

Charakterisierung hydrophiler Permeationswege
in der pflanzlichen Kutikula
anhand der Permeationseigenschaften
ionischer Aminosäuren

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



vorgelegt von

Katja Arand

aus Berlin

Würzburg, 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. T. Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. M. Riederer

Gutachter: Prof. Dr. W. Kaiser

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DIE PFLANZLICHE KUTIKULA	3
1.1.1	BARRIEREEIGENSCHAFTEN DER KUTIKULÄREN WACHSE	4
1.1.2	GESETZMÄßIGKEITEN DES KUTIKULÄREN TRANSPORTS	6
1.2	PERMEATIONSEIGENSCHAFTEN DER KUTIKULA	10
1.2.1	PERMEATION NICHT-IONISCHER, LIPOPHILER SUBSTANZEN	10
1.2.2	PERMEATION IONISCHER UND NICHT-IONISCHER HYDROPHILER SUBSTANZEN	10
1.2.3	PERMEATION VON WASSER	12
1.3	FRAGESTELLUNG	14
1.3.1	AUSWAHL DER PFLANZEN	14
1.3.2	CHARAKTERISIERUNG DES HYDROPHILEN TRANSPORTWEGES	15
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	18
2.1	PFLANZENMATERIAL	18
2.1.1	ISOLIERUNG DER KUTIKULARMEMBRANEN	18
2.1.2	GRAVIMETRISCHE BESTIMMUNG DER KUTIKULÄREN KOMPONENTEN	19
2.1.3	TITRATION VON ISOLIERTEN KUTIKULARMEMBRANEN	19
2.2	MODELLSUBSTANZEN	21
2.2.1	CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON AMINOSÄUREN	22
2.3	QUANTIFIZIERUNG VON AMINOSÄUREN MITTELS GC-ANALYTIK	25
2.3.1	DERIVATISIERUNG DER PROBEN	25
2.3.2	QUANTIFIZIERUNG DER AMINOSÄUREN	27
2.4	PERMEATIONSKAMMERN	28
2.5	WASSERTRANSPARATION	29
2.5.1	EINFLUSS DER KUTIKULÄREN WACHSE AUF DIE WASSERTRANSPARATION	29
2.5.2	PH ABHÄNGIGKEIT DER WASSERTRANSPARATION	30
2.6	AMINOSÄURENPERMEATION	31

2.6.1	VERWENDETE AMINOSÄURELÖSUNGEN	31
2.6.2	ABLAUF DER PERMEATIONSEXPERIMENTE	31
2.6.3	PH ABHÄNGIGKEIT DER AMINOSÄUREPERMEATION	32
2.6.4	EINFLUSS DER KUTIKULÄREN WACHSE AUF DIE PERMEATION VON AMINOSÄUREN	32
2.7	BERECHNUNG VON LEITWERTEN	33
2.8	KUTIKULA/WASSER VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN	34
2.8.1	PH ABHÄNGIGKEIT DER WASSERSORPTION VON KUTIKULARMEMBRANEN	34
2.8.2	KUTIKULA/WASSER-VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN FÜR AMINOSÄUREN	34
2.9	HYDROPHOBIZITÄT VON BLATTOBERFLÄCHEN	36
2.10	BESTIMMUNG DES AMINOSÄUREGEHALTS	37
2.10.1	AMINOSÄUREN IN BLÄTTERN	37
2.10.2	AMINOSÄUREN IN BLÜTEN VON HEDERA HELIX	37
2.10.3	AMINOSÄUREN AUF BLATTOBERFLÄCHEN	38
2.11	LEACHINGSIMULATION VON AMINOSÄUREN AUS INTAKTEN BLÄTTERN	39
2.11.1	STEADY-STATE	39
2.11.2	NON-STEADY-STATE	40
2.12	VISUALISIERUNG DER KUTIKULÄREN EIGENSCHAFTEN	41
2.12.1	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN	41
2.12.2	FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN	41
3	ERGEBNISSE	42
<hr/>		
3.1	EIGENSCHAFTEN DER ISOLIERTEN KUTIKULARMEMBRANEN	42
3.1.1	GRAVIMETRISCHE BESTIMMUNG DER KUTIKULÄREN KOMponentEN	42
3.1.2	TITRATION VON ISOLIERTEN KUTIKULARMEMBRANEN	43
3.2	WASSERTRANSPIRATION	44
3.2.1	EINFLUSS DER KUTIKULÄREN WACHSE AUF DIE WASSERPERMEATION	44
3.2.2	PH ABHÄNGIGKEIT DER WASSERPERMEATION	45
3.3	QUANTIFIZIERUNG DER AMINOSÄUREN	46
3.4	AMINOSÄUREPERMEATION	47
3.4.1	PH ABHÄNGIGKEIT DER AMINOSÄUREPERMEATION	47
3.4.2	EINFLUSS DER KUTIKULÄREN WACHSE AUF DIE AMINOSÄUREPERMEATION	49
3.5	KUTIKULA/WASSER-VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN	50
3.5.1	PH-ABHÄNGIGKEIT DER WASSERSORPTION VON KUTIKULARMEMBRANEN	50
3.5.2	KUTIKULA/WASSER-VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN VON AMINOSÄUREN	51
3.6	HYDROPHOBIZITÄT VON BLATTOBERFLÄCHEN	52
3.7	BESTIMMUNG DES AMINOSÄUREGEHALTS	52

3.7.1 INTAKTE BLÄTTERT	52
3.7.2 BLÜTEN VON <i>HEDERA HELIX</i>	54
3.7.3 AMINOSÄUREN AUF DER BLATTOBERFLÄCHE	55
3.8 LEACHINGEXPERIMENTE	56
3.8.1 „STEADY-STATE“-BEDINGUNGEN	56
3.8.2 „NON-STEADY-STATE“ BEDINGUNGEN	58
3.9 VISUALISIERUNG DER KUTIKULÄREN EIGENSCHAFTEN	59
3.9.1 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON INTAKTEN BLÄTTERN	59
3.9.2 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON ISOLIERTEN KUTIKULAR- MEMBRANEN	60
3.9.3 FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON ISOLIERTEN KUTIKULAR- MEMBRANEN	63
4 DISKUSSION	65
4.1 ETABLIERUNG DER METHODEN	65
4.1.1 PERMEATION VS. UDOS UND SOFU	65
4.1.2 QUANTIFIZIERUNG HYDROPHILER MODELSUBSTANZEN	67
4.2 MEMBRANPOTENTIAL.	69
4.3 LIPOPHILIE DER AMINOSÄUREN	72
4.4 EIGENSCHAFTEN DER KUTIKULA VON <i>HEDERA HELIX</i>	74
4.4.1 WASSERSORPTION	74
4.4.2 DONNANAUSCHLUSS	75
4.4.3 SORPTION VON AMINOSÄUREN	76
4.4.4 VERTEILUNGSABHÄNGIGKEIT DER AMINOSÄUREPERMEATION	79
4.4.5 GRÖßENABHÄNGIGKEIT DER AMINOSÄUREPERMEATION	83
4.4.6 EINFLUSS DER HYDRATHÜLLE	85
4.4.7 DIMENSIONEN DES HYDROPHILEN PERMEATIONSWEGES	90
4.5 EIGENSCHAFTEN DER KUTIKULA DER LIONS-ROSE®	94
4.5.1 WASSERSORPTION	94
4.5.2 SORPTION VON AMINOSÄUREN	95
4.5.3 VERTEILUNGSABHÄNGIGKEIT DER AMINOSÄUREPERMEATION	97
4.5.4 GRÖßENABHÄNGIGKEIT DER AMINOSÄUREPERMEATION	98
4.5.5 EINFLUSS DER HYDRATHÜLLE	101
4.6 VERGLEICH DER HYDROPHILEN PERMEATIONSWEGE IN ISOLIERTEN KUTIKULARMEMBRANEN VON EFEU UND ROSE	104
4.7 LEACHINGEXPERIMENTE MIT INTAKTEN BLÄTTERN	106

4.7.1 „ <i>STEADY-STATE</i> “ - BEDINGUNGEN	107
4.7.2 STOMATA ALS MÖGLICHE PERMEATIONSWEGE	111
4.7.3 <i>LEACHING</i> UNTER NATÜRLICHEN BEDINGUNGEN – „ <i>NON-STEADY-STATE</i> “	115
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>119</u>
<u>6 SUMMARY</u>	<u>123</u>
<u>7 LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>126</u>

1 Einleitung

Eine der größten Herausforderungen für das Leben an Land ist das stark negative Wasserpotential der Atmosphäre, welches einen kontinuierlichen Wasserverlust aller lebenden Organismen an ihre Umwelt bewirkt.

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen eine effektive Verdunstungsbarriere entwickelt, die den Wasserverlust auf ein Minimum reduziert und kontrollierbar macht (Riederer & Schreiber, 2001). Die pflanzliche Kutikula ist eine Membran, die allen primären, oberirdischen Teilen höherer Pflanzen wie Blättern, Blüten oder Früchten aufgelagert ist (Martin & Juniper, 1970). Lediglich die Spaltöffnungen unterbrechen diese kontinuierliche Haut und ermöglichen über ihre Öffnungsweite eine aktive Regulation der CO₂-Aufnahme und der Wasserabgabe (Schönherr, 1982). Als strukturelles Element, welches das zelluläre Gefüge des darunter liegenden Gewebes verstärkt und stützt, ermöglicht die Kutikula die Separierung sich neu entwickelnder Organe (Lolle *et al.*, 1992; Nawrath, 2002). Ihre physikalischen Eigenschaften schützen die Pflanze zusätzlich vor Schädigungen, die durch extreme Witterungsbedingungen wie Wind, Regen, Frost oder UV Strahlung (Krauss *et al.*, 1997) entstehen können.

Als Grenzfläche zwischen Pflanzen und ihrer Umgebung spielt die Kutikula eine wichtige Rolle beim Stoffaustausch zwischen den Umweltbereichen Boden und Atmosphäre (Riederer, 1995). Gasförmige und leicht flüchtige Substanzen gelangen über die Stomata in das Pflanzeninnere (Riederer *et al.*, 2002), wohingegen die Aufnahme von schwer flüchtigen Substanzen, die als Feststoffe aus der Luft, oder durch Nebel und Regen gelöst, auf die Blattoberfläche treffen, durch die kutikulären Transporteigenschaften bestimmt wird (Riederer *et al.*, 1994). Die Relevanz der kutikulären Grenzflächen wird deutlich, wenn man die Oberflächenvergrößerung betrachtet, die Pflanzenbestände im Verhältnis zur Bodenfläche bewirken können. Der Quotient aus Blattfläche und Bodenfläche definiert den Blattflächenindex, der im Fall von borealen Wäldern Werte bis zu 16 annehmen kann (Larcher, 2001). Bei landwirtschaftlichen Pflanzungen erreicht die Blattfläche eines Bestandes durchschnittlich das 4fache der bedeckten Bodenfläche, so dass den kutikulären Grenzflächen unter dem Gesichtspunkt der Blattapplikation von Pflanzenschutzmitteln (Hock *et al.*, 1995) und dem Eintrag von Xenobiotika in die

Nahrungskette eine wichtige Bedeutung zukommt (Riederer & Schönherr, 1995). Das Verständnis von Aufnahme- und Transportprozessen innerhalb der Kutikula kann dabei helfen, die Pestizidapplikation und die Blattdüngung zu optimieren.

Über die Kutikula werden durch die Benetzung mit Nebel, Tau oder Regen organische Nährstoffe und Salze aus dem Blattinneren ausgewaschen („*Leaching*“, Tukey, 1970). Diese können einerseits durch Abwaschen in den Nährstoffkreislauf des Ökosystems zurückgeführt werden (Larcher, 2001), andererseits stehen sie auf der Oberfläche blattassoziierter Mikroorganismen als Nahrungsquelle zur Verfügung (Mercier & Lindow, 2000). Die Kutikula und die durch ihre Transporteigenschaften bestimmte Oberflächenchemie stellt somit die erste Interaktionsebene für epiphytische und pathogene Mikroorganismen (Knoll & Schreiber, 2004; Schreiber *et al.*, 2004; Leveau, 2006; Carver & Gurr, 2006; Zabka *et al.*, 2008) oder die Wirtserkennung bei Insekten (Eigenbrode & Espelie, 1995; Städler, 1986; Müller, 2006) dar. Ein besseres Verständnis der spezifischen Interaktionen zwischen Insekten oder Mikroorganismen und pflanzlichen Oberflächen könnte in der biologischen Schädlingsbekämpfung Anwendung finden.

1.1 Die pflanzliche Kutikula

Die Dicke der Kutikula variiert in Abhängigkeit der Spezies zwischen $< 0,1 \mu\text{m}$ und $> 10 \mu\text{m}$ (Holloway, 1994), wobei dieser Parameter keine Rückschlüsse auf die Permeabilität zulässt (Kamp, 1930; Schönherr, 1982; Becker *et al.*, 1986; Schönherr & Riederer, 1989; Riederer & Schreiber, 1995, 2001; Kerstiens, 1996). Im Gegensatz zu homogenen, synthetischen Membranen, weist die Kutikula eine hohe Heterogenität in Bezug auf ihre chemische Beschaffenheit und Feinstruktur auf. Grundsätzlich lassen sich zwei verschiedene Lipidbestandteile klassifizieren. Das amorphe Biopolymer Kutin besteht hauptsächlich aus Hydroxyalkansäuren mit Kettenlängen von 16 und 18 C-Atomen. Diese sind über Esterbindungen vernetzt und bilden so das dreidimensionale Grundgerüst der Kutikula. Dieser Kutinmatrix sind verschiedene lipophile Substanzen ein- und aufgelagert, die als Gesamtheit die kutikulären Wachse darstellen und für die eigentlichen Barriereigenschaften der Membran verantwortlich sind.

Informationen über die interne Struktur der Kutikula können mit Hilfe histochemischer Methoden und mikroskopischer Techniken gewonnen werden. Hierbei lassen sich verschiedene transversale Schichten bestimmen (Holloway, 1982; Abbildung 1.1), deren Ausprägung in Abhängigkeit der Pflanzenspezies variiert.

Die Kutikula ist über eine Pektinlamelle mit der darunter liegenden Zellwand der Epidermiszellen verbunden. Von hier aus erstrecken sich Polysaccharidausläufer in die Kutikularschicht (cuticle layer) die den Hauptteil der Kutikula bildet und aus Kutin

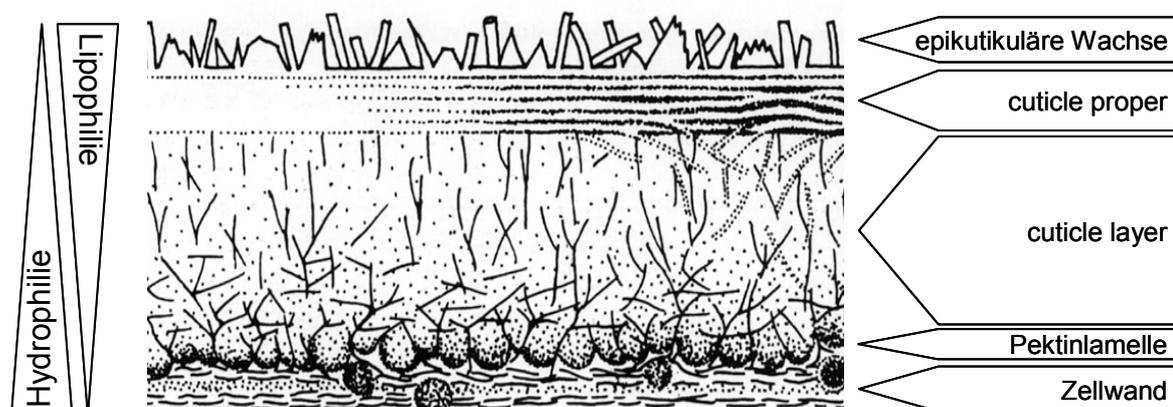


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Schichtung der Kutikula (nach: Jeffree, 1996)

und Wachs besteht. Darüber liegt eine Schicht die oft eine lamellare Struktur aufweist und kein Zellwandmaterial mehr enthält (cuticle proper). In einigen Spezies wie zum Beispiel *Prunus lauraceasus*, *Ilex aquifolium* oder bei Früchten der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) konnte diese Schicht allerdings nicht nachgewiesen werden (Lendzian & Kerstiens, 1991). Auf der Außenseite wird die Kutikula durch die epikutikulären Wachse zur Umwelt hin abgegrenzt. Die Grenzschicht zwischen Pflanzen und ihrer Umgebung bildet somit ein hydrophil-lipophil Gefälle vom inneren wässrigen Kompartiment der Zellwände bis hin zu den lipophilen epikutikulären Wachsen auf der Außenseite (Abbildung 1.1). So entsteht eine Schranke zwischen den beiden hydrophilen Bereichen Atmosphäre und Blattinneres die sich stark in ihrem Wasserpotential unterscheiden.

1.1.1 Barriereeigenschaften der kutikulären Wachse

Die Wachse bestehen vor allem aus besonders langkettigen, aliphatischen Verbindungen wie Alkanen, Alkoholen, Alkansäuren und Alkylestern, die in Abhängigkeit von der Substanzklasse Kettenlängen mit bis zu 50 C-Atomen erreichen können. Daneben sind häufig auch zyklische Verbindungen wie Triterpene enthalten. Auf Grund der unterschiedlichen Komponenten weisen die Wachse eine heterogene physikalische Struktur auf. Aliphatische Verbindungen können sich zu hoch geordneten, kristallinen Bereichen zusammenlagern (Zone A, Abbildung 1.2,

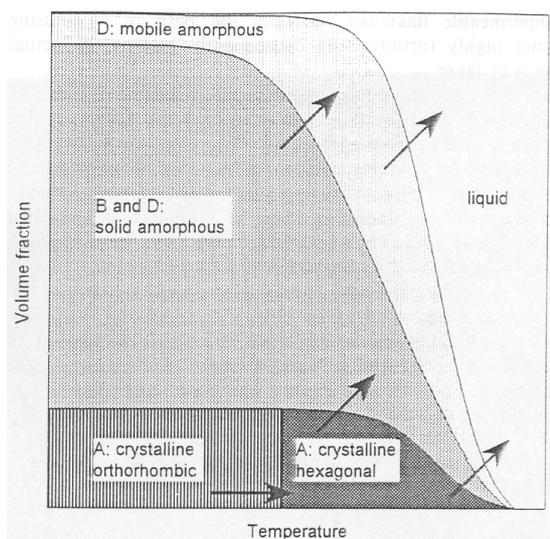


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Aggregatzustände kutikulärer Wachse in Abhängigkeit der Temperatur (aus: Riederer & Schreiber, 1995)

Abbildung 1.3), die der Diffusion von Substanzen nicht zugänglich sind.

Bei normaler Umgebungstemperatur sind die Kohlenstoffketten in den kristallinen Bereichen in einem orthorhombischen Kristallgitter angeordnet. Erhöht sich die Temperatur, so geht die Struktur in eine hexagonale Anordnung über, bis der Schmelzpunkt erreicht ist, ab dem auch die aliphatischen Bestandteile in flüssiger Form vorliegen (Reynhardt & Riederer, 1991; Riederer & Schreiber, 1995; Merk *et al.*, 1998; Abbildung 1.2). Auf Grund der

heterogenen Kettenlängenverteilung innerhalb der kristallinen Phase kommt es in den Randbereichen zu überhängenden Kettenenden, die einen weniger starren Zwischenraum zwischen zwei kristallinen Klustern bilden (Zone B, Abbildung 1.3). Diese Domänen bieten diffundierenden Molekülen einen bedeutend höheren Grad an Bewegungsfreiheit. Wachsbestandteile mit niedrigem Schmelzpunkt und sterisch anspruchsvolle Moleküle wie Triterpene können flüssig-amorphe Bereiche (Zone D, Abbildung 1.3) in Lücken zwischen den Kettenenden der Zone B oder außerhalb der kristallinen Zone bilden (Riederer & Schreiber, 1995). Diese beschriebenen Zonen finden sich hauptsächlich in der intrakutikulären Wachsstruktur innerhalb der Kutinmatrix. In synthetischen Wachsen finden sich innerhalb der Zone A zusätzliche unelastische, amorphe Bereiche die durch Defekte oder Verzweigungen der Ketten hervorgerufen werden (Lourens & Reynhardt, 1979). In pflanzlichen Wachsen ist diese Zone C allerdings sehr selten vorhanden (Reynhardt & Riederer, 1994).

Auf der Oberfläche der Kutikula bilden die epikutikulären Wachse einen abschließenden Wachsfilm und weisen abhängig von der Substanzklasse charakteristische Morphologien wie z.B. Stäbchen, Plättchen oder Röhren auf (Jeffree, 2006). Diese epikutikulären Wachsstrukturen verleihen der Oberfläche eine Mikrorauheit und beeinflussen dadurch die Wasserbenetzbarkeit (Adam, 1963; Holloway, 1969a,b). Das Ausbilden großflächiger Wasserfilme auf der

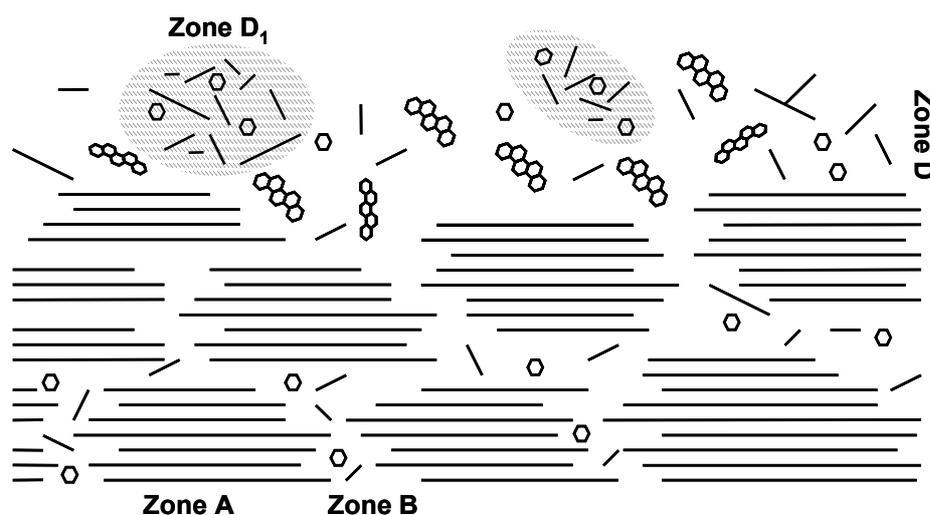


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der molekularen Struktur der intrakutikulären Wachse. Zone A: hochgeordnete, kristalline Bereiche. Zone B: überhängende Enden der Kohlenstoffketten aus den kristallinen Bereichen. Zone D: flüssig-amorphe Bereiche (stationär). Zone D₁: flüssig-amorphe Bereiche (mobil). Die Linien und hexagonalen Strukturen stellen aliphatische bzw. zyklische Wachsbestandteile dar (nach Riederer & Schreiber, 1995)

Blattoberfläche wird so verhindert und die Oberfläche trocken und sauber gehalten (Barthlott & Neinhuis, 1997). Die Pflanze profitiert in zweierlei Hinsicht davon, da Wasseraggregationen auf dem Blatt einerseits die Ansiedlung von möglicherweise schädlichen Mikroorganismen wie pathogenen Bakterien (Beatti & Lindow, 1995, 1999; Lindow & Leveau, 2002; Lindow & Brandl, 2003; Schreiber *et al.*, 2004) oder parasitischen Pilzen (Manners, 1963; Butler, 1996; Carver & Gurr, 2006; Zabka *et al.*, 2008), und andererseits das Auswaschen von organischen und anorganischen Nährstoffen aus dem Blattinneren begünstigen würden (Tukey *et al.*, 1965; Tukey, 1970).

Im angewandten, landwirtschaftlichen Bereich erschweren diese feinen Oberflächenstrukturen die Applikation und Aufnahme von Pflanzenschutzmitteln. Hier müssen Zusatzstoffe wie Tenside als Benetzungsmittel zum Einsatz kommen, um die Kontaktfläche zu vergrößern und so eine Aufnahme der Aktivsubstanzen über die Kutikula zu gewährleisten (Kirkwood, 1993; Stock & Holloway, 1993; Schönherr & Baur, 1994; Zabkiewicz, 2000).

1.1.2 Gesetzmäßigkeiten des kutikulären Transports

Trotz ihrer Barrierefunktion ist die Kutikula permeabel für viele natürlich vorkommende Substanzen wie Wasser, Nähr- und sekundäre Pflanzenstoffe aber auch für anthropogen eingetragene Umweltschadstoffe und Pflanzenschutzmittel (Burghardt & Riederer 2006; Schreiber & Schönherr, 2009). Da es sich um eine nicht stoffwechselaktive Membran handelt, finden hier ausschließlich physikalische Transportprozesse statt, die sich in verschiedene Phasen gliedern lassen. Treffen Substanzen in gelöster Form auf das Blatt, werden sie zunächst an der lipophilen Oberfläche der Kutikula adsorbiert und in das innere Kompartiment absorbiert. Entlang eines Konzentrationsgradienten diffundieren die Moleküle durch die Kutikula und werden an der Innenseite desorbiert, also in das wässrige Medium des Apoplasten abgegeben (Schreiber & Schönherr, 1992; Bukovac & Petracek, 1993). Es gibt also keinen aktiven Transport durch die Kutikula sondern vielmehr handelt es sich bei der Aufnahme über pflanzliche Grenzflächen um eine Diffusion aus einem wässrigen Donorkompartiment (z.B. Regentropfen) über eine Lipidmembran (Kutikula) in ein wässriges Rezeptorkompartiment (Apoplast).

Die Menge Substanz (M) [g oder mol], die dabei pro Zeiteinheit (t) [s] über die Grenzfläche diffundiert, ist unter Versuchsbedingungen messbar und definiert den Fluss (F) in [g s⁻¹] oder [mol s⁻¹]:

$$F = \frac{M}{t} \quad (1.1)$$

Da der Fluss direkt proportional zu der für die Diffusion zur Verfügung stehenden Fläche (A) ist, kann unter Einbeziehung der Fläche [m²] die Flussdichte (J) [g s⁻¹ m⁻²] berechnet werden :

$$J = \frac{F}{A} = \frac{M}{t \times A} \quad (1.2)$$

Ein Stofftransport findet nach dem 1. Fickschen Gesetz nur dann statt, wenn ein Konzentrationsgradient ($\Delta c > 0$) als treibende Kraft vorhanden ist. Bei der Diffusion in einer Membran ist die treibende Kraft durch den Konzentrationsgradienten in der Membran bestimmt (Abbildung 1.4). Dieser ist zwar nicht messbar, wird aber direkt durch den Konzentrationsunterschied zwischen den beiden wässrigen Phasen des Donor- und Rezeptorkompartiments bestimmt, der bei der Permeation durch eine Membran als treibende Kraft zu Grunde liegt:

$$C_{\text{Donor}} - C_{\text{Rezeptor}} = \Delta c \quad (1.3)$$

Proportional zu der treibenden Kraft ist der Leitwert (P), der die Dimension einer Geschwindigkeit [m s⁻¹] hat:

$$P \Delta c = J \quad \rightarrow \quad P = \frac{F}{A \times \Delta c} \quad (1.4)$$

Der Leitwert ist das Maß für die Permeabilität einer Membran für eine bestimmte Substanz (Kerler & Schönherr, 1988b) und macht die Permeationseigenschaften der Kutikula unterschiedlicher Pflanzenarten vergleichbar. Er wird bestimmt durch die substanzspezifischen Diffusionskoeffizienten (D) [m² s⁻¹] und Membran/Wasser-

Verteilungskoeffizienten (K) und der zu überwindenden Weglänge (l) [m], die mindestens der Dicke der Membran entspricht:

$$P = \frac{D \times K}{l} \quad (1.5)$$

Hierbei gibt der Membran/Wasser-Verteilungskoeffizient das Verteilungsgleichgewicht eines gelösten Stoffes an, das sich in den zwei aneinandergrenzenden Phasen Membran und wässriger Umgebung einstellt.

$$K = \frac{C_{\text{Membran}}}{C_{\text{Wasser}}} \quad (1.6)$$

Der Verteilungskoeffizient ist dabei abhängig von den chemischen Eigenschaften der Membran, des Lösungsmittels und der zu verteilenden Substanz (Abbildung 1.4). Da die Kutikula hauptsächlich aus lipophilen Substanzen wie Kutin und Wachsen besteht, muss also eine Verteilung zwischen der wässrigen Donorphase und der lipophilen Kutikula stattfinden. Vergleichbare Bedingungen herrschen auch bei der Bestimmung von Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten, bei der sich substanzspezifische Verteilungsgleichgewichte zwischen dem hydrophilen Lösungsmittel Wasser und dem lipophilen Lösungsmittel Oktanol einstellen (Leo *et al.*, 1971). Ein Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient > 1 definiert somit eine lipophile

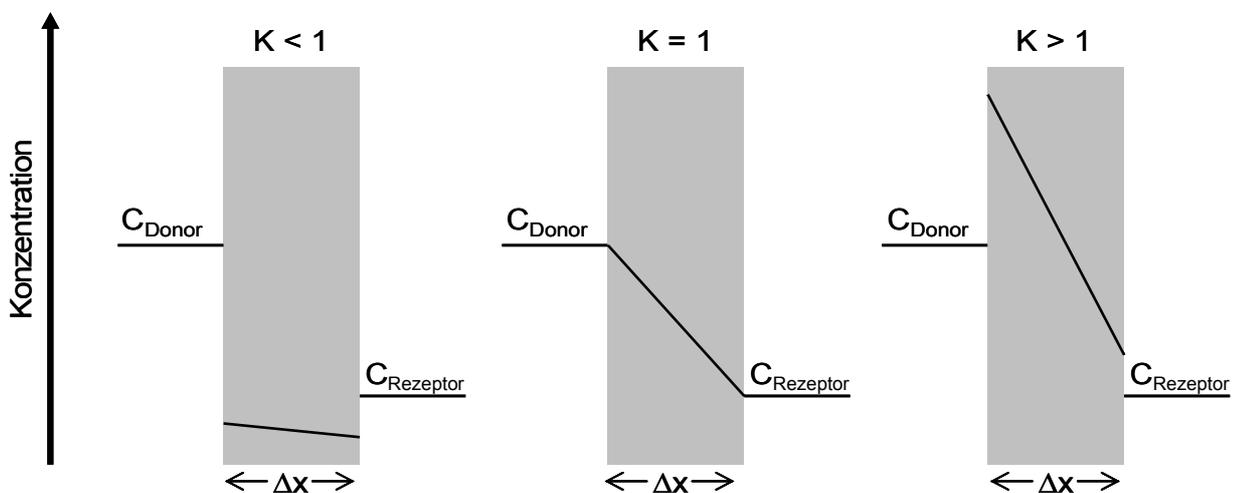


Abbildung 1.4: Konzentrationsgradienten über homogenen, lipophilen Membranen mit angrenzenden hydrophilen Phasen bei Verteilungskoeffizienten $K < 1$, $K = 1$, $K > 1$. Δx ist die Dicke der Membran.

Substanz die eine größere Affinität zum lipophilen Lösungsmittel hat. Eine Substanz mit einem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten < 1 löst sich zu größeren Anteilen in der hydrophilen Phase. Der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ist somit ein Maß für die Lipophilie oder Hydrophilie einer Substanz.

Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten lassen sich experimentell für lipophile Substanzen gut bestimmen, für sehr hydrophile Substanzen stößt man allerdings schnell an die Grenzen der Messbarkeit, da nur sehr geringe Mengen in die Oktanolphase übergehen. Aus der chemischen Struktur der Substanz lassen sich aber die Verteilungskoeffizienten auf mathematischem Weg abschätzen (Moriguchi *et al.*, 1992; Yalkowsky, 1992; Leo, 1993).

1.2 Permeationseigenschaften der Kutikula

1.2.1 Permeation nicht-ionischer, lipophiler Substanzen

Innerhalb der letzten 30 Jahre wurde die Permeation von nicht-ionischen, lipophilen Substanzen durch pflanzliche Kutikularmembranen eingehend untersucht. Umfassende Erläuterungen hierzu finden sich in den Büchern „Biology of the Plant Cuticle“ (Riederer und Müller, 2006) und „Water and Solute Permeability of Plant Cuticles“ (Schreiber & Schönherr, 2009).

Im Wesentlichen resultieren die Studien in einem einfachen „*Solubility/Mobility*“ Modell (Löslichkeits/Mobilitäts-Modell) (Schönherr & Riederer, 1989; Riederer & Schreiber, 1995), das allgemein für den Transport von lipophilen Substanzen durch die Kutikula angewendet werden kann. Als Maß für die Löslichkeit wird der Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizient (Riederer & Schönherr, 1984) angenommen, der für lipophile Substanzen dem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten entspricht (Baur *et al.*, 1997). Die Mobilität von Substanzen innerhalb der Kutikula wird durch den Diffusionskoeffizienten (Schreiber & Schönherr, 1993) oder die Geschwindigkeitskonstante der Desorption aus kutikulären Wachskomponenten (Bauer & Schönherr, 1992) bestimmt. Dabei nimmt die Geschwindigkeit, mit der eine Substanz über die Kutikula permeiert, mit zunehmender Löslichkeit und/oder Mobilität innerhalb der lipophilen Kutikularmembran zu.

1.2.2 Permeation ionischer und nicht-ionischer hydrophiler Substanzen

Im Vergleich zu lipophilen Molekülen, ist jedoch noch wenig über die kutikuläre Permeation ionischer Species und großer polarer Moleküle bekannt. Erst in den letzten zehn Jahren wurden wieder vermehrt mechanistische Studien über den kutikulären Transport von geladenen Substanzen wie z.B. Kalium- (Schönherr & Luber, 2001) oder Calciumsalzen (Schönherr, 2000, 2001; Schönherr & Schreiber, 2004b; Schlegel *et al.*, 2005) und Glyphosat (Schönherr, 2002; Schönherr & Schreiber, 2004a) durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass auch Ionen die Kutikula in signifikanten Mengen permeieren, obwohl sie auf Grund ihrer Hydrathülle (Stein, 1967) nicht in der lipophilen Kutinmatrix, oder den Wachsbestandteilen der

Kutikula löslich sein sollten. Als Konsequenz müssen die geladenen Moleküle die Kutikula somit über einen alternativen Transportweg permeieren.

Verschiedene Permeationsexperimente lieferten gute Hinweise für die Existenz eines polaren Permeationsweges. Im Gegensatz zu der Permeation von Wasser und lipophilen Molekülen wird die kutikuläre Permeation von anorganischen Salzen und geladenen, organischen Substanzen nicht von Faktoren wie Weichmachern (Schönherr, 2000) oder der Temperatur (Schönherr, 2001; Schönherr & Luber, 2001), welche die Aggregatzustände der Wachse determinieren, beeinflusst. Auch die Extraktion der kutikulären Wachse bewirkt nur eine leichte Erhöhung der Permeation hydrophiler Substanzen (Schönherr, 2000). Die vorherrschende Luftfeuchtigkeit spielt jedoch eine entscheidende Rolle für die Permeation von Ionen (Schönherr, 2000, 2001, 2002). Diese Resultate unterstützen die Theorie, dass bestimmte Bereiche in der Kutikula Wasser sorbieren, was zu einem Schwellen des polaren Weges und damit zu einer erhöhten Permeabilität für Wasser und wasserlösliche Substanzen führt. Um die Natur des polaren Weges zu untersuchen, bestimmten Schreiber et. al (2001) Wasserpermeabilitäten von methylierten Matrixmembranen und konnten im Vergleich zu unmethylierten Membranen einen deutlich reduzierten Luftfeuchteeffekt beobachten. Daher wird angenommen, dass polare Domänen in der Kutikula von nicht veresterten Carboxy- und Hydroxygruppen der Hydroxyfettsäuren im Kutin gebildet werden (Schreiber, 2005), die im Fall einer Methylierung vor einer möglichen Hydratisierung geschützt werden.

In unzähligen elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden außerdem Mikrofibrillen visualisiert (Franke, 1967; Martin & Juniper, 1970; Hoch, 1975; Wattendorf & Holloway, 1980; Mérida *et al.*, 1981; Kolattukudy, 1984; Miller 1986; Jeffree 1996; Krüger *et al.*, 1996; Marga *et al.*; 2001) die sich ausgehend von der Zellwand bis in die Kutikula erstrecken. Man nimmt an, dass es sich hierbei um Pektin- oder Zellulosestränge handelt, die zusammen mit hydrolysierbaren Gruppen im Kutingerüst für die Wassersorption verantwortlich sind, und auf diese Weise einen hydrophilen Weg in der Kutikula konstituieren. Für Zellulose ist bekannt, dass sie bei hoher Luftfeuchtigkeit bis zu 25% des Eigengewichtes an Wasser absorbiert. Dabei bildet sich ein wässriges Kontinuum in den interfibrillaren Zwischenräumen (Fengel, 1985). In der Kutikula könnte dieser Prozess einen Diffusionsweg für polare Substanzen zur Verfügung stellen. Bei sehr geringer Luftfeuchtigkeit wird das

Wasser wieder an die Umgebung abgegeben, wodurch die Polysaccharidstränge anschwellen und die Verfügbarkeit der polaren Wege reduziert wird.

Trotz vieler Spekulationen ist die Natur des polaren Weges in der Kutikula nicht eindeutig geklärt, da nur auf indirektem Weg Nachweise für die chemische Beschaffenheit erbracht werden können. Die Permeation geladener Moleküle ist hierbei ein guter Anhaltspunkt, wobei es keinen direkten Beweis dafür gibt, dass die Hydrathüllen beim Eintritt in die Kutikula tatsächlich am Molekül verbleiben und so eine Löslichkeit in den lipophilen Kompartimenten verhindern.

Auch mit bildgebenden Methoden konnten bis jetzt keine Stränge oder Poren visualisiert werden, die sich von der Zellwand der Epidermiszellen bis an die Oberfläche der Kutikula erstrecken, und somit eine kontinuierliche polare Verbindung zwischen dem Blattinneren und der Atmosphäre bilden. Die Tatsache, dass der Transport von Ca^{2+} -Salzen weniger größenabhängig ist als die Permeation von lipophilen Substanzen (Schönherr & Schreiber, 2004b; Schlegel *et al.*, 2005) kann ebenfalls nur als Hinweis gewertet werden, dass hydrophile und lipophile Substanzen auf unterschiedlichen Wegen die Kutikula passieren. Die Größenselektivitäten der lipophilen Substanzen wurden hierbei an Hand der Molvolumen modelliert, die nach McGowan & Mellors (1986) errechnet wurden. Für die Bestimmung der Größenselektivität des hydrophilen Weges wurden hingegen die Molekulargewichte der wasserfreien Reinsubstanzen zu Grunde gelegt, da über die Größe der Hydrathülle, und das daraus resultierende Volumen keine Daten verfügbar waren. Anhand dieser unterschiedlichen Größenbezüge lässt sich kein direkter Vergleich zwischen den Größenselektivitäten des polaren und des lipophilen Transportweges ziehen und damit auch keine eindeutige Aussage über mögliche Unterschiede der beiden postulierten Wege treffen.

1.2.3 Permeation von Wasser

Der Mechanismus der Wasserpermeation durch die Kutikula ist zwar vielseitig untersucht worden, ein eindeutiges Modell konnte bis heute allerdings nicht erstellt werden. Experimente zur Kopermeation von Wasser und undissoziierten, lipophilen, organischen Säuren zeigten Korrelationen (Schönherr & Riederer, 1989; Niederl *et al.*, 1998; Schreiber, 2002) die zu der Schlussfolgerung führten, dass nicht-ionische lipophile Substanzen und polare Wassermoleküle auf dem selben, lipophilen Weg die Kutikula permeieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die

Wasserpermeabilität durch steigende Temperatur (Schönherr & Merida, 1981; Schreiber, 2001), Extraktion der kutikulären Wachse (Riederer & Schreiber, 2001) und durch die Anwesenheit von Adjuvantien (Riederer & Schönherr, 1990) erhöht wird. Diese Effekte wurden auch für lipophile organische Verbindungen gefunden, nicht aber für polare, dissoziierbare Kalziumsalze (Schönherr, 2000). Vorausgesetzt, dass Wasser auf dem lipophilen Weg die Kutikula permeiert, sollten sich anhand der Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizienten die kutikulären Leitwerte für Wasser errechnen lassen. Die tatsächlich gemessenen Leitwerte sind allerdings um mehrere Größenordnungen höher, als die mit dem lipophilen Modell vorausgesagten Leitwerte (Kerstiens & Lenzian, 1989).

Der Quotient aus dem Leitwert (P) und dem Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($K_{C/W}$) ergibt ein Maß für die Mobilität (m) einer Substanz, die direkt proportional zum Diffusionskoeffizienten (D) ist. Der negativ-lineare Zusammenhang zwischen der Mobilität und dem Molvolumen der permeierenden Substanzen spiegelt die Größenselektivität des lipophilen Permeationsweges wieder. Die tatsächlich gemessene Mobilität des Wassers ist aber signifikant höher als anhand der Zusammenhänge für die Größenselektivität des lipophilen Transportweges aus dem Molvolumen extrapoliert werden kann. Das wirft die Frage auf, ob Wasser tatsächlich in signifikanten Mengen über die lipophile Phase der Kutikula permeiert.

Im Jahre 1976 wies Schönherr Diskrepanzen zwischen der osmotischen und der diffusiven Wasserpermeabilität bei entwachsten Matrixmembranen von *Citrus aurantium* nach. Während es für einfache, homogene Lipidmembranen keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Größen gibt, weist eine höhere osmotische Wasserpermeabilität im Vergleich zur diffusiven Wasserpermeabilität auf das Vorhandensein von polaren Wegen oder Poren in der Membran hin (Verkman, 2000). Auch die Tatsache, dass die kutikuläre Transpiration signifikant durch die Luftfeuchtigkeit beeinflusst wird (Schreiber *et al.*, 2001), lässt sich mit dem Modell einer homogenen „mobility/solubility“ Membran nicht erklären. Neben den vorrangig lipophilen Komponenten der Kutikula müssen also zusätzliche, polare Domänen vorhanden sein, die für die Sorption von Wasser verantwortlich sind. Ein Anstieg der Luftfeuchtigkeit bewirkt somit eine erhöhte Wassersorption in diese hydrophilen Bestandteile, was wiederum zur Erhöhung der kutikulären Transpiration führt.

1.3 Fragestellung

Die Permeation von polaren und geladenen Molekülen durch die Kutikula lässt darauf schließen, dass in der Kutikula ein alternativer Transportweg für hydrophile Substanzen existieren muss. Da sich die Quantifizierung hydrophiler Moleküle, die in sehr kleinen Mengen die Kutikula permeieren, schwierig gestaltet, gibt es bis heute nur wenige mechanistische Untersuchungen, die sich mit der Permeation von polaren Modellsubstanzen oder pflanzlichen Metaboliten beschäftigen.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Permeation von Aminosäuren den hydrophilen Transportweg in der Kutikula zweier unterschiedlicher Pflanzenarten vergleichend zu charakterisieren.

1.3.1 Auswahl der Pflanzen

Bei *Hedera helix* L. (Efeu) handelt es sich um eine immergrüne Kletterpflanze die in den gemäßigten Breiten Europas heimisch ist (Preston & Hill, 1997). Dabei ist der Strauch in der Lage, kurzfristig Temperaturen bis unter -20°C und Trockenperioden ohne Schaden zu überstehen (Parker, 1962). Die immergrünen Blätter überdauern bis zu 3 Jahre, so dass sie sowohl an Frostrocknis im Winter, als auch an hohe Temperaturen im Sommer angepasst sein müssen. Auf Grund seiner antimikrobiellen, sekundären Inhaltsstoffe weist Efeu auch aus medizinischer Sicht eine Forschungsrelevanz auf (Cioaca *et al.*, 1978; Mejester-Savornin *et al.*, 1991). Oft findet man die Pflanzen an schattigen, mäßig feuchten Standpunkten (Metcalf, 2005), unter deren Standortbedingungen viele andere Pflanzenarten nicht wettbewerbsfähig sind (Kollmann & Grubb, 1999).

Die Efeukutikula hat eine sehr geringe Wasserleitfähigkeit (Burghard & Riederer, 2003, 2006; Sack *et al.*, 2003) die einen Vorteil in der Anpassung an diese Standorte bringen kann. Isolierte Kutikularmembranen von Efeu sind mit einer Dicke von ca. $5\ \mu\text{m}$ (Burghardt & Riederer, 2006) sehr robust und stabil, weshalb sie gut in Permeationsexperimenten eingesetzt werden können. Popp *et al.* (2005) haben bereits versucht, anhand von Leitwerten für lipophile Pflanzenschutzmittel, nicht-ionische, hydrophile Zucker und flüchtige Substanzen ein Modell der kutikulären Transporteigenschaften der Efeukutikula zu etablieren. Ionische, hydrophile Substanzen wurden dabei nicht berücksichtigt, und sollen deshalb in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Bei der Lions-Rose® handelt es sich um eine kommerziell genutzte, robuste Zierrose, die wegen ihrer lang anhaltenden Blütenpracht sowohl im Garten, als auch im Kübel gepflanzt, sehr beliebt ist. Zierrosen sind im Allgemeinen sehr anfällig gegen Mehltau (Coyier, 1983; Aegerter *et al.*, 2002) oder Viruserkrankungen (Secor, 1977; Thomas, 1984) weshalb in der Rosenzucht oft Pestizide eingesetzt werden, die über die Blätter appliziert werden. Die Züchtung von besonders widerstandsfähigen Sorten ist dabei ein Beitrag um den Pestizideinsatz zu reduzieren.

In unabhängigen ADR-Prüfgärten (Allgemeine Deutsche Rosenneuheitenprüfung) wachsen die Prüfsorten ohne die Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln, um den Zierwert und vor allem die Robustheit gegenüber biotischen und abiotischen Einflüssen zu testen. Bei Erreichen eines bestimmten Qualitätsstandards wird der entsprechenden Sorte das ADR-Zeichen verliehen (www.adr-rose.de).

Auch die in der vorliegenden Arbeit verwendete Lions-Rose® gehört zu den ADR-Rosen und wächst zur Beurteilung im Prüfungsgarten der Bayerischen Landesanstalt für Wein- und Gartenbau (Thüngersheim, Deutschland) ohne den Einsatz von Pestiziden. Die kutikulären Permeationseigenschaften dieser Pflanzen sind somit nicht durch Adjuvantien oder Weichmacher - die in Spritzmitteln eingesetzt werden, um die Wirkstoffaufnahme zu maximieren - modifiziert (Riederer & Schönherr, 1990), und können für mechanistische Permeationsstudien eingesetzt werden.

Viele landwirtschaftlich relevante Pflanzen, vor allem die *Poaceae* sind ampistomatisch, weswegen mit isolierten Kutikularmembranen dieser Arten keine mechanistischen Erkenntnisse über die Permeationseigenschaften pflanzlicher Oberflächenmembranen gewonnen werden können. Im Gegensatz dazu sind bei der Rose nur auf der abaxialen Seite der Blätter Stomata vorhanden. Da die relativ geringe Dicke der Kutikula außerdem mit der vieler kommerziell genutzter Pflanzen vergleichbar ist, bietet sich in der Rose ein gutes Modellsystem für die Untersuchung der kutikulären Eigenschaften.

1.3.2 Charakterisierung des hydrophilen Transportweges

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand von isolierten Kutikularmembranen Permeabilitäten für Aminosäuren bei unterschiedlichen pH Werten bestimmt. Die einzelnen Aminosäuren tragen funktionelle Gruppen die unter bestimmten pH

Bedingungen zu positiven, negativen oder zwitterionischen Ladungen an den Molekülen führen. Anhand einer einzelnen Verbindung kann so der Einfluss unterschiedlicher Ladungen auf die Permeation hydrophiler Substanzen untersucht werden. Die einzelnen Aminosäuren lassen sich auch untereinander gut vergleichen, da sie dieselbe Grundstruktur aufweisen und durch die Addition von Methylgruppen an der Seitenkette teilweise homologe Reihen mit unterschiedlichem Molvolumen bilden.

Weiterhin sollte geklärt werden, in wie fern die kutikuläre Permeabilität für hydrophile, geladene Substanzen vom Verteilungskoeffizienten determiniert wird. Dabei ist fraglich, ob anhand der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten, die für die einzelnen Verbindungen aus ihrer Struktur berechnet werden können, Voraussagen über die Permeation getroffen werden können, wie dies für lipophile Verbindungen der Fall ist.

