

**Die Bedeutung tonoplastenständiger  
Ca<sup>2+</sup>-Transporter für die zytoplasmatische Signalübertragung  
und Ca<sup>2+</sup>-Homöostase bei *Zea mays* L.-Koleoptilen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Gerald Albach  
aus Oppenrod

Gießen 1999

Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Felle

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. W. Clauß

Dekan: Prof. Dr. W. Clauß

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.1999

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Abkürzungen, Symbole & Definitionen	5
3. Material und Methoden	7
3.1 Anzucht des Pflanzenmaterials	7
3.2 Häufig verwendete Chemikalien	7
3.3 Verwendete Geräte	7
3.4 Präparative Maßnahmen zur Herstellung intakter Vakuolen	8
3.5 Isolation der Protoplasten und Vakuolen	9
3.6 Messungen mit $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Mini-Elektroden	14
3.7 Vakuoläre pH-Bestimmung mittels Acridinorangeabsorption	15
3.7.1 Quantitative Auswertung	16
3.7.2 Ermittlung des Vakuolenvolumens	18
3.8 Darstellung der Patch-Clamp-Technik	19
3.8.1 Pipettenherstellung, Pipettenhalter und Elektroden	19
3.8.2 Meßküvetten und Badperfusion	19
3.8.3 Membrankonfigurationen	20
3.8.4 Berechnung der Selektivitäten aus der Strom-Spannungs-Kennlinie	21
3.8.5 Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit	24
3.8.6 „Liquid-Junction“-Potentiale	26
4. Ergebnisse	28
4.1 Der pH-Gradient über dem Tonoplasten	28
4.1.1 Die vakuoläre $v\text{-H}^+$ -ATPase	29
4.1.2 Der $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluß auf den pH-Gradienten über dem Tonoplasten	32
4.2 Der $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient über dem Tonoplasten	34
4.2.1 ATP-abhängiger $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in die Vakuole von <i>Z. mays</i> L. Koleoptil-Protoplasten	35
4.2.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Agonisten	37
4.3 $\text{Ca}^{2+}$ -selektive und nichtselektive Ionenkanäle im Tonoplasten von <i>Z. mays</i> L.	44
4.3.1 Ein schnell aktivierbarer Ionenkanal	46
4.3.1.1 Symmetrische und asymmetrische KCl-Konzentration	53
4.3.1.2 Selektivität für $\text{Na}^+$ und $\text{Rb}^+$	57
4.3.2 Ein durch Inositol-1,4,5-triphosphat aktivierbarer hochselektiver $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal	60
4.3.2.1 Die Offenwahrscheinlichkeit des $\text{InsP}_3$ -aktivierbaren hochselektiven $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in der <i>c</i> -Konfiguration	64
4.3.2.2 Der Einfluß der pH-Absenkung und der Erhöhung der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der vakuolären Seite auf die Offenwahrscheinlichkeit	67
4.3.2.3 Selektivität für Ionen der Berylliumgruppe	71
4.3.2.4 Hemmung durch Ionenkanalblocker auf der vakuolären Seite	76
4.3.3 Ein durch Ryanodin aktivierbarer Ionenkanal	79
4.3.3.1 Aktivierung durch zyklische ADP-Ribose	84
4.3.3.2 Hemmung durch Ruthenium Rot	85

4.3.4	Ein Ionenkanal mit 37 pS Leitfähigkeit	88
4.3.4.1	Symmetrische und asymmetrische KCl-Konzentration	88
4.3.4.2	Selektivität für $\text{Ca}^{2+}$	92
4.3.4.3	Selektivität für $\text{Na}^+$ und $\text{Rb}^+$	92
4.3.5	Ein Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit	96
4.3.5.1	Symmetrische und asymmetrische KCl-Konzentration	96
4.3.5.2	Selektivität für $\text{Ca}^{2+}$	99
4.3.5.3	Selektivität für $\text{Na}^+$ und $\text{Rb}^+$	100
5.	Diskussion	103
5.1	Die Energetisierung der sekundär aktiven Transportprozesse durch die v-H <sup>+</sup> -ATPase und die v-Ppase	105
5.2	$\text{Ca}^{2+}$ -Transport am Tonoplasten	107
5.2.1	Transport des $\text{Ca}^{2+}$ in die Vakuole	107
5.2.2	$\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung	112
5.2.2.1	Inositol-1,4,5-triphosphat	112
5.2.2.2	Ryanodin	122
5.2.2.3	Andere Kationenkanäle	126
5.2.3	Die Bedeutung der $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Ionenkanäle für die zytoplasmatische $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation und die zelluläre Signalübertragung	129
6.	Zusammenfassung	141
7.	Literatur	144

# 1. Einleitung

Die Koleoptile ist ein spezifisches Organ der Pflanzenfamilie der Süßgräser (*Poaceae*). Schon im ungekeimten Getreidekorn ist sie nachweisbar und bildet eine zylindrische, oben stumpfe, geschlossene Röhre (Keimscheide) in der das Primärblatt und die Plumula völlig eingeschlossen und geschützt ruhen. Bei einsetzender Keimung ereignen sich in der Koleoptile zunächst zahlreiche Zellteilungen. Dadurch schiebt sie sich aus dem gequollenen und aufgeplatzten Getreidekorn heraus. Sobald sie eine Länge von ca. 0,5 cm erreicht hat, nimmt die Anzahl der Zellteilungen beträchtlich ab. Zu diesem Zeitpunkt beginnt das augenfälligste Längenwachstum der etiolierten Koleoptile. In einiger Entfernung hinter den meristematischen, isodiametrisch verbleibenden Zellen der Koleoptilenspitze beginnen sich die isodiametrischen Zellen von Epidermis und Kortex durch Zellexpansion in der Längsrichtung des Organs zu strecken. Diese Zellstreckung nimmt am unteren Ende der Koleoptile ihren Anfang und schreitet nach oben fort, bis die Koleoptile eine Länge von mehreren Zentimetern erreicht hat. Gerade in dieser Zellstreckungsphase war und ist die Koleoptile Versuchsobjekt grundlegender Untersuchungen hinsichtlich der Perzeption und Signaltransduktion von Pflanzenwuchsstoffen, Schwerkraft und Licht (DARWIN & DARWIN 1880, HAGER et al. 1971, IINO 1990).

Die pflanzliche Vakuole, die bis zu 90 % des Zellvolumens einnehmen kann, ist für das turgorgetriebene Zellstreckungswachstum durch eine ca. hundertfach höhere H<sub>2</sub>O-Permeabilität des Tonoplasten gegenüber dem Plasmalemma als einer der Schlüsselregulatoren anzusehen (MAUREL 1997, CHAUMONT et al. 1998). Die gegenüber dem Plasmalemma quasi nicht limitierte Fähigkeit zum H<sub>2</sub>O-Transport durch den Tonoplasten ermöglicht es der pflanzlichen Zelle, das vakuoläre Lumen effizient zur Pufferung osmotischer Schwankungen im Zytosol einzusetzen. Nachhaltige Veränderungen der osmotischen Konsistenz der Koleoptile von *Z. mays* L. treten bei lichtinduzierter Wachstumsinhibition und Wachstumsförderung durch Pflanzenwuchsstoffe auf. So führt lichtinduzierte Wachstumsinhibition zu einer Abnahme der osmotisch wirksamen Teilchen in der Maiskoleoptile (KUTSCHERA & FRÖHLICH 1992; PARVEZ et al. 1994, 1996). Hingegen führt die durch den Pflanzenwuchsstoff Indol-3-Essigsäure induzierte Wachstumsförderung der Maiskoleoptile zu einer Aufnahme von osmotisch wirksamen K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen (HASCHKE & LÜTTGE

1973, 1975; RUBINSTEIN & LIGHT 1973), wobei die Netto-Aufnahme von  $K^+$  der Gewebsstreckung entspricht. Die mit der Aufnahme von Ionen verbundene Wasseraufnahme, der Anstieg des Turgors, die Volumenvergrößerung und die damit verbundene Zellstreckung können hierbei nur durch die Koordination der Ionentransportsysteme durch das Plasmalemma und den Tonoplasten der Vakuole verstanden werden.

