapillarenrohlinge (GB150T-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland und Borsilikat-Hartglaskapillaren bzw. Klimax-51, Kimble Products, Vineland, N.Y., USA) innen mit Sigmacote® (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) beschichtet und anschließend über Nacht bei 60 °C getrocknet wurden (Abbildung 11A). Die beschichteten Kapillaren wurden an einem Vertikal-Ziehgerät (PC-10, Narishige Group, Tokyo, Japan; dt. Vertikalzieher) über zwei Schmelzschritte (Hitzelevel 80→52,5) zu zwei Pipetten mit jeweils einer dünnen Spitze ausgeformt (Abbildung 11B). Zur Reduzierung von störenden Kapazitäten des Glases während der Messung wurden ca. die ersten 3 mm der Spitze unter Aussparung der Öffnung mit Silikon (Sylgard® 184 Silicone elastomer Kit, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA) ummantelt und das Silikon durch Erhitzen mit der „Mikroforge“ ausgehärtet (L/MCPZ 101, List Medical-Elektronik, Darmstadt, Deutschland, dt. Mikro-Schmiede) (Abbildung 11C). Da eine scharfkantige Spitze später die Vakuolenmembran verletzen könnte, wurden die Ränder der Kapillarenspitze an einem glühenden Heizdraht unter lichtmikroskopischer Kontrolle poliert. Die Glaspipette wurde ca. 2/3 mit Pipettenlösung luftblasenfrei befüllt und auf die Messelektrode gesteckt. Die verwendeten Messpipetten besaßen in der Standardmesslösung (Kap. 2.7.5) einen Widerstand zwischen 3,5 und 4,5 MΩ.

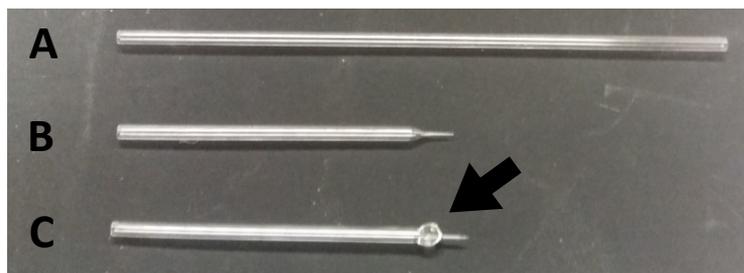


Abbildung 11: Anfertigungsschritte einer Messelektroden-Pipette

(A) Glaskapillarenrohling (B) Sigmacote® beschichtete Pipette nach zwei Schmelzschritten am Vertikalziehgerät; (C) fertige Patchpipette mit Silikonbeschichtung (Sylgard®, siehe Pfeil) und hitzepolierter Spitze.

2.7.3. Applikationspipette

Die Applikationsglaspipetten dienten zur kontrollierten Zugabe der Applikationslösung auf die Vakuole während der Stromaufzeichnung. Sie wurden aus unbeschichteten Glaskapillaren (Klimax-51, Kimble Products, Vineland, N.Y., USA) am Vertikalziehgerät (PC-10, Narishige Group, Tokyo, Japan) in zwei Schmelzschriften (Hitzelevel 70→40,5) hergestellt. Aufgrund der Tatsache, dass kein unmittelbarer Kontakt zwischen Applikationspipette und Vakuole hergestellt wurde, war ein weiteres Beschichten oder Polieren des Glases unnötig.

2.7.4. Patch-Clamp-Messplatz

Im Zentrum des *Patch-Clamp*-Messplatzes stand das Mikroskop (Axio Vert.A1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland; Okulare: 10x; 40x; 60x) auf einem schwingungsarmen Tisch unter einem Faraday'schen Käfig, der vor unerwünschten äußeren elektrischen Störungen schützte (Abbildung 12). Auf der rechten Seite des Mikroskops war der *Patch-Clamp*-Vorverstärker an einem Mikromanipulator (Scientifica PatchStar Micromanipulator, East Sussex, Großbritannien) zur Feinjustierung angebracht, an dem direkt die Messelektrode und die Referenzelektrode angeschlossen waren. Auf der linken Seite des Mikroskops war die Applikationspipette an einem weiteren Mikromanipulator montiert (Scientifica PatchStar Micromanipulator, East Sussex, Großbritannien). Die eingesetzte mit Lösung befüllte Applikationspipette war am Ende mit einem Silikonschlauch verbunden, über den der Ausstrom des Pipetteninhaltes manuell kontrolliert wurde (Abbildung 13). In der Messkammer wurde der stabile Pegel der Badlösung während des kontinuierlichen Lösungs-austausches durch zwei Peristaltikpumpen gewährleistet (Reglo ICC und Reglo Analog, Ismatec Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) (Abbildung 13). Um ein vollständiges Austauschen der Badlösung in der Messkammer zu erreichen, wurde der Zu- und Ablauf an gegenüberliegende Enden der Kammer platziert. Zur Reduktion von Stromstörungen, ausgelöst durch die elektrischen Peristaltikpumpen, wurden diese wiederum in einen weiteren Faraday'schen Käfig gesetzt. Die Referenzelektrode wurde direkt am Ablauf fixiert (Abbildung 13). Über einen Schlauch war die Messelektrodenhalterung mit einem Unter-drucksystem verbunden. Der in der Messelektrode aufgebaute Druck konnte mittels dieses Systems stabil gehalten oder wahlweise direkt über ein Mundstück schnell und sensibel vom Experimentator variiert werden. Zur Vermeidung zusätzlicher elektrischer Störungen wurden alle weiteren genannten Geräte außerhalb des Faraday'schen Käfigs angebracht: Die Steuer-einheitsschnittstelle für die Mikromanipulatoren, die Lichtquelle (Power Supply, Carl Zeiss

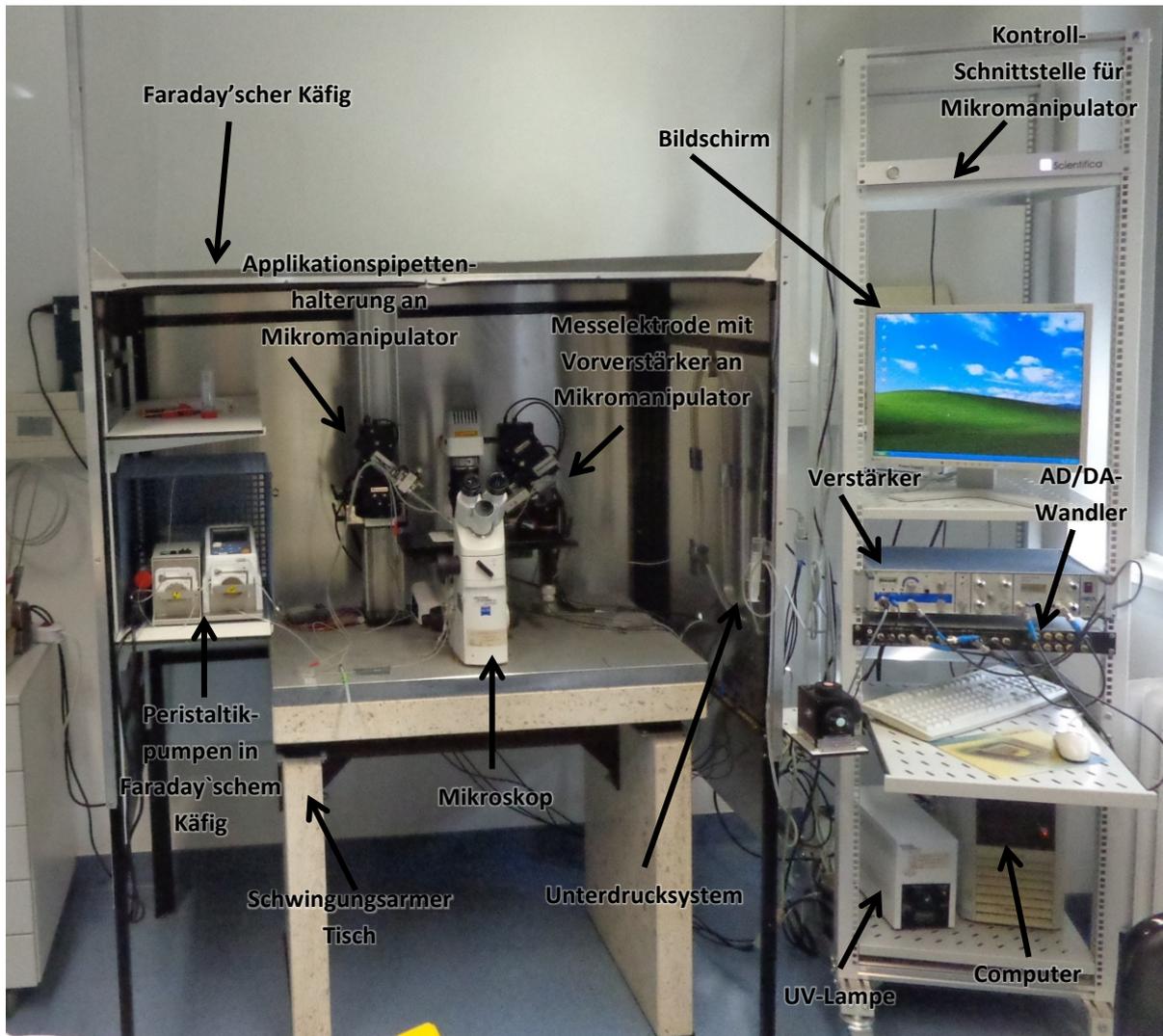


Abbildung 12: Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes

Komponenten des Patch-Clamp-Messplatzes: Mikroskop auf einem schwingungsgedämpften Tisch, Mikromanipulator, Messelektrode mit Vorverstärker, Applikationspipettenhalterung, Unterdrucksystem der Messelektrode, Peristaltikpumpen innerhalb des Faraday'schen Käfigs, sowie Verstärker, AD/DA-Wandler, Computer mit Bildschirm und UV-Lampe. (nicht zu sehen: Lichtquelle für Mikroskop hinter dem Bildschirm)

AG, Oberkochen, Deutschland; in Abbildung 12 nicht zu sehen) sowie der EPC8-Patch-Clamp-Verstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) mit integrierter Filter-funktion. Für den Austausch der analogen und digitalen Signale zwischen Verstärker und Computer war ein Analog/Digital-Wandler (ITC-16 Computer Interface, Instrutech Corporation, Great Neck, New York, USA) eingebaut (Abbildung 12).

Für die Speicherung der Daten wurde ein Computer (Esprimo, Fujitsu Computers, Fujitsu Technology Solutions GmbH, München, Deutschland) mit „Windows XP“-Betriebssystem genutzt, auf dem auch über das Programm „Pulse“ (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) die Pulsprotokolle und die Datenaufzeichnung gesteuert wurden. Eine UV-Lampe (Lichtquelle LQ-HXP 120 UV, Leistungselektronik JENA GmbH, Jena, Deutschland) wurde zur Anregung

der GFP-Fluoreszenz eingesetzt. Die Anregungswellenlänge betrug 470 nm und die Emission wurde zwischen 480–535 nm gefiltert (Chroma Technology Corp, VT, USA).

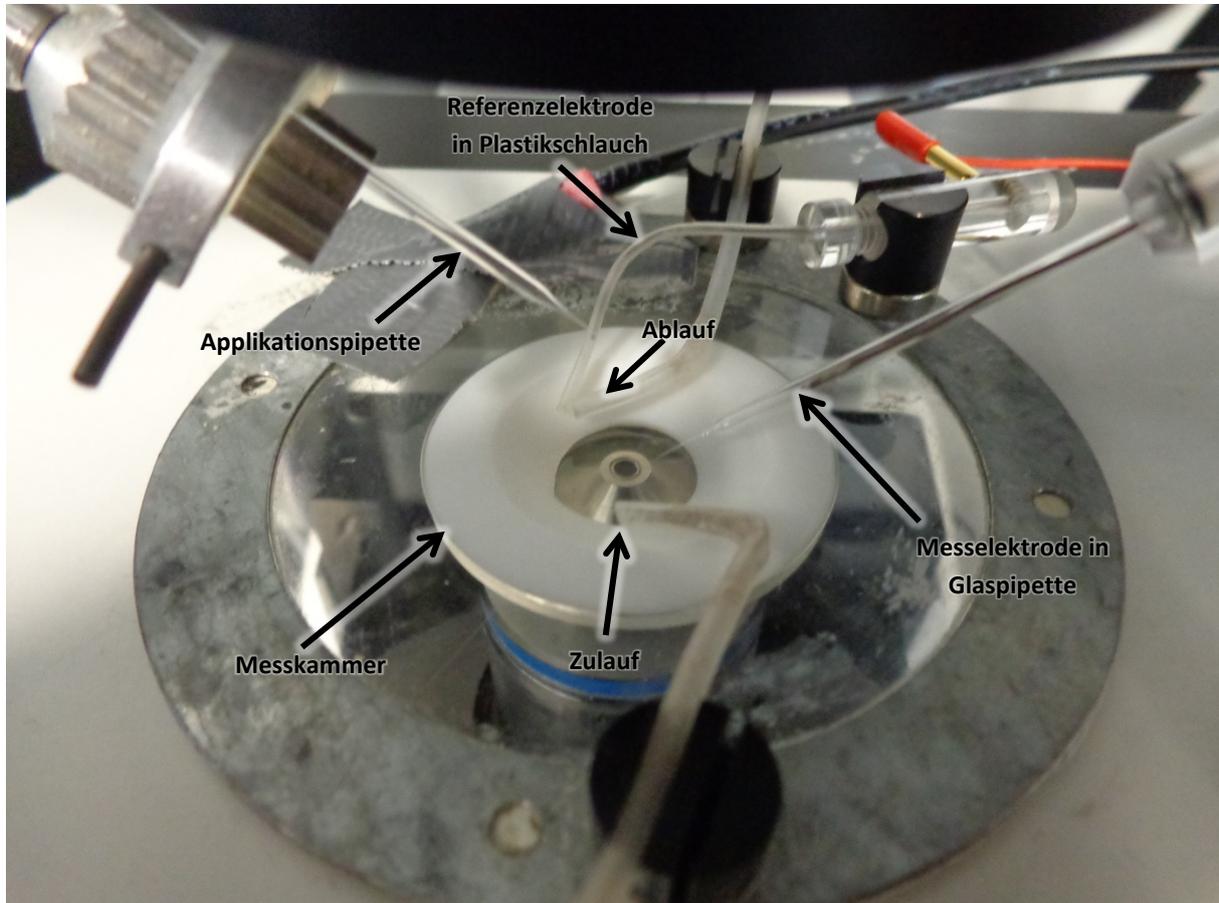


Abbildung 13: Aufbau der Messkammer

Der Zu- und Ablauf der Badlösungen hatten gegenüberliegende Positionen. Während der Messung wird die Messkammer mit Badlösung zwischen dem Zu- und Ablauf gespült. Die Referenzelektrode wurde Nahe des Ablaufes positioniert. Die Messelektrode und Applikationspipette wurden mittels Mikromanipulators gesteuert. Foto: D.GRAUS 2016

2.7.5. Durchführung der Patch-Clamp-Messungen

Die Voraussetzung für den Start der *Patch-Clamp*-Messungen waren die transformierten Tabak-Protoplasten (Kap. 2.3.3), die vorbereiteten Glas-Pipetten (Kap. 2.7.2) und die Chlorierung der Elektroden. Zu Beginn der *Patch-Clamp*-Experimente wurden ca. 50 μl Protoplastensuspension in die Messkammer transferiert und mit 200 μl Lysispuffer (Kap. 2.4) für 8 min inkubiert. Die Lysierung bewirkte einen osmotischen Schock, der zur Freisetzung der Vakuolen aus den Protoplasten führte, und durch Auswaschen des Puffers mit Badlösung gestoppt wurde. Die Patch-Pipette wurde mit Pipettenlösung luftblasenfrei zu ca. 2/3 befüllt und an die Messelektroden-Halterung befestigt und in die mit Badlösung und Vakuolen befüllte

Messkammer eingetaucht. Mit Hilfe des Programmes *Pulse* (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) wurde am Computer ein Testpuls (vom Haltepotential 0 mV auf -10 mV dann auf +10 mV jeweils für 20 ms) generiert, dessen Stromantwort zur ständigen Statusprüfung während der Etablierung der *Whole-Vacuole*-Konfiguration diente. Nach Abgleich des *Offset*-Potentials wurde die Messelektrode nahe einer fluoreszierenden Vakuole platziert, um durch Anlegen eines kontrollierten Unterdruckes d.h. durch kurzes manuelles verstärktes Ansaugen den *Vacuole-Attached*-Modus zu etablieren. Infolge des dann erhöhten Abdichtwiderstandes im G Ω -Bereich wurde eine stark reduzierte Stromantwort auf den gleichbleibenden Testspannungspuls gemäß des Ohmschen Gesetzes (Spannung = Widerstand \cdot Stromstärke) beobachtet. Die im Testpuls sehr schnell abklingenden Kapazitätsströme konnten mittels dem sogenannten *C-fast*-Kompensationsmodus am *Patch-Clamp*-Verstärker kompensiert werden. Der Übergang in die *Whole-Vacuole*-Konfiguration gelang durch simultanes Anlegen eines Unterdruckes und eines starken Spannungspulses (± 800 mV für 100 μ s), wodurch die Membran unter der Pipettenspitze durchbrach. Aufgrund der Kondensator-Eigenschaften der Membran entstanden durch den schnellen Spannungswechsel an der gesamten Vakuolenmembran durch Ladungsumlagerungen abermals kapazitive Ströme, die über die Anpassung des *C-slow*-Kompensationsmodus und des *G-Series*-Modus am Verstärker kompensiert wurden. Da die Kapazität der Membran direkt proportional zu der elektrisch zugänglichen Membranoberfläche ist (1 μ F cm⁻²), konnte die Membrankapazität C_m und damit indirekt auch die Zellgröße anhand des am Verstärker angezeigten *C-Slow*-Wertes bestimmt werden. Waren die Voraussetzungen für einen stabilen und messbaren *Whole-Vacuole*-Modus gegeben (ein Widerstand von mind. 100 M Ω und einem *G-Series*-Wert von über 0,05 μ S), wurde für den Austausch des Vakuoleninhaltes mit der Pipettenlösung mindestens 8 Minuten gewartet. Während eines kontinuierlichen Spannungspulses von 0 mV ließ sich dieser Vorgang verfolgen, da aufgrund der identischen Pipetten- und Badlösung der elektrische und chemische Gradient sich durch den Austausch verringerte und so der gemessene Netto-Strom mit der Zeit auf 0 A sank.

Für die Strommessung legte man abermals einen kontinuierlichen Puls von 0 mV bei einer Abtastrate von 50 Hz über die *Puls*-Programmsteuerung an und änderte die Filterfrequenz auf 100 Hz am Verstärker. Während des kontinuierlichen Spannungspulses wurde erst unmittelbar vor der Applikation die Pyrophosphat-haltige (kurz: PP_i-haltige) Pipette vor die Vakuole platziert, um vorzeitiges Aktivieren der PPasen durch mögliches Austreten der Applikationslösung in die Badlösung zu vermeiden. Die Dauer der PP_i-Zugabe betrug 30 s, während die Dauer der Stromabnahme nach PP_i-Entzug auf das Ausgangsniveau variierte

(zwischen 10 Sekunden und 3 Minuten). Je nach Versuchsaufbau und Stabilität der Vakuole wurde die Applikation mit gleicher oder neuer Applikationspipette auf die gleiche Weise wiederholt.

2.7.6. Messlösungen und *Liquid-Junction-Potential*

Für die nachfolgenden Lösungen wurde der pH mittels eines pH-Meters (Digital-pH-Meter 646, Knick, Berlin, Deutschland) und die Osmolalität mit einem Osmometer (Vapor Pressure Osmometer 5520, Wescor, Vapro) gemessen und eingestellt. Die Osmolalität lag zwischen 500 – 600 mosmol kg⁻¹ und wurde an die verwendeten *N. benthamiana* Pflanzen angepasst. An dieser Stelle sei erwähnt, dass das *Liquid-Junction-Potential* aufgrund der symmetrischen Lösungsbedingungen in Bad und Pipette bei 0 mV lag und daher keine Anpassung der Klemmspannung nötig war.

Messlösung für die Calcium-Abhängigkeit der V-PPase und der Aktivierung von V-ATPase:

Bad- und Pipettenlösung:

100 mM KCl (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
1 mM CaCl₂ (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
5 mM MgCl₂ (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
10 mM HEPES (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA)
500 – 600 mosmol kg⁻¹ mit Sorbitol eingestellt
(Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe, Deutschland)
pH 7,5 mit Tris eingestellt (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

Applikationspipettenlösung:

Calcium-Abhängigkeit: Zugabe von 150 µM Kaliumpyrophosphat (KPP_i; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) zur Messlösung.

V-ATPase: 5 mM MgATP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland) zur V-ATPase-Messlösung.

Aktivitätsmessungen und Dosis-Effekt-Messungen der V-PPasen

Bad- und Pipettenlösung:

100 mM KGluconat (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

0,1 mM CaCl₂ (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

5 mM MgCl₂ (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

500 – 600 mosmol kg⁻¹ mit Sorbitol eingestellt

(Carl Roth GmbH& Co.Kg, Karlsruhe, Deutschland)

pH 7,5: 10 mM HEPES (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA)

pH 5,5: 10 mM MES (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

Der pH wurde mit Tris eingestellt (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

Applikationspipettenlösung:

Zur Badlösung für PPasen wurden unterschiedliche Konzentrationen Kaliumpyrophosphates (KPP_i; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) hinzugefügt:

Standardkonzentration: 150 µM

Dosis-Effekt-Kurve mit AtVHP1: 0; 12,5; 25; 50; 100; 150; 300 µM

Dosis-Effekt-Kurve mit NbVHP1: 0; 9,375; 18,75; 37,5; 75; 125; 150; 225; 300 µM

2.7.7. Aufzeichnung und Auswertung der Messdaten

Auswertung der Standardmessungen:

Die erhaltenen Stromdaten wurden mittels *Igor Pro 6* (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, USA) statistisch ausgewertet, indem der Wert der maximalen Stromänderung nach PP_i-Zugabe für jede Vakuole ermittelt und mit deren Membrankapazität C_m auf die Vakuolengröße normiert wurde. Aus den für die individuellen Vakuolen erhaltenen Werten wurde der Mittelwerte mit Standardfehler bzw. -abweichungen unter den jeweiligen Messbedingungen berechnet.

Auswertung der Dosis-Effekt-Messungen:

V-PPasen sind membranständige Enzyme, deren Funktionsweise mit löslichen Enzymen verglichen werden können. Sie binden an ein Substrat (hier PP_i) und wandeln es (hier durch Hydrolyse) in ein Produkt (hier 2xP_i) um. Dabei unterstehen diese Schritte dem Fließgleichgewicht, was bedeutet, dass sie in beide Reaktionsrichtungen laufen können. Auch die Geschwindigkeit jedes einzelnen Schrittes ist definiert und konstant.

Auf dieser Grundlage basiert die von Leonor Michaelis und Maud Menten erstellte Gleichung (Formel 4) zur Berechnung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms (v_{\max}). Die Michaeliskonstante (K_m) wird dabei als Substratkonzentration bei halb-maximaler Reaktionsgeschwindigkeit ($1/2 v_{\max}$) definiert. Für die Analyse der Enzymkinetik der V-PPasen wurde auf diese Formel zurückgegriffen.

Formel 4: Michaelis-Menten-Gleichung

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

v_0 = Reaktionsgeschwindigkeit

v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

[S] = Substratkonzentration

K_m = Michaelis-Menten-Konstante (Substratkonzentration bei $1/2 v_{\max}$)

Aufgrund der möglicherweise variierenden Expressionsrate der V-PPasen zwischen den einzelnen transformierten Mesophyllzellen wurden für die Normierung der Dosis-Effekt-Kurven alle erhaltenen Stromamplituden der einzelnen KPP_i-Konzentrationen mit der Stromantwort auf 150 μ M PP_i der jeweiligen Vakuole in Relation gesetzt. Danach wurden die normierten Stromdaten der einzelnen Vakuolen und PP_i-Konzentrationen gemittelt und in eine Dosis-Effekt-Kurve übertragen, durch deren Beschreibung mit der Michaelis-Menten-Gleichung der K_m -Wert mit dem Programm *Igor Pro 6* bestimmt wurde. Bei ähnlichen Datensets ist es zudem möglich einen sogenannten „Global-Fit“ über die gesamten erhaltenen Daten zu erstellen, was in diesem Fall eine Michaelis-Menten-Ausgleichskurve auf alle Daten beider pH-Bedingungen der jeweiligen V-PPase bedeutete. Aufgrund der ausgeführten Normierung auf 150 μ M PP_i ließ sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nicht bestimmen.

2.8.pH-Visualisierung in Cytosol und Vakuole

Direkte pH-Messungen des vakuolären bzw. des cytosolischen Inhaltes sind nur schwierig bis gar nicht möglich, da bei dem Versuch der Extraktion von genügend Material die Zellen zerstört werden und die Inhalte sich mischen. Informationen über den pH können daher nur indirekt, zum Beispiel mittels pH-sensitiver Farbstoffe gesammelt werden. Einer dieser Farbstoffe ist BCECF-AM (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester; Rink et al. 1982), welcher zunächst inaktiv durch die Plasmamembran in das Zellinnere gelangt und erst nach Abspaltung der Estergruppe („AM“) aktiviert wird. Wird BCECF nun bei ~500 nm angeregt so ist seine Emissionsintensität bei 535 nm pH-abhängig. Je saurer das umgebende Milieu von BCECF ist, desto geringer ist die gemessene Fluoreszenz-Intensität. Der isobestische Punkt von BCECF liegt bei ~440 nm und seine Emission ist nicht pH-abhängig. Eine mögliche Schwankung der Intensität aufgrund der eingelagerten Farbstoffkonzentration kann durch die Berechnung des Intensitäts-Ratios zwischen den beiden Anregungswellenlängen (500 und 440 nm) ausgeschlossen werden. Dieser Farbstoff bietet zusätzlich die Möglichkeit, je nach Inkubationsdauer und damit Einlagerung in ein Kompartiment der Zelle den pH des Cytosols oder der Vakuole wiederzugeben (Duan et al. 2007). Ein weiterer pH-Indikator heißt PRpHluorin (*engl. Plant Ratiometric pHluorin*), und ist ein in Pflanzen löslicher, modifizierter, ratiometrischer Sensor für pH-Bereiche zwischen 5,6 - 7,6. Sein Emissions-Intensitätsmaximum variiert je nach pH zwischen 395 nm (pH 5,5) und 475 nm (pH 7,5), während der isobestische Punkt bei 428 nm liegt (Shen et al. 2013). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde für die quantitative Aufzeichnung des vakuolären pH-Wertes BCECF-AM und des cytosolischen pH-Wertes PRpHluorin verwendet.

Vakuolärer pH:

Für die Messungen wurden *N. benthamiana* Pflanzen mit NbVHP1 (ohne GFP) mit und ohne 200 mM NaCl infiltriert. Zur Kontrolle wurden weitere Pflanzen ausschließlich mit dem Agrobakterium 19K mit und ohne 200 mM NaCl behandelt (Kap. 2.3.2). Zwei Tage nach Agrobakterien-Infiltration wurde 200 µM BCECF-AM (gelöst in 10 mM MgCl₂, 10 mM MES/KOH pH 5.6) in die transformierten Blätter injiziert und für zwei Stunden im Dunkeln inkubiert.

Cytosolischer pH:

Das genetisch kodierte PRpHluorin (Shen et al. 2013) wurde zunächst mit einem N-Terminus-Sequenz versehen (NES = *Nuclear exclusion site*), der eine Lokalisation des Sensors im Nukleus ausschloss (NES:PRpHluorin). Anschließend wurde die NES:PRpHluorin-DNA-Sequenz vor einen 2x35s-Promotor in einen pCambia3300-Vektor eingebaut, welcher bereits unabhängig UBQ:*NbVHPI* beinhaltet, während der Kontrollvektor keine *NbVHPI*-Sequenz besaß. Die Vektoren wurden in Agrobakterien transformiert (Kap. 2.2.5) und in *N. benthamiana* Blätter infiltriert (Kap. 2.3.2). Zwei Tagen nach Transformation konnte direkt in der Blattepidermis die PRpHluorin-Fluoreszenz detektiert werden.

Die Visualisierung für den cytosolischen und vakuolären pH erfolgte auf eine ähnliche Weise: 2-3 Tage nach Infiltration wurden transformierte Blattbereiche mit Medical Adhesive (VM 355, Ulrich AG, St. Gallen, Schweiz) in einer Petrischale mit der abaxialen Seite nach oben fixiert und mit Lösung (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.6 (KOH)) bedeckt. Mit Hilfe des Zeiss Mikroskop AxioObserver (Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland; Plan-Apochromat 20x/0.8 NA Objektiv), an dem ein Hochgeschwindigkeits-Polychromatorsystem (Visitron System, Puchheim, München) angeschlossen war, und einer Fluoreszenzkamera (Evolve EMCCD, Photometrics, Tucson, AZ, USA) wurden Aufnahmen (512x512 Pixel) der Fluoreszenz der obersten Zellschicht erstellt. PRpHluorin wurde bei 390 nm und 470 nm ± 5 nm angeregt, während die Emission bei 500 nm mittels eines dichroitischen Spiegels und eines HQ 535/25 M Bandpassfilters (AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) detektiert wurde. Während der cytosolische pH der Epidermiszellen gemessen wurde, wurde der vakuoläre pH der Mesophyllzellen bestimmt, wofür die Epidermis vor Aufkleben des Blattstückes manuell entfernt wurde. Das BCECF wurde bei 440 nm oder 500 nm ± 5 nm aktiviert und seine Emission durch einen dichroitischen Spiegel 440/520 abgelenkt und durch einen Emitter 464/547 (Semrock Inc. Rochester, NY, USA) und einen ET 535/30 nm Bandpassfilter (Chroma Technology Corporation, Bellows Falls, VT, USA) geleitet. Die Berechnung des Intensitäts-Ratios beider pH-Indikatoren fand mittels ImageJ v1.51 (National Institute of Health, Rockville Pike, MD, USA) statt.

Umrechnung der vakuolären Ratio-Werte in pH-Werte:

Durch die Erstellung einer Eichkurve für den Farbstoff BCECF konnten die ermittelten Intensitäts-Ratios von BCECF in pH-Werte umgerechnet werden. Für die Kurve wurde 2,5 µM BCECF *ex vivo* in 1 mM CaCl₂ und 1 mM MES (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gelöst

und mit TRIS auf einen definierten pH eingestellt. Nachdem die Intensitäts-Ratios ermittelt wurden, wurde eine linearer Ausgleichsgerade (Origin Pro 2016G; OriginLab, Northampton, MA, USA) über die Werte gelegt, auf dessen Basis die Mesophyll-Intensitätsratios in pH-Werte übertragen wurden (Abbildung 14).

Die Klonierung der Vektorkonstrukte sowie die Injektion des BCECF-AM, die Fluoreszenz-Messungen (einschließlich Eichkurve) und die Auswertungen wurden freundlicherweise von Dr. Kai Konrad und Tilmann Güthoff (Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik - Botanik I der Universität Würzburg) durchgeführt.

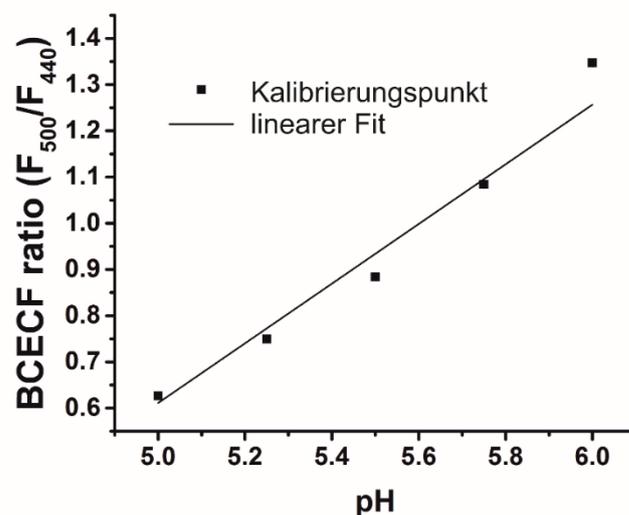


Abbildung 14: Eichkurve für BCECF

Die Intensitätsratios für BCECF bei unterschiedlichen pH-Werten wurden *ex vivo* von Dr. Kai Konrad (Universität Würzburg) ermittelt und mit einer linearen Ausgleichsgeraden beschrieben.

2.9. Atomabsorptionsspektrometrie

Die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) ist eine Technik, um quantitative und qualitative Messungen von Metallen und Halbmetallen durchzuführen. Bei der Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (*engl.: Flame Atomic Absorption Spectrometry* kurz: F-AAS) wird das Untersuchungsobjekt als Aerosol in eine Flamme zerstäubt und anschließend geschmolzen. Je nach Konzentration und Art der enthaltenen Ionen wird Licht unterschiedlich absorbiert. Diese metallspezifische Absorption kann mittels eines Detektors erfasst und zur Identifizierung und Quantifizierung der Ionen herangezogen werden.

Für die Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie wurde *N. benthamiana* Wildtyp-Pflanzenmaterial eingesetzt, welches auf zwei unterschiedliche Weisen mit Salz behandelt

wurden: (1) Die Anzuchterde wurde mit 200 mM NaCl-Lösung getränkt, während bei den Kontrollpflanzen stattdessen Wasser verwendet wurde; (2) Es wurden zwei Blätter (das 3. und 4. Blatt von unten; vgl. Abbildung 8) mit Agromix (Kap. 2.3) mit oder ohne 200 mM NaCl injiziert. Jeweils das 3. und 4. Blatt von unten wurden 0, 6, 12, 24, 48 Stunden nach Injektion entfernt, bei 60 °C vollständig über mehrere Tage getrocknet und mit einer Kugelmühle (1 min, 75 Hz; Tissue Lyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) und Keramikugeln anschließend pulverisiert. 10-20 mg des Pflanzenpulvers wurde mit 1 ml Salpetersäure (65%, suprapur, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt und bei 180 °C 10 Stunden in einem Teflon-Druck-Gefäß zersetzt. Die abgekühlten Proben wurden 1:20 mit *Nanopure* Wasser verdünnt und am Flammen-Atomabsorptionsspektrometer (AAAnalyst 400, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) auf die Natriumkonzentration untersucht. Die erhaltenen Natriumwerte wurden anschließend auf das Trockengewicht der Probe hochgerechnet.

Die beschriebene Präparation der Blattproben nach der Pulverisierung und die Messung am Flammen-Atomabsorptionsspektrometer wurden freundlicherweise von Christian Lorey (Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik - Botanik I der Universität Würzburg) und seinem Team im naturwissenschaftlichen Labor für Schüler am FKG e.V. des Friedrich-König-Gymnasium in Würzburg durchgeführt.

2.10. Apoplastenwaschung zur Osmolalitätsmessung

Der Apoplast beansprucht einen großen Teil des Blattes und stellt somit auch eine Möglichkeit für die umliegenden Blattzellen dar, Moleküle und Ionen hierüber aufzunehmen oder zu entsorgen. Das Lösen und Herausschwemmen dieser Teilchen ohne eine Kontamination durch Zellinhalte kann durch Apoplastenwaschen, wie von O'Leary et al. (2014) beschrieben, erfolgen.

Für das Apoplastenwaschen wurden Blätter von 4-6 Wochen alten *N. benthamiana* Wildtyppflanzen zunächst mit Agromix mit oder ohne 200 mM NaCl infiltriert. Nach Regeneration der behandelten Blätter (i.d.R. 3-5 Stunden nach Infiltration) wurden sie von der Pflanze entfernt und deren Oberfläche in destilliertem Wasser gewaschen. Durch Erzeugen eines Unterdrucks in einer Wasser-gefüllten 50-ml Spritze füllte sich der Apoplast der Blätter mit destilliertem H₂O. Die Blattoberfläche wurde anschließend vorsichtig mit einem Papiertuch abgetrocknet. Jeweils ein Blatt wurde auf ein ca. 10x10 cm großes Stück Parafilm (Brand GmbH & Co. KG; Wertheim, Deutschland) gelegt, um eine 5-ml Pipettenspitze (Sarstedt,

Numbrecht, Deutschland) gerollt und in den Spritzenzylinder einer 20-ml-Spritze (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) gesteckt. Dieser Aufbau wurde wiederum in ein 50 ml-Falconröhrchen (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) überführt und bei 1000 xg bei 4 °C für 10 min (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Diese Konstruktion ermöglichte es, die Blätter ohne eine größere Zerstörung der Blattzellen, zu zentrifugieren und dennoch den Inhalt des Apoplasten im 50 ml-Falcon zu sammeln. Kontaminationen durch Zellfragmente, die trotz dieser Behandlung in die Apoplastenlösung gelangt sein könnten, wurden durch Transfer der Lösung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß, Zentrifugation bei 14.000 xg für 5 min (Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und anschließender Abnahme des Überstandes (der sauberen Apoplastenlösung) entfernt (O’Leary et al. 2014). Die Osmolalität der Apoplastenlösung wurde am Osmometer (Vapor Pressure Osmometer 5520, Wescor, Vapro) abschließend bestimmt.

2.11. Puls-Amplituden-modulierende (PAM) Chlorophyll-Fluorometrie

Mit der Puls-Amplituden-modulierenden (PAM) Chlorophyll-Fluorometrie ist es auf nicht-invasive Weise möglich, die Photosyntheseaktivität des Photosystems II (PSII) *in vivo* zu untersuchen (Baker and Rosenqvist 2004; Blankenship 2002; Maxwell and Johnson 2000). Diese Technik basiert auf der Eigenschaft des PSII, welches in der Photonenannahme vor Photosystem I (PSI) eingereicht ist, die aufgenommene Photonenenergie in drei unterschiedlichen Weisen wieder abzugeben: (1) die Energie wird in photochemische Energie umgewandelt, indem das damit angeregte Elektron an die nachfolgenden Enzymelektronenkette abgegeben und für die Photosynthese verwendet wird; (2) die Energie wird als nicht-photochemische Energie, wie Wärme, abgegeben, was z.B. durch abiotischen Stress verstärkt werden kann; (3) die Energie wird in Form von Fluoreszenz abgegeben, falls das PSII bereits ein angeregtes Elektron enthält. Dieser Zustand wird auch „geschlossenes“ PSII-System genannt. Diese zuletzt genannte Fluoreszenz kann erfasst und quantifiziert werden. Da die photochemische und die nicht-photochemische Energie die Fluoreszenz unterdrücken, wird dies auch photochemisches (q_p) und nicht-photochemisches (q_{NP}) Löschen (*engl.: quenching*) genannt (Maxwell and Johnson 2000; Blankenship 2002; Pfündel 2007).