Hydrophile und vor allem ionische Verbindungen bilden beim Lösen in Wasser Hydrathüllen, die einen erheblichen Einfluss auf das effektive Volumen der Moleküle haben. Die Rolle dieser Hydrathüllen bei der kutikulären Permeation ist bis heute nicht diskutiert worden, da keine Information über die exakte Größe der Hydrathüllen vorlagen. Neue Untersuchungsmethoden erlauben es aber, die Hydrathüllen von Aminosäuren mit unterschiedlichen Ladungszuständen zu bestimmen (Burakowski & Gliński, 2007, 2008). Daher soll in der vorliegenden Arbeit erstmals auch der Einfluss der Hydrathülle auf die Permeation untersucht werden.

Aminosäuren kommen natürlicherweise im Blatt vor und sind auch in signifikanten Mengen auf Blattoberflächen zu finden. *Leaching*experimente mit intakten Blättern sollten zeigen, ob die Metabolite auf Blattoberflächen aus dem Blattinneren stammen, und in wie weit Permeationsmechanismen die mit isolierten Kutikularmembranen untersucht werden, auch im intakten Blatt zum Tragen kommen.

Pflanzenschutzmittel wie Glufosinat und Glyphosat, die strukturell Aminosäuren darstellen, werden im landwirtschaftlichen Bereich über die Blätter appliziert. Um ihr Wirkspektrum innerhalb der Pflanze zu entfalten, müssen sie durch die Kutikula in

die Blätter permeieren. Eine Kenntnis der Aufnahmemechanismen von Aminosäuren durch die Kutikula kann hier helfen, die Applikation und Aufnahme dieser Aktivsubstanzen zu optimieren.

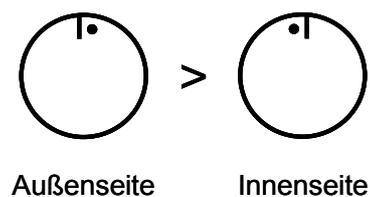
2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Kutikularmembranen wurden sowohl von einem Efeustrauch (*Hedera helix* L.) aus dem Botanischen Garten der Universität Würzburg (Deutschland) als auch von einem Zierrosenstrauch (Lions-Rose®) aus dem ADR-Prüfungsgarten der bayerischen Landesanstalt für Wein- und Gartenbau (Thüngersheim) gewonnen. Um die Variabilität der Messungen zu minimieren wurden beim Efeu ausschließlich die glänzenden, von generativen Pflanzenteilen stammenden Blätter, die oft auch als Sonnenblätter bezeichnet werden, verwendet. Hierbei wurde nur das 4. bis 8. Blatt unterhalb des Blütenstandes geerntet. Bei der Rose wurden jeweils nur die drei endständigen Blätter voll ausgewachsener, dunkelgrüner Blattpfiedern verwendet.

2.1.1 Isolierung der Kutikularmembranen

Die enzymatische Isolierung der Kutikularmembranen erfolgte nach der Methode von Schönherr und Riederer (1986). Hierzu wurden mit einem Korkbohrer (\varnothing 2 cm) Scheiben aus voll entfalteten, ausgereiften und noch nicht seneszenten Blättern ausgestanzt. Nach Möglichkeit wurden hierbei die Hauptleitbündel vermieden. Die adaxiale Seite der Blattscheiben wurde an den Rändern asymmetrisch (Abbildung 2.1) mit einem wasserfesten Stift markiert, um bei den isolierten Kutikularmembranen (CM) noch eindeutig die physiologischen Außen- und Innenseiten bestimmen zu können. Vor allem bei Membranen der Rose wäre ohne diese Markierung kein Unterschied erkennbar. Bei der anschließenden Isolierung wurden die Blattscheiben in Enzymlösung mit einem Anteil von 1% Cellulase (Celluclast, Novo Nordisk, Bagvaerd, Dänemark) und 1% Pektinase (Trenolin, Erbslöh) in Citratpuffer (0,01 M, pH 3, Citronensäure-Monohydrat, Applichem, Darmstadt) bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zusatz von Natriumazid (0,001 M, NaN_3 , Fluka, Steinheim, Deutschland) sollte das Wachstum von Mikroorganismen verhindern. Um die Isolation der derben Efeumembranen zu beschleunigen, wurden die Blattscheiben zusätzlich mit einer Vakuumpumpe (Vacuumbrand GmbH & Co, Wertheim) bei einem



Außenseite

Innenseite

Abbildung 2.1: asymmetrische Markierung der Blattscheiben

Unterdruck von 150 mbar mit der Enzymlösung infiltriert. Nach mehrmaligem Wechseln der Enzymlösung und dem vollständigen Verdau der Zellstruktur wurden die nicht markierten, Stomata aufweisenden Membranen der abaxialen Blattseiten verworfen und die verbleibenden adaxialen Kutikularmembranen mehrfach in destilliertem Wasser gewaschen. Die isolierten Rosenmembranen wurden auf Grund ihrer zarten Struktur bis zum Gebrauch in destilliertem Wasser (0,001 M NaN_3) gelagert, die Efeumembranen wurden hingegen unter einem leichten Luftstrom auf Teflonplättchen geglättet und in getrocknetem Zustand aufbewahrt.

2.1.2 Gravimetrische Bestimmung der kutikulären Komponenten

Über Silikagel getrocknete Kutikularmembranen von Efeu wurden auf einer Mikrowaage (Sartorius ME5, Göttingen, Deutschland) gewogen und anschließend die enthaltenen Wachsbestandteile in einem Chloroform/Methanol Gemisch (v/v 4:1, Roth, Karlsruhe) über 24 Stunden bei 50 °C extrahiert. Die so erhaltenen Matrixmembranen (MX) wurden erneut getrocknet, gewogen und danach innerhalb von 12 Stunden bei 110 °C mit Salzsäure (6 N HCL, Roth, Karlsruhe) hydrolysiert. Der dadurch messbare Gewichtsverlust begründet sich auf dem Verlust von polaren, hydrolysierbaren Substanzen wie Phenolen, Polypeptiden, Polysacchariden und kristalliner Zellulose (Riederer & Schönherr, 1984).

Für die Rosenmembranen konnte der Anteil an Polysacchariden mit dieser Methode nicht angegeben werden, da die Membranen nach der Behandlung mit Chloroform so zerfallen waren, dass das Trockengewicht der MX nicht mehr exakt bestimmt werden konnte. Daher wurde hier nur der Wachsanteil bestimmt, indem die Chloroform/Methanol Phase in einem sauberen Gläschen unter Stickstoff abgedampft, und die verbleibende Wachsmenge gewogen wurde.

2.1.3 Titration von isolierten Kutikularmembranen

Kutikularmembranen von Efeu mit einem Trockengewicht von insgesamt 180 mg wurden in 100 ml destilliertem Wasser inkubiert und mit 1 N HCl auf einen pH Wert von 1,5 eingestellt. Anschließend wurde die Mischung mit 1 N NaOH in kleinen Schritten (5 – 500 μl) zu pH 12 titriert, wobei nach jeder Zugabe von NaOH solange gerührt wurde, bis ein konstanter pH Wert erreicht war. Als Kontrolle wurden 100 ml destillierten Wassers auf dieselbe Art behandelt.

Für Rosenkutikularmembranen wurde der Versuch ebenfalls durchgeführt, allerdings mit einem kleineren Volumen der Titrationslösung und kleineren Titrationschritten, da hier weniger Kutikulamaterial zur Verfügung stand.

Der pH Werte wurde mit eine Glaselektrode (inLab micro, Mettler-Toledo GmbH, Deutschland) bestimmt, die an ein digitales pH-Meter (inoLab pH Level1, WTW, Germany) angeschlossen war.

2.2 Modellsubstanzen

Zur Untersuchung von kutikulären Transporteigenschaften für polare Moleküle wurde ein Set von 10 Aminosäuren und das polare Lösungsmittel Wasser ausgewählt (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Übersicht über einige relevante Eigenschaften der verwendeten Aminosäuren und Wasser, MW: Molekulargewicht, MV: Molvolumen bei pH 6, K_{OW} : Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient

Substanz	Seitenkette	MW ⁽¹⁾ [g mol ⁻¹]	MV ⁽²⁾ [cm ³ mol ⁻¹]	log K_{OW} ⁽³⁾		
				pH 1	pH 6	pH 11
Wasser		18.02	17	-0.85	-0.85	-0.85
Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette						
Glycin	GLY aliphatisch	75.07	56.46	-4.31	-3.37	-4.61
Alanin	ALA aliphatisch	89.09	70.55	-3.82	-2.83	-3.99
Prolin	PRO heterocyclisch	115.13	87.87	-3.38	-2.6	-2.75
Valin	VAL aliphatisch	117.15	98.73	-3.01	-1.96	-3.07
Leucin	LEU aliphatisch	131.17	112.82	-2.7	-1.63	-2.78
Phenylalanin	PHE aromatisch	165.19	131	-2.14	-1.14	-2.32
Aminosäuren mit polarer Seitenkette						
Serin	SER aliphatisch	105.09	76.42	-4.74	-3.92	-5.22
Threonin	THR aliphatisch	119.12	90.51	-4.4	-3.5	-4.8
Aminosäuren mit polarer, dissoziierbarer Seitenkette						
Asparaginsäure	ASP aliphatisch	133.1	98.4	-4.1	-4.39	-8.22
Glutaminsäure	GLU aliphatisch	147.13	106.17	-3.94	-4.93	-8.01

⁽¹⁾ Lide, 1992-1993

⁽²⁾ berechnet nach Abraham & McGowan, 1987

⁽³⁾ berechnet mit Chemaxon (2008), Marvin, Calculator Plugin and Chemical Terms Demo

2.2.1 Chemische Eigenschaften von Aminosäuren

Glycin als kleinste Aminosäure besteht aus einer Carboxy- (-COOH) und einer Aminogruppe (-NH₂) und repräsentiert das hydrophile Grundgerüst, welches allen Aminosäuren gemeinsam ist. Die Seitenketten der übrigen Aminosäuren, die unterschiedliche, funktionelle Gruppen aufweisen, können als C(α)-Substituenten von Glycin betrachtet werden (Fauchère *et al.*, 1980; Abbildung 2.2). Diese beeinflussen sowohl das molekulare Volumen (MV, berechnet nach Abraham & McGowan, 1987) als auch die physiko-chemischen Eigenschaften. Die Aminosäuren können in 2 große Gruppen eingeteilt werden: 1. Aminosäuren mit nicht-polarer und 2. Aminosäuren mit polarer Seitenkette. Die nicht polaren Seitengruppen bestehen ausschließlich aus Alkylgruppen, wohingegen bei den polaren Seitenketten

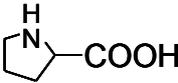
<p>Grundstruktur der α-Aminosäuren</p> $ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{array} \\ \\ \text{R} \end{array} $ <p>R = Seitenketten</p>	
<p>aliphatische, nicht polare Seitenketten</p> <p>Glycin —H</p> <p>Alanin —CH₃</p> <p>Valin —CH $\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$</p> <p>Leucin —CH₂-CH $\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$</p>	<p>aliphatische, polare Seitenketten</p> <p>Serin —CH₂-OH</p> <p>Threonin —CH $\begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{CH}_3 \end{array}$</p> <p>Asparaginsäure —CH₂-C $\begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{array}$</p> <p>Glutaminsäure —CH₂-CH₂-C $\begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{array}$</p>
<p>aromatische Seitenkette</p> <p>Phenylalanin —CH₂-</p>	<p>heterocyclische Seitenkette (Iminosäure)</p> <p>Prolin -COOH</p>

Abbildung 2.2: Strukturformeln der verwendeten Aminosäuren

zusätzliche Hydroxy-, Carboxy- oder andere polare Gruppen vorhanden sind. Diese Seitenketten bestimmen maßgeblich den Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($K_{O/W}$), der ein Maß für die Hydrophilie einer Substanz ist. Der $K_{O/W}$ kann experimentell bestimmt werden, indem eine wässrige Lösung der zu bestimmenden Substanz mit dem organischen Lösungsmittel Oktanol ausgeschüttelt wird. Das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentration des Stoffes in der organischen und der wässrigen Phase gibt den $K_{O/W}$ an (Gleichung 1.6).

Löst sich der Stoff besser in der organischen Phase ist der $K_{O/W} > 1$ und es handelt sich definitionsgemäß um eine lipophile Substanz. Ein $K_{O/W} < 1$ hingegen definiert eine hydrophile Substanz die eine höhere Affinität zum polaren Lösungsmittel (Wasser) hat. Verteilungskoeffizienten von hydrophilen und lipophilen Substanzen variieren über viele Größenordnungen, so dass für eine bessere Übersichtlichkeit oft der logarithmische Wert ($\log K_{O/W}$) angegeben wird. Für extrem hydrophile Substanzen können die geringen Konzentrationen in der organischen Phase nur schwer bestimmt werden. Algorithmische Verfahren ermöglichen es allerdings, Verteilungskoeffizienten aus der chemischen Struktur der Substanzen abzuschätzen (Chemaxon, 2008; Leo, 1993; Moriguchi *et al.*, 1992). Mit dem frei verfügbaren Modellierungsprogramm Chemaxon (2008) wurden in der vorliegenden Arbeit die Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der Aminosäuren errechnet. Diese werden auch durch die Ladungszustände beeinflusst, die abhängig vom pH Wert der Lösung variieren (Gulyaeva *et al.*, 2003). In Feststoffen und in neutralen wässrigen Lösungen ist die Carboxygruppe deprotoniert und die Aminogruppe protoniert, weshalb die Aminosäuren hier als Zwitterionen vorliegen. Die beiden Ladungen neutralisieren sich gegenseitig und das Molekül ist somit nach außen hin ungeladen (isoelektrischer Punkt, IEP). Verschiebt sich der pH Wert in den sauren Bereich, so wird die Carboxygruppe durch Protonierung neutralisiert und die positive Aminogruppe bestimmt die Ladung des Moleküls. Im basischen Bereich sind die Aminosäuren negativ geladen, da die Aminogruppe neutralisiert wird und nur noch die negative Ladung der Carboxygruppe ausschlaggebend ist. Die pK-Werte geben hierbei an, bei welchem pH Wert 50% aller Moleküle einfach positiv ($pK_{\text{Säure}}$, pK_a) oder einfach negativ (pK_{Base} , pK_b) geladen sind (Abbildung 2.3). Die Aminosäuren mit polaren Seitenketten können bei bestimmten pH Werten noch weitere Ladungen an den Seitenketten tragen, da die zusätzlichen Säure- oder Carbamidgruppen ebenfalls pH abhängig dissoziieren. Für die folgenden Versuche wurden allerdings

nur polare Aminosäuren mit zusätzlichen nicht dissoziierenden Hydroxy- (Serin, Threonin) oder dissoziierenden Carboxygruppen (Asparaginsäure, Glutaminsäure) verwendet. Für die verschiedenen Ladungszustände können die Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten berechnet werden, die dementsprechend pH abhängig variieren (Abbildung 2.3).

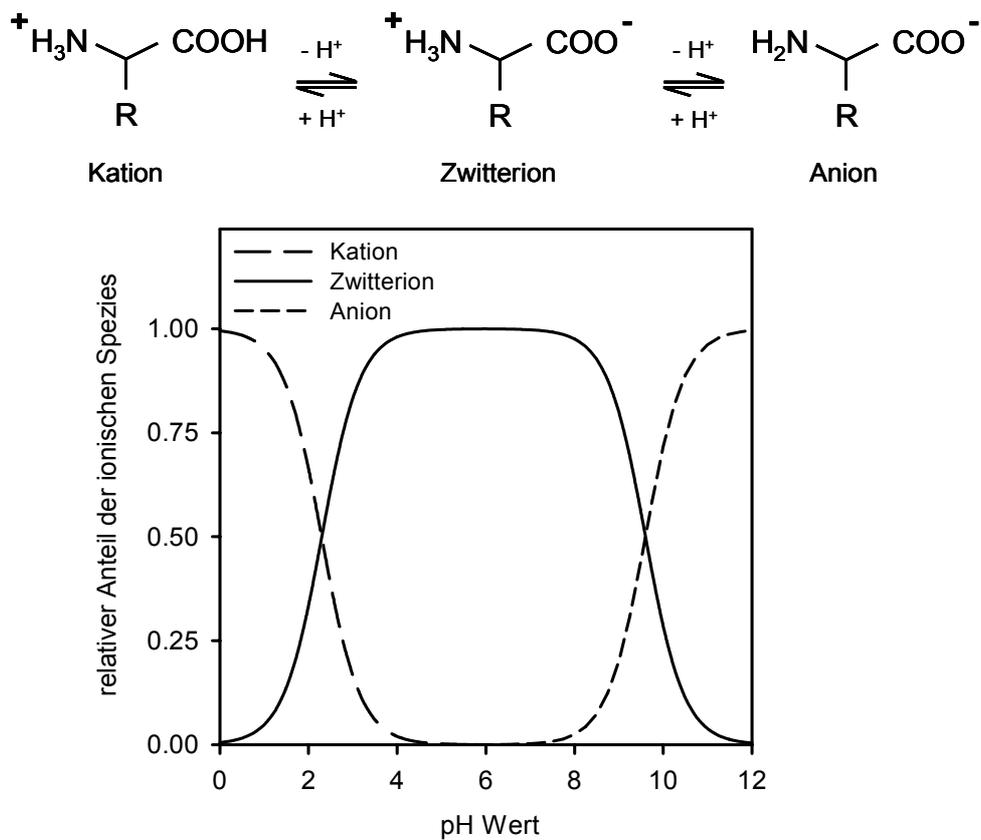


Abbildung 2.3: Ionisierung der Aminosäuren und die Verteilung der einzelnen Spezies in Abhängigkeit des pH-Wertes am Beispiel von Glycin

2.3 Quantifizierung von Aminosäuren mittels GC-Analytik

Alle Aminosäuren wurden gaschromatographisch quantifiziert. Dazu wurde das Aminosäure Analyse Kit EZ:faast[®] GC/MS für freie physiologische Aminosäuren (Phenomenex, Torrance, USA) verwendet, mit dem es möglich ist, sehr geringe Konzentrationen ab 1 pmol/μl quantitativ zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil ist die schnelle Aufarbeitung der Proben (~ 15 Minuten pro Probe). Die spezielle GC-Säule (Zebron ZB-AAA, 10 m x 0,25 mm) ermöglicht außerdem eine extrem schnelle und exakte Trennung, so dass mehr als 50 Aminosäuren und Dipeptide in einer Probe in weniger als 10 Minuten bestimmt werden können.

2.3.1 Derivatisierung der Proben

Die Derivatisierung erfolgte analog zu der Anleitung des Herstellers. Die Proben wurden je nach Bedarf auf pH 2-3 angesäuert (1N HCL) und je nach der zu erwartenden Aminosäurekonzentration mit 20 – 100 μl internem Standard (Reagenz 1, Norvalin, 0,2 mM) versetzt. Der Interne Standard ist notwendig um eventuelle Verluste während der Aufarbeitung quantitativ erfassen zu können. Die so vorbereiteten Proben wurden über ein Sorbenz geleitet, welches die protonierten Aminogruppen der Aminosäuren bindet. Ein Waschschrift mit 200 μl Waschlösung (Reagenz 2, n-Propanol) sollte mögliche organische Verunreinigungen entfernen. Durch die Zugabe von 150 μl Elutionsmedium (Reagenz 3a + 3b, Natriumhydroxid: n-Propanol, v/v 3:2) wurde die Lösung basifiziert und die adsorbierten Aminosäuren wieder in Lösung gebracht. Im Anschluss wurden die Aminosäuren durch Zugabe von 50 μl Reagenz 4 in Ihre Esterderivate (Abbildung 2.4) umgewandelt und durch

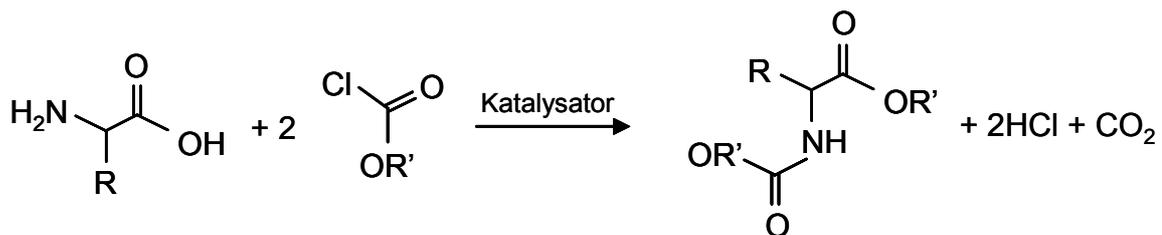


Abbildung 2.4: Chematische Darstellung der Derivatisierungsreaktion für den gaschromatografischen Nachweis von Aminosäuren.

ausschütteln mit 100 µl Reagenz 5 (iso-Octan) in die vereinigte organische überführt. Durch kurze Zentrifugation wurden die wässrige und die organische Phase voneinander getrennt und anschließend 120 µl der oberen, organischen Phase in ein GC-Vial überführt. Nach dem Eindampfen unter einem Stickstoffstrom wurden die Esterderivate der Aminosäuren erneut in 30 – 100 µl organischem Lösungsmittel (Reagenz 6, iso-Octan:Chloroform, v/v 4:1) aufgenommen und direkt im Gaschromatografen mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID, 6850 Series II, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit folgenden Parametern analysiert:

Injektion:	2 µl, Split 1:15, hot needle, 250°C
Temperaturprogramm:	110-320 °C; 30°C min ⁻¹ ; 1 min isotherm
Trärgas:	Helium, 1,1 ml min ⁻¹ , konstanter Fluss
Detektion:	Flammenionisation (FID) 320°C

Die Esterderivate sind bei Raumtemperatur für mindestens 24 Stunden und bei -12° C für mehrere Tage stabil, so dass durchschnittlich 12-15 Proben gemeinsam aufgearbeitet und unter Verwendung eines Autosamplers im GC-FID nacheinander analysiert wurden.

2.3.2 Quantifizierung der Aminosäuren

Die Ansprechempfindlichkeit des FID-Detektors hängt stark vom C-Gehalt der einzelnen Verbindungen ab (Abbildung 2.5). Deshalb wurden für die einzelnen Aminosäuren so genannte Korrektur- oder Responsefaktoren (RF) bestimmt (Cichetti *et al.*, 2008). Hierzu wurden zwischen 2 und 200 μl der mitgelieferten Aminosäurestandardlösungen (SD1, SD2, SD3 á 0,2 mM) mit je 20, 50 oder 100 μl internem Standard (Norvalin, 0,2 mM) und destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 600 μl eingestellt und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Aus dem Verhältnis der Peakflächen von Aminosäure (area_{AS}) und internem Standard (area_{STD}) und den eingesetzten Mengen ($\text{amount}_{\text{STD}}$, $\text{amount}_{\text{AS}}$, [nmol]) kann der Korrekturfaktor (RF) für jede einzelne Aminosäure berechnet werden:

$$\text{RF} = \frac{\text{area}_{\text{AS}} \times \text{amount}_{\text{STD}} [\text{nmol}]}{\text{area}_{\text{STD}} \times \text{amount}_{\text{AS}} [\text{nmol}]} \quad (2.1)$$

Bei der Quantifizierung der Aminosäuren in den Proben wurden die Aminosäuremengen im Verhältnis zum Internen Standard unter Berücksichtigung der Korrekturfaktoren berechnet:

$$\text{amount}_{\text{AS}} [\text{nmol}] = \frac{\text{area}_{\text{AS}} \times \text{RF}^{-1} \times \text{amount}_{\text{STD}} [\text{nmol}]}{\text{area}_{\text{STD}}} \quad (2.2)$$

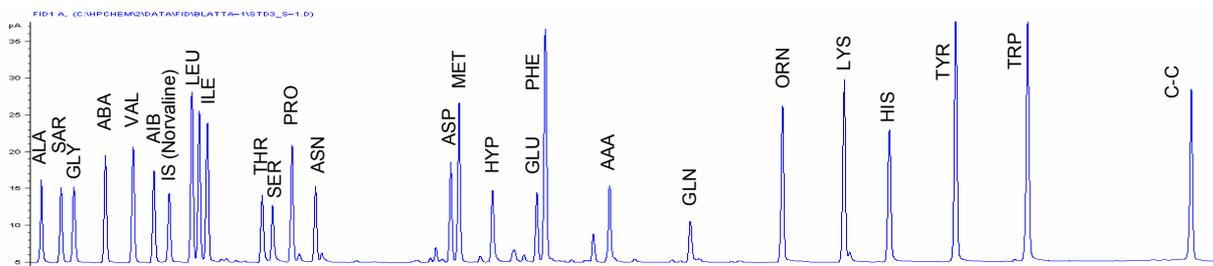


Abbildung 2.5: Chromatogramm eines Standard-Mixes aus 26 Aminosäuren und dem internen Standard Norvalin. Alle Aminosäuren wurden in derselben Konzentration (0,2 mM) eingesetzt, die unterschiedlichen Peakflächen weisen auf unterschiedliche Ansprechempfindlichkeiten des Detektors hin.

2.4 Permeationskammern

Zur Bestimmung der kutikulären Flussraten von Wasser und Aminosäuren wurden Permeationskammern benutzt, die aus einer Edelstahlkammer mit einem Fassungsvermögen von 1 cm³ und einem Edelstahlring bestehen (Schreiber *et al.*, 1995; Abbildung 2.6A). Die Kontaktflächen beider Elemente wurden mit Teflonpaste (PTFE-Paste, Roth, Karlsruhe) bestrichen und je eine Kutikel so auf die Unterseite der Kammer aufgespannt, dass die physiologische Innenseite zum Kammerinneren orientiert war (Abbildung 2.6B). Zum Fixieren der Kutikularmembran wurde der Edelstahlring aufgesetzt und beide Kammerteile seitlich mit einem Klebestreifen gegen Verrutschen gesichert. Die Unterseite der Kammer war seitlich mit einem Bohrloch präpariert, das ein Austauschen der Lösungen mittels Hamiltonspritze ermöglichte ohne die Kutikeln zu entfernen. Die frei zur Atmosphäre exponierte Fläche hatte eine Größe von $1,13 \times 10^{-4} \text{ m}^2$. Unter dem Stereomikroskop wurden die eingespannten Membranen bei 7facher Vergrößerung auf Defekte untersucht und bei im Falle von erkennbaren Beschädigungen ausgesondert.

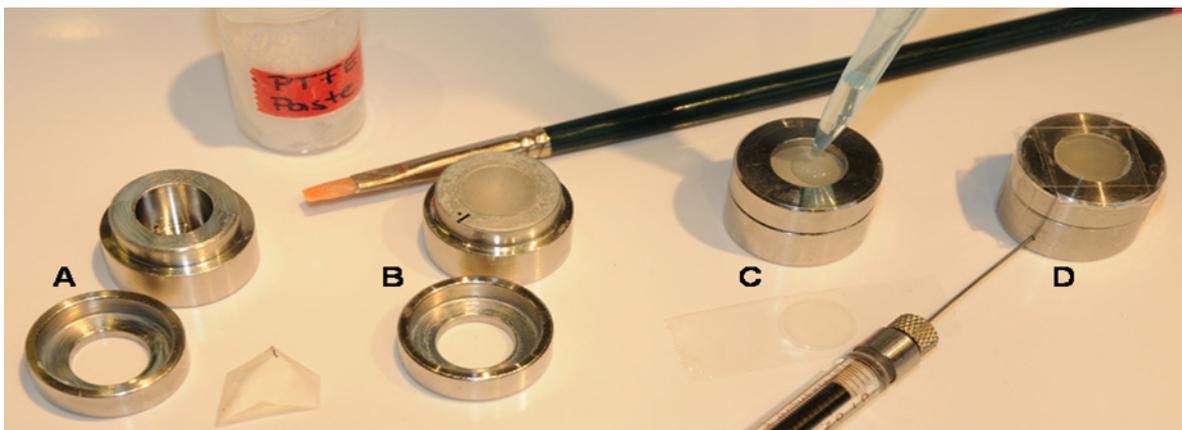


Abbildung 2.6: Versuchsaufbau für die Messung von Permeabilitäten isolierter Kutikularmembranen. A: Transpirationskammer mit PTFE-Paste bestrichen. B: Kutikularmembran von Efeu die mit der physiologischen Außenseite nach Außen zeigend auf die Kammer aufgespannt ist. C: Applikation der Donorlösung auf die Kutikularmembran. Die Klebestelle des Tesafilms zum Abdichten der Kammer ist mit einer Scheibe Parafilm abgeschirmt. D: Abnahme der Rezeptorlösung.

2.5 Wassertranspiration

Um die Wasserleitfähigkeit von Kutikularmembranen zu bestimmen wurde mit einer Hamiltonspritze destilliertes Wasser in die Unterseiten der mit Kutikularmembranen bestückten Kammern gefüllt und das Bohrloch mit Tesafilm luftdicht verschlossen. Die Kammern wurden kopfüber in eine 2 cm hoch mit trockenem Silikagel (Trockenperlen orange, AppliChem, Darmstadt) befüllte Plastikbox gestellt, so dass die physiologische Innenseite der Kutikula jederzeit mit flüssigem Wasser benetzt war. Ein Lochblech über dem Trockenmedium sollte den Kontakt zwischen den Membranen und dem Silikagel vermeiden um einer mechanische Beschädigung der Kutikularmembranen vorzubeugen. Während des Experimentes wurde die Box mit den Kammern im Wärmeschrank (Memmert Inkubator, Schwabach) bei 25°C gelagert. Der Wasserverlust über die exponierte Kutikulaoberfläche wurde gravimetrisch gemessen (Schönherr & Lenzian, 1981), indem die einzelnen Kammern ein- bis dreimal am Tag gewogen wurden. Gewicht und Zeitpunkt wurden digital dokumentiert (Balance Reader v1.60d, Sartorius AG, Göttingen).

Um einen möglichen Richtungseffekt zu untersuchen, wurden Kutikularmembranen von Efeu zusätzlich mit der physiologischen Außenseite zum Kammerinneren hin eingespannt und die Wassertranspiration gemessen.

2.5.1 Einfluss der kutikulären Wachse auf die Wassertranspiration

Für die Kutikula von *H. helix* wurde der Einfluss der Wachse auf die Wasserleitfähigkeit bestimmt. Dafür wurden zuerst die Leitwerte für native Kutikularmembranen bei 25°C bestimmt. Die in die Kammern eingespannten Membranen wurden anschließend mit Gummi Arabicum behandelt, um die epikutikulären Wachse auf der Oberfläche zu entfernen. Dazu wurde das Gummi Arabicum (Roth, Karlsruhe) in destilliertem Wasser gelöst (~1:2), auf die Kutikularmembranen pipettiert und jeweils über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Beim Trocknen hob sich das Gummi Arabicum mit den darin eingebetteten epikutikulären Wachsen ab. Nach dreimaliger Behandlung wurde erneut die Transpiration gemessen. Danach wurden die Membranen vorsichtig aus den Kammern entfernt und über Nacht bei 50°C in einem Chloroform/Methanol Gemisch (v/v 4:1, Roth, Karlsruhe) entwachst, getrocknet und wieder in die Kammern eingebaut um erneut die Transpiration zu messen. Anschließend wurde das Wasser

in der Donorkammer gegen eine Natriumchloridlösung (NaCl, 0,01 M) ausgetauscht. Auf die Außenseite der Membranen wurden 280µl einer Silbernitratlösung (AgNO₃, 0,01 M, Merk, Darmstadt) pipettiert und das so entstandene Volumenkompartiment mit Tesafilm luftdicht verschlossen. Die Kammern wurden Kopfüber für 24 Stunden inkubiert. Wie bereits beschrieben (Schreiber *et al.*, 2006) entstehen bei der beidseitigen Diffusion der verschiedenen Ionen durch die Kutikularmembranen wasserunlösliche Silberchloridausfällungen. Die behandelten Membranen wurden 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend wiederum der Wasserleitwert bestimmt.

Bei der gesamten Behandlung wurden viele Membranen offensichtlich beschädigt, so dass am Ende nur 5 von 20 Ansätzen ausgewertet werden konnten. Vorteil der Methode ist allerdings, dass verbundene Stichproben für CM, Membranen bei denen das epikutikuläre Wachs entfernt wurde und MX vorliegen.

2.5.2 pH Abhängigkeit der Wassertranspiration

Um eine mögliche pH Abhängigkeit der Wasserleitfähigkeit zu untersuchen, wurden nacheinander Lösungen verschiedener pH Werte (HCL, pH1; MES, pH1; NaOH, pH 11; NaOH, pH 13) in die Kammern gefüllt und die Transpiration bei einer konstanten Temperatur von 25°C wie oben beschrieben (Kapitel 0) bestimmt.

2.6 Aminosäurenpermeation

2.6.1 Verwendete Aminosäurelösungen

Um den Einfluss verschiedener Ladungszustände der Aminosäuren auf die kutikuläre Permeation zu messen wurden Aminosäurelösungen mit verschiedenen pH Werten angesetzt. Hierzu wurden die Aminosäuren (Tabelle 2.1, Fluka, Neuulm) mit einer Konzentration von jeweils 10 mM in 0,1 N Salzsäure (HCl, pH 1, Roth, Karlsruhe), 0,1 N MES-Puffer (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Monohydrat, AppliChem, Darmstadt, mit NaOH auf pH 6 eingestellt) oder 0,1 N Natriumhydroxidlösung (NaOH-Plätzchen, Roth, Karlsruhe) gelöst. Die Aminosäuren geben im basischen Bereich H^+ Ionen ab, die ein leichtes Absinken des pH Wertes auf einen, durch die Pufferwirkung der Aminosäuren konstanten Wert von pH 11 bewirkten. Die extremen pH Werte wurden gewählt, da hier die 3 verschiedenen dissoziierten Spezies (Anion, Zwitterion, Kation) der Aminosäuren mit nahezu 100%iger Sicherheit (Abbildung 2.3) vorliegen und die Aminosäuren quantitativ in der jeweiligen geladenen Form diffundieren müssen.

2.6.2 Ablauf der Permeationsexperimente

Um die Aufnahme von Aminosäuren über die Kutikula in das Blatinnere zu simulieren, wurden jeweils 280 μ l Aminosäurelösung auf die physiologische Außenseite der in die Kammern eingespannten Membranen pipettiert (Abbildung 2.6C). Die so entstandene Donorkammer wurde luftdicht mit einem Klebestreifen verschlossen (Abbildung 2.6D). Um Interaktionen zwischen der Donorlösung und dem Klebematerial zu verhindern wurde die Klebefläche mit einer Scheibe Parafilm (\varnothing 12 mm) abgeschirmt. Die vorbereiteten Kammern wurden über Nacht bei 25°C auf einem Schüttler inkubiert und so ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Kutikula und wässriger Donorlösung eingestellt. Zum Starten des Versuchs wurden jeweils 500 μ l Rezeptorlösung (mit entsprechendem pH Wert der Aminosäurelösung) in die Unterseite der Kammern gefüllt. Die Kammern wurden für die Dauer des Versuches bei 25°C auf dem Schüttler bewegt um der Entstehung eines Konzentrationsgradienten vorzubeugen. Nach bestimmten Zeitschritten wurde die Rezeptorlösung abgenommen und durch frische ersetzt. Die Menge der

Aminosäuren in der Rezeptorlösung wurde wie oben beschrieben (Kapitel 2.3) bestimmt und über die gesamte Zeit kumuliert.

2.6.3 pH Abhängigkeit der Aminosäurepermeation

Ein möglicher Einfluss verschiedener Ladungszustände auf die kutikuläre Permeation hydrophiler Substanzen sollte durch den Einsatz von Aminosäurelösungen verschiedener pH Werte (Kapitel 2.6.1) untersucht werden. Um einen elektrochemischen Gradienten zwischen Donor und Rezeptorkompartiment und eine Ladungsänderung der Aminosäuren zu verhindern, wurden als Rezeptorlösungen die jeweiligen Lösungsmittel eingesetzt, die auch für die Herstellung der Aminosäurelösungen benutzt wurden (Kapitel 2.6.1). Die 0,1 N NaOH Lösung wurde durch Zugabe von geringen Mengen HCl auf einen pH Wert von 11 eingestellt. Bevor der Versuch gestartet wurde, wurden die Kutikularmembranen über Nacht in den entsprechenden Lösungen inkubiert um sie an die pH Bedingungen zu adaptieren.

2.6.4 Einfluss der kutikulären Wachse auf die Permeation von Aminosäuren

Der Einfluss der kutikulären Wachse auf die Permeation von Aminosäuren wurde exemplarisch bei pH 6 bestimmt. Hierzu wurden entwachste Kutikularmembranen von *H. helix* (MX, Kapitel 2.1.2) in die Kammern eingespannt und die Aminosäurepermeation nach der oben beschriebenen Methode gemessen.

2.7 Berechnung von Leitwerten

Der Stofffluss (F) über die Kutikularmembran wird durch die Steigung der Regressionsgeraden bestimmt, die aus der Auftragung der geflossenen Stoffmenge gegen die Zeit resultiert.

Für die Permeation von Aminosäuren wurden in allen Fällen lineare Transportkinetiken beobachtet (Abbildung 2.7), so dass der Leitwert (P) nach Gleichung 1.4 berechnet werden konnte. Als Konzentrationsgradient (Δc) wurde jeweils die Donorkonzentration der Aminosäure angenommen, da über die gesamte Versuchszeit so geringe Mengen über die Membran permeierten, dass sich die Donorkonzentration nicht signifikant änderte. Die vergleichsweise geringen Mengen im Rezeptor konnten für die Berechnung des Konzentrationsgradienten vernachlässigt werden.

Die Transpirationsversuche mit Wasser ergaben ebenfalls lineare Transportkinetiken. Für die Berechnung der Wasserleitwerte wurde der Konzentrationsgradient über der Membran auf Basis der Dichte von flüssigem Wasser ($0,998 \text{ g cm}^{-3}$) bei maximaler treibender Kraft zugrunde gelegt. Somit können die Leitwerte für Aminosäuren und Wasser direkt miteinander verglichen werden.

Die errechneten Leitwerte für flüssiges Wasser lassen sich aber leicht in wasserdampfbasierte Leitwerte konvertieren, indem sie mit dem Faktor 43270 – dem Verhältnis der Dichte von flüssigem und gasförmigem Wasser – multipliziert werden (Burghardt & Riederer, 2006).

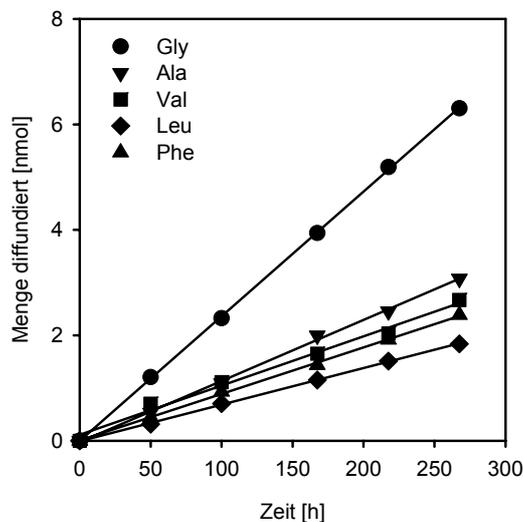


Abbildung 2.7: Beispiel für lineare Transportkinetiken verschiedener Aminosäuren über eine Efeumembran bei einem pH-Wert von 1.

2.8 Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizienten

Der Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizient ($K_{C/W}$) ist definiert als das Verhältnis zwischen der Gleichgewichtskonzentration eines Stoffes in der Kutikula (C_{Membran}) und in der angrenzenden, wässrigen Phase (C_{Wasser}) (Gleichung 1.6) wobei die Konzentration des Stoffes in der Kutikula auf das Trockengewicht der Membran bezogen wird.

2.8.1 pH Abhängigkeit der Wassersorption von Kutikularmembranen

Der Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizient für Wasser wurde ähnlich wie bei Lippold *et al.* (1999) gravimetrisch bestimmt. Dazu wurden isolierte Kutikularmembranen von Efeu und Rose mit bekanntem Trockengewicht in Lösungen mit verschiedenen pH Werten (0,1M HCL pH 1; 0,1M MES-Puffer pH 6; 0,1 M NaOH mit HCl auf pH 11 eingestellt) für mindestens 3 Tage bei 25°C inkubiert. Um die Wassersorption zu messen, wurden die Membranen kurz (ca. 2 sek) in destilliertem Wasser geschwenkt und vorsichtig zwischen 2 Papiertüchern abgetupft um das außen anhaftende Wasser zu entfernen. Sofort danach wurde das Gewicht mit einer Feinwaage bestimmt. Die Differenz zwischen gemessenem End- und Anfangsgewicht entspricht der Menge an sorbiertem Wasser in der Kutikula.

2.8.2 Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten für Aminosäuren

Kutikularmembranen mit bekanntem Trockengewicht wurden bei 25°C in einem Thermoinkubator (Thriller, Peqlab, Erlangen) für mindestens 3 Tage in Aminosäurelösungen verschiedener pH Werte (Kapitel 2.6.1) inkubiert. Um Konzentrationsgradienten in der Donorlösung zu vermeiden wurden die Proben zweimal pro Stunde für jeweils 10 Sekunden mit 600 rpm geschüttelt.

Der Überstand wurde abpipettiert und die Membranen 4mal für jeweils 5 Sekunden mit destilliertem Wasser gewaschen. Vortests haben gezeigt, dass im 4. Waschschrift keine signifikanten Mengen von Aminosäuren mehr zu detektieren waren (Abbildung 2.8).

Anschließend wurden die sorbierten Aminosäuren in den Kutikularmembranen mit 0,1 N HCl und unter mehrmaliger Behandlung im Ultraschallbad (5 x 10 Minuten innerhalb von 24 Stunden) eluiert. Die Aminosäurekonzentrationen im Donor und in allen Waschschrritten wurden wie oben beschrieben (Kapitel 2.3) bestimmt.

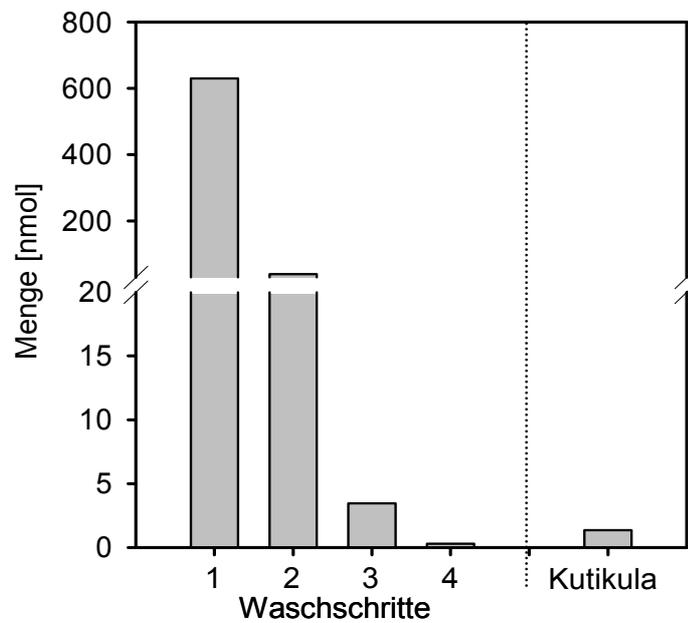


Abbildung 2.8: Absolute Menge von Glycin in den verschiedenen Waschschrritten und in der Kutikula bei der Bestimmung des Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten.

2.9 Hydrophobizität von Blattoberflächen

Die Wasserbenetzbarkeit von Pflanzenoberflächen wird durch die physiko-chemischen Eigenschaften der Oberflächenwachse bestimmt. Als Maß für die Benetzbarkeit wird der Kontaktwinkel angegeben, der zwischen der Blattoberfläche und der Tangente an einem Wassertropfen auf der entsprechenden Oberfläche gemessen wird (Shepherd & Griffiths, 2006) (Abbildung 2.9).

Um die Kontaktwinkel von Efeu- und Rosenblättern zu bestimmen, wurden die Blätter geerntet und unter einem weichen Wasserstrahl gewaschen, um Staubpartikel die den Kontaktwinkel verfälschen würden, zu entfernen. Nach dem vollständigen Trocknen der Oberfläche wurden die Blätter in Streifen geschnitten und mit doppelseitigem Klebeband auf Objektträgern fixiert.

Tropfen von jeweils 1 μl destilliertem Wasser wurden auf die Oberfläche aufgesetzt und die Kontaktwinkel gemessen (Kontaktwinkelsystem OCA 15, Software SCA20, Dataphysics Instruments, Filderstadt, Deutschland).

Für Rosenblätter wurden zusätzlich Kontaktwinkel mit 0,1N HCl, 0,1M MES-Puffer und 0,1N NaOH bestimmt, um zu überprüfen, ob sich die Benetzbarkeit der Blätter in Abhängigkeit des pH Wertes der Lösung ändert.

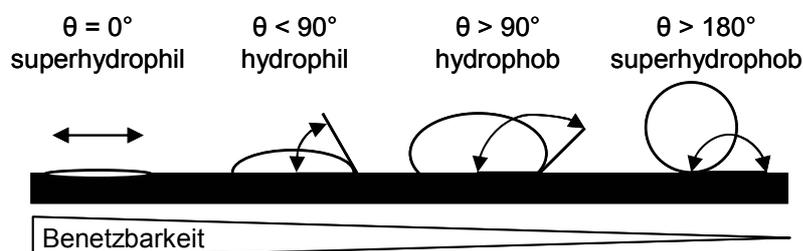


Abbildung 2.9: Variation des Kontaktwinkels (θ) auf Blattoberflächen als Maß für die Benetzbarkeit von Blättern, vom Wasserfilm (links) bis zum sphärischen Tropfen (rechts), (nach Shepherd & Griffiths, 2006).

2.10 Bestimmung des Aminosäuregehalts

2.10.1 Aminosäuren in Blättern

Um für *Leaching*experimente an intakten Blättern eine treibende Kraft bestimmen zu können, wurde der Aminosäuregehalt in Rosen- und Efeublättern bestimmt. Mit einem Korkbohrer wurden Scheiben (\varnothing 2 cm) aus den Blättern ausgestanzt und auf einer Mikrowaage das Frischgewicht bestimmt. Anschließend wurden die Blattscheiben bei $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und bei -55°C und einem Druck von 0,05-0,1 mbar lyophilisiert (Alpha 1-2 LD, Christ, Deutschland), um das Trockengewicht zu bestimmen. Die gefriergetrockneten Blattscheiben wurden in der Schwingmühle (Retsch GmbH, Haan) fein gemahlen und 3mal mit jeweils 500 μl 0,1 N HCl extrahiert. Beim ersten Extraktionsschritt wurde zusätzlich 100 μl Interner Standard (Norvalin, 0,2 mM) zugefügt. Ein Vortest, bei dem 4 Extraktionsschritte getrennt analysiert wurden, zeigte eine deutliche Abnahme des Aminosäuregehaltes mit der Anzahl der Extraktionen und beim 4. Schritt nur noch Spuren, so dass eine quantitative Extrahierung mit 3 Schritten gewährleistet war. Die 3 Phasen wurden vereinigt und wie oben beschrieben analysiert.

2.10.2 Aminosäuren in Blüten von *Hedera Helix*

Für die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung in Blüten von *Hedera helix*, wurden Blütenstände von derselben Pflanze geerntet, von der auch die Kutikularmembranen isoliert wurden. Jeweils 10 Einzelblüten wurden nacheinander für je 10 Sekunden in 1 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Waschlösungen der 5 Parallelen wurden für je 5 Minuten bei 13000 U min^{-1} zentrifugiert und der Aminosäuregehalt im Überstand wie oben beschrieben quantifiziert.

2.10.3 Aminosäuren auf Blattoberflächen

Um die Aminosäurezusammensetzung auf pflanzlichen Oberflächen zu bestimmen wurden Efeublätter aus dem Botanischen Garten Würzburg und Efeu- und Rosenblätter von im Gewächshaus angezogenen Pflanzen geerntet und die Oberseiten in Anlehnung an die Methode von Fiala *et al.* (1990) mit destilliertem Wasser abgesprüht. Dazu wurden die Schnittflächen der Blattstiele mit Paraffinwachs verschlossen um ein unkontrolliertes Auswaschen zu vermeiden. Die so präparierten Blätter wurden an den Blattstielen mit Klebeband an der Innenwand eines Glastrichters fixiert so dass die adaxiale Seite nach oben zeigte. Die Oberseiten der Blätter wurden mit destilliertem Wasser aus einem Druckluftsprüher für 20 Sekunden besprüht, und anschließend das auf den Blättern verbliebene Wasser mit Druckluft heruntergepustet und der Waschphase zugeführt. Je nach Blattgröße wurde der Abwasch von 4 bis 10 Blättern vereinigt und nach Zugabe von internem Standard (Norvalin) durch Filterpapier filtriert. Die über Nacht unter Druckluft getrockneten Proben wurden in HCl (0,01N) aufgenommen und wie oben beschrieben auf ihren Aminosäuregehalt hin untersucht.