Neben diesen für die Osmoregulation der Zelle wichtigen Aspekten nimmt die Vakuole innerhalb der Organisationsstruktur der pflanzlichen Zelle hinsichtlich ihrer multifunktionalen Rolle eine einzigartige Stellung unter den pflanzlichen Zellkompartimenten ein. Durch ihren Gehalt an Proteinasen und sauren Hydrolasen stellt sie das hydrolytische Kompartiment der pflanzlichen Zelle dar, in dem Bestandteile des Zytoplasmas abgebaut werden können. Neben der Zwischenspeicherung wiederverwertbarer Stoffe dient die Vakuole als Depot für nicht mehr benötigte Stoffwechselprodukte sowie für Xenobiotica. Einem Teil dieser Verbindungen kommt eine wichtige Bedeutung als Allelochemikalien bei Schutz und Abwehrreaktionen zu.

Die Energie für Transport und Akkumulation vieler Substanzen in die Vakuole wird durch die Aktivität zweier tonoplastenständiger Protonenpumpen, der protonentranslozierenden vakuolären Adenosin-5'-triphosphatase (v- $H^+$ -ATPase) und Pyrophosphatase (PPase), generiert. So werden sog. sekundär aktive Transportsysteme ( $H^+$ /Antiporter) für Kationen wie  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Na^+$  oder für Stoffwechselmetaboliten wie Glukose und Aminosäuren ermöglicht, die den transmembranen Protonengradienten über dem Tonoplasten ausnutzen (SCHUMAKER & SZE 1985, PFEIFFER & HAGER 1993, BLUMWALD & POOLE 1987, RAUSCH et al. 1987, BOLLER et al. 1975). Die pflanzliche Vakuole ist somit nicht nur in den komplexen pflanzlichen Stoffwechsel eingebunden, sondern auch in die zytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Homöostase und in die Regulation des zytoplasmatischen pH mit einbezogen (FELLE 1988a, b, c; FROHNMEYER et al. 1998).

Zytosolisches  $Ca^{2+}$  ist seit langem als ein wichtiger Schlüsselregulator des zellulären Metabolismus bekannt. In Koleoptilzellen von *Z. mays* L. beeinflussen verschiedenste externe Faktoren die zytosolische  $Ca^{2+}$ -Homöostase. So führen Indol-3-Essigsäure (FELLE 1988a), Abzissinsäure (GEHRING et al. 1990b) und gravitropische

Stimuli (GEHRING et al. 1990a) zu einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Auch seitlich appliziertes Licht (GEHRING et al. 1990a) führt auf der Schattenseite zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in Epidermis und Kortex.

Setzt man voraus, daß im phosphatgepufferten Zytoplasma die Konzentration von freiem  $\text{Ca}^{2+}$  auf ein niedriges Niveau einreguliert wird, kann die Zelle einen Anstieg der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Signal erkennen. Eine niedrige zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird durch primär und sekundär aktive Transportprozesse, die  $\text{Ca}^{2+}$  in den extrazytosolischen Raum (Apoplast, Vakuole, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi, Mitochondrium, Plastiden) transportieren, ermöglicht. Somit kann in diesen extrazytosolischen Kompartimenten ein steiler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradient gegenüber dem Zytoplasma generiert werden. Insbesondere das Endoplasmatische Retikulum und die Vakuole schaffen die Voraussetzung, der pflanzlichen Zelle einen ständig verfügbaren intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zu garantieren. Innerhalb dieser intrazellulären Kompartimente kann, in Verbindung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Anionenkomplexen, die Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  relativ konstant gehalten werden. Die pflanzliche Zelle wird somit gegenüber Konzentrationsschwankungen des freien  $\text{Ca}^{2+}$  im das Plasmalemma umgebenden Apoplasten unempfindlicher. Durch eine leichte Erhöhung der Membranpermeabilität oben genannter Kompartimente kann die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration angehoben werden und  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine,  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare Proteinkinasen, Phosphatasen, Ionenkanäle sowie die Exozytose regulieren (HETHERINGTON & TREWAVAS 1984, LUAN et al. 1993, THIEL et al. 1994, KETCHUM & POOLE 1991).

Eine Erhöhung der Membranpermeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  kann durch die Aktivierung von agonistenabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen erfolgen. Als Agonisten gelten hierbei sogenannte „second messenger“ wie Inositol-1,4,5-triphosphat oder zyklische Adenosin-Diphosphat-Ribose. Agonisten können durch die Aktivierung tonoplastenständiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine kurzfristige Erhöhung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verursachen (ALEXANDRE et al. 1990, ALEXANDRE & LASSALLES 1992, ALLEN & SANDERS 1994b, ALLEN et al. 1995). Insbesondere die Signaltransduktion via Inositol-1,4,5-triphosphat könnte hierbei in der Koleoptile von *Z. mays* L. eine Rolle spielen, da eine Aktivierung des Phosphoinositid-Metabolismus durch Indol-3-

Essigsäure, Phytochrom und osmotischen Streß in pflanzlichen Zellen vermutet wird (ALLEN & SANDERS 1994b, DOVE et al. 1997, GURON et al. 1992, POLEVOI et al. 1996, SRIVASTAVA et al. 1989, ZBELL & WALTER-BACK 1988).

Eine erste Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, die Aktivität der tonoplastenständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter in der Koleoptile von *Z. mays* L. bei der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signaltransduktion zu untersuchen. Mit Hilfe von  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Mini-Elektroden wird dazu der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport durch den Tonoplasten in die Vakuole untersucht. Um zwischen primär und sekundär aktiven Transportprozessen unterscheiden zu können, wird die Aktivität der tonoplastenständigen Protonenpumpen, das Ausmaß des von ihnen generierten pH-Gradienten sowie der Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$  auf diesen ermittelt.

Die Frage nach der Beteiligung der Vakuole bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen zellulären Signaltransduktion wird anhand der Reaktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports durch den Tonoplasten aus der Koleoptile von *Z. mays* L. auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Agonisten Inositol-1,4,5-triphosphat, Ryanodin und zyklische Adenosin-Diphosphat-Ribose diskutiert.

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik erfolgt eine abschließende Identifikation und Charakterisierung der durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Agonisten aktivierbaren Ionenkanäle im Tonoplasten von *Z. mays* L. Koleoptilzellen.

Schließlich wird die vermutliche Rolle der vorgefundenen tonoplastenständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter bei der Generierung von zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in der pflanzlichen Zelle diskutiert.