Auf dieser Grundlage können durch Lichtimpulse, wie den Sättigungspuls (*engl. saturation pulse*; Abbildung 15), und nachfolgende Berechnungen (Formel 5, Formel 6, Formel 7) Aussagen über den Zustand des PSII eines Blattes gemacht werden.

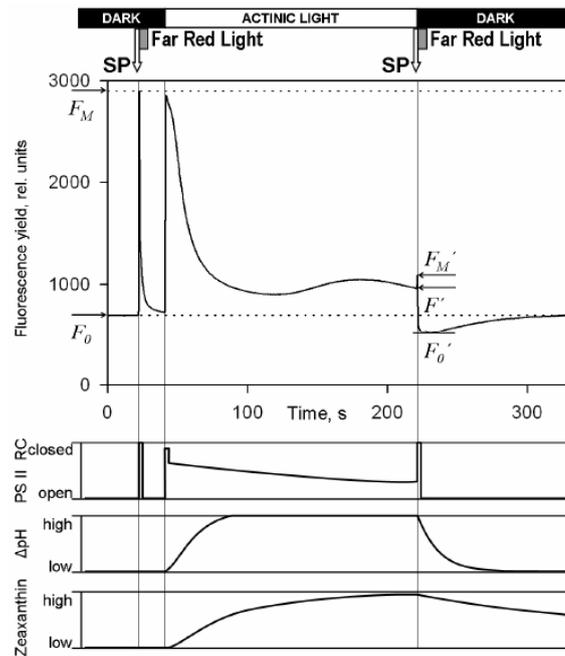


Abbildung 15: Sättigungs-Lichtimpuls-Protokoll

Auswirkungen unterschiedlicher Lichtpulse auf relative Fluoreszenz, relativer pH-Gradient (D-pH) und relative Zeaxanthin-Konzentration. (SP = Sättigungs-Puls; PSII = PhotosystemII; F_0 , F_0' , F_M , F_M' = Fluoreszenzwerte zu bestimmten Zeitpunkten und Lichtpulsen)

Quelle: PFÜNDEL, 2007 mit freundlicher Genehmigung der Heinz WALZ GmbH

Die Dunkeladaptation einer Pflanze bewirkt die Öffnung aller PSII, und damit befinden sich keine angeregten Elektronen mehr darin. Ein gezielter langer und starker Sättigungs-Lichtpuls auf eine dunkeladaptierte Pflanze regt alle PSII-Elektronen an und schließt damit alle vorliegenden PSII. Durch gleichzeitige Unterdrückung der Elektronentransportkette ist eine Weitergabe der Elektronen von PSII zu PSI allerdings nicht möglich, wodurch die Energie aller folgenden Photonen nicht in photochemische Energie umgewandelt werden kann und als Fluoreszenz wieder abgegeben wird (F_M bzw. F'_M). Dieser Fluoreszenzwert ist die maximale Fluoreszenz (F_M), die das untersuchende Gewebe abgeben kann und spiegelt gleichzeitig die Anzahl der vorhandenen PSII-Systeme wider (Formel 5; Kitajima and Butler 1975). Sofort nach Sättigungspuls wird das Blatt mit Rotlicht (Aktivierungslicht; *engl. activation light*) bestrahlt, welches hauptsächlich das PSI aktiviert. Dadurch werden die zuvor angeregten Elektronen zwischen PSII und PSI weitergegeben, wodurch PSII wieder in den offenen Status zurückkehrten (F_0 bzw. F'_0).

Durch längere Bestrahlung des Gewebes mit aktinischem Licht entsteht ein Protonengradient über die Thylakoidmembran, während gleichzeitig Xanthophyll und Zeaxanthin gebildet werden. Diese Faktoren begünstigen signifikant die nicht-photochemische Löschung der Fluoreszenz. Die entstandene nicht-photochemische Energie kann aus einem abermaligen

kurzen Sättigungslichtimpuls errechnet werden (NPQ, Formel 7). Die weiterhin offenen PSII emittieren durch einen erneuten Sättigungspuls Fluoreszenz, wodurch ein weiterer lokaler Spitzenwert entsteht (F'_M), der alle momentanen offenen PSII angibt. Da durch F_M die maximal-vorhandene PSII-Menge anfänglich ermittelt wurde, zeigt die Differenz $F_M - F'_M$ die Menge der nicht-photochemisch genutzten Energie an (Bilger and Björkman 1990). Gleichzeitig kann durch weitere Sättigungspulse während einer längeren Belichtung auch die Effektivität $Y(II)$ des PSII gemessen werden, da das Fluoreszenzmaximum auch die theoretisch noch vorhandenen, aber nicht genutzten PSII des Gewebes anzeigt (Formel 6; Genty et al. 1989; Maxwell and Johnson 2000; Blankenship 2002).

Formel 5: Kitajima and Butler (1975)

$$\frac{F_v}{F_M} = \frac{F_M - F_0}{F_M}$$

Formel 6: Genty et al. (1989)

$$Y(II) = \frac{F'_M - F'}{F'_M}$$

Formel 7: Bilger and Björkman (1990)

$$NPQ = \frac{F_M}{F'_M} - 1$$

In dieser Arbeit wurden *Nicotiana benthamiana*, wie unter Kap. 2.3.2 beschrieben, infiltriert und vor der Messung 30 Minuten im Dunkeln adaptiert. Anschließend wurden die infiltrierten Blätter (pro Pflanze zwei Stück) abgetrennt, pro Blatt je 3 Regionen willkürlich gewählt und mittels vorgegebenem Sättigungspuls-Protokoll der Imaging-PAM (ImagingWinv2.41a ausgestattet mit der AVT 033(MAXI) Kamera; Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) vermessen. Das Messlicht betrug 20 PAR (*engl. Photosynthetically Active Radiation*; dt.: Photosynthetisch aktive Strahlung) und war zu schwach, um ein Schließen des PSII zu induzieren, während das aktinische Licht mit seinen 185 PAR dagegen die Photosyntheseaktivität anregen konnte. Der Sättigungspuls besaß die maximal erzeugbare Intensität (Pfündel 2007).

Da sich Y(II) (Formel 6) und NPQ (Formel 7) immer auf die anfangs vorhandenen PSII-Systeme beziehen und demzufolge Rückschlüsse nur auf die Qualität und nicht auf die Quantität möglich sind, wurde für die Auswertung der Daten Formel 5 herangezogen. Für jede gewählte Region eines Blattes wurden $F_v \cdot F_M^{-1}$ für den ersten Sättigungspuls berechnet und gemittelt, um anschließend den Mittelwert und den Standardfehler aller Blätter zu bestimmen. Die danach entstandenen Photographien der Blätter zur Dokumentation ihrer Phänotypen wurden mit einer Digitalkamera (FinePix HS10, Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan) aufgenommen.

2.12. PPase-Hydrolyseaktivitäts-Messung

Eine Methode die Aktivität sowohl der löslichen als auch der membranständigen PPasen zu bestimmen, ist die Erfassung der Hydrolyse-Aktivität von Pyrophosphat in Phosphat. Voraussetzung für diese Messung war zunächst eine Extraktion aller Proteine aus den löslichen Teilen der Zelle bzw. den Membranen und eine Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976), so dass nachfolgend eine exakt definierte Proteinmenge eingesetzt werden konnte. Die Grundlage für die Aktivitätsmessung war die Ermittlung des freiwerdenden Phosphates durch die Hydrolyse. So wurde die PPase zunächst durch Pyrophosphatzugabe aktiviert und nach einer definierten Zeit durch Beigabe von Säure abgestoppt. Durch Natriummolybdat-Gabe (Na_2MoO_4), welches mit freiem Phosphat reagiert und dadurch einen gelben Niederschlag bildet, konnte die Phosphat-Konzentration über die Intensität des gelben Niederschlages und mittels der gleichzeitig generierten Eichkurve quantifiziert werden. Die Hydrolyse-Aktivität ergab sich nun aus der Differenz einer Messung mit und ohne Kaliumchlorid (KCl), welches zum Aktivieren der V-PPase erforderlich ist. Für die Durchführung dieser Messungen wurden die Pflanzen, wie unter Kapitel 2.3 beschrieben, kultiviert und mittels Agrobakterien mit den unterschiedlichen PPase-Konstrukten (NbVHP1, IPP1, Kontrolle) infiltriert. Die behandelten Blätter wurden 48 Stunden nach Infiltration in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Pflanzenmaterial wurde unter ständiger Kühlung in einem Mörser manuell pulverisiert und für die Hydrolyse-Aktivitätsmessungen an die Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg an das Labor von Prof. Dr. Karin Schumacher verschickt. Die weitere Präparation der Proben sowie die Hydrolysemessungen wurden von Meliha Görkem Patir Nebioglu (Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; Mitarbeiterin von Prof. Dr. Karin Schumacher) durchgeführt und ausgewertet.

2.13. Ionen- und Metabolit-Messung

Die Metabolithomöostase bzw. dessen Störung lässt Schlüsse auf das Entwicklungsstadium oder die Zellvitalität der Zellen zu. Daher wurden die transformierten *N. benthamiana* Blätter mittels Ionenaustauschchromatographie (*engl. Ion Exchange Chromatography*; kurz IEC) auf einige ionische und metabolische Bestandteile wie Anionen, Kationen, Zuckermoleküle, Karbonsäuren und Aminosäuren untersucht. Generell ermöglicht die IEC die qualitative und quantitative Messung von geladenen und/oder polaren Teilchen durch deren Bindung an eine stationäre Phase aus Zellulose oder Agarose. Je nach Ladung und Typ der Untersuchungsobjekte wird eine positiv bzw. negativ geladene Chromatographiesäule (die stationäre Phase) gewählt. Während der Äquilibrierung wird die Säule mit austauschbaren Gegen-Ionen durch einen Puffer gesättigt, um diese Gegen-Ionen mit gleichgeladenen Ionen aus der Probe austauschen zu können. Das ungebundene Material wird anschließend ausgewaschen und durch Anpassung der Puffer-Bedingungen die gebundenen Ionen wieder schrittweise mittels eines Eluenten abgelöst und ersetzt. Mit Hilfe der Leitfähigkeit und der Retentionszeit, d.h. der Zeit, die die Ionen zum Durchlaufen der Säule benötigen, lassen sich sowohl die Ionen als auch deren Konzentration bestimmen. Während der Regenerationsphase werden alle restlichen gebundenen Ionen durch eine entsprechende Lösung abgelöst, so dass die Säule für eine erneute Messung bereit ist.

Die *N. benthamiana* Pflanzen für diese Metabolitmessungen wurden, wie unter Kapitel 2.3 beschrieben, kultiviert und mit Agrobakterien mit unterschiedlichen Konstrukten (NbVHP1, NbVHP2, IPP1, Kontrolle) infiltriert, ggf. mit 200 mM NaCl injiziert. Zwei Tage nach Infiltration wurden die behandelten Blattteile in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in diesem Zustand manuell gemörsert. Die nachfolgende Verarbeitung der Proben und deren Messung erfolgte im Labor für Pflanzenphysiologie an der Technischen Universität Kaiserslautern in Zusammenarbeit mit den dortigen Mitarbeitern von Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus. Dabei wurden 100 mg des gemörserten Pflanzenmaterials in 1 ml doppeltdestilliertem Wasser gelöst und durch stufenweises Erhitzen bis maximal 210 °C (MLS-Ethos Mikrowellen Ofen, MLS GmbH, Leutkirch, Deutschland) mit 5 ml HNO₃ (60% v/v) und 2 ml H₂O₂ (30 % v/v) (auf 12 ml mit doppelt -destilliertem Wasser aufgefüllt) komplett hydrolysiert. Die Messung der Metabolite am Chromatograph (761 Compact IC mit Suppressor, Metrohm-Schweiz, Herisau, Schweiz) fand unter den in Tabelle 4 angegebenen Bedingungen statt und wurde mit Hilfe der dortigen Mitarbeitern durchgeführt (Graus et al. 2018).

Für die Auswertung der Daten wurde die ermittelte Massenkonzentration über die molare Masse des Ions auf das zuvor eingesetzte Frischgewicht umgerechnet (Formel 8).

Tabelle 4: IEC-Messbedingungen nach Ionenart

Ion	Säulentyp	Eluent	Flussrate	Gegen-Ion
Anionen	METROSEP A Supp. 250/4.0 und Vorsäule	1,8 mM Na ₂ CO ₃ + 1,7 mM NaHCO ₃	1 ml/min	50 mM H ₂ SO ₄
Kationen	METROSEP C4 150 und C4 Guard/4.0	Salpetersäure (c = 1 mol/L) 3,4 mL/2L 1,7 mmol/L Dipicolinsäure-Eluent Dipicolinsäure 234 mg/2 L 0,7 mmol/L	1 ml/min	
Karbonsäuren	METROSEP organic Acids 250/7 und Vorsäule	0,175mM H ₂ SO ₄	0,6 ml/min	10 mM LiCl
Aminosäuren	Macherey Nagel NUCLEODUR® 100-5 C18 ec 4,6 mm ID Länge 250mm	100 mM NaAcetat + 7 mM Tris-HCL ph 5,5	1 ml/min	
Zucker	Metrosep Carb 2 - 250/4.0. mit Vorsäule	100 mM NaOH	0,6 ml/min	10 mM NaAcetat

Die METROSEP-Säulen stammten von Metrohm-Schweiz (Herisau, Schweiz), und die Aminosäuren-Säule von MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland).

Formel 8: Berechnung der Ionen-Konzentration auf das Frischgewicht

$(X [mg/L] * Y [g/mol]) * 10 = Z [\mu mol/g FW]$ <p>X: gemessene Konzentration Y: Molare Masse des Ions Z: Konzentration des Ions auf das Frischgewicht (FW) Mittels des Faktor 10, wird die eingesetzte Probenmenge von 100 mg berücksichtigt.</p>
--

3. Ergebnisse

3.1. Strategie und Übersicht der elektrophysiologischen und physiologischen Herangehensweise der V-PPase-Untersuchungen

Die Charakterisierung von Membranproteinen gestaltet sich in elektrophysiologischer Hinsicht je nach Typ und Ursprungsmembran unterschiedlich anspruchsvoll. Grundsätzlich gilt, dass Membranproteine, die keine geladenen Teilchen transportieren, auch nicht elektrophysiologisch vermessen werden können. Iontentransportierende Proteine der Zellmembran können in der Regel mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik in der stabilen und leicht zugänglichen Oozytenmembran von *Xenopus laevis* untersucht werden (Geiger et al. 2011; Hedrich 2012; Meyer et al. 2010; Nieberl et al. 2017). Hingegen lassen sich Proteine der Vakuolenmembran nur in Ausnahmefällen in die Oozytenmembran einbauen. Für die elektrophysiologische Vermessung der Membranproteine der Vakuole wird daher oft die *Patch-Clamp*-Technik (Kap. 2.7) herangezogen (Jung et al. 2015; Rienmüller et al. 2012; Schulz et al. 2011). Wie bereits unter Kapitel 2.7 beschrieben, wurde auf Grund der geringen Protonentransportrate der V-PPasen der Summenstrom der gesamten Vakuolenmembran der Tabakmesophyllkvakuolen herangezogen.

Die hier untersuchten V-PPasen generieren allerdings selbst im *Whole-Vacuole*-Modus nur einen geringen Strom von ca. $20 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ (Hedrich et al. 1989; Nakanishi et al. 2003), der für eine genauere Charakterisierung des Proteins nicht ausreicht. Die Lösung dieses Problems war eine Verbesserung der Stromauflösung über eine gesteigerte V-PPase-Proteinmenge in der Membran, was einen erhöhten PP_i -induzierten Summenstrom zur Folge hätte. Für eine solche Behandlung bot sich *Nicotiana benthamiana* an, eine für transiente Überexpression bekannte und einfach transformierbare Pflanze (Goodin et al. 2008). Die exakte Identifikation transient transformierter Zellen war eine Voraussetzung für die Anwedung der *Patch-Clamp*-Technik und stellte eine weitere Hürde dar, da V-PPasen nach dem Wissensstand von 2012 nicht ohne Funktionsverlust mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden konnten. Um dennoch die Expression ohne Funktionsverlust des Pump-Proteins zu visualisieren wurde GFP nicht direkt an die Pumpe fusioniert, sondern simultan freies GFP unter der Kontrolle eines separaten Promotors im gleichen Expressionsvektor exprimiert. Die erstellten Konstrukte bildeten die Basis der Versuche dieser Arbeit. Die unerwarteten Auswirkungen dieser V-PPase-Konstrukte auf die Vitalität der transformierten *N. benthamiana* Blätter sorgten für weitreichende physiologische Untersuchungen. Zusätzlich zur *Patch-Clamp*-Technik, der quantitativen PCR,

der Metabolitbestimmung, als auch der *in vivo* pH- und Membranpotentialanalyse wurde eine unkonventionelle Salzapplikationsmethode entwickelt, um dem Ursprung dieses neuentdeckten Phänomens nach zu gehen.

3.2. Identifikation und Expressionnachweis von *NbVHP1* und *NbVHP2*

Die Sequenz der V-PPase von *A. thaliana* (*AtVHP1*) war bereits seit einigen Jahren bekannt und erfolgreich kloniert worden (Bao et al. 2009; Duan et al. 2007; Gaxiola et al. 2001; Park et al. 2005; Pasapula et al. 2011; Sarafian et al. 1992; Zhao et al. 2006). Für die transiente Transformation und der anschließenden elektrophysiologischen Charakterisierung bot sich der Wechsel des Untersuchungsobjektes von *A. thaliana* zu *N. benthamiana* an. Eine Transformation der *N. benthamiana* Mesophyllzellen mit *AtVHP1* hätte allerdings zur Folge gehabt, dass die gemessenen Stromantworten sowohl von *AtVHP1* als auch von den endogenen V-PPasen stammten. Je höher jedoch die Anzahl der beteiligten V-PPase-Varianten wäre, desto schwieriger könnten Aussagen über die ermittelten Daten gemacht werden. Aus diesem Grund wurde auf *AtVHP1* bei den Versuchen weitestgehend verzichtet und nur zu Vergleichszwecken herangezogen.

Zur Identifikation der V-PPase-Genomsequenz von *N. benthamiana* wurde zu Beginn zunächst das gesamte Genom von *N. benthamiana* auf die V-PPase-Gene abgesucht und anschließend deren Expression abgeklärt. Auf Basis des bis dato (2012) bereits sequenzierten Genoms von *N. benthamiana* und der bekannten DNA-Sequenz von *AtVHP1* wurden acht Gene als möglicherweise V-PPasen kodierend ermittelt:

NbS00030505g0009.1;	NbS00009733g0024.1;
NbS00040188g0002.1;	NbS00059018g0004.1;
NbS00005939g0108.1;	NbS00025104g0012.1;
NbS00024485g0009.1;	NbS00056299g0007.1.

Ausschließlich mit dieser Genomanalyse konnte allerdings keine Aussage über mögliche Pseudogene oder das Expressionsgewebe gemacht werden. Erst nach anschließendem Abgleich mit RNA-Sequenzdaten von *N. benthamiana* kristallisierten sich zwei Gene (*NbVHP1*: NbS00030505g0009.1; *NbVHP2*: NbS00040188g0002.1) heraus, die mit hoher Wahrscheinlichkeit im Blattgewebe von *N. benthamiana* transkribiert werden. Diese bioinformatische Arbeit wurde von Dr. Felix Bemm (damals: Lehrstuhl für Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg) übernommen.

Ein nachfolgender Vergleich auf Basis der Aminosäuren-Sequenzen zeigte eine 91%ige Übereinstimmung der endogenen NbVHPs untereinander und eine 88-91%ige Übereinstimmung mit den bereits bekannten V-PPasen von *Arabidopsis thaliana* (AtVHP1) und *Vigna radiata* (VrVHP) (Tabelle 5). Bei einem direkten Vergleich der essenziell wichtigen Aminosäuren der V-PPase für das hydrophobe Tor, den Protonen-Transport, die Substrat-Bindung (Mg^{2+} , K^+ , PP_i) als auch für das Salzbrücken interagierendes Netzwerk (Lin et al. 2012) waren alle vier verglichenen V-PPasen absolut identisch (Abbildung 16). Auch die Ubiquitinierungs- und Sumoylierungsstellen stimmten in den vier V-PPasen überein (Pizzio et al. 2017). Auf der Ebene der Aminosäuresequenz konnte somit die Identität der NbVHP1 und NbVHP2 als vakuoläre PPasen in *N. benthamiana* bestätigt werden.

Tabelle 5: Prozentuale Übereinstimmung der V-PPase-Aminosäuresequenzen

		NbVHP2
	NbVHP1	91 %
AtVHP1	88 %	90 %
VrVHP	91 %	91 %

Nach der theoretischen Identifikation der *NbVHP1*- und *NbVHP2*-Gene wurde das tatsächliche Expressionslevel der beiden Gene in isolierten Mesophyllzellen aus *N. benthamiana* mit quantitative PCR bestimmt (Abbildung 17). Dieses Ergebnis bestätigte die Expression von *NbVHP1* und *NbVHP2* im Blattgewebe bzw. in dem für die kommenden Versuche bevorzugten Mesophyllgewebe. Auffällig ist der verhältnismäßig geringe, aber dennoch signifikante Expressionsunterschied der beiden V-PPasen von ca. 253 Molekülen pro 10.000 Aktinmolekülen, was offenbar auf eine getrennte Expressionkontrolle der Pflanze hinweist.

NbVHP1	1	-mgaql	l	s	d	l	g	t	e	l	l	p	v	c	a	v	g	l	a	f	s	l	f	q	w	l	v	s	k	v	t	l	s	a	e	k	s	-	-	s	g	a	a	d	-	d	l	n	g	y	a	a	e	s	l	e	e	e	e	g	i	n	d	h	s	v	v	g	c	a	e	i	q	n	a	i	s	e	g	a	t	s	f	l	f	t	e	y	q	y	v	g	v	f	m	v	a	f	a	i	105
NbVHP2	1	-mgaal	l	p	d	l	g	t	e	l	l	p	v	c	a	v	g	l	a	f	s	l	f	q	w	l	v	s	k	v	t	l	s	a	e	k	s	-	-	s	p	s	n	n	g	-	g	y	-	g	d	l	e	e	e	e	g	i	n	d	q	n	v	v	c	a	e	i	q	n	a	i	s	e	g	a	t	s	f	l	f	t	e	y	q	y	v	g	v	f	m	v	a	f	a	i	104				
AtVHP1	1	m	v	a	p	l	p	e	l	w	t	e	l	v	p	c	a	v	g	l	a	f	s	l	f	q	w	l	v	s	k	v	t	l	s	a	e	k	s	-	-	s	g	a	a	d	-	g	-	g	d	l	e	e	e	e	g	i	n	d	q	s	v	v	a	c	a	e	i	q	n	a	i	s	e	g	a	t	s	f	l	f	t	e	y	q	y	v	g	v	f	m	v	a	f	a	i	109			
VrVHP	1	-mgaal	l	p	d	l	g	t	e	l	l	p	v	c	a	v	g	l	a	f	s	l	f	q	w	l	v	s	k	v	t	l	s	a	e	k	s	-	-	s	p	n	a	a	-	g	-	n	g	-	n	d	l	e	e	e	e	g	i	n	d	h	n	v	v	c	a	e	i	q	n	a	i	s	e	g	a	t	s	f	l	f	t	e	y	q	y	v	g	v	f	m	v	a	f	a	i	105			

Abbildung 16: Vergleich der V-PPase-Aminosäuresequenzen

Bestimmung der Homologie der endogenen NbVHP1 und NbVHP2 (*Nicotiana benthamiana*) mit AtVHP (*Arabidopsis thaliana*) und VrVHP (*Vigna radiata*) mittels Proteinsequenzvergleich. Die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuren wurden farbig markiert (>80 % blau, >60 % hell blau, >40 % hell grau, = 0% weiß): Konservierte Aminosäuren (nach Lin et al. 2012) wurden gesondert hervorgehoben: orange: Hydrophobes Tor; dunkelblau: Protonen-Transport; grün: Substrat Bindung (Mg, K, PP_i); violett: Salzbrücken-interagierendes Netzwerk. Mögliche Aminosäuren zur Ubiquitinierung oder Sumoylierung nach Pizzio et al. (2017) wurden rot markiert. (Clustal Omega; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

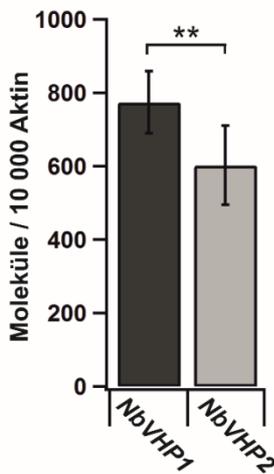


Abbildung 17: Expressionsnachweis endogener V-PPasen in *Nicotiana benthamiana* Mesophyllzellen

Transkriptmenge von NbVHP1 und NbVHP2 in isolierten Mesophyllzellen von 4-6 Wochen alten unbehandelten *N. benthamiana* Pflanzen. Die Transkriptmenge wurde auf die entsprechende Aktinexpression normiert. (n = 4 unabhängige Experimente; Mittelwert ±SE; **, P < 0.01, Student's t-Test)

3.3. Transiente PPase-Überexpression in *Nicotiana benthamiana* Blättern

Die erfolgreiche Identifikation und Expression zweier vakuolärer PPasen und der Nachweis von deren Expression im Mesophyllgewebe von *N. benthamiana* (Kap. 3.2) war der erste Schritt zur Generierung transienter V-PPase-überexpimierender Zellen. In einem nächsten Schritt wurde zum Erlangen der vollständigen DNA-Sequenz der beiden putativen Pumpen zunächst mittels reverser Transkriptase die gesamte isolierte mRNA des Blattes in cDNA umgewandelt

(Kap. 2.4.3), wodurch genomische (Intron-beinhaltende) Sequenzen von vornherein vermieden wurden. Mit Hilfe spezifischer Primer und mehrerer PCRs wurden aus der gesamten cDNA die gewünschten NbVHP-Sequenzen extrahiert und in entsprechende bivalente Vektoren (pCambia2300) eingefügt (Kap. 2.2.3). Neben diesen beiden NbVHP-Sequenzen wurden zusätzlich noch zwei weitere PPasen für Vergleichsstudien herangezogen: (1) Als Kontrolle für eine bereits bekannte und zum Teil charakterisierte V-PPase wurde die cDNA-Sequenzen von *AtVHP1*³ in pCambia2300 integriert. (2) Zur Bestimmung der Effekte, die auf die Hydrolyseaktivität der PPasen zurückzuführen sind, wurde eine lösliche PPase, *IPPI*⁴, aus *Saccharomyces cerevisiae* ebenfalls in den bivalenten Vektor eingebaut. Zur Transformationskontrolle diente eine GFP-DNA-Sequenz auf dem Vektor pCambia2300. Als Kontrollkonstrukt fungierte der Vektor, welcher ausschließlich die GFP-Sequenz aber keine PPase-Sequenz beinhaltetete, um mögliche Transformationseffekte von PPase-Auswirkungen zu differenzieren. Der Gentransfer in *N. benthamiana* Pflanzen erfolgte durch Injektion transformierter Agrobakterien direkt durch die Stomata der Blattunterseite in das Mesophyll-Gewebe (Kap. 2.3).

3.3.1. Fluoreszenznachweis transient transformierter Mesophyllzellen

Das standardisiert Markieren der V-PPasen am C- oder N-terminus mit GFP führt zu unerwünschten Effekten wie Delokalisation und Funktionsverlust (Segami et al. 2014). Während der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit gelang es Segami et al. (2014) jedoch ein Markierungsverfahren von V-PPasen ohne diese negativen Nebeneffekte zu etablieren. Neben Gewebeexpressionsanalysen konnte Segami et al. (2014) auch zum ersten Mal den Einbau von AtVHP1 im Tonoplasten visuell bestätigen. Diese Vorgehensweise von Segami et al. (2014) wurde mit NbVHP1 wiederholt, um dessen Lokalisation im Protoplasten zu bestimmen. Hierzu wurde zunächst eGFP (enhanced GFP), welches dimerartige Strukturen bilden kann, mittels Punktmutation zu mGFP (monomeres GFP) umgewandelt. Mit Hilfe des Aminosäuresequenzvergleiches (Abbildung 16) konnte der erste cytosolische Loop von NbVHP1 identifiziert und das mGFP mit Linkersequenz (Abbildung 7) eingefügt werden. Das gesamte Konstrukt wurde in den Vektor „pCambia2300“ übertragen und mit Hilfe der

³ von Prof. Dr. Karin Schumacher Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, freundlicherweise zur Verfügung gestellt

⁴ von Dr. Ali Ferjani, Tokyo Gakugei University, Koganei, freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Agrobakterientransformation in *Nicotiana benthamiana* Blättern exprimiert (Kap. 2.3). Zwei bis drei Tage nach Transformation war die Fluoreszenzaktivität in den Zellen zu beobachten (Abbildung 18 und Abbildung 19) und damit die Expression des Konstruktes bewiesen. Die Membranlokalisierung von NbVHP1-mGFP erfolgte 48-72 h nach Infiltration der Bakterien an isolierten Mesophyllzellen. Für die Co-Lokalisationsstudien wurden die Zellen mit dem Membranmarker FM4-64 für kurze Zeit inkubiert und unter dem LSM betrachtet. Der Einsatz von FM4-64 bewirkte dabei eine rotfluoreszierende Markierung der Plasmamembran. Bei der Überlagerung der GFP- und FM4-64-Fluoreszenz konnte ein Abweichen der rot- und grünfluoreszierenden Bereiche festgestellt (Abbildung 18A oben rechts Pfeil) und damit eine Lokalisation von NbVHP1-mGFP in der Plasmamembran ausgeschlossen werden. Nach Lyse der transformierten Protoplasten konnte die GFP-Fluoreszenz in der Membran freigesetzter Vakuolen nachgewiesen werden (Abbildung 18).

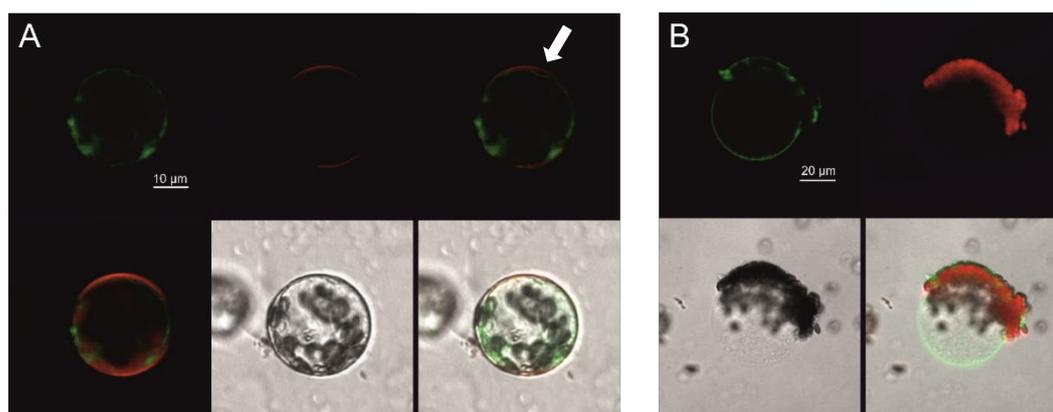


Abbildung 18: NbVHP1-mGFP Fluoreszenz in *N. benthamiana* Mesophyllzellen

Konfokale Laserscanning-Mikroskopie-Bilder von einem transformierten Mesophyllprotoplasten (A) bzw. transformierter Mesophyllvakuole (B) 48-72 h nach Infiltration mit NbVHP1-mGFP (monomeres Grün Fluoreszierendes Protein). (A) Dargestellt ist: oben links: mGFP; oben Mitte: FM4-64; oben rechts: Überlagerung von mGFP und FM4-64; unten links: Überlagerung von mGFP, FM4-64 und der Autofluoreszenz der Chloroplasten; unten Mitte: Durchlicht; unten rechts: Überlagerung von mGFP, FM4-64, Durchlicht und Autofluoreszenz der Chloroplasten. Es ist dabei keine Co-Lokalisation von NbVHP1-mGFP und FM4-64 festzustellen (siehe Pfeil). (B) Abgebildet ist: oben links: mGFP; oben rechts: Autofluoreszenz der Chloroplasten; unten links: Durchlicht; unten rechts: Überlagerung der drei Aufnahmen.

Eine erfolgreiche Lokalisation von NbVHP1-mGFP in der Vakuolenmembran schließt einen Einfluss des GFPs auf die Funktion nicht aus. Für die *Patch-Clamp*-Technik war eine eindeutige Identifikation transformierter Zellen ohne Funktionsverlust der transformierten PPasen allerdings Voraussetzung. Die Konstruktion eines pCambia2300-Vektors, der die Expression einer PPase-DNA-Sequenz unter dem UBQ10-Promotor und der gleichzeitig eine separate Expression der *eGFP*-DNA-Sequenz unter dem zweifachen 35s-Promotor ermöglichte, erlaubte eine Transformationskontrolle der Zellen ohne eine Beeinflussung der

PPase-Aktivität (Kap. 2.2.2). Diese Konstellation wurde für NbVHP1, NbVHP2, AtVHP1 und IPP1 generiert, während als Kontrolle der Vektor ohne PPase, aber mit freiem eGFP diente. Wie bereits oben beschrieben wurden mittels Agrobakterientransformation die *Nicotiana benthamiana* Blätter transformiert und die Expression 2-3 Tage nach Infiltration durch die GFP-Fluoreszenz bestätigt (Abbildung 19).

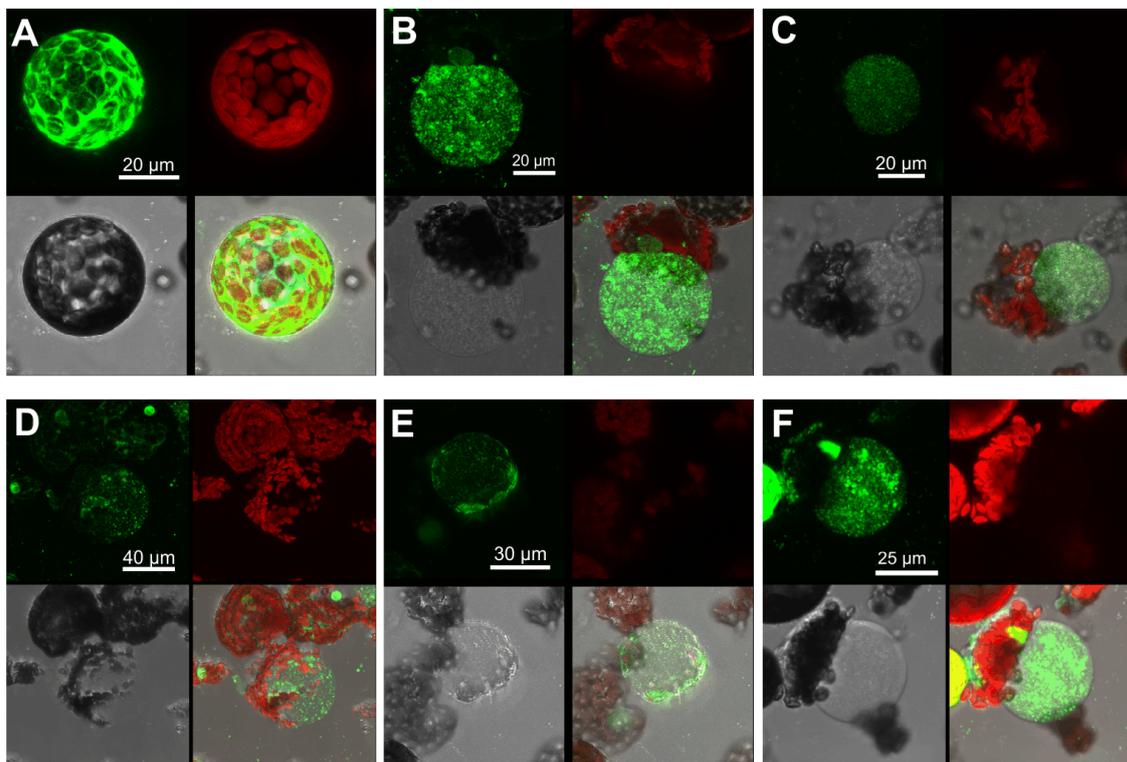


Abbildung 19: Freie GFP-Fluoreszenz in *N. benthamiana* Mesophyllzellen

Konfokale Laserscanning-Mikroskopie-Bilder von einem transformierten Mesophyllprotoplasten (A) bzw. transformierten Mesophyllvakuolen (B-F) 48-72 h nach Infiltration mit einer PPase und freiem GFP (Grün Fluoreszierendes Protein). Neben der Fluoreszenz des freien GFPs in grün (jeweils oben links) wird auch die Autofluoreszenz der Chloroplasten in rot (jeweils oben rechts), das Durchlicht (jeweils unten links) sowie die Überlagerung der drei Aufnahmen (jeweils unten rechts) für jedes Bild dargestellt. (A) NbVHP1-Protoplast (B) NbVHP1-Vakuole (C) NbVHP2-Vakuole, (D) AtVHP1-Vakuole, (E) IPP1-Vakuole, (F) Kontroll-Vakuole.

Da neben jedem PPase-Konstrukt zusätzlich das freie GFP auf dieselbe Weise in den Zellen exprimiert wurde, wurde die Fluoreszenz bei allen Konstrukten an den gleichen Stellen lokalisiert (Abbildung 19), was nachfolgend nur einmal universal beschrieben wird: Infolge der GFP-Expression unter der Kontrolle des doppelten 35s-Promotors wurde sehr starke Fluoreszenz in den Zellen wahrgenommen. Im Protoplasten konnte die GFP-Fluoreszenz im Zwischenraum der Chloroplasten (durch deren Autofluoreszenz leicht erkennbar), aber nicht im Inneren der Vakuole detektiert werden, was darauf hindeutet, dass das GFP im Cytosol vorlag (Abbildung 19A). Durch anheftende Chloroplasten konnten die isolierten Vakuolen identifiziert werden, welche trotz des freien GFPs eine grüne punktuelle Fluoreszenz aufwiesen.

Da keine exakte Untersuchung des eGFPs an der Vakuolenmembran durchgeführt wurde, und es sich auch durchaus um rudimentäre cytosolische Reste an der Vakuole handeln könnte, kann hier keine Aussage über die subzelluläre Lokalisation des eGFPs getroffen werden. Dennoch konnte auf Basis dieses vakuolären GFP-Fluoreszenzsignals die transformierten Vakuolen für die nachfolgenden *Patch-Clamp*-Experimente erfolgreich und eindeutig identifiziert werden.