2.11 *Leachingsimulation* von Aminosäuren aus intakten Blättern

2.11.1 *Steady-State*

Efeu- oder Rosenblätter wurden geerntet, die Schnittstellen der Blattstiele mit Paraffin versiegelt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Blätter wurden kopiert und eingescannt um in Photoshop über einen Vergleich der Pixel mit einer Referenzfläche die Blattfläche zu bestimmen.

Entweder die adaxiale oder die abaxiale Seite der Blätter wurde mit Paraffin beschichtet um ein kontrolliertes Auswaschen von der Ober- bzw. Unterseite der Blätter zu gewährleisten. 8 bis 10 Blätter der gleichen Behandlung wurden zusammen in eine 100 ml Schottflasche gegeben (Abbildung 2.10). Um den Versuch zu starten wurden jeweils 100 ml bidestilliertes Wasser hinzugefügt. Das Wasser enthielt Natriumazid (0,001M) um das Wachstum von Mikroorganismen zu unterdrücken, die einen Abbau der Aminosäuren bewirken würden. Nach verschiedenen Zeitschritten wurden jeweils Aliquots von 1 ml entnommen und der Aminosäuregehalt wie oben beschrieben bestimmt. Das Abgenommene Probenvolumen wurde durch frisches Wasser ausgeglichen.



Abbildung 2.10: *Leachingsimulation* in einer 100 ml Schottflasche anhand von 10 Rosenblättern, die auf der adaxialen Seite mit Paraffin versiegelt wurden

2.11.2 *Non-Steady-State*

Blütentragende Efeuzweige wurden im Freiland geerntet und der Blütenstand sowie die nachfolgenden drei Blätter entfernt, so dass pro Zweig jeweils sechs voll entwickelte, etwa gleich alte Blätter verblieben. Die Schnittstellen wurden mit Paraffin versiegelt, um ein unkontrolliertes Auswaschen der Aminosäuren zu vermeiden. Anschließend wurden die Blätter mit destilliertem Wasser gewaschen und die Oberflächen bei Raumtemperatur getrocknet. Die Zweige wurden kontinuierlich mit Wasser versorgt, und in der Klimakammer (25°C, 70% RH, 16L:8D) aufgestellt. Nach jeweils 10-14 Tagen wurden die adaxialen Seiten der Blätter wie oben beschrieben mit destilliertem Wasser abgesprüht und der Abwasch auf den Aminosäuregehalt hin untersucht. Am Ende des Versuches wurden die Blätter geerntet und die Blattflächen über den Vergleich mit einer Referenzfläche in Photoshop bestimmt.

2.12 Visualisierung der kutikulären Eigenschaften

2.12.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Getrocknete Kutikularmembranen wurden waagrecht und senkrecht auf mit Karbonkleber beschichtete Aluminiumhalter aufgeklebt. Für Ganzblattabbildungen von Efeu wurden Gefrierbrüche der Blätter auf die Halter geklebt. Für Aufnahmen die in der mikroskopischen Abteilung der Biocinetics Group von Syngenta (Jealotts Hill, Bracknell, Berkshire, England) entstanden, wurden die Proben mit Platin beschichtet (3nm) und mit einem Hitachi S-4700 Feldemissionsrasterelektronenmikroskop (FESEM) bei einer Beschleunigungsspannung von 2 kV visualisiert. An der Universität Würzburg wurden mit einem Zeiss DSM962 Rasterelektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) Aufnahmen von Gold/Palladium bedampften Proben bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV angefertigt.

2.12.2 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Isolierte Kutikularmembranen von Efeu und Rose wurden mit einem Mix aus den Fluoreszenzfarbstoffen *N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)-hexatrienyl)pyridinium dibromide (FM®4-64) und *N*-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoyl (BODIPY® FL C₁₂-sphingomyelin) (Invitrogen, Deutschland) gefärbt. Dazu wurden Stücke der Membranen über Nacht bei 25°C im Dunkeln in den in Wasser/DSMO gelösten Farbstoffen (jeweils 5µg/ml) inkubiert. Die gefärbten Membranen wurden auf Objektträger transferiert und in hydratisiertem Zustand mit einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (CLSM Pascal, Zeiss, Deutschland) visualisiert. Dabei wurden Scannstapel durch die Membranen angefertigt um einen möglichen heterogenen Aufbau zu visualisieren. Die Emissionsmaxima der verwendeten Farbstoffe liegen für BODIPY® FL C₁₂ mit 511 nm im grünen Bereich (Molecular Probes, 2003) und für FM®4-64 mit 734 nm im roten Bereich (Molecular Probes, 2005). Beide Farbstoffe werden generell für die Färbung von Plasmamembranen und die Visualisierung von Endozytose eingesetzt (Fischer-Parton *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2009), wobei der amphiphile Farbstoff BODIPY® FL C₁₂ auch polare Domänen aufweist, mit denen er an hydrophile Strukturen binden kann.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften der isolierten Kutikularmembranen

3.1.1 Gravimetrische Bestimmung der kutikulären Komponenten

Das spezifische Gewicht der Efeukutikula beträgt $0,61 \pm 0,06 \text{ mg cm}^{-2}$. Mit der gravimetrischen Methode zur Bestimmung kutikulärer Komponenten konnte für isolierte Kutikularmembranen von Efeu ein hoher Anteil an Kutin ($63,58 \pm 1,42\%$) nachgewiesen werden. Das verbleibende Drittel der kutikulären Gesamtmenge wird gleichermaßen von den lipophilen, extrahierbaren Wachsen ($17,78 \pm 0,98\%$) und von hydrophilen, hydrolysierbaren Komponenten wie z.B. Polysacchariden ($18,06 \pm 0,99\%$) gebildet (Abbildung 3.1).

Für Kutikularmembranen der Rose konnte nur der Anteil der extrahierbaren, lipophilen Bestandteile bestimmt werden. Die isolierten Kutikularmembranen haben ein spezifisches Gewicht von $0,097 \pm 0,002 \text{ mg cm}^{-2}$. Der Wachsanteil von 36% entspricht einer Wachsmenge von $0,035 \text{ mg cm}^{-2}$.

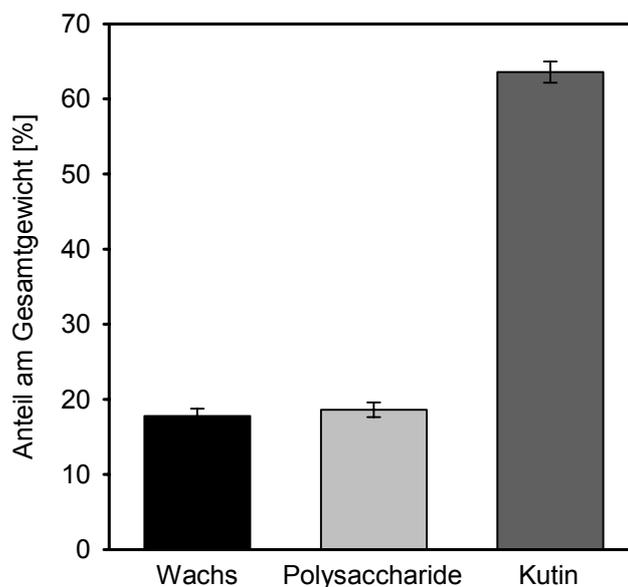


Abbildung 3.1: Prozentualer Anteil der kutikulären Bestandteile am Gesamtgewicht der Kutikularmembran von Efeu.

3.1.2 Titration von isolierten Kutikularmembranen

Der Vergleich zwischen Titrationskurven von Kutikularmembranen von Efeu und deionisiertem Wasser, zeigt eine deutliche Abweichung der beiden Kurven im basischen pH Bereich (Abbildung 3.2A). Im Sauren pH Bereich liegen die beiden Kurven exakt übereinander. Ab einem pH Wert von 6 steigt der pH Wert unter Zugabe von NaOH in der Lösung mit Kutikularmembranen deutlich langsamer an, als in der Kontrolle. Die zugegebenen OH^- Ionen werden hier durch die Kutikula neutralisiert. Der Pufferbereich erstreckt sich beginnend von pH 6 über einen großen Teil des basischen pH Bereichs.

Bei der Titration von Kutikularmembranen der Rose änderte sich der pH Wert gleichermaßen wie bei der Titration von Wasser. Ein möglicher Puffereffekt der Rosenmembranen ist hier nicht zu erkennen (Abbildung 3.2B).

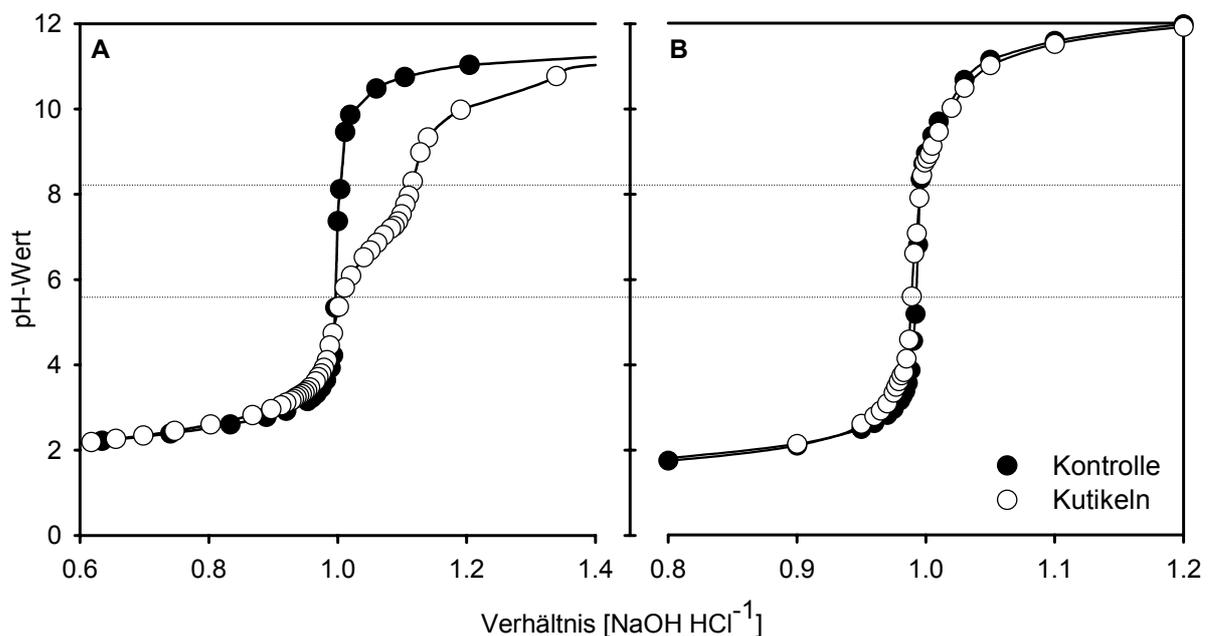


Abbildung 3.2: Titrationskurven von Kutikularmembranen von Efeu (A) und Rose (B) im Vergleich zu deionisiertem Wasser als Kontrolle.

3.2 Wassertranspiration

Bei der Wassertranspiration von isolierten Kutikularmembranen von Efeu wurde zunächst ein Vergleich der Transpirationsrichtungen angestellt. Für die Leitwerte konnte hierbei kein Richtungseffekt festgestellt werden. Im Mittel liegen die Wasserleitwerte bei $5,0 \times 10^{-11}$ ($\pm 1,1 \times 10^{-11}$) und $5,1 \times 10^{-11}$ ($\pm 1,8 \times 10^{-11}$) m s^{-1} , so dass es keine Rolle spielt ob die morphologische Außen- oder Innenseite der Kutikula mit dem Wasser in Kontakt steht (Abbildung 3.3A).

3.2.1 Einfluss der kutikulären Wachse auf die Wasserpermeation

Ein Versuch zur Bedeutung der kutikulären Bestandteile für die Wassertranspiration wurde an verbundenen Stichproben durchgeführt. Die Leitwerte der unbehandelten Kutikularmembranen von Efeu liegen ähnlich wie im Versuch zur Richtungsabhängigkeit der Transpiration bei $5,4 \times 10^{-11}$ m s^{-1} ($\pm 1,2 \times 10^{-11}$) (Abbildung 3.3A, B). Wurden die epikutikulären Wachse durch die Behandlung mit Gummi Arabicum entfernt, so führte dies zu einer Verdopplung der

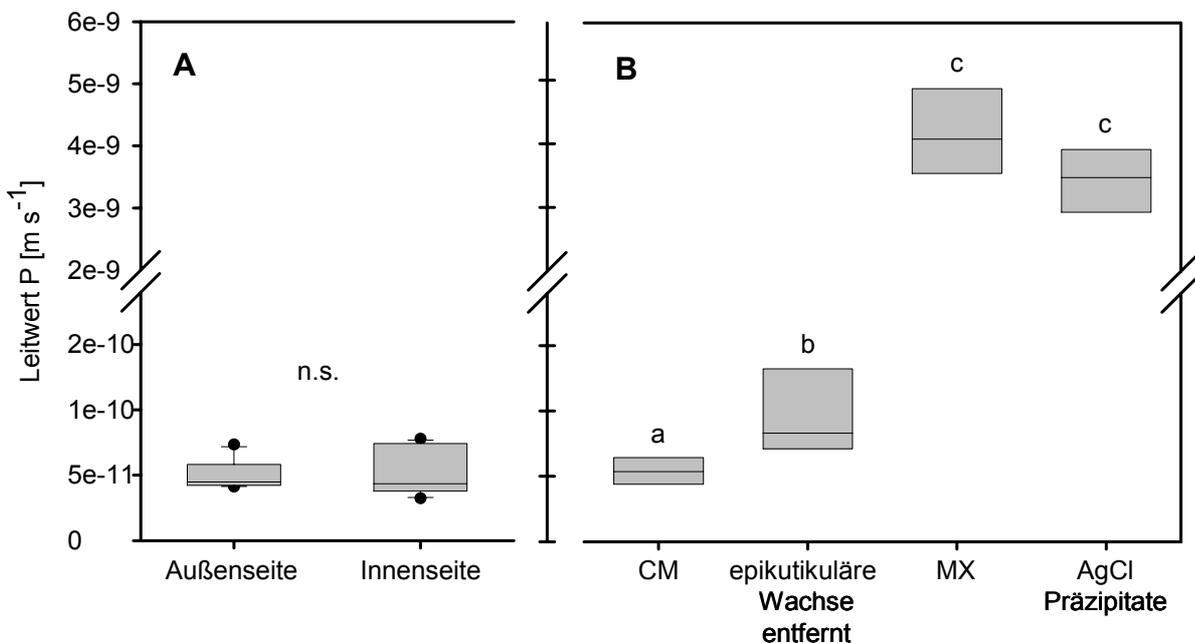


Abbildung 3.3: A: Wasserleitwerte der Efeukutikula in Abhängigkeit der Transpirationsrichtung. Die X-Achse gibt an welche physiologische Seite der isolierten Kutikula zum Kammerinneren zeigte und vom Wasser benetzt war (T-Test, n.s.: nicht signifikant, FG=22). B: Wasserleitwerte der Efeukutikula die in Abhängigkeit der Wachsbelegung an verbundenen Stichproben gemessen wurden. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (Anova; $p > 0,001$; $N=5$).

Wasserpermeabilität ($\times 1,8 \pm 0,39$). Eine Extraktion der intrakutikulären Wachse mit organischem Lösungsmittel bewirkte einen zusätzlichen Anstieg der Leitwerte um das 45fache, was im Vergleich zum Anfangswert der nativen Kutikularmembranen eine höchstsignifikante ca. 80fache Erhöhung ergibt. Wurden die Membranen mit Silbernitrat und Natriumchlorid behandelt, so sank der Leitwert lediglich um das 1,22fache ($\pm 0,09$) (Abbildung 3.3B). Ein signifikanter Effekt von Silberchlorid Präzipitaten ist also nicht zu erkennen.

3.2.2 pH Abhängigkeit der Wasserpermeation

Die Wasserpermeabilität isolierter Kutikularmembranen wird durch den pH Wert der Lösung beeinflusst. Der Wasserleitwert isolierter Efeumembranen liegt mit $5,5 \times 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ im sauren Bereich am niedrigsten und steigt von pH 6 nach pH 11 auf das 2,1fache ($1,16 \times 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ bei pH 11) an (Abbildung 3.4 A).

Für isolierte Kutikularmembranen der Rose wurden ebenfalls bei pH 1 die niedrigsten Wasserleitwerte gemessen ($7,91 \times 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$). Mit steigendem pH Wert nimmt die Wasserpermeabilität um den Faktor 1,6 zu ($1,25 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$; pH 11) (Abbildung 3.4B).

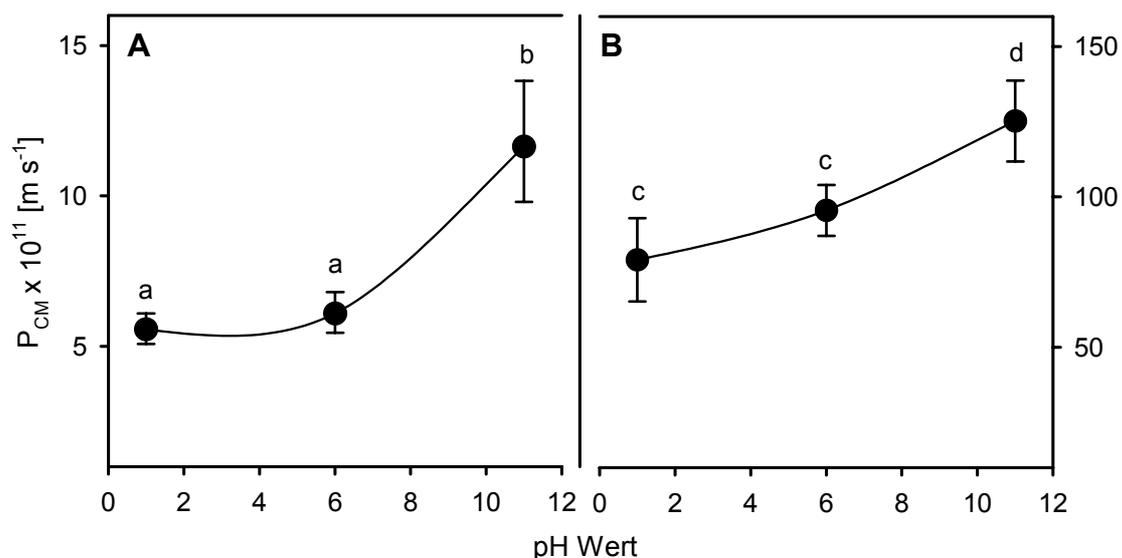


Abbildung 3.4: Wasserleitwerte von isolierten Kutikularmembranen von Efeu (A) und Rose (B) in Abhängigkeit des pH Wertes der Lösung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (T-Test, $FG > 30$).

3.3 Quantifizierung der Aminosäuren

Für jede einzelne Aminosäure wurde ein Responsefaktor bestimmt, der das Verhältnis der Peakflächen von internem Standard und zu quantifizierender Aminosäure und das Verhältnis der tatsächlichen Mengen relativiert. Die Beziehung zwischen dem Verhältnis der Peakflächen und dem Verhältnis der Substanzmengen war dabei für die einzelnen Aminosäuren über große Konzentrationsbereiche konstant (Abbildung 3.5). Die Steigung der resultierenden Geraden gibt den Responsefaktor an, der zwischen 0,47 für Glycin und 2,46 für Tryptophan liegt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Responsefaktoren (RF), die für die einzelnen Aminosäuren (AS) bestimmt wurden.

AS	RF	AS	RF	AS	RF	AS	RF
Gly	0,47	Glu	0,72	Ile	1,03	Lys	1,70
Gln	0,50	Asn	0,73	Asp	1,04	Phe	1,96
Ser	0,53	Pro	0,76	Leu	1,27	Tyr	2,39
Ala	0,56	Val	0,79	Met	1,30	Trp	2,46
Thr	0,70	His	0,96	Orn	1,46		

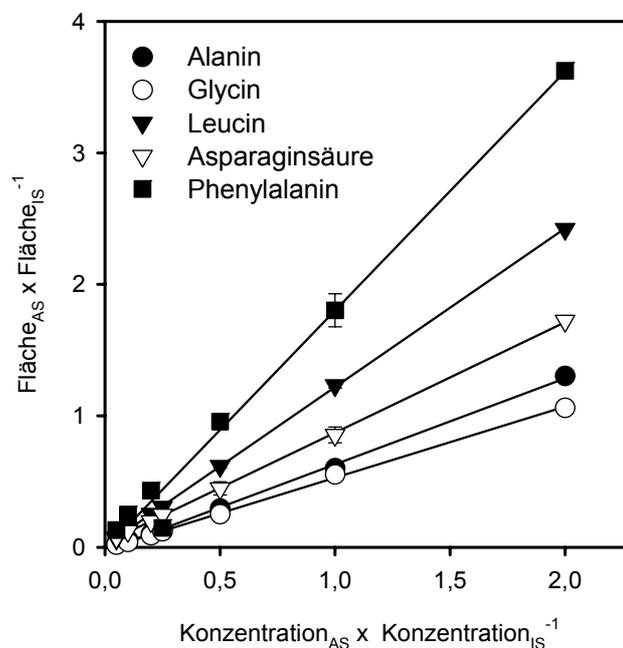


Abbildung 3.5: Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Konzentrationen und der Peakflächen von Analyt (AS) und internem Standard (IS) am Beispiel einiger Aminosäuren. Die Steigungen der Geraden (m) entsprechen den Responsefaktoren für die Ansprechempfindlichkeit des GC-FID Detektors.

3.4 Aminosäurepermeation

3.4.1 pH Abhängigkeit der Aminosäurepermeation

Sowohl beim Efeu als auch bei der Rose konnte für alle verwendeten Aminosäuren nachgewiesen werden, dass sie die Kutikula in signifikanten Mengen permeieren. Somit konnten für alle Aminosäuren Leitwerte bestimmt werden, die für die Kutikularmembranen der Rose generell 1-2 Größenordnungen über denen der Efeukutikula liegen (Abbildung 3.6, Tabelle 3.2).

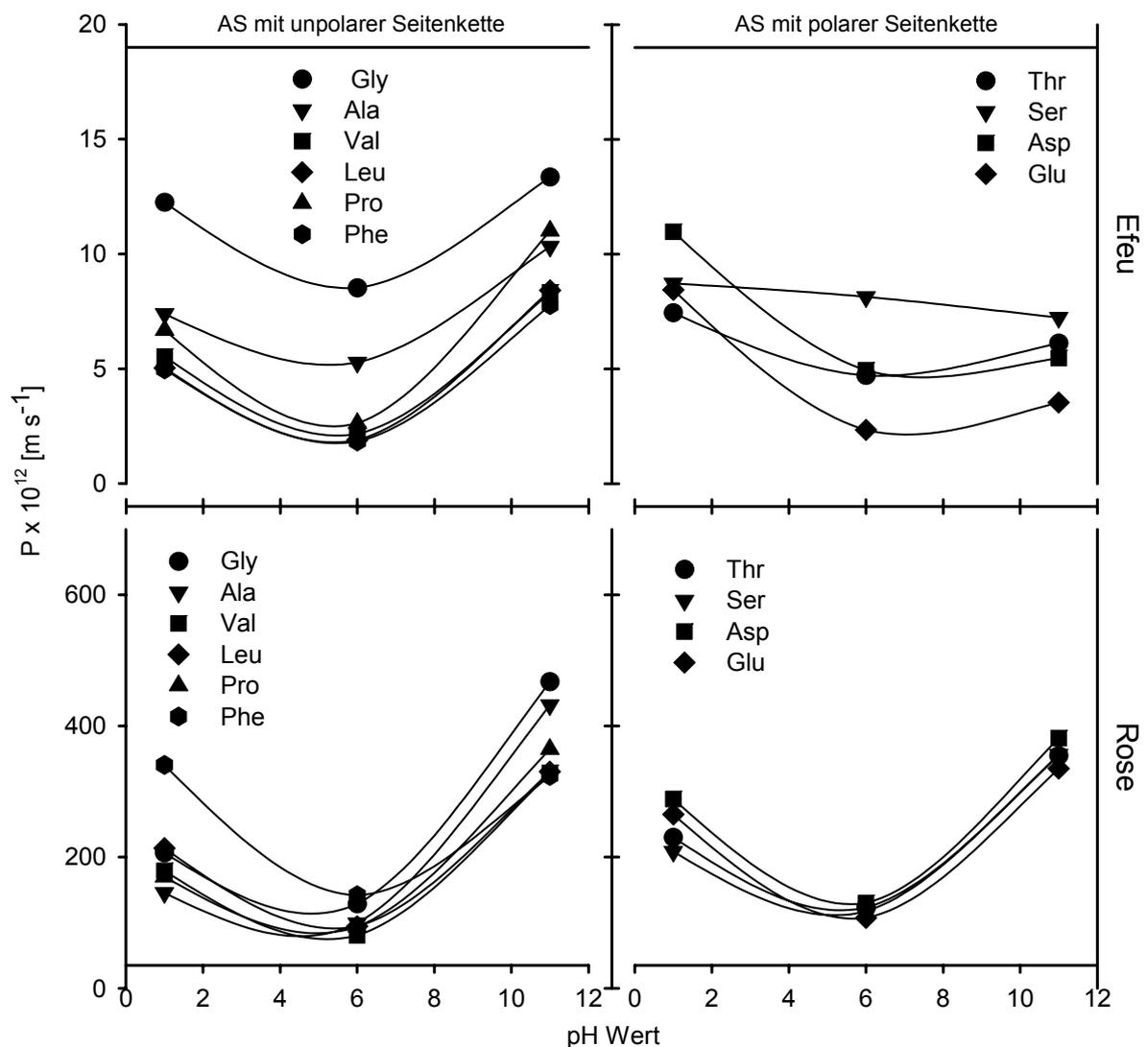


Abbildung 3.6: pH Abhängigkeit der Aminosäureleitwerte isolierter Kutikularmembranen von Efeu und Rose für Aminosäuren mit unpolarer oder polarer Seitenkette.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der kutikulären Leitwerte (P) die unter verschiedenen pH Bedingungen für isolierte Kutikularmembranen (CM) von Efeu und Rose bestimmt wurden. Angegeben sind Mittelwerte \pm 95% Konfidenzintervall.

	Efeu $P_{CM} \times 10^{12} [m s^{-1}]$			Rose $P_{CM} \times 10^{10} [m s^{-1}]$		
	pH 1	pH 6	pH 11	pH 1	pH 6	pH 11
Wasser	55,6 \pm 10,3	60,9 \pm 13,7	116,4 \pm 41,5	7,91 \pm 1,95	9,55 \pm 0,84	12,52 \pm 1,35
Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette						
Gly	9,57 \pm 1,72	8,52 \pm 2,34	13,35 \pm 2,69	2,07 \pm 1,04	1,29 \pm 0,41	4,68 \pm 1,26
Ala	7,39 \pm 1,55	5,27 \pm 1,27	10,33 \pm 1,74	1,46 \pm 0,86	0,99 \pm 0,35	4,32 \pm 1,19
Pro	6,68 \pm 1,50	2,62 \pm 0,81	11,01 \pm 2,57	1,70 \pm 0,99	0,94 \pm 0,32	3,65 \pm 0,97
Val	5,53 \pm 1,10	2,16 \pm 0,56	8,33 \pm 1,53	1,79 \pm 0,86	0,81 \pm 0,28	3,29 \pm 0,90
Leu	5,03 \pm 1,12	1,89 \pm 0,49	8,41 \pm 1,60	2,14 \pm 1,08	0,95 \pm 0,30	3,31 \pm 0,83
Phe	4,53 \pm 1,20	1,38 \pm 0,42	7,77 \pm 1,64	3,41 \pm 1,65	1,42 \pm 0,34	3,24 \pm 0,79
Aminosäuren mit polarer Seitenkette						
Ser	8,72 \pm 2,39	8,14 \pm 2,23	7,24 \pm 2,77	2,09 \pm 1,08	1,17 \pm 0,31	3,57 \pm 1,03
Thr	7,44 \pm 2,02	4,72 \pm 1,25	6,13 \pm 2,11	2,30 \pm 1,21	1,23 \pm 0,29	3,55 \pm 0,91
Asp	10,97 \pm 2,18	4,95 \pm 0,67	5,48 \pm 1,59	2,89 \pm 1,29	1,30 \pm 0,27	3,82 \pm 0,89
Glu	8,45 \pm 2,15	2,34 \pm 0,52	3,54 \pm 1,39	2,65 \pm 1,27	1,07 \pm 0,26	3,35 \pm 0,82

Aminosäureleitwerte, die mit Kutikularmembranen von Efeu bestimmt wurden, variieren zwischen $1,38 \times 10^{-12} m s^{-2}$ für die größte Aminosäure (Phenylalanin) bei pH 6 und $1,34 \times 10^{-11} m s^{-2}$ für die kleinste Aminosäure (Glycin) bei pH 11. Die Leitwerte unterscheiden sich in Abhängigkeit der jeweiligen ionischen Spezies, wobei die zwitterionische Form bei pH 6 generell die kleinsten Leitwerte aufweist (Abbildung 3.6). Für Aminosäuren mit unpolarer, lipophiler Seitenkette wurden die höchsten Leitwerte im basischen Bereich gemessen (Abbildung 3.6). Aminosäuren mit polarer Seitenkette dagegen weisen tendenziell die höchsten Leitwerte im sauren pH Bereich auf.

Mit Kutikularmembranen der Rose wurden Aminosäureleitwerte zwischen $0,81 \times 10^{-10} m s^{-2}$ (Valin, pH 6) und $4,68 \times 10^{-10} m s^{-2}$ (Glycin, pH 11) gemessen. Die niedrigsten Leitwerte finden sich hier wie beim Efeu im neutralen pH Bereich, die höchsten Leitwerte wurden bei pH 11 gemessen (Abbildung 3.6, Tabelle 3.2).

3.4.2 Einfluss der kutikulären Wachse auf die Aminosäurepermeation

Um einen möglichen Einfluss der lipophilen, kutikulären Komponenten auf die Permeation hydrophiler Substanzen zu erläutern, wurden für isolierte, extrahierte Matrixmembranen (MX) von Efeu Leitwerte für Aminosäuren in der zwitterionischen Form (pH 6) bestimmt.

Die mit Matrixmembranen gemessenen Aminosäureleitwerte (P_{MX}) liegen zwischen $2,87 \times 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ für die größte Aminosäure Phenylalanin und $9,79 \times 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ für die kleinste Aminosäure Glycin (Tabelle 3.3).

Die Extraktion der Wachse bewirkt einen Anstieg der Membranpermeabilitäten für Aminosäuren um Faktoren zwischen 11,5 (Glycin) und 22,7 (Glutaminsäure) (Tabelle 3.3). Dabei fällt auf, dass die Leitwerte von Aminosäuren mit großem molekularem Volumen stärker durch die Extraktion beeinflusst sind, als die Leitwerte der kleineren Aminosäuren. Der Extraktionseffekt korreliert positiv mit der Größe der Aminosäuren, wobei für die Aminosäuren mit polarer Seitenkette ein anderer Zusammenhang gilt als für Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette (Abbildung 3.7).

Tabelle 3.3: Leitwerte (P_{MX}) von Wasser und Aminosäuren für Matrixmembranen von Efeu bei einem pH Wert von 6. Angegeben sind Mittelwerte \pm 95% Konfidenzintervall.

	$P_{MX} \times 10^{11} [\text{m s}^{-1}]$	$P_{CM} \times P_{MX}^{-1}$
Wasser	$417,62 \pm 10,35$	77,2
Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette		
Gly	$9,79 \pm 3,24$	11,5
Ala	$6,97 \pm 2,62$	13,2
Pro	$4,58 \pm 1,83$	17,5
Val	$3,98 \pm 1,62$	18,5
Leu	$3,44 \pm 1,40$	18,1
Phe	$2,87 \pm 1,09$	20,8
Aminosäuren mit polarer Seitenkette		
Ser	$9,79 \pm 2,83$	12,0
Thr	$8,37 \pm 2,64$	17,8
Asp	$7,04 \pm 2,40$	14,2
Glu	$5,32 \pm 2,06$	22,7

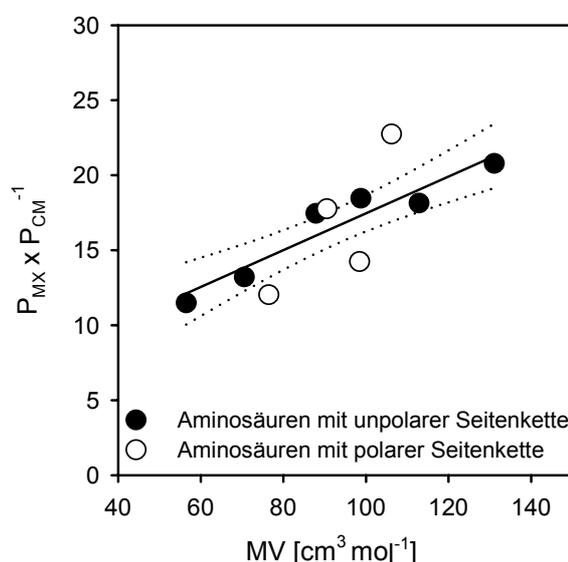


Abbildung 3.7: Zusammenhang zwischen dem Wachsextraktionseffekt und dem Molvolumen der Aminosäuren. Für die Regression wurden nur Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette berücksichtigt ($r^2 = 0,92$).

3.5 Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten

Für lipophile Substanzen werden die Membranpermeabilitäten maßgeblich durch den Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten bestimmt, der proportional zum Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ist. Um zu überprüfen, inwieweit auch die Diffusion von hydrophilen Substanzen von dieser physikalischen Größe abhängt, wurden Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten für Wasser und Aminosäuren bestimmt.

3.5.1 pH-Abhängigkeit der Wassersorption von Kutikularmembranen

Die Wassersorption für isolierte Kutikularmembranen von Efeu betrug im sauren pH-Bereich $0,11 \text{ g g}^{-1}$, was einer Sorption von 11% des Trockengewichtes der Membran entspricht. Mit steigendem pH-Wert nahm auch die Wassersorption signifikant zu. Bei einem pH-Wert von 11 betrug die sorbierte Wassermenge in den Kutikularmembranen das 2,2fache ($0,25 \text{ g g}^{-1}$) im Vergleich zu pH 1.

Für Kutikularmembranen der Rose wurden deutlich geringere Wassersorptionen gemessen als bei Efeumembranen. Bei pH 1 betrug die Wassermenge in der Kutikula $0,018 \text{ g g}^{-1}$. Ein leichter, 1,4facher Anstieg der Wassersorption mit steigendem pH-Wert ($0,028 \text{ g g}^{-1}$, pH 11) konnte nicht statistisch abgesichert werden ($p = 0,38$).

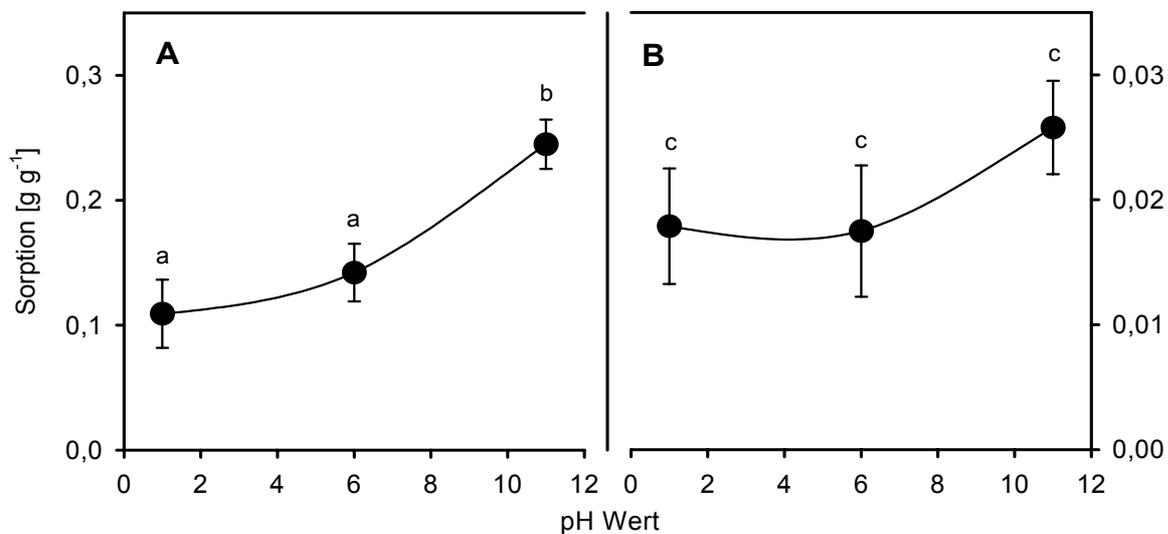


Abbildung 3.8: pH-Abhängigkeit der Wassersorption von Kutikularmembranen von Efeu (A) und Rose (B). Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (T-Test, FG: 4).

3.5.2 Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten von Aminosäuren

Alle gemessenen Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten für Aminosäuren, die mit Kutikularmembranen von Efeu bestimmt wurden, sind deutlich kleiner als 1, wobei sich innerhalb eines pH Wertes keine signifikanten Unterschiede für die einzelnen Aminosäuren ergeben. Die Verteilungskoeffizienten der Aminosäuren variieren zwischen von 0,011 für Alanin (pH 1) und 0,104 für Phenylalanin (pH 11).

Für Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette steigen die Verteilungskoeffizienten mit zunehmendem pH Wert an. Die Kationen der jeweiligen Aminosäure haben somit den kleinsten und die Anionen den größten Verteilungskoeffizienten. Für Aminosäuren mit nicht dissoziierbarer, polarer Seitenkette gilt dieser Zusammenhang ebenfalls, wobei die Verteilungskoeffizienten der zwitterionischen Form am niedrigsten sind. Für die beiden Säuren Asparagin- und Glutaminsäure gibt es für die anionische und die kationische Form keine Unterschiede.

Die Verteilungskoeffizienten von Aminosäuren, die mit Kutikularmembranen der Rose bestimmt wurden, sind deutlich höher und reichen von 0,130 (Serin, pH 6) bis 1,336 (Phenylalanin, pH 1). Die Zwitterionen (pH 6) haben dabei die kleinsten Verteilungskoeffizienten. Im Gegensatz zum Efeu wurden bei der Rose die größten Verteilungskoeffizienten im sauren Bereich gemessen (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{CW}) für Wasser und Aminosäuren die mit isolierten Kutikularmembranen (CM) von Efeu und Rose bestimmt wurden (MW \pm 95% CI).

	Efeu $K_{CW} \times 10^2$			Rose $K_{CW} \times 10$		
	pH 1	pH 6	pH 11	pH 1	pH 6	pH 11
Wasser	10,91 \pm 2,73	14,21 \pm 2,30	24,49 \pm 1,97	0,179 \pm 0,46	0,17 \pm 0,53	0,258 \pm 0,3741
Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette						
Gly	1,81 \pm 0,47	3,24 \pm 0,40	5,99 \pm 0,91	8,30 \pm 1,65	1,48 \pm 0,14	6,41 \pm 0,46
Ala	1,11 \pm 0,45	2,78 \pm 0,68	3,64 \pm 0,96	8,35 \pm 2,00	1,46 \pm 0,06	5,88 \pm 0,32
Pro	1,26 \pm 0,42	1,39 \pm 0,45	5,31 \pm 0,94	10,12 \pm 2,44	1,52 \pm 0,11	6,00 \pm 0,70
Val	1,40 \pm 0,42	1,62 \pm 0,53	3,62 \pm 0,80	9,79 \pm 2,33	1,37 \pm 0,11	5,94 \pm 0,55
Leu	1,55 \pm 0,42	1,88 \pm 0,49	6,64 \pm 0,93	11,71 \pm 2,95	1,69 \pm 0,15	6,18 \pm 0,70
Phe	2,81 \pm 0,54	2,93 \pm 0,52	10,38 \pm 1,00	13,36 \pm 3,39	2,21 \pm 0,19	6,65 \pm 0,86
Aminosäuren mit polarer Seitenkette						
Ser	1,76 \pm 0,62	1,44 \pm 0,19	4,27 \pm 0,78	7,66 \pm 1,59	1,30 \pm 0,11	6,05 \pm 1,20
Thr	1,97 \pm 0,58	1,43 \pm 0,31	6,01 \pm 0,75	7,83 \pm 1,42	1,59 \pm 0,16	5,94 \pm 1,05
Asp	3,59 \pm 0,74	1,88 \pm 0,31	4,82 \pm 1,15	8,00 \pm 1,38	1,70 \pm 0,13	5,98 \pm 0,92
Glu	4,17 \pm 0,99	1,25 \pm 0,38	3,44 \pm 1,42	8,06 \pm 1,43	1,74 \pm 0,19	6,04 \pm 1,08

3.6 Hydrophobizität von Blattoberflächen

Mit destilliertem Wasser wurden auf Oberflächen von Efeublättern Kontaktwinkel von $52,34^\circ \pm 1,58^\circ$ gemessen.

Rosenblätter weisen für destilliertes Wasser einen Kontaktwinkel von $108,02^\circ \pm 0,87^\circ$ auf. Bei der Applikation von Salzsäure, MES-Puffer und Natronlauge wurden ähnliche Kontaktwinkel gemessen (pH 1: $107,11^\circ$; pH 6: $107,7^\circ$; pH 11: $107,7^\circ$).

3.7 Bestimmung des Aminosäuregehalts

3.7.1 Intakte Blätter

Mit Ausnahme von Cystin, welches mit der angewandten Methode nicht identifiziert werden kann, konnten in den Blättern von Efeu und Rose alle proteinogenen Aminosäuren nachgewiesen werden.

Insgesamt waren in Efeublättern $1676,47 \mu\text{mol}$ und in Rosenblättern $447,80 \mu\text{mol}$ freie Aminosäuren pro m^2 Blattfläche enthalten, wobei Serin, Alanin und die beiden Säuren Asparaginsäure und Glutaminsäure den größten Anteil an der Gesamtmenge ausmachten. Methionin, Tryptophan und Ornitin konnten hingegen nur in Spuren nachgewiesen werden (Abbildung 3.9).

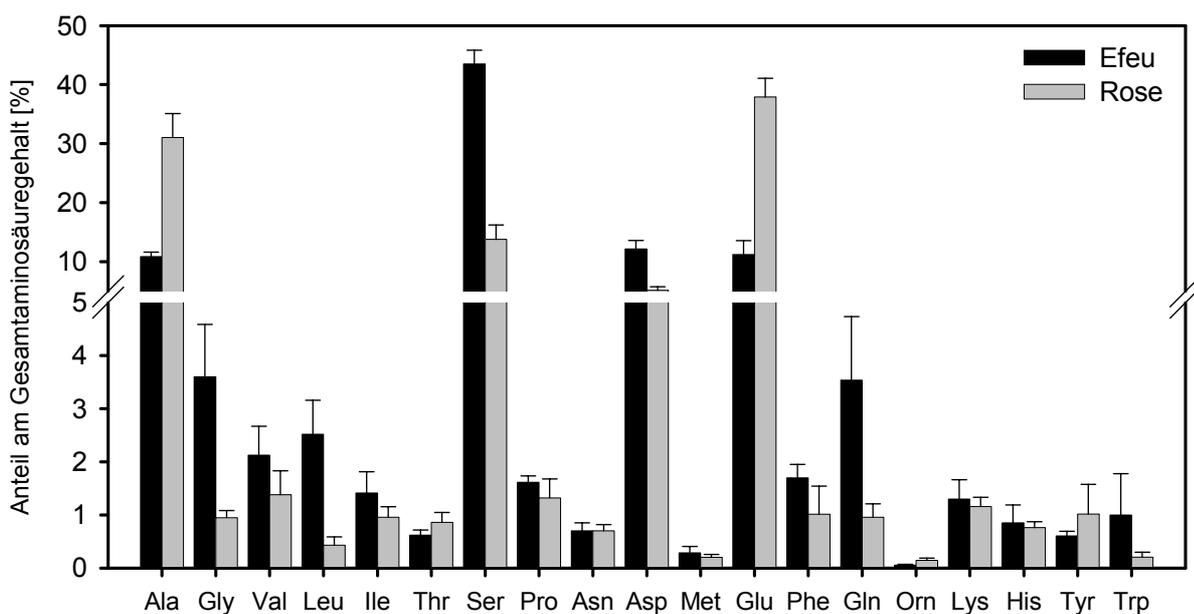


Abbildung 3.9: prozentualer Anteil der einzelnen Aminosäuren am Gesamtaminosäuregehalt in den Blättern von Efeu und Rose (MW \pm STD, N = 6).

Tabelle 3.5: Vergleich der physiologischen Eigenschaften von Efeu- und Rosenblättern (MW \pm STD, N = 6).

	Frischgewicht [kg m ⁻²]	Trockengewicht [kg m ⁻²]	Wassergehalt [%]	Dicke [mm]	Dichte [kg m ⁻³]
Efeu	0,287 \pm 0,031	0,112 \pm 0,015	60,99 \pm 0,93	0,20 \pm 0,02	1467,28 \pm 64,33
Rose	0,152 \pm 0,009	0,043 \pm 0,003	71,97 \pm 1,16	0,15 \pm 0,01	1019,44 \pm 28,16

Die Blätter von Rose und Efeu unterscheiden sich in ihren physiologischen Eigenschaften wie der Dicke und dem Wassergehalt (Tabelle 3.5). Daher wurden diese Parameter bei der Berechnung des Aminosäuregehaltes mit einbezogen, um beide Arten vergleichen zu können. Bezogen auf die Blattfläche ist der Gesamtaminosäuregehalt in Efeublättern 3,7mal höher als in Rosenblättern. Berücksichtigt man jedoch die Dichte der Blätter, so ist der Gesamtaminosäuregehalt in Efeublättern nur noch 2,8mal so hoch wie in Rosenblättern. Geht man davon aus, dass die extrahierbaren Aminosäuren in gelöster Form frei im wässrigen Kompartiment des Pflanzengewebes vorliegen, kann man auch den

Tabelle 3.6: Menge (M) der einzelnen Aminosäuren in den Blättern von Efeu und Rose unter Berücksichtigung der physiologischen Eigenschaften der Blätter (MW \pm 95% CI).

AS	pro Blattfläche M x 10 ⁶ [mol m ⁻²]		im gesamten Blatt [mol m ⁻³]		im Wasseranteil [mol m ⁻³]	
	Efeu	Rose	Efeu	Rose	Efeu	Rose
Ala	173,15 \pm 33,06	142,06 \pm 58,25	0,868 \pm 0,17	0,947 \pm 0,39	1,06 \pm 0,23	1,273 \pm 0,60
Gly	58,58 \pm 11,33	4,22 \pm 1,32	0,294 \pm 0,06	0,028 \pm 0,01	0,35 \pm 0,05	0,038 \pm 0,01
Val	29,78 \pm 4,69	5,86 \pm 1,09	0,149 \pm 0,02	0,039 \pm 0,01	0,18 \pm 0,03	0,054 \pm 0,01
Leu	37,49 \pm 5,46	1,84 \pm 0,51	0,188 \pm 0,03	0,012 \pm 0,00	0,23 \pm 0,04	0,017 \pm 0,00
Ile	19,83 \pm 2,97	4,16 \pm 0,57	0,099 \pm 0,01	0,028 \pm 0,00	0,12 \pm 0,02	0,038 \pm 0,01
Thr	11,86 \pm 2,11	3,87 \pm 1,49	0,059 \pm 0,01	0,026 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,035 \pm 0,01
Ser	771,66 \pm 109,69	63,42 \pm 29,75	3,866 \pm 0,55	0,423 \pm 0,20	4,70 \pm 0,77	0,579 \pm 0,29
Pro	23,14 \pm 4,22	5,69 \pm 1,05	0,116 \pm 0,02	0,038 \pm 0,01	0,14 \pm 0,03	0,052 \pm 0,01
Asn	12,32 \pm 2,17	3,07 \pm 0,44	0,062 \pm 0,01	0,020 \pm 0,00	0,07 \pm 0,01	0,028 \pm 0,01
Asp	199,05 \pm 42,81	22,73 \pm 3,42	0,997 \pm 0,21	0,152 \pm 0,02	1,23 \pm 0,31	0,207 \pm 0,03
Met	4,73 \pm 0,89	0,90 \pm 0,39	0,024 \pm 0,00	0,006 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,008 \pm 0,00
Glu	190,77 \pm 44,83	167,58 \pm 32,91	0,956 \pm 0,22	1,117 \pm 0,22	1,15 \pm 0,25	1,521 \pm 0,29
Phe	23,97 \pm 6,90	4,15 \pm 1,69	0,120 \pm 0,03	0,028 \pm 0,01	0,15 \pm 0,05	0,038 \pm 0,02
Gln	67,28 \pm 21,12	4,18 \pm 1,07	0,337 \pm 0,11	0,028 \pm 0,01	0,40 \pm 0,12	0,038 \pm 0,01
Orn	0,90 \pm 0,12	0,64 \pm 0,26	0,005 \pm 0,00	0,028 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	0,006 \pm 0,00
Lys	19,67 \pm 3,04	5,06 \pm 0,57	0,099 \pm 0,02	0,034 \pm 0,00	0,12 \pm 0,02	0,046 \pm 0,01
His	10,69 \pm 5,94	3,34 \pm 0,47	0,054 \pm 0,03	0,022 \pm 0,00	0,07 \pm 0,04	0,030 \pm 0,01
Tyr	9,49 \pm 1,92	4,16 \pm 1,65	0,048 \pm 0,01	0,028 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,038 \pm 0,02
Trp	12,10 \pm 5,98	0,86 \pm 0,32	0,061 \pm 0,03	0,006 \pm 0,00	0,07 \pm 0,04	0,008 \pm 0,00
Σ	1676,47 \pm 219,53	447,80 \pm 122,03	8,40 \pm 1,10	3,01 \pm 0,80	10,21 \pm 1,55	4,05 \pm 1,21

Aminosäuregehalt bezogen auf den Wasseranteil des Blattes berechnen. Hier unterscheiden sich Efeu und Rose im Gesamtaminosäureanteil nur noch um den Faktor 2,5 (Tabelle 3.6).