## 2. Abkürzungen, Symbole & Definitionen

A	Ampère, Einheit der elektrischen Stromstärke
AO	Acridinorange, ungeladenes Ion
AO <sup>+</sup>	Acridinorange kation
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAPTA	1,2-bis-(o-Aminophenoxy)-Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
BSA	Rinderserumalbumin
c	Grundlinie der Darstellung von Kanalereignissen (Grundlinie des geschlossenen Kanals)
cADPR	zyklische Adenosin-Diphosphat-Ribose
ci	"cytosolic-side in"-Konfiguration
co	"cytosolic-side out"-Konfiguration
$\psi_m$	el. Potentialdifferenz über einer Membran, „Membranpotential“, [mV]
D	Digitonin
DTT	DL-Dithiothreitol
$E_{rev}$	Umkehrpotential des Ions X <sup>+/-</sup> [mV]
$E_{x^{+/-}}$	Gleichgewichtspotential des Ions X <sup>+/-</sup> [mV]
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -Aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraessigsäure
F	Faradaykonstante (96485 As·mol <sup>-1</sup> )
fA	Femtoampère
FV	Fast-Vacuolar-Ionenkanal, schnell aktivierender Ionenkanal der Vakuole
$\Delta G$	Freie Energie (J·mol <sup>-1</sup> )
$g$	Fallbeschleunigung (m·s <sup>-2</sup> )
Glu <sup>-</sup>	Glukonat-Ion, Anion der D-Glukonsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
I	Stromstärke
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
InsP <sub>3</sub> R	InsP <sub>3</sub> -Rezeptor-Ca <sup>2+</sup> -Kanal-Komplex
KJ	Kilojoule
L <sub>j</sub>	"Liquid-junction" -Potential
ln	Logarithmus zur Basis e
log	Logarithmus zur Basis 10
MES	2-N-Morpholino-Ethan-Sulfonsäure
N <sub>A</sub> = L	Avogadro-Konstante (6,022045·10 <sup>23</sup> ·mol <sup>-1</sup> )
o1...oX	Erster bis xter Offenzustand eines Kanals
pA	Pikoampère
pCa	Negativer dekadischer Logarithmus der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
pmf	Proton-Motive-Force (Triebkraft der Protonenbewegung)
PPase	Pyrophosphatase
PPi	Pyrophosphat, ohne Spezifizierung der Ladung und Komplexierung
$P_{x^{+/-}}$	Permeabilitätskonstante des Ions X <sup>+/-</sup>
R	Allgemeine Gaskonstante (8,314 J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> )
Rya	Ryanodin
RyR	Ryanodin-Rezeptor-Ca <sup>2+</sup> -Kanal-Komplex
S	Einheit des elektrischen Leitwertes (1/ $\Omega$ =A/V)
SV	Slow-Vacuolar-Ionenkanal, langsam aktivierender Ionenkanal der Vakuole

T	Temperatur in Kelvin
TRIS	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propanediol
V	Volt, Einheit der elektrischen Spannung
<i>wv</i>	"whole-vacuole"-Konfiguration
$[X]_a$	Konzentration des Ions X im Außenmedium
$[X]_i$	Konzentration des Ions X im Zytoplasma
z	Valenz eines Ions

**Häufig verwendete Anglizismen:**

Patch	isolierter Membranfleck
second messenger	intrazellulärer Signalstoff

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Anzucht des Pflanzenmaterials

Als Pflanzenmaterial dienten 5 bis 6 Tage alte Koleoptilen von *Zea mays* L. cv. "Santos". Karyopsen wurden von der Firma KWS (Einbeck) bezogen.

Die gebeizten Karyopsen von *Z. mays* L. wurden für 3 Stunden in Leitungswasser vorgequollen und dann auf feuchten Vermiculit in verschließbaren Plastikboxen ausgesät. Die Anzucht erfolgte in einem Kulturschrank bei 25° C und Dunkelheit.

### 3.2 Häufig verwendete Chemikalien

Calbiochem, Bad Soden:

Bafilomycin, Ryanodin

Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm:

Acridinorange, Ca<sup>2+</sup>-Sensor (Fluka Cocktail A, Best.-Nr.: 21196)

Seishin Pharmaceutical Co., LTD, Tokyo:

Pectolyase Y-23 aus *Aspergillus japonicus*

Serva Feinchemikalien GmbH, Heidelberg:

Cellulase TC aus *Trichoderma reesei*, Macerocym

Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen:

Ficoll Type 400, Percoll, Inositol-1,4,5-triphosphat, cADPR

Alle anderen für die Medien verwendete Chemikalien stammten von unterschiedlichen Herstellern und entsprachen dem üblichen Laborstandard (pro analysi).

### 3.3 Verwendete Geräte

#### Patch-Clamp-Messungen

Auflicht-Mikroskop Zeiss ID02

DAT Recorder Biologic DTR 1202

Generator WP-Instruments (1830,1831)

Glaskapillaren Kimble Kimax 51

Patch-Clamp-Verstärker List Electronic EPC-7

PC Laser 386 mit Bildschirm Eizo Flexscan 9070S

Peristaltikpumpen: Verder Peristaltic 2000, Pharmacia P1

Pipetten-Poliereinheit L/M-CPZ-101, List-Electronic

Präzisions-Kreuztischkombination Spindler & Hoyer

Speicheroszillograph Gould OS 4020

Vertikal-Mikrokapillar-Ziehgerät L/M-3P-A Patch Pipette Puller, List Electronic

Wasserschüttelbad Braun Thermomix 1441

Zentrifuge Hettich Universal K2S

### **Ca<sup>2+</sup>-selektive Mini-Elektroden**

Hochimpedanzverstärker WP-Instruments KS-700

Elektrodenhalter WP-Instruments

Linienschreiber Kontron W+W 320

Trockenschrank Heraeus T 5028

### **Acridinorange-Messungen**

Präparative Kühlzentrifuge Beckmann J-21 B mit Rotor JA 20

Spektralphotometer Gilford Response

## **3.4 Präparative Maßnahmen zur Herstellung intakter Vakuolen**

Zur Isolierung intakter Vakuolen aus pflanzlichen Zellen sind verschiedene Methoden etabliert worden, die sich hinsichtlich der verwendeten Untersuchungsmethoden, Messungen an Einzelvakuolen oder Vakuolensuspensionen, stark unterscheiden. Die einfachste Methode ist die direkte Isolierung durch mechanische Zerkleinerung des Gewebes, die z.B. bei *Brassica oleracea* L. (ASKERLUND 1997) zur Herstellung einer Vakuolensuspension erfolgreich angewandt wurde. Diese Methode führte bei *Z. mays* L. aufgrund der zu geringen Menge des verfügbaren Gewebematerials (8 g vs. 600 g) zu keinen befriedigenden Ergebnissen.

Alle weiteren Methoden gehen von isolierten Protoplasten aus, die aus dem pflanzlichen Gewebe mittels enzymatischen Abverdaus der Zellwand gewonnen werden. Aus den isolierten Protoplasten lassen sich dann über verschiedene Wege Vakuolen herstellen.