3.3.2. Calcium-Abhängigkeit der V-PPasen

Die prinzipielle Durchführbarkeit von *Patch-Clamp*-Messung an transient transformierten *N. benthamiana* Mesophyllvakuolen, wurde bereits von De Angeli et al. (2013) gezeigt. Für eine erfolgreiche Messung von NbVHP1- und NbVHP2-Pumpstromaktivitäten musste dennoch zunächst die Eignung des neu erstellten pCambia2300 Vektors für die geplanten *Patch-Clamp*-Experimente mit Hilfe einer bereits bekannten V-PPase und freiem GFP getestet werden. Aus diesem Grund wurde auf die mehrfach publizierte V-PPase aus *A. thaliana*, AtVHP1, zurückgegriffen, da sowohl deren DNA-Sequenz als auch deren Funktionalität bereits bestätigt waren (Nakanishi et al. 2003; Sarafian et al. 1992). Das AtVHP1-freie-GFP-Konstrukt wurde mittels Agrobakterientransformation in den Mesophyllzellen von *N. benthamiana* exprimiert und 48-72 h danach elektrophysiologisch untersucht. Hierzu wurden aus den enzymatisch gewonnenen Protoplasten die Vakuolen durch einen osmotischen Schock extrahiert und im *Whole-Vacuole*-Modus deren Protonenpumpströme vermessen. Sowohl Bad- als auch Pipettenlösung enthielten 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES/Tris und waren auf pH 7,5 gepuffert. Die identische Zusammensetzung von Bad- und Pipettenlösung und eine Haltespannung von 0 mV an der Membran verhinderte sowohl das Auftreten eines chemischen als auch eines elektrischen Gradienten und damit die Interferenz mit unerwünschten Hintergrundströmen. Die Applikationslösung war in ihrer Basis-Zusammensetzung identisch mit der Badlösung und wurde nur mit 150 μ M KPP_i zusätzlich angereichert. Während der Zugabe der Applikationslösung auf die Vakuole wurden eine positive Stromantwort detektiert, welche durch die Aktivierung der V-PPasen und dem damit verbundenen Protonentransport in das Vakuolenlumen erklärt werden konnte. Eine Unterbrechung der PP_i-Applikation und das Auswaschen von PP_i aus dem Badmedium bewirkte einen Rückgang des Stromniveaus auf das Ausgangslevel und wurde mit dem Beenden der V-PPase-Pumpaktivität in Zusammenhang gebracht. Da die Stromantwort direkt proportional zur Membranoberfläche (entspricht der Membrankapazität C_m) war, wurden die maximal ermittelten Stromwerte auf die Zellgröße normiert und anschließend gemittelt (Kap. 2.7.7). Der Vergleich der maximalen Stromamplituden durch PP_i-Applikation zeigte für die

Kontrollvakuolen einen Stromwert von ca. $0,2 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$, während die AtVHP1-überexprimierten Vakuolen einen 5-fach höhere Pumpstromamplitude von $1 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ erzeugten (Abbildung 20). Diese Stromerhöhung war eine erste Bestätigung sowohl für eine erfolgreiche V-PPase-Protonenstrommessung im Tonoplasten von *N. benthamiana* als auch für eine gelungene V-PPase-Überexpression mit Hilfe des generierten Vektorkonstruktes.

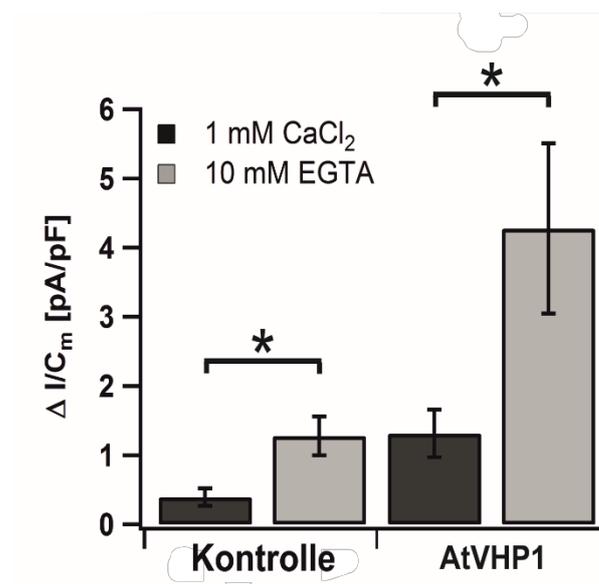


Abbildung 20: Calcium-abhängige V-PPase -Stromantworten

Die PP_i -induzierten Stromantworten wurden von *N. benthamiana* Mesophyllvakuolen 48-72 h nach Infiltration von GFP alleine (Kontrolle) oder AtVHP1 mit freiem GFP (AtVHP1) vermessen. Neben den konstanten Bedingungen von einem symmetrischen pH 7.5 und einer Klemmspannung von 0 mV, wurden jede Vakuole nacheinander mit zwei Applikationslösungen unterschiedlichen Calcium-Gehaltes (1 mM CaCl_2 oder 10 mM EGTA), aber gleicher PP_i -Konzentration (150 μM) umspült. Die Stromamplituden wurden mit der jeweiligen Membrankapazität normiert und statistisch erfasst. Die Bad- und Pipettenlösung enthielt Ca^{2+} (Mittelwert \pm SE; * $P < 0,05$ Student's *t*-Test; AtVHP1 $n = 4$; Kontrolle $n = 3$)

Zur weiteren Bestätigung des molekularen Ursprungs der gemessenen PP_i -induzierten Stromantworten, wurde der inhibitorische Einfluss von cytosolischem Calcium auf die Aktivität der Pumpen untersucht (Maeshima 1991; Drozdowicz et al. 2000). Zu diesem Zweck wurde eine weitere Applikationspipettenlösung hergestellt, die sich durch den Austausch des CaCl_2 mit 10 mM EGTA (ein Chelator für Ca^{2+} -Ionen) von der vorhergehenden Applikationslösung unterschied. Diese Lösungszusammenstellung bewirkte, dass beim Umspülen der Vakuole mit der EGTA-Applikationslösung nominal kein Calcium um die Vakuole vorlag. Wurde nun diese EGTA-Applikationslösung auf die zuvor vermessenen Vakuolen angewendet, stieg die Stromamplitude signifikant um das 4-fache im Vergleich zu den vorangegangenen Messwerten an. Die maximale Stromamplitude für Kontrollvakuolen betrug mit EGTA $1 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$, die der AtVHP1-überexprimierende Vakuolen $4-5 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ (Abbildung 20). Die gezeigte Ca^{2+} -

Empfindlichkeit der AtVHP1-exprimierenden Mesophyllzellen bestätigte ebenfalls, dass der PP_i -induzierte gemessene Strom auf die Pumpaktivität der V-PPasen zurückzuführen ist.

Die calciumabhängigen PP_i -induzierten Stromantworten der AtVHP1-überexprimierenden Vakuolen bewiesen die Eignung des Vektorkonstruktes als auch des *Patch-Clamp*-Messaufbaus für die Untersuchungen der NbVHP1 und NbVHP2 mit der *Patch-Clamp*-Technik.

3.3.3. Funktionalität der V-PPasen in transformierten Mesophyll-Vakuolen

Nach der erfolgreichen Identifikation (Kap. 3.2) der transient transformierten Mesophyllvakuolen von *N. benthamiana* über die freie GFP-Fluoreszenz (Kap. 3.3.1) und deren nachweislichen Verwendbarkeit in *Patch-Clamp*-Experimenten (Kap.3.3.2), stellte sich die Frage, ob auch die exprimierten NbVHPs nicht nur erfolgreich in die Vakuolenmembran eingebaut wurden, sondern auch dort funktionsfähig waren. In Analogie zum Fluoreszenznachweis (Kap. 3.3.2) wurde die Protonenpumpaktivität der exprimierten V-PPasen direkt mit der *Patch-Clamp*-Technik zwei bis drei Tage nach Agrobakterien-Infiltration untersucht. Die bereits verwendeten Messlösungen aus Kapitel 3.3.2 wurden geringfügig abgewandelt, indem die $CaCl_2$ -Konzentration in allen drei Lösung auf 0,1 mM $CaCl_2$ gesenkt wurde. Durch diese Abänderung sollte eine Steigerung der Stromamplitude durch eine geringere V-PPase-Inhibierung ohne den Verlust der membranstabilisierenden Wirkung von Calcium erreicht werden. Alle weiteren experimentellen Abläufe und Einstellungen geschahen wie in Kapitel 3.3.2 bei symmetrischen Lösungsbedingungen und einer Membranhaltspannung von 0 mV. Nach Etablierung der *Whole-Vacuole*-Konfiguration konnte bei Applikation von 150 μ M PP_i ein Anstieg der Stromantwort beobachtet werden, die wie in den *Patch-Clamp*-Versuchen in Kapitel 3.3.2 auf einem Protoneneinstrom in die Vakuole zugeordnet wurde. Einen Stopp der PP_i -Applikation bei gleichzeitigem Anschalten der Badperfusion hatte eine Abnahme des Stromlevels auf den Ausgangszustand zur Folge, was den Rückgang der V-PPase-Aktivität widerspiegelte (Abbildung 21). Zunächst wurde die Pumpaktivität der Kontrollvakuolen von GFP-exprimierenden Mesophyllprotoplasten und damit der endogenen NbVHPs über eine durchschnittliche Stromamplitude von 1 $pA \cdot pF^{-1}$ unter diesen Lösungsbedingungen statistisch erfasst (Abbildung 21). Als Positivkontrolle wurden AtVHP1-überexprimierende Vakuolen herangezogen, deren Funktionalität bereits bestimmt worden war. Die Überexpression der *AtVHP1* in *N. benthamiana* zeigte gegenüber der Kontrolle eine signifikante 3-fache Erhöhung der Stromantwort (ca. 3 $pA \cdot pF^{-1}$) (Abbildung 21). Diese Ergebnisse unterscheiden sich nur wenig von der Stromantwort auf die EGTA-haltige-

Applikationslösung von ca. $4\text{-}5 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ (Abbildung 20). Diese leichte Senkung der V-PPase-Aktivität durch den geringen Einsatz von $0,1 \text{ mM CaCl}_2$ im Badmedium, konnte für eine höhere *Patch*-Stabilität somit akzeptiert werden.

In *Patch-Clamp*-Experimenten mit NbVHP1- bzw. NbVHP2- überexprimierten Vakuolen konnte ebenfalls eine positive Stromantwort auf PP_i beobachtet werden (Abbildung 21). Diese Stromamplitude lag bei ca. $4 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ für beide Protonenpumpen und war damit 4-Mal so hoch wie die von Kontrollvakuolen (ca. $1 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$). Mit diesem Ergebnis wurde nicht nur die Lokalisation der NbVHPs in der Vakuolenmembran mit einer weiteren Technik bestätigt, sondern darüber hinaus auch deren Funktionalität nachgewiesen. Aufgrund dieser Überexpressionsmessung mittels der *Patch-Clamp*-Technik ließ sich sagen, dass eine transiente Überexpression der V-PPase-Gene durch Agrobakterieninjektion erfolgreich war und für weitere Studien der V-PPase angewendet werden konnte. Das Teilziel einen höheren Strom zu generieren und damit das Auflösungsvermögen der Pumpströme zu verbessern, wurde erreicht.

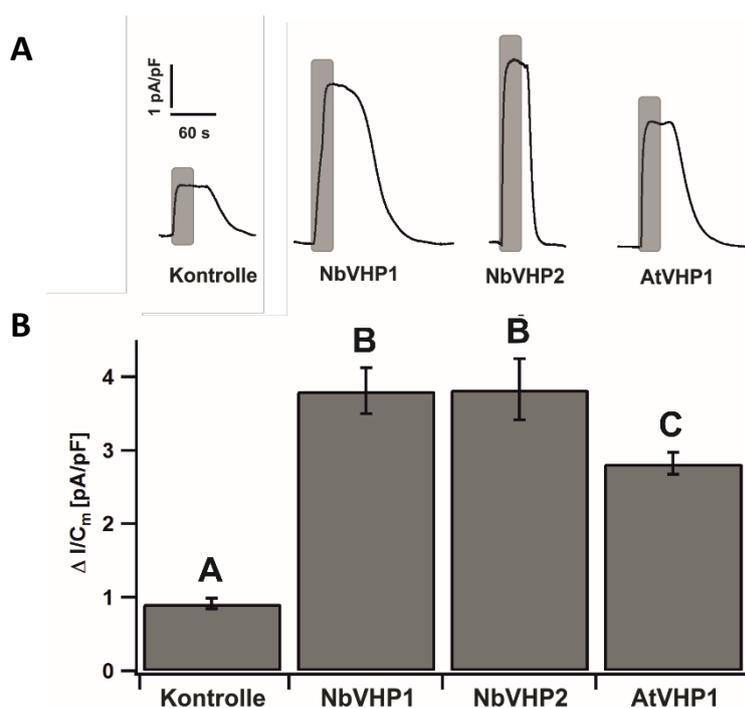


Abbildung 21: PP_i -induzierte Stromantworten transformierter *Nicotiana benthamiana* Mesophyllvakuolen

Die in *Patch-Clamp*-Experimenten erhaltenen Stromantworten von *N. benthamiana* Mesophyllvakuolen auf eine Gabe von $150 \mu\text{M PP}_i$ 48- 72 h nach Überexpression von nur freiem GFP (Kontrolle) oder GFP zusammen mit der jeweiligen V-PPase. Stromaufzeichnungen wurden unter symmetrischen pH 7.5 und einer Klemmspannung von 0 mV durchgeführt. (A) Repräsentative PP_i -induzierte Stromantworten der jeweiligen Konstrukte normiert auf die Membrankapazität. Die grauen Balken spiegeln den Applikationszeitraum für $150 \mu\text{M PP}_i$ wider.

(B) Statistische Auswertung der Stromamplituden normiert auf die Membrankapazität (Mittelwert \pm SE). Die Signifikanzen ($P < 0,05$) wurden mittels *Student's t-Test* ermittelt und durch Buchstaben verdeutlicht. (NbVHP1 n = 14; NbVHP2 n = 4; AtVHP1 n = 20 ; Kontrolle n = 10)

3.3.4. Hydrolyseaktivität der löslichen Zellkompartimente nach Transformation mit verschiedenen PPasen

Vakuoläre PPasen beziehen ihre Protonenpumpenergie aus der Hydrolyse von PP_i zu P_i . Ein durch die Überexpression von V-PPasen Einfluss auf die Zelle Die möglichen intra- und extrazellulären Einflüsse der V-PPase-Überexpression können demzufolge entweder durch eine verstärkte Protonenanreicherung in der Vakuole oder durch die Reduktion des cytosolischen PP_i -Spiegels und der daraus resultierenden Anreicherung von P_i im Cytosol entstehen.

Um in den Folgeexperimenten zwischen diesen beiden möglichen Ursachen differenzieren zu können, wurde auf die lösliche PPase, die IPP1, aus *Saccharomyces cerevisiae* zurückgegriffen. Die IPP1 hydrolysiert, wie die membranständigen PPasen, Pyrophosphat zu Phosphat. Sie ist allerdings im Cytosol lokalisiert und nicht in der Lage Protonen zu pumpen. Aufgrund der fehlenden Protonen-Translokation durch die Membran war eine Überprüfung der IPP1-Aktivität in der transformierten Zelle mittels *Patch-Clamp*-Technik nicht durchführbar. Zu diesem Zweck war ein PPase-Hydrolyseaktivitätstest (Krebs et al. 2010) erforderlich. Für diesen Test wurde Blattgewebe von *N. benthamiana* 48 h nach Transformation schockgefroren, um die gesamten Proteine des Blattes zu konservieren. Der lösliche Anteil der Zellen wurde separiert, eine zuvor definierten Proteinmenge Pyrophosphat hinzugegeben und nach 20 min der Phosphatgehalt mittels eines Farbumschlag ermittelt (Kap. 2.11). Aufgrund der Hydrolyseaktivität der PPasen entspricht dieser Phosphatgehalt der PPase-Aktivität. Bei Überexpression der IPP1 im Blattgewebe erhöhte sich die Hydrolyseaktivität signifikant um das 10-fache sowohl gegenüber der Kontrolle als auch der NbVHP1-Überexprimierer (Abbildung 22). Dieses Ergebnis bestätigt die Funktionalität der heterolog überexprimierten löslichen Pyrophosphatase IPP1 in *N. benthamiana* Zellen. Der vergleichbare Phosphatgehalt der NbVHP1-Proben mit den Kontrollproben weist darauf hin, dass die Überexpression einer vakuolären V-PPase keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der endogenen löslichen PPasen in *N. benthamiana* Mesophyllzellen hat. Ein indirekter Effekt der V-PPase-Überexpression auf die löslichen PPasen der Zellen kann damit ausgeschlossen werden.

Die für diese Experimente notwendige Transformation der Pflanzen, sowie das Einfrieren und Pulverisieren der Blätter wurde von mir durchgeführt, während die Proteinextraktion und die Hydrolyseaktivitätsmessungen von Meliha Görkem Patir Nebioglu (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Schumacher, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) ausgeführt wurden.

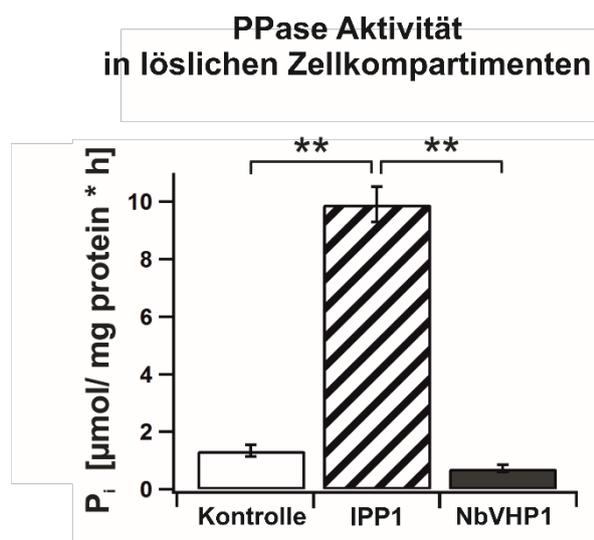


Abbildung 22: IPP1-Aktivität in *Nicotiana benthamiana*
N. benthamiana Blätter wurden entweder mit freiem GFP alleine (Kontrolle) oder mit freiem GFP zusammen mit IPP1 bzw. NbVHP1 transformiert. Die lösliche Fraktion wurde 48 h nach Infiltration auf ihren Phosphatgehalt untersucht, welcher proportional zur PPase-Aktivität ist. (n = 3, Mittelwert ±SE; ** P < 0,01 Student's t-Test)

3.4. Einfluss der NbVHP-Überexpression auf die Zellvitalität

3.4.1. Salzapplikationsvarianten auf *N. benthamiana* Blätter

Der positive Einfluss der V-PPasen auf die Biomasse bzw. Zellgröße und Stresstoleranz bei Pflanzen wurde bereits vermehrt untersucht (vgl. Tabelle 1, Kap.1.3.2). Allerdings waren diese Pflanzen stabil transformiert, weswegen diese Beobachtungen und Messungen ab der Keimung und über einen längeren Zeitraum geschahen. Die Herausforderung in dieser Arbeit bestand darin, in der zur Verfügung stehenden kurzen Zeitspanne von ca. 3-4 Tagen nach Agrobakterien-Infiltration der *Nicotiana benthamiana* Blätter einen Stressfaktor so zu applizieren, dass bei diesen Blättern die physiologischen Auswirkungen der überexprimierten PPasen noch erfasst werden konnten. Die Stressbehandlung durfte allerdings nicht vor der Infiltration starten, um eine Stressanpassung der Wildtyp-Pflanze vor der Transformation auszuschließen. Trockenstress war keine Option, da die Zeitspanne von zwei Tagen zu gering gewesen wäre, um den Pflanzentopf ausreichend austrocknen zu lassen. Für Kältestress musste noch berücksichtigt werden, dass die Agrobakterien zwar selbst bei 4 °C noch in der Lage sind zu wachsen, die Prozesse allerdings wesentlich verlangsamt verlaufen. Für eine erfolgreiche Transformation hätte die Pflanze erst 24 h nach Infiltration der Bakterien in die Kälte gestellt werden können, wodurch sich die Stressapplikation auf nur 24 h verkürzt hätte. Die Wahl fiel daher auf die Stressbehandlung der Tabak-Pflanzen mit Salz, welche zu Testzwecken zunächst auf zwei unterschiedliche Weisen ausgeführt wurde. Nach der

klassischen Variante wurde die Pflanze nach Infiltration mit 200 mM NaCl-Lösung gegossen. Die Erde wurde dabei konstant mit dieser Salzlösung feucht gehalten. Der Natriumgehalt wurde mittels Atomabsorptions-spektrometrie (Kap. 2.8) über 3 Tage hinweg im 3. und 4. von unten inserierenden Blatt vermessen (Abbildung 23). Dadurch konnte der Transport des Natriums in der Pflanze und in den für die Transformation bevorzugten Blättern nachverfolgt werden. Es zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des Natriums, welcher nach 48 h ein Plateau und in beiden Blättern eine vergleichbare Konzentration von ca. $7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$ (*engl. dry weight* = Trockenmasse) erreichte. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass das Salz erst 24 h nach Infiltration der Bakterien in den Blättern ankam und somit das Blatt der Salzbelastung nicht allzu lange (zwischen 24-48 h) vor den geplanten Messungen ausgesetzt sein würde. Für eine längere und damit intensivere Salzbehandlung der Blätter wurde die zweite unkonventionelle Variante entwickelt, bei der 200 mM NaCl-Lösung einmalig direkt über die offenen Stomata in den Apoplasten des Blattes injiziert wurde. Da in späteren Versuchen dies zusammen mit den transformierenden Agrobakterien geschehen sollte, wurde das Salz im Agromix-Medium (Kap. 2.2.5) gelöst. Wie bei dieser Behandlung zu erwarten war, stieg der Natriumgehalt des infiltrierten Blattes sofort an und blieb über die Zeitdauer von 72 h annähernd konstant um einen Wert von $7\text{-}8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$ (Abbildung 23). Die Ergebnisse verdeutlichen zum einen, dass das injizierte Natrium kaum auf andere Blätter verteilt wird, sondern über mehrere Tage im Blattgewebe nahezu konstant verbleibt. Zum anderen wird durch Injektion die gleiche Natrium-Konzentration im Blatt erreicht, wie erst 48 h nach der klassischen Variante. Das bedeutet, dass das Salz vor den Messungen nicht nur 48 h länger im Blatt verweilt, sondern auch noch in vergleichbarer „natürlicher“ Konzentration. Diese Vorteile sprachen für die Salz-Anwendungsmethode nach der unkonventionellen statt der klassischen Variante.

In der klassischen Gieß-Variante wird Natrium über die Wurzeln aufgenommen und über das Leitgewebe in die Blätter transportiert, wo es dann in den Vakuolen eingelagert wird (Wu 2018). Zwar konnte in Abbildung 23 eine vergleichbar ähnliche Natriumkonzentration im Blatt für beide Varianten nachgewiesen werden, aber der Versuchsaufbau verhinderte eine genauere Differenzierung über den Verbleib des Natriums im Blatt. Es war daher nicht vollkommen auszuschließen, dass das Natrium nach Injektion zu einem großen Teil im Apoplasten blieb und von den Zellen nicht aufgenommen wurde und daher keinen oder einen anderen toxischen Effekt auf die Zellen ausübte. Um Hinweise für den Verbleib des injizierten Salzes im Gewebe zu erlangen, wurde der Apoplast nach Infiltration und kurzer

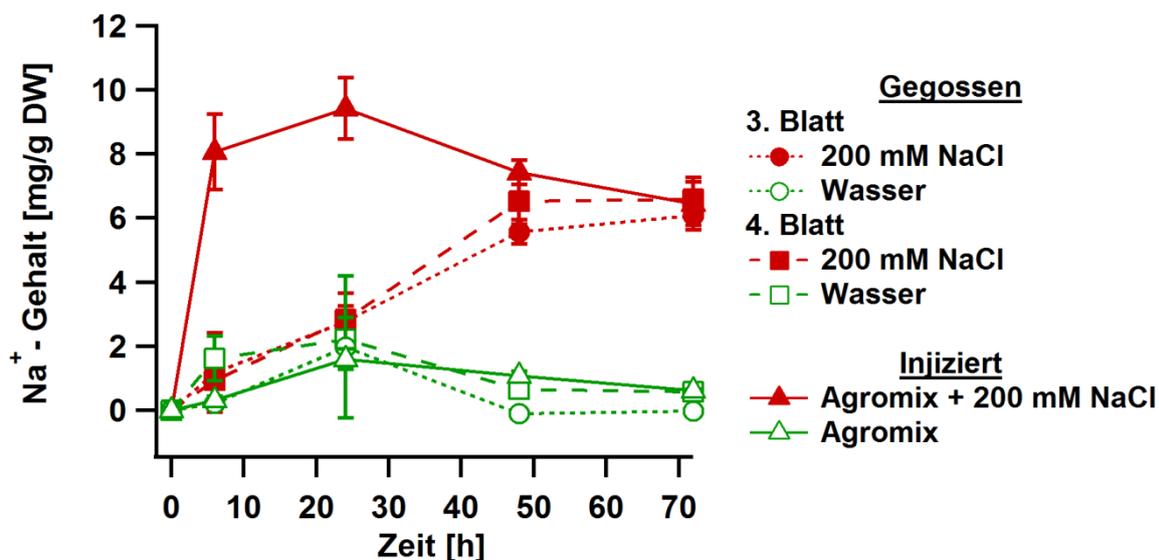


Abbildung 23: Natriumgehalt salzbehandelter *Nicotiana benthamiana* Blätter

Der Natriumgehalt von *N. benthamiana* Wildtyp-Blätter (DW = engl. dry weight; dt. Trockengewicht) wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 200 mM NaCl (rot) oder ohne NaCl (grün) bestimmt. Den Pflanzen wurden entweder eine Agromix-Lösung direkt ins Blatt injiziert (Dreiecke) oder ihre Erde mit Lösung getränkt (= gegossen; Kreis und Quadrat). Der Natriumgehalt des 3. und 4. Blattes (von unten gezählt) wurden getrennt vermessen. Die Natriumkonzentrationen wurden auf den Zeitpunkt „0“ normiert. (Mittelwert \pm SE; n = 3)

Erholung des Blattes (ca. 3-4 h nach Infiltration) mit destilliertem Wasser „ausgespült“ und die Osmolalität des Spülwassers bestimmt (Kap. 2.8). Die Osmolalität des salzinjizierten (Agromix + 200 mM NaCl) Apoplasten unterschied sich höchst signifikant um $30 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ von der Kontrolle (Agromix) (Abbildung 24). Diese Differenz erscheint auf den ersten Blick groß. Es ist allerdings zu bedenken, dass die zuvor injizierte NaCl-Konzentration von 200 mM NaCl $400 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ entspricht und somit ein Verbleiben von $30 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ im Apoplasten eine Aufnahme von $370 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ bzw. 185 mM NaCl in die Blattzellen bedeutet. Unter Berücksichtigung des weitgehend konstant erhöhten Natrium-Gehaltes im Blatt nach Injektion (Abbildung 23) konnte davon ausgegangen werden, dass der größte Teil des Natriums aus dem Apoplasten in die Blattzellen aufgenommen wurde und dort vergleichbare Stressaktionen auslöste wie beim normalen Gießen von Salzlösung.

Da für die weiteren Experimente mit V-PPase-überexprimierenden Pflanzen eine simultane Zugabe der Agrobakterien und des Salzes geplant war, musste zusätzlich noch ein negativer Einfluss des Salzes auf die Vitalität der Agrobakterien und damit auf die Transformationsrate ausgeschlossen werden. Diese Kontrolle geschah visuell über GFP-Expression und dem damit verbundenen Fluoreszenzsignal der transformierten Blattepidermis am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop (CLSM) (Abbildung 25). Anhand der Aufnahmen der transformierten Blätter ließ sich feststellen, dass nahezu die gesamte Epidermis des infiltrierten Bereiches eine GFP-Fluoreszenz (grün) für jedes Konstrukt (NbVHP1, IPP1 und Kontrolle) mit oder ohne 200

mM NaCl aufwies. Lediglich die Schließzellen wurden, wie erwartet, nicht transformiert und enthielten ausschließlich die Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot). Die schwarzen oder unscharfen Bereiche der Epidermis entstanden durch die Unebenheiten des Blattes, welche mit dem CLSM nur schwer oder gar nicht zu erfassen waren.

Da die GFP-Expression direkt auf die erfolgreiche Transformation der Zelle und somit auch auf die Expression der infiltrierten PPase schließen ließ, konnte von einer erfolgreichen Überexpression der PPasen auch unter simultaner Salzbehandlung ausgegangen werden. Aufgrund der hier zuvor beschriebenen Vorteile und der fehlenden Nachteile, wurde in dieser Arbeit diese unkonventionelle Variante zur Standardbehandlung für die Salzapplikation gewählt.

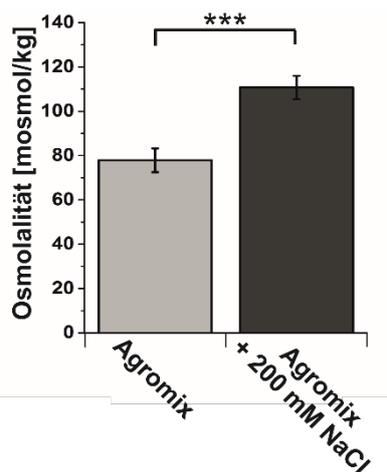


Abbildung 24: Salzurückstände im Appoplasten

Wildtyp *N. benthamiana* Blätter wurden mit Agromix ± 200 mM NaCl injiziert. Nach erfolgter Regeneration des Blattes (i.d.R. nach 3-4 h) wurden die nicht-absorbierten Substanzen durch Waschen des Apoplast mit H₂O gelöst und die Osmolalität dieser Lösung bestimmt. (Mittelwert ± SE; n = 7; ***, P < 0.001, Student's *t*-Test)

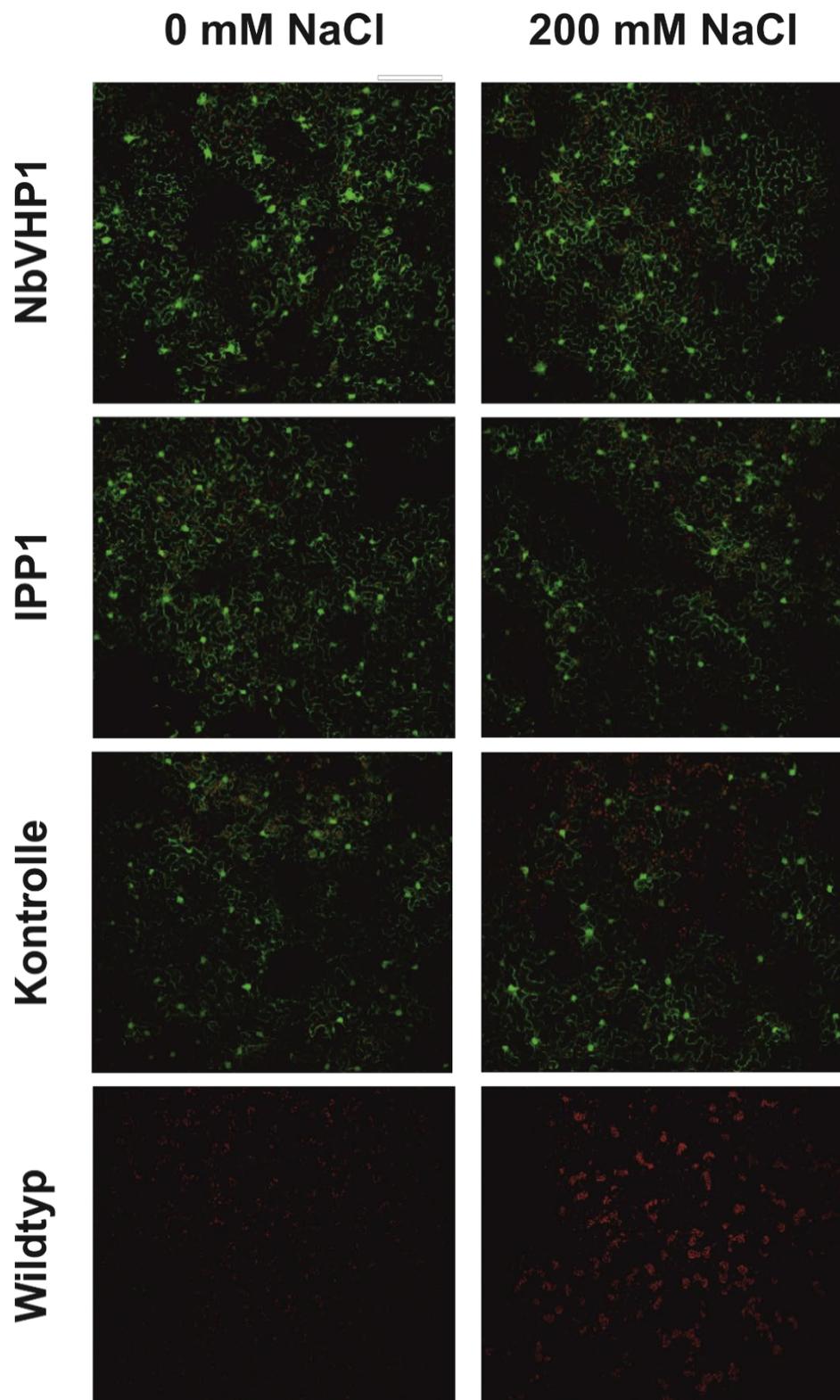


Abbildung 25: Visueller Nachweis der GFP-Expression bei gleichzeitiger Salzapplikation

Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie wurde die Fluoreszenzaktivität der Epidermis von transformierten bzw. untransformierten *N. benthamiana* Blättern visualisiert. Es wurden zum einen NbVHP1 und IPP1 jeweils zusammen mit freiem GFP exprimiert. Kontrolle kennzeichnet die Überexpression von freiem GFP alleine im Blatt, während untransformierte Blätter als Wildtyp angegeben wurden. Das GFP ist in grün und die Autofluoreszenz der Chloroplasten in rot wiedergegeben. Die Fluoreszenz wurde 48 h nach simultaner Infiltration der Agrobakterien \pm 200 mM NaCl kontrolliert. Aufgrund der Unebenheiten der Epidermis konnten einige Bereiche nur unscharf bzw. gar nicht dargestellt werden.

3.4.2. Auswirkung der PPase-Überexpression und der Salzbehandlung auf die Blattvitalität

In der Literatur wird – wie in der Einleitung ausgeführt wurde (Kap.1.3.2) – die stabile Überexpression einer V-PPase mit positiven Effekten für die Pflanze verbunden. Die verbesserte Resistenz gegenüber Trockenheit, Kälte und Salz stehen dabei vermehrt im Fokus der Wissenschaft (Tabelle 1, Kap.1.3.2). Im Gegensatz dazu werden 72 h nach Transformation mit NbVHP1, NbVHP2 und AtVHP1 großflächige nekrotische Blattareale festgestellt, was für großes Erstaunen sorgte. Keine Nekrosen wurden bei den GFP-exprimierenden Kontrollblättern beobachtet. Demzufolge konnte davon ausgegangen werden, dass die Ursache für die Nekrosen nicht an der Agroinfiltrationsmethode, sondern überraschenderweise explizit an der Überexpression der V-PPasen lag. Der Vergleich mit der löslichen PPase (IPP1) gab dabei Rückschlüsse auf den Ursprung dieser Nekrosen. Nach IPP1-Überexpression in den Blattzellen konnten keine Nekrosen beobachtet werden (Abbildung 26). Aufgrund der Tatsache, dass die IPP1 ausschließlich PP_i zu P_i hydrolysieren kann, konnte somit die erhöhte Hydrolyseaktivität als Ursache der Nekrosen ausgeschlossen werden. Es legte stattdessen die Pumpaktivität der V-PPasen als Verursacher dieses Phänomens nahe.

Im Falle der angewandten Salzbehandlung verhielt es sich dagegen umgekehrt. Wenn die Kontrollblätter zusätzlich mit Salz injiziert wurden, dann wurden entgegen der Erwartung einer stressinduzierenden negativen Auswirkung auf die Pflanze optisch keine offensichtlichen Veränderungen in der Vitalität der Blätter beobachtet. Interessanterweise verhinderte das applizierte Salz das Entstehen der Nekrosen bei V-PPase-Überexpression, wodurch sich die V-PPase-Blätter visuell nicht von den Kontroll-Blättern unterschieden (Abbildung 26).

Diese rein optischen Beobachtungen hinsichtlich der Blattvitalität bei Überexpression von PPasen in Gegenwart bzw. Abwesenheit einer Salzbehandlung wurden mittels PAM quantifiziert (Abbildung 27). Hierfür wurde die Menge an vorhandenem PhotosystemII (PSII) gemessen, welche in direkter Relation zu vitalen Zellen steht. Die maximal aktivierbare Menge an PSII wird dabei durch den Quotienten $F_v \cdot F_m^{-1}$ (Kitajima and Butler 1975) wiedergegeben. Dieser Wert lag für Kontroll-Blätter und IPP1-transformierte Blätter mit und ohne Stressbehandlung zwischen 0,72-0,79 und damit im Bereich gesunder Blätter (Demmig et al. 1987; Ings et al. 2013; Juergens et al. 2015).

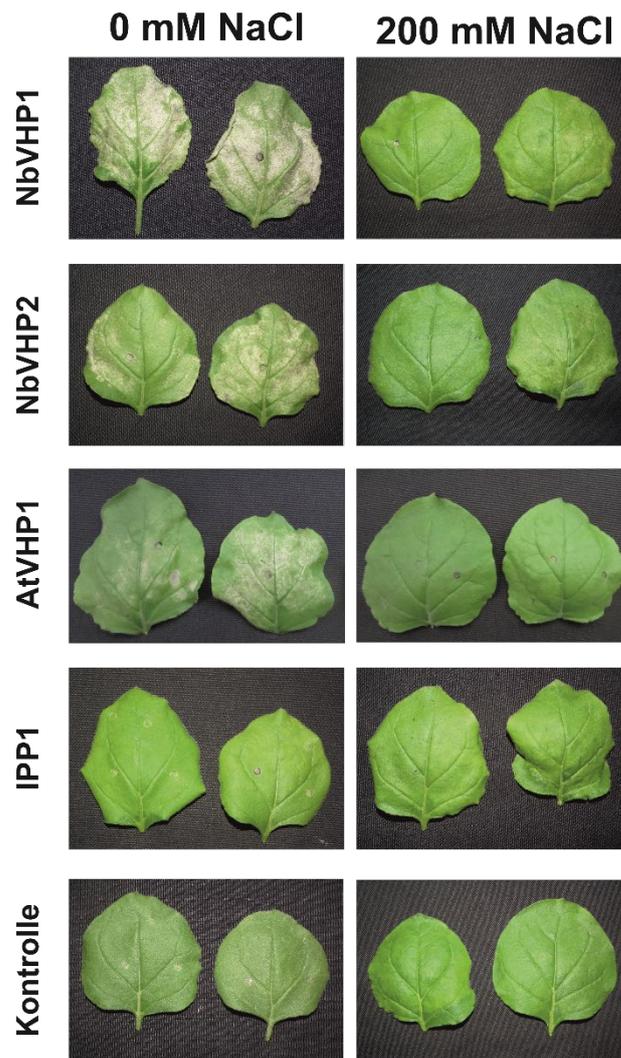


Abbildung 26: Phänotyp transformierter *Nicotiana benthamiana* Blätter

Die Bilder zeigen *N. benthamiana* Blätter 72 h nach Infiltration mit Agrobakterien, die die Zellen mit freiem GFP alleine (Kontrolle) oder mit NbVHP1, NbVHP2, AtVHP1, IPP1 jeweils zusammen mit freiem GFP transformierten. Die Agrobakterien wurden mit 200 mM NaCl-haltiger Agromixlösung oder mit purer Agromix-Lösung infiltriert.