3.7.2 Blüten von *Hedera helix*

In Efeublüten wurde ein hoher Anteil an Prolin (75,5%) detektiert. Außerdem konnten Glutamin (9,4%), Asparagin (5,8%), Serin (1,7%) und die beiden Säuren Asparagin- (1,5%) und Glutaminsäure (2,5%) nachgewiesen werden. Alle anderen Aminosäuren waren nur in Spuren (> 1%) vorhanden (Abbildung 3.10).

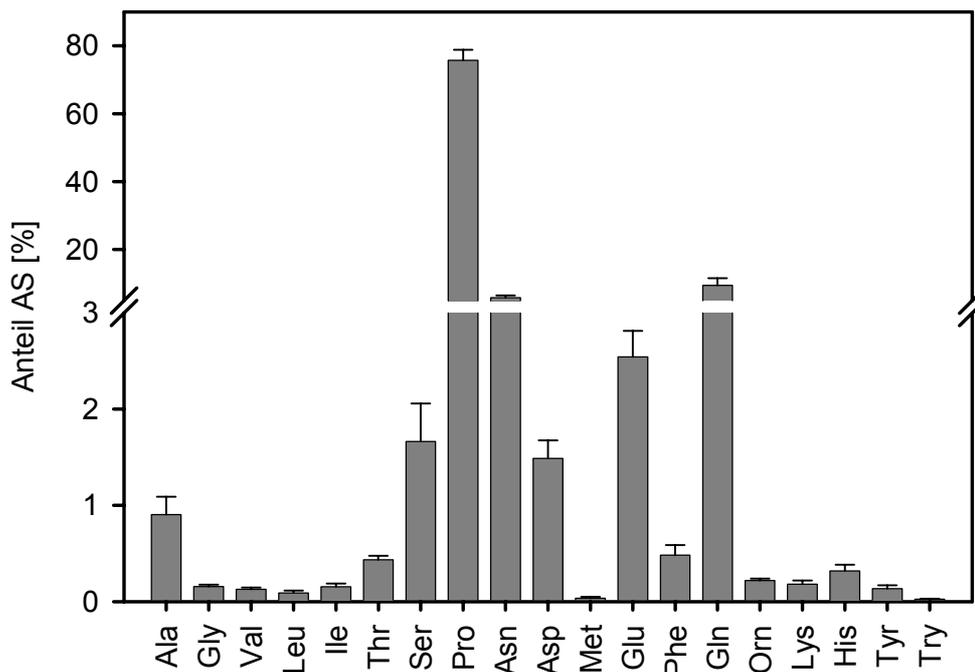


Abbildung 3.10: Verteilung der Aminosäuren (AS) in Blüten von *Hedera helix*

3.7.3 Aminosäuren auf der Blattoberfläche

Auf Efeublättern aus dem Freiland konnten alle Aminosäuren nachgewiesen werden, die auch im Blattgewebe gefunden wurden, wobei Prolin in hohen Mengen (57%) vorhanden war (Abbildung 3.11). Im Blattabwasch von Efeupflanzen, die im Gewächshaus angezogen wurden, waren ebenfalls alle Aminosäuren vorhanden, aber der Prolinanteil (14%) war hier deutlich reduziert (Abbildung 3.11).

Auch auf Blattoberflächen von Rosenpflanzen die im Gewächshaus angezogen wurden, konnten signifikante Mengen von Aminosäuren nachgewiesen werden (Abbildung 3.11).

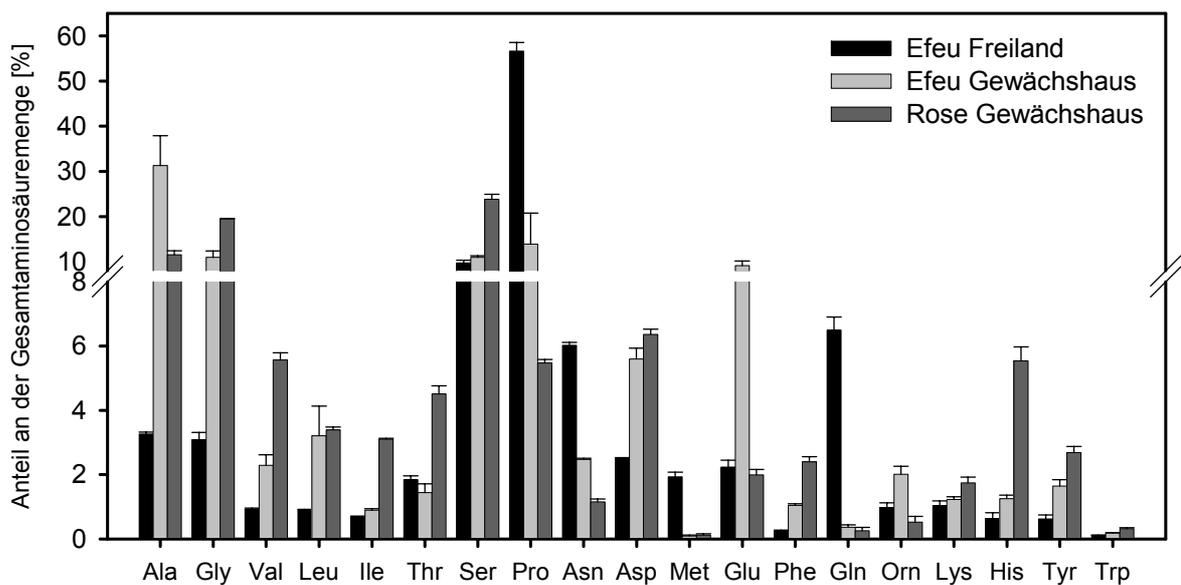


Abbildung 3.11: prozentuale Verteilung der Aminosäuren auf Blattoberflächen von Efeupflanzen aus dem Freiland, und Efeu- und Rosenpflanzen aus dem Gewächshaus.

3.8 Leachingexperimente

3.8.1 steady-state - Bedingungen

In *steady-state* Experimenten wurde unter kontrollierten und gleich bleibenden Bedingungen das Auswaschen (*Leaching*) von Aminosäuren aus intakten Blättern simuliert, indem Blätter kontinuierlich von einer Rezeptorlösung umgeben waren.

Nach einer Anlaufphase nahm die Menge der Aminosäuren in der Rezeptorlösung über die Zeit sowohl für die einzelnen Aminosäuren (Abbildung 3.12A) als auch für die Gesamtheit der Aminosäuren (Abbildung 3.12B) signifikant ($r^2 > 0,87$) zu. Im Vergleich der einzelnen Aminosäuren ergaben sich dabei unterschiedliche Flussraten (Abbildung 3.12A, Tabelle 3.7).

Für die adaxialen Seiten der Efeublätter lagen die gemessenen Flussraten zwischen $3,8 \times 10^{-13} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für Tryptophan und $1,55 \times 10^{-11} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für Serin. Beim *Leaching* aus abaxialen Seiten von Efeublättern wurden durchschnittlich 1,6mal höhere Flussraten gemessen, die zwischen $5,8 \times 10^{-13} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Tryptophan) und $3,11 \times 10^{-11} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Serin) lagen (Tabelle 3.7).

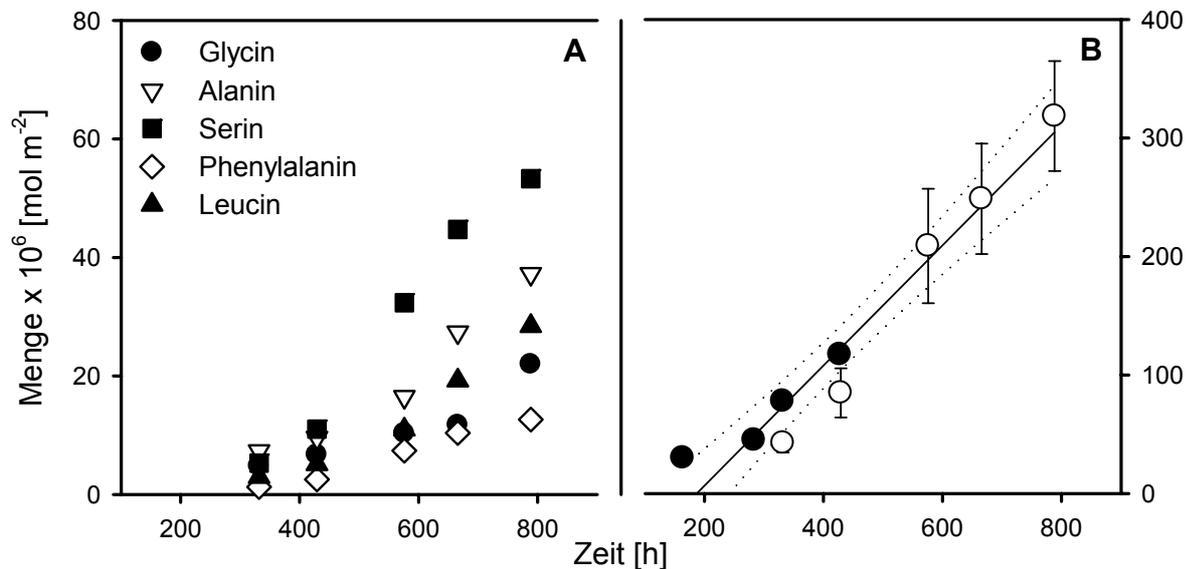


Abbildung 3.12: Zeitabhängigkeit der abgegebenen Aminosäuremenge pro m^2 Blattfläche (adaxial) beim Efeu am Beispiel von einzelnen Aminosäuren innerhalb einer Probe (A) und der Gesamtaminosäuremenge (B) als Mittelwert von 3 Ansätzen (weiße Symbole) und einem Einzelansatz (schwarze Symbole) deren Aminosäuregehalte zu unterschiedlichen Zeiten bestimmt wurden.

Bei den adaxialen Seiten der Rosenblättern variierten die gemessenen Flussraten für die einzelnen Aminosäuren ebenfalls über 2 Größenordnungen, zwischen $3,4 \times 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für Methionin und $2,13 \times 10^{-10} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für Serin (Tabelle 3.7). Die Aminosäureflussraten, die für abaxiale Seiten von Rosenblättern bestimmt wurden, lagen im Durchschnitt um das 1,2fache darüber (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Flussraten (F) für Aminosäuren die in *steady-state* Experimenten mit intakten Blättern von Efeu und Rose gemessen wurden (MW \pm 95% CI). $F_{ab} \times F_{ad}^{-1}$: Einfluss der Blattseite auf das Auswaschen der Aminosäuren.

AS	Efeu			Rose		
	$F \times 10^{12} [\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}]$		$F_{ab} \times F_{ad}^{-1}$	$F \times 10^{11} [\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}]$		$F_{ab} \times F_{ad}^{-1}$
	<i>ad</i> axial	<i>ab</i> axial		<i>ad</i> axial	<i>ab</i> axial	
Ala	8,72 \pm 2,38	15,19 \pm 2,60	1,74	13,61 \pm 1,10	17,20 \pm 2,05	1,26
Gly	5,48 \pm 1,09	9,35 \pm 0,82	1,70	1,58 \pm 0,23	1,98 \pm 0,39	1,26
Val	4,51 \pm 1,33	7,17 \pm 1,21	1,59	1,63 \pm 0,44	2,09 \pm 0,70	1,28
Leu	6,06 \pm 2,03	9,97 \pm 2,49	1,65	2,28 \pm 0,98	2,96 \pm 1,32	1,30
Ile	3,47 \pm 0,85	5,38 \pm 1,00	1,55	1,30 \pm 0,23	1,63 \pm 0,40	1,25
Thr	3,66 \pm 1,06	7,39 \pm 1,89	2,02	4,54 \pm 2,04	5,31 \pm 2,63	1,17
Ser	15,48 \pm 4,99	31,12 \pm 9,23	2,01	21,25 \pm 9,02	26,57 \pm 7,26	1,25
Pro	5,40 \pm 1,65	8,65 \pm 1,65	1,60	2,71 \pm 0,79	3,41 \pm 1,27	1,25
Asn	2,27 \pm 0,51	3,17 \pm 0,86	1,40	2,84 \pm 1,48	2,12 \pm 0,74	0,74
Asp	4,28 \pm 0,94	6,46 \pm 1,58	1,51	2,13 \pm 0,92	2,96 \pm 1,47	1,39
Met	1,36 \pm 0,40	2,83 \pm 0,99	2,09	0,34 \pm 0,07	0,37 \pm 0,14	1,08
Glu	1,85 \pm 0,48	2,14 \pm 0,45	1,16	1,69 \pm 0,82	2,12 \pm 1,07	1,25
Phe	3,49 \pm 0,97	5,95 \pm 1,23	1,71	2,47 \pm 1,25	2,90 \pm 1,55	1,17
Gln	2,23 \pm 0,96	2,85 \pm 0,74	1,27	0,65 \pm 0,37	0,91 \pm 0,55	1,39
Orn	0,53 \pm 0,18	0,87 \pm 0,24	1,63	0,46 \pm 0,15	0,46 \pm 0,29	1,01
Lys	3,66 \pm 1,00	5,64 \pm 1,53	1,54	3,05 \pm 1,56	3,59 \pm 1,95	1,18
His	0,62 \pm 0,14	1,08 \pm 0,11	1,75	0,63 \pm 0,34	0,64 \pm 0,32	1,01
Tyr	3,77 \pm 1,01	5,90 \pm 1,03	1,57	4,51 \pm 2,00	5,01 \pm 2,33	1,11
Trp	0,38 \pm 0,09	0,58 \pm 0,13	1,51	0,43 \pm 0,19	0,53 \pm 0,30	1,23

3.8.2 non-steady-state Bedingungen

Werden die kumulierten Aminosäuremengen, die auf den Blattoberflächen detektiert wurden, gegen die Zeit aufgetragen, so ergeben sich für die einzelnen Aminosäuren lineare Zusammenhänge (Abbildung 3.13) aus denen Flussraten zwischen $9,92 \times 10^{-15} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für Tryptophan und $1,02 \times 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für Alanin (Tabelle 3.8) resultieren. Diese sind abhängig von der entsprechenden Aminosäure zwischen 4 und 55mal niedriger als die Flussraten, die in steady-state Experimenten mit flüssigem Wasser als Rezeptor bestimmt wurden (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Flussraten der Aminosäuren, die für adaxiale Seiten von Efeublättern in der Klimakammer bei 70% Luftfeuchtigkeit und einem Licht-Dunkel-Verhältnis von 16H:8D bestimmt wurden (MW \pm 95% CI).

AS	$F \times 10^{12}$	Effekt	AS	$F \times 10^{12}$	Effekt
	[$\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	$F_{100\%} \times F_{70\%}^{-1}$		[$\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	$F_{100\%} \times F_{70\%}^{-1}$
Ala	$1,015 \pm 0,231$	8,6	Met	$0,035 \pm 0,006$	38,7
Gly	$0,551 \pm 0,158$	10,0	Glu	$0,389 \pm 0,072$	4,8
Val	$0,176 \pm 0,042$	25,7	Phe	$0,069 \pm 0,019$	50,8
Leu	$0,109 \pm 0,034$	55,6	Gln	$0,234 \pm 0,057$	9,5
Ile	$0,104 \pm 0,021$	33,5	Orn	$0,132 \pm 0,053$	4,0
Thr	$0,088 \pm 0,027$	41,8	Lys	$0,119 \pm 0,034$	30,7
Ser	$0,521 \pm 0,151$	29,7	His	$0,122 \pm 0,028$	5,1
Pro	$0,435 \pm 0,194$	12,4	Tyr	$0,125 \pm 0,044$	30,1
Asn	$0,089 \pm 0,024$	25,7	Trp	$0,010 \pm 0,004$	38,4
Asp	$0,171 \pm 0,033$	25,1			

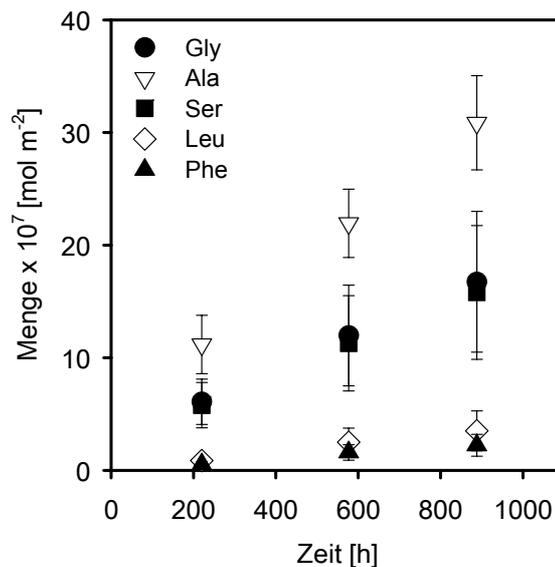


Abbildung 3.13: Zeitabhängigkeit der kumulierten Aminosäuremenge auf der Oberfläche von Efeublättern bei 70% Luftfeuchtigkeit am Beispiel von 5 Aminosäuren. (MW \pm Stabwa).

3.9 Visualisierung der kutikulären Eigenschaften

3.9.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von intakten Blättern

Die Visualisierung der Oberflächenstrukturen von Gefrierbrüchen von Efeublättern sollten Aufschluss darüber geben, wie die Kutikula mit der darunter liegenden Zellwand der Epidermiszellen assoziiert ist.

Die Kutikula ist der Schicht der unregelmäßigen Epidermiszellen aufgelagert, die fingerförmig ineinander verzahnt sind. Im Querschnitt sind nur Anschnitte der

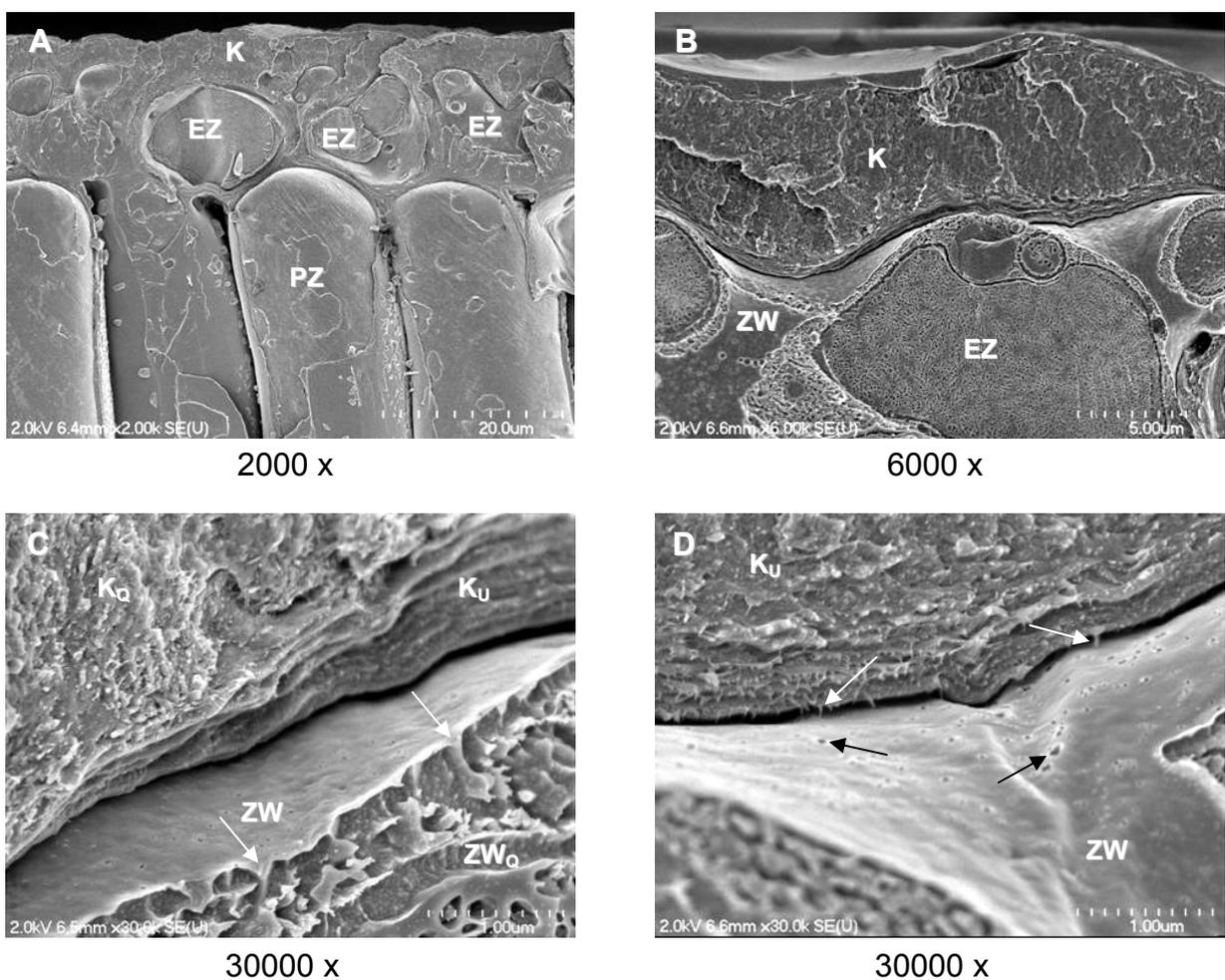


Abbildung 3.14: A: Bruchkante eines Efeublattes in 2000facher Vergrößerung. EZ: angeschnittene Epidermiszellen, K: Kutikula in die die Epidermiszellen eingelagert sind, PZ: Palisadenparenchymzelle. B: Bruchkante in 6000facher Vergrößerung. EZ: angeschnittene Epidermiszelle, K: Kutikula, ZW: Aufsicht auf die Zellwand der Epidermiszelle. C: Detailansicht der Verbindungsstelle zwischen Kutikula und Zellwand. Trichterförmige Vertiefungen in der Zellwand sind erkennbar (weiße Pfeile). KU: Unterseite der Kutikula die sich von der Zellwand abgehoben hat, KQ: Querschnitt der Kutikula, ZW: Aufsicht auf die Zellwand der Epidermiszelle, ZWQ: Querschnitt der Zellwand. D: Aufsicht auf die Zellwand der Epidermiszellen (ZW) und die Unterseite der Kutikula die sich von der Zellwand abgehoben hat (KU) In der Zellwand sind deutlich Löcher zu erkennen (schwarze Pfeile). Auf der Unterseite der Kutikula befinden sich Strukturen die mit den Löchern in der Zellwand assoziiert sind (weiße Pfeile).

Epidermiszellen zu erkennen. Darunter liegen die gleichmäßigen, senkrecht ausgerichteten Palisadenparenchymzellen (Abbildung 3.14 A). Die Dicke der Kutikula ist unregelmäßig und schwankt abhängig von der Position über der Epidermiszelle zwischen 3 und 7 μm (Abbildung 3.14 B). Bei 30000facher Vergrößerung sind in der Zellwand der Epidermiszellen Vertiefungen zu erkennen, die sich trichterförmig ins Zellwandinnere fortsetzen (Abbildung 3.14 C). Strukturen auf der Unterseite der Kutikula sind direkt mit diesen Vertiefungen assoziiert (Abbildung 3.14 D).

3.9.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Isolierten Kutikularmembranen

Die Visualisierung der Strukturen isolierter Kutikularmembranen im Rasterelektronenmikroskop sollte klären, in wie weit Unterschiede zwischen Kutikularmembranen von Efeu und Rose, die bei Permeations- und Sorptionsexperimenten gefunden wurden, auf struktureller Ebene erklärbar sind.

Die Oberflächenstrukturen der Kutikularmembranen von Efeu und Rose weisen eindeutige Unterschiede auf. Während der glatte Film beim Efeu nur durch einige schuppenförmige Strukturen aufgeraut wird, sind auf der Oberfläche von Rosenmembranen grobe, netzartige, dreidimensionale Strukturen zu erkennen (Abbildung 3.15).

Die Innenseiten der Kutikularmembranen weisen ebenfalls starke Unterschiede auf. Bei Kutikularmembranen von Efeu sind deutlich die Abdrücke der Epidermiszellen zu

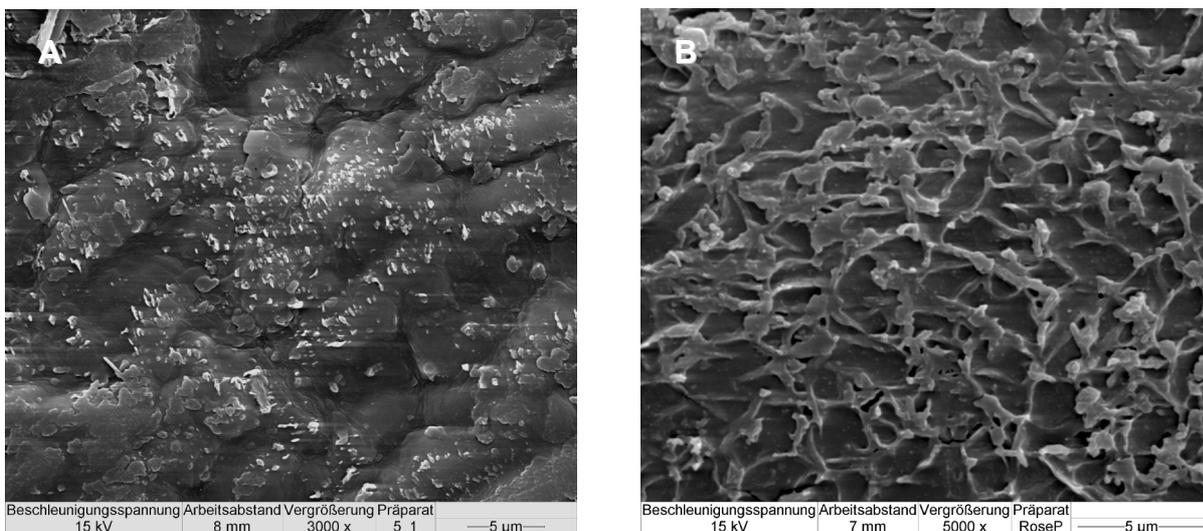


Abbildung 3.15: Oberflächenstrukturen von isolierten Kutikularmembranen von Efeu (A) und Rose (B).

erkennen, deren unregelmäßige Begrenzungen sich wie Puzzelteile ineinander fügen und Vertiefungen in der Kutikula hinterlassen haben (Abbildung 3.16A). Die Oberfläche wirkt rau und stark strukturiert (Abbildung 3.17A). Im Gegensatz dazu ist die Oberfläche der Innenseite der Rosenmembran einheitlich und wenig strukturiert. Die Abdrücke der regelmäßigen Begrenzungen der Epidermiszellen zeichnen sich schwach ab (Abbildung 3.16B).

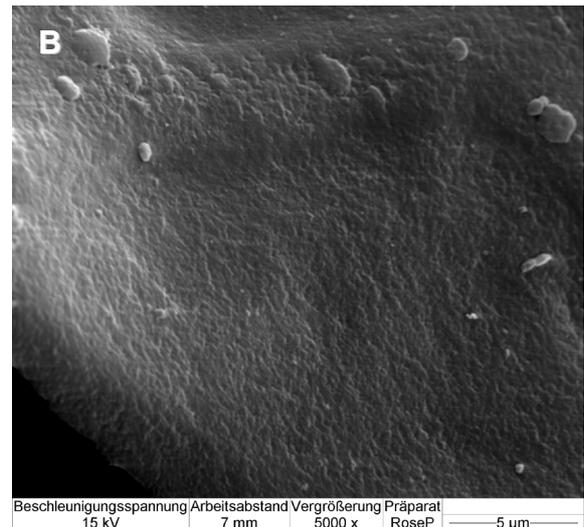
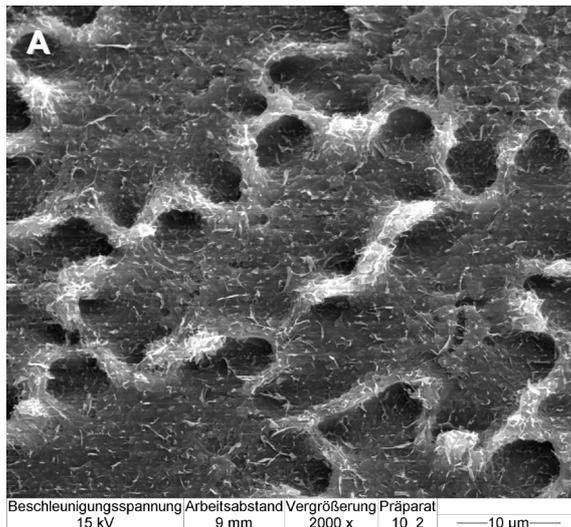


Abbildung 3.16: **A:** stark strukturierte Oberfläche der Innenseite einer Kutikularmembran von Efeu in 2000facher Vergrößerung. Deutlich zu erkennen sind die Abdrücke der Strukturen der Epidermiszellen. **B:** glatte Oberfläche der Innenseite einer Kutikularmembran der Rose in 5000facher Vergrößerung. Im oberen Teil ist eine leichte Verdickung der Kutikula zu erkennen, die im intakten System über den antiklinen Zellwänden der Epidermiszellen lokalisiert war.

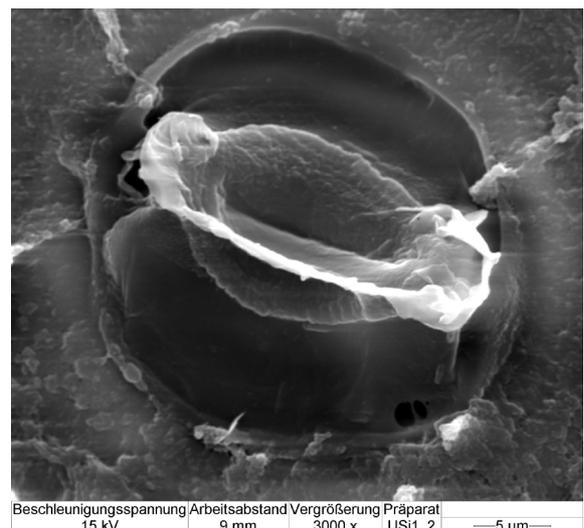
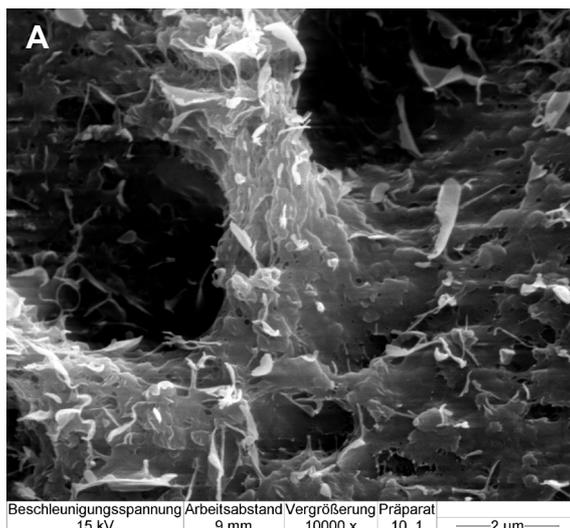


Abbildung 3.17: **A:** Detailansicht der Innenseite einer isolierten Kutikularmembran von Efeu in 10000facher Vergrößerung. **B:** Abdruck einer Spaltöffnung von der Innenseite einer isolierten Kutikularmembran von Efeu betrachtet. Deutlich erkennbar sind die bohnenförmigen Abdrücke der Schließzellen und die Wachsschicht die sich durch den Spalt der Schließzellen bis ins Innere der stomatären Höhle zieht.

Auch im Querschnitt der Kutikularmembranen von Efeu und Rose sind deutliche Unterschiede erkennbar. Während die Dicke der Efeumembran abhängig von der Position über den anti- oder periklinen Zellwänden der Epidermis stark variiert (3 bis 7 μm), hat die Rosenmembran eine einheitliche Dicke von ca 1,3 μm (Abbildung 3.18). Die Bruchkanten der Membranen wirken amorph und es sind keine distinkten Strukturen erkennbar. Bei der Visualisierung der Kutikularmembran von Efeu fiel eine Stelle auf, an der das Zellwandmaterial nicht vollständig verdaut war. Hier sind deutlich fädige Strukturen zu erkennen, die das Zellwandmaterial mit der Kutikula verbinden (Abbildung 3.19). Der Durchmesser dieser Stränge liegt im Bereich zwischen 10 und 100 nm.

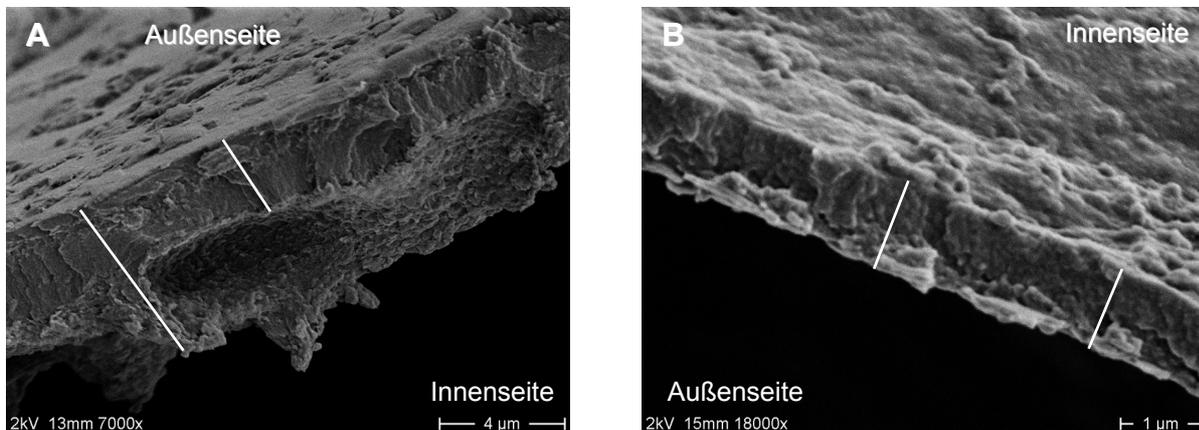


Abbildung 3.18: Querschnitte isolierter Kutikularmembranen von Efeu (A) und Rose (B). Die weißen Linien sollen die unterschiedliche Dicke der Kutikula an verschiedenen Stellen verdeutlichen

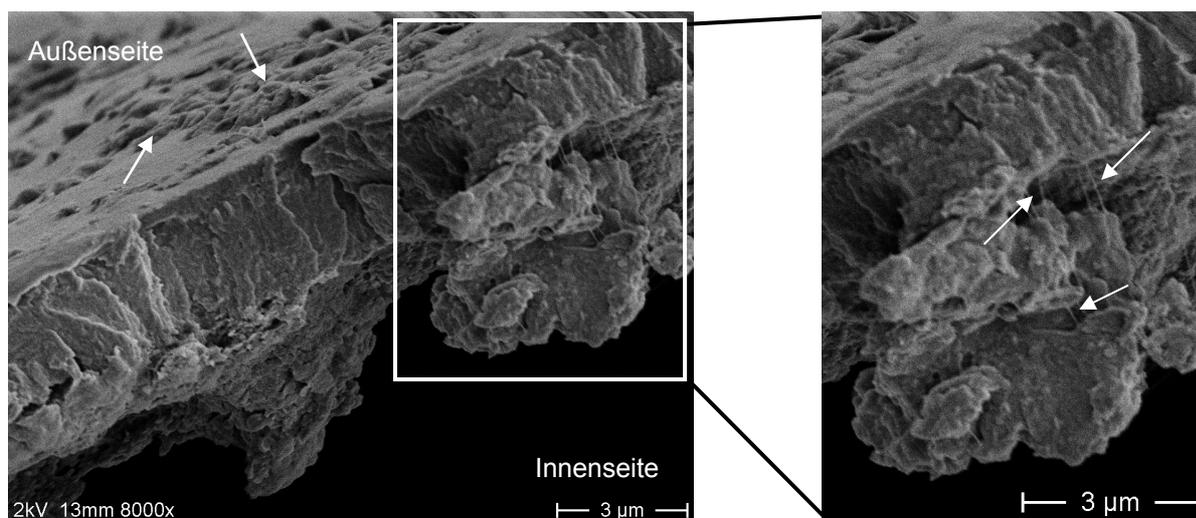


Abbildung 3.19: links: Bruchkante einer isolierten Kutikularmembran von Efeu. Auf der Außenseite sind Wachsaggregate zu erkennen (Pfeile). Rechts: Vergrößerung der Stelle an der das Zellwandmaterial nicht komplett verdaut ist. Die Pfeile zeigen Stränge an, die das Zellwandmaterial mit der Kutikula verbinden.

3.9.3 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von isolierten Kutikularmembranen

Anhand von Doppelfärbungen mit einem lipophilen und einem amphiphilen Fluoreszenzfarbstoff konnte die Heterogenität von Kutikularmembranen nachgewiesen werden.

Im Scan durch die Kutikularmembran von Efeu sind dabei deutlich unterschiedlich gefärbte Strukturen zu erkennen (Abbildung 3.20). Auf der physiologischen Außenseite befindet sich eine zusammenhängende Schicht, die durch das FM4-64

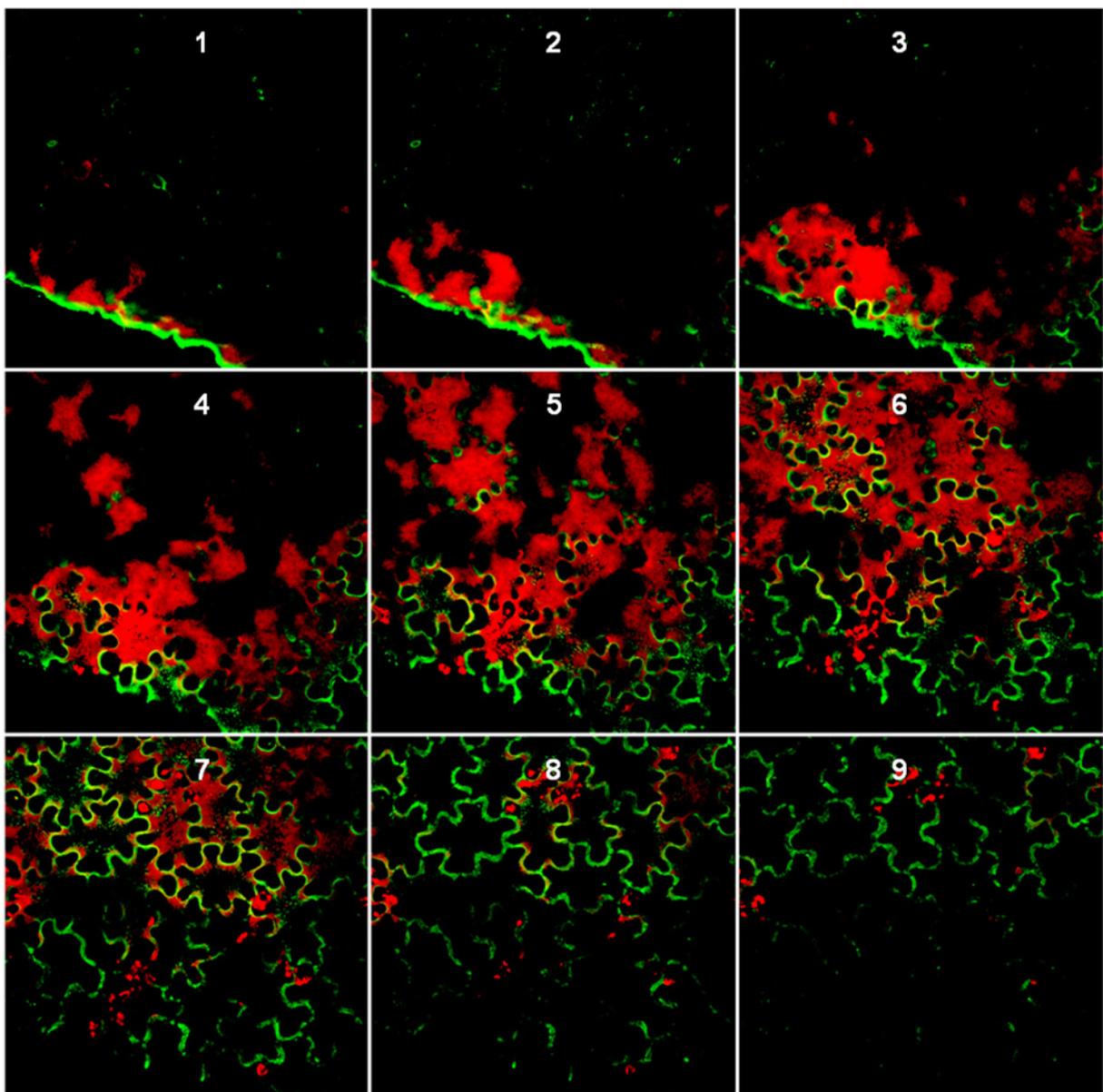


Abbildung 3.20: horizontaler Scan durch eine gefärbte Efeumembran von der physiologischen Außenseite (1) bis hin zur physiologischen Innenseite (9). rot: FM4-64, grün: BODIPY® FL C₁₂-sphingomyelin. Von der Außen- zur Innenseite ist ein deutliches Rot-Grün Gefälle zu erkennen, wobei der rot gefärbte Bereich eine durchgehende Schicht auf der Außenseite bildet, während in grün klar definierte Strukturen abgebildet sind.

rot angefärbt wird. Zum inneren Teil der Membran werden grüne Strukturen sichtbar, die die Umrandungen der Epidermiszellen widerspiegeln.

Bei der Kutikularmembran der Rose bietet sich ein ähnliches Bild. Die rot gefärbten Bereiche bilden auf der Oberfläche der Membran eine durchgehende Schicht, während die grün gefärbten Strukturen zur Innenseite der Membran die Grenzen der Epidermiszellen abbilden. Die Teile der Kutikula, die über den antiklinalen Zellwänden der Epidermis liegen, sind dabei etwas vertieft, da diese Strukturen in beiden Färbungen erst in tieferen Ebenen sichtbar werden. Sowohl beim Efeu als auch bei der Rose gibt es kaum eine Überlagerung der beiden unterschiedlichen Farbstoffe.

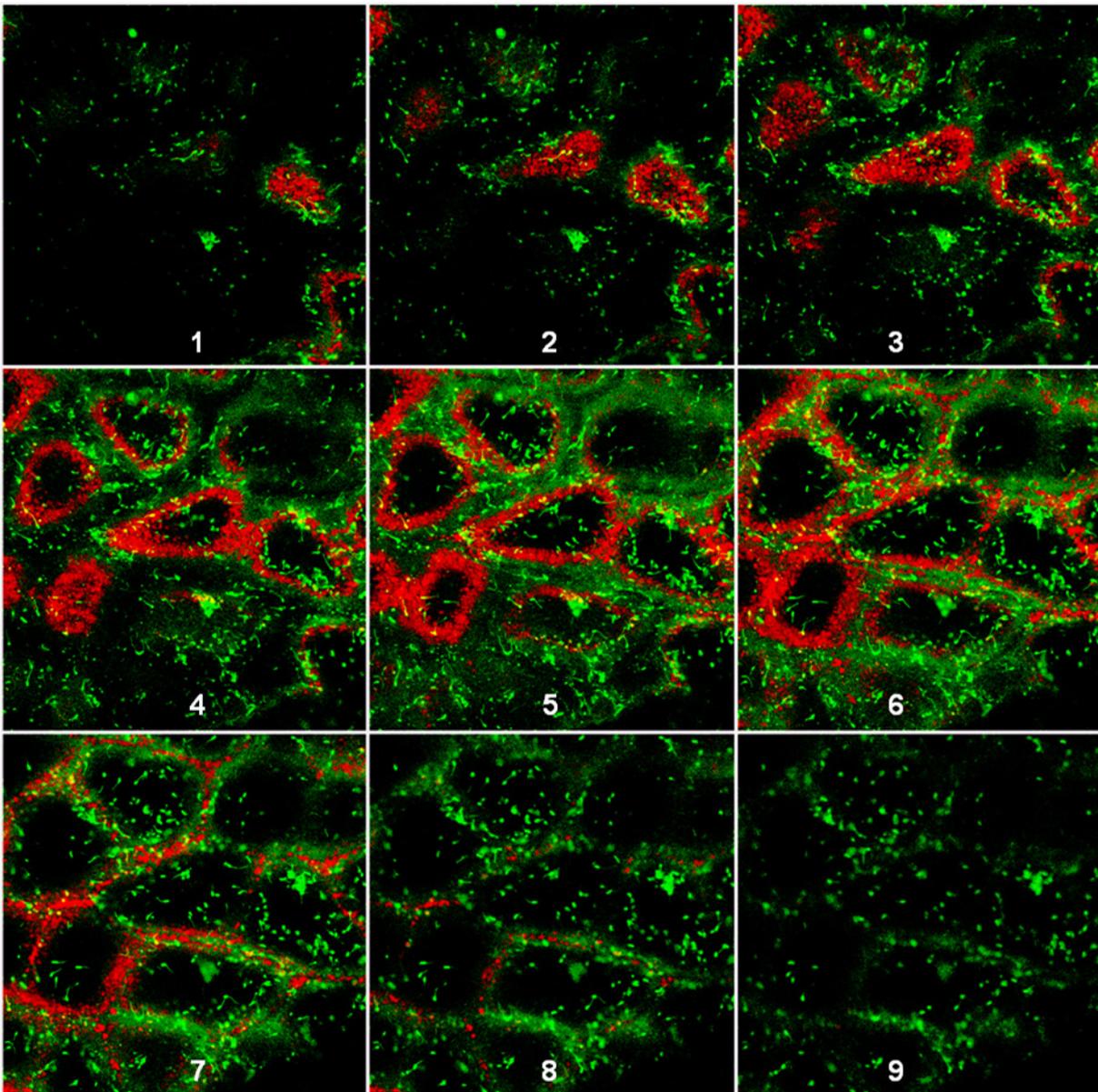


Abbildung 3.21: horizontaler Scan durch eine gefärbte Rosenmembran von der physiologischen Außenseite (1) bis hin zur physiologischen Innenseite (9). rot: FM4-64, grün: BODIPY® FL C₁₂-sphingomyelin. Deutlich erkennbar ist ein Rot-Grün Gefälle von der Außen- zur Innenseite und die Begrenzungen der Epidermiszellen die unterhalb der Kutikula gelegen haben.

4 Diskussion

4.1 Etablierung der Methoden

4.1.1 Permeation vs. UDOS und SOFU

Um Permeationseigenschaften von Kutikularmembranen für unterschiedliche Substanzen, oder von unterschiedlichen Pflanzenarten vergleichbar zu machen, ist es sinnvoll, Leitwerte in einem geschlossenen System unter kontrollierbaren und vergleichbaren Bedingungen zu bestimmen (*steady-state*). Ein Zweikammersystem, bei dem die isolierte Kutikula als permeable Membran das Donor- und Rezeptorkompartiment voneinander trennt, hat sich hierfür etabliert (Schönherr, 1976; Kerler *et al.*, 1984; Schreiber *et al.*, 1995). Dabei wird die Donorlösung in einer so hohen Konzentration eingesetzt, dass es während des gesamten Experimentes nicht zu einer signifikanten Abnahme im Donor kommt, und die Treibende Kraft konstant bleibt. Des Weiteren ist die Fläche der Kutikularmembran, über die tatsächlich die Permeation stattfindet bekannt, und bleibt ebenfalls während des gesamten Experimentes unverändert.