### **A. Polykationen-induzierte Lyse**

Unter leicht hypotonen Bedingungen konnte HOFFMANN (1988) durch die irreversible Bindung des Plasmalemmas an Polykationen (DEAE-Dextran) ein Auf-

reißen des Protoplasten und die Freisetzung von Vakuolen aus *Chenopodium rubrum* L. Suspensionszellen erreichen.

#### B. Mechanische Scherkräfte

Die bei der Hochgeschwindigkeitszentrifugation auftretenden externen Scherkräfte wurden von MANDALA & TAIZ (1985) und BRODMERKEL (1994) zur Isolierung von Vakuolen aus *Z. mays* L. verwendet. Diese Methode wurde jedoch durch die nicht unter optischer Kontrolle stehende Protoplastenlyse und zu langer Zentrifugationszeiten verworfen.

Das Aufreißen des Plasmalemmas kann auch durch Pressen der Protoplastensuspension durch eine lange, dünne Kanüle erreicht werden (MARTINOIA et al. 1981). Dies führte bei *Z. mays* L. nur zu einer geringen Ausbeute an Vakuolen, konnte jedoch für Patch-Clamp-Messungen an Einzelvakuolen verwendet werden.

#### C. Membrandestabilisierende Agenzien

Für Messungen mit der Patch-Clamp-Technik konnten in Anlehnung an SCHULZ-LESSDORF & HEDRICH (1995) mittels eines scharfen EDTA-Strahls (100 mM) aus einer Mikropipette einzelne Vakuolen aus Protoplasten freigesetzt werden.

#### D. Osmotische Lyse

Eine Herabsetzung der Osmolarität des Mediums und der damit einhergehende osmotische Schock führt bei vielen Spezies zur Freisetzung von Vakuolen (WAGNER 1987).

#### E. Kombination membrandestabilisierender Agenzien, osmotischer Lyse und externer Scherkräfte

Als Methode der Wahl zur Herstellung der Vakuolensuspension für *Z. mays* L. erwies sich die Protoplastenlyse durch eine Absenkung der Osmolarität des Mediums und eine weitergehende Destabilisierung des Plasmalemmas durch EDTA-Zusatz, externen Scherkräften sowie pH- und Temperaturerhöhung (JOHANNES 1989, LOMMEL 1996).

### 3.5 Isolation der Protoplasten und Vakuolen

#### Patch-Clamp: Protoplastenisolation und Vakuolenfreisetzung

Zur Protoplastenherstellung wurden nur Koleoptilen von 5 - 6 Tage alten und 4 - 7 cm großen etiolierten Keimlingen verwendet. Die Protoplasten wurden durch enzymatischen Verdau der Zellwand gewonnen (RÜCK 1994). Die apikalen 3 mm der Koleoptile wurden entfernt und die weiteren 10 - 15 mm langen Segmente nach

Entfernung des Primärblattes zur Präparation verwendet. 15 Segmentstücke mit einem Gewicht von ca. 0,5 g wurden in 1 mm dicke Ringe geschnitten und nochmals in ca. 1 mm<sup>2</sup> große Segmente zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde in einem Sieb unter fließendem Leitungswasser gespült und die überschüssige Feuchtigkeit durch Auflegen des Siebes auf Papier entzogen. Dann wurde das Gewebe in 10 ml Enzymlösung (s.u.) auf einem Rundschtüttler bei 30° C für 60 min inkubiert. Der Abbau der Zellwand wurde durch mikroskopische Kontrolle verfolgt. Die Enzymlösung wurde durch ein Nylonnetz (100 µm) filtriert und die Protoplasten und Zellfragmente durch Zentrifugation (90 *g* für 10 min, 4° C) abgetrennt.

Die Aufreinigung der Protoplasten erfolgte mittels Flotation über einen diskontinuierlichen Saccharose-Mannitol-Gradienten (s. Tabelle 3.1). Nach dem Dekantieren der Enzymlösung mittels einer Wasserstrahlpumpe wurde der Rückstand in 5 ml Lösung I aufgenommen und mit jeweils 5 ml der Lösung II und 2 ml der Lösung III überschichtet. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 90 *g* (4° C) konnten 2 ml einer aufgereinigten Protoplastenbande zwischen der Grenzschicht der Lösungen II und III entnommen werden. Die Dichte der Protoplasten betrug ca. 10<sup>5</sup>·ml<sup>-1</sup>. Die Protoplasten hatten einen Durchmesser von 20 - 70 µm. Zur Freisetzung der Vakuolen wurden nur frisch hergestellte, höchstens 8 h alte Protoplasten verwendet. Zur Vakuolenfreisetzung wurden 200 µl der Protoplastensuspension in eine saubere Meßküvette pipettiert. Nach ca. 15 min hatten sich die Protoplasten auf der Glasoberfläche abgesetzt. Die Freisetzung der Vakuolen wurde gewährleistet durch:

- a) die Absenkung der Osmolarität der Lösung von 500 mOsm auf 130 mOsm
- b) den Anstieg des pH von pH 5,6 auf pH 7,2
- c) die Destabilisierung der Protoplasten durch EDTA
- d) die Scherkraft der nachfolgenden dichteren Badlösung (WEISER 1991).

Die sedimentierten Protoplasten wurden mit Lösung IV 5 - 10 min gespült. Wurden in dieser Zeitspanne genügend Vakuolen freigesetzt, die sich am Glasboden festsetzt hatten, wurden durch die anschließende Badperfusion mit den dichteren Badmedien nochmals weitere Protoplasten aufgebrochen.

Tabelle 3.1: Verwendete Lösungen zur Gewinnung und Aufreinigung der Protoplasten und Vakuolen für die Patch-Clamp-Versuche.

Enzymlösung:	Lösung I	Lösung II
10 mM Mes/Tris (pH 5,6)	10 mM Mes/Tris (pH 5,6)	10 mM Mes/Tris (pH 5,6)
400 mM Mannitol	431 mM Saccharose	284 mM Saccharose
1 mM Spermidin	1 mM DTT	183 mM Mannitol
2 mM DTT	1 mM KCl	1 mM DTT
1 mM KCl	1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM KCl
1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>
1 mM MgCl <sub>2</sub>		1 mM MgCl <sub>2</sub>
10 mM L-Ascorbinsäure		
2 % Cellulase TC		
0,5 % Macerozym		
0,15 % Pectolyase Y 23		
0,3 % BSA		

Lösung III	Lösung IV
0,5 mM Mes/Tris (pH 5,6)	Tris (pH 7,2)
466 mM Mannitol	50 mM KCl
1 mM DTT	20 mM EDTA
1 mM KCl	
1 mM CaCl <sub>2</sub>	
1 mM MgCl <sub>2</sub>	

### Vakuolensuspension: Protoplastenisolation und Vakuolenisolation

Zur Herstellung der Vakuolensuspension wurden die Koleoptilen in der oben beschriebenen Weise präpariert. Als Ausgangsmenge diente 6 - 8 g Gewebematerial (200 Koleopilsegmente). Diese wurden in 60 ml Enzymlösung für 40 - 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Dichte der Enzymlösung mit 120 ml Verdünnung heruntersetzt. Die Enzymlösung wurde durch ein Nylonnetz (100 µm) filtriert und die Protoplasten und Zellfragmente durch Zentrifugation (90 g für 10 min, 4° C) abgetrennt.