In Einklang mit der rein optischen Beobachtung führte die Transformation der *N. benthamiana* Blätter mit NbVHPs zu einer signifikanten Reduktion der PSII-Mengen im Vergleich zu IPP1- und Kontroll-Blätter. Aber auch die V-PPasen zeigten untereinander einen signifikanten Unterschied von 0,64 bei NbVHP1- und 0,70 bei NbVHP2-transformierten Blättern. Die Salzapplikation sorgte für eine Bewahrung der PSII-Aktivität in den NbVHP-transformierten Blättern auf Kontroll-Niveau.

Die direkte Applikation von 200 mM NaCl in den Apoplasten des Blattes könnte zwei verschiedene Stressfaktoren für die Pflanze darstellen. Zum einen wurde mit der Injektion von Natrium und Chlorid, zwei im Cytosol toxisch wirkende Ionen, verabreicht. Zum anderen

wurde wahrscheinlich über die Injektion von $400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ in den interzellularen Raum des Blattes auch ein osmotischer Stress ausgelöst. Es stellte sich daher die Frage, ob das Ausbleiben von Nekrosen bei V-PPase-transformierten Blätter auf zellulären Entgiftungsmechanismen der toxischen Ionen oder der erhöhten Osmolalität und den damit ausgelösten pflanzlichen Stressantworten zurückzuführen war.

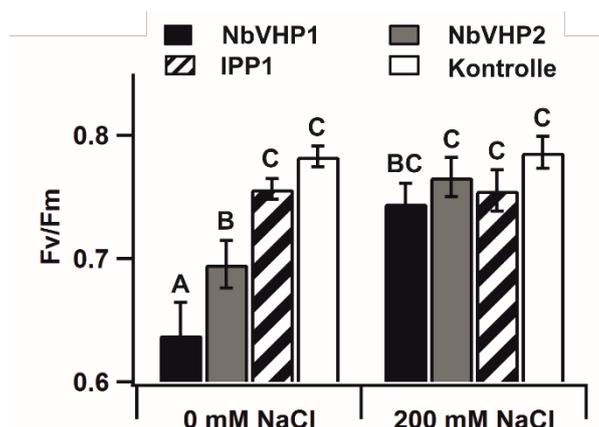


Abbildung 27: Photosystem-II-Gehalt von transformiertem *Nicotiana benthamiana* Blattgewebe

N. benthamiana Blätter wurden mit den Konstrukten NbVHP1, NbVHP2 oder mit freiem GFP alleine (Kontrolle) mit oder ohne 200 mM NaCl transformiert. 72 h nach Infiltration wurden die maximale photochemische Quantenausbeute ($F_v \cdot F_m^{-1}$), was dem Photosystem II-Gehalt entspricht, ermittelt. (Mittelwert \pm SE; $n = 6$; * $< 0,05$). Die Signifikanz ($P < 0,05$) wurden durch den Duncan-Test berechnet und durch Buchstaben verdeutlicht.

Für eine genauere Analyse des Einflusses von 200 mM NaCl im Blatt wurden weitere Blätter mit 200 mM KCl, NaGluconat und KGluconat infiltriert und 72 h später begutachtet (Abbildung 28). Während KCl ein Salz ist, dessen Ionen beide über Ionenkanäle in das Blattinnere transportiert werden können, ist Gluconat nicht in der Lage in das Zellinnere zu gelangen. Das injizierte Gluconat besaß daher eine rein osmotische Wirkung. In Abbildung 28 sind die transformierten Kontroll- und NbVHP1-Blätter im Vergleich aufgeführt. Während KCl die gleiche Wirkung wie NaCl hatte und die Nekrosen bei NbVHP1-transformierten Zellen verhinderte, bewirkte der Einsatz von sowohl Na- als auch KGluconat das vollkommene Absterben bzw. Austrocknen des Blattes. Dieser Effekt trat dabei nicht nur bei den NbVHP1-transformierten Blätter, sondern auch bei Kontroll-Blättern auf. Für den unwahrscheinlichen Fall, dass die mit Gluconat co-injizierten Kationen (Na^+ , K^+) unterschiedlichen Einfluss auf das Blattgewebe gehabt haben sollten, so ging dieser im Gluconateffekt unter. Es war zu beobachten, dass das Blatt sich nicht von der Gluconat-Infiltration erholte und austrocknete, bevor die Nekrosen entstehen konnten.

Nach einer persönlichen Mitteilung von Dr. Kai Konrad (Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik - Botanik I der Universität Würzburg) führten auch Injektionen von TEA-Cl zu einem Austrocknen/Absterben des Blattes. TEA steht für Tetraethylammonium und ist aufgrund seiner positiven Ladung nicht in der Lage biologische Membranen über Diffusion zu passieren. KGluconat und TEA-Cl bewirkten gleichermaßen das Absterben des Blattes, da die osmotische Aktivität der Teilchen durch ihren Verbleib im Apoplasten zu einem Wasserentzug der Zellen führte.

Um ein Vertrocknen der Blätter nach Salz-Infiltration zu vermeiden müssen sie den Wasserverlust möglichst gering und ihren Metabolismus aufrecht halten, indem sie die osmotisch aktiven Stoffe zunächst in das Cytosol und dann in die Vakuole der Blattzellen aufnehmen. Die geringe Osmolalität nach Apoplastenwaschung bei NaCl-Zugabe (Abbildung 24) bestätigte die problemlose Aufnahme von 200 mM NaCl für die Pflanze.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass zwar ein osmotischer Stress durch die NaCl-Injektion bestand, dieser aber zügig durch Abtransport der Ionen aus dem Apoplasten reduziert wurde und in der Folge ein osmotisches Vertrocknen der Blätter verhindert werden konnte. Trotz des identischen Effekts von NaCl und KCl auf die Nekrosen war dieses positive Phänomen nicht auf ein spezifisches Ion zurückzuführen. So könnte die Aufnahme jedes dieser Ionen in die Zelle verantwortlich für die Verhinderung der Nekrosenbildung sein.

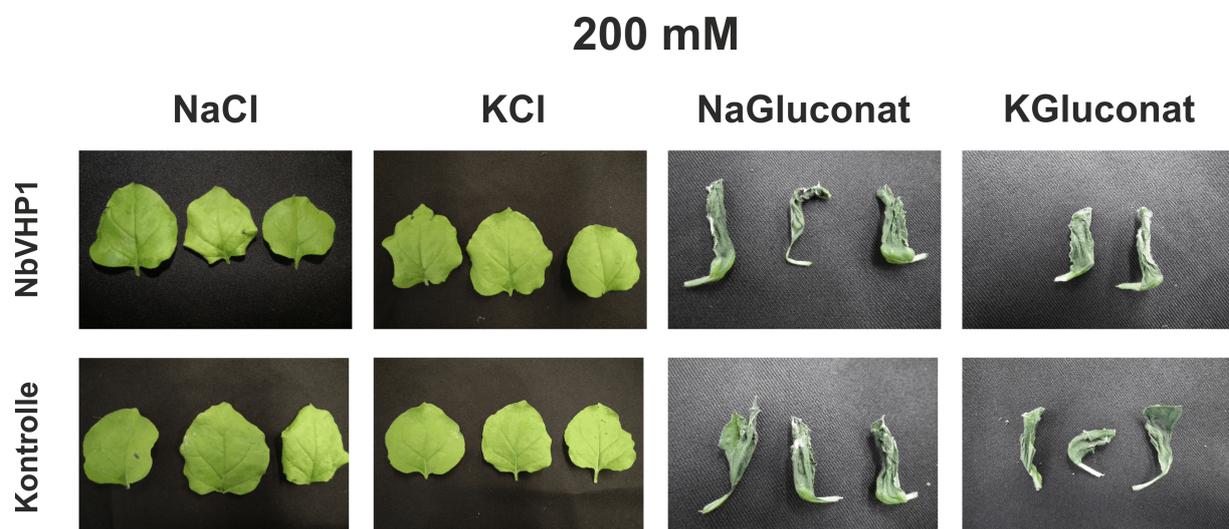


Abbildung 28: Auswirkung der Infiltration unterschiedlicher Salze auf *Nicotiana benthamiana* Blätter
Gezeigt sind *N. benthamiana* Blätter 72 h nach Transformation mit NbVHP1 mit freiem GFP oder mit freiem GFP alleine (Kontrolle). Mit den Konstrukten wurde simultan 200 mM NaCl, KCl, NaGluconat oder KGluconat injiziert.

3.5. Einfluss der V-PPase-Überexpression auf den Stoffwechsel der Zelle

Die erfolgreiche transiente Überexpression der V-PPasen in *N. benthamiana* Blätter zeigte einen gravierenden nekrotischen Effekt auf die Zellen nach 72 Stunden (Abbildung 26). Um die Ursache dieser Nekrosen zu ergründen, wurde der Einfluss der V-PPase in der Zelle sowohl hinsichtlich ihrer Hydrolyseaktivität als auch ihrer Pumaktivität untersucht. Sowohl eine verstärkte Spaltung von Pyrophosphat zu Phosphat als auch ein verstärkter Protonenpumtransport und damit eine mögliche Ansäuerung der Vakuole könnten Auswirkungen auf den Metabolismus, den vakuolären Protonengradienten und damit auch auf die Membranspannung und wichtige Transportprozesse der Zelle haben.

3.5.1. Endogene V-PPase Expression nach Salzbehandlung

Die in Kapitel 3.4 beschriebene Salzinjektion hatte bei NbVHP-überexprimierenden Blättern einen positiven Einfluss auf die Zellvitälität, indem sie die Entwicklung der Nekrosen verhinderte. Dennoch ist eine direkte Verbindung zwischen Salzbehandlung und V-PPase in diesen Experimenten nicht bewiesen worden. Da bereits in anderen Publikationen (Fukuda et al. 2004; Gao et al. 2006) ein Zusammenhang zwischen Salzstress und Transkription der endogenen V-PPasen entdeckt wurde, wurde die endogene NbVHP-mRNA-Menge auch in den transformierten Blättern bestimmt. Da die Behandlung mit Agrobakterien bzw. die Transformation mit Fremdgenen einen zusätzlichen Einfluss auf die Transkription haben könnte, wurden die *N. benthamiana* Blätter mit dem Kontroll-Vektor (nur freies GFP) mit und ohne 200 mM NaCl transformiert. Zwei Tage nach Infiltration wurden die Blätter entfernt und deren mRNA isoliert. Die mittels qRT-PCR erhaltenen Werte für *NbVHP1* und *NbVHP2* wurden auf die GFP-Werte normiert, um die Transformationsrate zu berücksichtigen. Abbildung 29 zeigt die Expression der beiden endogenen Pumpen und einen signifikanten Anstieg unter der Salzbehandlung von 0,08 auf 4,7 (*NbVHP1*) und 0,03 auf 1,3 (*NbVHP2*). Die Injektion von 200 mM NaCl bewirkt demzufolge eine erhöhte Genexpression, wobei *NbVHP2* signifikant weniger anstieg als *NbVHP1* ($p = 0,04$). Dies könnte bedeuten, dass *NbVHP1* und *NbVHP2* unter der Kontrolle verschiedener Transkriptionsfaktoren mit unterschiedlicher Sensitivität auf die NaCl-Applikation stehen.

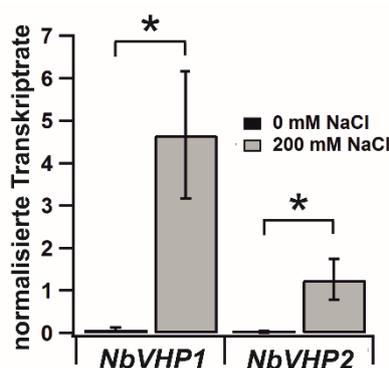


Abbildung 29: Expression der endogenen NbVHPs nach Salzbehandlung
Die Transkriptmenge von *NbVHP1* und *NbVHP2* wurde an freiem GFP-exprimierenden Blättern von *N. benthamiana* 48 h nach Injektion der transformierenden Agrobakterien mit oder ohne 200 mM NaCl bestimmt. Die Normalisierung erfolgte mit der jeweiligen Transkriptmenge des freien GFPs. (n = 5; Mittelwerte \pm SE; * P < 0.05, Student's t-Test)

3.5.2. Einfluss der PPase-Überexpression auf den Metabolismus der Zellen

Der Metabolismus der Zelle ist ein labiles Gleichgewicht, das durch verschiedene Faktoren gestört werden kann. Eine Erhöhung der V-PPase-Pumpströme ist mit einer erhöhten PP_i -Hydrolyse verbunden, was evtl. wiederum zu einem starken P_i -Anstieg im Cytosol führen könnte. Da PP_i in zu großen Konzentrationen toxisch in der Zelle wirken kann (Ferjani and Maeshima 2016), könnte sich dessen Reduktion positiv auf den Metabolismus auswirken. Ein Anstieg des P_i -Spiegels im Cytosol könnte allerdings auch das chemische Gleichgewicht vieler Reaktionen verschieben (z.B. $ATP \rightarrow ADP + P_i$) und damit den Metabolismus stören (Mosse 1973; Zhou et al. 2008). Um nun den Einfluss sowohl der überexprimierten NbVHPs als auch der Salzbehandlung auf den Stoffwechsel zu überprüfen, wurden die verschiedensten Metabolit- und Ionenkonzentrationen aus den Stoffklassen Zucker, Aminosäuren, organische Säuren, Anionen und Kationen mittels der Ionenaustauschchromatographie detektiert. Die ausgewählten Metabolite treten in den unterschiedlichsten Zellprozessen (Photosynthese, Zitronensäurezyklus, DNA-Synthese usw.) auf und können dadurch ein umfassendes Bild des Stoffwechsels in den Blättern abgeben. Um zwischen dem Einfluss des Protonentransportes und der Hydrolyseaktivität der V-PPase auf den Metabolismus unterscheiden zu können, wurden Blätter nicht nur mit den V-PPasen, sondern auch mit der löslichen PPase (IPP1) transformiert und vermessen. Diese ionischen/metabolischen Messungen zielten auf die Veränderungen der V-PPase-transformierten Zellen vor ihrem Absterben -also vor Entstehungsbeginn der Nekrosen- ab. Aus diesem Grund stammte das verwendete Pflanzenmaterial aus nekrosefreien *N. benthamiana* Blättern 48 h Stunden nach Infiltration.

Es wurden folgende Ionen- und Metabolit-Gehalte erfasst:

<i>Anionen:</i>	Cl ⁻ , NO ³⁻ , F ⁻ , PO ⁴⁻ , HSO ₄ ⁻ , PO ₄ ³⁻
<i>Kationen:</i>	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , NH ₄ ⁺
<i>Zucker:</i>	Glucose, Fructose, Saccharose, Raffinose
<i>Aminosäuren:</i>	Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Glycin, Glutamin, Glutamat, Histidin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin
<i>organische Säuren:</i>	Malat, Fumarat, Citrat, Succinat

Abbildung 30 zeigt nur ausgewählte Ionen und Metabolite jeder Klasse, um hier für einen ausreichenden Überblick über die erzielten Ergebnisse zu sorgen. Ein Einblick in alle erfassten Ionen/Metabolite wird im Anhang ermöglicht (Kap 7.1, Abbildung 35 bis Abbildung 41). Für alle getätigten Ionen/Metabolit-Bestimmungen konnte kein eindeutiger Unterschied innerhalb der verschiedenen transient-exprimierten Konstrukte, also weder zwischen V-PPasen und IPP1 noch gegenüber dem GFP-exprimierenden Kontrollansatzes, festgestellt werden. Die Salzbehandlung der Blätter mit NaCl ließ zunächst -wie erwartet- die Werte für Natrium von ca. 8 µmol/g FW auf ca. 60 µmol/g FW (*engl. Fresh Weight* dt. frisch Gewicht) und für Chlorid von ca. 30-40 µmol/g FW auf ca. 80 µmol/g FW für jedes Konstrukt signifikant steigen. Als Salzstressindikator wurde der Prolingehalt ermittelt, der sich signifikant unter NaCl-Zugabe von ca. 5 µmol/g FW auf ca. 10-20 µmol/g FW sowohl für Kontroll-Blätter als auch alle PPasen-transformierten Zellen erhöhte. Für alle weiteren gemessenen Aminosäuren konnten keine signifikanten Veränderungen ihrer Konzentration aufgrund der Salzinjektion festgestellt werden. Glucose zeigte in der Gruppe der Zucker den tendenziell stärksten Unterschied durch Salzbehandlung, da seine Konzentration für alle Konstrukte von ca. 8 µmol/g FW auf 4 µmol/g FW sank. Die Signifikanz des Rückgangs konnte allerdings nur für NbVHP2-transformierte und Kontroll-Blätter bestätigt werden. Für die restlichen gemessenen Metabolite galt zusammenfassend (Kap 7.1, Abbildung 35 bis Abbildung 41), dass die Injektion von 200 mM NaCl keinen nennenswerten Effekt auf ihre Konzentration hatte.

Dieser Einblick in die Ionen/Metabolit-Konzentrationen der *N. benthamiana* Blätter verdeutlichte die geringe Auswirkung von sowohl der Salzbehandlung als auch der PPase-Überexpression auf den Zellmetabolismus. Der Anstieg von Natrium und Chlorid nach Salzinjektion bestätigte, dass auch nach 48 h deren Ionenkonzentration erhöht war und die Salzionen nicht oder zumindest nicht vollständig in andere Teile der Pflanze transportiert wurden. Lediglich die erhöhte Prolin-Konzentration in den salzinjizierten Blättern konnte als Stressindiz gewertet werden. Die Bildung der nekrotischen Blattbereiche

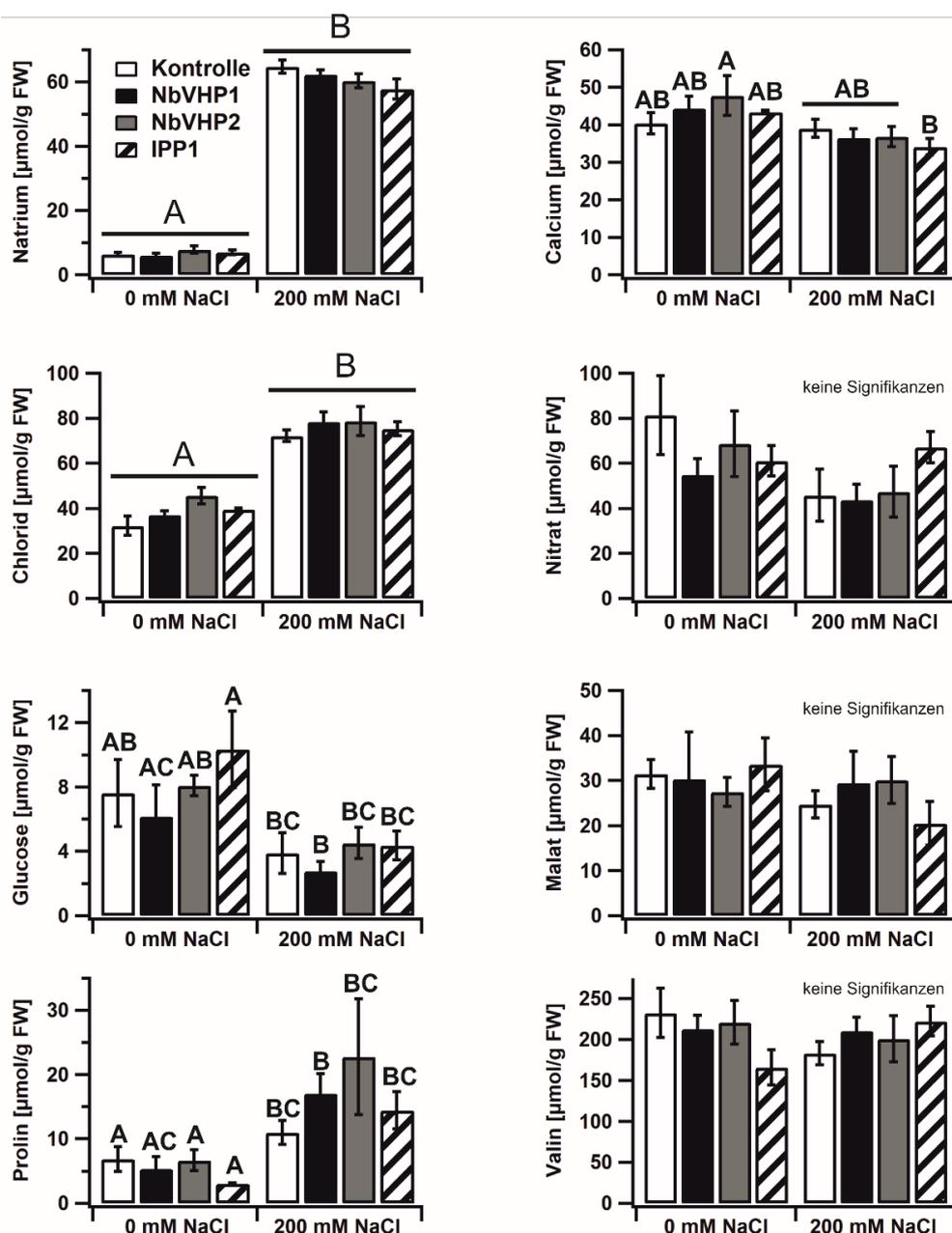


Abbildung 30: Ionen/Metabolit-Gehalt nach PPase-Überexpression und Salzbehandlung

N. benthamiana Blätter wurden mit unterschiedlichen Konstrukten (NbVHP1, NbVHP2 oder IPP1) jeweils mit freiem GFP oder freies GFP allein (Kontrolle) ggf. mit simultaner Zugabe von 200 mM NaCl infiltriert. Nach 48 h wurde das Gewebe (FW = engl. fresh weight; dt. Frischgewicht) auf dessen Gehalt an Natrium, Calcium, Chlorid, Nitrat, Glucose, Malat, Prolin und Valin getestet. Die Signifikanzen ($P < 0.05$) wurden mittels *Student's t-Test* berechnet und mit Buchstaben wiedergegeben. ($n = 4$; Mittelwert \pm SE)

unter VHP-Überexpression kann demzufolge nicht auf ein gestörtes Gleichgewicht des Zellmetabolismus infolge einer stärkeren vakuolären Protonen-pumpleistung oder PP_i -Hydrolyseaktivität zurückgeführt werden.

Die Metabolite wurden von mir im Labor für Pflanzenphysiologie an der Technischen Universität Kaiserslautern in Zusammenarbeit mit den dortigen Mitarbeitern von Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus vermessen.

3.5.3. Pumpaktivität von V-PPasen und V-ATPase in *Nicotiana benthamiana* Vakuolen nach Salzbehandlung

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche verdeutlichten den geringen Unterschied zwischen der NbVHP1 und NbVHP2. Die hohe Homologie (Kap. 3.2), die identische Stromantwort auf PP_i (Kap. 3.3.3), die Bildung der Nekrosen (Kap. 3.4.2) als auch die metabolischen Auswirkungen (Kap. 3.5.2) waren gleichwertig. Lediglich in der signifikant höheren Expression (Abbildung 17) und dem signifikant niedrigerem F_v/F_m -Wert der PAM-Messungen (Abbildung 27) zeigte sich die leichte Dominanz der NbVHP1 in *N. benthamiana* Vakuolen gegenüber NbVHP2. Die Summe dieser Ergebnisse wurde zum Anlass genommen, für die weiteren Versuche den Fokus auf NbVHP1 - stellvertretend für die vakuolären V-PPasen - zu legen.

Die erhöhte Expression der endogenen V-PPasen in *N. benthamiana* (Kap. 3.5.1) unter Salzstress führte zu der Frage, ob diese Steigerung auf Transkriptebene sich auch auf Proteinebene widerspiegelt und dies dann anhand eines erhöhten Protonenpumpransports zu detektieren wäre. Dieser Aspekt wurde in *Patch-Clamp*-Experimenten mit *N. benthamiana* Mesophyll-Vakuolen 48-72 h nach Infiltration überprüft. Unter symmetrischen pH- und Lösungsbedingungen wurde bei einer Membranspannung von 0 mV die Stromantwort der Vakuolen auf die Applikation von 150 μM PP_i erneut aufgezeichnet (Kap. 2.7.5). Die PP_i ausgelöste positive Stromamplitude für Kontroll-Vakuolen (nur freies GFP) änderte sich signifikant von 0,9 $pA \cdot pF^{-1}$ bei Standardbedingungen auf 1,7 $pA \cdot pF^{-1}$ unter Salzbehandlung. Hingegen war bei den Vakuolen von NbVHP1-überexprimierenden Mesophyllzellen zwischen salzbehandelten und unbehandelten Blättern kein nennenswerter Unterschied durch die Salzinjektion messbar (Abbildung 31A). Diese Ergebnisse belegen zum einen, dass die erhöhte Expressionsrate der V-PPasen (Kap. 3.5.1) sich auch im Pumpstrom und damit auch im Proteinlevel widerspiegelte. Zum anderen wird angezeigt, dass bei den Kontrollvakuolen das Stromniveau durch Salzbehandlung gesteigert werden kann. Das Niveau der NbVHP1-überexprimierenden Vakuolen durch die Salzinjektion konnte dabei jedoch nicht erreicht werden. Darüber hinaus scheint eine zusätzliche Steigerung der Stromantwort bei NbVHP1-transformierten Zellen durch Salzbehandlung nicht möglich zu sein.

Nach diesem nachgewiesenen Einfluss der Salzinjektion auf die NbVHP1-Pumpströme, geriet die V-ATPase von *N. benthamiana* und ihre Reaktion auf die Salzbehandlung in den Fokus des Interesses. Aufgrund der Komplexität des V-ATPase Aufbaus war es nicht möglich die Expressionswerte der endogenen V-ATPase von *N. benthamiana* mit und ohne

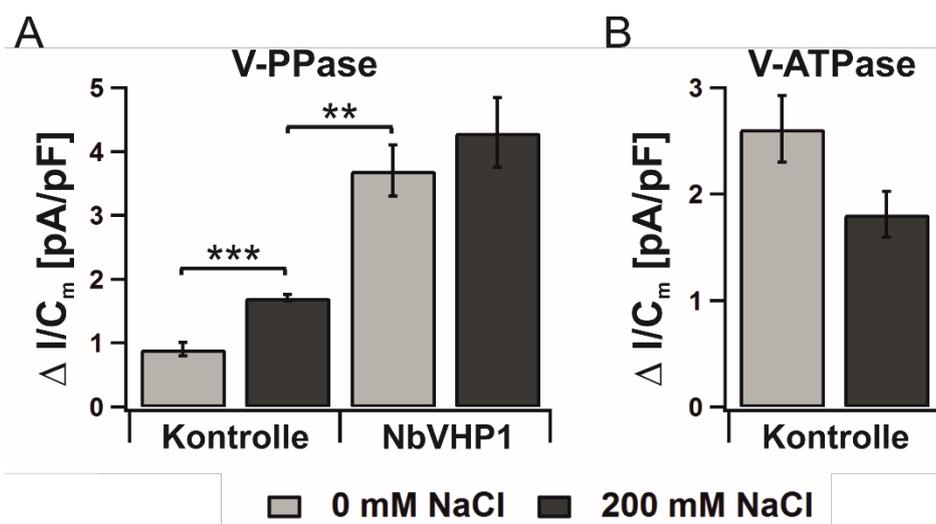


Abbildung 31: Einfluss von injiziertem NaCl auf die Pumpaktivität der V-ATPase und V-PPase

N. benthamiana Blätter wurden mittels Agrobakterien mit freiem GFP allein (Kontrolle) oder NbVHP1 mit freiem GFP \pm 200 mM NaCl transformiert. Unter symmetrischen pH7.5 und einer Membranspannung von 0 mV wurde die Pumpaktivität der V-PPase durch cytosolische Zugabe von 150 μ M PP_i (A) bzw. der V-ATPase durch cytosolische Zugabe von 5 mM ATP (B) mittels *Patch-Clamp*-Technik erfasst. Die ermittelten Stromamplituden wurden auf die Membrankapazität normiert. (Mittelwert \pm SE; A: n = 4-10; B: n = 7; **, P < 0.01; ***, P < 0.001 *Student's t-Test*)

Salzbehandlung zu ermitteln. Auf Proteinebene konnte der Pumpstrom allerdings durch die *Patch-Clamp*-Technik erfasst werden. Für die V-ATPase-Messungen wurden die Lösungsbedingungen angepasst (Rienmüller et al. 2012). Die Bad- und Pipettenlösung enthielten nun 100 mM KCl statt KGluconat und 1 mM statt 0,1 mM CaCl₂. Die Applikationspipettenlösung entsprach wiederum der Badlösung mit allerdings dem Unterschied, dass sie zusätzlich 5 mM ATP enthielt. Die restlichen Einstellungen und die experimentelle Durchführung waren zu den V-PPase-*Patch-Clamp*-Messungen identisch. Unter diesen Bedingungen wurden die V-ATPasen anstelle der V-PPasen durch ATP-Applikation aktiviert, wodurch Protonen in die Vakuole gepumpt wurden und eine positive Stromantwort zu verzeichnen war. Nachdem die ATP-Zugabe beendet wurde, sank die Stromantwort wieder auf Ausgangsniveau zurück. Kontroll-Vakuolen generierten unter den beschriebenen Voraussetzungen eine Stromamplitude von durchschnittlich 2,6 pA·pF⁻¹, die unter Salzbehandlung auf 1,8 pA·pF⁻¹ sank. Diese Reduktion in den V-ATPase-vermittelten Pumpströmen war allerdings mit einem p-Wert von 0,059 nur knapp nicht signifikant (Abbildung 31B). Da diese Werte den vorhandenen Protonentransport der V-ATPase wiedergaben, kann die Tendenz der Stromabnahme unter der Salzbehandlung nicht eindeutig auf eine reduzierte Genexpression und/oder eine potenzielle Inhibierung der Pumpe durch Natriumionen zurückgeführt werden. Die V-ATPase-Messungen wurden von dem Studenten

Jan Ratje (Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik - Botanik I der Universität Würzburg) unter meiner Anleitung durchgeführt.

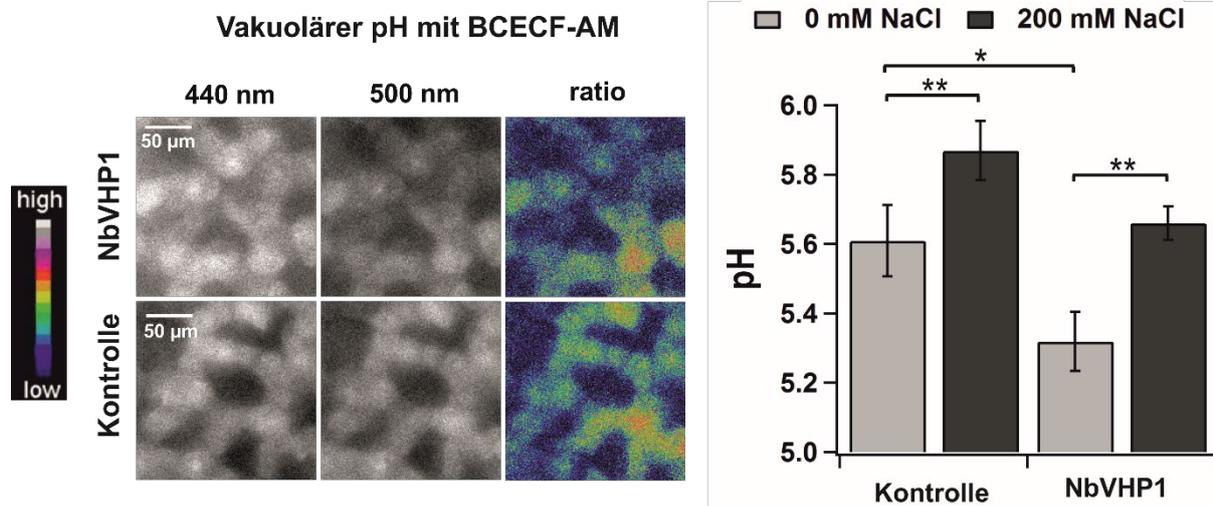
3.5.4. Auswirkung der NbVHP1-Überexpression auf den cytosolischen und vakuolären pH der Mesophyllzellen

Die vorangegangenen Ergebnisse bewiesen nicht nur die erfolgreiche starke Überexpression der V-PPasen in *N. benthamiana* (Kap. 3.3.2). Sie zeigten auch den stimulierenden Einfluss von NaCl auf die Expression der V-PPase (Kap. 3.5.1) und den daraus resultierenden gesteigerten Protonentransport an der Vakuolenmembran (Kap. 3.5.2). Bei diesen Untersuchungen wurde die Pumpaktivität von isolierten Vakuolen ermittelt, deren Lumen durch eine definierte Lösung ausgetauscht wurde. Aufgründessen konnten keine Rückschlüsse auf den Einfluss einer erhöhten PPase-Protonen-Pumpaktivität auf den pH der Zelle getroffen werden. Der erhöhte Protonentransport in das Vakuolenlumen könnte sowohl zur einer verstärkten Ansäuerung der Vakuole als auch zu einer Alkalisierung des Cytosols beitragen.

Um eine mögliche pH-Veränderung der Zelle *in vivo* zu visualisieren und zu quantifizieren, wurden *N. benthamiana* Blattzellen mit ortsspezifischen pH-sensitiven Fluoreszenzmarker behandelt. Für die Untersuchungen des vakuolären pH-Wertes, wurden NbVHP1-überexprimierende Blätter, die mit oder ohne 200mM NaCl injiziert wurden, mit BCECF-AM 48h nach der Transformation inkubiert. Bei diesem Ansatz musste auf die Co-Expression mit GFP verzichtet werden, um eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale zu verhindern. Als Kontrolle dienten Blätter, die ausschließlich mit 19K-Hilfsbakterien infiltriert waren. Die Esterverbindung BCECF-AM war Membran-permeabel und diente nach Abspaltung der Estergruppe durch hydrolytische Enzyme im Zellinneren als pH-Sensor. Der BCECF-Fluoreszenzmarker reichte sich in der Vakuole an und wurde anschließend in Mesophyllzellen bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen detektiert. Über die erstellte Eichkurve konnte der Intensitätsverhältnis der Wellenlängen (500 nm/440 nm) auf einen pH-Wert umgerechnet werden (Kap. 2.8). Die Analyse der Vakuolen von Kontrollzellen ergaben einen pH von 5,6 unter Standardbedingungen, während die Kontroll-Vakuolen unter Salzbehandlung hingegen einen pH von 5,9 aufwiesen. Dieser Anstieg könnte durch die Einlagerung der ins Blatt infiltrierten Ionen in die Vakuole mittels Protonen-gekoppelter Antiporter wie beispielsweise NHX erklärt werden. Der signifikante pH-Unterschied von 0,3 pH zwischen Kontroll- und NbVHP1-Vakuolen unter Standardbedingungen – also ohne Salzapplikation – belegte, dass die transiente Überexpression der V-PPase stark genug war, um

sich auf den vakuolären pH auszuwirken. Die applizierte Salzlösung bewirkte hingegen einen Ausgleich dieser vakuolären Ansäuerung zurück auf das Niveau der Kontrollvakuolen (Abbildung 32A).

A



B

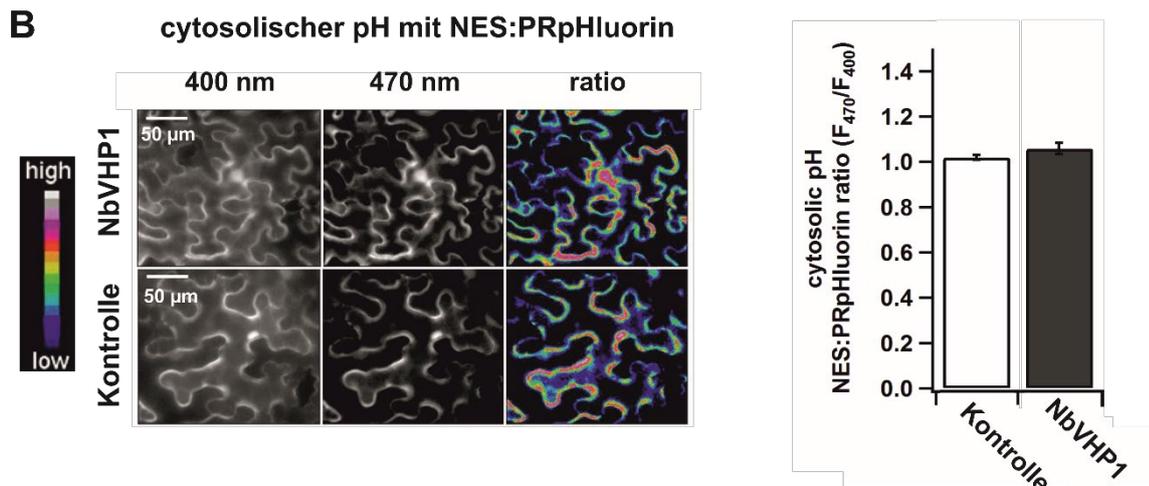


Abbildung 32: Einfluss der NbVHP1-Überexpression auf den pH der Zelle

(A) *N. benthamiana* Blätter wurden mittels Agrobakterien mit NbVHP1 ohne GFP oder leerem Vektor (Kontrolle) ± 200 mM NaCl transformiert und 48 h später mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM für eine Stunde inkubiert. Die Fluoreszenzaktivität der Mesophyllvakuolen wurde bei 440 und 500 nm ermittelt und das daraus resultierende Verhältnis (ratio) mittels Kalibrierung (Abbildung 14) in den entsprechenden pH-Wert umgerechnet. *Links*: repräsentative Fluoreszenzausschnitte des BCECF-AM inkubierten Mesophyllgewebes; *Rechts*: Statistische Erfassung der pH-Werte; (Mittelwert ± SE; n = 10; *, P < 0.05; **, P < 0.01, *Student's t-Test*); (B) *N. benthamiana* Blätter wurden mit NbVHP1 mit NES:PRpHluorin (ein pH-abhängiger cytosolischer Fluoreszenzmarker) entweder zusammen mit NbVHP1 oder alleine (Kontrolle) infiltriert. Die Fluoreszenzaktivität des NES:PRpHluorin bei 400 und 470 nm wurde in der Epidermis detektiert und das resultierende Intensitätsverhältnis statistisch erfasst. *Links*: Repräsentative Fluoreszenzausschnitte der NES:PRpHluorin-exprimierenden Epidermis. *Rechts*: Statistische Erfassung der Fluoreszenzratios. (Mittelwert ± SE; n = 8)

Zur Ermittlung des cytosolischen pH-Wertes der *N. benthamiana* Blätter wurde der genetisch kodierte pH-Sensor PRpHluorin (Shen et al. 2013) verwendet. Hierzu wurde die *NbVHP1*-Gensequenz zusammen mit der *PRpHluorin*-Gensequenz unter dem NES-Promotor aus einem Vektor mittels Agrobakterien in *N. benthamiana* Blätter übertragen und exprimiert. Die

Kontrollzellen enthielten ausschließlich die NES:PRpHluorin-Sequenz. 48 h nach Transformation wurde die Intensität des Markers in der Blattepidermis *in vivo* bestimmt. Das erfasste Intensitätsverhältnis der Wellenlängen lag dabei sowohl für Kontroll- als auch für NbVHP1-Vakuolen bei ungefähr „1“ (Abbildung 32B).