Für sehr lipophile Substanzen mit hohen Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten ist allerdings zu beachten, dass die Stoffe in hohem Maß in der Kutikula akkumulieren können, was bei der Quantifizierung der geflossenen Stoffmenge in nur einem Kompartiment (Abnahme im Donor oder Zunahme im Rezeptor) zu verfälschten Leitwerten führen kann (Kerler *et al.*, 1984). Deshalb wurde für lipophile Substanzen die UDOS-Methode (unilateral desorption from the outer surface) entwickelt, bei der Tropfen der zu untersuchenden Substanz auf die morphologische Innenseite der Kutikula aufgetragen werden. Während das Lösungsmittel verdampft, wird die lipophile Substanz quantitativ in die Kutikula absorbiert und kann auf der Außenseite wieder desorbiert werden. Aus der desorbierten Menge und der verbleibenden Menge in der Kutikula kann dann eine Geschwindigkeitskonstante als Maß für die Permeabilität bestimmt werden (Bauer & Schönherr, 1992; Schönherr & Bauer, 1994; Baur *et al.*, 1996; Buchholz *et al.*, 1998).

Sehr hydrophile Substanzen akkumulieren bei Permeationsexperimenten nicht in signifikanten Mengen in der Kutikula, allerdings besteht hier die Schwierigkeit die sehr geringen Substanzmengen, die die Kutikula permeieren, zuverlässig zu quantifizieren.

Um die geflossene Stoffmenge zu erhöhen, wurden kutikuläre Permeabilitäten für Elektrolyte oder andere polare Substanzen deshalb in der Vergangenheit mit der SOFU-Methode (simulation of foliar uptake) bestimmt (Schönherr & Baur, 1994, Schönherr & Schreiber, 2004b; Schlegel *et al.*, 2005). Die hochkonzentrierte Donorlösung wird in Form von Tröpfchen auf die morphologische Außenseite der Kutikula oder die ganzen Blätter appliziert, so dass eine maximale treibende Kraft zu erwarten ist. Hierbei können Situationen simuliert werden, die sich bei der Blattapplikation von Dünge- oder Pflanzenschutzmitteln im Feld einstellen und Voraussagen über die Aufnahme und Effektivität bestimmter Wirkstoffe oder Formulierungen getroffen werden. Zur mechanistischen Aufklärung der Beschaffenheit des polaren Weges ist diese Methode allerdings weniger geeignet, da sich während eines Versuches nahezu alle Parameter, die für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante einfließen, ändern und diese Änderungen nicht eindeutig zu jedem Zeitpunkt bestimmt werden können. Bei 100% Luftfeuchtigkeit nimmt die Konzentration im Donortropfen, welche die treibende Kraft für die Diffusion darstellt, mit der Zeit ab, weil signifikante Mengen die Kutikula permeieren und die initiale Substanzmenge im Donor limitiert ist. Somit nimmt die Treibende Kraft über die Dauer des Versuches ab.

Bei niedrigeren Luftfeuchtigkeiten verdunstet das Lösungsmittel aus dem applizierten Tropfen, was in der Anfangszeit zu einer Aufkonzentrierung des gelösten Stoffes und somit zu einer Erhöhung der treibenden Kraft führt. Beim Eintrocknen ändert sich aber gleichzeitig auch die Kontaktfläche zwischen Tropfen und Kutikula, die für die Diffusion zur Verfügung steht.

Abhängig von den hygroscopischen Eigenschaften der gelösten Substanzen sind unterschiedlich hohe Luftfeuchtigkeiten nötig, um ein Auskristallisieren auf der Oberfläche zu verhindern, was zu einem Stillstand der Diffusion führen würde. Dabei ist der POD (point of deliquescence) - also die Luftfeuchtigkeit, bei der ein auskristallisiertes Salz wieder in Lösung geht - nicht allein von der Substanz, sondern auch von der Größe der Kontaktfläche zwischen Untergrund und den Kristallen (Russel & Ming, 2002), und ebenso von der Temperatur (Tang & Munkelwitz, 1993)

abhängig. Somit kann bei SOFU Experimenten nicht eindeutig differenziert werden, ob ein gemessener Effekt tatsächlich auf die Eigenschaften des kutikulären Transportweges, oder auf eine nicht quantifizierbare Modifikation der physikalischen Größen, die für die Berechnung zu Grunde liegen, zurückzuführen sind.

Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit Leitwerte für die Aminosäuren in einem geschlossenen System unter *steady-state* Bedingungen bestimmt.

4.1.2 Quantifizierung hydrophiler Modellschubstanzen

Die radioaktive Detektion der Versuchssubstanzen hat sich im Laufe der Jahre als Methode der Wahl etabliert. Für lipophile Substanzen mit hohen Leitwerten ist diese Methode zuverlässig, da eine vergleichsweise große Menge Substanz im Rezeptor oder in der Kutikula vorhanden ist, die detektiert werden kann. Um ein zuverlässiges Ergebnis bei der Szintillationsmessung zu erzielen, sollten dabei mindestens

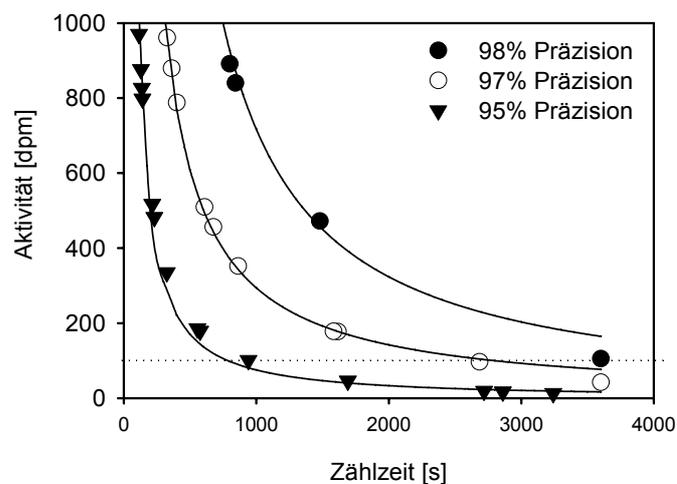


Abbildung 4.1: Zusammenhang zwischen der Aktivität einer Probe (^{14}C -Leucin) und der benötigten Zählzeit im Szintillationszähler um eine Präzision von 98%, 97% oder 95% zu erreichen (eigene Messreihe).

100 dpm (1,67 Bq) im Rezeptor gemessen werden. Grundsätzlich ist es sinnvoll so lange zu messen, bis der Messfehler unter 5% oder besser unter 3% liegt. Je geringer dabei die Aktivität in der Probe ist, desto mehr Zeit ist nötig um die gewünschte Genauigkeit zu erzielen. Zwischen der Aktivität und der benötigten Zählzeit besteht dabei ein exponentieller Zusammenhang (Abbildung 4.1).

Anhand einer Beispielrechnung soll hier veranschaulicht werden, welche Bedeutung das für den Einsatz von radioaktiv markierten, hydrophilen Substanzen bei der Messung kutikulärer Permeationen hat:

Bei Permeationsversuchen unter *steady-state* Bedingungen soll der Receiver 1mal pro Tag gemessen werden, wobei eine Aktivität von 100 dpm (1,67 Bq) nicht unterschritten werden soll, um ein eindeutiges Ergebnis bei der Szintillationszählung zu erhalten. Damit muss also die Flussrate bei mindestens 100 dpm pro Tag, oder

0,00115 dpm s⁻¹ ($1,9 \times 10^{-5}$ Bq s⁻¹) liegen. Die Fläche der Kutikula, die in den Kammern für die Permeation zur Verfügung steht, beträgt $1,13 \times 10^{-4}$ m². Für die Berechnung soll ein hypothetischer Leitwert der polaren Substanz in der Größenordnung von $P = 10^{-10}$ m s⁻¹ angenommen werden. Werden diese Werte in Gleichung 1.4 eingesetzt, so kann man den Konzentrationsgradienten abschätzen, der nötig ist, um unter den vorliegenden Bedingungen eine Flussrate von mindestens 100 dpm pro Tag zu erreichen. Dabei wäre es notwendig bei einem Volumen von 1ml pro Kammer eine Gesamtmenge von 1×10^7 dpm ($1,7 \times 10^5$ Bq) im Donor einzusetzen. Die Reinheit der kommerziell erwerbbaaren, radioaktiv markierten Substanzen liegt in der Regel zwischen 95% und 99%, wobei die Identitäten der Verunreinigungen nicht bekannt sind. Eine 1%ige Verunreinigung mit einer Substanz, deren kutikulärer Leitwert 2 Größenordnungen ($P = 10^{-8}$ m s⁻¹) über dem der tatsächlich zu untersuchenden Substanz liegt, würde die gemessene Flussrate verdoppeln, da hier in der vorliegenden Zeitspanne die gleiche Menge permeiert, wie von der eigentlichen, hydrophileren Substanz. Im Szintillationszähler kann allerdings nur die Gesamtaktivität in der Probe gemessen werden, die sich aus der Aktivität des polaren, zu untersuchenden Stoffes und der lipophilen Verunreinigung zusammensetzt. Damit würde die Permeabilität für den hydrophilen Stoff überschätzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine alternative Detektionsmethode zur Szintillationszählung benutzt.

Mit der gaschromatographischen Detektion können die einzelnen Substanzen exakt einem Peak zugeordnet werden, so dass mögliche Verunreinigungen in der Probe das Ergebnis nicht beeinflussen. Die verwendete Methode bietet hierbei eine sehr hohe Reproduzierbarkeit, da die Retentionszeiten der einzelnen Aminosäuren und die Abstände zwischen den Peaks sehr konstant sind. Außerdem lassen sich mit dieser Methode Konzentrationen bis in den pmol Bereich messen.

Trotzdem mussten relativ große Zeitabstände (im Bereich von Tagen) zwischen den einzelnen Messungen berücksichtigt werden, um in den Rezeptorlösungen signifikante Mengen von Aminosäuren nachweisen zu können.

4.2 Membranpotential.

Bei der Permeation von Ionen durch Membranen entlang eines Konzentrationsgradienten, können unter bestimmten Umständen elektrische Potentiale über der Membran entstehen (Nobel, 1991). Dieses Membranpotential kommt dann zu Stande, wenn die Innen- und Außenlösungen unterschiedliche Ionenkonzentrationen aufweisen und die trennende Membran eine selektive Leitfähigkeit für die unterschiedlichen Ionensorten besitzt (Helfferich, 1962). Ist die Membran permeabel für verschiedene Ionensorten, so lässt sich das Membranpotential anhand der Goldman-Gleichung errechnen (Lüttge, 1973):

$$\Delta E = -\frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{A^+} \cdot [A^+]_i + P_{B^+} \cdot [B^+]_i + P_{C^-} \cdot [C^-]_i}{P_{A^+} \cdot [A^+]_a + P_{B^+} \cdot [B^+]_a + P_{C^-} \cdot [C^-]_a} \right) \quad (4.1)$$

Dabei sind P_{A^+} , P_{B^+} und P_{C^-} die Permeabilitätskoeffizienten für die Kationen (A^+ , B^+) und die Anionen (C^-), und $[A^+]$, $[B^+]$ bzw. $[C^-]$ die entsprechenden Ionenkonzentrationen in der Innen- (i) und der Außenphase (a). Außerdem fließen für die Berechnung die allgemeine Gaskonstante (R), die absolute Temperatur in Kelvin (T) und die Faraday-Konstante (F) ein.

Oft wird anstelle der Permeabilitätskoeffizienten die relative Permeabilität eines Ions im Vergleich zu einem anderen Ion angegeben:

$$\alpha = \frac{P_{B^+}}{P_{A^+}}; \quad \beta = \frac{P_{C^-}}{P_{A^+}} \quad (4.2)$$

wodurch die einfachere Form:

$$\Delta E = -\frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[A^+]_i + \alpha [B^+]_i + \beta [C^-]_i}{[A^+]_a + \alpha [B^+]_a + \beta [C^-]_a} \right) \quad (4.3)$$

entsteht. Die Gleichung lässt sich bei Beteiligung von zusätzlichen Ionen beliebig erweitern.

Die Umstände die zu teilweise erheblichen, elektrischen Potentialen über Kutikularmembranen führen können, wurden von Tyree et. al. (1990) beschrieben. Dabei nimmt der Betrag des Membranpotentials exponentiell mit zunehmendem Konzentrationsunterschied der Ionen auf der Außen- und Innenseite zu. Eine Zunahme der Ionenstärke in den beiden Außenlösungen bewirkt hingegen eine Abnahme des elektrischen Signals.

Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen waren die Ionenkonzentrationen der Lösungen (H^+ , Cl^- , Na^+ , OH^-) auf beiden Seiten der Membranen vergleichsweise hoch (100mM) während die Aminosäurekonzentration im Donor eine Größenordnung niedriger (10mM) war. Der Konzentrationsunterschied aller Ionen liegt damit nahe 1, was zu einem vernachlässigbaren Membranpotential führen sollte (Tyree *et al.*, 1990).

Bei pH 6 permeieren die Aminosäuren als Zwitterionen. Hier muss also kein Ladungsausgleich stattfinden um die Elektroneutralität zu bewahren.

Bei pH 1 können die Ladungsunterschiede, die bei der Permeation der Aminosäure-Kationen entstehen durch die Gegenpermeation der viel kleineren Protonen, die im Überschuss vorhanden sind, ausgeglichen werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Permeabilität von Lipidmembranen für Protonen mindestens 4 Größenordnungen über der für anorganische, monovalente Ionen liegt (Deamer & Nichols, 1989). Da für die Aminosäuren keine vergleichbaren Angaben in der Literatur zu finden sind, wird für die Berechnung davon ausgegangen, dass diese die Membran höchsten so schnell permeieren, wie die monovalenten, anorganischen Ionen (z.B. Cl^-). Damit ergibt sich aus Gleichung 4.3:

$$\Delta E = - \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\left[0,01 \frac{\text{mol}}{\text{l}} AS^+ \right]_i + 1 \times 10^4 \left[0,1 \frac{\text{mol}}{\text{l}} H^+ \right]_i + \left[0,1 \frac{\text{mol}}{\text{l}} Cl^- \right]_i}{\left[0 \frac{\text{mol}}{\text{l}} AS^+ \right]_a + 1 \times 10^4 \left[0,1 \frac{\text{mol}}{\text{l}} H^+ \right]_a + \left[0,1 \frac{\text{mol}}{\text{l}} Cl^- \right]_a} \right)$$

$$\Delta E = - \frac{8,315 \frac{\text{J}}{\text{mol K}} \cdot 298 \text{ K}}{96\,485 \frac{\text{C}}{\text{mol}}} \ln(1,00001)$$

ein vernachlässigbares Membranpotential von maximal $\Delta E = - 2,6 \times 10^{-3}$ mV. Auch Tyree *et al.* (1990) haben bei vergleichbarem Konzentrationsunterschied und vergleichbarer Ionenstärke ähnlich niedrige Werte gemessen.

Membranpermeabilitäten für Hydroxidionen sind zwar nicht bekannt, aber der Transport von Hydroxidionen in wässrigen Lösungen ist unverhältnismäßig schnell im Vergleich zu anderen Ionen, da die Ladung einfach an benachbarte Wassermoleküle weitergegeben werden kann, ohne dass sich das betreffende Molekül bewegen muss (Aziz *et al.*, 2008). Die entstehenden Ladungsunterschiede bei der Permeation von anionischen Aminosäuren bei pH 11 können also leicht durch die kleinen Hydroxidionen ausgeglichen werden.

In Abwesenheit eines Membranpotentials permeieren die Aminosäuren somit entlang des Konzentrationsgradienten und Gleichung 1.4. kann für die Berechnung der Leitwerte herangezogen werden.

4.3 Lipophilie der Aminosäuren

Eine wichtige Voraussetzung für die Permeation von Substanzen über Membranen ist die Löslichkeit der Substanz innerhalb der Membran (Wijmans & Baker, 1995). Nur wenn eine Verteilung zwischen der wässrigen Donorphase und der lipophilen Membran – im speziellen Fall der Kutikula - stattfindet, kann die Substanz die Membran auch permeieren.

Der dimensionslose Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{OW}) definiert die Lipophilie und damit die Membranlöslichkeit einer Substanz (Leo *et al.*, 1971) und kann aus der chemischen Struktur abgeschätzt werden (Moriguchi, 1992; Leo, 1993). Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Aminosäuren wurden sehr niedrige Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten errechnet, die für die einzelnen Aminosäuren stark variieren (Tabelle 2.1). Für Aminosäuren mit unpolare Seitenkette gibt es in jedem pH Bereich einen linearen, positiven Zusammenhang zwischen dem Molvolumen und dem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten, der mehrere Größenordnungen umfasst (Abbildung 4.2). Glycin als kleinste Aminosäure repräsentiert das hydrophile, geladene Grundgerüst, welches allen Aminosäuren gemeinsam ist. Die Masse, und demzufolge auch das Volumen der Aminosäuren,

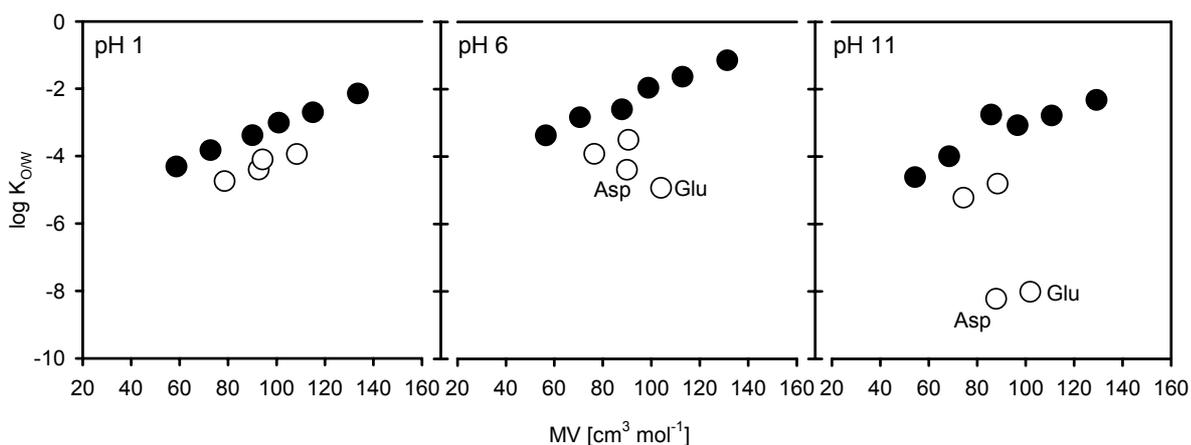


Abbildung 4.2: Zusammenhang zwischen dem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{OW}$) und dem entsprechenden Molvolumen der Aminosäuren mit unpolare (schwarze Symbole) und polare Seitenkette (weiße Symbole) bei pH 1, pH 6 und pH 11.

expandiert jeweils durch die Addition lipophiler Methylgruppen (bzw. Phenylgruppen bei Phenylalanin (Abbildung 2.2), die die hydrophilen Eigenschaften des Grundgerüsts abschwächen und somit die Lipophilie erhöhen. Bei Aminosäuren mit zusätzlichen, polaren Substituenten in der Seitenkette wird der hydrophile Charakter verstärkt, weswegen sie niedrigere Verteilungskoeffizienten aufweisen. Besonders deutlich wird dieser Effekt bei den beiden Säuren Asparagin- und Glutaminsäure. Die Carboxylgruppe in der Seitenkette dissoziiert im basischen pH Bereich, was die ohnehin geringe Löslichkeit in einer lipophilen Phase noch einmal stark erniedrigt (Abbildung 4.2).

4.4 Eigenschaften der Kutikula von *Hedera helix*

4.4.1 Wassersorption

Bei der gravimetrischen Bestimmung der kutikulären Komponenten konnte für Efeumembranen zusätzlich zum Kutin und den Wachsen eine Fraktion hydrolysierbarer Substanzen nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.1). Bei den hydrolysierbaren Bestandteilen handelt es sich um Polysaccharide und kristalline Zellulose (Riederer & Schönherr, 1984), die eine Hydratisierung der Kutikula bewirken (Chamel *et al.*, 1991; Dominguez & Herédia, 1999).

Maréchal und Chamel (1996, 1997) konnten mit Hilfe der Infrarotspektroskopie zeigen, dass Wassermoleküle in Kutikularmembranen hauptsächlich über Wasserstoffbrücken mit Hydroxygruppen der Polysaccharide oder Carbonylgruppen des Kutingerüsts assoziiert sind. Die sorbierten Wassermoleküle bilden so einen wässrigen Pfad innerhalb der Kutikula (Luque *et al.*, 1995). Dabei liegt das Wasser in zwei verschiedenen Konfigurationen vor.

Flüchtige Wassermoleküle (i), die nur über eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Kutikula assoziiert sind, befinden sich im Gleichgewicht mit den Wassermolekülen in der Atmosphäre, wobei es für die Transpiration durch isolierte Kutikularmembranen keinen Unterschied macht, von welcher Seite aus die Hydratation stattfindet (Abbildung 3.4). Eingebettete Wassermoleküle (ii) hingegen sind über zwei bis drei Wasserstoffbindungen fest in das Netzwerk der Kutikula eingebettet und können selbst bei Temperaturen um 100°C nicht evaporieren.

Die Wassermenge, die hier von Efeumembranen aus der flüssigen Wasserphase bei pH 6 sorbiert wurde (14%, Abbildung 3.8A), stimmt gut mit den bereits für gasförmiges Wasser bestimmten Werten überein (11% für Efeu, Kerstins & Lenzian, 1989). In Abhängigkeit des pH Wertes konnte im System mit flüssigem Wasser ein Anstieg der Wassersorption beobachtet werden (Abbildung 3.8A), der sich unter Berücksichtigung der Titrationskurve für Kutikularmembranen erklären lässt. Innerhalb des Bereiches zwischen pH 6 und pH 8 puffern die Efeumembranen zugeführte OH⁻-Ionen ab (Abbildung 3.2A). Funktionelle Gruppen in der Kutikula dissoziieren und geben dabei H⁺-Ionen ab, die die OH⁻-Ionen neutralisieren. Dabei entstehen innerhalb der Kutikula negative Ladungen, die auf Grund der Vernetzung der aliphatischen Ketten fest an die Matrix gebunden sind. Eine gegenseitige

Abstoßung dieser gleichgerichteten Ladungen bewirkt einen erhöhten Wassereinstrom und somit eine Schwellung der polaren Kompartimente (Abbildung 3.8). Infolgedessen sollte die Wasserpermeabilität der Kutikula mit steigendem pH Wert ansteigen, was wiederum in Transpirationsversuchen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.4).

4.4.2 Donnan ausschluss

Bei Ionenaustauschermembranen mit fest gebundenen Ladungen, entsteht durch die Ungleichverteilung von Co- und Counterionen in der Außenlösung ein Donnanpotential, das die mobilen Ionen mit gleichgerichteter Ladung wie in der Membran vorhanden, daran hindert, diese zu permeieren (Helfferich, 1962).

Auf Grund der Tatsache das innerhalb der Kutikula dissoziierbare Gruppen vorhanden sind, die bei pH 11 negative Ladungen exponieren, ist also davon auszugehen, dass die negativ geladenen Aminosäuren bei pH 11 von einer Permeation ausgeschlossen sind. Mobile Kationen akkumulieren in Bereichen mit hoher Konzentration an gebundenen, negativen Ladungen. Die entstehende

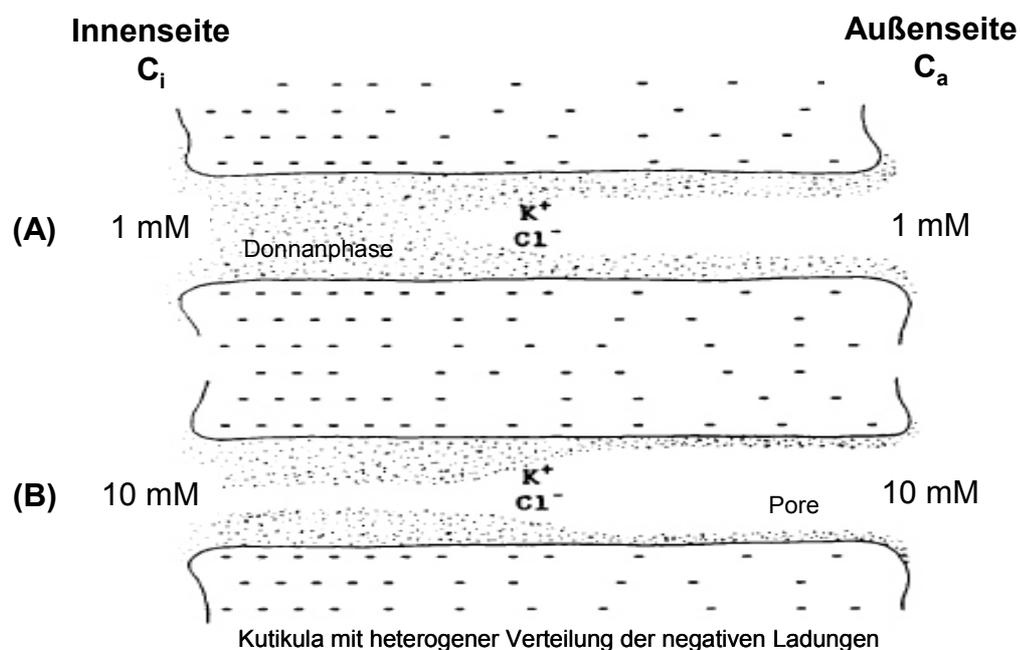


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Donnanphase innerhalb der Kutikula unter dem Einfluss verschiedener Ionen-Konzentrationen in der Außenphase (verändert nach: Tyree, 1990)

Doppelschicht kann dabei überlappen, und die Anionen vollständig ausschließen (Donnanphase, Abbildung 4.3A).

Aus dem Titrationsexperiment (Abbildung 3.2A) lässt sich bei pH 11 eine Ionenaustauscherkapazität von 260 meq pro Kilogramm Kutikula abschätzen. Ähnliche Werte wurden auch für Matrixmembranen von *Citrus aurantium* (250 meq kg⁻¹) und *Prunus armeniaca* (290 meq kg⁻¹) gefunden (Schreiber & Schönherr, 2009). Im Vergleich dazu ist der Wert für Kutikularmembranen der Tomatenfrucht etwa doppelt so hoch (500 meq kg⁻¹), was durch den hohen Anteil an nicht extrahierbaren Flavonoiden zu erklären ist, die ebenfalls dissoziierbare Gruppen enthalten (Schönherr & Bucovac, 1973).

In den Permeationsexperimenten mit Aminosäuren wurden Kutikularmembranen mit einem Gewicht von ca. 1 mg eingesetzt, so dass eine Gesamtexposition von ca. 1×10^{17} negativer Ladungen in der Kutikula einer Gesamtmenge von 2×10^{18} negativ geladener Aminosäuremolekülen in der Donorlösung gegenüber stand. Da die Effektivität des Ionenausschlusses mit zunehmender Schwellung des polaren Weges und zunehmender Konzentration des gleichgerichteten Ions in der Außenphase abnimmt (Abbildung 4.3, Tyree, 1990), kann also ein Einfluss der Donnanphase auf die Permeation der negativ geladenen Aminosäuren ausgeschlossen werden. Somit wirkt auch bei pH 11 der Konzentrationsgradient der Aminosäuren als Treibende Kraft für die Permeation.

4.4.3 Sorption von Aminosäuren

Ein maßgeblicher Faktor für die Sorptionseigenschaften der Efeukutikula ist die Zusammensetzung der Membran, die zu ca. 81% von lipophilen Bestandteilen wie Kutin und Wachsen dominiert wird (Kapitel 3.1.1). Wenn der Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizient durch die Sorptionseigenschaften der lipophilen Phase in der Kutikula bestimmt wird, dann sollte es eine Korrelation mit dem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten geben. Ein solcher Zusammenhang konnte für lipophile Substanzen mit $\log K_{OW} > 0$ gezeigt werden (Kerler & Schönherr, 1988a; Schönherr & Riederer, 1989; Popp, 2005).

Die Sorption von Aminosäuren in diese lipophile Phase lässt sich anhand der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten voraussagen (lipophiler Anteil der Kutikula

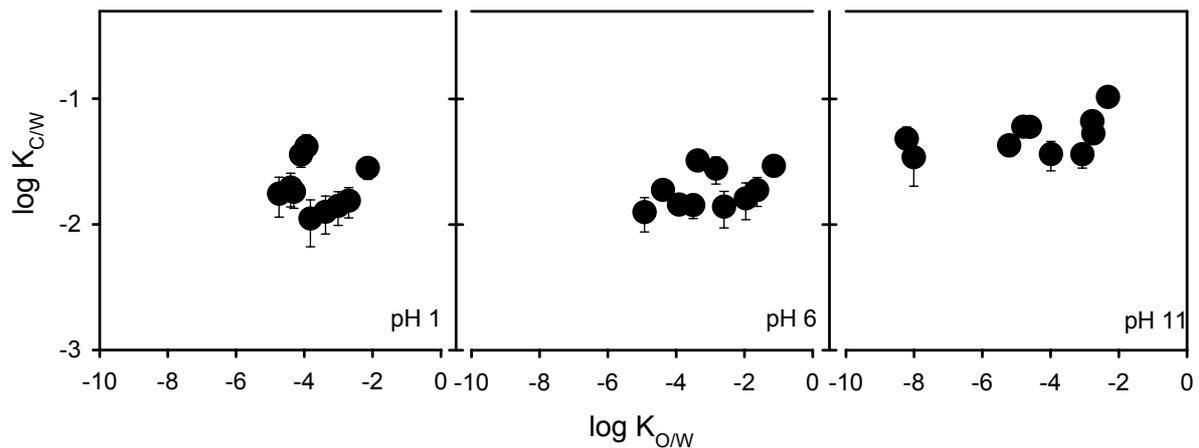


Abbildung 4.4: Zusammenhang zwischen den errechneten Oktanol/Wasser – ($\log K_{O/W}$) und dem gemessenen Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{C/W}$) der Aminosäuren für Efeumembranen (r^2 : pH1 = 0,01; pH 6 = 0,17; pH 11 = 0,22).

($0,81) \times K_{O/W} = K_{C\text{-lipophil/Wasser}}$). Bei pH 6 ergeben sich daraus sehr kleine Verteilungskoeffizienten die zwischen $9,6 \times 10^{-6}$ für Glutaminsäure und $5,9 \times 10^{-2}$ für Phenylalanin liegen, und ebenso wie die $K_{O/W}$ über mehrere Größenordnungen variieren.

Die tatsächlich gemessenen Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten sind hingegen deutlich höher und rangieren alle innerhalb einer Größenordnung (Tabelle 3.4). Eine Korrelation zwischen beiden Größen ist nicht festzustellen (Abbildung 4.4), so dass die Sorption von polaren Aminosäuren in die Efeukutikula nicht anhand der physicochemischen Eigenschaften der Moleküle (Lipophilie) voraussagbar ist.

Analog zur Berechnung der Verteilungskoeffizienten zwischen der Außenlösung und der lipophilen Phase, lassen sich unter Berücksichtigung der Wassersorption in die Kutikula die zu erwartenden Verteilungskoeffizienten neu berechnen. Bei pH 6 enthält die Efeukutikula ca. 14% Wasser (Abbildung 3.8), welches theoretisch für die Sorption der Aminosäuren zur Verfügung steht. Der Verteilungskoeffizient zwischen der Außenlösung und dem sorbierten Wasser in der Kutikula ist hier 1, da kein Phasenübergang stattfindet. Der Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizient für die Aminosäuren setzt sich also aus der Sorption in die wässrige Phase (hydrophiler Anteil der Kutikula ($0,14$) $\times K_{\text{Wasser/Wasser}}$ (1) = $K_{C\text{-hydrophil/Wasser}}$) und der Sorption in die

lipophile Phase ($K_{C\text{-lipophil/Wasser}}$) zusammen. Bei pH 6 ergeben sich dabei für die einzelnen Aminosäuren Verteilungskoeffizienten im Bereich von $K_{C/W} = 0,14$ für Glycin und $K_{C/W} = 0,2$ für Phenylalanin (Tabelle 4.1). Die Tatsache, dass diese - genau wie die experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten - innerhalb einer Größenordnung liegen, zeigt, dass die wässrige Phase das eigentliche Sorptionskompartiment für die hydrophilen Aminosäuren bildet, während die Verteilung in der lipophilen Phase vernachlässigbar ist. Für Phenylalanin mit sehr großer, lipophiler Seitenkette, hat die Sorption in die lipophile Phase allerdings einen nicht unerheblichen Einfluss auf den errechneten Verteilungskoeffizienten.

Alle experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten sind kleiner als die errechneten, was zeigt, dass nur ein begrenzter Anteil des wässrigen Bereiches innerhalb der Kutikula für die Sorption zur Verfügung steht.

Da die Wassersorption mit steigendem pH Wert zunimmt, sollten auch die Verteilungskoeffizienten für die Aminosäuren in gleichem Maße ansteigen, wie das für die errechneten Werte der Fall ist. Bei pH 6 konnte allerdings kein

Tabelle 4.1: Berechnete Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($K_{C/W\text{-theoretisch}}$) unter Berücksichtigung der Wassersorption bei verschiedenen pH Werten, und der Unterschied zwischen berechneten und gemessenen Verteilungskoeffizienten ($K_{C/W\text{-theoretisch}} \times K_{C/W\text{-experimentell}}^{-1}$) für Kutikularmembranen von *H. helix*.

	$K_{C/W\text{-theoretisch}}$			$K_{C/W\text{-theoretisch}} \times K_{C/W\text{-experimentell}}^{-1}$		
	pH 1	pH 6	pH 11	pH 1	pH 6	pH 11
Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette						
Gly	0,110	0,140	0,240	6,1	4,3	4,0
Ala	0,110	0,141	0,240	9,9	5,1	6,6
Pro	0,110	0,142	0,241	8,8	10,2	4,5
Val	0,111	0,149	0,241	7,9	9,2	6,6
Leu	0,112	0,160	0,241	7,2	8,5	3,6
Phe	0,116	0,202	0,244	4,1	6,9	2,3
Aminosäuren mit polarer Seitenkette						
Ser	0,110	0,140	0,240	6,3	9,7	5,6
Thr	0,110	0,140	0,240	5,6	9,8	4,0
Asp	0,110	0,140	0,240	3,1	7,4	5,0
Glu	0,110	0,140	0,240	2,6	11,2	7,0

entsprechender Anstieg der Verteilungskoeffizienten bestimmt werden, womit hier der größte Unterschied zwischen den theoretischen und den experimentellen K_{CW} entsteht (Tabelle 4.1). Das weist darauf hin, dass die absolute Wassermenge in der Kutikula nicht der einzige bestimmende Faktor für die Sorption der Aminosäuren ist. Die Aminosäuren liegen bei pH 6 als Zwitterionen vor, so dass es denkbar ist, dass die zwei entgegen gerichteten Ladungen stärkere Wechselwirkungen mit den kutikulären Komponenten eingehen, wodurch die Sorption behindert wird.

4.4.4 Verteilungsabhängigkeit der Aminosäurepermeation

Für lipophile Substanzen sind die Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten direkt mit den Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten korreliert, und können deshalb zur Voraussage der entsprechenden kutikulären Leitwerte eingesetzt werden (Schönherr & Riederer, 1989). Das „Solution-Diffusion“ Modell impliziert dabei, dass die kutikuläre Permeabilität mit zunehmender Lipophilie der Substanzen ansteigt (Riederer & Friedmann, 2006).

Popp *et al.* (2005) haben eine entsprechende Gleichung für den lipophilen Weg in

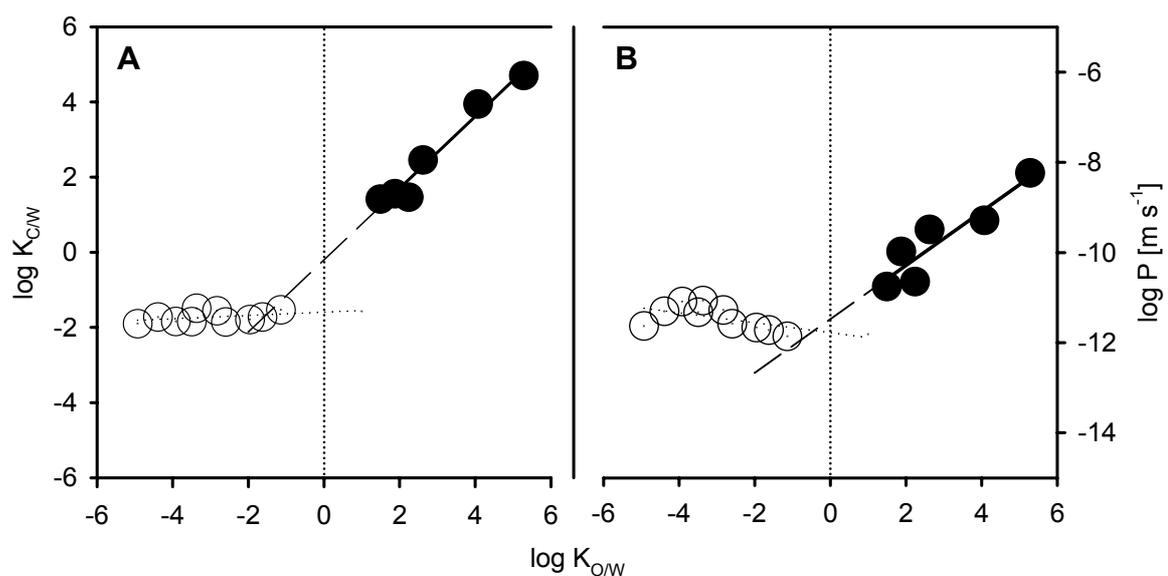


Abbildung 4.5: Vergleich der (A) Verteilungs- (K_{CW}) und (B) Permeationseigenschaften (P) von hydrophilen (Aminosäuren: weiße Symbole) und lipophilen Substanzen (schwarze Symbole, Daten aus Popp *et al.* (2005)) in Bezug auf die Hydrophilie (K_{OW}) der entsprechenden Substanzen bei einem pH Wert von 6.

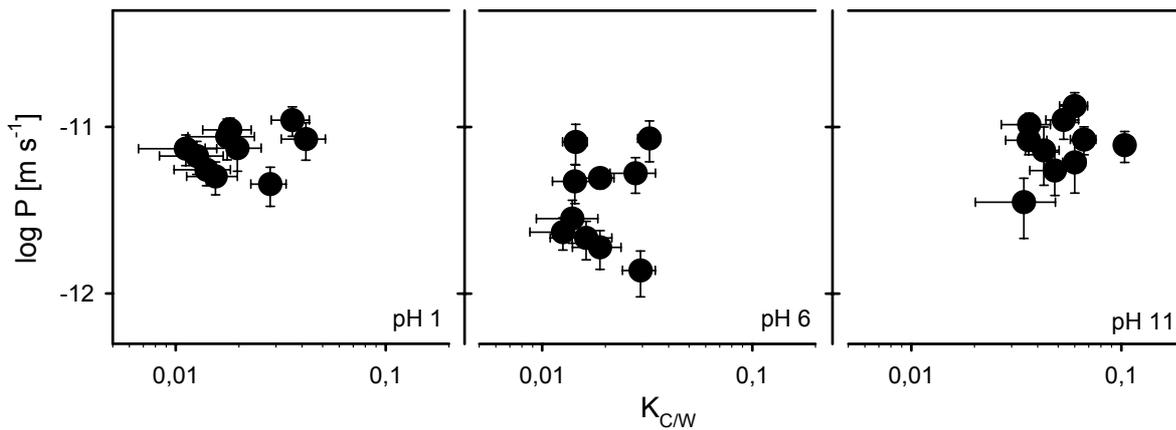


Abbildung 4.6. Zusammenhang zwischen den gemessenen Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten und ($K_{C/W}$) und den gemessenen Leitwerten (P) der Aminosäuren für Efeumembranen.

Kutikularmembranen des Efeus etabliert. Zieht man diese heran um anhand des K_{OW} die Leitwerte der Aminosäuren vorauszusagen, so ergeben sich bei pH 6 Werte zwischen $7,5 \times 10^{-14} \text{ m s}^{-1}$ für Glycin und $1,4 \times 10^{-12} \text{ m s}^{-1}$ für Phenylalanin. Für Phenylalanin stimmt der experimentell bestimmte Wert ($1,38 \times 10^{-12} \text{ m s}^{-1}$) exakt mit dem vorausgesagten überein, wohingegen der experimentelle Leitwert für Glycin ($8,52 \times 10^{-12} \text{ m s}^{-1}$) im Vergleich zum lipophilen Modell zwei Größenordnungen zu hoch liegt. Auch bei graphischer Auftragung der experimentell bestimmten $K_{C/W}$ oder Leitwerte gegen den K_{OW} wird deutlich, dass sich die Regressionsgeraden für lipophile Substanzen und für die hydrophilen Aminosäuren stark in ihren Eigenschaften unterscheiden (Abbildung 4.5). Das zeigt eindeutig, dass es in Kutikularmembranen von Efeu differenzierte Permeationswege mit unterschiedlichen physico-chemischen Eigenschaften gibt. Der Schnittpunkt der theoretischen Regressionsgeraden ist leicht in den hydrophilen Bereich verschoben, so dass der lipophile Weg in der Kutikula unter bestimmten Umständen auch für wasserlösliche Substanzen mit lipophiler Seitenkette (z.B. Phenylalanin) für die Permeation zur Verfügung stehen kann.

In Kapitel 4.4.3 konnte bereits gezeigt werden, dass es zwischen dem K_{OW} und dem $K_{C/W}$ der Aminosäuren keinen Zusammenhang gibt, da die Sorption zum überwiegenden Teil in die wässrige Phase der Kutikula stattfindet. Auch für die Leitwerte bestätigt sich, dass es bei keinem der untersuchten pH Werte einen Zusammenhang mit den Verteilungskoeffizienten gibt (Abbildung 4.5B; Abbildung 4.6). Für die Charakterisierung des hydrophilen Weges innerhalb der Kutikula müssen also andere Eigenschaften als die Lipophilie der permeierenden Substanzen herangezogen werden.

Im Gegensatz dazu zeigten Popp *et al.* (2005) einen positiven Zusammenhang zwischen den Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten und den gemessenen Leitwerten für Zucker und andere hydrophile Substanzen. Im Widerspruch zu den chemischen Eigenschaften der verwendeten Substanzen stehen allerdings die extrem hohen Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizienten die für alle verwendeten Zucker gemessen wurden (z.B. $K_{C/W}$ Erythrose = 99, $K_{C/W}$ Xylose = 4,7). Die Kombination von dermaßen hohen Verteilungskoeffizienten sowohl für sehr hydrophile

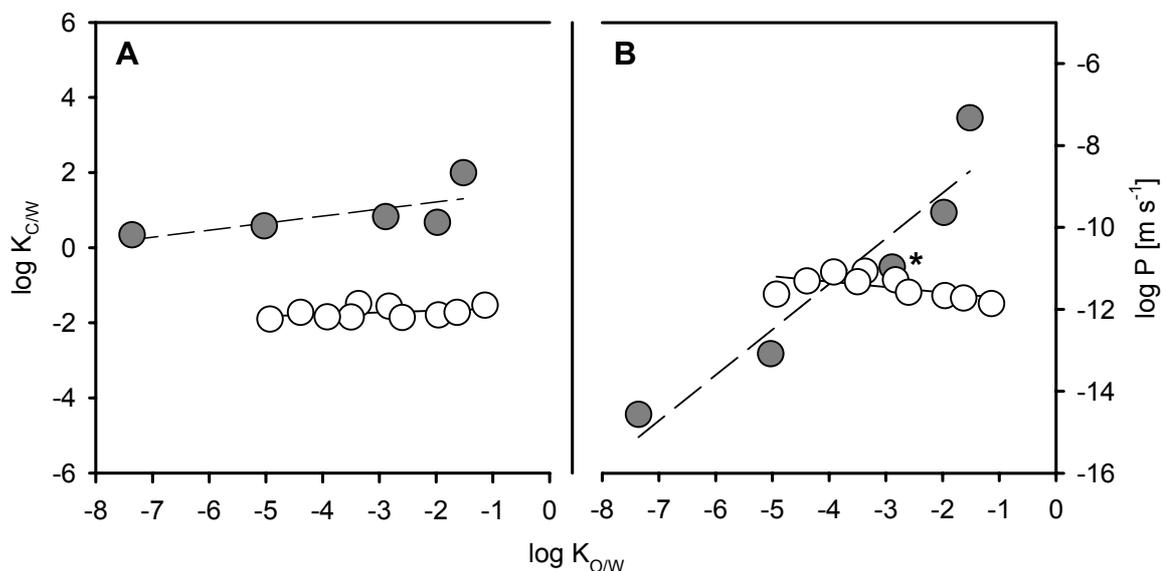


Abbildung 4.7 Vergleich der (A) Verteilungs- ($K_{C/W}$) und (B) Permeationseigenschaften (P) von Aminosäuren (weiße Symbole) und Zuckern (graue Symbole, Daten aus Popp, 2005) in Bezug auf die Hydrophilie (K_{OW}) der entsprechenden Substanzen bei einem pH Wert von 6. *: Glukose

(Löslichkeit: 6 - 8 mol kg⁻¹ Wasser) als auch für sehr lipophile Substanzen in ein und demselben Medium ist hier nicht erklärbar.

Die gemessenen Leitwerte der Zucker variieren über 7 Größenordnungen und übersteigen dabei teilweise die Leitwerte der lipophilen Substanzen (Popp *et al.*, 2005). Die hier angewendete, enzymatische Detektion mit einem Glukose-Oxidase-Peroxidase Farbreagenz, ist für die Detektion von Glukosemonomeren einsetzbar. Bei einer Reproduktion der Versuche war unter Verwendung von Xylose und Erythrose keine Farbreaktion zuerkennen (persönliche Beobachtung), womit in diesem Fall kein quantitativer Nachweis geführt werden konnte. Daher war auch ein Überprüfen der Verteilungskoeffizienten mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode nicht möglich.

Ein Vergleich zwischen den Zuckerleitwerten (Popp, 2005) und den Aminosäureleitwerten bringt keine Gemeinsamkeiten für die Verteilungs- und Permeationseigenschaften der beiden Gruppen hydrophiler Substanzen hervor (Abbildung 4.7). Lediglich der Leitwert von Glukose gliedert sich in die Zusammenhänge für die Aminosäuren ein (Abbildung 4.7B).

4.4.5 Größenabhängigkeit der Aminosäurepermeation

In Abwesenheit eines Verteilungsprozesses wird die kutikuläre Permeabilität nur durch den Diffusionskoeffizienten bestimmt, der in einem negativ, exponentiellen Verhältnis zur Größe der diffundierenden Spezies steht (Potts & Guy, 1992). Demzufolge ist der Leitwert (P) einer hydrophilen Substanz ebenso eine Funktion des molaren Volumens:

$$P = P_0 \times e^{-\beta \times MV} \quad (4.4)$$

Trägt man den Logarithmus der Leitwerte (P) gegen das entsprechende Molvolumen (MV) der Aminosäuren auf, so ergibt sich eine lineare Korrelation (Abbildung 4.8), wobei der y-Achsenabschnitt (P_0) der Funktion den Leitwert eines hypothetischen Moleküls mit dem Molvolumen $MV = 0$ wiedergibt und die Steigung (β) der Größenselektivität des Diffusionsweges entspricht. Diese beiden Größen bestimmen über die Beziehung:

$$P = \frac{\varepsilon \times D_p(r_p)}{\tau \times l} \quad (4.5)$$

die Permeationseigenschaften von hydrophilen Substanzen durch poröse Membranen (Peck *et al.*, 1994; Mitagotri, 2003). Die Porosität (ε) gibt den relativen Anteil der Porenoberfläche an der Gesamtoberfläche der Membran an. Die gesamte Länge des Diffusionsweges wird vom Umwegfaktor (τ) bestimmt, der den direkten Weg über die Dicke der Membran (l) aufgrund der Gewundenheit um ein Vielfaches verlängern kann. Der Diffusionskoeffizient (D_p) der Substanz innerhalb der Pore stellt eine Funktion des Porenradius (r_p) dar, wobei die Diffusion in engen Poren durch sterische Wechselwirkungen am Poreneingang und an der Porenwand behindert wird (Ford & Glandt, 1995). Je kleiner das diffundierende Molekül ist, desto kleiner werden diese Wechselwirkungen. Ein hypothetisches Molekül mit dem Molvolumen $MV = 0$ wird dabei weder Wechselwirkungen am Poreneingang noch an den Wänden eingehen, womit die Diffusion innerhalb der Pore einer ungehinderten Diffusion in Wasser entspricht und der Leitwert allein durch die Porosität und den Umwegfaktor

bestimmt wird. Der y-Achsenabschnitt der Funktion ist also ein Maß für das Verhältnis von Porosität zu Tortuosität ($\varepsilon \times \tau^{-1}$).