Die Aufreinigung der Protoplasten erfolgte mittels Flotation der Protoplasten über einen diskontinuierlichen Ficoll-Saccharose-Mannitol-Gradienten (s. Tabelle 3.2). Nach dem Dekantieren der Enzymlösung mittels einer Wasserstrahlpumpe wurde der Rückstand in 5 ml P I 10 % aufgenommen und mit jeweils 5 ml P II 6 %, 5 ml P II, sowie 3 ml P III überschichtet. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 90 g (4° C) konnte eine aufgereinigte Protoplastenbande zwischen der Grenzschicht der Lösungen P II und P III entnommen werden.

Die Lyse der Protoplasten wurde durch eine Reduzierung der Osmolarität des Mediums von 500 mOsm auf 200 mOsm eingeleitet (s. Tabelle 3.3). Durch Mischen

Tabelle 3.2: Verwendete Lösungen zur Gewinnung und Aufreinigung der Protoplasten für die Herstellung der Vakuolensuspension.

<b>Enzymlösung:</b>	<b>Verdünnung:</b>	<b>P I 10 %</b>
10 mM Mes/Tris (pH 5,6)	10 mM Mes/Tris (pH 5,6)	5 mM Mes/Tris (pH 5,6)
400 mM Mannitol	400 mM Mannitol	431 mM Saccharose
1 mM Spermidin	1 mM Spermidin	10 % Ficoll
2 mM DTT	2 mM DTT	1 mM DTT
1 mM KCl	1 mM KCl	1 mM KCl
1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>
1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM MgCl <sub>2</sub>
10 mM L-Ascorbinsäure	10 mM L-Ascorbinsäure	
6 % Cellulase TC		
0,5 % Macerozym		
0,15 % Pectolyase Y 23		
0,3 % BSA	0,3 % BSA	

<b>P II 6 %</b>	<b>P II</b>	<b>P III</b>
0,5 mM Mes/Tris (pH 5,6)	0,5 mM Mes/Tris (pH 5,6)	0,5 mM Mes/Tris (pH 5,6)
284 mM Saccharose	284 mM Saccharose	466 mM Mannitol
183 mM Mannitol	183 mM Mannitol	
6 % Ficoll	1 mM DTT	1 mM DTT
1 mM DTT	1 mM KCl	1 mM KCl
1 mM KCl	1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>
1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM MgCl <sub>2</sub>
1 mM MgCl <sub>2</sub>		

Tabelle 3.3: Verwendete Lösungen zur Protoplastenlyse und Aufreinigung der Vakuolen.

<b>Hypotone Lyse VL I 14%</b>	<b>VS A</b>	<b>VS B</b>
20 mM Hepes/Tris (pH 7,2)	10 mM Hepes/Tris (pH 7,2)	10 mM Hepes/Tris (pH 7,2)
14 % Ficoll	100 mM KCl	100 mM KCl
2 % BSA	1mM DTT	1mM DTT
1 mM DTT	4 mM MgCl <sub>2</sub>	4 mM MgCl <sub>2</sub>
4 mM MgCl <sub>2</sub>	200 mM Mannitol	350 mM Mannitol
6 mM EDTA	250 mM Saccharose	100 mM Saccharose

<b>VS C</b>
10 mM Hepes/Tris (pH 7,2)
100 mM KCl
1mM DTT
4 mM MgCl <sub>2</sub>
450 mM Mannitol

von 2 Teilen erwärmten (35° C) VL I 14 % mit 1 Teil des Protoplastenmediums erfolgte ein gleichzeitiger pH- und Temperatursprung. Die Anwesenheit von EDTA führte zu einer weiteren Destabilisierung der Protoplasten. Zusätzlich wurde das Medium auf einem Rundschüttler (100 rpm) für 2 - 3 min unter optischer Kontrolle inkubiert. Das so gewonnene Rohhomogenat wurde mit 5 ml VS A, 6 ml VS B und 2 ml VS C überschichtet und für 12 min bei 4° C und 100 g zentrifugiert (Beckmann Zentrifuge mit Rotor JA 20). Während der Zentrifugation flotierte intakte Vakuolen und lysierte Protoplasten in die oberen Mediensichten. In der obersten Schicht befanden sich die Vakuolen mit dem höchsten Reinheitsgrad (ca. 0 - 1,5 % Kontamination), während der Kontaminationsgrad mit steigender Dichte des Mediums zunahm. Protoplasten sammelten sich in VS A. Die Ausbeute der Vakuolen in Bezug auf die eingesetzten Protoplasten lag bei 7 - 20 %. Die Vakuolenfraktion wurde bei 4° C gelagert und konnte bis zu 6 Stunden für AO-Versuche verwendet werden.

Für Messungen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Elektroden wurden die aufgereinigten Vakuolen nochmals konzentriert. Hierzu wurde das Vakuolenmedium im Verhältnis 3,5 : 1 mit Percoll versetzt und mit 1 ml VS B und 0,25 ml VS A überschichtet. Die anschließende Zentrifugation (10 min, 100 g) erbrachte eine Aufkonzentrierung der Vakuolen auf  $4 \cdot 10^5$  bis  $10^6$  pro ml. Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des Vakuolenmediums wurde mit BAPTA (1,2-bis-(o-Aminophenoxy)-Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure) eingestellt.

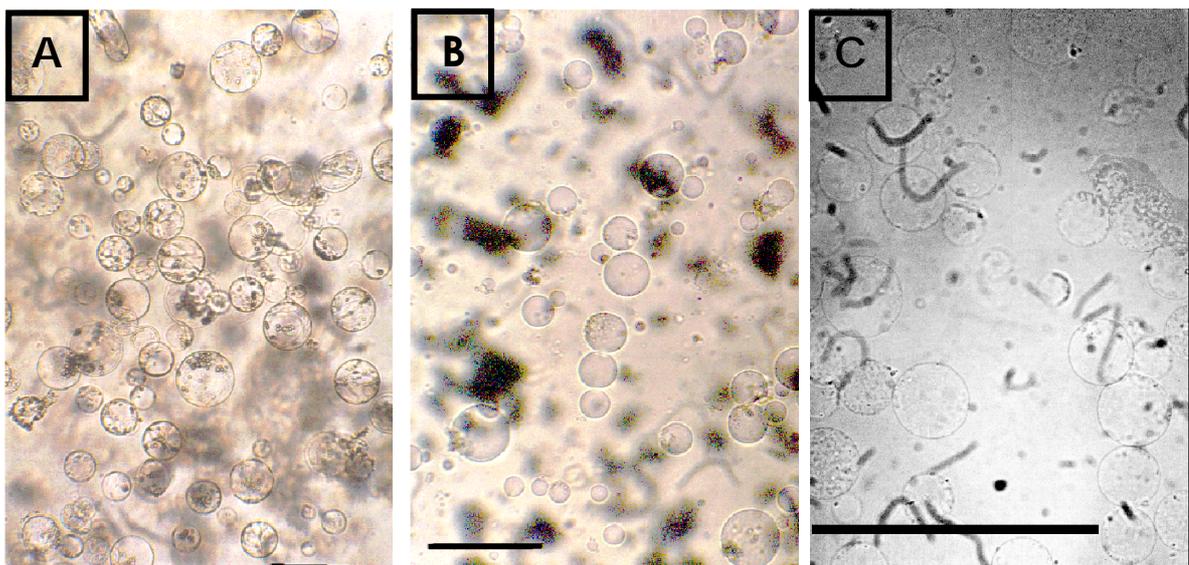


Abbildung 3.1: Die einzelnen Stadien der Vakuolenpräparation von *Z. mays* L. Protoplasten (Balken entspricht 250 µm):