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, zeigte eine Überexpression von NbVHP1 eine Ansäuerung der Vakuole, aber keine Alkalisierung des Cytosols.

Die *PRpHluorin*-Vektor-Konstrukte wurden von Dr. Kai Konrad erstellt, während der Student Tillmann Güthoff die von mir transformierten Blätter auf ihre Fluoreszenzintensität in Vakuole und Cytosol untersuchte und die Daten auswertete (Beide vom Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik - Botanik I der Universität Würzburg).

3.5.5. pH-Abhängigkeit der Pumpaktivität von AtVHP1 und NbVHP1

V-PPasen sind Enzyme, die das Substrat Pyrophosphat in zwei Phosphate spalten und die freigesetzte Energie zum aktiven Transport von Protonen gegen den elektrochemischen Protonegradienten über die Membran nutzen. Die Pumpaktivität hängt neben der Präsenz von Kalium und Magnesium (Davies et al. 1991; Drozdowicz et al. 2000) u. a. auch von der Substrataffinität (hier PP_i) und der pH-Sensitivität auf der cytosolischen und vakuolären Membranseite ab. Um nun die pH-Abhängigkeit der NbVHP-Pumpfunktion zu ermitteln, wurde die Abhängigkeit der Pumpströme von der PP_i -Dosis unter zwei verschiedenen pH-Bedingungen für NbVHP1 und AtVHP1 als Vergleichskontrolle erstellt. Für die Dosis-Effekt-Messungen wurde sowohl die Membranspannung bei 0 mV, wie auch die Zusammenstellung der Bad- und Pipettenlösung wie unter Kap. 3.3.2 (auch Kap. 2.7.5) beibehalten und nur die Applikationslösung mit der entsprechenden PP_i -Konzentration angepasst:

NbVHP1:

0 μ M, 9,4 μ M, 18,8 μ M, 37,5 μ M, 75 μ M, 112,5 μ M, 150 μ M, 225 μ M, 300 μ M PP_i

AtVHP1:

0 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 300 μ M PP_i

Aufgrund der transienten Transformation musste von einer Schwankung in der Expressionsrate für die eingeschleusten V-PPasen im Blatt ausgegangen werden. Die Berücksichtigung dieser Schwankungen fand durch das Normieren jeder einzelnen Zelle auf deren Stromamplitude bei 150 μ M PP_i statt. Für die praktische Durchführung des Experiments bedeutete dies, dass die

Stromantwort jeder Zelle bei 150 μM PP_i und mindestens einer weiteren Konzentration aufgezeichnet werden musste. Wie anhand der Rohspuren in Abbildung 33A zu erkennen ist, stieg die Stromamplitude mit steigender PP_i -Konzentration sowohl für AtVHP1 als auch für NbVHP1 transformierte Vakuolen kontinuierlich an, bis sie bei ca. 150 μM PP_i zu stagnieren begann. Die aufgetragenen Messdaten entsprachen einer Sättigungskurve, wodurch die PP_i -Dosisabhängigkeit der jeweiligen V-PPasen mit Hilfe eines Michaelis-Menten-Fits beschrieben werden konnte. Sowohl die Substrataffinität (K_m) als auch die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit ($\frac{1}{2} V_{\text{max}}$) für ein Enzym lassen sich über die Michaelis-Menten-Gleichung bestimmen, wobei in diesem Fall durch vorangegangene Normierung auf 150 μM PP_i keine Aussage über $\frac{1}{2} V_{\text{max}}$ getroffen werden konnte (Formel 4).

Diese Messungen wurden sowohl bei symmetrischen pH ($7,5_{\text{cyt/vac}}$) als auch bei asymmetrischem pH ($7,5_{\text{cyt}}/5,5_{\text{vac}}$) durchgeführt und es wurden keine nennenswerten Unterschiede in den Stromantworten der einzelnen Konzentrationen zwischen den pH-Bedingungen festgestellt. Daher wurden die Messdaten der jeweiligen V-PPasen zusammengefasst und über die gesamten Messwerte ein sogenannter *Global-fit* nach der Michael-Menten-Gleichung erstellt. Die Berechnungen ergaben für die NbVHP1 einen K_m -Wert von $65 \pm 9 \mu\text{M}$ und für die AtVHP1 einen K_m -Wert von $75 \pm 11 \mu\text{M}$ (Abbildung 33B und C). Wegen der Normierung auf den 150 μM PP_i -Stromwert war die Berechnung von V_{max} der beiden V-PPasen nicht möglich. Dennoch war zu beobachten, dass bei einer maximalen Konzentration von 300 μM PP_i der Fit in diesem Messbereich nahezu eine Sättigung erreichte (Abbildung 33B und C). Die Berücksichtigung der Rohspuren der einzelnen Vakuolen ließ sogar den Sättigungsbereich von PP_i bei V-PPasen zwischen 112,5 und 225 μM vermuten (Abbildung 33A).

Die Möglichkeit eines Zusammenschluss der pH-*Patch-Clamp*-Daten der jeweiligen Pumpen in einem Global-Fit verdeutlichte die starke Ähnlichkeit der K_m -Werte für beide V-PPasen bei diesen unterschiedlichen pH-Bedingungen. Die Tatsache, dass der K_m -Wert die Substrataffinität widerspiegelt, weist darauf hin, dass NbVHP1 und AtVHP1 trotz einer Erhöhung des pH-Gradienten um 2 pH-Einheiten keine Veränderung in ihrer Substrataffinität zeigen. Zudem ähnelten die erhaltenen K_m -Werte für NbVHP1 und AtVHP1 als auch der Verlauf der Dosis-Effekt-Kurve sich sehr stark und verdeutlichten ein weiteres Mal die Strukturhomologie der beiden Protonenpumpen (Kap. 3.2).

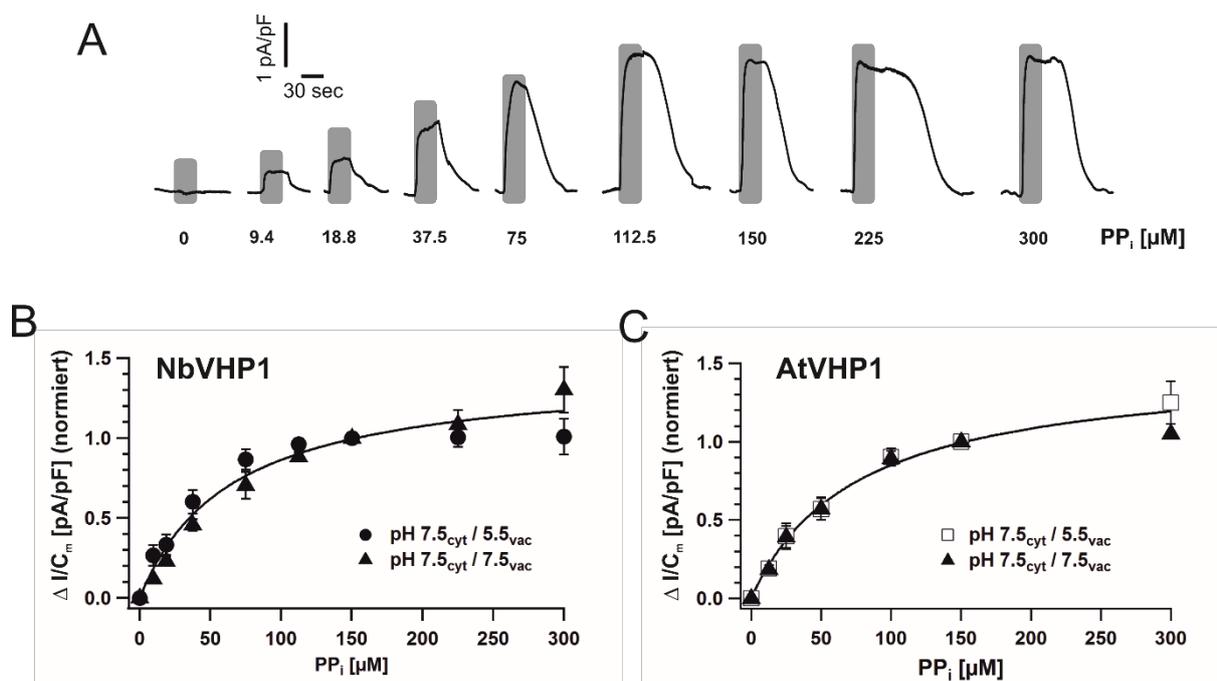


Abbildung 33: PP_i -abhängige Pumpaktivitätsmessungen an V-PPase-überexprimierten Vakuolen

Patch-Clamp-Messungen an *N. benthamiana* Mesophyllvakuolen 48-72 h nach Infiltration von NbVHP1 bzw. AtVHP1 mit freiem GFP bei 0 mV Klemmspannung. (A) Repräsentative Stromantworten **einer** mit NbVHP1 transformierten Vakuole auf unterschiedliche PP_i -Konzentrationen. Die grauen Balken spiegeln den PP_i -Applikationszeitraum wider; (B) Dosis-Effekt-Kurve von NbVHP1-transformierten Vakuolen; $K_m = 65 \pm 9 \mu\text{M}$, (Mittelwerte \pm SE; $n = 3-10$); (C) Dosis-Effekt-Kurve von AtVHP1-transformierten Vakuolen; $K_m = 75 \pm 11 \mu\text{M}$, (Mittelwerte \pm SE; $n = 3-17$); (B und C) Werte wurden bei symmetrischen pH 7.5_{zyt/vak} und asymmetrischen pH 7.5_{zyt}/5.5_{vac} gemessen und jede Stromamplitude auf die 150 μM PP_i -Stromantwort der jeweiligen Vakuole normiert. Der Fit wurde unabhängig von den pH-Bedingungen auf alle Daten nach der Michaelis-Menten-Gleichung berechnet (durchgezogene Linie).

3.5.6. Auswirkungen der NbVHP1-Überexpression auf das Membranpotential

Wie bereits unter 3.5.1 beschrieben, hat eine Überexpression der V-PPase eine signifikante Ansäuerung der Vakuole zur Folge. Da Protonen geladene Teilchen sind, besitzen sie nicht nur eine osmotische Wirkung auf die Zelle, sondern haben auch eine elektrochemische Wirkung auf die Zellkompartimente. Um den elektrochemischen Einfluss der V-PPase-Überexpression auf die Zellkompartimente zu testen, wurde die Mikroelektrodeneinstich-Technik herangezogen, um sowohl die Plasmamembranspannung und falls möglich die Vakuolenmembranspannung direkt zu bestimmen. Für die Detektion der Plasmamembranpotentiale von *N. benthamiana* Blattepidermiszellen wurden die Pflanzen mit freiem GFP mit und ohne NbVHP1 transformiert. 48-72 h vor Entstehung der Nekrosen wurde mit einer Glasmikroelektrode in die transformierten Epidermiszellen eingestochen und das Membranpotential gemessen (Kap. 2.6). Die Differenzierung zwischen Plasmamembran- und Vakuolenmembran-Spannung kann nach Wang et al. (2015) über die Ermittlung ihrer Leitfähigkeit geschehen. Aufgrund ihrer isolierten Lokalisation in der Zelle weisen *A. thaliana*

Wurzel-Vakuolen eine geringere Leitfähigkeit auf als die Plasmamembran, die durch Plasmodesmata mit ihren Nachbarzellen verbunden ist (Wang et al. 2015). Eine Unterscheidung der Membranen auf dieser Grundlage schlug allerdings bei *N. benthamiana* Blattzellen fehl, da die gemessenen Leitfähigkeiten nicht den Leitfähigkeitswerten von *A. thaliana* Wurzelzellen entsprachen und auch sonst keine Konvergenz zeigten. Die erhaltenen Leitfähigkeiten bestätigten ausschließlich den Elektrodeneinstich in eine intakte Zelle. Die Lokalisation der Glasmikroelektrode geschah daraufhin visuell durch das Anfärben des eingestochenen Zellbereiches mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Lucifer-Yellow*. Bei jedem erfolgreichen Einstich wurde das Cytosol angefärbt, während eine Anfärbung der Vakuole leider nie zu beobachten war (n = 9; Daten nicht gezeigt). Diese stetige Lokalisation der Mikroelektrode im Cytosol sprach somit dafür, dass bei diesen Messungen jedes Mal das Membranpotential der Plasmamembran erfasst wurde. Die Spannungswerte der Kontroll-Epidermiszellen von *N. benthamiana* lagen dabei im Schnitt bei -150 mV (Abbildung 34) und damit im Bereich gesunder Zellen, womit sie deren Vitalität unter den Messbedingungen bestätigten (Roelfsema et al. 2001; Wang et al. 2015). Das Potential von NbVHP1-Zellen lag dagegen bei -85 mV, was durch die Salzbehandlung auf -120 mV erniedrigt werden konnte (Abbildung 34). Sowohl die Veränderung der Membranspannung durch NbVHP1-Überexpression als auch die durch zusätzliche Salzgabe waren hoch signifikant.

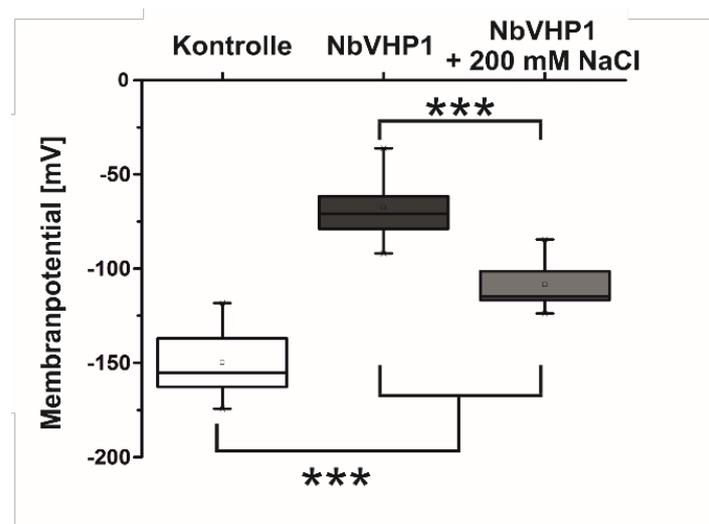


Abbildung 34: Membranpotential NbVHP1-überexprimierender Epidermiszellen

Die Ermittlung des Membranpotentials von intakten *N. benthamiana* Epidermiszellen erfolgte mittels Elektrodeneinstichs 48-72 h nach Infiltration von NbVHP1 mit freiem GFP oder mit freiem GFP alleine (Kontrolle) \pm 200 mM NaCl. Die mittlere horizontale Linie gibt den Median an, während die „Whiskers“ die minimalen und maximalen Werte umschließen. Der Mittelwert ist durch ein Quadrat symbolisiert. (n = 6-10; ***, P < 0.001, Student's t-Test)

4. Diskussion

Die bisherige Sicht auf die V-PPase als H⁺-Pumpe in Wachstums- und Stressphasen der Pflanze, deren Überexpression zu stresstoleranteren Pflanzen führt, wurde in dieser Arbeit mit zum Teil unkonventionellen Methoden elektrophysiologisch/physiologisch untersucht und hinterfragt.

4.1. Identifikation zweier endogener V-PPase von *N. benthamiana*

Die bereits jahrelange Forschungsarbeit (über 20 Jahre) über die DNA-Sequenz, Lokalisation und prinzipielle Funktionsweise der V-PPasen verschiedener Pflanzen und speziell von *A. thaliana* diente als Grundlage zur Identifikation der endogenen V-PPasen von *N. benthamiana* (Hedrich et al. 1989; Lin et al. 2012; Maeshima 1991; Sarafian et al. 1992). Es wurden zwei endogene V-PPasen NbVHP1 und NbVHP2 von *N. benthamiana* identifiziert, deren Expression in Mesophyllprotoplasten, Lokalisation im Tonoplasten und Funktionalität als PPase bestätigt werden konnten (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 20, Abbildung 21). Trotz der signifikant unterschiedlichen Expressionsrate von NbVHP1 und NbVHP2, waren die Transkriptmengen in der Größenordnung vergleichbar (Abbildung 17), weswegen die gemessene Pumpaktivität der Kontroll-Mesophyll-Vakuolen gleichermaßen auf beide Pumpen zurückgeführt werden kann (Abbildung 21).

Der Aminosäuresequenzvergleich beider NbVHPs mit AtVHP1 (*Arabidopsis thaliana*) und VrVHP (*Vigna radiata*) zeigte eine Homologie von über 88% und untereinander von 91% (Abbildung 16). Diese große Übereinstimmung steht im Einklang mit der These von (Drozdowicz and Rea 2001), dass alle V-PPasen (TypI) im Pflanzenreich mindestens zu 85% homolog sind. Auch die nach Lin et al. (2012) und Pizzio et al. (2017) strukturell und funktional wichtigen Aminosäurereste für das hydrophobe Tor, den Protonen-Transport, die Substratbindung, das Salzbrücken-interagierende Netzwerk, die Ubiquitinierung und Sumoylierung waren zwischen all diesen V-PPasen identisch. Zusätzlich konnte auch die typische Calciumabhängigkeit der V-PPasen (Drozdowicz et al. 2000; Maeshima 2000; Nakanishi et al. 2003) mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Methode, sowohl für AtVHP1 als auch für die endogenen V-PPasen von *N. benthamiana* bestätigt werden (Abbildung 20). Die inhibierende Wirkung des Calciums wirkte sich in beiden Fällen im gleichen Verhältnis auf die Pumpaktivität aus und sprach für deren bereits auf Sequenzebene entdeckte Homologie. Diese

Ergebnisse bestätigen die NbVHP1 und NbVHP2 als endogene V-PPasen im Tonoplasten der Mesophyllzellen von *N. benthamiana*. Rückschlüsse auf das Expressionslevel der beiden V-PPasen bzgl. anderer Zelltypen von *N. benthamiana* konnte nicht gezogen werden. Ebenfalls konnte die Existenz zusätzlicher endogener V-PPasen in *N. benthamiana* Blattzellen und in anderen Bereichen der Pflanze nicht ausgeschlossen werden.

4.2. Transiente Überexpression der PPasen in *N. benthamiana*

In früheren Publikationen wurde die V-PPase-Aktivität meistens mittels einer Hydrolyseaktivitätsmessung (Drozdowicz et al. 2000; Krebs et al. 2010; Kriegel et al. 2015; Maeshima 1990) oder über einen pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff (Hirata et al. 2000; Johannes and Felle 1990; Katschnig et al. 2014; Malinen et al. 2004) bestimmt. Eine direkte Messung des Protonentransportes über den Einsatz der *Patch-Clamp*-Technik wurde aufgrund der niedrigen Pumpströme (2,5-10 pA; Hedrich et al. (1989); Nakanishi et al. (2003)) und der damit limitierten Stromauflösung der Strommessungen, selten elektrophysiologisch durchgeführt. Eine Möglichkeit den Betrag der Stromantworten zu erhöhen und damit die Auflösung zu verbessern, ist eine künstliche Überexpression der V-PPase. In der Vergangenheit wurden bereits mehrere stabile V-PPase-Überexpressionslinien mit verschiedenen Pflanzenarten generiert (Tabelle 1; Kap. 1.3.2) und deren Bedeutung bei der Entwicklung junger Keimlinge bestätigt. Ferjani et al. (2011) konnte an AtVHP1-Verlust-mutanten Keimlinge (*fugu5*) zeigen, dass eine Anreicherung des PP_i aufgrund der fehlenden V-PPase zu einer Reduktion der Zellvermehrung führt. Eine stabile Überexpression der V-PPase in einer Pflanze könnte demzufolge deren Entwicklungsprozesse beeinflussen und diese veränderte Entwicklung könnte sich wiederum auf spätere Messungen auswirken. Die hier durchgeführte transiente Transformation von *N. benthamiana* mit Agrobakterien geschah hingegen an ausdifferenzierten Mesophyllzellen, wodurch eine Interferenz mit Entwicklungsprozessen der Pflanze vermieden wurde. Ferner ermöglichte die Strategie der simultanen, aber separaten Expression von PPase und GFP die Identifizierung transformierter Zellen bei gleichzeitigem Erhalt der PPase-Funktion (Abbildung 19 und Abbildung 21). Letzteres wäre ansonsten bei C- oder N-terminalen Verknüpfung von GFP an die Protonenpumpe verloren gegangen (Segami et al. 2014).

4.3. Transporteigenschaften der V-PPasen

Die endgültige Bestätigung der Funktionalität der identifizierten NbVHP1 und NbVHP2 erfolgte durch die direkte Messung des Protonentransportes an der Vakuolenmembran mittels der *Patch-Clamp*-Technik. Infolge der transienten Überexpression der V-PPasen (AtVHP1, NbVHP1 oder NbVHP2) konnte die PP_i -induzierte Stromantwort gegenüber den Kontrollvakuolen, um das drei- bis vier-fache gesteigert werden (Abbildung 21). Nakanishi et al. (2003) konnte durch Expression von AtVHP1 in Hefezellen eine Stromantwort von 20 pA generieren und liegt damit allerdings 20-fach unter der in dieser Arbeit maximal-erzeugten Stromantwort (Abbildung 20 und Abbildung 21).

Aufgrund der bereits charakterisierten AtVHP1 (Drozdowicz et al. 2000; Kriegel et al. 2015; Maeshima 2000; Rea et al. 1992a; Segami et al. 2014) diente die Stromerhöhung der AtVHP1-Überexpressionsvakuolen zunächst als positive Bestätigung für das Messprotokoll (Abbildung 21). Eine weitere Bestätigung des Messprotokolls wurde mit Hilfe der inhibierenden Wirkung von Calcium erreicht, da PP_i und Calcium einen Komplex ($CaPP_i$) bilden, welchen die V-PPasen im Gegensatz zu $MgPP_i$ nicht in der Lage sind zu hydrolysieren (Maeshima 2000; Rea et al. 1992a). Auf diese Weise konnte sogar die Ca^{2+} -Abhängigkeit der endogenen V-PPasen in Tabakmesophyllvakuolen durch die erhaltenen Stromwerte der Kontrolle demonstriert werden (Abbildung 20). Der direkte Vergleich der Stromantworten der AtVHP1- oder den endogenen NbVHP-überexprimierende Zellen wies trotz der hohen Homologie in der Aminosäuresequenz eine signifikant geringere Stromantwort für AtVHP1-transformierte Vakuolen auf (Abbildung 21). Diese Diskrepanz könnte auf den Membranaufbau oder auf die Homodimerbildung zurückzuführen sein: Die Zusammensetzung der Vakuolenmembran von *N. benthamiana* könnte für die heterolog-exprimierte AtVHP1 eine beeinträchtigende Wirkung haben, im Gegensatz zu den homolog-exprimierten NbVHPs. Die Homodimerbildung der V-PPasen ist noch weitgehend unbekannt und unerforscht. Zwar ist die generelle Bildung der Dimerstruktur bestätigt (Lin et al. 2012), doch die Funktionsfähigkeit vereinzelter V-PPase-Einheiten also Monomere oder die Bildung von V-PPasen bestehend aus verschiedenen Isoformen ist bis heute ungeklärt. Bei der Überexpression von AtVHP1 im *N. benthamiana* Hintergrund könnte dies bedeuten, dass AtVHP1 möglicherweise nicht ausschließlich nur aus AtVHP1-Monomeren aufgebaut ist, sondern auch mit den endogenen bis zu 20 % divergierenden NbVHP1- und NbVHP2-Monomeren eine Dimerbildung eingehen kann. Ob solche „heteromere Dimere“ der V-PPasen unter diesen Versuchsbedingungen tatsächlich gebildet wurden und deswegen eine eingeschränkte Aktivität gemessen wurde, ist in dieser Arbeit nicht nachgewiesen worden. Eine

Möglichkeit, die Bildung solcher heteromerer Dimere zu untersuchen, wäre der Einsatz von BiFC- oder FRET-Konstrukten (engl. *Bimoleculare Fluorescenc Complementation* oder *Förster-Resonanz-Energie-Transfer*), durch die die Interaktion zweier Proteine *in vivo* bestätigt werden kann. Ohne eine Bestätigung oder Verneinung der heteromeren Dimer-Bildung unter diesen Versuchsbedingungen muss diese Möglichkeit als eine Erklärung für die Stromdifferenz von AtVHP1- und NbVHP1-überexprimierenden Vakuolen von *N. benthamiana* herangezogen werden. Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz in der AtVHP1- und NbVHP1-Aktivität nach Überexpression wäre eine unterschiedliche Codonverwendung (engl. *Codon Usage*) der beiden Spezies. Dies könnte bedeuten, dass die AtVHP1-DNA-Sequenz in Tabak schlechter transkribiert wird und dies im Vergleich zu den anderen überexprimierenden Zellen zu einer geringeren V-PPase-Proteinmenge in der Vakuole und damit zu einem geringeren Ionenpumpstrom führt.

Die nachgewiesene hohe V-PPase-Proteinmenge war allerdings noch keine Garantie, dass unter besonderen Umständen diese Proteinaktivität z.B. durch eine verstärkte Ansäuerung der Vakuole beeinflusst wurde. Während Duan et al. (2007) und Kriegel et al. (2015) den Einfluss der V-PPase auf den vakuolären pH beschrieben, wurde der Einfluss des vakuolären pH-Wertes auf die V-PPase-Aktivität vernachlässigt. Die hier für AtVHP1 und NbVHP1 ermittelten Dosis-Effekt-Kurven (Abbildung 33) zeigen, dass eine vakuoläre Ansäuerung von pH 7,5 auf pH 5,5 keine erheblichen Auswirkungen auf die Pumpaktivität hat, wie es auch von Scholz-Starke et al. (2019) für die UBQ::AVP1-Mutante von *A. thaliana* in diesem pH-Bereich gezeigt wurde. Die Erhaltung der Pumpaktivität spiegelt sich auch in den verhältnismäßig identischen K_m -Werten für sowohl AtVHP1- als auch für NbVHP1-Überexpressionsvakuolen wider. Zur Bestimmung der K_m -Werte für jeweils AtVHP1 und NbVHP1 wurden die erhaltenen Stromwerte pH-unabhängig zusammengefasst, da der Datenpunkt-Verlauf für beide pH-Bedingungen für die jeweilige Protonenpumpe übereinstimmte. Die daraus abgeleiteten K_m -Werte lagen bei 65 μM für NbVHP1 bzw. 70 μM PP_i für AtVHP1. Einen Vergleich dieser K_m -Werte mit bisher veröffentlichten Werten von 2 - 130 μM PP_i (Baykov et al. 1993; Gordon-Weeks et al. 1996; Maeshima 1991; Nakanishi et al. 2003) fällt dagegen aus unterschiedlichen Gründen schwer. Mit Ausnahme von Nakanishi et al. (2003) wurden alle K_m -Werte auf Basis der Hydrolyseaktivität von *Vigna radiata* oder *Beta vulgaris* extrahierten V-PPasen erhoben und können somit nur indirekt Rückschlüsse auf die tatsächliche Affinität zum Substrat geben. Einzig Nakanishi et al. (2003) ermittelte einen K_m -Wert von 4,6 μM PP_i auf der Basis des H^+ -Pumpstromes. Allerdings wurde hierzu die pflanzliche V-PPase (AtVHP1) in *S. cerevisiae* exprimiert, wodurch atypische posttranslationale Modifikationen und Membraneinflüsse nicht

abschätzbar sind. Die hier erhobenen K_m -Werte sind die ersten Daten direkt von der Pumpaktivität einer pflanzlichen V-PPase in der pflanzlichen Vakuole einer höheren Pflanze. Im Gegensatz zum AtVHP1- K_m -Wert von $4,6 \mu\text{M PP}_i$ (Nakanishi et al. 2003) lagen die in dieser Arbeit berechneten K_m -Werte von $65\text{-}70 \mu\text{M PP}_i$, innerhalb der physiologischen PP_i -Konzentration $50\text{-}390 \mu\text{M PP}_i$ von Pflanzenzellen (Jelitto et al. 1992; Rea and Sanders 1987; Weiner et al. 1987). Dies bedeutet, dass der Bedarf an PP_i selbst bei erhöhten V-PPase-Mengen (wie z.B. bei Salzstress) in der Vakuole gedeckt sein sollte. Die ausreichende PP_i -Menge in Mesophyllzellen von *N. benthamiana* bestätigte sich auch durch den signifikant erniedrigten pH-Wert in der Vakuole (Abbildung 32), der ohne eine dauerhaft erhöhte V-PPase-Pump- und damit H^+ -Hydrolyse-Aktivität nicht erlangt werden könnte. D.h. die hier ermittelten Transporteigenschaften lassen den Schluss zu, dass die Substrataffinität der V-PPasen auch bei pH-Änderungen der Zelle, wie unter Stressbedingungen nicht beeinträchtigt ist und die V-PPasen ohne eine drohende Unterversorgung mit PP_i ihre volle Transportkapazität ausschöpfen können.

4.4. Salzinjektion als Salzbehandlung

Salzstress mit NaCl, KCl oder anderen Salzen ist in der Literatur ein viel untersuchtes Forschungsthema und geschieht meist direkt durch Gießen von Salzlösungen oder durch salzhaltigen Keimungsmedien. Die Zeitspanne dieser Versuche geht von 3 Tagen bis hin zu mehreren Wochen (Duan et al. 2007; Gaxiola et al. 2001; Ghoulam et al. 2002; Krebs et al. 2010; Liu and Zhu 1997; Pasapula et al. 2011; Queirós et al. 2009; Zhao et al. 2006). Aufgrund dieses langen Zeitraumes war eine konventionelle Salzbehandlung für die kurze Wirkungsdauer der transienten Transformation der *N. benthamiana* nicht möglich. Die gewählte Methode der direkten Injektion der Salzlösung in den Blattapoplasten ermöglichte eine gezielte und schnelle Salzzugabe. Die Natriummessungen (Abbildung 23) und die Osmolalitätsmessungen (Abbildung 24) des Apoplasten nach drei Tagen bestätigten den Verbleib des Natriums im injizierten Blatt auf gleichem Niveau, wie eine vergleichbare über die Erde gewässerte Pflanze. Gleichzeitig sprachen diese Daten für die Aufnahme des Salzes in die Vakuolen der Blattzellen, da eine cytosolische Lagerung des Salzes aufgrund der Toxizität des Natriums ausgeschlossen werden konnte (Blumwald et al. 2000; Hall and Flowers 1973; Munns and Tester 2008; Yamaguchi et al. 2013).

Ob mit der Salzinjektion auch tatsächlich ein Salzstress bei der Pflanze verursacht wurde, konnte mit Hilfe des bekannten Salzstress-Indikators Prolin beantwortet werden (Ghoulam et

al. 2002; Gzik 1996; Liu and Zhu 1997; Tsugane et al. 1999). Die Aminosäure zeigte einen leichten Anstieg unter NaCl und bestätigte die Existenz einer Reaktion der Blätter auf das Salz (Abbildung 30). Allerdings waren keine weiteren salzstresstypischen Auswirkungen, weder auf die äußerliche Erscheinung (Abbildung 26), noch auf die Photosyntheseaktivität (Abbildung 27) oder auf weitere Bereiche des Metabolismus (Abbildung 35 bis Abbildung 41) nachzuweisen (Blumwald et al. 2000; Ghoulam et al. 2002; Hall and Flowers 1973; Tsugane et al. 1999; Tsunekawa et al. 2009). Aus diesem Grund mag hier der Begriff „Salzstress“ irreführend sein, da es sich wohl eher um eine „Salzbehandlung“ der Pflanzen handelte, die sich nicht wie eine langanhaltende Salzgabe negativ auf die Pflanze auswirkte.

4.5. Auswirkungen der Salzbehandlung auf die vakuoläre H⁺-Pumpaktivität

Die Einlagerung von Natrium in die Vakuole zur Detoxifikation des Cytosols geschieht durch den H⁺/Na⁺-Antiporter NHX (Apse et al. 1999) und ist somit direkt von der Stärke der PMF abhängig. Diese hängt wiederum von der Pumpaktivität der Protonen-Pumpen der Vakuole ab, also der V-ATPasen und V-PPasen. Es wurde bereits mehrfach in vergangenen Publikationen über den Zusammenhang zwischen der Pumpaktivität der beiden Pumpen unter Salzstress berichtet, allerdings ohne eine allgemeingültige Schlussfolgerung auf deren Aktivität ziehen zu können. Die in Tabelle 6 gezeigte Übersicht über die endogenen Pumpaktivitäten macht deutlich, dass die Stressreaktionen der Wildtyp-Pflanzen nicht nur pflanzenspezifisch (Gao et al. 2006), sondern auch gewebespezifisch (Fukuda et al. 2004) und sogar zeitspezifisch (de Lourdes Oliveira Otoch et al. 2001; Wang et al. 2001) ausfallen können. Auch die jeweilig verwendete Messmethode muss bei dem Vergleich berücksichtigt werden. Transkriptmessungen spiegeln nur den Einfluss des Salzes auf die Expression des Genes wider und Proteingele nur die vorhandene Proteinmenge. In beiden Fällen kann keine fundierte Aussage über mögliche posttranslationale Modifikationen und auch nicht über die Funktionalität der Pumpproteine getroffen werden. Hydrolyseaktivitätstests messen wiederum nur indirekt die Aktivität, indem sie über das hydrolysierte Phosphat Rückschlüsse auf die Proteinaktivität geben. Die dabei erhaltenen Ergebnisse könnten allerdings durch Kontamination anderer Membranen beeinflusst werden. Zudem spiegelt die Hydrolyseaktivität nicht zwingend die Pumaktivität der vakuolären Protonenpumpen wider. Eine Entkoppelung der Hydrolyse und des Protonentransports, welche mit unserem heutigen Wissensstand nicht ausgeschlossen werden kann, stellt die Schlussfolgerungen aus den Hydrolysemessungen bzgl. der Pumpaktivität infrage. Die Messung des relativen pH-Wertes über einen

Fluoreszenzfarbstoff ist die annähernd direkteste Methode zur Messung des Protonentransportes. Dafür werden Tonoplastenvesikel isoliert und mit einem pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff wie BCECF-AM (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein), Acridine-Orange (N,N,N',N'-Tetramethylacridine-3,6-diamine) oder ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine) inkubiert. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensität bzw. der Emissionswellenlänge der Farbstoffe vor und nach der gezielten Aktivierung der Protonenpumpen, lässt Rückschlüsse auf deren Pumpaktivität und Stärke ziehen. Die Schwierigkeit dieser Methode besteht allerdings in der Auswahl der Messlösung, um den Einfluss anderer Transporter auf den pH zu minimieren und Hintergrundfluoreszenzen zu vermeiden.

Eine exklusive Messung des Protonenpumpen-vermittelten Stroms über die Vakuolenmembran wäre mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik zwar möglich, ist aber bisher für salzgestresste Zellen nicht durchgeführt worden.