Bei der Permeation von Aminosäuren mit nicht polarer Seitenkette bleiben die y-Achsenabschnitte (P_0) der Regressionsgeraden unabhängig vom pH Wert konstant (Tabelle 4.2). Da es aber unwahrscheinlich ist, dass beide Parameter durch die nachgewiesene Schwellung und Wassersorption (Abbildung 3.8) unbeeinflusst bleiben, ist die Möglichkeit nicht außer Acht zu lassen, dass sich sowohl die Porosität als auch der Umwegfaktor in gleichem Maße ändern, und das Verhältnis damit gleich bleibt.

Die Größenselektivität (β) ist einer der bestimmenden Faktoren um die Eigenschaften des polaren Weges innerhalb der Kutikula in Bezug auf die permeierenden Substanzen zu charakterisieren. Dabei stehen Molekülen mit bestimmter Größe nur Wege für die Permeation zur Verfügung, deren Durchmesser mindestens dem des Moleküls entspricht. Geht man von einer Häufigkeitsverteilung der Porengröße aus, so stehen kleinen Molekülen kumulativ mehr Wege offen, als großen Molekülen, was auch den negativ exponentiellen Zusammenhang (Abbildung 4.8) zwischen Leitwerten und Molvolumen der Aminosäuren erklärt. Da die Größenselektivitäten unter den verschiedenen pH Bedingungen variieren, ist davon

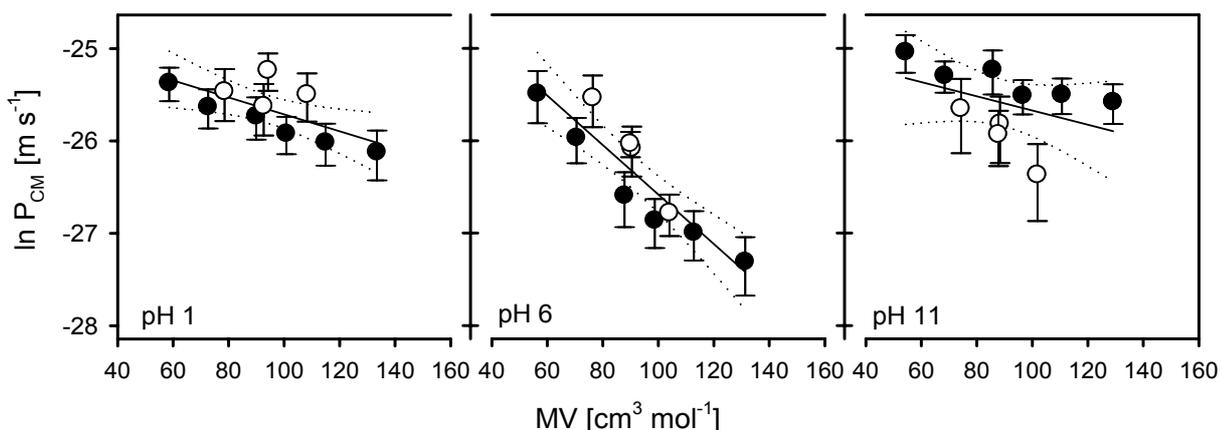


Abbildung 4.8: Abhängigkeit der Leitwerte ($\ln P_{CM}$) vom Molvolumen (MV) der Aminosäuren bei unterschiedlichen pH Werten für Kutikularmembranen von Efeu. schwarze Symbole: Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette, weiße Symbole: Aminosäuren mit polarer Seitenkette. Die Regressionsgeraden und 95%-CI der Geraden (gepunktete Linien) sind über alle Aminosäuren dargestellt. $r^2 = 0,47$ (pH 1), $r^2 = 0,83$ (pH 6), $r^2 = 0,18$ (pH 11). In Tabelle 4.2 sind die Parameter der Regressionsgeraden für Aminosäuren mit nicht-polarer und polarer Seitenkette gesondert aufgeführt.

auszugehen, dass die polaren Wege, die für die Permeation von hydrophilen Substanzen bereit stehen, keine starren Strukturen sind, sondern sich unter dem Einfluss von äußeren Bedingungen ändern.

Im vorliegenden Fall ändern sich aber auch die diffundierenden Aminosäuren, da sie unter verschiedenen pH Bedingungen unterschiedliche Ladungen tragen. Für die zwitterionischen Spezies der Aminosäuren (pH 6) ist dabei die Größenselektivität am stärksten, für die Anionen bei pH 11 am schwächsten ausgeprägt (Tabelle 4.2).

4.4.6 Einfluss der Hydrathülle

Ionen sind durch ihre Ladungen charakterisiert, die beim Lösen in Wasser Ion-Dipol Interaktionen mit den Wassermolekülen eingehen, was zu einer Hydratisierung der Moleküle führt. Die effektive, hydratisierte Ionengröße kann dabei ein Vielfaches des Molvolumens annehmen, welches aus der molekularen Masse errechnet werden kann (Abraham & McGowan, 1987). Für anorganische Ionen kann die Hydrathülle eine effektive Vergrößerung des Ionenradius bis um das 5fache, in Extremfällen sogar um das 15fache (Be^{2+} , Volkov et. al., 1997) bewirken.

Für organische Ionen gibt es in der Literatur nur wenige Untersuchungen, aus denen sich die Quantität der Hydratisierung erschließt. Burakowski und Glinski (2008) bestimmten anhand der Geschwindigkeit, die ein akustisches Signal benötigt, um eine definierte Strecke durch eine wässrige Probe zurückzulegen, unter anderem auch die Größen der Hydrathüllen verschiedener Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette. Anhand ihrer Ergebnisse konnten sie ein Modell erstellen, mit dem es möglich ist, die Hydratationszahlen von Molekülen vorauszusagen. Hierbei steuert jede funktionelle Gruppe am Molekül abhängig von ihrer jeweiligen Ladung eine definierte Anzahl an Wassermolekülen bei, die zur gesamten Hydratationszahl (HZ) aufaddiert werden können. Die Ladung ist dabei abhängig vom pH Wert des verwendeten Lösungsmittels.

Für Aminosäuren zeigt sich, dass die zwitterionische Form (neutraler pH Bereich) am stärksten hydratisiert ist, wohingegen mit der anionischen Form (basischer pH Bereich) die wenigsten Wassermoleküle assoziiert sind (Abbildung 4.9 A). Ein gegenläufiger Zusammenhang ist bei den gemessenen Leitwerten der Aminosäuren durch Efeumembranen zu erkennen. Im neutralen pH Bereich, wo die Aminosäuren die größten Hydrathüllen tragen, wurden die kleinsten Leitwerte gemessen. Aminosäuren mit den kleinsten Hydrathüllen im basischen pH Bereich hingegen wiesen die größten Leitwerte auf (Abbildung 4.9 B). Unabhängig von den pH Werten ergibt sich daraus ein linearer Zusammenhang ($r^2 = 0,93$) zwischen den Hydratationszahlen und allen gemessenen Leitwerten der Aminosäure (Abbildung 4.10A).

Aus der Summe des Gesamtvolumens der umgebenden Wassermoleküle ($HZ \times 16,7$) und des Molvolumens der Aminosäuren lassen sich die effektiven, hydratisierten Molvolumina abschätzen. Auch hier ergibt sich ein linearer negativer Zusammenhang mit allen gemessenen Leitwerten ($r^2 = 0,87$), was zeigt, dass die Hydrathüllen bei der Permeation durch Kutikularmembranen von Efeu nicht abgestoßen werden, und die tatsächlich permeierenden Moleküle bedeutend größer sind, als aus dem Molvolumen angenommen.

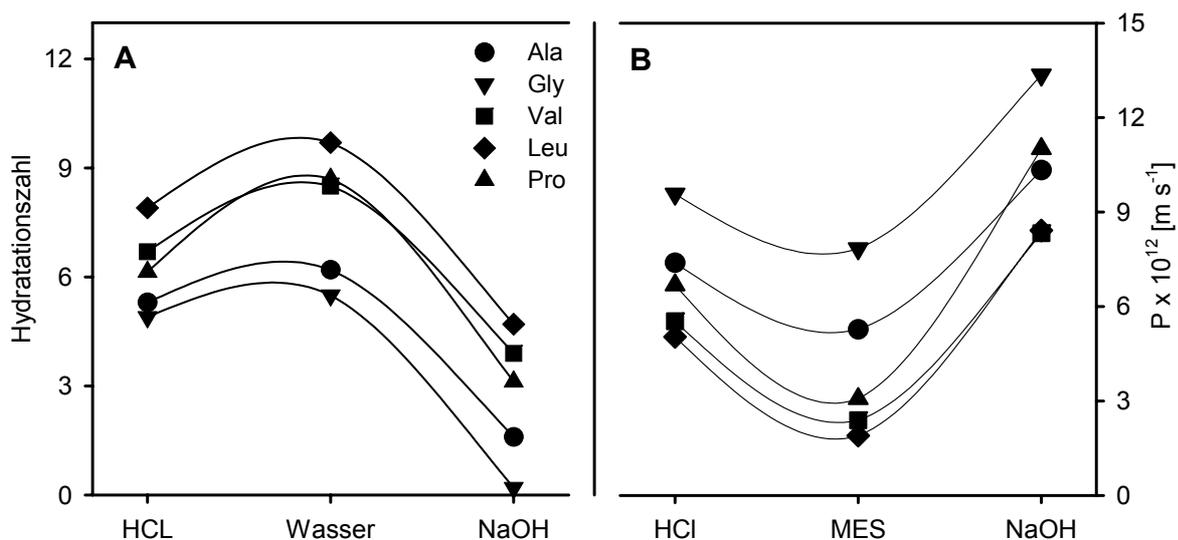


Abbildung 4.9: Zusammenhang zwischen der Hydratationszahl (Burakowski & Glinski, 2008) (A) oder den gemessenen Leitwerten (B) der Aminosäuren und dem entsprechenden Lösungsmittel (pH Bereiche: HCl: sauer, Wasser u. MES: neutral, NaOH: basisch). Die verwendeten Lösungsmittelkonzentrationen zur Bestimmung der Hydratationszahlen (Burakowski & Glinski, 2008) lagen bei jeweils 0,2 M, in der vorliegenden Arbeit für die Bestimmung der Leitwerte bei 0,1 M.

Im vorliegenden Fall wurden allerdings nur die Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette in die Korrelation einbezogen. Über die Hydratation der hydrophilen und dissoziierbaren, funktionellen Gruppen liegen noch zu wenige Informationen vor, um die effektiven Volumina der Aminosäuren mit polaren Seitenketten exakt zu bestimmen. Daher lassen sich auch die Diskrepanzen zwischen den Korrelationen für Aminosäuren mit polarer und unpolarer Seitenkette (Tabelle 4.2) nicht eindeutig aufklären. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die dissoziierte Seitengruppe der Säuren bei pH 11 eine zusätzliche Hydratisierung und somit eine starke Vergrößerung der Hydrathülle bewirkt. Das würde erklären, warum die Leitwerte der Säuren bei pH 11 bedeutend niedriger sind, als die der nicht dissoziierbaren Aminosäuren mit vergleichbarem Molvolumen.

Wird das Molvolumen für Phenylalanin nach Burakowski und Glinski (2008) berechnet, so sind die gemessenen Leitwerte bei allen pH Werten bezogen auf die Korrelation der restlichen Aminosäuren mit den hydratisierten Molvolumen zu hoch. Auf Grund von Wechselwirkungen durch die Ringstruktur der Seitenkette könnte das effektive Molvolumen in einer Weise beeinflusst werden, die in der Modellrechnung nicht berücksichtigt werden kann. Eine weitere mögliche Erklärung ergibt sich aus dem ausgeprägten amphiphilen Charakter von Phenylalanin, das durch die

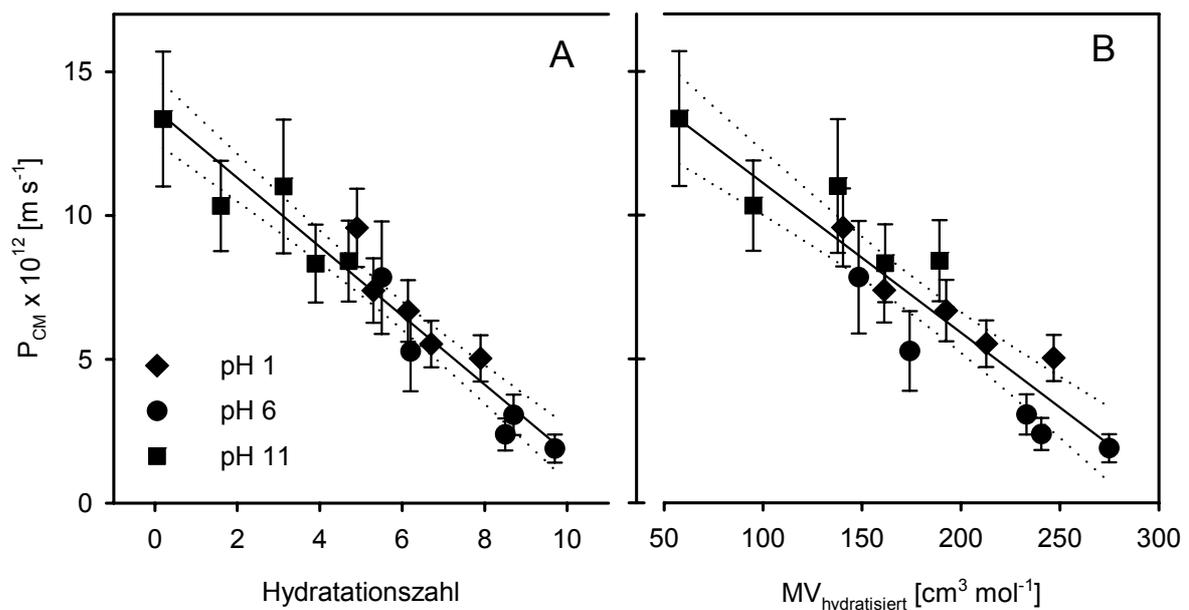


Abbildung 4.10: Abhängigkeit aller gemessenen Leitwerte von den pH-abhängigen Hydratationszahlen (A) oder den hydratisierten Molvolumen (B) der Aminosäuren. Die gepunkteten Linien geben die 95%-CI der Regressionsgeraden an. Bestimmtheitsmaße, A: $r^2 = 0,93$; B: $r^2 = 0,87$

Überlegenheit der lipophilen Seitenkette genau auf dem Schnittpunkt der beiden Permeationswege (hydrophil und lipophil) liegt (Abbildung 4.5B). Der gemessene Leitwert setzt sich deshalb möglicherweise aus variablen Anteilen der beiden Wege zusammen ($P_{\text{gesamt}} = P_{\text{lipophil}} + P_{\text{hydrophil}}$). Aus diesem Grund wurde auch Phenylalanin nicht für die Korrelation berücksichtigt.

Eine lineare Korrelation zwischen Molvolumen und Leitwert der Aminosäuren würde implizieren, dass der hydrophile Weg durch die Kutikula nicht größenlimitiert ist und es eine Anzahl von Poren gibt, deren Durchmesser unendlich groß ist. Daher gilt auch unter Berücksichtigung des hydratisierten Molvolumens die oben beschriebene exponentielle Beziehung (Gleichung 4.1).

Bei der logarithmischen Auftragung der Leitwerte gegen das hydratisierte Molvolumen zeigen sich ebenfalls Unterschiede zwischen den Korrelationen im Vergleich der verschiedenen pH Bedingungen (Abbildung 4.11). Im Vergleich mit den Korrelationen für das unhydratisierte Volumen bleiben die Werte für P_0 bei allen Bedingungen nahezu unverändert (Tabelle 4.2), was damit zu erklären ist, dass ein hypothetisches Molekül mit $MV = 0$ keine Hydrathülle aufweist, die die Permeation

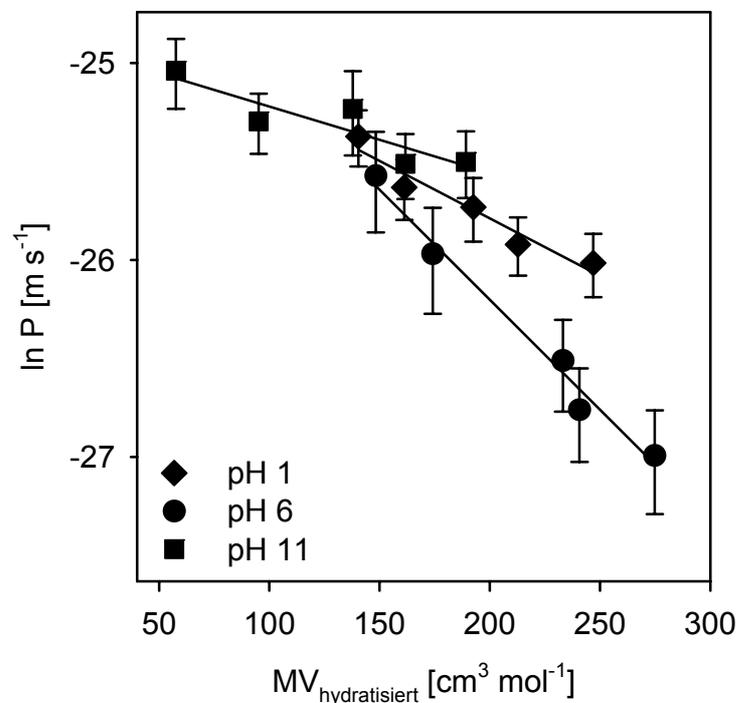


Abbildung 4.11: logarithmische Abhängigkeit der Leitwerte von den effektiven, hydratisierten Molvolumen der Aminosäuren. Die Parameter der Regressionsgeraden sind in Tabelle 4.2 angegeben.

beeinflusst. Die Steigungen der Korrelationen und somit die Größenselektivitäten für alle 3 pH Bereiche werden durch die Hydrathüllen in unterschiedlicher Weise verändert. Der Einfluss der Hydrathüllen sollte sich bei pH 6 am stärksten auf die Größenselektivität auswirken, da die Aminosäuren hier die größten Hydrathüllen tragen. Für die anionischen Aminosäuren mit den kleinsten Hydrathüllen bei pH 11 hingegen wäre der kleinste Effekt zu erwarten. Im Gegensatz dazu wurde bei pH 11 ein größerer Effekt gefunden, als bei pH 1 (Tabelle 4.2). Das zeigt, dass sich nicht nur die Moleküle sondern ebenfalls die Bedingungen des Permeationsweges unter dem Einfluss verschiedener pH Werte ändern. Grund dafür ist die vermehrte Wasserversorption, die für ein Schwellen der polaren Wege innerhalb der Kutikula verantwortlich ist (Kapitel 4.4.1). Da bei pH 11 die stärkste Wasserversorption stattfindet, die Moleküle aber gleichzeitig das kleinste effektive Volumen aufweisen, sind hier die Wechselwirkungen zwischen den permeierenden Molekülen und der Porenwand am kleinsten. Bei pH 6 hingegen reicht die Schwellung des polaren Weges nicht aus, um die starke Hydratisierung der Aminosäuren zu kompensieren, wodurch die Moleküle hier am stärksten behindert werden. Abbildung 4.12 zeigt ein schematisches Modell wie sich die Schwellung der Poren und die Hydratisierung der Moleküle auf die Permeation auswirken können.

Tabelle 4.2: Parameter der Regressionsgeraden aus der Korrelation der nicht hydratisierten oder hydratisierten Molvolumen der Aminosäuren und dem natürlichen Logarithmus der Leitwerte (P) für Efeumembranen. Die Größenselektivität (β) wird durch die Steigung der Geraden bestimmt, der y-Achsenabschnitt ($\ln P_0$) entspricht dem Leitwert eines hypothetischen Moleküls mit $MV = 0$. Der Effekt der Hydrathüllen ist als Verhältnis zwischen den Parametern für nichthydratisierte und hydratisierte Molvolumina dargestellt (nichthydratisiert \times hydratisiert⁻¹). Für Aminosäuren mit polarer Seitenkette liegen zu wenige Informationen vor, um die Hydrathüllen zu berechnen, daher konnte hier kein Effekt angegeben werden.

Korrelation: ln P vs MV	nicht hydratisiertes MV			hydratisiertes MV			Effekt	
	β	$\ln P_0$	r^2	β	$\ln P_0$	r^2	β	$\ln P_0$
	[mol cm ⁻³]	[m s ⁻¹]		[mol cm ⁻³]	[m s ⁻¹]			
Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette								
pH 1	0,0098	-24,9	0,96	0,0058	-24,6	0,94	1,69	1,01
pH 6	0,0241	-24,3	0,95	0,0112	-24,0	0,98	2,15	1,01
pH 11	0,0069	-24,7	0,83	0,0034	-24,9	0,81	2,03	0,99
Aminosäuren mit polarer Seitenkette								
pH 1	0,0004	-25,4	0,01					
pH 6	0,0450	-22,0	0,98					
pH 11	0,0260	-23,7	0,90					

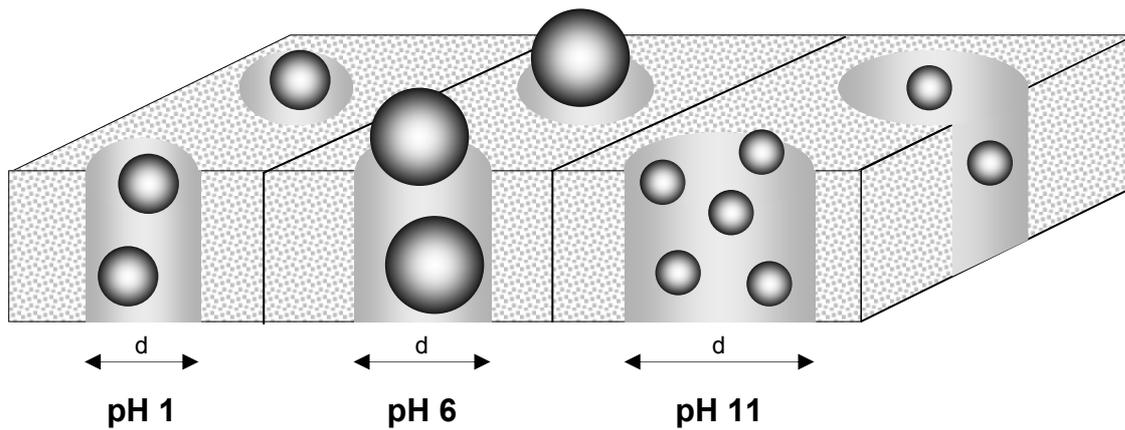


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der Größenverhältnisse zwischen hydratisierten Aminosäuremolekülen (Kugeln) und dem polaren Weg mit unterschiedlichen Schwellungszuständen bei pH 1, pH 6 und pH 11. d: Durchmesser der polaren Poren.

4.4.7 Dimensionen des hydrophilen Permeationsweges

Da die Permeation durch Efeumembranen ohne Phasenübergang stattfindet, ist der Prozess vergleichbar mit der freien Diffusion durch ein wässriges Medium mit entsprechender Dicke (Gleichung 4.5). Anhand der Diffusionskoeffizienten, die Longworth (1953) für Aminosäuren in Wasser bei 25° C bestimmt hat, können hypothetische Aminosäureleitwerte für eine Wasserschicht mit einer Dicke von 4,6 μm (durchschnittliche Dicke der Efeumembran, Abbildung 3.18) berechnet werden. Vorausgesetzt, dass Aminosäuren in wässriger Lösung ebenfalls mit der assoziierten Hydrathülle diffundieren, lassen sich die Parameter der Korrelationen vergleichen (Abbildung 4.13, Tabelle 4.3). Die Größenselektivität (β) für die kutikuläre Permeation von Aminosäuren ist dabei 4mal höher als für die ungehinderte Diffusion in Wasser und der Leitwert (P_0) für ein hypothetisches Molekül mit $MV = 0$ wird durch die Kutikularmembran um den Faktor $8,9 \times 10^6$ reduziert (Tabelle 4.3).

Die drastische Reduktion der Leitwerte durch Kutikularmembranen gegenüber der Diffusion in Wasser (Abbildung 4.13) zeigt die effektiven Barriereigenschaften der Kutikula für hydrophile Substanzen. Nur ein sehr geringer Anteil innerhalb der Membranen steht für die Permeation von hydrophilen Substanzen zur Verfügung.

Aus dem Verhältnis der kutikulären Leitwerte ($\frac{P_{K,2}}{P_{K,1}}$) zweier Aminosäuren (1,2) mit unterschiedlicher Größe und dem reziproken Verhältnis der Leitwerte durch eine Wasserschicht ($\frac{P_{W,1}}{P_{W,2}}$) lassen sich unter Berücksichtigung der hydratisierten Molekülradi ($r_2 > r_1$) aus:

$$r_P = \frac{r_2 - r_1 \sqrt[4]{\frac{P_{K,2}}{P_{K,1}} \frac{P_{W,1}}{P_{W,2}}}}{1 - \sqrt[4]{\frac{P_{K,2}}{P_{K,1}} \frac{P_{W,1}}{P_{W,2}}}}} \quad (4.6)$$

(verändert nach Eichert & Goldbach, 2008) Porenradi (r_P) errechnen. Bei pH 6 ergibt sich daraus ein Porenradius von 0,7 nm, wohingegen diese theoretische Betrachtung bei pH 1 zu einem doppelt so großen Porenradius (1,4 nm) führt. Auf Grund der Schwellung sollte der Porenradius allerdings mit steigendem pH Wert zunehmen, wie das für pH 11 (3,2 nm) auch der Fall ist. Die errechneten Werte zeigen also, dass anhand der Formel (Eichert & Goldbach, 2008) keine fixen Porenradi berechnet

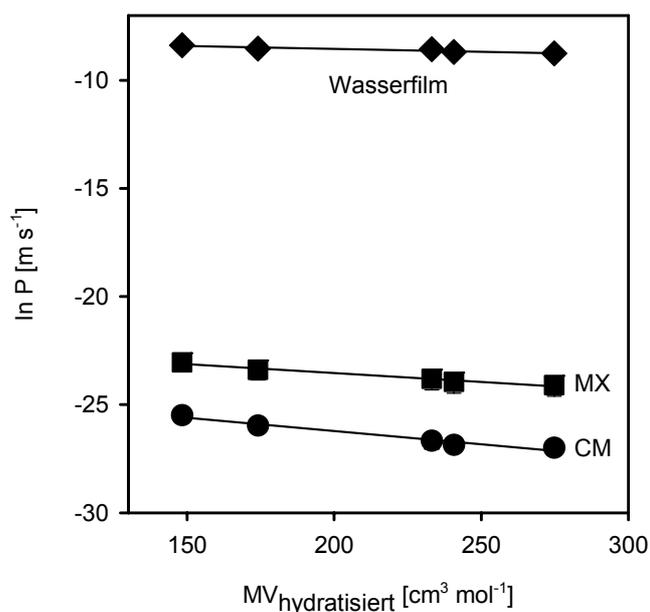


Tabelle 4.3: Parameter der Korrelationen zwischen den hydratisierten Molvolumen und Leitwerten der Aminosäuren mit nichtpolare Seitenkette für isolierte (CM) und extrahierte Kutikularmembranen (MX) und einem Wasserfilm mit vergleichbarer Dicke (4,6µm) bei pH 6 (Abbildung 4.13).

Korrelation: lnP vs MV	β [mol cm ⁻³]	ln P ₀ [m s ⁻¹]	r ²
CM	0,0112	-24,0	0,98
MX	0,0083	-21,9	0,97
Wasserfilm	0,0027	-8,0	0,88

Abbildung 4.13: Korrelationen zwischen den hydratisierten Molvolumen und den Leitwerten der Aminosäuren mit nichtpolare Seitenkette für isolierte (CM) und extrahierte Kutikularmembranen (MX) von Efeu und einem Wasserfilm mit vergleichbarer Dicke (4,6µm) bei pH 6

werden können. Vielmehr reflektiert das Ergebnis die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und dem Permeationsweg. Diese sind bei pH 6 am stärksten, wodurch hier rechnerisch die kleinsten äquivalenten Porenradi zu Stande kommen, da den Molekülen effektiv der geringste Raum im Vergleich zu ihrer Größe zur Verfügung steht (Abbildung 4.12).

Die Formel für die Berechnung der Porenradi (Eichert & Goldbach, 2008) basiert auf einer Funktion, die für synthetische Membranen modelliert wurde (Beck & Schulz, 1972). Hierfür wurden die Membranen so präpariert, dass sie einheitliche Poren (im Sinne von Löchern) aufweisen, deren Dichte und Länge bestimmt werden konnte. Anhand der gemessenen Permeationsgeschwindigkeiten von unterschiedlich großen Substanzen konnte dann bei bekannter Porendichte und Weglänge der Porenradius errechnet werden. Im Gegensatz dazu ist im Fall der Kutikula weder die Porendichte noch die Weglänge bekannt, weswegen hier immer nur ein Verhältnis zwischen 2 Größen, nie aber ein genauer Porenradius angegeben werden kann.

Schönherr (1976) hat anhand des Verhältnisses zwischen viskosem und diffusivem Wasserfluss Porenradi in Matrixmembranen von *C. aurantium* bestimmt und hat dabei keine pH Abhängigkeit gefunden. Dies führte zu dem Schluss, dass die erhöhten Wasserleitwerte, die mit steigendem pH Wert gemessen wurden, durch eine erhöhte Porenanzahl und nicht durch zunehmende Porenradi bedingt sind. Wenn allerdings ein Schwellen in der Kutikula stattfindet, ist es eher unwahrscheinlich, dass zwar zusätzliche Wege exponiert werden, die bestehenden aber unverändert bleiben. Unter solchen Umständen müssten die Größenselektivitäten für die hydratisierten Aminosäuren bei allen pH Werten konstant sein, was aber beim Efeu nicht der Fall war.

Generell ist es nicht sinnvoll, für Kutikularmembranen absolute Porenradi anzugeben, da es sich beim hydrophilen Weg um veränderbare Bereiche in der Membran handelt, deren Dimensionen höchstwahrscheinlich einer Verteilungsfunktion folgen und vom Schwellungszustand abhängen. Im Allgemeinen lässt sich also nur sagen, dass ein signifikanter Anteil der Wege in der Efeukutikula bedeutend größer sein muss, als die größte eingesetzte Aminosäure ($r_{\text{Phenylalanin hydratisiert, pH6}} = 0,54 \text{ nm}$), da hier kein Ausschluss stattgefunden hat.

Unter der Annahme, dass Wachse in der Kutinmatrix eingelagert sind, und ein zusätzlicher epikutikulärer Wachsfilm polare Wege blockiert (Schreiber & Schönherr, 2009), kann eine Extraktion der Wachse die Aminosäurepermeabilität erhöhen, indem zusätzliche Wege exponiert werden, oder der Durchmesser der Wege erweitert wird.

Tatsächlich bewirkt eine Extraktion der Wachse eine leichte Verringerung der Größenselektivität im Vergleich zur nativen Kutikularmembran (CM) um das 1,3fache (Abbildung 4.13, Tabelle 4.3), was auf die Permeation sehr großer Moleküle einen entscheidenden Einfluss haben kann. Das zeigt sich deutlich beim Vergleich der Aminosäureleitwerte die mit CM und MX von Efeu bestimmt wurden. Der Extraktionseffekt korreliert positiv mit der Größe der Aminosäuren (Abbildung 3.7), was bedeutet, dass in der Matrixmembran deutlich größere Poren zur Verfügung stehen. Auch P_0 erhöht sich durch die Wachsextraktion um etwa das 8fache, was für eine Erhöhung der Porosität und eine Verringerung der Tortuosität des polaren Weges spricht.

Auch bei der Permeation von Wasser sind deutliche Wachseffekte erkennbar. Werden die epikutikulären Wachse entfernt, so verdoppelt sich der Wasserleitwert (Abbildung 3.3B), was zeigt, dass der Wachsfilm auf der Oberfläche einen Anteil der polaren Wege blockiert. Eine Extraktion der Gesamtwachse wirkt sich auf die Wasserpermeation bedeutend stärker aus (Tabelle 3.3), als auf die Aminosäurepermeation, da die Wassermoleküle sehr viel kleiner sind. In der Matrixmembran stehen den Wassermolekülen also bedeutend mehr Wege offen, die aber auf Grund der limitierten Größe nicht für die Aminosäuren zugänglich sind.

Auch eine Ausfällung von Silberchlorid in den polaren Wegen von Matrixmembranen kann den Wasserleitwert nicht mehr erniedrigen, da mit dieser Methode nur Wege blockiert werden können, die größer sind als die hydratisierten Ionen ($r_{Ag^+} = 0,34$ nm; $r_{Cl^-} = 0,33$ nm; Volkov *et al.*, 1997). Damit konnte also gezeigt werden, dass es sich bei den Dimensionen der polaren Wege tatsächlich um eine Häufigkeitsverteilung handelt. Im Gegensatz zu technischen Membranen mit einheitlichen Poren (Beck & Schulz, 1972) existieren in der Kutikula also gleichzeitig Wege mit unterschiedlich großen Porenradi.

4.5 Eigenschaften der Kutikula der Lions-Rose®

4.5.1 Wassersorption

Im Vergleich zu Efeumembranen konnte nur eine sehr geringe Wasseraufnahme in die Rosenkutikula festgestellt werden. Anders als bei den Efeumembranen zeigte sich hier mit steigendem pH Wert nur eine leichte, nicht signifikante Zunahme der Wassersorption (Abbildung 3.8).

Eine Titration der Kutikularmembranen der Rose erbrachte keine Hinweise auf die Existenz von dissoziierbaren Gruppen innerhalb der Kutikula, die eine Wassersorption bewirken können. Hier wurde allerdings auf Grund der geringen Dicke der Rosenmembran eine erheblich kleinere Menge eingesetzt, als das für die Efeumembranen der Fall war. Kleine Effekte konnten deshalb möglicherweise nicht erkannt werden. Auch über die gravimetrische Bestimmung konnten keine hydrolysierbaren Bestandteile nachgewiesen werden, da die Matrixmembranen zu labil für eine saure Hydrolyse waren, und das Trockengewicht der Matrixmembranen nicht bestimmt werden konnte.

In Fluoreszenzfärbungen mit einem amphiphilen (BODIPY® FL C₁₂-sphingomyelin) und einem lipophilen (FM4-64) Farbstoff konnten jedoch bei beiden Pflanzenarten Asymmetrien innerhalb der Kutikula nachgewiesen werden. Sowohl bei Efeu- als auch bei Rosenmembranen macht der lipophile Farbstoff eine durchgängige Wachsschicht sichtbar, die sich über die Außenseite der Kutikula zieht (Abbildung 3.20, Abbildung 3.21). Der amphiphile Farbstoff hingegen akkumuliert auf der Innenseite und lässt deutlich Umriss der Zellstrukturen erkennen, die im intakten Blatt unterhalb der Kutikula liegen. Das deutet darauf hin, dass sich vor allem von den antiklinalen Zellwänden der Epidermis vermehrt Zellwandmaterial in die Kutikula erstreckt (Schönherr, 2006), an welches das polare Ende des Farbstoffes binden kann.

Damit konnte gezeigt werden, dass auch in Kutikularmembranen der Rose hydrophile Bestandteile vorhanden sind, die durchaus zu einer Schwellung führen können. Auch in Transpirationsexperimenten hat sich gezeigt, dass die Wasserleitwerte der Rosenmembranen mit zunehmendem pH Wert ansteigen (Abbildung 3.4), was für eine vermehrte Wassersorption innerhalb der Kutikula spricht.

Um die Wassersorption in die extrem dünnen Kutikularmembranen zuverlässig quantifizieren zu können, müssten allerdings sensiblere Methoden wie z.B. die Infrarotspektroskopie (Maréchal & Chamel, 1996) zum Einsatz kommen.

4.5.2 Sorption von Aminosäuren

Für die Rosenmembranen wurde im neutralen und basischen pH Bereich keine Korrelation zwischen dem Oktanol/Wasser- und dem Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten gefunden. Auffällig ist allerdings, dass im sauren Bereich ein leichter, positiver Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen bestimmt wurde (Abbildung 4.14). Für die Aminosäuren mit den größten lipophilen Seitenketten Leucin, Prolin und Phenylalanin wurden dabei Werte von $K_{C/W} \sim 1$ ($\log K_{C/W} \sim 0$) gemessen, was bedeutet, dass diese Aminosäuren in gleichem Maße in der wässrigen Umgebung und innerhalb der Kutikula löslich sind. Voraussetzung dafür wäre allerdings, dass es zwischen dem Lösungsmittel und der Membran keine Unterschiede in den chemischen Eigenschaften gibt, die Membran also vollständig hydrophil ist.

Die Analyse der Rosenmembran zeigt aber neben der nicht bestimmten Kutinmenge einen Wachsanteil von 36% (Kapitel 3.1.1), der bei der Berechnung des

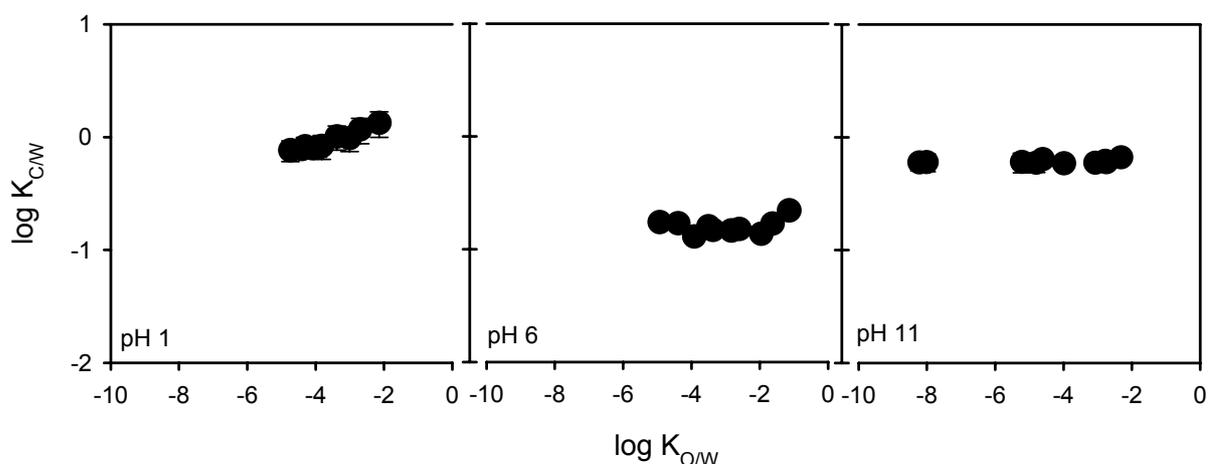


Abbildung 4.14: Zusammenhang zwischen den errechneten Oktanol/Wasser – ($\log K_{O/W}$) und den gemessenen Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{C/W}$) der Aminosäuren für Rosenmembranen (r^2 : pH1 = 0,92; pH 6 = 0,07; pH 11 = 0,11).

Verteilungskoeffizienten im Gesamtgewicht der Membran inbegriffen ist. Wie schon anhand einer Modellrechnung für die Efeumembranen gezeigt wurde (Kapitel 4.4.3), wären bei einer Verteilung der Aminosäuren zwischen der wässrigen Außenlösung und den lipophilen Bestandteilen der Kutikula bedeutend niedrigere Verteilungskoeffizienten zu erwarten (Tabelle 4.4). Auch die sehr niedrige Wassersorption in die Kutikularmembran der Rose (Abbildung 3.8, Tabelle 3.4) kann die hohen Verteilungskoeffizienten der Aminosäuren nicht bedingen.

Eine mögliche Erklärung für eine solch hohe Sorption könnte die Ausbildung von kovalenten Esterbindungen zwischen Epoxigruppen im Kutingerüst und den Carboxylgruppen der Aminosäuren sein. Riederer und Schönherr (1986) zeigten solche Effekte für einige Pflanzenarten, wobei der Nachweis der Sorption indirekt über die zeitabhängige Abnahme der Konzentration in der Inkubationslösung geführt wurde. Die Bindungsreaktion ist irreversibel und führt zu einem unlöslichen Produkt. Da im vorliegenden Fall aber die Aminosäuremenge bestimmt wurde, die nach der Inkubation wieder aus den Kutikularmembranen heraus gewaschen werden konnte, können die Esterbindungen nicht für die hohe Sorption verantwortlich sein.

Tabelle 4.4: theoretische Verteilungskoeffizienten der Aminosäuren die anhand des Verhältnisses zwischen Wassersorption und lipophilen Bestandteilen in der Rosenmembran für verschiedene pH Werte errechnet wurden

	$K_{C/W}$ -theoretisch		
	pH 1	pH 6	pH 11
Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette			
Gly	0,018	0,018	0,026
Ala	0,018	0,019	0,026
Pro	0,018	0,020	0,028
Val	0,019	0,028	0,027
Leu	0,020	0,041	0,027
Phe	0,025	0,089	0,030
Aminosäuren mit polarer Seitenkette			
Ser	0,018	0,018	0,026
Thr	0,018	0,018	0,026
Asp	0,018	0,018	0,026
Glu	0,018	0,018	0,026

Eine große Unsicherheit bei der Bestimmung von Verteilungskoeffizienten für sehr hydrophile Substanzen entsteht aus der Tatsache heraus, dass die Sorption in die Kutikula extrem niedrig ist. Im Vergleich dazu kann allerdings ein relativ großer Teil in Form eines Wasserfilms auf der Außenseite adsorbiert sein, was die gemessenen Werte verfälschen kann (Schreiber & Schönherr, 2009). Gerade bei der sehr dünnen Rosenkutikula ist das Verhältnis von Oberfläche zu innerem Volumen sehr groß, so dass die adsorbierten Aminosäuren auf der Außenseite einen erheblichen Anteil der quantifizierten Gesamtmenge ausmachen können, wodurch die hohen Verteilungskoeffizienten zu Stande kommen. Bei den Kutikularmembranen des Efeus ist dieser Fehler vernachlässigbar, da die Membranen erheblich dicker sind (Abbildung 3.18).

4.5.3 Verteilungsabhängigkeit der Aminosäurepermeation

Da die Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten der Aminosäuren für die Rosenmembranen nicht exakt bestimmt werden konnten, kann hier auch kein zuverlässiger Vergleich mit den Leitwerten angestellt werden.

Ein Vergleich mit den errechneten Verteilungskoeffizienten zeigt allerdings keine Zusammenhänge mit den Leitwerten (Abbildung 4.15), so dass die Permeation der Aminosäuren auch bei der Rose im Allgemeinen durch polare, wassergefüllte Strukturen stattfinden sollte.

Eine Ausnahme bilden die drei Aminosäuren mit sehr lipophiler Seitenkette (Prolin, Leucin, Phenylalanin). Hier gibt es bei pH 6 einen positiven Zusammenhang zwischen dem theoretischen K_{CW} und den gemessenen Leitwerten (Abbildung 4.15), so dass spekuliert werden kann, dass sich die beiden Permeationswege (hydrophil und lipophil) in der Rosenmembran stärker überschneiden, als das in der Efeukutikula der Fall ist. Entsprechende Leitwerte für lipophile Substanzen sind allerdings momentan nicht verfügbar, so dass hier kein eindeutiger Vergleich analog zum Efeu angestellt werden kann.

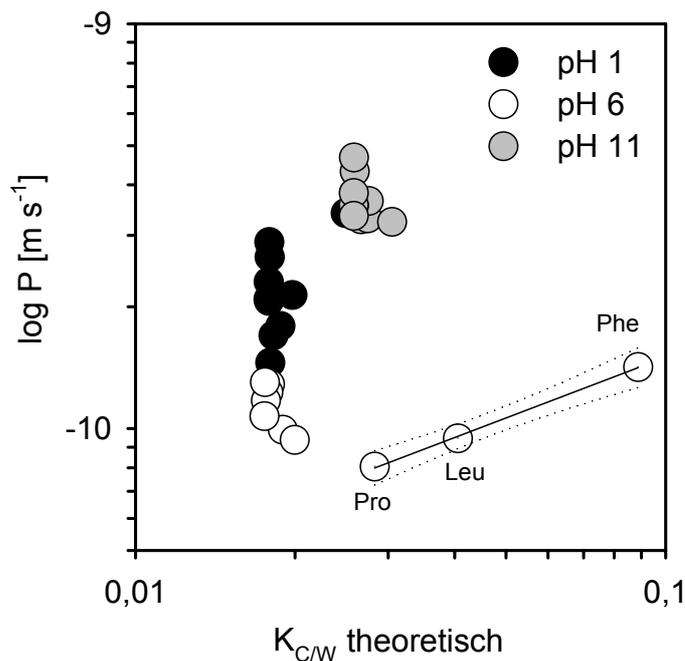


Abbildung 4.15: Abhängigkeit der Aminosäureleitwerte vom theoretisch errechneten Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizienten in Kutikularmembranen der Rose bei verschiedenen pH Werten.

4.5.4 Größenabhängigkeit der Aminosäurepermeation

Ein eindeutiger negativer Zusammenhang zwischen den Aminosäureleitwerten und der Größe der Aminosäuren ist bei den Rosenmembranen nicht zu erkennen (Abbildung 4.16). Eine mögliche Erklärung für die uneinheitlichen Zusammenhänge bei den verschiedenen pH Werten lässt sich aber anhand der der Strukturen der Aminosäuren und der Beschaffenheit der Kutikularmembran konstruieren:

Im sauren pH Bereich findet eine Permeation statt, die teilweise durch eine Sorption - und damit durch eine Verteilung der Aminosäuren innerhalb der lipophilen Phase der Membran - angetrieben wird. Trotz der positiven Ladung am Grundgerüst ist es möglich, dass durch die lipophilen Seitenketten eine Verteilung in der lipophilen Phase der Membran stattfindet. Das würde den positiven Zusammenhang zwischen der Größe – und demzufolge auch den Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten - und den Leitwerten der Aminosäuren erklären.

Auch für die menschliche Haut konnte gezeigt werden, dass die Permeation von Aminosäuren zwar hauptsächlich über wässrige Poren stattfindet, ein gewisser Anteil der Aminosäuren allerdings auch über die lipophile Membranphase, die bei der Haut ebenfalls dominierend ist, permeiert (Ruland *et al.*, 1994).

Die Wassersorption in Kutikularmembranen der Rose ist über alle pH Bereiche betrachtet im Vergleich zu Efeumembranen sehr gering und bei pH 1 am kleinsten (Abbildung 3.8). Diese geringe Hydratisierung der Kutikula würde nur einen sehr begrenzten wässrigen Transportweg zur Verfügung stellen, dessen Dimension vorrangig der kleinsten Aminosäure (Glycin) eine schnellere Permeation ohne energetisch ungünstigen Phasenübergang ermöglicht. Deshalb weist Glycin auch einen höheren Leitwert auf (Abbildung 4.16) als von der Korrelation für die übrigen Aminosäuren angenommen werden kann. Mit steigendem pH Wert nimmt die Wassersorption und demzufolge die Schwellung innerhalb der Kutikula etwas zu. Damit besteht auch für größere Moleküle eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, die Kutikula auf dem verteilungsfreien Diffusionsweg über die wässrige Phase zu passieren. Der Wendepunkt der Korrelation von einer negativen zu einer positiven

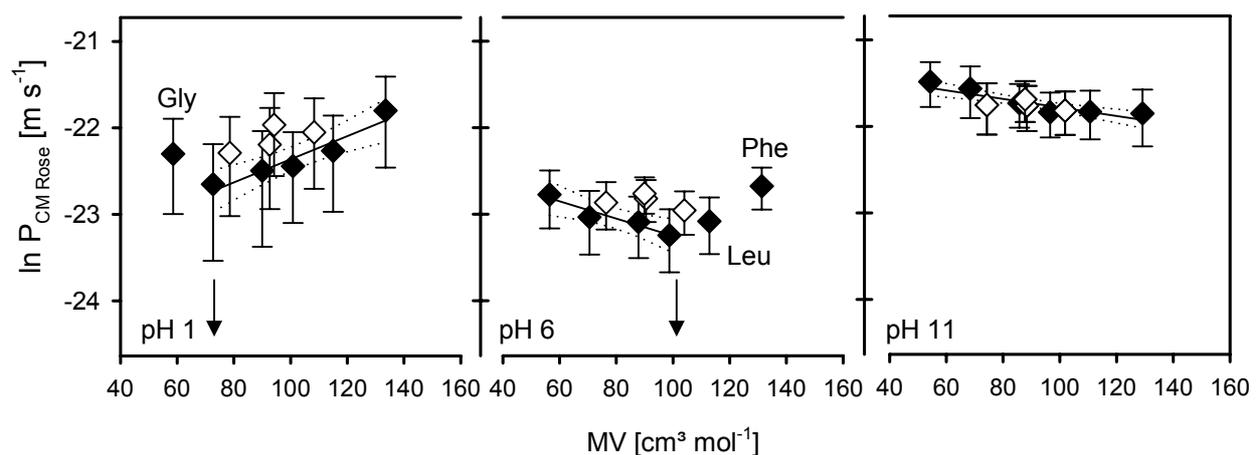


Abbildung 4.16: Abhängigkeit der Leitwerte ($\ln P_{CM}$) vom Molvolumen (MV) der Aminosäuren bei unterschiedlichen pH Werten für Kutikularmembranen der Rose. schwarze Symbole: Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette, weiße Symbole: Aminosäuren mit polarer Seitenkette. Die Regressionsgeraden und 95% CI der Geraden (gepunktete Linien) sind über alle Aminosäuren dargestellt (ausgenommen Glycin pH1, Phenylalanin pH 6). $r^2 = 0,38$ (pH 1), $r^2 = 0,05$ (pH 6), $r^2 = 0,75$ (pH 11). Die Pfeile markieren das Molvolumen, bei dem sich die Steigungen der Regressionsgeraden von negativ zu positiv ändern.