- A) aufgereinigte Protoplasten
- B) Protoplastenlyse
- C) Vakuolenbände nach dem Ficollgradienten

### 3.6 Messungen mit $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Mini-Elektroden

Zur Ermittlung der Veränderung der extravakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der aufkonzentrierten Vakuolensuspension dienten selbstgefertigte  $\text{Ca}^{2+}$ -selektive Mini-Elektroden. Die Mini-Elektroden wurden aus handelsüblichen Haematokritkapillaren hergestellt. Die Kapillaren wurden auf eine Länge von 5 cm zurechtgesägt und anschließend in absolutem Methanol gewaschen. Anschließend wurden die Kapillaren im Trockenofen bei  $200^\circ\text{C}$  getrocknet und das prospektive Sensorende in der Flamme eines Bunsenbrenners hitzepoliert. Nach nochmaligem Erhitzen im Trockenofen wurden die Kapillaren innen silanisiert (0,2 % Tributylchlorosilan in Chloroform) und für 90 min im Trockenofen bei  $200^\circ\text{C}$  gebacken. Die silanisierten Kapillaren wurden von vorne mit einem Sensor-Tetrahydrofuran-Polyvinylchlorid-Gemisch befüllt. Hierzu wurden 40 mg Polyvinylchlorid in 1 ml Tetra-

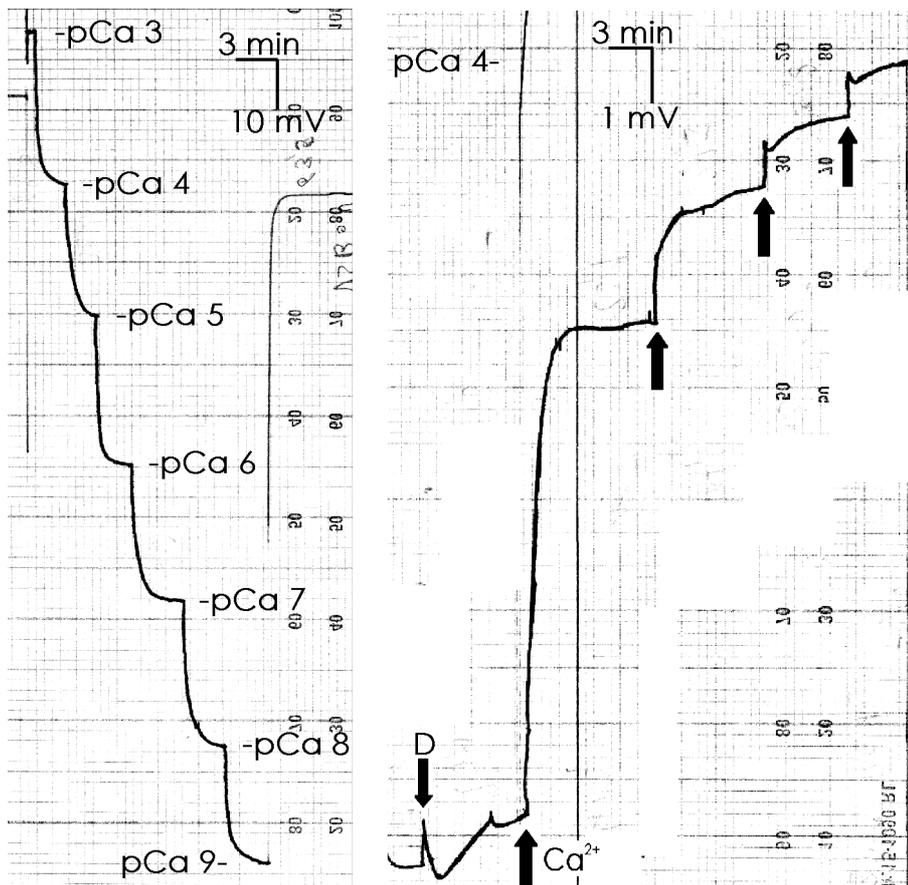


Abb. 3.2: Linke Seite: Kalibrierung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Elektrode vor einer Messung mittels Eichlösungen nach TSIEN & RINK (1980). Rechte Seite: Nach der Messung mit einer Vakuolensuspension. Mittels der Applikation von  $1\ \mu\text{M}$  Digitonin (D) wurde das in den Vakuolen enthaltene freie  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt. Durch die nachfolgende wiederholte  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe [ $50\ \mu\text{M}$ ,  $10\ \mu\text{M}$ ] konnte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Vakuolensuspension interpoliert werden.

hydrofuran gelöst. 70 µl dieses Gemisches wurden anschließend mit 30 µl des  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensors versetzt. Nach 24 Stunden war das Tetrahydrofuran verdunstet und die Mini-Elektroden konnten mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (pCa 5) befüllt werden. Nach einer weiteren 24stündigen Aufbewahrung des Sensorendes in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (pCa 4) waren die Elektroden gebrauchsfertig. Die Elektroden hatten eine lineare Abhängigkeit von 25 bis 29 mV im Bereich von pCa 3 bis pCa 8. Da die Sensorspitzen durch den Kontakt mit den Vakuolen an Sensitivität verloren, wurden diese zusätzlich durch eine Dialysemembran geschützt. Die Eichlösungen zur Eichung der Mini-Elektroden wurden nach TSIEN & RINK (1980) hergestellt. Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Vakuolensuspension konnte mittels Zugabe definierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Mengen nach Beendigung der Messung interpoliert werden (s. Abb. 3.2).

### 3.7 Vakuoläre pH-Bestimmung mittels Acridinorangeabsorption

Mit dem pH-Indikator Acridinorange (AO) erfolgte die photometrische Messung der Protonentranslokation (ZANKER 1952, GOGARTEN-BOEKELS et al. 1985). Der basische Farbstoff (pK = 10,6) ist in unprotonierter Form membranpermeabel. Somit erfolgt zunächst als Folge des Konzentrationsausgleichs eine Gleichverteilung des Moleküls zwischen Vakuoleninnen- und -außenraum. Im sauren Milieu der energetisierten Vakuolen wird Acridinorange protoniert und somit membran-impermeabel. Dadurch kommt es zu einer vom vakuolären Lumen vorliegenden pH-Wert abhängigen Anreicherung des Farbstoffkations (Ionenfallenmechanismus). Weiterhin führt die weitere Anreicherung des Moleküls zu einer reversiblen Komplexbildung. Diese pH-abhängige Akkumulation führt zu einer Konzentrationsverringerung des Farbstoffs im Außenmedium und kann als Absorptionsabnahme der neutralen Form bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 490 \text{ nm}$  photometrisch gemessen werden.

Die Aktivität der v- $\text{H}^+$ -ATPase und v-PPase wurde beim Erreichen des steady-state als Gesamtansäuerung ermittelt ( $\Delta_{A490}$ ). Pro Versuchsansatz wurden durchschnittlich  $2,5 \cdot 10^5$  Vakuolen eingesetzt.