Tabelle 6: Publikationsauswahl zur Reaktion der vakuolären Protonenpumpaktivität auf Salz

Spezies (ggf. Gewebe)	V-PPase	V-ATPase	NaCl- Konzentration	Nachweis über	Publikation
<i>Acer pseudoplatanus</i> Zellkultur	Anstieg	Anstieg	80 mM	Hydrolyseaktivität	Zingarelli et al. (1994)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Anstieg	k.A.	50 & 100 mM	Hydrolyseaktivität	Krebs et al. (2010)
	unverändert	k.A.	200 mM	Transkriptanzahl	Gao et al. (2006)
<i>Cucumis sativus</i>	Rückgang	kurzfristig Anstieg Langfristig Rückgang	50 mM	Hydrolysetest, Transkriptanzahl, Proteinmenge	Kabała and Kłobus (2008)
<i>Daucus carota</i> Zellkultur	Anstieg	unverändert	50 mM	Hydrolyseaktivität	Colombo and Cerana (1993)
<i>Helianthus annuus</i> Wurzel	Anstieg	Anstieg	150 mM	Hydrolyseaktivität	Ballesteros et al. (1996)
<i>Hordeum vulgare</i> Wurzel	Anstieg in Wurzel	unverändert bis geringer Anstieg	100 mM	pH, Transkriptanzahl	Fukuda et al. (2004)
<i>Hordeum vulgare</i> Blatt	unverändert im Blatt	unverändert im Blatt			
<i>Iris lactea</i>	Anstieg	k.A.	50 – 200 mM	Transkriptanzahl	Meng et al. (2017)
	Rückgang	Anstieg	400 mM	Hydrolyseaktivität	Bremberger and Lüttge (1992)

Diskussion

<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	k.A.	Anstieg	200 mM	pH, Hydrolyseaktivität	Barkla et al. (1995)
	k.A.	Anstieg	100-400 mM	Proteinmenge	Rockel et al. (1994)
	k.A.	Anstieg	200 mM	Hydrolyseaktivität	Vera-Estrella et al. (1999)
<i>Nicotiana tabacum</i> Zellkultur	k.A.	Anstieg	428 mM	Proteinmenge, pH	Reuveni et al. (1990)
<i>Salicornia bigelovii</i>	Anstieg	k.A.	5 & 200 mM	pH, Hydrolyseaktivität	Parks et al. (2002)
<i>Solanum tuberosum</i> Zellkultur	Anstieg	Anstieg	150 mM	pH, Hydrolyseaktivität	Queirós et al. (2009)
<i>Suada. salsa</i>	unverändert	unverändert	200 mM	Hydrolyseaktivität	Guo et al. (2006)
	k.A.	Anstieg	100-400 mM	Hydrolyse-, Pumpaktivität	Qiu et al. (2007)
	Zeitabhängig bei 0,4 M Anstieg bei 0,1 M NaCl	Anstieg	100-400 mM	Hydrolyseaktivität	Wang et al. (2001)
<i>Thellungiella halophila</i>	Anstieg	k.A.	200 mM	Transkriptanzahl	Gao et al. (2006)
<i>Vigna mungo</i> Wurzel	Rückgang	Anstieg	100 mM	Hydrolyseaktivität	Nakamura et al. (1992)
<i>Vigna unguiculata</i>	Rückgang	kurzfristig Rückgang langfristig Anstieg	100 mM	Proteinmenge, Hydrolyseaktivität	de Lourdes Oliveira Otoch et al. (2001)

k.A. = keine Angabe

Grundsätzlich besteht ein breiter Konsens in der Wissenschaft über die entscheidende Rolle der V-PPase für die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber Salz und anderen Stressfaktoren wie Trockenheit (Tabelle 1, Kap. 1.3.2). Die Regulation dieses Proteins und die Kontrollebene in der Pflanze sind dagegen noch weitestgehend unbekannt. Zwar deuten einige bereits publizierte Ergebnisse darauf hin, dass die V-PPase-Regulation über die Expressionsrate, also auf Transkriptebene, verläuft, weitere – möglicherweise spezie-abhängige – posttranslationale Mechanismen können aber nicht ausgeschlossen werden. Gao et al. (2006) begründete die Salztoleranz bestimmter Pflanzen über deren erhöhte Expressionsrate der V-PPase. Unabhängig von der Ursprungspflanze der V-PPase bewirkten *AtVHPI* oder *TsVP* (= V-PPase aus *Thellungiella halophila*) unter der Kontrolle des 35s-Promotors in *Nicotiana tabacum* Pflanzen die gleiche gesteigerte Toleranz gegenüber Salz. Queirós et al. (2009) zeigte eine erhöhte V-PPase-Proteinmenge in der Vakuole bei salztoleranten Zellen. Ob der Anstieg durch eine erhöhte Transkriptionsrate, eine posttranslationale Modifikation oder durch eine modifizierte Lebensdauer des Proteins unter Salz verursacht wurde, blieb dagegen offen. Ein unverändertes Transkriptlevel zwischen NaCl-behandelten und Kontroll-Gurkenzellen bei

veränderter Pumpaktivität lässt Kabała and Kłobus (2008) dagegen auf posttranslationale Abwandlungen des Proteins schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur ein Anstieg der V-PPase-Menge mit Hilfe von Transkriptdaten der endogenen *NbVHP1* und *NbVHP2* 72 Stunden nach Salzbehandlung nachgewiesen (Abbildung 29), sondern auch direkt über die Pumpaktivität an der Vakuolenmembran (Abbildung 31). Diese *Patch-Clamp*-Messungen an salzbehandelten Pflanzen sind, soweit bekannt, zum ersten Mal durchgeführt worden, weswegen sich ein direkter Vergleich mit bereits publizierten elektrophysiologisch erhobenen Daten nicht möglich ist. Dennoch reiht sich der erhöhte Pumpstrom der V-PPase unter Salzbehandlung zu dem bereits mehrfach beobachteten Anstieg der Transkriptmenge, der Hydrolyseaktivität oder der über pH-Indikatoren gemessene Pumpaktivität der V-PPase in verschiedensten Pflanzen ein (Ballesteros et al. 1996; Colombo and Cerana 1993; Fukuda et al. 2004; Gao et al. 2006; Parks et al. 2002; Queirós et al. 2009; Wang et al. 2001; Zingarelli et al. 1994). Eine postrtranslationale Modifikation als Ursache für den hier gezeigten Stromanstieg bei salzbehandelten Zellen konnte aus zwei Gründen durch meine Experimente weitgehend ausgeschlossen werden. Zum einen stieg die Expressionsrate zusammen mit dem Stromniveau. Zum anderen wurde zwischen salzbehandelten und -unbehandelten *NbVHP1*-überexprimierten Vakuolen keine zusätzliche Stromerhöhung beobachtet (Abbildung 31), was ansonsten bei posttranslationalen Modifikation der V-PPase durch die Salzbehandlung zu erwarten gewesen wäre. Vielmehr könnte die Stagnation der Stromantwort bei *NbVHP1*-überexprimierenden Vakuolen nach Salzbehandlung damit erklärt werden, dass durch die Überexpression schon die maximale Anzahl an V-PPasen in die Vakuolenmembran eingebaut wurde und eine weitere Steigerung der V-PPase-Menge in der Vakuole nicht möglich ist. Eine Regulation der V-PPase auf genomischer Ebene ist daher am nachvollziehbarsten und wahrscheinlichsten.

Eine elektrophysiologische Vermessung der V-ATPase in Tabakmesophyllzellen ergab statistisch gesehen keine signifikante Änderung in der Pumpaktivität nach Salzbehandlung (Abbildung 31), wenn auch eine tendenzielle Abnahme vorzuliegen schien. Mit Ausnahme von Colombo and Cerana (1993) widerspricht dieser Befund den Ergebnissen aller anderen Publikationen aus Tabelle 6. Die Ergebnisse dieser Publikationen beruhen allerdings auf Hydrolyseaktivitätsmessungen und indirekter Pumpaktivität mittels pH-Fluoreszenzfarbstoffen, welche z.B. wie oben schon angesprochen wurde durch verunreinigte Membranen verfälscht sein könnten, und nicht auf den direkten Protonenpumpstrom einer einzelnen Vakuole wie in dieser Arbeit. Eine weitere Ursache für die Diskrepanz der hier bestimmten V-

ATPase-Aktivität zu den publizierten Ergebnissen könnten die untersuchten Pflanzenspezies sein. Halophyten, wie *M. crystallinum*, *S. Salsa* oder *T. salsuginae*, könnten die V-ATPase unter anderen Transkriptionsfaktoren exprimieren als *N. benthamiana*. Zudem sind auch pflanzenspezifische posttranslationale Modifikationen möglich, welche die unterschiedlichen V-ATPase-Aktivitätsänderungen der einzelnen Spezies unter Salz erklären könnten (Barkla et al. 1995; Kabała and Kłobus 2008; Qiu et al. 2007). Darüber hinaus scheint auch der Zeitpunkt der Messung nach Salzbehandlung eine bedeutende Rolle für die V-ATPase-Aktivität zu spielen (Kabała and Kłobus 2008; de Lourdes Oliveira Otoch et al. 2001). Kabała and Kłobus (2008) untersuchten die V-ATPase-Aktivität nach einem, vier und acht Tagen nach Start der Salzbehandlung mit 50 mM NaCl und konnten nur am 1. Tag einen leicht erhöhten V-ATPase-Protonentransport (mittels Acridine Orange) nachweisen. Für alle weiteren Tage nahm die V-ATPase-Aktivität deutlich gegenüber den Kontrollzellen ab.

Die in dieser Arbeit direkt gemessenen Protonentransportströme verdeutlichen die Rolle der V-PPase bei Salzstress. Für die Entgiftung des Cytosols von Natriumionen greift ein Transporter des NHX-Typs auf die PMF zurück und reduziert sie dadurch (Apse et al. 1999; Jiang et al. 2010; Queirós et al. 2009; Yamaguchi et al. 2013; Zhao et al. 2006). Für die Aufrechterhaltung der PMF trotz H^+/Na^+ -Antiports über die Vakuolenmembran sind die *N. benthamiana* Pflanzen offenbar auf die V-PPase angewiesen, da der V-ATPase-Pumpstrom unter diesen Bedingungen keine Aktivitätszunahme zeigt und vielmehr tendenziell verringert war. Die Rolle der V-PPase unter Kontrollbedingungen scheint dagegen gering zu sein, was durch den schwachen bzw. kompensierbaren Phänotyp der V-PPase-Verlustmutante *fugu5* von *A. thaliana* unter Standardbedingungen zu erkennen ist (Ferjani et al. 2011).

4.6. Nekrosenbildung als Folge einer extremen V-PPase Überexpression

Die Fähigkeit der V-PPase zur Erhaltung der PMF beschränkt sich allerdings nicht nur auf Salzstress. Wie in zahlreichen Publikationen (vgl. Tabelle 1; Kapitel 1.3.2) gezeigt wurde, bewirkt eine stabile Überexpression einer V-PPase in den unterschiedlichsten Pflanzen, wie der Ackerschmalwand (*A. thaliana*), Reis (*O. sativa*), Gerste (*H. vulgar*), Baumwolle (*G. hirsutum*), Pappel (*P. trichocarpa*), Tomate (*L. esculentum*) und Tabak (*N. tabacum*) eine verbesserte Toleranz gegen Salz, Kälte und Trockenheit (Duan et al. 2007; Gao et al. 2006; Gaxiola et al. 2001; Park et al. 2005; Pasapula et al. 2011; Schilling et al. 2014; Yang et al. 2015; Zhao et al. 2006). Trotz dieser vielen Studien von stabil V-PPase-überexprimierenden

Pflanzen wurden, soweit bekannt, nie schädliche Auswirkungen für die Pflanze beschrieben. Die in dieser Arbeit beobachteten nekrotischen Blattareale 72 Stunden nach V-PPase-Transformation sind bisher einmalig und waren nicht nur für das bloße Auge erkennbar (Abbildung 26), sondern waren auch durch eine verringerte Photosyntheseleistung (Abbildung 27) oder ein verringertes Plasmamembran-Potential (Abbildung 34) quantifizierbar.

Segami et al. (2014) markierte als erster erfolgreich AtVHP1 mit einem Fluoreszenzfarbstoff (mGFP) ohne einen Funktionsverlust zu erzielen. Mit Hilfe dieses AtVHP1-mGFP-Fusionskonstruktes konnten die Autoren ferner bei starker Überexpression in *A. thaliana* unter anderem eine Fehllokalisierung der V-PPase in die Plasmamembran zeigen. Solch eine Delokalisierung der V-PPase könnte ursächlich für die sinkende Zellvitalität bei extremer Überexpression von V-PPasen in *N. benthamiana* sein. Allerdings konnte die Delokalisierung als Ursache ausgeschlossen werden, da eine fehlende Fluoreszenz der Plasmamembran in NbVHP1-mGFP transient transformierten *N. benthamiana* Mesophyllzellen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 18).

Eine Überexpression der V-PPase könnte auch einen starken Einfluss auf den PP_i - und P_i -Haushalt der Zelle haben und damit Veränderungen im Metabolismus erzeugen. Der Einfluss von V-PPasen auf den PP_i -Haushalt der Zellen ist bereits mehrfach bewiesen worden. So sorgt die V-PPase durch die Reduktion des PP_i in *A. thaliana* Pflanzen für eine Toleranz gegenüber hohen Magnesiumkonzentrationen (Yang et al. 2018). Während weitere evtl. negative Folgen für Pflanzen durch PP_i -Mangel bisweilen unbekannt sind, resultierte die Anreicherung von PP_i im Phänotyp der V-PPase-Verlustmutante-Linie *fugu5*. Dieser Phänotyp konnte durch eine lösliche PPase aus Hefe (IPP1) erfolgreich komplementiert werden (Ferjani et al. 2011). Die Reproduktion der Nekrosen durch die transiente Überproduktion der IPP1 in *N. benthamiana* Blättern schlug allerdings fehl (Abbildung 26). Eine übermäßige Anreicherung von P_i im Cytosol konnte daher als Grund für das Absterben der Zellen ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnte ein potenzieller negativer Einfluss der NbVHP-Überexpression auf den Metabolithaushalt nicht bestätigt werden. Es konnte keine Änderung der organischen Säuremenge (Malat, Citrat, Fumarat oder Succinat) festgestellt werden, welche wichtige Bestandteile des Glyoxylatzykluses und des Citratzykluses sind (Ferjani et al. 2011). Auch von den ausgewählten Anionen, Kationen und Aminosäuren (Chlorid, Fluorid, Nitrat, Phosphat, Sulfat, Ammonium, Calcium, Kalium, Magnesium, Natrium, Alanin, Prolin, Valin, Arginin, Aspartat, Glutamat, Histidin, Asparagin, Glutamin, Glycin, Serin, Threonin und Tyrosin) wurde keine Veränderung durch die Überproduktion von NbVHP1, NbVHP2 oder IPP1 registriert

(Kap. 7.1). Selbst die Konzentrationen von Saccharose, Fructose und Glucose, welche an der photosyntheseabhängigen Herstellung von Saccharose aus Malat mit Hilfe von Fructosederivaten und Glucose unter Generierung von PP_i beteiligt sind (Ferjani et al. 2011), wiesen kaum bis keine Abweichungen auf (Abbildung 30, Abbildung 35 bis Abbildung 41). Aufgrund der IPP1-Kontrolle und der Metabolitdaten blieben als Auslöser für die nekrotischen Zellen bei NbVHP-Überexpression nur der Protonentransport des Enzyms und damit die vakuoläre Ansäuerung. In der Tat konnte mit Hilfe eines pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes die signifikant stärkere Ansäuerung der Vakuole durch die erhöhte V-PPase-Expression in *N. benthamiana* bestätigt werden (Abbildung 32). Diese Abnahme im vakuolären pH-Wert um 0,3 erschien zunächst äußerst gering und kaum verantwortlich für einen derart starken Phänotyp zu sein. Doch im Vergleich zu anderen Arbeiten wie Duan et al. (2007) und Kriegel et al. (2015), bei denen trotz stabiler AtVHP1-Überexpressionslinie keine zusätzliche Ansäuerung der Vakuolen zu beobachten war, weist die hier beobachtete Reduktion des vakuolären pH-Wertes um 0,3 pH in den NbVHP1-transformierten Zellen auf eine extrem außergewöhnlich starke V-PPase-Aktivität hin. Trotz der fehlenden vakuolären Ansäuerung unter Standardbedingungen führte eine bis zu fünf-fach erhöhte V-PPase-Hydrolyse bei Kriegel et al. (2015) nur zu geringen Auswirkungen auf den Phänotyp, während bei Duan et al. (2007) die relativ schwache Überexpression von 33% von AtVHP1 in Tabak eine stärker negative vakuoläre Membranspannung bewirkte.

Weiterhin verursachte der starke Protonenpumptransport aus dem Cytoplasma in die NbVHP1-überexprimierten Vakuole keine Alkalisierung des cytosolischen pHs. Ähnliche Beobachtungen wurden mit den stabil PPase-exprimierenden *N. tabacum* Mesophyllzellen (Duan et al. 2007) gemacht. Eine stabile cytosolische Protonenkonzentration ist von enormer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität und für einen funktionierenden Metabolismus der Zelle, weswegen das Cytosol ein belastbares Puffersystem gegen pH-Schwankungen besitzt (Raven and Smith 1978). Da eine pH-Messung an nekrotischen Zellen nicht möglich war, geben die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten (Abbildung 32) den Zustand kurz vor der Entstehung der Nekrosen wider. Eine schnelle starke Alkalisierung des cytosolischen pH-Wertes der Zellen könnte demnach theoretisch auch für die Nekrosenbildung ursächlich gewesen sein. Dies erscheint allerdings als äußerst unwahrscheinlich, da z.B. die P₁-typ-ATPase in der Plasmamembran der V-PPase-verursachten Ansäuerung aktiv gegensteuern könnte (Pedersen et al. 2012).

Dennoch stellt sich die Frage, warum diese Nekrosen trotz der vielfältigen Studien zur V-PPase-Überexpression bisher nie in der Literatur beschrieben wurden (vgl. Tabelle 1). In erster Linie sind alle vorangegangenen Studien mit V-PPase-Überexpression hauptsächlich an stabil transformierten Pflanzenlinien erfolgt. Da allerdings vermutet wird, dass die V-PPase während der Entwicklung eine erhebliche Rolle spielt, könnte bei stabilen Überexpressionslinien dies von Beginn an zu einer pleiotropischen Adaption führen. Dieser Effekt könnte für eine Kaschierung negativer Auswirkungen der V-PPase-Erhöhung verantwortlich sein oder sogar über Transkriptionsfaktoren zur Senkung der V-PPase-Expression auf ein für die Zelle erträgliches Niveau führen. Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten transiente Transformation ausdifferenzierter Mesophyllzellen, konnte dagegen ein solcher entwicklungsabhängiger Effekt mit hoher Wahrscheinlichkeit verhindert und ausgeschlossen werden.

Durch die transiente Transformation konnte auch eine Überexpression von 300% im Vergleich zu Kontrollpflanzen erzeugt werden (Abbildung 21) und dies direkt anhand des generierten Protonenpumpstroms nachgewiesen werden. Viele der veröffentlichten V-PPase-Überexpressionen wurden hingegen nur auf mRNA- oder Protein-Ebene wie z.B. qPCR, Southern- oder Westernblot bestätigt und sogar nur selten quantifiziert (Arif et al. 2013; Bao et al. 2009; Brini et al. 2006; Chen et al. 2015; Dong et al. 2011; Gaxiola et al. 2001; Khadilkar et al. 2016; Khoudi et al. 2012; Park et al. 2005; Pasapula et al. 2011; Schilling et al. 2014; Yang et al. 2015; Zhao et al. 2006). Infolge einer konstitutiven Expression von AtVHP1 unter dem 35s-Promotor in *A. thaliana* erzeugte Khadilkar et al. (2016) eine Überexpression von 900 % auf Transkriptebene. Es wurde hier allerdings nicht die Pumpaktivität kontrolliert. Dass diese Proteinaktivität nicht in Relation mit der Expression steht, wurde bei Yang et al. (2015) deutlich, wo eine 250%ige Steigerung der V-PPase-mRNA bei *Populus trichocarpa* nur in einer 20%igen Steigerung der Hydrolyseaktivität resultierte. Guo et al. (2006) bestätigte zwar einen erhöhten V-PPase-Proteingehalt zusammen mit gesteigerter Trocken- und Salztoleranz in *A. thaliana*, ohne eine erhöhte Hydrolyseaktivität unter Standardbedingungen zu erfassen. In einigen Fällen wurde die Hydrolyseaktivität der erzeugten stabilen V-PPase-Überexpressionslinien kontrolliert, wobei ein maximaler Anstieg von 20-80 % nachgewiesen werden konnte (Gao et al. 2006; Lv et al. 2008, 2009; Park et al. 2005; Yang et al. 2015; Zhang et al. 2011). Die erfolgreiche V-PPase-Überexpression zeigte sich dagegen in der Regel durch erhöhte Biomasse, Salz- und/oder Trockentoleranz. Kriegel et al. (2015) und Asaoka et al. (2016) haben zwar einen Anstieg von 200% bis 300% bei der V-PPase-Hydrolyseaktivität von UBQ::AtVHP1-Pflanzen gemessen, konnten allerdings nicht den typischen Zuwachs in der

Biomasse bei diesen Pflanzen beobachten. Betrachtet man Gao et al. (2006) und Duan et al. (2007), welche beide mit den gleichen transienten *N. tabacum*-Überexpressionslinien arbeiteten (*TsVP* bzw. *AtVHPI* in *N. tabacum*), relativieren sich die Auswirkungen der Überexpression. Während Gao et al. (2006) in *A. thaliana* V-PPase-Überexpressionslinien sowohl auf Proteinebene als auch durch Hydrolystests eine V-PPase-Aktivitätsteigerung von 30-40% bestätigte, konnte Duan et al. (2007) für die gleichen Linien keine Absenkung des vakuolären pHs beobachten. Beide bestätigten jedoch eine erhöhte Salztoleranz dieser Pflanzen aufgrund der Überexpression.

Unter Berücksichtigung, dass eine gesteigerte Hydrolyseaktivität nicht zwangsläufig einen gesteigerten Protonentransport der V-PPase zur Folge hat, bedeutet dies, dass keine der bisher veröffentlichten Überexpressionslinien eine 300%ige Erhöhung in der Pumpaktivität der V-PPase nachweisen konnte. Diese extreme Form der V-PPase-Überexpression in dieser Arbeit scheint daher bisher noch nie vorgekommen zu sein und damit auch die daraus resultierenden Nekrosen. Während bis zu diesem Zeitpunkt jegliche Erhöhung der V-PPase-Aktivität sich ausschließlich vorteilhaft auf das Wachstum, die Fruchtbildung oder die Toleranz gegen Trockenheit, Salzstress und Kälte auswirkte (Tabelle 1, Kap. 1.3.2), belegen die hier gezeigten Nekrosen die Existenz einer sich negativ auswirkenden V-PPase-Überdosis.

4.7. Salzbehandlung verhindert V-PPase induzierte Nekrosen

Die erfolgreiche Erhöhung des V-PPase vermittelten Protonenpumpstroms (Abbildung 21) erzeugte eine verstärkte PMF, was anhand der gleichzeitig einhergehenden Ansäuerung der Vakuolen (Abbildung 32) auch im Blatt dokumentiert werden konnte. Eine verstärkte PMF bedeutet eine gleichzeitige Veränderung des elektrischen als auch chemischen Gradienten, wobei jedoch in dieser Arbeit die auftretenden Nekrosen 72 h nach Transformation nicht spezifisch auf einen dieser veränderten Gradienten zurückgeführt werden konnte. Allerdings konnte die Bildung der Nekrosen durch die zuvor beschriebene NaCl-Behandlung (vgl. Abbildung 26; Abbildung 28; Kapitel 4.4 und 3.4) verhindert werden. Dieser antagonistische Effekt der Salzgabe auf die Nekrosenbildung war dabei nicht nur auf die Gabe von 200 mM NaCl beschränkt, sondern konnte auch durch äquivalente Mengen KCl hervorgerufen werden. Beide Salze erzeugen zwei unterschiedliche Stressformen, osmotischen und ionenspezifischen Stress (Blumwald et al. 2000). Während allerdings durch die Aufnahme der Salzionen in die Zelle der osmotische Effekt zeitlich begrenzt war, konnte durch den Einsatz von membran-

impermeablen Ionen, wie Gluconat der osmotische Druck dauerhaft aufrechterhalten werden. Die Na- bzw. K-Gluconat-injizierten Blätter trockneten aufgrund des stark erhöhten osmotischen Potentials im Apoplasten vollkommen aus, und zwar unabhängig vom eingesetzten Kation. Dies konnte auch durch eine Überexpression der V-PPase nicht verhindert werden (Abbildung 28). Es konnte demzufolge davon ausgegangen werden, dass der osmotische Stress im Apoplasten nach NaCl- bzw. KCl-Injektion zügig von der Pflanze durch Aufnahme der Salzionen abgebaut wurde. Erst durch die starke Aufnahme der Salzionen über die Plasmamembran aus dem Apoplasten wurde der ionenspezifische Stress für die Pflanze initiiert. Dies bedeutet für den Versuchsaufbau in dieser Arbeit, dass trotz simultaner Injektion der Salzionen und der Agrobakterien die starke V-PPase-Überexpression der Zellen erst nach dem Abklingen des osmotischen Stresses erreicht wurde. Demzufolge konnte bei V-PPase-Überexpression nur der ionenspezifische Stress als Ursache für die Unterdrückung der Nekrosen in Frage kommen. Dieser Stress äußert sich dadurch, dass die Zelle die Anreicherung der Natriumionen und des Chlorids im Cytoplasma vermeiden muss, um ihren Metabolismus aufrecht erhalten zu können. Während ein Export der Ionen in den Apoplasten nur das Problem kurzzeitig löst, stellt die Einlagerung der Ionen in die Vakuole eine dauerhafte Lösung dar. Für diese Einlagerung stehen in der Vakuolenmembran Antiporter wie der H^+/Cl^- -Transporter CLC und der Na^+/H^+ - bzw. K^+/H^+ -Transporter NHX zur Verfügung (Apse et al. 1999; Blumwald et al. 2000; Carpaneto et al. 2017; De Angeli et al. 2006; von der Fecht-Bartenbach et al. 2010; Martinoia 2018; Yamaguchi et al. 2013). Deren Effektivität hängt allerdings wiederum von den in der Vakuole angereicherten Protonen und der damit verbundenen PMF der Vakuole ab, welche wiederum durch Protonenpumpen generiert wird (Gaxiola et al. 2007; Johannes and Felle 1990; Maeshima 2000; Martinoia et al. 2007). Der Transport der Salzionen über den Tonoplasten bedeutet demzufolge PMF-Senkung der Vakuole und gleichzeitig ein verstärkter Import von Protonen in das Cytosol. Wie bereits in Kapitel 4.5 diskutiert wurde, erhöhten selbst Kontrollpflanzen die V-PPase-Transportrate unter Salzbehandlung, um die sinkende PMF auszugleichen oder die cytotoxischen Wirkung der Natriumionen entgegenzuwirken, ist allerdings ungeklärt. Diese endogene Pumpaktivitätssteigerung betrug allerdings „nur“ 70 %, wohingegen sie in V-PPase-überexprimierenden Zellen um 300 % betrug (Abbildung 31). Da die Salzzugabe die nekrotischen Auswirkungen erfolgreich verhindern konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die indirekte Reduktion der PMF bzw. die H^+ -Reduktion in der Vakuole stark genug war, um den nekrotischen Phänotyp abzuwenden. Eine vollständige Regeneration bzw. Abwendung der negativen Überexpressionsfolgen konnte durch Salz aber nicht bewirkt werden. Während Photosyntheseaktivitätsmessungen (Abbildung 27) keinen

Unterschied zwischen Kontroll- und V-PPase-Pflanzen enthüllten, deckten die Plasmamembran-Potentialmessungen die unvollständige Regeneration auf. Bei einer vitalen Pflanzenzelle liegt das Plasmamembranpotential bei ca. -150 mV (Roelfsema et al. 2001; Thiel et al. 1992) wie es auch für die Kontrollzellen mit -152 mV hier in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde (Abbildung 34). Das Potential in V-PPase-überexprimierten Zellen kurz vor dem Absterben lag hingegen bei -85 mV. Ob dieser Anstieg die Nekrosen letztendlich auslöste oder nur das beginnende Absterben der Zellen anzeigte, ist nicht geklärt. Es steht jedoch fest, dass die simultane Behandlung mit NaCl diesen Depolarisationseffekt signifikant abschwächte, wodurch sich das Membranpotential um +50 mV auf +135 mV erhöhte. Eine vollkommene Repolarisation auf das ursprüngliche Potenzial von -152 mV bei V-PPase-überexprimierenden salzbehandelten Zellen wurde zwar nicht beobachtet, aber die salzinduzierte Potenzialsenkung um 50 mV reichte offenbar im Beobachtungsfenster aus damit die Minderung des Membranpotenzials für die Pflanze bei V-PPase-Hyperaktivität im ertragbaren Rahmen blieb (Abbildung 34).

Eine derartige Potenzialsenkung muss nicht zwangsläufig durch die Aufnahme von Natrium über einen Protonen-Antiporter erzeugt werden, sondern könnte auch über viele andere Protonen-Transportprozesse an der Vakuolenmembran verursacht werden und diesen positiven Effekt auf die Zellvitalität unter extremer Überexpression von V-PPasen haben. Die Einlagerung von Zucker wie Fructose, Glucose und Saccharose in die Vakuole geschieht z.B. über Transporter der TMT-, VGT- und ERDL-Familie und ist somit direkt von der PMF abhängig (Aluri and Büttner 2007; Jung et al. 2015; Klemens et al. 2014; Martinoia 2018; Schulz et al. 2011). Eine verstärkte Einlagerung von Zucker in die Vakuole über diese Transporter, wie es unter Kälte geschieht, könnte eine ähnliche Auswirkung wie die Salzioneninjektion aufweisen. Tatsächlich zeigten V-PPase-überexprimierende Blätter bei 4 °C keine nekrotischen Bereiche, sondern entsprachen denen von Kontroll-Pflanzen (Daten nicht gezeigt). Auch die Speicherung bzw. Detoxifikation von (Schwer-)Metallen, wie Zink (MTPs und IREGs), Nickel, Mangan, Cobalt, Aluminium und Eisen findet unter Protonenantiport durch MTP-, IREG-, CAX- oder VIT-Transporter über den Tonoplasten statt (Hirschi 2004; Martinoia 2018; Shitan and Yazaki 2013). Ob allerdings eine Stressbelastung mit den entsprechenden Metallen sich genauso positiv auf die Zellvitalität der V-PPase-Überexprimierenden Blätter auswirkt, ist fraglich, da für eine merkliche Senkung der PMF eine enorme Anzahl dieser Metallionen über die Vakuolenmembran transportiert werden müsste.

4.8. Die V-PPase – unterschätztes Protein der Vakuole

Die Tatsache, dass in der pflanzlichen Vakuolemembran zwei unterschiedliche Protonenpumpen simultan existieren und arbeiten (Gaxiola et al. 2007; Hedrich et al. 1989; Maeshima et al. 1996; Viotti 2014), stellte bisher für die Wissenschaft ein Rätsel dar. Die V-ATPase schien in Experimenten die stärkere und für die vakuoläre Ansäuerung bedeutendere und essenziellere Protonenpumpe zu sein (Hedrich et al. 1989; Krebs et al. 2010; Kriegel et al. 2015; Schumacher and Krebs 2010). Die geringen Beeinträchtigungen der *A. thaliana* Verlustmutante *fugu5* unter Standardbedingungen (Ferjani et al. 2007, 2011) scheint diese Einschätzung zu bestätigen. Allerdings weist die vier-fach erhöhte Proteinmenge der V-PPase gegenüber der V-ATPase in der Mungbohne auf eine enorme Bedeutung der V-PPase hin (Maeshima 2000).

Warum investieren Pflanzen demnach so viel Energie in die Bildung der kleinen, unbedeutenden V-PPase?

Durch die Überexpression von V-PPasen in verschiedenen Pflanzen und deren Auswirkung auf die Stresstoleranz und Produktivität der Pflanzen erhielt man erste Hinweise für deren physiologische Bedeutung (Tabelle 1). Die V-PPase erlaubt den Pflanzen ihre Toleranz gegen bestimmte abiotische Umwelteinflüsse zu steigern. Die Hoffnung mit Hilfe der V-PPase einen Großteil der landwirtschaftlichen Probleme der Welt zu beseitigen, indem man entsprechende transiente Pflanzen generiert, war geboren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie unter Salzbehandlung die endogenen V-PPasen von der Pflanze hochreguliert wurden, während die V-ATPase gleichzeitig eher ihre Aktivität verringerte. Die vakuoläre PPase würde demzufolge zu einem Nothelfer in schweren Zeiten zur Aufrechterhaltung der fundamentalen PMF werden.

Doch bereits der berühmte Arzt Paracelsus schrieb 1538 (Holzinger 2013):

*„Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift;
allein die dosis machts, daß ein Ding kein Gift sei.“*

Auch die V-PPase ist keine Ausnahme dieser Regel, da selbst dieser scheinbar „kleine Retter“ durch extreme Überproduktion ohne Notwendigkeit das Zellsterben einleiten kann. Für die Erwartungen an die V-PPase als Grundlage für stresstolerantere Pflanzen setzt diese Erkenntnis zwangsläufig eine Regulation dieses Proteins voraus. Gerade in stressfreien Zeiten ist eine Prävention der negativen Rückkopplung auf die Zellvitalität notwendig. Genau betrachtet

setzen Pflanzen diese Steuerung bereits in die Tat um, indem sie unter normalen Bedingungen die V-PPase-Aktivität wahrscheinlich über ein niedriges Expressionsniveau drosseln und unter Stress die Expression auf ein erhöhtes, akzeptables Niveau steigern. Noch erreicht die Expression der V-PPase in stabil-transformierter Pflanzenlinien nicht das Level der hier erzeugten transienten Zellen, dennoch konnte durch diese Arbeit schon ein Maximum für die V-PPase-Expression unter Standardbedingungen festgestellt werden. Inwieweit sich dieses Maximum durch anhaltende Stressbedingungen noch erhöhen lässt und wann selbst eine extrem starke V-PPase-Überexpression keine positiven Effekte unter Stressbedingungen für die Pflanze mehr aufweist, bleiben spannende Fragen für zukünftige Forschungsarbeiten. In Anbetracht der Abnahme an nutzbaren Ackerflächen und Zunahme von versalzten Böden auf der Welt könnte die V-PPase dennoch eines der wichtigsten Werkzeuge zur Generierung Stress-toleranterer Agrarpflanzen für die Menschheit werden.

5. Zusammenfassung

Vakuoläre PPasen (V-PPase) in Landpflanzen dienen dem Transport von Protonen in die Vakuole und dem Aufbau eines elektrochemischen Gradienten, während sie gleichzeitig durch Hydrolyse eine Anreicherung des toxischen PP_i im Cytosol verhindern. Zahlreiche Publikationen bewiesen bereits positive Effekte der stabilen V-PPase-Überexpression in Pflanzen. Unter anderem zeigte die Ackerschmalwand, Tabak, Reis und Tomate eine erhöhte Biomasse und gesteigerte Stresstoleranz auf Grund einer erhöhten stabilen V-PPase Expression. Um die zugrundeliegenden Prozesse ohne potenzielle pleiotropische Effekte während der Pflanzenentwicklung zu analysieren, wurden in der vorliegenden Dissertation die physiologischen Auswirkungen einer transienten V-PPase-Überexpression in *Nicotiana benthamiana* Blättern und die Einflussnahme von NaCl quantitativ erfasst.

Zu diesem Zweck wurden zwei endogene V-PPasen (NbVHP1 und NbVHP2) aus *N. benthamiana* zunächst bioinformatisch und dann auf Transkriptionsebene mittels quantitativer Real-Time-PCR identifiziert. Die endogenen V-PPasen wurden mittels der Agrobakterien-Infiltrationstechnik transient in *N. benthamiana* Blättern und ihre vakuoläre Lokalisation mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern bestätigt. Die Protonenpump-Funktion der überexprimierten NbVHPs konnte mit der *Patch-Clamp*-Technik anhand des vier-fach erhöhten Protonenpumpstroms in den isolierten Mesophyllvakuolen verifiziert werden. Im Zuge der elektro-physiologischen Charakterisierung der endogenen *N. benthamiana* V-PPasen konnte die für V-PPasen typische Sensitivität gegenüber cytosolischem Calcium bestätigt werden, welche sich bei einem erhöhten Calcium-Spiegel in einer Hemmung der Pumpströme äußerte. Ferner wurde ihre gleichartige Substrataffinität (K_m von 65 μM PP_i) unabhängig des vakuolären pHs zwischen 5,5 und 7,5 festgestellt. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit analog durchgeführten Messungen an der bereits publizierten AtVHP1 von *A. thaliana* bestätigte die große Homologie der V-PPasen von Landpflanzen. Im Gegensatz zu den erwünschten Auswirkungen der stabilen V-PPase Überexpression resultierte diese starke transiente Überexpression nach drei Tagen im Absterben makroskopischer Blattbereiche. Das Ausmaß dieser Nekrosen wurde anhand des vorhandenen PhotosystemII in den transformierten Blättern mit der Puls-Amplituden-Modulations-Technik quantifiziert. Die analoge transiente Überexpression einer löslichen PPase (IPP1) führte allerdings zu keinerlei negativen Effekten für die Pflanze, wodurch die erhöhte Protonentransportaktivität im Gegensatz zur Hydrolyseaktivität der V-PPasen als Ursache des Zellsterbens verifiziert werden konnte.

Aufgrund dieser unerwarteten negativen Auswirkungen der transienten V-PPase-Überexpression auf die Blattvitalität wurde zusätzlich die Salzstresstoleranz der Blätter untersucht. Unter Berücksichtigung des kurzen Transformations- und damit Beobachtungszeitfensters wurde ein Salzapplikationsverfahren etabliert, bei dem simultan mit der Agrobakterieninfiltration 200 mM NaCl direkt in den Blattapoplasten eingeführt wurde. Anhand einer Zunahme in sowohl der Transskriptmenge der V-PPase als auch des PP_i -induzierten Protonenpumptransportes über den Tonoplasten wurde gezeigt, dass die NaCl-Anwesenheit im Blatt eine erhöhte Aktivität der endogenen V-PPasen des *N. benthaminan* Pflanzen bewirkte. Der gleichzeitige tendenzielle Rückgang der V-ATPase-Pumpaktivität in salzbehandelten Mesophyllvakuolen lässt vermuten, dass die V-PPasen eine größere Rolle bei der Bewahrung des vakuolären pH-Wertes und der protonenmotorische Kraft (PMF) unter Salzstress einnimmt. Interessanterweise führte die Salzapplikation bei einer V-PPase-Überexpression zu keinen additiven negativen Effekten, sondern verhinderte sogar das Auftreten der Nekrosen. Um dieses Phänomen zu ergründen, wurde zunächst mit Hilfe von Apoplastenwaschungen und Natrium-Konzentrationsmessungen bestätigt, dass das injizierte NaCl im Blatt verblieb und von den Blattzellen aufgenommen wurde. Für weitere Studien der Ursachen der Nekrosen wurden *in-vivo*-pH-, Membranpotenzial- und Metabolitmessungen durchgeführt. Während in V-PPase-überexprimierenden Zellen der vakuoläre pH-Wert zu Kontrollvakuolen signifikant sank, blieb er mit zusätzlicher Salzbehandlung auf Kontrollniveau. Des Weiteren schwächte die Salzapplikation die starke Depolarisation der Plasmamembran nach V-PPase-Überexpression um mehr als die Hälfte ab. Hingegen konnten keine nennenswerten Veränderungen im Metabolit- und Ionengehalt des Blattgewebes bei V-PPase-Überexpression festgestellt werden. Lediglich der Natrium- und Chlorid-Spiegel waren bei salzbehandelten Blättern erwartungsgemäß erhöht. Diese Ergebnisse bekräftigten, dass der stark erhöhte V-PPase-vermittelte Protonenpumpstrom und weniger metabolische Veränderungen für die Nekrosen von V-PPase-überexprimierte Pflanzen verantwortlich ist. Diese negativen Auswirkungen werden offensichtlich durch die Salzbehandlung stark vermindert, da die Aufnahme der Salzionen über Protonen- Na^+/K^+ -Antiporter wie NHX antagonistisch auf die V-PPase verursachte Protonenanreicherung und die daraus folgende Veränderung des Membranpotentials und der PMF entgegenwirkt. In diese Arbeit wurde in einem neuen Blickwinkel deutlich, dass die natürliche Expressionskontrolle der V-PPase in ausdifferenzierten Pflanzenzellen sich den Umweltbedingungen anpasst, um das Gleichgewicht zwischen den positiven und negativen Auswirkungen der Pumpaktivität zu halten.