Steigung verschiebt sich dabei in Bezug auf die nicht hydratisierten Moleküle von $MV \sim 70 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ bei pH 1 zu $MV \sim 100 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ bei H 6 (Abbildung 4.16, Pfeile). Bei pH 11 ist die negative Korrelation über alle Aminosäuren ausgeprägt, so dass man davon ausgehen kann, dass hier der hydrophile Weg dominierend ist.

Dass sich die Verfügbarkeiten der Permeationswege über Membranen abhängig vom pH Wert ändern, konnte unter anderem auch für künstlich hergestellte Ethylzellulose Membranen gezeigt werden (Lippold *et al.*, 1999). Während der Permeation bei $\text{pH} < 6$ eine Sorption des diffundierenden Stoffes in der Membran zu Grunde liegt, und hier die Permeationsgeschwindigkeiten positiv mit den Verteilungskoeffizienten korrelieren, stehen ab pH 6 zusätzliche, wassergefüllte Wege zur Verfügung, die eine schnellere Permeation von wasserlöslichen Substanzen (Sucrose) ohne Phasenübergang ermöglichen. Die stark erhöhte Wassersorption in die Membran wird - ebenso wie bei der Kutikula - durch die Dissoziation der Carboxygruppen innerhalb der Ethylzellulose verursacht, was zur Etablierung eines kontinuierlichen hydrophilen Wegs führt.

Diese Eigenschaft macht man sich zum Beispiel bei der oralen Applikation von Arzneimitteln, die erst im Darm aufgenommen werden sollen, zu Nutze. Tabletten werden mit einer Membran aus Ethylzellulose überzogen, so dass der Wirkstoff im sauren Milieu des Magens in der Tablette eingeschlossen bleibt. Erst im basischen Milieu des Darms nimmt die Ethylzellulose Wasser auf und schwillt, wodurch der Wirkstoff freigesetzt werden kann (Lippold *et al.*, 1999).

4.5.5 Einfluss der Hydrathülle

Auch bei der Rose zeigt sich unter Berücksichtigung der Hydrathülle der Aminosäuren über alle pH Bereiche ein grober negativer Zusammenhang mit den Leitwerten (Abbildung 4.17). Aminosäuren mit sehr kleiner Hydrathülle bei pH 11 haben auch hier die höchsten Leitwerte und gehen die geringsten Wechselwirkungen mit dem Permeationsweg ein (Tabelle 4.5). Daher kann auch bei der Rose davon ausgegangen werden, dass die Hydrathüllen bei der Permeation am Molekül verbleiben, wenn der hydrophile Weg genutzt wird.

Anders als beim Efeu ist die Korrelation bei der Rose allerdings nicht so eindeutig ausgeprägt, und bei der logarithmischen Auftragung der Leitwerte gegen das hydratisierte Molvolumen ergeben sich wiederum uneinheitliche Zusammenhänge bei den verschiedenen pH Werten, die zum Beispiel dadurch erklärbar sind, dass die Aminosäuren teilweise durch die lipophile Phase permeieren.

Wären die Permeationsgeschwindigkeiten für die beiden Einzelwege bekannt, dann ließen sich aus den pH abhängigen Diskrepanzen zwischen den y-Abschnitten der Regressionen (P_0) die Anteile der einzelnen Wege an der Gesamtpermeation bei

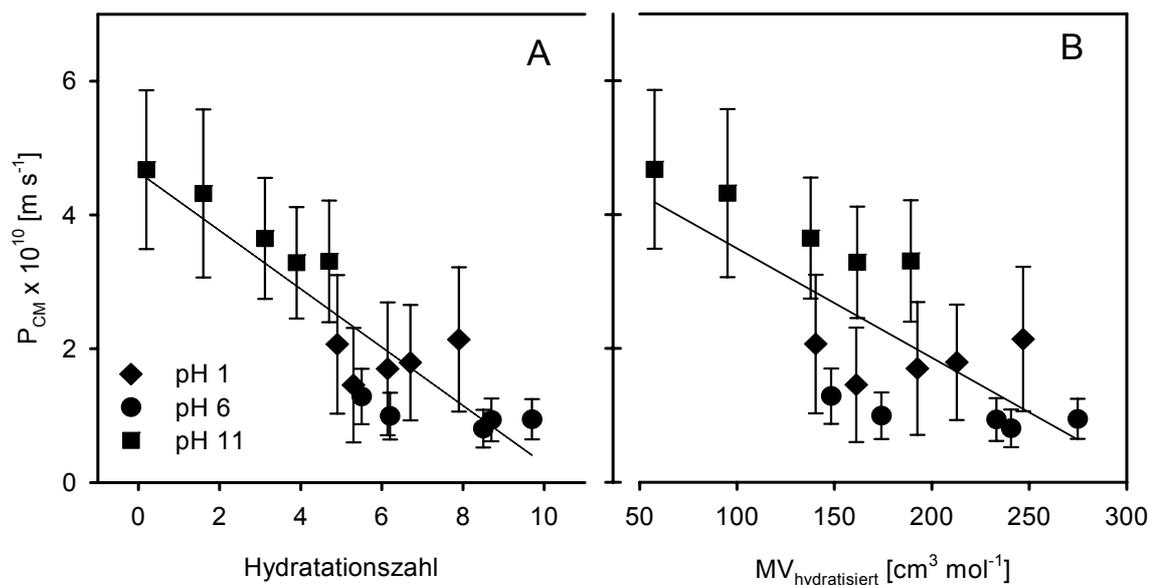


Abbildung 4.17: Zusammenhang zwischen allen mit Rosenmembranen gemessenen Leitwerten und den pH-abhängigen Hydratationszahlen (A) oder den hydratisierten Molvolumen (B) der Aminosäuren. Die gepunkteten Linien geben die 95%-CI der Regressionsgeraden an. Bestimmtheitsmaße, A: $r^2 = 0,79$; B: $r^2 = 0,55$.

einem gegebenen pH Wert abschätzen. Im vorliegenden Fall wurde aber lediglich die Gesamtpermeation gemessen. Weiterführend könnten zum Beispiel die Permeations- oder Diffusionsgeschwindigkeiten der Aminosäuren im Rosenwachs bestimmt werden, um diese Frage aufzulösen.

Anhand der oben beschriebenen Wendepunkte zwischen positiver und negativer Korrelation (Kapitel 4.5.4, Abbildung 4.16) bei den verschiedenen pH Werten lassen sich ungefähr die Dimensionen der wässrigen Poren abschätzen. Das hydratisierte Glycin hat bei pH 1 einen Molekülradius von 0,38 nm und kann, wie oben beschrieben, einen Teil der wässrigen Wege passieren. Alanin mit einem Radius von 0,4 nm scheint dagegen einen sehr beschränkten Zugang zu haben. Der durchschnittliche Radius der polaren Wege sollte bei pH 1 demzufolge nahe bei 0,4 nm, bei pH 6 hingegen zwischen der Größe von Valin ($r = 0,46$) und Leucin ($r = 0,48$) liegen (Abbildung 4.16). Da bei pH 11 alle hydratisierten Aminosäuren bedeutend kleiner sind und daher alle Aminosäuren auf dem hydrophilen Weg permeieren, kann hier kein maximaler Porenradius abgeschätzt werden.

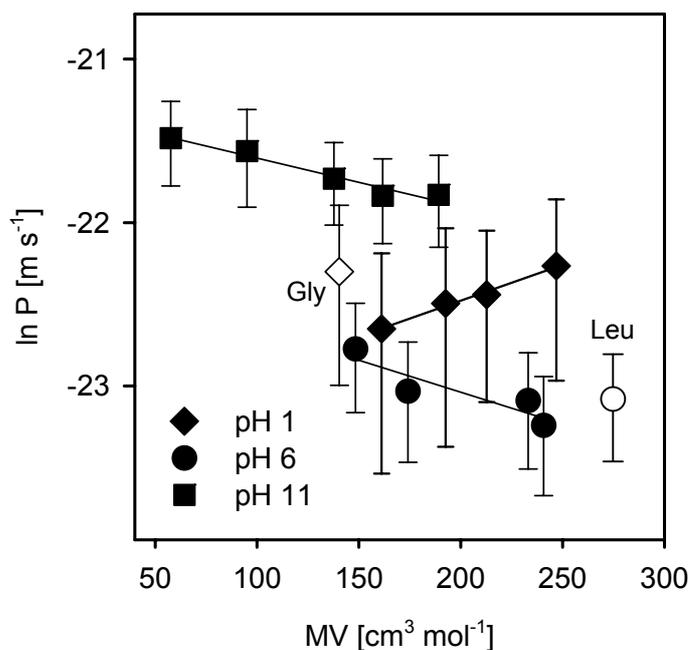


Abbildung 4.18: logarithmische Abhängigkeit der Leitwerte von den effektiven, hydratisierten Molvolumen der Aminosäuren. Die Parameter der Regressionsgeraden sind in angegeben.

Tabelle 4.5: Parameter der Regressionsgeraden aus der Korrelation der nicht hydratisierten oder hydratisierten Molvolumen der Aminosäuren und dem natürlichen Logarithmus der Leitwerte (P) für Rosenmembranen. $\ln P_0$ = y-Achsenabschnitt, β = Steigung $\times -1$, r^2 = Bestimmtheitsmaß. Der Effekt der Hydrathüllen ist als Verhältnis zwischen den Parametern für nichthydratisierte und hydratisierte Molvolumen dargestellt (nichthydratisiert \times hydratisiert⁻¹). Für die Berechnung der Korrelationen wurden bei pH 1 Glycin und bei pH 6 Phenylalanin und Leucin ausgenommen.

Korrelation: ln P vs MV	nicht hydratisiertes MV			hydratisiertes MV			Effekt	
	β [mol cm ⁻³]	ln P ₀ [m s ⁻¹]	r ²	β [mol cm ⁻³]	ln P ₀ [m s ⁻¹]	r ²	β	ln P ₀
Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette								
pH 1	-0,0134	-23,7	0,91	-0,0044	-23,4	0,99	3,05	1,01
pH 6	0,0100	-22,3	0,59	0,0039	-22,3	0,57	2,56	1,00
pH 11	0,0053	-21,3	0,83	0,0030	-21,3	0,95	1,77	1,00
Aminosäuren mit polarer Seitenkette								
pH 1	-0,0008	-22,9	0,50					
pH 6	0,0033	-22,5	0,20					
pH 11	0,0023	-21,6	0,23					

4.6 Vergleich der hydrophilen Permeationswege in isolierten Kutikularmembranen von Efeu und Rose

Bisher wurde angenommen, dass eine Permeation von geladenen Molekülen durch die lipophilen Bestandteile von Kutikularmembranen auf Grund der assoziierten Hydrathüllen ausgeschlossen ist (Schreiber & Schönherr, 2009). Wie die Versuchsergebnisse zeigen, scheint sich allerdings die Permeation von organischen Ionen über isolierte Kutikularmembranen nicht vollkommen auf einen polaren Weg zu beschränken. Abhängig von den Membraneigenschaften und den jeweiligen Eigenschaften der permeierenden Spezies, die sich durch äußere Bedingungen wie zum Beispiel dem pH Wert ändern können, kann sowohl der polare als auch der lipophile Weg an Bedeutung gewinnen.

Die Rosenmembranen sind bedeutend dünner als die Kutikularmembranen von Efeu, was generell die höheren Permeabilitäten (1-2 Größenordnungen, Tabelle 3.2) erklären kann, da eine viel kürzere Strecke überwunden werden muss. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Dicke der Membran und den Permeationsgeschwindigkeiten für Wasser konnte allerdings bis heute nicht gezeigt werden (Riederer & Schreiber, 2001). Das liegt unter anderem daran, dass die Länge des Permeationswegs nicht gleichzeitig der Dicke der Membran entspricht. Durch die heterogene Verteilung der funktionellen Gruppen innerhalb der Kutikula kommt ein weit verzweigtes, dreidimensionales Netzwerk von wassergefüllten Strängen zu Stande, in dem sich durch die zufälligen Diffusionsbewegungen der Moleküle der Permeationsweg um ein Vielfaches verlängern kann. In Gleichung 4.2 wird dies durch den Umwegfaktor (τ) ausgedrückt. Die Gleichung kann allerdings nicht zuverlässig nach τ aufgelöst werden, da andere notwendige Parameter wie die Porosität ebenfalls nicht direkt gemessen werden können.

In Bezug auf das Gesamtgewicht der Kutikula ist der Anteil der löslichen Lipidbestandteile bei der Rose ca. doppelt so groß wie bei den Efeumembranen, bei denen der Wachsanteil etwa der Menge der hydrolysierbaren, polaren Komponenten entspricht (Kapitel 3.1). Auch in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen sich bei der Betrachtung der Innenseiten isolierter Efeumembranen tiefe Abdrücke der einzelnen Epidermiszellen (Abbildung 3.16A) und faserige Feinstrukturen

(Abbildung 3.17A) die auf die Existenz von Polysacchariden hinweisen. Bei den Aufnahmen der Gefrierbrüche von Efeublättern zeigt sich auf der Innenseite der Kutikula tatsächlich eine große Anzahl an Strukturen, welche exakt in Vertiefungen in der Zellwandoberfläche greifen. In Abbildung 3.19 sind sogar fädige Strukturen zu erkennen, die das nicht verdaute Zellwandmaterial mit der Kutikula verbinden. Hierbei könnte es sich um die gesuchten Polysaccharid- oder Zellulosestränge handeln, die den relativ großen Anteil an polaren Komponenten in der Kutikula bilden.

Die Innenseite der Rosenmembran erscheint hingegen eher glatt und unstrukturiert (Abbildung 3.16B), so dass hier ein optischer Anhaltspunkt vorliegt, dass in der Rosenmembran bedeutend weniger polare Komponenten enthalten sind, als beim Efeu.

Anhand dieser unterschiedlichen Beschaffenheit lässt sich erklären, warum die Wassersorption bei der Efeumembran in bedeutend größerem Umfang stattfindet, so dass hier der hydrophile Weg dominiert. Der resultierende mittlere, geschätzte Porenradius von $r_{pH\ 6} \gg 0,6$, ist größer als bei der Rosenmembran ($r_{pH\ 6} < 0,5$), bei der demzufolge der lipophile Permeationsweg eine größere Bedeutung für die Permeation von geladenen Aminosäuren haben kann.

Ausschlaggebend für die Permeation hydrophiler Substanzen ist also die Verfügbarkeit der verschiedenen Wege, wobei die Permeation ohne Phasenübergang den energetisch günstigeren darstellt, da mit zunehmender Schwellung innerhalb der Rosenmembran der hydrophile Weg an Bedeutung gewinnt.

4.7 Leachingexperimente mit intakten Blättern

Ein theoretisches Model von Schönherr & Baur (1996) besagt, dass Aminosäuren in Blättern die Kutikula nicht permeieren können, da die treibende Kraft zu gering ist. Deshalb sollten Experimente an intakten Blättern Aufschluss darüber geben, in wie weit die Permeation von Aminosäuren durch die Kutikula tatsächlich eine Relevanz im System der intakten Pflanze hat. Dabei konnte auf der Blattoberfläche von Efeupflanzen aus dem Freiland eine Fülle von Aminosäuren nachgewiesen werden, wobei hier über die Hälfte der Gesamtmenge durch Prolin repräsentiert wurde (Abbildung 3.11). Eine Analyse der freien Aminosäuren im Blattinneren zeigte allerdings nur einen relativ geringen Prolinanteil (Abbildung 3.9, Tabelle 3.6), so dass es unwahrscheinlich ist, dass der Ursprung des Prolins auf der Blattoberfläche im Blattinneren zu finden ist.

Zum Zeitpunkt der Probennahme im Freiland stand der Efeustrauch in voller Blüte und eine Analyse der Blüten erbrachte ebenfalls einen extrem hohen Prolingehalt von 75,5% (Abbildung 3.10). Bei der Analyse der Efeublüten wurden sowohl der Nektar, als auch die frei löslichen Aminosäuren in den Pollen extrahiert. Da die Blätter im Freiland in hohem Maße von Pollen bedeckt waren, ist also davon auszugehen, dass der hohe Prolingehalt auf der Blattoberfläche durch die Pollen verursacht wurde, die sich dort abgelagert hatten.

Auf den Blattoberflächen von nicht blühenden Efeu- und Rosenpflanzen, die unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer angezogen wurden, fanden sich ebenfalls Aminosäuren, wobei der Prolinanteil deutlich reduziert war (Abbildung 3.11). In dieser Situation war ein Eintragen von Aminosäuren über die Luft nicht möglich. Somit konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Aminosäuren, die auf der Blattoberfläche exponiert sind, tatsächlich aus dem Blattinneren stammen, wobei die Zusammensetzung im Freiland, durch die Ablagerung aus externen Quellen modifiziert werden kann.

4.7.1 *steady-state* - Bedingungen

In *Leaching*experimenten, in denen die Blätter kontinuierlich von einer Rezeptorlösung umgeben waren konnte gezeigt werden, dass bei diesen modifizierten Umweltbedingungen sowohl bei der Rose, als auch beim Efeu tatsächlich ein kontinuierliches Auswaschen der Aminosäuren aus dem Blattinneren stattfindet. Über einen Zeitraum von 4 Wochen wurde dabei ein linearer Anstieg der Aminosäuremenge innerhalb der Rezeptorlösung beobachtet (Abbildung 3.12). Da die Kutikula sowohl von der Innen- (Apoplast) als auch von der Außenseite (Rezeptor) zu wässrigen Phasen hin exponiert war, fand hier eine gleichmäßige Schwellung der polaren Wege innerhalb der Kutikula statt. Die Diffusion der Aminosäuren aus dem Apoplasten über die hydratisierten Komponenten der Kutikula bis hin zur Blattoberfläche war dadurch begünstigt.

Die Flussraten, die für die unterschiedlichen Aminosäuren bestimmt wurden, variieren im Gegensatz zu den mit isolierten Kutikularmembranen gemessenen, über mehrere Größenordnungen. Da die Permeation, abgesehen von der exponierten Fläche, die für alle Aminosäuren identisch war, vom Konzentrationsgradienten angetrieben wird (Gleichung 1.4), liegt die Erklärung für diese großen Unterschiede im unterschiedlichen Aminosäuregehalt der Blätter (Tabelle 3.6). Aminosäuren die in großer Menge im Blatt enthalten sind, bilden große Konzentrationsgradienten und erreichen damit auch höhere Flussraten. Die quantitativ weniger vertretenen Aminosäuren sollten demzufolge niedrigere Flussraten zeigen.

Sowohl bei Efeu- als auch bei Rosenblättern zeigt sich, dass die Flussraten wie erwartet vom Gehalt der Aminosäuren im Blattinnern abhängen (Abbildung 4.19). Da die Aminosäuremengen in den Blättern über mehrere Größenordnungen variieren ergeben sich erst bei logarithmischer Auftragung der Aminosäuremengen gegen die Flussraten lineare Korrelationen (Abbildung 4.19), deren Steigungen einen durchschnittlichen Leitwert (P) [m s^{-1}] über alle Aminosäuren darstellen. Für Efeublätter liegt die Steigung bei 5×10^{-12} [m s^{-1}] ($r^2 = 0,81$) während für Rosenblättern ein durchschnittlicher Leitwert von $7,8 \times 10^{-10}$ [m s^{-1}] ($r^2 = 0,71$) bestimmt werden konnte. Diese Werte stimmen jeweils mit der Größenordnung der Leitwerte überein, die in Versuchen mit isolierten Kutikularmembranen gemessen wurden (Tabelle 3.2).

Beim Efeu ist der positive Zusammenhang zwischen der Menge der einzelnen Aminosäuren in den Blättern und den gemessenen Flussraten deutlicher ausgeprägt als bei der Rose (Abbildung 4.19). Das weist darauf hin, dass die Verfügbarkeit der hydrophilen Wege im intakten System ebenfalls eingeschränkt sein kann.

Die Außenlösung zeigte über die gesamte Versuchsdauer einen pH Wert zwischen 5,5 und 6, so dass in der Kutikula keine maximale Schwellung stattfinden konnte, da nicht alle funktionellen Gruppen dissoziiert waren. Da die Wassersorption bei pH 6 in der Efeukutikula ausreichend ist, um für alle untersuchten Aminosäuren eine Permeation über den hydrophilen Weg zu gewährleisten (Kapitel 4.4), werden die Flussraten hauptsächlich vom Konzentrationsgradienten bestimmt.

Bei der Rose hingegen reicht die Schwellung nicht aus (Kapitel 4.5), so dass hier zusätzliche Verteilungsmechanismen eine Rolle spielen können, die nicht vom Konzentrationsgradienten sondern von den physiko-chemischen Eigenschaften der permeierenden Substanz und der Membran abhängen (Abbildung 4.19B).

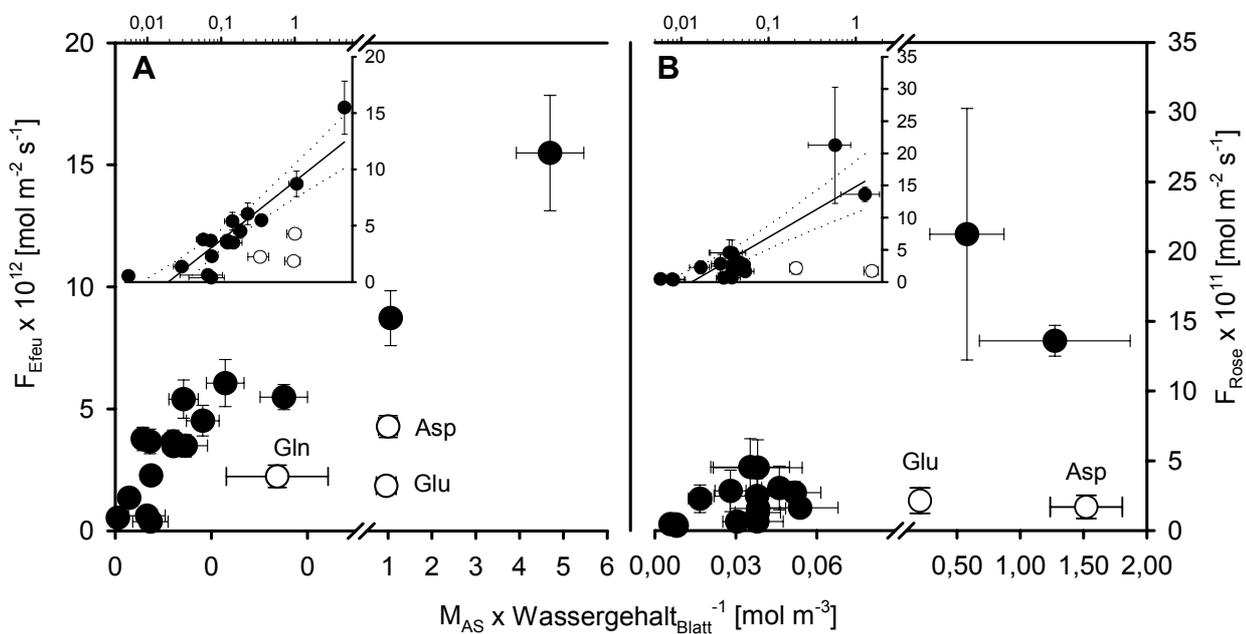


Abbildung 4.19: Zusammenhang zwischen dem Aminosäuregehalt der Blätter (als Menge der Aminosäuren (M_{AS}) bezogen auf den Wassergehalt der Blätter unter der Annahme das die permeierenden Aminosäuren gelöst im Blatt vorliegen) und den Flussraten (F) die in steady-state Experimenten für Efeu- (A) oder Rosenblätter (B) bestimmt wurden. (MW \pm 95% CI) Die Einsätze zeigen den linearen Zusammenhang bei logarithmischer Auftragung des AS Gehaltes im Blatt.

Die beiden Säuren Asparagin- und Glutaminsäure sowie das Glutamin beim Efeu zeigen bezogen auf den Gehalt im Blatt zu niedrige Flussraten (Abbildung 4.19). Ein möglicher mikrobieller Abbau der Aminosäuren wurde durch den Zusatz von Natriumazid in der Rezeptorlösung verhindert. Da aber bei der *Leachingsimulation* nicht nur selektiv die Aminosäuren, sondern auch andere im Blatt enthaltenen organischen und anorganischen Metabolite und Salze ausgewaschen wurden, ist es denkbar, dass die reaktionsfreudigen Säuren über den langen Versuchszeitraum in der Rezeptorlösung modifiziert wurden, und somit nicht mehr als solche nachweisbar waren.

Den Aminosäuregehalt in den Blättern kann man als treibende Kraft für die Permeation heranziehen. Da jeweils die Fläche der Blätter bekannt ist, lässt sich aus den gemessenen Flussraten und dem Konzentrationsgradienten ein Leitwert für die verschiedenen Aminosäuren abschätzen. Die so bestimmten Leitwerte liegen für Efeublätter zwischen $3,3 \times 10^{-12} \text{ m s}^{-1}$ (Serin) und $9,6 \times 10^{-11} \text{ m s}^{-1}$ (Ornithin) und für Rosenblätter zwischen $1,1 \times 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ (Asparaginsäure) und $1,4 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$ (Leucin). Eine negative Korrelation der Leitwerte mit dem Molvolumen konnte allerdings, hier nicht gezeigt werden (Abbildung 4.20).

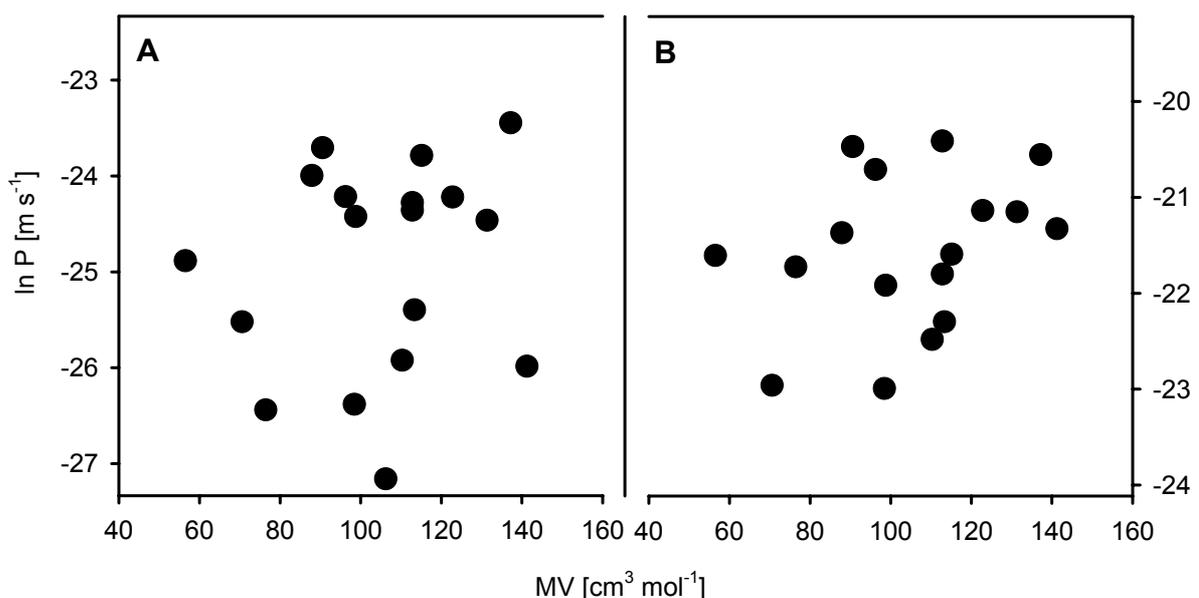


Abbildung 4.20: Zusammenhang zwischen den in Leachingexperimenten an intakten Blättern bestimmten Leitwerten (P) und dem Molvolumen der Aminosäuren. Sowohl beim Efeu ($r^2 = 0,06$) (A) als auch bei der Rose ($r^2 = 0,06$) (B) gibt es keine Korrelationen.

In den *Leaching*experimenten mit intakten Blättern beeinflussen viele unbekannte Faktoren die Permeation der Aminosäuren (z.B. Volumen, pK-Werte, Polarität, Hydrophobizität, Gehalt der Aminosäuren in den Blättern, Kopermeation von anderen Metaboliten) (Derridj, 1996), so dass es schwierig ist aus solchen Versuchen einfache Zusammenhänge auf mechanistischer Ebene abzuleiten. Bei der Berechnung der Leitwerte wurde davon ausgegangen, dass die Aminosäuren, die in den Blättern quantifiziert wurden, im Wasseranteil des Blattes gelöst sind, und gleichmäßig verteilt im Blatt vorliegen, so dass ein kontinuierlicher Konzentrationsgradient für das *Leaching* vorhanden ist. Diese Annahme spiegelt sicherlich nicht die exakte Situation im intakten Blatt wieder, so dass unter diesen Umständen nur eine grobe Abschätzung der Leitwerte gegeben werden kann. Erstaunlich hierbei ist allerdings, dass die so berechneten Leitwerte, trotz der großen Konzentrationsunterschiede in den Blättern, für alle Aminosäuren nicht mehr als eine Größenordnung umfassen, und sowohl beim Efeu als auch bei der Rose im selben Bereich liegen, wie die mit isolierten Kutikularmembranen bestimmten Leitwerte (Tabelle 3.2).

Bei den *Leaching*experimenten mit intakten Blättern wurde ein breites Spektrum von Aminosäuren berücksichtigt, die sich durch eine Vielzahl von Seitengruppen mit unterschiedlichen Polaritäten und Ladungen auszeichnen. Wie in Experimenten mit isolierten Membranen gezeigt werden konnte, beeinflussen diese Seitenketten in unterschiedlicher Weise die Leitwerte, da einerseits Wechselwirkungen mit polaren oder dissoziierbaren Gruppen in der Kutikula denkbar sind und andererseits die Größe der Hydrathülle durch die funktionellen Gruppen beeinflusst wird. Zusätzlich ist zu beachten, dass im intakten Blatt Stoffwechselprozesse oder Umlagerungen der Aminosäuren stattfinden können, so dass die Bestimmung der Aminosäuregehalte, nur einen momentanen Zustand widerspiegelt.

4.7.2 Stomata als mögliche Permeationswege

Um eine ausreichende CO₂ Versorgung der Blattgewebe zu gewährleisten, ist die für Gase größtenteils impermeable Kutikula von den Spaltöffnungen unterbrochen, deren Öffnungsweite aktiv reguliert werden kann. Ob und in wie weit diese Poren eine Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen in das Blattinnere oder beim *Leaching* spielen ist bis heute umstritten. In der Vergangenheit haben viele Studien gezeigt, dass in Anwesenheit der Stomata die Permeation von gelösten Substanzen über die Blattoberfläche oder über isolierte Kutikularmembranen signifikant erhöht sein kann (Sargent & Blackman, 1962; Middleton & Sanderson, 1965; Kannan, 1969; Schönherr & Bukovac, 1978; Eichert *et al.*, 1998; Šantrůček *et al.*, 2004; Schlegel, 2005), wobei unklar ist, welcher Mechanismus diesem Effekt zu Grunde liegt.

Ein direkter Vergleich der Aminosäureflussraten die auf der adaxialen und der abaxialen Blattseite gemessen wurden, zeigt sowohl für Efeu- ($r^2 = 0,98$) als auch für Rosenblätter ($r^2 = 0,99$) eine sehr gute positive Korrelation (Abbildung 4.21).

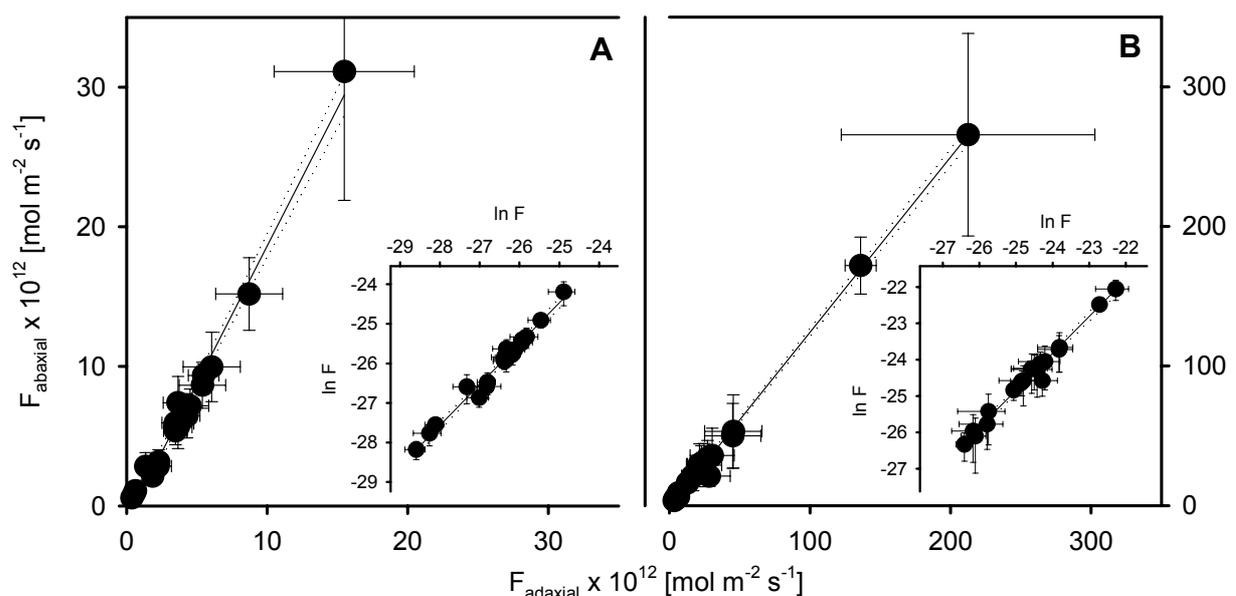


Abbildung 4.21: Zusammenhang zwischen den Flussraten (F) für Aminosäuren die in steady-state Experimenten (flüssiges Wasser als Rezeptor) für adaxiale und abaxiale Seiten von Efeu-(A) und Rosenblättern (B) bestimmt wurden (MW \pm 95% CI).

Die Zusammenhänge werden dabei durch die Gleichungen:

$$F_{\text{abaxial}} [\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}] = 1,97 \times F_{\text{adaxial}} [\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}] - 1,08 \times 10^{-12} \text{ (Efeu)}$$

$$F_{\text{abaxial}} [\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}] = 1,26 \times F_{\text{adaxial}} [\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}] - 1,44 \times 10^{-12} \text{ (Rose)}$$

beschrieben. Die Aminosäureflussraten die für beide Seiten der Rosenblätter bestimmt wurden, unterscheiden sich nur geringfügig (Tabelle 3.7, Abbildung 4.21B, Steigung = 1,26), was zeigt, dass die Anwesenheit der stomatären Poren unter den vorherrschenden Bedingungen keinen Einfluss auf das *Leaching* von Nährstoffen oder Metaboliten aus dem Inneren von Rosenblättern hat.

Für Efeublätter wurden auf der Stomata tragenden Blattseite etwa doppelt so hohe Flussraten gemessen, wie auf der stomafreien Seite (Tabelle 3.7, Abbildung 4.21A, Steigung = 1,97). Dabei stellt sich die Frage ob die stomatären Poren einen Permeationsweg für hydrophile Substanzen darstellen:

Die tatsächliche Fläche, über die eine stomatäre Diffusion stattfinden könnte, errechnet sich aus der Porendichte, also der Gesamtanzahl der Stomata pro Blattfläche und der maximalen Öffnungsweite. Bei den meisten Pflanzen bewegt sich dieses Porenareal zwischen 0,5 und 1,2% der gesamten Blattoberfläche (Larcher, 2001). Beim intakten Blatt ist davon auszugehen, dass selbst in völliger Dunkelheit nicht alle Stomata perfekt geschlossen sind (Larcher, 2001). Unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen kann außerdem durch den osmotischen Gradienten Wasser aus der Rezeptorlösung in die Schließzellen diffundieren, was zu einer zusätzlichen Öffnung der Poren führen kann. Somit kann hier ein Porenareal von 1% angenommen werden.

In Kapitel 4.6 wurde gezeigt, dass der Leitwert eines Moleküls mit $MV = 0$ für die ungehinderte Permeation durch einen Wasserfilm etwa 7 Größenordnungen über der für die gehinderte Permeation durch Kutikularmembranen des Efeus liegt. Ein verfügbares Porenareal von 1% der gesamten Blattoberfläche, über das eine ungehinderte Diffusion - vergleichbar mit der freien Diffusion in Wasser - stattfinden kann, würde also die Flussraten um mehrere Größenordnungen (5 Größenordnungen für $MV = 0$) erhöhen. Da im vorliegenden Versuch aber

lediglich eine Verdopplung der Flussraten beobachtet wurde, kann die stomatäre Pore als Permeationsweg für wasserlösliche Substanzen ausgeschlossen werden. Schönherr und Bukovac (1972) zeigten drei Gründe auf, warum die stomatären Poren unter natürlichen Bedingungen nicht von wässrigen Lösungen infiltriert werden können, und damit nicht als Permeationsweg in Frage kommen. Zum einen ist die stomatäre Höhle bis ins Innere des Blattes von der lipophilen Kutikula überzogen (Abbildung 3.17B), was eine sehr geringe Benetzbarkeit (i) zur Folge hat. Außerdem haben wässrige Lösungen sehr hohe Oberflächenspannungen (ii), was in Kombination mit der Geometrie (iii) der stomatären Pore eine Infiltration verhindert. Die Tatsache, dass die stomatäre Höhle und die Interzellularräume des Schwammparenchyms mit Gas gefüllt sind (Nultsch, 1995) verhindert zusätzlich eine Infiltration der Stomata (Franke, 1967). Selbst wenn die Lösung durch den Zusatz von Benetzungsmitteln in die stomatäre Höhle eindringt (Schönherr & Bukovac, 1972), sind die gelösten Stoffe noch nicht in die Zellen aufgenommen. Auch hier muss eine Permeation durch die Kutikula innerhalb der stomatären Pore stattfinden. Daher wird spekuliert, dass die Kutikula über den Schließ- und Begleitzellen permeabler ist (Sargent & Blackman, 1962; Schönherr & Bukovac, 1978; Schlegel *et al.*, 2006), als die Kutikula über den umgebenden Epidermiszellen was zu höheren Permeabilitäten der mit Stomata versehenen Blattoberflächen führt. Die Gründe hierfür können in (i) einer Änderung der Transporteigenschaften des polaren Weges, (ii) einem erhöhten Anteil an polaren Strukturen oder (iii) einer reduzierten Wachseinlagerung liegen (Karbalková *et al.*, 2008).

- (i) Da die auf beiden Blattseiten gemessenen Flussraten exakt korrelieren, ist nicht davon auszugehen, dass die Unterschiede auf veränderte Transporteigenschaften zurückzuführen sind.
- (ii) Schlegel *et al.* (2005) zeigten, dass eine Applikation von Silbernitratlösung auf intakte Blätter zu vermehrten Silberchloridpräzipitaten in den Schließ- und Begleitzellen führten, und schlossen daraus, dass es in der Kutikula über den Stomata eine höhere Dichte an polaren Wegen gibt. Die Möglichkeit einer erhöhten Ausfällung aufgrund einer erhöhten Konzentration an Cl⁻-Ionen in den Schließzellen wurde dabei allerdings nicht diskutiert. Ein direkter Nachweis einer erhöhten Polysaccharid- und

Zellulosemenge in der Kutikula über den Schließzellen konnte also bis jetzt nicht erbracht werden.

- (iii) Ein Vergleich der Dichte der isolierten Kutikularmembranen zeigt deutlich, dass sich die Kutikula auf beiden Seiten der Efeublätter unterscheidet. Verglichen mit der Oberseite ($0,61 \pm 0,06 \text{ mg cm}^{-2}$, Kapitel 3.1.1) ist das Gewicht der Kutikula auf der Unterseite der Blätter höchstsignifikant auf $0,46 \pm 0,02 \text{ mg cm}^{-2}$ reduziert (T-Test, $p > 0,001$, FG = 27). Eine weiterführende Analyse der Wachs- und Polysaccharidmenge könnte hier eine Erklärung für die erhöhte Permeation erbringen. Denkbar wäre dabei, dass die Wachsmenge auf der Blattunterseite reduziert ist, wodurch die polaren Wege weniger stark blockiert sind. Ähnlich wie bei der Wachsextraktion (Kapitel 4.6) hätte das eine erhöhte Porosität und eine reduzierte Tortuosität des polaren Weges zur Folge. Ein qualitativer Unterschied in der Wachszusammensetzung hätte wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Permeabilität für polare Substanzen. Das konnte jedenfalls für die Wasserpermeation durch Efeumembranen gezeigt werden (Hauke & Schreiber, 1998).

Im ökologischen Kontext betrachtet, ist eine stärkere Barrierefunktion der Kutikula auf den adaxialen Seiten der Blätter von Vorteil, da diese einer intensiveren Sonneneinstrahlung und stärkeren physikalischen Beanspruchung ausgesetzt sind. Durch Regen oder Tauablagerungen kann auf der Oberseite der Blätter zusätzlich das *Leaching* gefördert werden.

4.7.3 Leaching unter natürlichen Bedingungen – *non-steady-state*

Auch unter naturnahen Umweltbedingungen die in der Klimakammer nachgestellt wurden, war auf den Blattoberflächen von Efeutrieben eine zeitabhängige Zunahme der Aminosäuremenge zu erkennen (Abbildung 3.13). Hier standen die Blätter nicht in direktem Kontakt mit einer wässrigen Lösung sondern waren lediglich einer Luftfeuchtigkeit von 70% ausgesetzt. Unter dem Binocular zeigte sich allerdings ein leichter Schimmer auf den Blättern, der auf einen dünnen Wasserfilm auf der Oberfläche hinweisen könnte. Dieser könnte durch die hygroskopischen Eigenschaften von auf der Blattoberfläche abgelagerten Substanzen entstehen und eine Dehydratisierung der polaren, kutikulären Komponenten auf der Blattoberfläche verhindern.

Im Gegensatz zu den *steady-state* Versuchen waren die berechneten Aminosäureflussraten unter *non-steady-state* Bedingungen deutlich reduziert (Tabelle 3.8). Die Flussraten die unter den verschiedenen Bedingungen für die einzelnen Aminosäuren bestimmt wurden, korrelieren allerdings positiv miteinander,

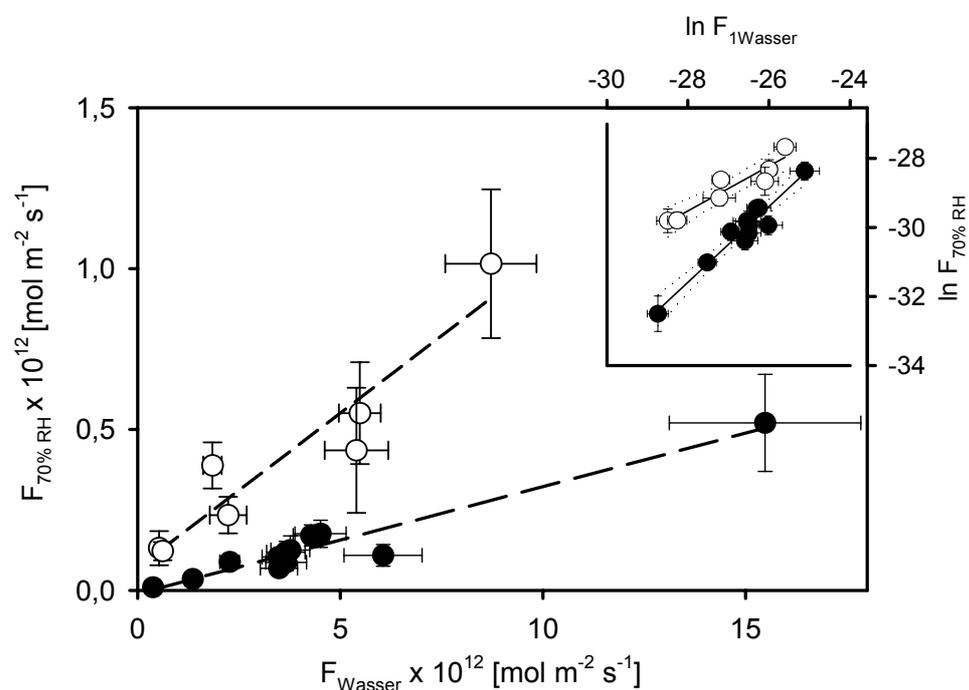


Abbildung 4.22: Zusammenhang zwischen den Flussraten von Aminosäuren bei 100% (flüssiges Wasser) und 70% Luftfeuchtigkeit (RH), bestimmt mit intakten Efeublättern (MW \pm 95% CI). Die weißen Symbole stehen für die Aminosäuren Alanin, Glycin, Prolin, Glutamin, Glutaminsäure, Ornitin und Histidin. Die schwarzen Symbole für die übrigen Aminosäuren. Beide Gruppen ergeben unterschiedliche Regressionsgeraden (Gleichungen siehe Text).

wobei sich 2 Cluster mit unterschiedlichen Zusammenhängen bilden (Abbildung 4.22). Die Regression für die Aminosäuren Alanin, Glycin, Prolin, Glutamin, Glutaminsäure, Ornitin und Histidin folgt der Beziehung:

$$F_{70\%RH} = 0,096 \times F_{Wasser} + 0,7 \times 10^{-11} \quad (r^2 = 0,90)$$

wobei die Steigung etwa 3mal so groß ist wie bei den übrigen Aminosäuren deren Regression eine Gerade mit der Formel:

$$F_{70\%RH} = 0,033 \times F_{Wasser} - 0,1 \times 10^{-11} \quad (r^2 = 0,93) \text{ ergibt.}$$

Der Versuch zeigt eindeutig dass auch unter natürlichen Bedingungen kontinuierlich Aminosäuren aus dem Blattinneren auf der Oberfläche akkumulieren. Damit stehen also auf Blattoberflächen Nährstoffe zur Verfügung, die blattassoziierten Mikroorganismen eine erfolgreiche Besiedlung ermöglichen können. Wie Abbildung 4.23 zeigt, waren auf den Oberflächen der Efeublätter tatsächlich Pilze und Bakterien vorhanden, die ihrerseits die Nährstoffzusammensetzung auf der Blattoberfläche modifizieren könnten. Zucker oder Aminosäuren können dabei selektiv verstoffwechselt, und die entsprechenden Abbauprodukte sezerniert werden.

Bei *Leaching*versuchen, bei denen die Blätter vollständig untergetaucht waren, sollte die Zugabe von Natriumazid das Wachstum von Mikroorganismen und somit den Abbau der Aminosäuren verhindern.

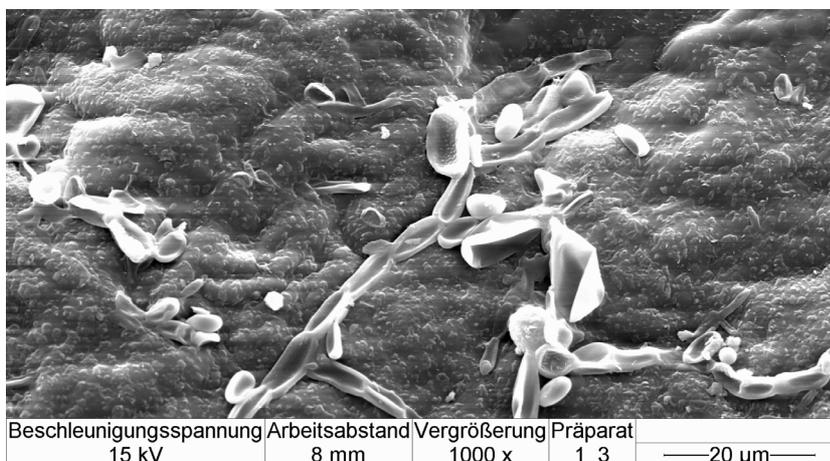


Abbildung 4.23: REM-Aufnahmen von Pilzhyphen und Bakterien auf der Oberfläche eines Efeublattes. Durch den Trocknungsprozess für die Vorbereitung der Probe sind die Strukturen deformiert.