Wegen einer nicht ganz auszuschließenden Kontamination der Präparation durch die plasmalemmständige  $\text{H}^+$ -ATPase wurde zu deren Hemmung dem Versuchsansatz 100 µM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  zugesetzt (HAGER & HELMLE 1981, HAGER & BIBER 1984, O'NEILL & SPANSWICK 1984).

### 3.7.1 Quantitative Auswertung

Der Farbstoff Acridinorange ermöglicht eine qualitative Verfolgung des Versuchsvorganges und eine quantitative Analyse der pH-Änderung in der Vakuole. Das vakuoläre pH läßt sich nach GOGARTEN-BOEKELS et al. (1985) als Funktion der Absorptionsänderung bei 490 nm rechnerisch ermitteln. In Abhängigkeit vom Verhältnis des Vakuolenvolumens ( $V_i$ ) zum Volumen des Versuchsmediums ( $V_a$ ) lassen sich zur Interpretation der Versuchsergebnisse Eichkurven erstellen. Für die einzelnen Acridinorangeformen gilt

$$[AO]_{ges} = [AO] + [AO^+] + 2 \cdot [AO^{2+}] \quad (1)$$

wobei  $[AO]_{ges}$  die Gesamtkonzentration an Acridinorange bezeichnet. Die Dissoziationskonstanten der einzelnen Acridinorangeformen ( $K_D$  und  $10^{-pK}$ ) wurden ZANKER (1952) entnommen und ermöglichen es,  $[AO]$  und  $[AO^{2+}]$  durch die bekannten Terme  $K_D$ ,  $pK$  und  $pH_a$  zu ersetzen.

Unter der Annahme, daß zum Versuchsstart die Acridinorange-Konzentration der Vakuolen gleich der des Außenraumes ist und somit der pH-Wert des Vakuoleninnenraums ( $pH_i$ ) dem des Versuchsmediums ( $pH_a$ ) entspricht, gilt für  $[AO^+]_{start}$

$$[AO^+]_{start} = -\frac{(1 + 10^{pH_a - pK})}{4K_D} + \sqrt{\left(\frac{(1 + 10^{pH_a - pK})}{4K_D}\right)^2 + \frac{[AO]_{ges}}{2K_D}} \quad (2)$$

Nach dem Aufbau des Protonengradienten ( $pH_i \neq pH_a$ ) ergibt sich die Verteilung der einzelnen Acridinorangezustände in Abhängigkeit vom Vakuolen- bzw. Versuchsvolumen

$$[AO]_{ges} \cdot (V_i + V_a) = \left( [AO] + [AO^+] + 2[AO^{2+}] \right)_i \cdot V_i + \left( [AO] + [AO^+] + 2[AO^{2+}] \right)_a \cdot V_a \quad (3)$$

Die Substitution von  $[AO^+]$  und  $[AO^{2+}]$  durch die Dissoziationskonstanten ergibt

$$0 = [AO]^2 \cdot \alpha + [AO] \cdot \beta - [AO]_{ges} \quad (4)$$

wobei

$$\alpha = 2 \cdot K_D \cdot \left( \frac{V_i}{V_i + V_a} \cdot (10^{pK - pH_i})^2 + \frac{V_a}{V_i + V_a} \cdot (10^{pK - pH_a})^2 \right) \quad (5)$$

und

$$\beta = \frac{V_i}{V_i + V_a} \cdot (1 + 10^{pK - pH_i}) + \frac{V_a}{V_i + V_a} \cdot (1 + 10^{pK - pH_a}) \quad (6)$$

gesetzt wurden. Die Binomialgleichung löst sich nach

$$[AO] = -\frac{\beta}{2\alpha} + \sqrt{\left(\frac{\beta}{2\alpha}\right)^2 + \frac{[AO]_{ges}}{\alpha}} \quad (7)$$

wobei die negative Lösung der Wurzel zu vernachlässigen ist, da sie zu einer negativen Konzentration führen würde.

Die Konzentration des protonierten Acridinorangemonomers im Versuchsansatz

$$\text{l\"a\ss}t \text{ sich mittels } 10^{pK} = \frac{[AO] \cdot [H^+]}{[AO^+]} \quad (8)$$

$$\text{aus } [AO] \text{ berechnen } [AO^+]_{ges} = \frac{[AO^+]_i \cdot V_i + [AO^+]_a \cdot V_a}{V_i + V_a} \quad (9)$$

Nach Festlegung der Variablen  $[AO]_{ges}$ ,  $pH_a$  sowie  $V_i$  und  $V_a$  kann mittels

$$\Delta A_{490} = 5,2 \cdot 10^4 \cdot \left( [AO^+]_{Start} - [AO^+]_{ges} \right) \quad (10)$$

eine Eichkurve für die Absorptionsänderung bei 490 nm als Funktion des vakuolären pH-Wertes erstellt werden (s. Abb. 3.3).