6. Summary

The Effects of V-PPase overexpression on *Nicotiana benthamiana* leaf cells and their physiological significance under saline load

The plant vacuolar PPases (V-PPase) transport protons across the tonoplast from the cytosol into the vacuole. This establishes a trans-tonoplast electrochemical gradient and prevents the accumulation of toxic PP_i in the cytosol. Many publications have already shown positive effects of stable V-PPase overexpression in plants. Arabidopsis, tobacco, rice and tomato for example, all showed increased biomass and greater stress tolerance with stable V-PPase overexpression. To understand the underlying processes without potential pleiotropic effects during plant development, we characterised V-PPase in *Nicotiana benthamiana* leaves using an electrophysiological approach, and investigated its physiology in overexpressing plants, concentrating on its regulation by NaCl.

Two endogenous V-PPases (NbVHP1 and NbVHP2) from *N. benthamiana* were identified using bioinformatics and quantified with real-time PCR. Endogenous V-PPases were transiently overexpressed using Agrobacteria in *N. benthamiana* leaves, with their vacuolar localisation confirmed by fluorescence labelling. The proton pump activity of the NbVHPs was verified by a fourfold increase in the patch clamp-recorded proton current response of isolated mesophyll vacuoles. For the electrophysiological characterisation of the endogenous V-PPases, the V-PPase-typical cytosolic calcium sensitivity was confirmed; the proton pump became inhibited with increased calcium levels. Furthermore, their similar substrate affinity, a K_m of 65 μM PP_i , was found to be independent of the vacuolar pH between 5.5 and 7.5. Both attributes were comparable to the already published AtVHP1 of *Arabidopsis thaliana*, showing a high homology of plant V-PPases.

The physiological effects of V-PPase overexpression was obvious from the time-delayed death of transformed cells. In contrast to the desired effects of stable V-PPase over-expression, this strong transient overexpression resulted in macroscopic dead leaf areas after three days. The extent of these necroses was quantified by counting the existing photosystems in the transformed leaves using the pulse-amplitude modulation technique (PAM). In contrast, no necrosis was found in plants where a soluble PPase (IPP1) was over-expressed. This supports the hypothesis that the increased proton transport activity of V-PPases, not the hydrolysis activity, is the cause of cell death.

Because of these unexpected negative effects of transient V-PPase over-expression on leaf vitality, the salt stress tolerance of the leaves was also examined. The short transformation and observation time window meant we needed to establish a new way of salt application; we injected 200 mM NaCl directly into the leaf apoplast simultaneously with the agrobacterial material. Absorption of NaCl by leaf cells was confirmed by apoplast washing and sodium concentration measurements. The NaCl treatment increased the amount of transcripts of endogenous V-PPases in tobacco and increased the PP_i-induced proton transport across the vacuolar membrane. The concomitant decline in V-ATPase pumping activity in saline-treated mesophyll vacuoles indicates that V-PPases have a significant role in maintaining the vacuolar pH and proton motive force (PMF) under saline conditions.

Interestingly, simultaneous salt administration with V-PPase overexpression did not result in an additive negative effect but did prevent the occurrence of necrotic leaf areas. For further analysis of the necrosis, *in vivo* pH, membrane potential and metabolite measurements were performed. Under V-PPase over-expression and salt treatment, the vacuolar pH remained constant and did not decrease as it did in non-salt-treated V-PPase over-expressing cells. Furthermore, the salt application attenuated the strong depolarisation of the plasma membrane by more than a half in V-PPase overexpressing plants, but no noteworthy changes in cell metabolism could be detected by metabolite and ion concentration measurements. Only the Na⁺ and Cl⁻ levels were, as expected, increased in salt-treated leaves.

This decrease in vacuolar pH alongside a membrane depolarisation confirms that the strong proton pump current of the V-PPase overexpressing vacuoles is the cause of the observed necrosis. These negative effects are obviously greatly reduced by salt treatment, since the uptake of the salt ions via proton:Na⁺/K⁺ antiporters such as NHX acts as an antagonist to V-PPase-induced proton accumulation in the vacuole and the consequent change in membrane potential and PMF.

This work reveals in a new perspective, that the natural expression control of V-PPase in differentiated plant cells adapts to environmental conditions to balance the positive and negative effects of pumping activity.

7. Anhang

7.1. Ergänzende Ionen- und Metabolitdaten

Für alle Abbildungen 35-41 gilt gleichermaßen:

Die *N. benthamiana* Blätter wurden mit unterschiedlichen Konstrukten (NbVHP1, NbVHP2 oder IPP1 jeweils mit freiem GFP; die Kontrolle enthält keine zusätzliche PPase nur freies GFP) ggf. mit simultaner Zugabe von 200 mM NaCl infiltriert. Nach 48 h wurde das Gewebe auf dessen Gehalt der jeweiligen Metabolite getestet. (n = 4; Mittelwert ± SE).

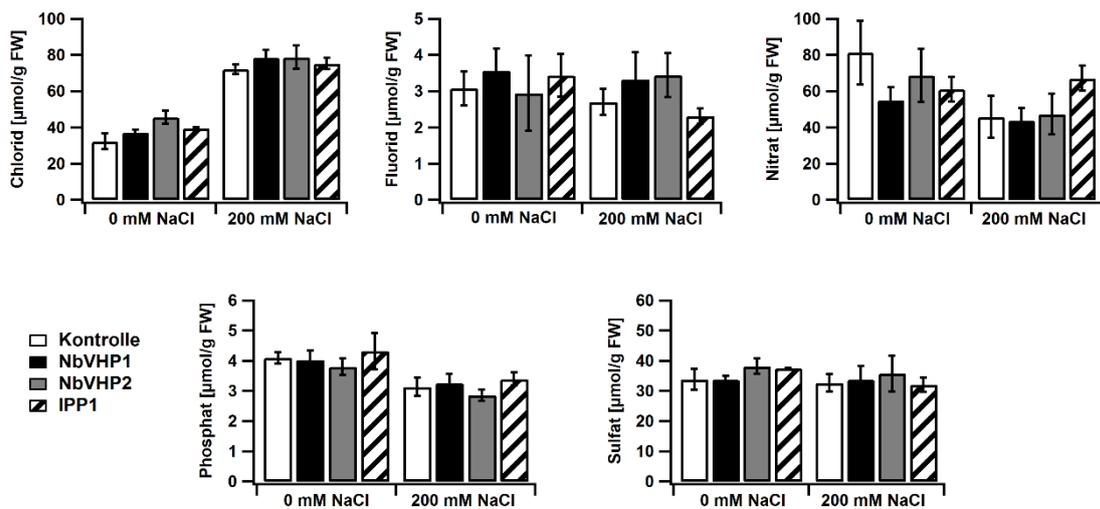


Abbildung 35: Anionen

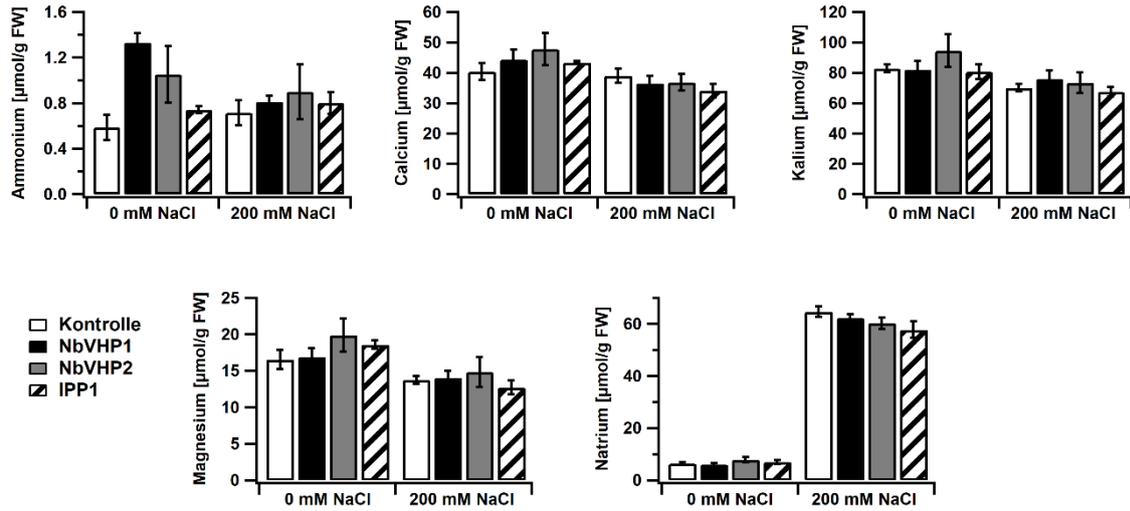


Abbildung 36: Kationen

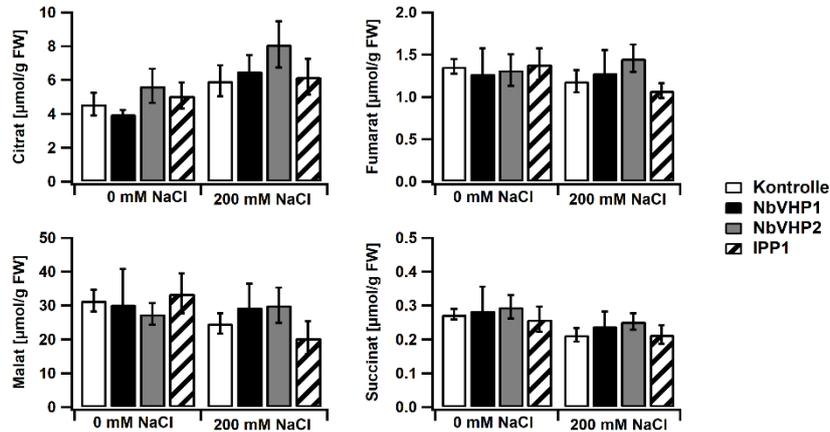


Abbildung 37: organische Säuren

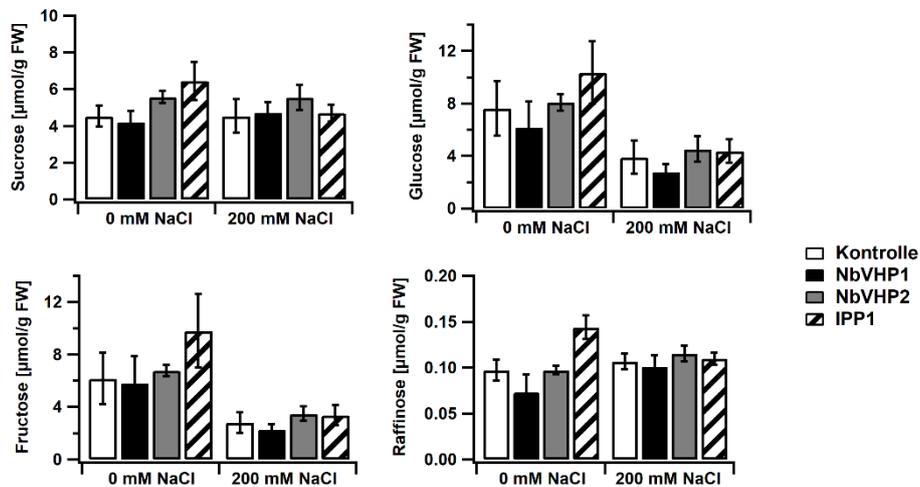


Abbildung 38: Zucker

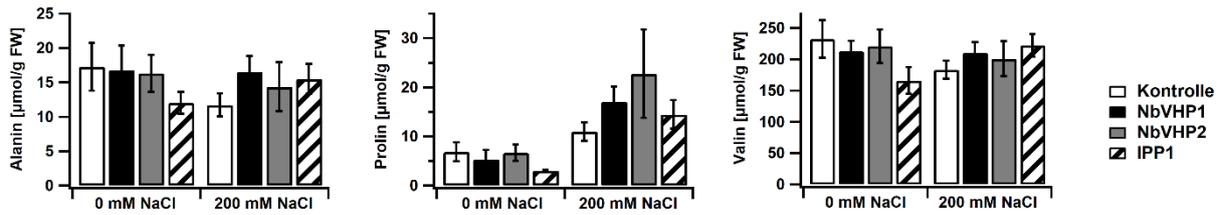


Abbildung 39: unpolare Aminosäuren

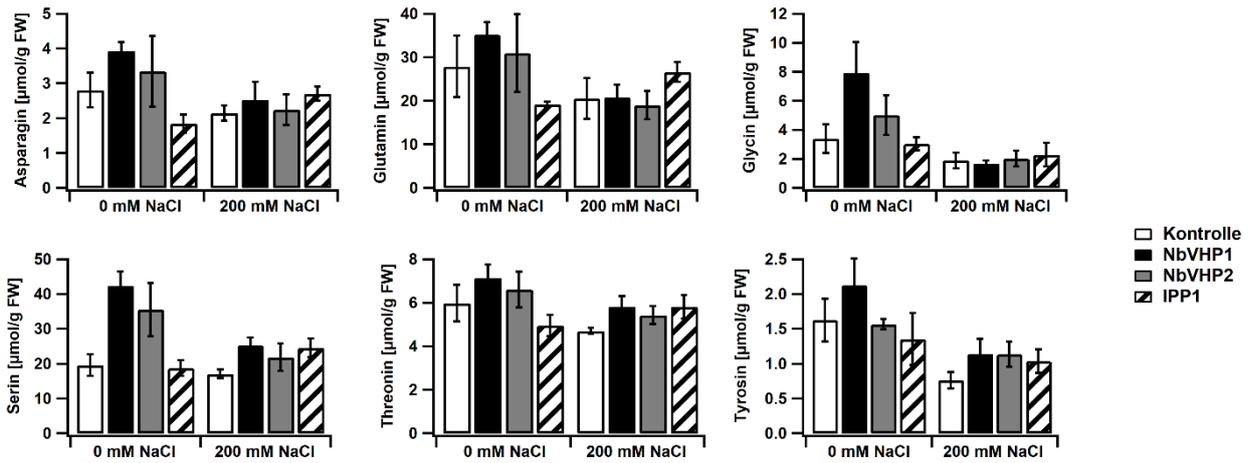


Abbildung 40: polare Aminosäuren

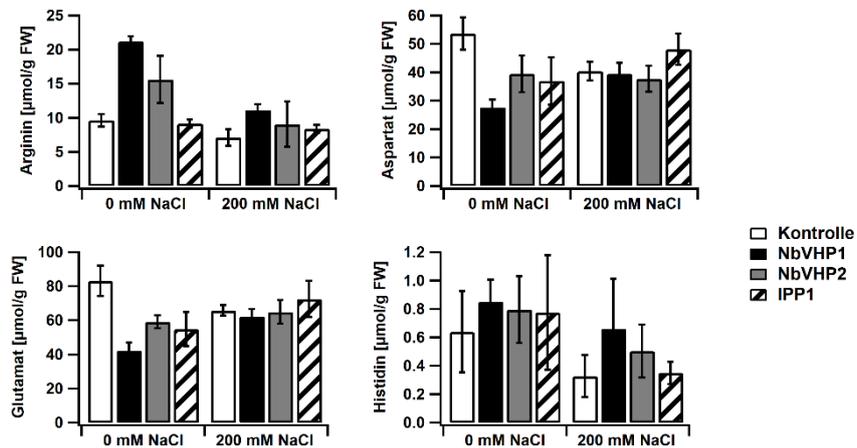


Abbildung 41: Basische und saure Aminosäuren

7.2. Literaturverzeichnis

- Almeida DM, Oliveira MM, Saibo NJM (2017) **Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants.** *Genetics and Molecular Biology* 40:326–345
- Aluri S, Büttner M (2007) **Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:2537–2542
- Aprile A, Federici C, Close TJ, De Bellis L, Cattivelli L, Roose ML (2011) **Expression of the H⁺-ATPase AHA10 proton pump is associated with citric acid accumulation in lemon juice sac cells.** *Functional & Integrative Genomics* 11:551–563
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) **Salt Tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*.** *Science* 285:1256–1258
- Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E (2003) **Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter.** *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 36:229–239
- Arif A, Zafar Y, Arif M, Blumwald E (2013) **Improved growth, drought tolerance, and ultrastructural evidence of increased turgidity in tobacco plants overexpressing *Arabidopsis* vacuolar pyrophosphatase (AVP1).** *Molecular Biotechnology* 54:379–392
- Asaoka M, Segami S, Ferjani A, Maeshima M (2016) **Contribution of PP_i-hydrolyzing function of vacuolar H⁺-Pyrophosphatase in vegetative growth of *Arabidopsis*: Evidenced by expression of uncoupling mutated enzymes.** *Frontiers in Plant Science* 7:415
- Baker NR, Rosenqvist E (2004) **Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities.** *Journal of Experimental Botany* 55:1607–1621
- Ballesteros E, Donaire JP, Belver A (1996) **Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots.** *Physiologia Plantarum* 97:259–268
- Baltscheffsky H, Stedingk L-V von, Heldt H-W, Klingenberg M (1966) **Inorganic pyrophosphate: Formation in bacterial photophosphorylation.** *Science* 153:1120–1122
- Baltscheffsky M (1967) **Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*.** *Nature* 216:241–243
- Bao A-K, Wang S-M, Wu G-Q, Xi J-J, Zhang J-L, Wang C-M (2009) **Overexpression of the *Arabidopsis* H⁺-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.).** *Plant Science* 176:232–240
- Barkla BJ, Zingarelli L, Blumwald E, Smith JAC (1995) **Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L.** *Plant Physiology* 109:549–556

- Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S, Schumaker KS, Grillo S, Zhu J-K (2007) **SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity.** *Molecular and Cellular Biology* 27:7781–7790
- Baykov AA, Bakuleva NP, Rea PA (1993) **Steady-state kinetics of substrate hydrolysis by vacuolar H⁺-pyrophosphatase. A simple three-state model.** *European Journal of Biochemistry* 217:755–762
- Belogurov GA, Lahti R (2002) **A lysine substitute for K⁺. A460K mutation eliminates K⁺ dependence in H⁺-pyrophosphatase of *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*.** *The Journal of Biological Chemistry* 277:49651–49654
- Belogurov GA, Malinen AM, Turkina MV, Jalonen U, Rytönen K, Baykov AA, Lahti R (2005) **Membrane-bound pyrophosphatase of *Thermotoga maritima* requires sodium for activity.** *Biochemistry* 44:2088–2096
- Bertl A, Blumwald E, Coronado R, Eisenberg R, Findlay G, Gradmann D, Hille B, Köhler K, Kolb HA, MacRobbie E (1992) **Electrical measurements on endomembranes.** *Science (New York, N.Y.)* 258:873–874
- Bethmann B, Thaler M, Simonis W, Schonknecht G (1995) **Electrochemical potential gradients of H⁺, K⁺, Ca²⁺, and Cl⁻ across the tonoplast of the green alga *Eremosphaera Viridis*.** *Plant Physiology* 109:1317–1326
- Bilger W, Björkman O (1990) **Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*.** *Photosynthesis Research* 25:173–185
- Blankenship RE (2002) **Molecular mechanisms of photosynthesis.** 1 edition. *Blackwell Science Ltd*, Oxford, United Kingdom: 145-156
- Blumwald E (1987) **Tonoplast vesicles as a tool in the study of ion transport at the plant vacuole.** *Physiologia Plantarum* 69:731–73
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000) **Sodium transport in plant cells.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465:140–151
- Bradford MM (1976) **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* 72:248–254
- Bremberger C, Lüttge U (1992) **Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of Crassulacean acid metabolism.** *Planta* 188:575–580
- Brini F, Hanin M, Mezghani I, Berkowitz GA, Masmoudi K (2006) **Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNHX1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants.** *Journal of Experimental Botany* 58:301–308
- Brüx A, Liu T-Y, Krebs M, Stierhof Y-D, Lohmann JU, Miersch O, Wasternack C, Schumacher K (2008) **Reduced V-ATPase activity in the trans-golgi network causes oxylipin-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*.** *The Plant Cell* 20:1088–1100
- Buchanan B, Gruissem W, Jones RL (2002) **Biochemistry & molecular biology of plants.** 1 edition. *John Wiley & Sons*, Rockville, Md USA

- Carden DE, Walker DJ, Flowers TJ, Miller AJ (2003) **Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance.** *Plant Physiology* 131:676–683
- Carpaneto A, Boccaccio A, Lagostena L, Zanni ED, Scholz-Starke J (2017) **The signaling lipid phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate targets plant CLC-a anion/H⁺ exchange activity.** *EMBO reports* 18:1100-1107
- Carswell MC, Grant BR, Plaxton WC (1997) **Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate.** *Planta* 203:67–74
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV (2004) **The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins.** *The Plant Cell* 16:3285–3303
- Carystinos GD, MacDonald HR, Monroy AF, Dhindsa RS, Poole RJ (1995) **Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice.** *Plant Physiology* 108:641–649
- Chao D-Y, Silva A, Baxter I, Huang YS, Nordborg M, Danku J, Lahner B, Yakubova E, Salt DE (2012) **Genome-wide association studies identify heavy metal ATPase3 as the primary determinant of natural variation in leaf cadmium in *Arabidopsis thaliana*.** *PLoS genetics* 8:e1002923
- Chen Y, Li L, Zong J, Chen J, Guo H, Guo A, Liu J (2015) **Heterologous expression of the halophyte *Zoysia matrella* H⁺-pyrophosphatase gene improved salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant physiology and biochemistry: PPB* 91:49–55
- Cipriano DJ, Wang Y, Bond S, Hinton A, Jefferies KC, Qi J, Forgac M (2008) **Structure and regulation of the vacuolar ATPases.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777:599–604
- Collins T (2014) **World losing 2,000 hectares of farm soil daily to salt-induced degradation - United Nations University.** [<https://unu.edu/media-relations/releases/world-losing-2000-hectares-of-farm-soil-daily-to-salt-induced-degradation.html>] Accessed August 24, 2018
- Colombo R, Cerana R (1993) **Effect of temperature on plasma membrane and tonoplast ion channels in *Arabidopsis thaliana*.** *Physiologia Plantarum* 87:118–124
- Cuin TA, Tian Y, Betts SA, Chalmandrier R, Shabala S (2009) **Ionic relations and osmotic adjustment in durum and bread wheat under saline conditions.** *Functional Plant Biology* 36:1110–1119
- Cuin TA, Zhou M, Parsons D, Shabala S (2012) **Genetic behaviour of physiological traits conferring cytosolic K⁺/ Na⁺ homeostasis in wheat.** *Plant Biology* 14:438–446
- Davies JM, Rea PA, Sanders D (1991) **Vacuolar proton-pumping pyrophosphatase in *Beta vulgaris* shows vectorial activation by potassium.** *FEBS letters* 278:66–68
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H (2006) **The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles.** *Nature* 442:939–942
- De Angeli A, Zhang J, Meyer S, Martinoia E (2013) **AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in *Arabidopsis*.** *Nature Communications* 4:1804
- De D (2000) **Plant cell vacuoles: an introduction.** *Csiro Publishing*, Collingwood Australien

- Demmig B, Winter K, Kruger A, Czygan F-C (1987) **Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves: a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy.** *PLANT PHYSIOLOGY* 84:218–224
- Dettmer J, Schubert D, Calvo-Weimar O, Stierhof Y-D, Schmidt R, Schumacher K (2005) **Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development.** *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 41:117–124
- Dong Q-L, Liu D-D, An X-H, Hu D-G, Yao Y-X, Hao Y-J (2011) **MdVHP1 encodes an apple vacuolar H⁺-PPase and enhances stress tolerance in transgenic apple callus and tomato.** *Journal of Plant Physiology* 168:2124–2133
- Drozdowicz YM, Kissinger JC, Rea PA (2000) **AVP2, a sequence-divergent, K⁺-Insensitive H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*.** *Plant Physiology* 123:353–362
- Drozdowicz YM, Rea PA (2001) **Vacuolar H⁺ pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream.** *Trends in Plant Science* 6:206–211
- Duan X-G, Yang A-F, Gao F, Zhang S-L, Zhang J-R (2007) **Heterologous expression of vacuolar H⁺-PPase enhances the electrochemical gradient across the vacuolar membrane and improves tobacco cell salt tolerance.** *Protoplasma* 232:87–95
- Duff SMG, Moorhead GBG, Lefebvre DD, Plaxton WC (1989) **Phosphate starvation inducible ‘bypasses’ of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells.** *Plant Physiology* 90:1275–1278
- Dujardin F (1841) **Histoire naturelle des zoophytes: infusoires, comprenant la physiologie et la classification de ces animaux, et la manière de les étudier a l’aide du microscope, Librairie encyclopédique de Roret.** *Fain et Thunot, Paris, Frankreich*
- Eddy SR (2011) **Accelerated profile HMM searches.** *PLoS Computational Biology* 7:e1002195
- Emmerlich V, Linka N, Reinhold T, Hurth MA, Traub M, Martinoia E, Neuhaus HE (2003) **The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:11122–11126
- Epimashko S, Meckel T, Fischer-Schliebs E, Lüttge U, Thiel G (2004) **Two functionally different vacuoles for static and dynamic purposes in one plant mesophyll leaf cell.** *The Plant Journal* 37:294–300
- Evert RF (2009) **Esau Pflanzenanatomie: Meristeme, Zellen und Gewebe der Pflanzen - ihre Struktur, Funktion und Entwicklung.** 3 edition. *Walter de Gruyter, Berlin Deutschland*
- von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Dynowski M, Ludewig U (2010) **CLC-b-mediated NO⁻³/H⁺ exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles.** *Plant and Cell Physiology* 51:960–968
- Ferjani A, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H (2007) **Analysis of leaf development in *fugu* mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs.** *Plant Physiology* 144:988–999
- Ferjani A, Maeshima M (2016) **Editorial: Multiple facets of H⁺-pyrophosphatase and related enzymes.** *Frontiers in Plant Science* 7:1265

- Ferjani A, Segami S, Horiguchi G, Muto Y, Maeshima M, Tsukaya H (2011) **Keep an eye on PPi: The vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase regulates postgerminative development in *Arabidopsis*.** *The Plant Cell* 23:2895–2908
- Flowers TJ, Munns R, Colmer TD (2015) **Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes.** *Annals of Botany* 115:419–431
- Fukuda A, Chiba K, Maeda M, Nakamura A, Maeshima M, Tanaka Y (2004) **Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley.** *Journal of Experimental Botany* 55:585–594
- Gaddam D, Stevens N, Hollien J (2013) **Comparison of mRNA localization and regulation during endoplasmic reticulum stress in *Drosophila* cells.** *Molecular Biology of the Cell* 24:14–20
- Gao F, Gao Q, Duan X, Yue G, Yang A, Zhang J (2006) **Cloning of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance.** *Journal of Experimental Botany* 57:3259–3270
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001) **Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:11444–11449
- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K (2007) **Plant proton pumps.** *FEBS Letters* 581:2204–2214
- Gaxiola RA, Sanchez CA, Paez-Valencia J, Ayre BG, Elser JJ (2012) **Genetic manipulation of a “vacuolar” H⁺-PPase: From salt tolerance to yield enhancement under phosphorus-deficient soils.** *Plant Physiology* 159:3–11
- Geiger D, Maierhofer T, AL-Rasheid KAS, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2011) **Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1.** *Sci. Signal.* 4(173):ra32
- Geisler M, Axelsen KB, Harper JF, Palmgren MG (2000a) **Molecular aspects of higher plant P-type Ca²⁺-ATPases.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465:52–78
- Geisler M, Frangne N, Gomès E, Martinoia E, Palmgren MG (2000b) **The ACA4 gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast.** *Plant Physiology* 124:1814–1827
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR (1989) **The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 990:87–92
- Gerhardt R, Heldt HW (1984) **Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media.** *Plant Physiology* 75:542–547
- Ghoulam C, Foursy A, Fares K (2002) **Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars.** *Environmental and Experimental Botany* 47:39–50
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001) **An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression.** *Methods (San Diego, Calif.)* 25:386–401

- Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA (2008) ***Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant–pathogen interactions.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:1015–1026
- Gordon-Weeks R, Steele SH, Leigh RA (1996) **The role of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates and activators of the vacuolar H⁺-pumping Inorganic pyrophosphatase’.** *Plant Physiology* 111:195-202
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A (2011) **Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data.** *Nature biotechnology* 29:644–652
- Graus D, Konrad KR, Bemm F, Nebioglu MGP, Lorey C, Duscha K, Güthoff T, Herrmann J, Ferjani A, Cuin TA, Roelfsema MRG, Schumacher K, Neuhaus HE, Marten I, Hedrich R (2018) **High V-PPase activity is beneficial under high salt loads, but detrimental without salinity.** *New Phytologist* 219:1421–1432
- Guo S, Yin H, Zhang X, Zhao F, Li P, Chen S, Zhao Y, Zhang H (2006) **Molecular cloning and characterization of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene, *SsVP*, from the halophyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis*.** *Plant Molecular Biology* 60:41–50
- Gzik A (1996) **Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress.** *Environmental and Experimental Botany* 36:29–38
- Hafke JB, Neff R, Hütt MT, Lüttge U, Thiel G (2001) **Day-to-night variations of cytoplasmic pH in a crassulacean acid metabolism plant.** *Protoplasma* 216:164–170
- Hall JL, Flowers TJ (1973) **The effect of salt on protein synthesis in the halophyte *Suaeda maritima*.** *Planta* 110:361–368
- Halperin SJ, Lynch JP (2003) **Effects of salinity on cytosolic Na⁺ and K⁺ in root hairs of *Arabidopsis thaliana*: in vivo measurements using the fluorescent dyes SBFI and PBFI.** *Journal of Experimental Botany* 54:2035–2043
- Hanitzsch M, Schnitzer D, Seidel T, Gollmack D, Dietz K-J (2007) **Transcript level regulation of the vacuolar H⁺-ATPase subunit isoforms VHA-a, VHA-E and VHA-G in *Arabidopsis thaliana*.** *Molecular Membrane Biology* 24:507-518
- Harlan JR (1992) **Crops & Man.** 2. edition, American Society of Agronomy, USA
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ (2000) **Plant cellular and molecular responses to high salinity.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:463–499
- Hedrich R (2012) **Ion channels in plants.** *Physiological Reviews* 92:1777–1811
- Hedrich R, Busch H, Raschke K (1990) **Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells.** *The EMBO Journal* 9:3889–3892
- Hedrich R, Kurkdjian A, Guern J, Flügge UI (1989) **Comparative studies on the electrical properties of the H⁺ translocating ATPase and pyrophosphatase of the vacuolar-lysosomal compartment.** *The EMBO journal* 8:2835–2841

- Hedrich R, Mueller TD, Becker D, Marten I (2018) **Structure and function of TPC1 vacuole SV Channel gains shape.** *Molecular Plant* 11:764–775
- Hedrich R, Neher E (1987) **Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles.** *Nature* 329:833–836
- Hedrich R, Sauer N, Neuhaus HE (2015) **Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins.** *Current Opinion in Plant Biology* 25:63–70
- Heinonen JK (2001) **Biological role of inorganic pyrophosphate.** 1 edition. *Springer Science+Business Media*, New York USA
- Hillel D (1992) **Out of the earth: Civilization and the life of the soil.** 1. edition, *University of California Press*, Barkeley and Los Angeles CA USA
- Hirata T, Nakamura N, Omote H, Wada Y, Futai M (2000) **Regulation and reversibility of vacuolar H⁺-ATPase.** *Journal of Biological Chemistry* 275:386–389
- Hirschi KD (2004) **The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal.** *Plant Physiology* 136:2438–2442
- Hirschi KD, ZHENT R-G, Cunningham KW, REAt PA, Fink GR (1996) **CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from Arabidopsis.** *Plant Biology* 93:8782-8786
- Holzinger M (2013) **Paracelsus: Das Buch Paragranum / Septem Defensiones.** *CreateSpace Independent Publishing Platform*, Berlin Deutschland
- Hurth MA, Suh SJ, Kretschmar T, Geis T, Bregante M, Gambale F, Martinoia E, Neuhaus HE (2005) **Impaired ph homeostasis in Arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast.** *Plant Physiology* 137:901–910
- Ings J, Mur LAJ, Robson PRH, Bosch M (2013) **Physiological and growth responses to water deficit in the bioenergy crop Miscanthus x giganteus.** *Frontiers in Plant Science* 4:468
- Ivashikina N, Hedrich R (2005) **K⁺ currents through SV-type vacuolar channels are sensitive to elevated luminal sodium levels.** *The Plant Journal* 41:606–614
- James RA, Rivelli AR, Munns R, Caemmerer S von (2002) **Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat.** *Functional Plant Biology* 29:1393–1403
- Jaquinod M, Villiers F, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, Garin J, Bourguignon J (2007) **A proteomics dissection of Arabidopsis thaliana vacuoles isolated from cell culture.** *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 6:394–412
- Jaślan D, Mueller TD, Becker D, Schultz J, Cuin TA, Marten I, Dreyer I, Schönknecht G, Hedrich R (2016) **Gating of the two-pore cation channel AtTPC1 in the plant vacuole is based on a single voltage-sensing domain.** *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 18:750–760
- Jelitto T, Sonnewald U, Willmitzer L, Hajirezeai M, Stitt M (1992) **Inorganic pyrophosphate content and metabolites in potato and tobacco plants expressing E. coli pyrophosphatase in their cytosol.** *Planta* 188:238–244
- Jiang X, Leidi EO, Pardo JM (2010) **How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance?** *Plant Signaling & Behavior* 5:792–795
-

- Johannes E, Felle H (1990) **Proton gradient across the tonoplast of *Riccia fluitans* as a result of the joint action of two electroenzymes 1.** *Plant Physiology* 93:412–417
- Joseph JT, Poolakkalody NJ, Shah JM (2018) **Plant reference genes for development and stress response studies.** *Journal of Biosciences* 43:173–187
- Juergens MT, Deshpande RR, Lucker BF, Park J-J, Wang H, Gargouri M, Holguin FO, Disbrow B, Schaub T, Skepper JN, Kramer DM, Gang DR, Hicks LM, Shachar-Hill Y (2015) **The regulation of photosynthetic structure and function during nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Plant Physiology* 167:558–573
- Jung B, Ludewig F, Schulz A, Meißner G, Wöstefeld N, Flügge U-I, Pommerrenig B, Wirsching P, Sauer N, Koch W, Sommer F, Mühlhaus T, Schroda M, Cuin TA, Graus D, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE (2015) **Identification of the transporter responsible for sucrose accumulation in sugar beet taproots.** *Nature Plants* 1:14001
- Kabała K, Kłobus G (2008) **Modification of vacuolar proton pumps in cucumber roots under salt stress.** *Journal of Plant Physiology* 165:1830–1837
- Kajander T, Kellosalo J, Goldman A (2013) **Inorganic pyrophosphatases: One substrate, three mechanisms.** *FEBS Letters* 587:1863–1869
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G (1997) **An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves.** *Plant Science* 122:101–108
- Kasai M, Nakamura T, Kudo N, Sato H, Maeshima M, Sawada S (1998) **The activity of the root vacuolar H⁺-pyrophosphatase in rye plants grown under conditions deficient in mineral nutrients.** *Plant and Cell Physiology* 39:890–894
- Katschnig D, Jaarsma R, Almeida P, Rozema J, Schat H (2014) **Differences in proton pumping and Na/H exchange at the leaf cell tonoplast between a halophyte and a glycophyte.** *AoB Plants* 6:plu023
- Khadilkar AS, Yadav UP, Salazar C, Shulaev V, Paez-Valencia J, Pizzio GA, Gaxiola RA, Ayre BG (2016) **Constitutive and companion cell-specific overexpression of AVP1, encoding a proton-pumping pyrophosphatase, enhances biomass accumulation, phloem loading, and long-distance transport.** *Plant Physiology* 170:401–414
- Khoudi H, Maatar Y, Gouiaa S, Masmoudi K (2012) **Transgenic tobacco plants expressing ectopically wheat H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) gene *TaVP1* show enhanced accumulation and tolerance to cadmium.** *Journal of Plant Physiology* 169:98–103
- Kiani-Pouya A, Roessner U, Jayasinghe NS, Lutz A, Rupasinghe T, Bazihizina N, Bohm J, Alharbi S, Hedrich R, Shabala S (2017) **Epidermal bladder cells confer salinity stress tolerance in the halophyte quinoa and *Atriplex* species.** *Plant, Cell & Environment* 40:1900–1915
- Kitajima M, Butler WL (1975) **Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone.** *Biochimica Et Biophysica Acta* 376:105–115
- Klemens PAW, Patzke K, Trentmann O, Poschet G, Büttner M, Schulz A, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE (2014) **Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination.** *New Phytologist* 202:188–197

- Krämer U, Clemens S (2006) **Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants.** In: Tamas MJ, Martinoia E, Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification: From Microbes to Man. 14 edition, *Springer*, Berlin, Heidelberg, Deutschland
- Krebs M, Beyhl D, Görlich E, Al-Rasheid KAS, Marten I, Stierhof Y-D, Hedrich R, Schumacher K (2010) ***Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:3251–3256
- Kriegel A, Andrés Z, Medzihradzky A, Krüger F, Scholl S, Delang S, Patir-Nebioglu MG, Gute G, Yang H, Murphy AS, Peer WA, Pfeiffer A, Krebs M, Lohmann JU, Schumacher K (2015) **Job sharing in the endomembrane system: Vacuolar acidification requires the combined activity of V-ATPase and V-PPase.** *The Plant Cell* 27:3383–3396
- Kronzucker HJ, Britto DT (2011) **Sodium transport in plants: a critical review.** *New Phytologist* 189:54–81
- Kronzucker HJ, Szczerba MW, Moazami-Goudarzi M, Britto DT (2006) **The cytosolic Na⁺:K⁺ ratio does not explain salinity-induced growth impairment in barley: a dual-tracer study using ⁴²K⁺ and ²⁴Na⁺: Cytosolic Na⁺:K⁺ ratio.** *Plant, Cell & Environment* 29:2228–2237
- Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M, Karthikeyan AS, Lee CH, Nelson WD, Ploetz L, Singh S, Wensel A, Huala E (2012) **The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools.** *Nucleic Acids Research* 40:D1202–D1210
- Langhans M, Ratajczak R, Lützelshwab M, Michalke W, Wächter R, Fischer-Schliebs E, Ullrich CI (2001) **Immunolocalization of plasma-membrane H⁺-ATPase and tonoplast-type pyrophosphatase in the plasma membrane of the sieve element-companion cell complex in the stem of *Ricinus communis* L.** *Planta* 213:11–19
- Lerchl J, Geigenberger P, Stitt M, Sonnewald U (1995) **Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants.** *The Plant Cell* 7:259–270
- Li B, Wei A, Song C, Li N, Zhang J (2008) **Heterologous expression of the *TsVP* gene improves the drought resistance of maize.** *Plant Biotechnology Journal* 6:146–159
- Li Z-S, Lu Y-P, Zhen R-G, Szczycka M, Thiele DJ, Rea PA (1997) **A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:42–47
- Lin S-M, Tsai J-Y, Hsiao C-D, Huang Y-T, Chiu C-L, Liu M-H, Tung J-Y, Liu T-H, Pan R-L, Sun Y-J (2012) **Crystal structure of a membrane-embedded H⁺-translocating pyrophosphatase.** *Nature* 484:399–403
- Lingrel JB (1992) **Na, K-ATPase: Isoform structure, function, and expression.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24:263–270
- Liu J, Zhu JK (1997) **Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*.** *Plant Physiology* 114:591–596
- Liu L, Wang Y, Wang N, Dong Y-Y, Fan X-D, Liu X-M, Yang J, Li H-Y (2011) **Cloning of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene from the halophyte *Suaeda corniculata* whose heterologous**