Dieser Unterschied könnte erklären, warum es beim Vergleich der Aminosäureflussraten, die unter *steady-state*- und unter natürlichen Bedingungen bestimmt wurden, zwei unterschiedliche Korrelationen gibt.

Einen wichtigen Faktor stellen außerdem die physico-chemischen Eigenschaften der Aminosäuren dar, die das Auskristallisieren auf der Oberfläche beeinflussen. Chan *et al.* (2005) untersuchten die hygroskopischen Eigenschaften von 7 Aminosäuren und konnten zeigen, dass die Luftfeuchtigkeit, bei der die Aminosäuren komplett in Lösung gehen und in flüssigem Zustand vorliegen (DRH%: deliquescence relative humidity), bei über 93% liegt. Im Gegensatz dazu variieren die Bedingungen unter denen die Aminosäuren wasserfreie Kristalle bilden (CRH%: crystallization relative humidity) sehr stark. Während Alanin (67,3-70,8% RH) und Glutamin (72,1-74,7% RH) schon bei vergleichsweise hoher Luftfeuchtigkeit auskristallisieren, liegt die entsprechende Luftfeuchtigkeit bei Threonin (42,2-47,3% RH) und Serin (27,6-30,8% RH) weit unterhalb der im vorliegenden *Leaching*experiment vorherrschenden Luftfeuchtigkeit von 70%. Arginin und Asparagin sind so stark hygroskopisch, dass sie selbst unterhalb von 10% Luftfeuchtigkeit noch in hydratisierter Form vorliegen.

Diese Eigenschaften könnten das Auswaschen von Aminosäuren aus dem Blatt in folgender Weise beeinflussen:

Liegen die Aminosäuren auf der Blattoberfläche in gelöster Form vor, so bilden sich in den winzigen Volumina über dem Permeationsweg sehr schnell hohe Konzentrationen, die die treibende Kraft für die Permeation reduzieren. Kristallisieren die Aminosäuren allerdings aus, so werden sie dem System entzogen wodurch der Gradient, der durch die Konzentration der Aminosäuren im Apoplasten bestimmt ist, aufrechterhalten wird. Das könnte die unterschiedlichen Zusammenhänge erklären, die sich bei der Auftragung der Flussraten, die mit flüssigem Wasser und bei 70% RH gemessen wurden, ergeben (Abbildung 4.22). Alanin und Glutamin gehören in der Tat zu der Gruppe der Aminosäuren, deren Korrelation eine größere Steigung aufweist, während die stärker hygroskopischen Aminosäuren Serin, Threonin, Arginin und Asparagin zu der 2 Gruppe mit geringerer Steigung zählen. Eine weiterführende quantitative Analyse der Beziehung zwischen *Leaching* und CRH% ist im Moment

nicht möglich, da nicht genügend Informationen über die hygroskopischen Eigenschaften aller involvierten Aminosäuren vorliegen.

5 Zusammenfassung

Um sich vor dem Austrocknen zu schützen, haben Pflanzen eine Transpirationsbarriere entwickelt, die als Membran alle primären, oberirdischen Pflanzenteile überzieht. Diese so genannte Kutikula besteht hauptsächlich aus den lipophilen Komponenten Kutin und Wachs und reduziert so effektiv den Verlust von Wasser und wasserlöslichen Nährstoffen aus dem Blattinneren. Trotzdem ist sie nicht vollständig undurchlässig, und so können Wasser und gelöste Substanzen wie organische und anorganische Nährstoffe, Pestizide oder Umweltchemikalien die Kutikula in beiden Richtungen permeieren.

Dabei ist offensichtlich, dass die zu Grunde liegenden Transportmechanismen den Ernährungszustand der Pflanzen, die Effizienz von Pestiziden und die Wirkung von Umweltchemikalien beeinflussen. Ein genaues Verständnis der Transportprozesse auf denen die kutikuläre Permeation basiert, kann helfen die Wirkweise von blattapplizierten Dünge- und Pflanzenschutzmitteln zu optimieren, indem gezielt Wirk- oder Zusatzstoffe modelliert werden können, welche die Aufnahme steigern.

Die Permeation lipophiler Substanzen über Kutikularmembranen ist sehr gut verstanden und kann als „solution-diffusion“ Modell beschrieben werden. Der Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient als Maß für die Lipophilie einer Substanz, bestimmt dabei die Löslichkeit innerhalb der Membran. Dieses Modell konnte allerdings nicht erfolgreich auf die Permeation von sehr wasserlöslichen Stoffen übertragen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der Einfluss physiko-chemischer Eigenschaften von hydrophilen Verbindungen auf die kutikuläre Permeation untersucht werden. Nicht zuletzt wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit den blattapplizierten Herbiziden Glufosinat und Glyphosat wurden Aminosäuren als Modellsbstenzen ausgewählt. Die verwendeten Aminosäuren sind gut wasserlöslich, wobei alle Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizienten kleiner als 1 sind. Zusätzlich liegen alle Aminosäuren in gelöster Form als Ionen vor, was zu einer Hydratisierung der Moleküle führt. Es wird spekuliert, dass hydratisierte Moleküle keinen Zugang zur lipophilen Phase der Kutikula haben. Welche Rolle die Hydrathülle bei der Permeation tatsächlich spielt, ist allerdings noch unklar. Viele Aktivwirkstoffe liegen nur unter ganz bestimmten Bedingungen in geladener Form

vor, während die Richtung der kontinuierlichen Nettoladung der Aminosäuren durch den pH Wert modifiziert wird. Damit kann der Einfluss verschiedener Ladungszustände auf die kutikuläre Permeation unter Verwendung eines einheitlichen Sets von Modellsubstanzen untersucht werden. Unter natürlichen Bedingungen sind Aminosäuren unter anderem auf Blattoberflächen zu finden, wo sie blattassoziierten Mikroorganismen eine profitable Nahrungsquelle bieten. Ob äußere Faktoren für die Deposition dieser Ressourcen verantwortlich sind, oder ob der Ursprung innerhalb des Blattgewebes liegt, wird kontrovers diskutiert.

Für die Beantwortung der Fragen wurden Versuche an zwei unterschiedlichen Pflanzenarten durchgeführt, um die kutikulären Eigenschaften von robusten, winterharten (*Hedera helix*) und feinen, einjährigen (Lions-Rose®) Blättern zu vergleichen. Die Permeabilität der stabilen Efeukutikula ist im Allgemeinen 1-2 Größenordnungen niedriger als die der zarten Rosenkutikula. Die grundlegenden Permeationsprozesse folgen allerdings ähnlichen Gesetzmäßigkeiten.

Die Sorption von Aminosäuren in isolierte Kutikularmembranen ist sehr gering, und korreliert - anders als bei lipophilen Substanzen - nicht mit dem Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizienten. Das zeigt, dass der Verteilung von lipophilen und hydrophilen Substanzen innerhalb der Kutikula verschiedene Mechanismen zu Grunde liegen. Unter einer gegebenen Bedingung werden die kutikulären Leitwerte der Aminosäuren negativ vom Molvolumen beeinflusst. Zudem übersteigt die Länge des Permeationswegs die eigentliche Dicke der Membran um ein Vielfaches. Diese Zusammenhänge kennzeichnen eine gehinderte Diffusion innerhalb einer engporigen und weit verzweigten Umgebung.

Eine Änderung des pH Wertes wirkt sich in unterschiedlicher Form auf die Leitwerte von Wasser und Aminosäuren aus. Mit steigendem pH Wert erhöht sich die Wasserpermeabilität isolierter Kutikularmembranen, was durch eine zunehmende, messbare Wassersorption in die Kutikula erklärt werden kann. Eine pH abhängige Dissoziation funktioneller Gruppen bewirkt eine Schwellung des polaren Weges, weshalb auch für die anionischen Aminosäuren bei pH 11 die höchsten Leitwerte gemessen wurden. Die zwitterionischen Aminosäuren bei pH 6 wiesen hingegen die geringsten Leitwerte auf, was im Widerspruch zu der Beobachtung steht, dass bei pH 1 die geringste Wassersorption in die Kutikula stattfindet. Eine Erklärung hierfür

liefern die Hydrathüllen, die bei den zwitterionischen Aminosäuren am stärksten und bei den anionischen Species am geringsten ausgeprägt sind. Eine negative Korrelation aller gemessenen Aminosäureleitwerte mit den entsprechenden hydratisierten Molvolumen zeigt eindeutig, dass die Hydrathülle eine wichtige Größe für die Permeation durch die Kutikula darstellt. Dabei nimmt der Leitwert einer hydrophilen Substanz mit definiertem Molvolumen mit kleiner werdender Hydrathülle zu.

Eine Ausnahme konnte für die Permeabilitäten von Kutikularmembranen der Rose bei pH 1 beobachtet werden. Hier waren die Leitwerte einiger Aminosäuren positiv durch den Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizienten bestimmt. Somit gibt es keine eindeutige Trennung zwischen einem polaren und einem lipophilen Weg. Aminosäuren mit besonders lipophilen Seitengruppen können, trotz ihrer Ladung am Grundgerüst, teilweise in die lipophilen Bestandteile der Kutikula sorbiert werden. Abhängig von der Verfügbarkeit des hydrophilen oder des lipophilen Weges findet die kutikuläre Permeation also als gehinderte Diffusion in einer wässrigen Umgebung, angetrieben durch einen Verteilungsprozess in der lipophilen Phase oder als Kombination aus beiden Mechanismen statt.

Einige Wissenschaftler stellen in Frage, ob Experimente mit isolierten Kutikularmembranen tatsächlich die Permeationsprozesse reflektieren, die in intakten Pflanzen stattfinden, da der Isolationsprozess die Membraneigenschaften verändern könnte. Um zu überprüfen in wie weit mit einer solchen Methode zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können, wurden zusätzliche *Leaching*experimente mit intakten Blättern durchgeführt.

Die intakten Blätter wurden in flüssiges Wasser als Rezeptorlösung getaucht, um *steady-state* Bedingungen aufrecht zu erhalten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Permeabilitäten von intakten Kutikularmembranen, die anhand der natürlichen Aminosäurekonzentration innerhalb der Blätter bestimmt wurden, in derselben Größenordnung liegen, wie die für isolierte Membranen gemessenen. Außerdem konnte ein Vergleich der Flussraten auf der Ober- und Unterseite der Blätter zeigen, dass die stomatären Poren nicht direkt in den *Leaching*prozess involviert sind.

In zusätzlichen *Leaching*experimenten, in denen natürliche Umweltbedingungen in Bezug auf Licht, Luftfeuchtigkeit und Temperatur simuliert wurden, waren die

resultierenden Flussraten zwar reduziert, korrelierten aber positiv mit den Werten, die in *steady-state* Experimenten gemessen wurden.

Somit konnte gezeigt werden, dass Aminosäuren und demzufolge auch andere Stoffwechselprodukte und Nährstoffe, die auf Blattoberflächen zu finden sind, in der Tat aus dem Blattinneren stammen. Die zugrunde liegenden Permeationsmechanismen können dabei unter kontrollierten Bedingungen anhand von isolierten Kutikularmembranen untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse können unter anderem angewendet werden, um landwirtschaftliche Erträge zu verbessern und die Verbreitung von Umweltchemikalien zu kontrollieren.

6 Summary

In order to overcome the risk of withering, all primary, aerial plant parts are bordered against the atmosphere with a transpiration barrier membrane, the so called cuticle. It is mainly composed of the lipophilic compounds cutin and waxes and therefore ensure an essentially reduction of uncontrolled loss of water and water soluble metabolites from plant tissues. Nevertheless, the cuticle is partially permeable for water and solutes like organic and inorganic nutrients, pesticides or environmental chemicals, and the flow can occur in both directions.

It is obvious, that the basic transport processes are important for the survival of plants, agricultural success or environmental pollution. Therefore, the knowledge of the mechanisms, underlying cuticular permeation, can improve the effectiveness of foliar applied nutrients and pesticides, in the way of modelling ideal active ingredients or additives to enhance cuticular uptake.

It is well known that the transport of lipophilics across lipophilic cuticular membranes can be described by a simple solution-diffusion model with the octanol/water partition coefficient provides the main parameter determining the solubility within the membrane. However, a successful application of this model for permeation processes of hydrophilics failed.

In the present study amino acids were used as model compounds to understand the influence of the physico-chemical properties of hydrophilic solutes on cuticular permeability. This is not only because of their structural similarity to foliar applied herbicides like glyphosate and glufosinate. Amino acids are water soluble with octanol/water partition coefficients always smaller than 1 and they carry charges. The resulting hydration of the molecules renders them insoluble in the waxy layer of the cuticle and therefore the actual role of the associated hydration shell for cuticular permeation is still questionable. In contrast to many active ingredients, which are ionised only under certain conditions, the continuous net charge of amino acids is modified by pH. This provides an insight into the effect of anionic, zwitterionic and cationic properties on cuticular permeability by using the same set of solutes. Furthermore, amino acids are frequently found on leaf surfaces where leaf associated microorganisms benefit from their nutritional significance. It is still

controversial, if amino acids originate from airborne particles or from the underlying leaf tissue.

In order to answer the questions, two plant species were chosen to compare cuticular characteristics of hardy, evergreen (*Hedera helix*) or smooth, annual (Lions-Rose®) leaves, which have to overcome different environmental conditions.

While the overall permeability of the strong ivy cuticle is 1-2 orders of magnitudes less than for the thin rose cuticle, the basic mechanisms seem to be constitutive.

The sorption of amino acids into isolated cuticular membranes was very low and cuticle/water partition coefficients were not correlated to octanol/water partition coefficients, as is true for lipophilic solutes. This proves the existence of two different mechanisms for cuticular penetration of lipophilic and hydrophilic solutes. Under a given condition, permeances were determined by the molar volume of the amino acids and the pathway was much longer than the membrane thickness, which indicates a hindered diffusion in a porous and tortuous environment.

Permeances for water and amino acids were affected by pH but in different ways. The water permeance increased with increasing pH which can be explained by a higher water sorption caused by dissociation of weak acidic groups within the cuticle above pH 6. Due to the maximum swelling of the pathway at pH 11 amino acid permeances were highest for the anionic form. Surprisingly, permeances were lowest for the zwitterionic species at intermediate pH and not for the cationic amino acids at pH 1 where the least water sorption occurs. The reason becomes obvious, when - next to the molar volume of the amino acids - the hydration shell is taken into account. Since the zwitterionic species at pH 6 possess the biggest and the anionic amino acids the smallest hydration shells, overall permeances are well correlated with the hydrated molar volume.

Thus, it was shown that the hydration shell plays an important role in cuticular permeability in the way that smaller hydration shells favour an increase in permeances, given that the molar volume of the “naked” molecule remain constant.

One exception was found for the amino acid permeability of isolated rose cuticles at pH 1. The fact, that under this condition, permeances are partially controlled by octanol/water partition coefficient shows clearly, that the lipophilic and the hydrophilic

pathway are not strictly separated from each other. Amino acids with large lipophilic side chains can also benefit from partitioning within the lipophilic phase of the cuticle. Hence, depending on the availability of either one of the two pathways, permeation is driven by hindered diffusion in an aqueous environment without phase transition, or partitioning within the lipophilic phase of the cuticle or even a combination of both.

It is still a matter of debate, if permeation experiments with isolated cuticular membranes reflect the real situation in intact plants, because isolation processes could alter cuticular properties. To proof the authority of this set up, additional leaching experiments were performed with intact leaves.

It was shown that permeances of intact cuticles, which were driven by the natural amino acid content in the leaf tissue, are in deed in the same order of magnitude as for isolated cuticular membranes, when liquid water was used as receiver. Furthermore, a comparison between fluxes from the upper and the lower leaf side showed that stomatal pores are not directly involved into the leaching process.

In additional leaching experiments, natural conditions concerning humidity, temperature and light, were simulated. The resulting efflux of amino acids was reduced, but positively correlated with values determined within experiments, where leaves were put under water to establish *steady-state* conditions.

Consequently, amino acids and in conclusion other metabolites and nutrients which are common on leaf surfaces, in deed originate from the leaf tissue, and the underlying mechanisms can be investigated by performing experiments with isolated cuticular membranes. The outcomes can be applied to enhance agricultural success and control environmental pollution.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham M.H., McGowan J.C.** (1987). The Use of Characteristic Volumes to Measure Cavity Terms in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 23: 243-246
- Adam N.K.** (1993). Principles of water repellency. In: Moilliet J.L. (ed.) *Waterproofing and Water-Repellency*. Elsevier, Amsterdam, London, pp 1-23
- Aegerter B.J., Nuñez J.J., Davis R.M.** (2002). Detection and management of downy mildew in rose rootstock. *Plant Disease*, 86: 1363-1368
- Aziz E., Ottosson N., Faubel M., Hertel I.V., Winter B.** (2008). Interaction between liquid water and hydroxide revealed by core-hole de-excitation. *Nature*, 455: 89-91
- Barthlott W., Neinhuis C.** (1997). Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta*, 202: 1-8
- Bauer H., Schönherr J.** (1992). Determination of Mobilities of Organic-Compounds in Plant Cuticles and Correlation with Molar Volumes. *Pesticide Science*, 35 (1): 1-11
- Baur P., Marzouk H., Schönherr J., Bauer H.** (1996). Mobilities of organic compounds in plant cuticles as affected by structure and molar volumes of chemicals and plant species. *Planta*, 199 (3): 404-412
- Baur P., Marzouk H., Schönherr J., Grayson B.T.** (1997). Partition Coefficients of Active Ingredients between Plant Cuticle and Adjuvants as Related to Rates of Foliar Uptake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (9): 3659-3665
- Beatti G.A., Lindow S.E.** (1995). The secret of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 145-172
- Beatti G.A., Lindow S.E.** (1999). Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89: 353-359
- Beck R.E., Schultz J.S.** (1972). Hindrance of solute diffusion within membranes as measured with microporous membranes of known pore geometry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 255: 273-303
- Becker M., Kerstiens G., Schönherr J.** (1986). Water permeability of plant cuticles: permeance, diffusion and partition coefficients. *Trees*, 1: 54-60
- Buchholz A., Baur P., Schönherr J.** (1998). Differences among plant species in cuticular permeabilities and solute mobilities are not caused by differential size selectivities. *Planta*, 206 (2): 322-328
- Bukovac M.J., Petracek P.D.** (1993). Characterizing pesticide and surfactant penetration with isolated plant cuticles. *Pesticide Science*, 37 (2): 179-194

- Burakowski A., Glinski J.** (2007). Hydration numbers of non-electrolytes – Application of the acoustic method of Pasynski. *Chemical Physics Letters*, 332 (2-3): 336-340
- Burakowski A., Glinski J.** (2008). Hydration of the Zwitterionic Forms of Amino Acids from the Acoustic Passynski Method. *Acta Physica Polonica A*, 114 (6A): 39-44
- Burghardt M., Riederer M.** (2003). Ecophysiological relevance of cuticular transpiration of deciduous and evergreen plants in relation to stomatal closure and leaf water potential. *Journal of Experimental Botany*, 54 (389): 1941-1949
- Burghardt M., Riederer M.** (2006). Cuticular Transpiration. In: Riederer M., Müller C. (eds) *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 292-311
- Butler D.R.** (1996). The presence of water on leaf surfaces and its importance for microbes and insects. In: Kerstiens G. (ed.) *Plant Cuticles: an integrated functional approach*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.
- Carver T.L.W., Gurr S.J.** (2006). Filamentous fungi on plant surfaces. In: Riederer M., Müller C. (eds) *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 368-397
- Chamel A., Pineri M., Escoubes M.** (1991). Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant, Cell and Environment*, 14: 87-95
- Chan M.N., Choi M.Y., Ng N.L., Chan C.K.** (2005). Hygroscopicity of Water-Soluble Organic Compounds in Atmospheric Aerosols: Amino Acids and Biomass Burning Derived Organic Species. *Environmental Science Technology*, 39 (6): 1555-1562
- ChemAxon** (2008). Marvin, Calculator plugin and Chemical Terms Demo. In: *MarvinSketch 5.1.2*: ChemAxon Ltd.
- Cicchetti E., Merle P., Chaintreau A.** (2008). Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database. *Flavour and Fragrance Journal*, 23: 450-459
- Cioaca C., Margineanu C., Cucu V.** (1978). Saponins of *Hedera Helix* with antibacterial activity. *Pharmazie*, 33(9): 609-610
- Coyier D.L.** (1983). Control of Rose Powdery Mildew in the Greenhouse and Field. *Plant Disease*, 67: 919-923
- Dominguez E., Herédia A.** (1999). Water hydration in cutinised cell walls: a physico-chemical analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426: 168-176.
- Deamer D.W., Nichols J.W.** (1989). Proton flux mechanisms in model and biological membranes. *Journal of Membrane Biology*, 107: 91-103
- Derridj S.** (1996). Nutrients on the leaf surface. In: Morris C.E., Nicot P.C., Nguyen C.N. (eds.) *Aerial Plant Surface Microbiology*. Plenum Press, New York, pp 25-41
- Eichert T., Goldbach H.E., Burkhardt J.** (1998). Evidence for the uptake of large anions through stomatal pores. *Botanica Acta*, 111 (6): 461-466

Eichert T., Goldbach H.E. (2008). Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces – further evidence for a stomatal pathway. *Physiologia Plantarum*, 132: 491-502

Eigenbrode S.D., Espelie K.E. (1995). Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annual Review of Entomology*, 40:171-194

Fauchère J.L., Quang D.O.K., Jow P.Y.C., Hansch C. (1980). Unusually strong lipophilicity of 'fat' or 'super' amino-acids, including a new reference value for glycine. *Experientia*, 36: 1203-1204

Fengel D. (1985). Cellulose. In: Burchard W. (ed.) *Polysaccharide – Eigenschaften und Nutzung*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp: 15-24

Fiala V., Glad C., Martin M., Jolivet E., Derridj S. (1990). Occurrence of Soluble Carbohydrates on the Phylloplane of Maize (*Zea-Mays L.*) - Variations in Relation to Leaf Heterogeneity and Position on the Plant. *New Phytologist*, 115 (4): 609-615

Fischer-Parton S., Parton R.M., Hickey P.C., Dijksterhuis J., Atkinson H.A., Read N.D. (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy-Oxford*, 198: 246-259

Ford D.M., Glandt E.D. (1995). Steric hindrance at the entrances to small pores. *Journal of Membrane Science*, 107: 47-57

Franke W. (1967). Mechanisms of foliar penetration of solutes. *Annual Review of Plant Physiology*, 18: 281-300

Gulyaeva N., Zaslavsky A., Lechner P., Chait A., Zaslavsky B. (2003). PH dependence of the relative hydrophobicity and lipophilicity of amino acids and peptides measured by aqueous two-phase and Oktanol-buffer partitioning. *Journal of Peptide Research* 61: 71-79.

Hauke V., Schreiber L. (1998). Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix L.*) sun and shade leaves. *Planta*, 207: 67-75

Helfferrich F. (ed) (1962). *Ion Exchange*. McGraw-Hill Book Company.

Hoch H.C. (1975). Ultrastructural alterations observed in isolated apple leaf cuticles. *Canadian Journal of Botany*, 53: 2006-2013

Hock B., Fedtke C., Schmidt R.R. (1995). *Herbizide: Entwicklung, Anwendung, Wirkungen, Nebenwirkungen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Holloway P.J. (1982). Structure and histochemistry of plant cuticular membranes. In: Cutler D.F., Alvin K.L., Price C.E. (eds.) *The plant cuticle*. Academic Press, London, UK, pp 1-32

Holloway P.J. (1994). Plant Cuticles: Physicochemical Characteristics and Biosynthesis. In: Percy K.E., Cape J.N., Jagels R., Simpson C.J. (eds.) *Air pollutants and the leaf cuticle*. Vol. 36. Springer-Verlag, Berlin, pp 1-13

- Holloway P.J.** (1969a). The effects of superficial wax on leaf wettability. *Annals of Applied Biology*, 63: 145-153
- Holloway P.J.** (1969b). Chemistry of leaf waxes in relation to wetting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20: 124-128
- Jeffree C.E.** (1996). Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Kerstiens G. (ed.) *Plant Cuticles: an integrated functional approach*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.
- Jeffree C.E.** (2006). The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer M., Müller C. (eds.) *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 11
- Kamp H.** (1930). Untersuchungen über Kutikularbau und kutikuläre Transpiration von Blättern. *Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik*, 72: 403-465
- Kannan S.** (1969). Penetration of Iron and Some Organic Substances Through Isolated Cuticular Membranes. *Plant Physiology*, 44 (4): 517-521
- Karbulková J., Schreiber L., Macek P., Šantrůček J.** (2008). Differences between water permeability of astomatous and stomatous cuticular membranes: effects of air humidity in two species of contrasting drought-resistance strategy. *Journal of Experimental Botany*, 59 (14): 3987–3995
- Kerler F., Riederer M., Schönherr J.** (1984). Non-Electrolyte Permeability of Plant Cuticles - a Critical-Evaluation of Experimental Methods. *Physiologia Plantarum*, 62 (4): 599-606
- Kerler F., Schönherr J.** (1988a). Accumulation of lipophilic chemicals in plant cuticles: Prediction from Oktanol/water partition coefficients. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17: 1-6
- Kerler F., Schönherr J.** (1988b). Permeation of lipophilic chemicals across plant cuticles: Prediction from Oktanol/water partition coefficients and molecular volumes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17: 7- 12.
- Kerstiens G.** (1996). Cuticular water permeability and its physiological significance. *J. Exp. Bot.*, 47: 1813-1832.
- Kerstiens G., Lenzian K.J.** (1989). Interactions between ozone and plant cuticles : II. Water permeability. *New Phytologist*, 112 (1): 21-27
- Kirkwood R.C.** (1993). Use and mode of action of adjuvants for herbicides: A review of some current work. *Pesticide Science*, 38, 93-102.
- Knoll D., Schreiber L.** (2004). Methods for analysing the interaction between epiphyllic microorganisms and leaf cuticles. In: Varma A., Abbott L., Werner D., Hampp R., (eds.) *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp:471-488
- Kolattukudy P.E.** (1984). Biochemistry and function of cutin and suberin. *Canadian Journal of Botany*, 62: 2918-2933

-
- Kollmann J., Grubb P.J.** (1999). Recruitment of fleshy-fruited species under different shrub species: Control by under-canopy environment. *Ecological Research*, 14: 9-21
- Krauss P., Markstätter C., Riederer M.** (1997). Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant, Cell and Environment*, 20: 1079-1085
- Krüger H., van Rensburg L., Peacock J.** (1996). Cuticular membrane fine structure of *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Annals of Botany*, 77: 11-16
- Larcher W.** (2001). *Ökophysiologie der Pflanzen*. 6. Auflage, Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co.
- Lendzian K.J., Kerstiens G.** (1991). Sorption and transport of gases and vapors in plant cuticles. Review
- Leo A.J.** (1993). Calculating log Poct from structures. *Chemical Reviews*, 93: 1281-1306.
- Leo A.J., Hansch C., Elkins D.** (1971). Partition Coefficients and their uses. *Chemical Reviews*, 71 (6): 525-616
- Leveau J.H.J.** (2006). Microbial communities in the phyllosphere. In: Riederer M., Müller C. (eds) *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 334-367
- Lewis M.W., Robalino I.V., Keyhani N.O.** (2009). Uptake of the fluorescent probe FM4-64 by hyphae and haemolymph-derived in vivo hyphal bodies of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 155: 3110-3120
- Lide D.R.** (ed) (1992-1993). *Handbook of Chemistry and Physics*, 73rd Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida. p 7-1
- Lindow S.E., Leveau J.H.J.** (2002). Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 238-243
- Lindow S.E., Brandl M.T.** (2003). *Microbiology of the Phyllosphere*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1875-1883
- Lippold B.C., Gunder W., Lippold B.H.** (1999). Drug release from diffusion pellets coated with the aqueous ethyl cellulose dispersion aquacoat (R) ECD-30 and 20% Dibutyl Sebacate as plasticizer: partition mechanism and pore diffusion. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 47 (1): 27-32
- Lolle S.J., Cheung A.Y., Sussex I.M.** (1992). Fiddlehead: An *Arabidopsis* mutant constitutively expressing an organ fusion program that involves interactions between epidermal cells. *Developmental Biology*, 152: 383-392
- Longworth L.G.** (1953). Diffusion Measurements, at 25, of Aqueous Solutions of Amino Acids, Peptides and Sugars. *Journal of American Chemical Society*, 75: 5705-5709

- Lourens J.A.J., Reynhardt E.C.** (1979). NMR investigation of Fischer-Tropsch waxes. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 12 (11): 1963-1972
- Lüttge U.** (1973). *Stofftransport der Pflanzen*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Luque P., Gavara R., Herédia A.** (1995). A study of the hydration process of isolated cuticular membranes. *New Phytologist*, 129 (2): 283-288
- Majester-Savornin B., Elias R., Diaz-Lanza A.M., Balansard G., Gasquet M., Delmas F.** (1991). Saponins of the Ivy Plant, *Hedera helix*, and their Leishmanicidal Activity. *Planta Medica*, 57 (3): 260-262
- Manners J.G., Hossain S.M.M.** (1963). Effects of temperature and humidity on conidial germination in *Erysiphe graminis*. *Transactions of the British Mycological Society*, 46: 225-234
- Maréchal Y., Chamel A.** (1996). Water in a biomembrane by infrared spectrometry. *Journal of Physical Chemistry*, 100: 8551-8555.
- Maréchal Y., Chamel A.** (1997). Interaction configurations of H₂O molecules absorbed in isolated plant cuticles by infrared spectrometry. *Biospectroscopy*, 3 (2): 143-153.
- Marga F., Pesacreta T.C., Hasenstein K.H.** (2001). Biochemical analysis of elastic and rigid cuticles of *Cirsium Horridulum*. *Planta*, 213: 841-848
- Martin J.T., Juniper B.E.** (eds.) (1970). *The cuticles of plants*. Edward Arnold, London
- McGowan J.C., Mellors A.** (1986). *Molecular volumes in Chemistry and Biology: applications, including partitioning and toxicity*. Ellis Horwood, Chichester
- Mercier J., Lindow S.E.** (2000). Role of leaf sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1): 369-374
- Mérida T., Schönherr J., Schmidt H.W.** (1981). Fine structure of plant cuticles in relation to water permeability: The fine structure of the cuticle of *Clivia miniata* Reg. Leaves. *Planta*, 151: 259-267
- Metcalf D.J.** (2005). *Hedera helix* L.. *Journal of Ecology*, 93:632-648
- Middleton L.J., Sanderson J.** (1965). The Uptake of Inorganic Ions by Plant Leaves. *Journal of Experimental Botany*, 16: 197-215
- Miller R.H.** (1986). The prevalence of pores and canals in leaf cuticular membranes: 2. Supplemental studies. *Annals of Botany*, 57: 419-434
- Mitragotri S.** (2003). Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *Journal of Controlled Release*, 86: 69-92

Molecular Probes – Invitrogen detection Technologies (2003). Product information, NBD- and BODIPY Dye-Labeled Sphingolipids. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01154.pdf>

Molecular Probes – Invitrogen detection Technologies (2005). Product Information, FM® Lipophilic Styryl Dyes. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp34653.pdf>

Moriguchi I., Hirono S., Liu Q., Nakagome I., Matsushita Y. (1992). Simple Method of calculating Oktanol Water Partition-Coefficients. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40: 127-130.

Müller C. (2006). Plant-Insect interactions on cuticular surfaces. In: Riederer M., Müller C. (eds) *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 398-422

Nawrath C. (2002). The biopolymers cutin and suberin, *The Arabidopsis Book 2002*, American Society of Plant Biologists, pp 1-14

Niederl S., Kirsch T., Riederer M., Schreiber L. (1998). Co-Permeability of 3H-Labeled Water and 14C-Labeled Organic Acids across Isolated Plant Cuticles . Investigating Cuticular Paths of Diffusion and Predicting Cuticular Transpiration. *Plant Physiology*, 116 (1): 117-123

Nobel P.S. (1991). *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press, Inc. San Diego, California, USA.

Nultsch W. (edt.) (1995). *Allgemeine Botanik*. Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.

Parker S. (1962). Relationships among cold hardiness, water-soluble protein, anthocyanins, & free sugars in *Hedera helix* L.. *Plant Physiology*, 37 (6): 809-813

Peck K.D., Ghanem A.H., Higuchi W.I. (1994). Hindered diffusion of polar molecules through and effective pore radii estimates of intact and ethanol treated human epidermal membrane. *Pharmaceutical Research*, 11: 1306-1314

Popp C. (2005). *Cuticular Transport of Hydrophilic Molecules with Special Focus on Primary Metabolites and Active Ingredients*. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Popp C, Burghardt M, Friedmann A, Riederer M. (2005). Characterization of hydrophilic and lipophilic pathways of *Hedera helix* L. cuticular membranes: permeation of water and uncharged organic compounds. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2797-2806

Potts R.O., Guy R.H. (1992). Predicting Skin Permeability. *Pharmaceutical Research*, 9: 663-669

Preston C.D., Hill M.O. (1997) The geographical relationships of British and Irish vascular plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 124: 1-120

- Reynhardt E.C., Riederer M.** (1991). Structure and molecular dynamics of the cuticular wax from leaves of *Citrus aurantium* L. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 24: 478-486
- Reynhardt E.C., Riederer M.** (1994). Structures and molecular dynamics of plant waxes II. Cuticular waxes from leaves of *Fagus sylvatica* L. and *Hordeum vulgare* L. *European Biophysics Journal*, 23: 59-70
- Riederer M.** (1995). Partitioning and transport of organic chemicals between the atmospheric environment and leaves. In: Trapp S., McFarlane J.C. (eds.) *Plant Contamination. Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp 153-190
- Riederer M., Badot P.M., Garrec J.P., Richard B., Schreiber L., Sümchen P., Uhlig M., Wienhaus O.** (1994). The plant cuticle as an interface between leaves and air-borne pollutants. *EUROSILVA - Contributions to forest tree physiology*. Editions INRA, Dourdan, pp 101-118
- Riederer M., Daiss A., Gilbert N., Köhle H.** (2002). Semi-volatile organic compounds at the leaf/atmosphere interface: numerical simulation of dispersal and foliar uptake. *Journal of Experimental Botany* 53: 1815-1823
- Riederer M., Friedmann A.** (2006). Transport of lipophilic non-electrolytes across the cuticle. In: Riederer M., Müller C. (eds) *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 249-278.
- Riederer M., Müller C.** (eds.) (2006). *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK
- Riederer M., Schönherr J.** (1984). Accumulation and transport of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in plant cuticles: I. Sorption in the cuticular membrane and its components. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8: 236-247.
- Riederer M., Schönherr J.** (1986). Covalent binding of chlorophenoxyacetic acids to plant cuticles. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, 15: 97-105
- Riederer M., Schönherr J.** (1990). Effects of surfactants on water permeability of isolated plant cuticles and on the composition of their cuticular waxes. *Pesticide Science*, 29: 85-94
- Riederer M., Schönherr J.** (1995) Die Rolle der Vegetation bei der Verteilung organischer Chemikalien in der Umwelt. In: Frenzel B., Servatius C. (eds.) *Ökosystemanalyse und Umweltforschung*, Vol 2. Fischer-Verlag, Stuttgart, pp 271-286
- Riederer M., Schreiber L.** (1995). Waxes - the transport barriers of plant cuticles. In: Hamilton R.J. (ed.) *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, Ed 1 Vol 6. The Oily Press, West Ferry, Dundee, Scotland, pp 130-156
- Riederer M., Schreiber L.** (2001). Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany*, 52: 2023-2032

Ruland A., Rohr U., Kreuter J. (1994). Transdermal delivery of the tetrapeptide Hisetal (melanotropin (6-9)) and amino acids: their contribution to the elucidation of the existence of an 'aqueous pore' pathway. *International Journal of Pharmaceutics*, 107: 23-28

Russel L.M., Ming Y. (2002). Deliquescence of small particles. *Journal of Chemical Physics*, 116 (1): 311-321

Sack L., Cowan P.D., Jaikumar N., Holbrook N.M. (2003). The 'hydrology' of leaves: co-ordination of structure and function in temperate woody species. *Plant, Cell and Environment*, 26 (8): 1343-1356

Santos S., Schreiber L., Graca J. (2007). Cuticular Waxes from Ivy Leaves (*Hedera helix* L.): Analysis of High-molecular-weight Esters. *Phytochemical Analysis*, 18: 60-69

Šantrůček J., Simánová E., Karbulková J., Simková M., Schreiber L. (2004). A new technique for measurement of water permeability of stomatous cuticular membranes isolated from *Hedera helix* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55 (401): 1411-1422

Sargent J.A., Blackman G.E. (1962). Studies on Foliar Penetration: I. Factors controlling the entry of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Experimental Botany*, 13: 348-368

Schlegel T.K., Schönherr J., Schreiber L. (2005). Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticles of *Vicia faba* leaves. *Planta*, 221 (5): 648-655

Schlegel T.K., Schönherr J., Schreiber L. (2006). Rates of Foliar Penetration of Chelated Fe(III): Role of Light, Stomata, Species, and Leaf Age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (18): 6809–6813

Schönherr J. (1976). Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores in the cutin matrix. *Planta*, 128: 113-126

Schönherr J. (1982). Resistance of plant surfaces to water loss: transport properties of cutin, suberin and associated lipids. In: Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Ziegler H. (eds.) *Encyclopedia of plant physiology*. Springer-Verlag, Heidelberg New York, pp 153-179.

Schönherr J. (2000). Calciumchloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta*, 212: 112-118.

Schönherr J. (2001). Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions and adjuvants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164 (2): 225-231

Schönherr J. (2002). A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across astomatous cuticular membranes. *Pest Management Science*, 58 (4): 343-351

Schönherr, J. (2006). Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*, 57 (11): 2471-2491

- Schönherr J., Baur P.** (1994). Modelling penetration of plant cuticles by crop protecting agents (CPA) and effects of adjuvants on rates of penetration. *Pesticide Science*, 42: 185-208
- Schönherr J., Baur P.** (1996). Cuticle permeability studies: A model for estimating leaching of plant metabolites to leaf surfaces. In: Morris C.E., Nicot P.C., Nguyen C.N. (eds.) *Aerial Plant Surface Microbiology*. Plenum Press, New York, pp 1-23
- Schönherr J., Bukovac M.J.** (1972). Penetration of Stomata by Liquids: Dependence on Surface Tension, Wettability, and Stomatal Morphology. *Plant Physiology*, 49 (5): 813-819
- Schönherr J., Bukovac M.J.** (1973). Ion exchange properties of isolated tomato fruit cuticular membrane: Exchange capacity, nature of fixed charges and cation selectivity. *Planta*, 109 (1): 73-93
- Schönherr J., Bukovac M.J.** (1978). Foliar Penetration of Succinic Acid-2,2-dimethylhydrazide: Mechanism and Rate Limiting Step. *Physiologia Plantarum*, 42: 243-251
- Schönherr J., Lenzian K.** (1981). A simple and inexpensive method of measuring water permeability of isolated plant cuticular membranes. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 102: 321-327.
- Schönherr J., Luber M.** (2001). Cuticular penetration of potassium salts: Effects of humidity, anions, and temperature. *Plant and Soil*, 236 (1): 117-122
- Schönherr J., Merida T.** (1981). Water permeability of plant cuticular membranes: the effects of humidity and temperature on the permeability of non-isolated cuticles of onion bulb scales. *Plant, Cell and Environment*, 4: 349-354
- Schönherr J., Riederer M.** (1986). Plant Cuticles Sorb Lipophilic Compounds during Enzymatic Isolation. *Plant Cell and Environment*, 9: 459-466.
- Schönherr J., Riederer M.** (1989). Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 108: 1-70.
- Schönherr J., Schreiber L.** (2004a). Interactions of calcium ions with weakly acidic active ingredients slow cuticular penetration: A case study with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (21): 6546-6551
- Schönherr J., Schreiber L.** (2004b). Size selectivity of aqueous pores in astomatous cuticular membranes from *Populus canescens* (Aiton) Sm. Leaves. *Planta*, 219: 405-411
- Schreiber L.** (2001). Effect of temperature on cuticular transpiration of isolated cuticular membranes and leaf discs. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1893-1900.
- Schreiber L.** (2002). Copermeability of ³H-labelled water and ¹⁴C-labelled organic acids across isolated *Prunus laurocerasus* cuticles: effect of temperature on cuticular path of diffusion. *Plant, Cell and Environment*, 25: 1087-1094

Schreiber L. (2005). Polar Paths of Diffusion across Plant Cuticles: New Evidence for an Old Hypothesis. *Annals of Botany*, 95: 1069-1073

Schreiber L., Bach S., Kirsch T., Knoll D., Schalz K., Riederer M. (1995). A simple photometric device analysing cuticular transport physiology: surfactant effect on permeability of isolated cuticular membranes of *Prunus laurocerasus* L.. *Journal of Experimental Botany*, 46 (293): 1915-1921

Schreiber L., Elshatshat S., Koch K., Lin J.X., Santrucek J. (2006). AgCl precipitates in isolated cuticular membranes reduce rates of cuticular transpiration. *Planta*, 223: 283-290.

Schreiber L., Krimm U., Knoll D. (2004). Interaction between Epiphyllic Microorganisms and Leaf Cuticles. In: Varma A., Abbott L., Werner D., Hampp R. (eds.) *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 145-156

Schreiber L., Schönherr J. (1992). Uptake of organic chemicals in conifer needles: Surface adsorption and permeability of cuticles. *Environmental Science and Technology* 26:153-159

Schreiber L., Schönherr J. (1993). Mobilities of organic compounds in reconstituted cuticular wax of barley leaves: Determination of diffusion coefficients. *Pesticide Science*, 38 (4): 353-361

Schreiber L., Schönherr J. (2009). *Water and Solute Permeability of Plant Cuticles*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Schreiber L., Skrabs M., Hartmann K., Diamantopoulos P., Simanova E., Santurcek J. (2001). Effect of humidity on cuticular transpiration of isolated cuticular membranes and leaf discs. *Planta*, 214: 274-282

Secor G.A., Kong M., Nyland G. (1977). Rose virus and virus-like diseases. *California Agriculture*, 31 (3): 4-7

Shepherd T., Griffiths D.W. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171: 469-499.

Städler E. (1986). Oviposition and feeding stimuli in free leaf surface waxes. In: Juniper B., Southwood R. (eds.) *Insects and the Plant Surface*. Edward Arnold, pp 105-121

Stein W.D. (edt) (1967). *The movement of molecules across cell membranes*. Academic Press, New York, London

Stock D., Holloway P.J. (1993). Possible mechanisms for surfactant-induced foliar uptake of agrochemicals. *Pesticide Science*, 38: 165-177.

Tang I.N., Munkelwitz H.R. (1993). Composition and temperature dependence of the deliquescence properties of hygroscopic aerosols. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 27 (4): 467-473

- Thomas B.J.** (1984). Rose mosaic disease: symptoms induced in roses by graft inoculation with both prunus necrotic ringspot and apple mosaic viruses. *Plant Pathology*, 33: 155-160
- Tukey H.B.** (1970). The Leaching of Substances from Plants. *Annual Revue of Plant Physiology*, 21: 305-324.
- Tukey H.B.** (1980). Some Effects of rain and mist on plants, with implications for acid precipitation. In: Hutchinson T.C., Havas M. (eds.) *Effects of acid Precipitation on terrestrial Ecosystems*, Plenum Press, New York, London, pp 141-150
- Tukey H.B., Mecklenburg R.A., Morgan J.V.** (1965). A mechanism for the leaching of metabolites from foliage. In: *Isotopes and radiation in soil-plant nutrition studies*. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp 370-385
- Tyree M.T., Scherbatskoy T.D., Tabor C.A.** (1990). Leaf cuticles behave as asymmetric membranes. *Plant Physiology*, 92: 103-109
- Verkman A.S.** (2000). Water permeability measurement in living cells and complex tissues. *Journal of Membrane Biology*, 173: 73-87
- Volkov A.G., Paula S., Deamer D.W.** (1997). Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 42: 153-160
- Wattendorf J., Holloway P.J.** (1980). Studies on the ultrastructure and histochemistry of plant cuticles: the cuticular membrane of *Agave Americana* L. in situ. *Annals of Botany*, 46: 13-28
- Wijmans J.G., Baker R.W.** (1995). The solution-diffusion model: a review. *Journal of Membrane Science*, 107 (1-2): 1-21
- www.adr-rose.de
- Yalkovsky S.H., Banerjee S.** (eds) (1992). *Aqueous Solubility: Methods of Estimation for Organic Compounds*. Marcel Dekker, INC, New York, USA.
- Yamada Y., Wittwer S.H., Bukowac M.J.** (1964). Penetration of Ions through isolated Cuticles. *Plant Physiology*, 39 (1): 28-32
- Yunger L.M., Cramer R.D.** (1981). Measurement and correlation of partition coefficients of polar amino acids. *Molecular Pharmacology* 20: 602-608.
- Zabka V., Stangl M., Bringmann G., Vogg G., Riederer M., Hildebrandt U.** (2008). Host surface properties affect prepenetration processes in the barley powdery mildew fungus. *New Phytologist*, 177: 251-263.
- Zabkiewicz J.A.** (2000). Adjuvants and herbicidal efficacy - present status and future prospects. *Weed Research*, 40 (1): 139-149

Publikationen

Arand K., Stock D., Burghardt M., Riederer M. (2010). PH-dependent permeation of amino acids through isolated ivy cuticles is affected by cuticular water sorption and hydration shell size of the solute. *Journal of Experimental Botany*: 10.1093/jxb/erq193

Müller C., Arand K. (2007). Trade-offs in oviposition choice? Food-dependent performance and defence against predators of a herbivorous sawfly. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 124 (2): 153-159

Präsentationen

Annual Progress Reports:

19.12.2006 – Syngenta AG, Bracknell, Berkshire, UK

07.11.2007 – Syngenta Crop Protection, Münchwilen, Schweiz

29.04.2008 - Syngenta AG, Bracknell, Berkshire, UK

22.04.2009 - Syngenta AG, Bracknell, Berkshire, UK

Posterpräsentation:

Arand K., Riederer M. (2009). The leaching of hydrophilic metabolites from *Hedera helix* leaves. Botanikertagung 2009, Leipzig

Curriculum vitae

Personal Information

Katja Arand	Huttenstrasse 12, 97072 Würzburg
Date of birth	01.02.1980
Place of birth	Berlin

Education

since October 2006	Research for Dissertation in the group of Prof. Dr. Markus Riederer, University of Würzburg, Department of Botany II. Topic: Characterisation of the hydrophilic pathway in plant cuticles by means of permeation properties of hydrophilic, ionic amino acids.
July 2006	Degree (Diploma) in Biology
2005 – 2006	Research for Diploma Theses in the Group of PD Dr. Caroline Müller, University of Würzburg, Department of Botany II. Topic: The specificity of the glucosinolate sequestration in the turnip sawfly <i>Athalia spp.</i> and its ecological relevance.
2003 - 2005	Advanced study period at the University of Würzburg with main focus on: Behavioral Physiology & Sociobiology, Ecophysiology & Vegetation Ecology, Animal Ecology
1999 - 2003	Basic course of studies in Biology University of Düsseldorf
1992 - 1999	High school, Gymnasium Berlin and Düsseldorf “Abitur” with main focus on: Maths, Biology, Educational Science and Arts

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Riederer für die Vergabe des Themas und die zahlreichen interessanten und erkenntnisreichen Diskussionen und Anregungen.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Dr. Markus Burghard, der mir bei Fragen und Problemen jederzeit mit hilfreichen Ideen und anregenden Diskussionen zu Versuchsaufbauten und Dateninterpretationen zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Firma Syngenta für die Finanzierung meiner Arbeit, und bei Dr. David Stock und Dr. Anushka Howell für die freundliche Unterstützung bei meinen Aufenthalten in England bedanken.

Vielen Dank auch an Andrew Brown (Syngenta) der mir faszinierende Einblicke in die Welt der Mikrostrukturen und die Funktionsweise von Rasterelektronenmikroskopen gewährt hat.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht auch an die gesamte Doktorandenschaft der Botanik II, die mich sowohl auf fachlicher als auch auf persönlicher Ebene sehr unterstützt haben, und die mich mit Freude an meine Zeit als Doktorandin zurück denken lassen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit nach bestem Wissen und Gewissen selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem Zeitpunkt einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre hiermit, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Katja Arand