- overexpression improves salt, saline-alkali and drought tolerance in *Arabidopsis*.** *Journal of Integrative Plant Biology* 53:731–742
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) **Molecular cell biology.** 4th edition. *W. H. Freeman*, New York NY USA
- Loqué D, Ludewig U, Yuan L, Wirén N von (2005) **Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole.** *Plant Physiology* 137:671–680
- de Lourdes Oliveira Otoch M, Menezes Sobreira AC, Farias de Aragão ME, Orellano EG, da Guia Silva Lima M, Fernandes de Melo D (2001) **Salt modulation of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase activities in *Vigna unguiculata*.** *Journal of Plant Physiology* 158:545–551
- Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E, Rea PA (1998) **AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1.** *The Plant Cell* 10:267–282
- Lundin M, Baltscheffsky H, Ronne H (1991) **Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function.** *The Journal of Biological Chemistry* 266:12168–12172
- Luoto HH, Belogurov GA, Baykov AA, Lahti R, Malinen AM (2011) **Na⁺-translocating membrane pyrophosphatases are widespread in the microbial world and evolutionarily precede H⁺-translocating pyrophosphatases.** *The Journal of Biological Chemistry* 286:21633–21642
- Lv S, Zhang K, Gao Q, Lian L, Song Y, Zhang J (2008) **Overexpression of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* in cotton enhances salt tolerance and improves growth and photosynthetic performance.** *Plant and Cell Physiology* 49:1150–1164
- Lv S-L, Lian L-J, Tao P-L, Li Z-X, Zhang K-W, Zhang J-R (2009) **Overexpression of thellungiella halophila H⁺-PPase (TsVP) in cotton enhances drought stress resistance of plants.** *Planta* 229:899–910
- Maeshima M (1990) **Development of vacuolar membranes during elongation of cells in mung bean hypocotyls.** *Plant and Cell Physiology* 31:311–317
- Maeshima M (1991) **H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles Inhibition by Ca²⁺, stabilization by Mg²⁺ and immunological comparison with other inorganic pyrophosphatases.** *European Journal of Biochemistry* 196:11–17
- Maeshima M (2000) **Vacuolar H⁺-pyrophosphatase.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465:37–51
- Maeshima M, Nakanishi Y, Matsuura-Endo C, Tanaka Y (1996) **Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells.** *Journal of Plant Research* 109:119–125
- Maeshima M, Yoshida S (1989) **Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean.** *Journal of Biological Chemistry* 264:20068–20073
- Malinen AM, Belogurov GA, Salminen M, Baykov AA, Lahti R (2004) **Elucidating the Role of Conserved Glutamates in H⁺-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*.** *Journal of Biological Chemistry* 279:26811–26816

- Marshansky V, Rubinstein JL, Grüber G (2014) **Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837:857–879
- Martinoia E (2018) **Vacuolar transporters – companions on a longtime journey.** *Plant Physiology* 176:1384–1407
- Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE (2007) **Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism.** *Journal of Experimental Botany* 58:83–102
- Martinoia E, Massonneau A, Frangne N (2000) **Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants.** *Plant and Cell Physiology* 41:1175–1186
- Marty F (1999) **Plant vacuoles.** *The Plant Cell* 11:587–599
- Mäser P, Eckelman B, Vaidyanathan R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M, Yamagami M, Yamaguchi K, Nishimura M, Uozumi N, Robertson W, Sussman MR, Schroeder JI (2002) **Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1.** *FEBS Letters* 531:157–161
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJM, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML (2001) **Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*.** *Plant Physiology* 126:1646–1667
- Matsuura-Endo C, Maeshima M, Yoshida S (1990) **Subunit composition of vacuolar membrane H⁺-ATPase from mung bean.** *European Journal of Biochemistry* 187:745–751
- Maxwell K, Johnson GN (2000) **Chlorophyll fluorescence--a practical guide.** *Journal of Experimental Botany* 51:659–668
- Meng L, Li S, Guo J, Guo Q, Mao P, Tian X (2017) **Molecular cloning and functional characterisation of an H⁺-pyrophosphatase from *Iris lactea*.** *Scientific Reports* 7:17779
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R (2010) **AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells.** *The Plant Journal* 63:1054–1062
- Meyer S, Scholz-Starke J, Angeli AD, Kovermann P, Burla B, Gambale F, Martinoia E (2011) **Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation.** *The Plant Journal* 67:247–257
- Mimura H, Nakanishi Y, Hirono M, Maeshima M (2004) **Membrane topology of the H⁺-pyrophosphatase of *Streptomyces coelicolor* determined by cysteine-scanning mutagenesis.** *Journal of Biological Chemistry* 279:35106–35112
- Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A, Richaud P (2009) **AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*.** *Plant Physiology* 149:894–904
- Mosse B (1973) **Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza.** *New Phytologist* 72:127–136
- Munns R, James RA (2003) **Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat.** *Plant and Soil* 253:201–218
-

- Munns R, James RA, Läuchli A (2006) **Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals.** *Journal of Experimental Botany* 57:1025–1043
- Munns R, Tester M (2008) **Mechanisms of salinity tolerance.** *Annual Review of Plant Biology* 59:651–681
- Murley VR, Theodorou ME, Plaxton WC (1998) **Phosphate starvation-inducible pyrophosphate-dependent phosphofructokinase occurs in plants whose roots do not form symbiotic associations with mycorrhizal fungi.** *Physiologia Plantarum* 103:405–414
- Nakamura Y (Keio U, Kasamo K, Shimosato N, Sakata M (1992) **Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean [*Vigna mungo*] roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca²⁺ ions.** *Plant and Cell Physiology (Japan)* 33:139-149
- Nakanishi Y, Saijo T, Wada Y, Maeshima M (2001) **Mutagenic analysis of functional residues in putative substrate-binding site and acidic domains of vacuolar H⁺-pyrophosphatase.** *The Journal of Biological Chemistry* 276:7654–7660
- Nakanishi Y, Yabe I, Maeshima M (2003) **Patch clamp analysis of a H⁺-pump heterologously expressed in giant yeast vacuoles.** *Journal of Biochemistry* 134:615–623
- Nieberl P, Ehrl C, Pommerrenig B, Graus D, Marten I, Jung B, Ludewig F, Koch W, Harms K, Flügge U-I, Neuhaus HE, Hedrich R, Sauer N (2017) **Functional characterisation and cell specificity of BvSUT1, the transporter that loads sucrose into the phloem of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) source leaves.** *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 19:315-326
- Nour-Eldin HH, Hansen BG, Nørholm MHH, Jensen JK, Halkier BA (2006) **Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments.** *Nucleic Acids Research* 34:e122
- Numberger M, Draguhn A (1996) **Patch-Clamp-Technik.** 1. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg Deutschland
- O’Leary BM, Rico A, McCraw S, Fones HN, Preston GM (2014) **The infiltration-centrifugation technique for extraction of apoplastic fluid from plant leaves using *Phaseolus vulgaris* as an example.** *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 94:e52113
- Paez-Valencia J, Patron-Soberano A, Rodriguez-Leviz A, Sanchez-Lares J, Sanchez-Gomez C, Valencia-Mayoral P, Diaz-Rosas G, Gaxiola R (2011) **Plasma membrane localization of the type I H⁺-PPase AVP1 in sieve element-companion cell complexes from *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* 181:23–30
- Palma DA, Blumwald E, Plaxton WC (2000) **Upregulation of vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase by phosphate starvation of *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures.** *FEBS letters* 486:155–158
- Palmgren MG (2001) **Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:817–845
- Pardo JM, Quintero FJ (2002) **Plants and sodium ions: keeping company with the enemy.** *Genome Biology* 3: reviews1017.1-reviews1017.4

- Park S, Li J, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang H, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD, Gaxiola RA (2005) **Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:18830–18835
- Parks GE, Dietrich MA, Schumaker KS (2002) **Increased vacuolar Na⁺/H⁺ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl.** *Journal of Experimental Botany* 53:1055–1065
- Pasapula V, Shen G, Kuppu S, Paez-Valencia J, Mendoza M, Hou P, Chen J, Qiu X, Zhu L, Zhang X, Auld D, Blumwald E, Zhang H, Gaxiola R, Payton P (2011) **Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions.** *Plant Biotechnology Journal* 9:88–99
- Pedersen CNS, Axelsen KB, Harper JF, Palmgren MG (2012) **Evolution of plant P-Type ATPases.** *Frontiers in Plant Science* 3:31
- Pei L, Wang J, Li K, Li Y, Li B, Gao F, Yang A (2012) **Overexpression of *Thellungiella halophila* H⁺-pyrophosphatase gene improves low phosphate tolerance in maize.** *PLoS One* 7:e43501
- Pérez V, Wherrett T, Shabala S, Muñiz J, Dobrovinskaya O, Pottosin I (2008) **Homeostatic control of slow vacuolar channels by luminal cations and evaluation of the channel-mediated tonoplast Ca²⁺ fluxes in situ.** *Journal of Experimental Botany* 59:3845–3855
- Pfündel E (2007) **Junior-pam - Chlorophyll Fluorometer Operator's Guide.** 1. edition, *Heinz Walz GmbH*, Effeltrich Deutschland
- Pittman JK (2012) **Multiple transport pathways for mediating intracellular pH homeostasis: The contribution of H⁺/ion exchangers.** *Frontiers in Plant Science* 3:11
- Pizzio GA, Hirschi KD, Gaxiola RA (2017) **Conjecture regarding posttranslational modifications to the *Arabidopsis* Type I proton-pumping pyrophosphatase (AVP1).** *Frontiers in Plant Science* 8:1572
- Plaxton WC (1996) **The organization and regulation of plant glycolysis.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:185–214
- Poole RJ (1993) **Cellular signaling machinery: conservation from plant stomata to lymphocytes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:3125–3126
- Pope AJ, Leigh RA (1987) **Some characteristics of anion transport at the tonoplast of oat roots, determined from the effects of anions on pyrophosphatedependent proton transport.** *Planta* 172:91–100
- Popova OV, Gollmack D (2007) **In the halotolerant *Lobularia maritima* (Brassicaceae) salt adaptation correlates with activation of the vacuolar H⁺-ATPase and the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter.** *Journal of Plant Physiology* 164:1278–1288
- Qadir M, Quillérou E, Nangia V, Murtaza G, Singh M, Thomas RJ, Drechsel P, Noble AD (2014) **Economics of salt-induced land degradation and restoration.** *Natural Resources Forum* 38:282–295

- Qiu N, Chen M, Guo J, Bao H, Ma X, Wang B (2007) **Coordinate up-regulation of V-H⁺-ATPase and vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter as a response to NaCl treatment in a C3 halophyte *Suaeda salsa*.** *Plant Science* 172:1218–1225
- Queirós F, Fontes N, Silva P, Almeida D, Maeshima M, Gerós H, Fidalgo F (2009) **Activity of tonoplast proton pumps and Na⁺/H⁺ exchange in potato cell cultures is modulated by salt.** *Journal of Experimental Botany* 60:1363–1374
- Raven JA, Smith FA (1978) **Effect of temperature and external pH on the Cytoplasmic pH of *Chara corallina*.** *Journal of Experimental Botany* 29:853–866
- Rea PA, Britten CJ, Jennings IR, Calvert CM, Skiera LA, Leigh RA, Sanders D (1992a) **Regulation of vacuolar H⁺-pyrophosphatase by free calcium.** *Plant Physiology* 100:1706–1715
- Rea PA, Britten CJ, Sarafian V (1992b) **Common identity of substrate binding subunit of vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase of higher plant cells.** *Plant Physiology* 100:723–732
- Rea PA, Li Z-S, Lu Y-P, Drozdowicz YM, Martinoia E (1998) **From vacuolar Gs-X pumps to multispecific Abc transporters.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:727–760
- Rea PA, Poole RJ (1985) **Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris* L.) tonoplast vesicles.** *Plant Physiology* 77:46–52
- Rea PA, Poole RJ (1993) **Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44:157–180
- Rea PA, Sanders D (1987) **Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane.** *Physiologia Plantarum* 71:131–141
- Reuveni M, Bennett AB, Bressan RA, Hasegawa PM (1990) **Enhanced H⁺ transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H-ATPase after NaCl Adaptation.** *Plant Physiology* 94:524–530
- Rienmüller F, Dreyer I, Schönknecht G, Schulz A, Schumacher K, Nagy R, Martinoia E, Marten I, Hedrich R (2012) **Luminal and cytosolic pH feedback on proton pump activity and ATP affinity of V-type ATPase from *Arabidopsis*.** *The Journal of Biological Chemistry* 287:8986–8993
- Rienmüller FC (2014) **Untersuchung der oxidativen und pH-abhängigen Regulation der vakuolären Protonen-ATPase und calciumabhängigen vakuolären Membranleitfähigkeiten von *Arabidopsis thaliana*.** *Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg Deutschland*
- Rink TJ, Tsien RY, Pozzan (1982) **Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes.** *The Journal of Cell Biology* 95:189–196
- Robinson DG, Haschke H-P, Hinz G, Hoh B, Maeshima M, Marty F (1996) **Immunological detection of tonoplast polypeptides in the plasma membrane of pea cotyledons.** *Planta* 198:95–103
- Rockel B, Ratajczak R, Becker A, Lüttge U (1994) **Changed densities and diameters of intra-membrane tonoplast particles of *Mesembryanthemum crystallinum* in correlation with NaCl-induced CAM.** *Journal of Plant Physiology* 143:318–324
- Rodríguez-Navarro A, Rubio F (2006) **High-affinity potassium and sodium transport systems in plants.** *Journal of Experimental Botany* 57:1149–1160

- Rodríguez-Rosales MP, Gálvez FJ, Huertas R, Aranda MN, Baghour M, Cagnac O, Venema K (2009) **Plant NHX cation/proton antiporters.** *Plant Signaling & Behavior* 4:265–276
- Roelfsema MRG, Hedrich R (2005) **In the light of stomatal opening: new insights into ‘the Watergate.’** *New Phytologist* 167:665–691
- Roelfsema MRG, Steinmeyer R, Staal M, Hedrich R (2001) **Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane.** *The Plant Journal* 26:1–13
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA (1992) **Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:1775–1779
- Schilling RK, Marschner P, Shavrukov Y, Berger B, Tester M, Roy SJ, Plett DC (2014) **Expression of the *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field.** *Plant Biotechnology Journal* 12:378–386
- Schneider S, Beyhl D, Hedrich R, Sauer N (2008) **Functional and Physiological Characterization of *Arabidopsis* inositol transporter1, a novel tonoplast-localized transporter for myo-inositol.** *The Plant Cell* 20:1073–1087
- Scholz-Starke J, Primo C, Yang J, Kandel R, Gaxiola RA, Hirschi KD (2019) **The flip side of the *Arabidopsis* type I proton-pumping pyrophosphatase (AVP1): Using a transmembrane H⁺ gradient to synthesize pyrophosphate.** *Journal of Biological Chemistry* 294:1290–1299
- Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Büttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R (2011) **Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2.** *The Plant Journal* 68:129–136
- Schulze LM, Britto DT, Li M, Kronzucker HJ (2012) **A pharmacological analysis of high-affinity sodium transport in barley (*Hordeum vulgare* L.): a 24Na⁺/42K⁺ study.** *Journal of Experimental Botany* 63:2479–2489
- Schumacher K, Krebs M (2010) **The V-ATPase: small cargo, large effects.** *Current Opinion in Plant Biology* 13:724–730
- Segami S, Makino S, Miyake A, Asaoka M, Maeshima M (2014) **Dynamics of Vacuoles and H⁺-pyrophosphatase visualized by monomeric green fluorescent protein in *Arabidopsis*: artifactual bulbs and native intravacuolar spherical structures.** *The Plant Cell* 26:3416–3434
- Segami S, Nakanishi Y, Sato MH, Maeshima M (2010) **Quantification, organ-specific accumulation and intracellular localization of type II H⁺-pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant and Cell Physiology* 51:1350–1360
- Serrano A, Pérez-Castiñeira JR, Baltscheffsky M, Baltscheffsky H (2007) **H⁺-PPases: yesterday, today and tomorrow.** *IUBMB Life* 59:76–83
- Shen J, Zeng Y, Zhuang X, Sun L, Yao X, Pimpl P, Jiang L (2013) **Organelle pH in the *Arabidopsis* Endomembrane System.** *Molecular Plant* 6:1419–1437

- Shi C-Y, Song R-Q, Hu X-M, Liu X, Jin L-F, Liu Y-Z (2015) **Citrus PH5-like H⁺-ATPase genes: identification and transcript analysis to investigate their possible relationship with citrate accumulation in fruits.** *Frontiers in Plant Science* 6:
- Shiratake K, Kanayama Y, Maeshima M, Yamaki S (1997) **Changes in H⁺-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit.** *Plant & Cell Physiology* 38:1039–1045
- Shitan N, Yazaki K (2013) **Chapter nine - new insights into the transport mechanisms in plant vacuoles.** In: Jeon KW (ed) *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 383–433
- Skou JC, Esmann M (1992) **The Na, K-ATPase.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24:249–261
- Smith FA, Raven JA (1979) **Intracellular pH and its regulation.** *Annual Review of Plant Physiology* 30:289–311
- Song W-Y, Sohn EJ, Martinoia E, Lee YJ, Yang Y-Y, Jasinski M, Forestier C, Hwang I, Lee Y (2003) **Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants.** *Nature Biotechnology* 21:914–919
- Stitt M (1998) **Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP.** *Botanica Acta* 111:167–175
- Strompen G, Dettmer J, Stierhof Y-D, Schumacher K, Jürgens G, Mayer U (2005) **Arabidopsis vacuolar H-ATPase subunit E isoform 1 is required for Golgi organization and vacuole function in embryogenesis.** *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 41:125–132
- Sze H (1985) **H⁺-Translocating ATPases: advances using membrane vesicles.** *Annual Review of Plant Physiology* 36:175–208
- Sze H, Schumacher K, Müller ML, Padmanaban S, Taiz L (2002) **A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase.** *Trends in Plant Science* 7:157–161
- Taiz L, Zeiger E (2006) **Plant physiology.** 4th Edition, *Sinauer Associates, Inc.*, Sunderland, Mass USA
- Te J, Melcher U, Howard A, Verchot-Lubicz J (2005) **Soilborne wheat mosaic virus (SBWMV) 19K protein belongs to a class of cysteine rich proteins that suppress RNA silencing.** *Virology Journal* 2:18
- Thiel G, MacRobbie EA, Blatt MR (1992) **Membrane transport in stomatal guard cells: the importance of voltage control.** *The Journal of Membrane Biology* 126:1–18
- Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hörtensteiner S, Matile P, Amrhein N, Martinoia E (1998) **An ABC-transporter of Arabidopsis thaliana has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity.** *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 13:773–780
- Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H (1999) **A recessive Arabidopsis mutation.** *The Plant Cell* 11:1195–1206
- Tsunekawa K, Shijuku T, Hayashimoto M, Kojima Y, Onai K, Morishita M, Ishiura M, Kuroda T, Nakamura T, Kobayashi H, Sato M, Toyooka K, Matsuoka K, Omata T, Uozumi N (2009) **Identification and characterization of the NA⁺/H⁺ antiporter NHAS3 from the thylakoid membrane of Synechocystis sp. PCC 6803.** *Journal of Biological Chemistry* 284:16513

- Tzfira T, Tian G-W, Lacroix B, Vyas S, Li J, Leitner-Dagan Y, Krichevsky A, Taylor T, Vainstein A, Citovsky V (2005) **pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants.** *Plant Molecular Biology* 57:503
- Van RC, Pan YJ, Hsu SH, Huang YT, Hsiao YY, Pan RL (2005) **Role of transmembrane segment 5 of the plant vacuolar H⁺-pyrophosphatase.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1709:84–94
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ, Pantoja O (1999) **Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed in the whole plant.** *Planta* 207:426–435
- Vercruyssen L, Gonzalez N, Werner T, Schmullig T, Inze D (2011) **Combining enhanced root and shoot growth reveals cross talk between pathways that control plant organ size in *Arabidopsis*.** *PLANT PHYSIOLOGY* 155:1339–1352
- Verweij W, Spelt C, Sansebastiano G-PD, Vermeer J, Reale L, Ferranti F, Koes R, Quattrocchio F (2008) **An H⁺ P-ATPase on the tonoplast determines vacuolar pH and flower colour.** *Nature Cell Biology* 10:1456–1462
- Viotti C (2014) **ER and vacuoles: never been closer.** *Frontiers in Plant Science* 5:20
- Walker DJ, Leigh RA, Miller AJ (1996) **Potassium homeostasis in vacuolate plant cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:10510–10514
- Wang B, Lüttge U, Ratajczak R (2001) **Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*.** *Journal of Experimental Botany* 52:2355–2365
- Wang Y, Dindas J, Rienmüller F, Krebs M, Waadt R, Schumacher K, Wu W-H, Hedrich R, Roelfsema MRG (2015) **Cytosolic Ca²⁺ signals enhance the vacuolar ion conductivity of bulging *Arabidopsis* root hair cells.** *Molecular Plant* 8:1665–1674
- Weiner H, Stitt M, Heldt HW (1987) **Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 893:13–21
- White E, Cipriani R (1990) **Role of adenovirus E1B proteins in transformation: altered organization of intermediate filaments in transformed cells that express the 19-kilodalton protein.** *Molecular and Cellular Biology* 10:120–130
- White P (2001) **Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: A Review.** *Annals of Botany* 88:967–988
- Wink M (1993) **The plant vacuole: a multifunctional compartment.** *Journal of Experimental Botany* 44:231–246
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW (1993) **Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves.** *Planta* 191:180–190
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW (1994) **Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves.** *Planta* 193:530–535
- Wu H (2018) **Plant salt tolerance and Na⁺ sensing and transport.** *The Crop Journal* 6:215–225
-

- Yamaguchi T, Hamamoto S, Uozumi N (2013) **Sodium transport system in plant cells.** *Frontiers in Plant Science* 4:410
- Yang Y, Tang RJ, Li B, Wang HH, Jin YL, Jiang CM, Bao Y, Su HY, Zhao N, Ma XJ, Yang L, Chen SL, Cheng XH, Zhang HX (2015) **Overexpression of a *Populus trichocarpa* H⁺-pyrophosphatase gene PtVP1.1 confers salt tolerance on transgenic poplar.** *Tree Physiology* 35:663–677
- Yang Y, Tang R-J, Mu B, Ferjani A, Shi J, Zhang H, Zhao F, Lan W-Z, Luan S (2018) **Vacuolar Proton Pyrophosphatase is required for high magnesium tolerance in *Arabidopsis*.** *International Journal of Molecular Sciences* 19:3617
- Yao M, Zeng Y, Liu L, Huang Y, Zhao E, Zhang F (2012) **Overexpression of the halophyte *Kalidium foliatum* H⁺-pyrophosphatase gene confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*.** *Molecular Biology Reports* 39:7989–7996
- Yeo AR, Flowers TJ (1986) **Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils.** *Functional Plant Biology* 13:161–173
- Zaal BJ van der, Neuteboom LW, Pinas JE, Chardonnens AN, Schat H, Verkleij JAC, Hooykaas PJJ (1999) **Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation.** *Plant Physiology* 119:1047–1056
- Zeng Y, Li Q, Wang H, Zhang J, Du J, Feng H, Blumwald E, Yu L, Xu G (2018) **Two NHX-type transporters from *Helianthus tuberosus* improve the tolerance of rice to salinity and nutrient deficiency stress.** *Plant Biotechnology Journal* 16:310–321
- Zhang J, Li J, Wang X, Chen J (2011) **OVP1, a vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance.** *Plant physiology and biochemistry: PPB* 49:33–38
- Zhang J-L, Flowers TJ, Wang S-M (2009) **Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants.** *Plant and Soil* 326:45
- Zhao F-Y, Zhang X-J, Li P-H, Zhao Y-X, Zhang H (2006) **Co-expression of the *Suaeda salsa* SsNHX1 and *Arabidopsis* AVP1 confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single SsNHX1.** *Molecular Breeding* 17:341–353
- Zhou J, Jiao F, Wu Z, Li Y, Wang X, He X, Zhong W, Wu P (2008) **OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants.** *Plant Physiology* 146:1673–1686
- Zimmermann U, Hüsken D, Schulze E-D (1980) **Direct turgor pressure measurements in individual leaf cells of *Tradescantia virginiana*.** *Planta* 149:445–453
- Zingarelli L, Anzani P, Lado P (1994) **Enhanced K⁺-stimulated pyrophosphatase activity in NaCl-adapted cells of *Acer pseudoplatanus*.** *Physiologia Plantarum* 91:510–516

7.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transportmechanismen an der Membran.....	16
Abbildung 2: Vakuoläre PPase und ATPase.....	19
Abbildung 3: Funktionsweise des Homodimers V-PPase aus Lin et al. (2012).....	26
Abbildung 4: Zusammensetzung des Vektors PPase & free eGFP pCambia 2300.....	38
Abbildung 5: Schema des pSAT-Fragmentes	39
Abbildung 6: t-DNA-Modell der PPasen mit freiem eGFP	43
Abbildung 7: t-DNA-Model der mGFP-markierten NbVHP1	44
Abbildung 8: <i>Nicotiana benthamiana</i> Agrobakterien-Infiltration.....	48
Abbildung 9: Spannungspulsprotokoll zur Ermittlung der Leitfähigkeit.....	59
Abbildung 10: Messkonfigurationen der <i>Patch-Clamp</i> -Technik	61
Abbildung 11: Anfertigungsschritte einer Messelektroden-Pipette	62
Abbildung 12: Aufbau des <i>Patch-Clamp</i> -Messplatzes	64
Abbildung 13: Aufbau der Messkammer	65
Abbildung 14: Eichkurve für BCECF.....	72
Abbildung 15: Sättigungs-Lichtimpuls-Protokoll	75
Abbildung 16: Vergleich der V-PPase-Aminosäuresequenzen.....	83
Abbildung 17: Expressionsnachweis endogener V-PPasen in <i>Nicotiana benthamiana</i> Mesophyllzellen	83
Abbildung 18: NbVHP1-mGFP Fluoreszenz in <i>N. benthamiana</i> Mesophyllzellen.....	85
Abbildung 19: Freie GFP-Fluoreszenz in <i>N. benthamiana</i> Mesophyllzellen.....	86
Abbildung 20: Calcium-abhängige V-PPase -Stromantworten.....	88
Abbildung 21: PP _i -induzierte Stromantworten transformierter <i>Nicotiana benthamiana</i> Mesophyllvakuolen.....	90
Abbildung 22: IPP1-Aktivität in <i>Nicotiana benthamiana</i>	92
Abbildung 23: Natriumgehalt salzbehandelter <i>Nicotiana benthamiana</i> Blätter.....	94
Abbildung 24: Salzurückstände im Appoplasten	95
Abbildung 25: Visueller Nachweis der GFP-Expression bei gleichzeitiger Salzapplikation.....	96
Abbildung 26: Phänotyp transformierter <i>Nicotiana benthamiana</i> Blätter	98
Abbildung 27: Photosystem-II-Gehalt von transformiertem <i>Nicotiana benthamiana</i> Blattgewebe.....	99
Abbildung 28: Auswirkung der Infiltration unterschiedlicher Salze auf <i>Nicotiana benthamiana</i> Blätter	100
Abbildung 29: Expression der endogenen NbVHPs nach Salzbehandlung.....	102
Abbildung 30: Ionen/Metabolit-Gehalt nach PPase-Überexpression und Salzbehandlung	104
Abbildung 31: Einfluss von injiziertem NaCl auf die Pumpaktivität der V-ATPase und V-PPase	106
Abbildung 32: Einfluss der NbVHP1-Überexpression auf den pH der Zelle	108
Abbildung 33: PP _i -abhängige Pumpaktivitätsmessungen an V-PPase-überexprimierten Vakuolen.....	111
Abbildung 34: Membranpotenzial NbVHP1-überexprimierender Epidermiszellen	112

Abbildung 35: Anionen.....	135
Abbildung 36: Kationen.....	136
Abbildung 37: organische Säuren.....	136
Abbildung 38: Zucker.....	136
Abbildung 39: unpolare Aminosäuren.....	137
Abbildung 40: polare Aminosäuren.....	137
Abbildung 41: Basische und saure Aminosäuren.....	137

7.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Publikationsauswahl stabiler V-PPase-Überexpressionslinien und deren Phänotyp.....	29
Tabelle 2: PCR-Programm.....	35
Tabelle 3: qRT-PCR Standard-Programm.....	55
Tabelle 4: IEC-Messbedingungen nach Ionenart.....	79
Tabelle 5: Prozentuale Übereinstimmung der V-PPase-Aminosäuresequenzen.....	82
Tabelle 6: Publikationsauswahl zur Reaktion der vakuolären Protonenpumpaktivität auf Salz.....	119

7.5. Formelverzeichnis

Formel 1 Hydrolyse von ATP.....	20
Formel 2 Hydrolyse von Pyrophosphat.....	23
Formel 3: Vorzeichenkonvention nach Bertl et al. (1992).....	61
Formel 4: Michaelis-Menten-Gleichung.....	69
Formel 5: Kitajima and Butler (1975).....	76
Formel 6: Genty et al. (1989).....	76
Formel 7: Bilger and Björkman (1990).....	76
Formel 8: Berechnung der Ionen-Konzentration auf das Frischgewicht.....	79

7.6. Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
AKT-Faktor	Aktinfaktor zur Berechnung der Expressionsrate
At	<i>A. thaliana</i> = <i>Arabidopsis thaliana</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCECF-AM	pH-abhängiger Fluoreszenzfarbstoff <i>mit</i> Esterrest
BCECF	pH-abhängiger Fluoreszenzfarbstoff <i>ohne</i> Esterrest
bp	Basen Paare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	kompakte DNA (ohne Introns)
Cl ⁻	Chloridion
CLSM	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie
C _m	Membrankapazität
Da	Dalton = atomare Masseneinheit
d.h.	das heißt
DNA	DNS = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
dt.	deutsch
DTT	Dithiotreitol
eGFP	enhanced GFP
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
engl.	englisch
ΔG	freie Energie nach Gibbs
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
F-AAS	Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie

fg	Femtogramm
FM4-64	Fluoreszenzmarker für organische Membranen
fwd	fw = forward
h	Stunde
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
Hz	Herz
IDP	Imidophosphat
IEC	Ionenaustauschchromatographie
J / kJ	Joule / Kilojoule
KCl	Kaliumchlorid
KPP _i	Kaliumpyrophosphat
LB	Lysogen Brühe
LC	Light-Cycler
LiCl	Litiumchlorid
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGFP	monomeres GFP
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol $\approx 6 \cdot 10^{23}$ Teilchen
mOsm	Milliosmol
Mrd.	Milliarden
mRNA	Boten-RNA
mV	Millivolt
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
Nb	<i>N. benthamiana</i> = <i>Nicotiana benthamiana</i>
nm	Nanometer
NPQ	nicht-photochemisch genutzte Energie
OD	optische Dichte

pA	Pikoamper
PAM	Pulse-amplituden-modulations Technik
pCambia	Bivalenter Vektor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pF	Pikofarad
pH	Maß für ProtenKonzentration (logarythmisch)
P _i	organisches Phosphat
PMF	Proton motif force (Protonenmotorische Kraft)
PPase	Pyrophosphatase
PP _i	Pyrophosphat
PS	Photosystem
pSAT	Vektor
qPCR	quantitative PCR
RBC	Ribulose-bisphosphat-Carboxylase
rev	rv = reverse
RISC	RNA-induzierter Selencing-Komplex
RNA	RNS = Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	real Time = echt Zeit
s	Sekunde
SE	Standard Fehler
SOB	Superoptimale Brühe
SOC	SOB-Medium mit Glucose
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
tRNA	transfer RNA
u.a.	unter anderem
µl	Mykroliter
µm	Mykrometer
µM	Mykromolar
USER	Uracil-spezifische Exzisionsreagenz
UTR	untranslatierte Regionen

UV	Ultraviolett
u.v.m.	und vieles mehr
v.a.	vor allem
VHP	Vakuläre Protonen-Pumpe
V _m	Membranpotential
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
YEB	Hefeextraktbrühe
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
Ω	Ohm
DPN1, Pac1, Nt.BbvCl, NEB	Restriktionsenzyme

Proteine:

AVP1	<i>AtVHP1 = Arabidopsis thaliana</i> vakuoläre Protonenpumpe
NbVHP1	<i>Nicotiana benthamiana</i> vakuoläre Protonenpumpe
NbVHP2	<i>Nicotiana benthamiana</i> vakuoläre Protonenpumpe
NHX	Antiporter (Natrium-Proton-Exchanger)
IPP1	lösliche Pyrophosphatase aus Hefe
V-PPase	Vakuoläre Pyrophosphatase
VrVHP1	VrPPase = <i>Vigna radiata</i> Protonenpumpe

7.7. Publikationen

Dieser Doktorarbeit zugrundeliegende Publikation:

Graus D, Konrad KR, Bemm F, Patir Nebioglu MG, Lorey C, Duscha K, Güthoff T, Herrmann J, Ferjani A, Cuin TA, Roelfsema MRG, Schumacher K, Neuhaus HE, Marten I, Hedrich R. (2018). High V-PPase activity is beneficial under high salt loads, but detrimental without salinity. *New Phytol.* **219**:1421–1432

Weitere Publikationen:

Jung B, Ludewig F, Schulz A, Meißner G, Wöstefeld N, Flügge UI, Pommerrenig B, Wirsching P, Sauer N, Koch W, Sommer F, Mühlhaus T, Schroda M, Cuin TA, **Graus D**, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE. (2015). Identification of the transporter responsible for sucrose accumulation in sugar beet taproots. *Nat. Plants* **1**:14001

Kuger S, **Graus D**, Brendtke R, Günther N, Katzer A, Lutyj P, Polat B, Chatterjee M, Sukhorukov VL, Flentje M, Djuzenova CS. (2013). Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Depends on Drug-Irradiation Schedule. *Transl. Oncol.* **6**:169–179

Nieberl P, Ehrl C, Pommerrenig B, **Graus D**, Marten I, Jung B, Ludewig F, Koch W, Harms K, Flügge UI, Neuhaus HE, Hedrich R, Sauer N. (2017). Functional characterisation and cell specificity of BvSUT1, the transporter that loads sucrose into the phloem of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) source leaves. *Plant Biol. Stuttg. Ger.* **19(3)**:315-326

7.8.Lebenslauf

Name Dorothea Graus

Schulbildung

1993-1997

Besuch der Grünewald-Volksschule Aschaffenburg

1997-2006

Besuch des K.-T.-v.-Dalberg-Gymnasium Aschaffenburg (Bayern) mit
abschließendem Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Studium

Okt 2006

Diplomstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Fachbereich
Biologie

Feb – Nov 2011

Anfertigung der Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof- Dr. M. Flentje im Labor
der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Würzburg
Thema: *Modulation der Strahlenempfindlichkeit humaner Glioblastomzelllinien
unterschiedlichen PTEN-Status mittels des neuartigen dualen mTOR- und PI3K-
Inhibitors NVP-BEZ235*

Promotionsstudium

Mai 2012- April 2018

Promotionsstudium am Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik
(Botanik I) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Prof.
Dr. R. Hedrich.

7.9.Danksagung

Vor allem möchte ich Prof. Dr. Rainer Hedrich danken, in dessen Labor ich unter hervorragenden Arbeitsbedingungen meine Dissertation anfertigen durfte. Auch für das spannende Thema, die vielen motivierenden und anregenden Diskussionen und für Möglichkeit der flexibleren Gestaltung meiner Arbeitszeiten während meiner Familiengründung möchte ich ihm ausdrücklich danken.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Prof. Dr. Irene Marten für die ausgezeichnete und geduldige Betreuung, die sich in zahlreichen Diskussionen, nützlichen Ratschlägen, aber auch in großem Vertrauen mir gegenüber widerspiegelte.

Meinem zweitgutachter Prof. Dr. Erhard Wischmeyer möchte ich für das Interesse an meiner Arbeit und für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ich möchte auch Dr. Kai Konrad und Tilman Güthoff meinen Dank ausdrücken, die die pH-Messungen ermöglichten.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Dietmar Geiger für die Anleitung in molekularbiologischem Arbeiten, Dr. M. Rob G. Roelfsema für die Hilfe bei den Einstichmessungen, Dr. Rosalia Deeken für ihr Wissen über Agrobakterientransformation und Dr. Peter Ache für die Unterstützung beim Klonieren der endogenen NbVHPs.

Sowohl Meliha Görkem Patir Nebioglu, für die Hydrolyseaktivitätsmessungen, Felix Bemm für die Identifikation der NbVHP-Gene als auch Christian Lorey, für die Atomabsorptionsspektroskopie sprechen ich hiermit meinen Dank aus.

Jan Ratje, Johannes Herrmann, Tracey Ann Cuin und Heike Müller und Sabrina Förster gilt mein besonderer Dank für die kollegialität und Unterstützung während meiner Zeit im Labor. Meinem Mann und meiner Mutter, danke ich für ihre langjährige Unterstützung, Geduld und ihr Verständnis, während meines Studiums und meiner Dissertation.

Ich danke den Mitgliedern der Forschergruppe FOR 1061 für den hilfreichen wissenschaftlichen Austausch, besonders gilt mein Dank Prof. Dr. Karin Schumacher und Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus, deren Labore ich für Messungen besuchen durfte.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Institutes für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft, ihre wissenschaftlichen Anregungen und das freundschaftliche Miteinander danken. Im Besonderen gilt mein Dank Joachim Rothenhöfer und seinen Gärtnern, für die Anzucht der Pflanzen und Caroline Weidmann, für die unkomplizierte Literaturbeschaffung.

7.10. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5

der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Auswirkungen einer V-PPase-Überexpression auf *Nicotiana benthamiana* Blattzellen und deren physiologische Bedeutung unter Salzbelastung**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Würzburg, den _____

Dorothea Graus