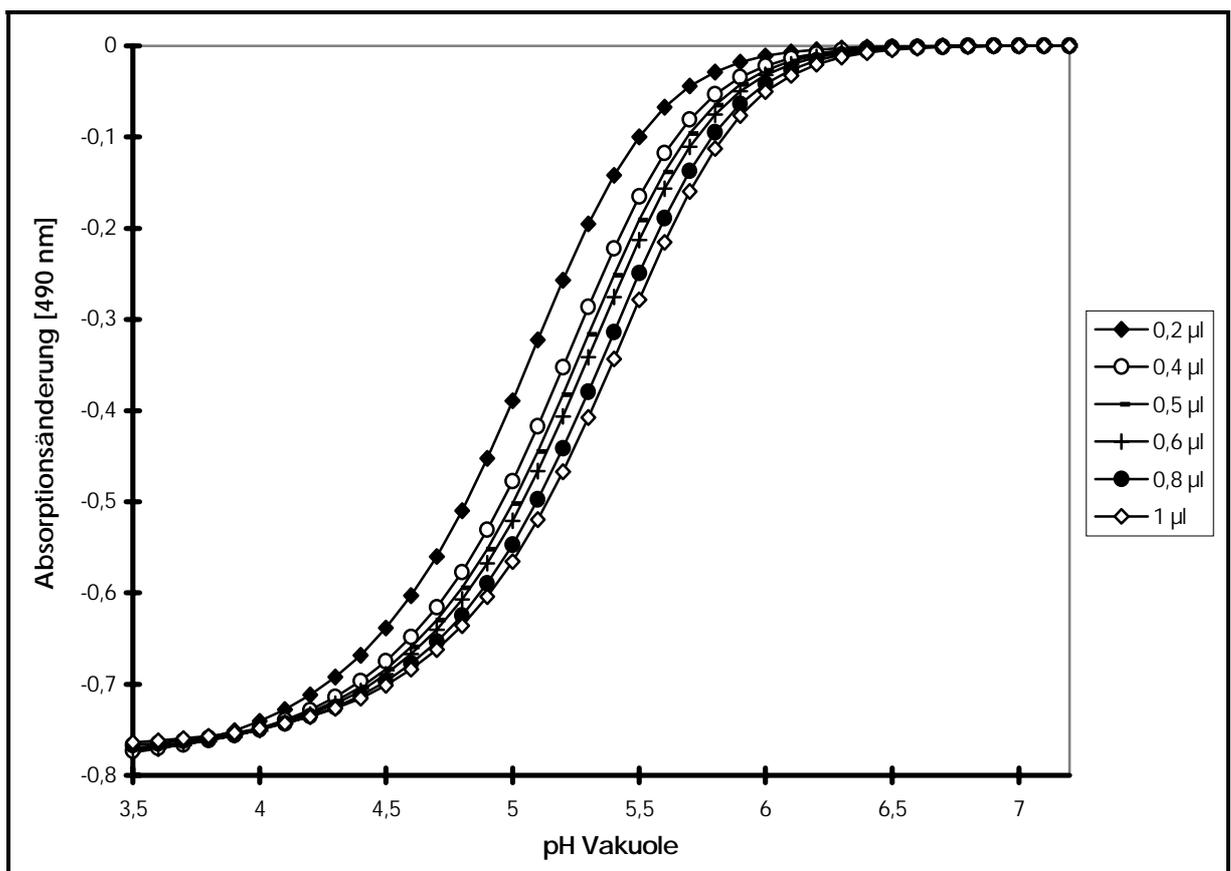


Abb. 3.3: Berechnung der Absorptionsänderung als Funktion des vakuolären pH nach GOGARTEN-BOEKELS et al. (1985) für die angezeigten Vakuolenvolumina. Es gelten: Gesamtkonzentration Acridinorange 30  $\mu$ M,  $pH_a=7,2$ ,  $(V_i+V_a)=1$  ml.

Als Bezugspunkt bei der Auswertung der Acridinorange-Versuche diene der Absorptionswert nach Dissipation des pH-Gradienten durch 2,3  $\mu\text{M}$  Nigericin, da die isolierten Vakuolen noch einen vom Alter der Präparation abhängigen „Restgradient“ besaßen und über eine längere Zeitspanne hinweg aufrechterhalten konnten.

### 3.7.2 Ermittlung des Vakuolenvolumens

Aus der Vakuolenanzahl multipliziert mit dem durchschnittlichen Volumen einer Vakuole errechnet sich das Volumen einer Vakuolensuspension. Die Vakuolendichte wurde jeweils vor dem Versuch durch Auszählen der Vakuolensuspension in der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Zur Ermittlung des durchschnittlichen Vakuolenvolumens wurden die Radien von 275 Vakuolen ermittelt. Die Vakuolen stammten aus verschiedenen Präparationen, die unter den gleichen Bedingungen gewonnen wurden. Der Mittelwert der Vakuolenradien betrug 32,5  $\mu\text{m}$ . Daraus folgt ein durchschnittliches Volumen von  $17,9 \cdot 10^{-10}$  l. Das Verteilungsmuster der Vakuolenradien zeigt Abbildung 3.4.

Durch Färbung mit Neutralrot oder Acridinorange konnte die Homogenität der Vakuolenfärbung und die Qualität der Vakuolenpräparation überprüft werden.

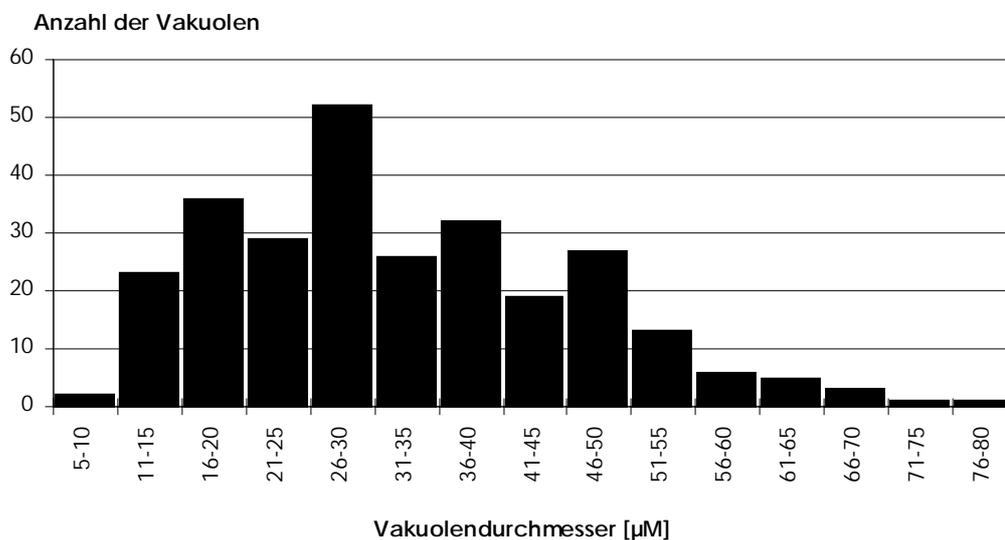


Abb. 3.4: Verteilungsmuster der Vakuolendurchmesser der Vakuolensuspension aus *Zea mays* L. Protoplasten.

### 3.8 Darstellung der Patch-Clamp-Technik

Der Aufbau des Meßplatzes und die verwendeten Geräte entsprachen dem von RÜCK (1990, 1994) beschriebenen Versuchsaufbau.

#### 3.8.1 Pipettenherstellung, Pipettenhalter und Elektroden

Die Pipetten für Einzelkanalableitungen in der *ci*- und *co*-Konfiguration (s. u.) wurden aus Borosilikat-Glasröhrchen (Kimax 51, Kimble, Toledo, USA) in einem zweistufigen Verfahren mit einem Vertikal-Mikrokapillar-Ziehgerät (List Electronic) hergestellt. Der Schaft der Pipettenspitze wurde mit SYLGARD beschichtet (SAKMANN & NEHER 1983), das im Heißluftstrom der Pipetten-Poliereinheit (List-Electronic) gehärtet wurde. Anschließendes Hitzepolieren der Pipettenspitze vervollständigte die Pipettenherstellung. Die Öffnung der Pipettenspitzen hatten mit einer Füllung von 100 mM KCl typischerweise einen elektrischen Widerstand von 10 - 20 M $\Omega$ . Für Messungen in der *wv*-Konfiguration eignete sich am besten dünnwandiges Borosilikatglas (Außendurchmesser 1,65 mm, Wanddicke 0,16 mm, Hilgenberg, Malsfeld). Die Öffnung der Pipettenspitzen hatten mit einer Füllung von 100 mM KCl einen elektrischen Widerstand von 1 - 2 M $\Omega$ .

Durch Verwendung eines mit Aluminium abgeschirmten Teflon-Pipettenhalters und der oben beschriebenen Pipetten konnte das Grundrauschen der Meßapparatur zwischen 270 - 350 fA, bei einem Abdichtungswiderstand  $\geq 10$  G $\Omega$ , gehalten werden. Ein mit AgCl beschichteter Silberdraht in einem Teflonschlauch diente als Referenzelektrode. Der Schlauch wurde luftblasenfrei mit Pipettenmedium befüllt und an seinem im Badmedium befindlichen Ende mit einem Agarpfropfen (3 % Agar im Pipettenmedium) abgedichtet.

#### 3.8.2 Meßküvetten und Badperfusion

Als Meßküvetten dienten kleine Teflonschalen ( $\varnothing$  37 mm) mit gebohrten Löchern ( $\varnothing$  17 mm) und abgeschrägten Wänden. Die Öffnung konnte durch ein unterklebtes Deckglas (SYLGARD) verschlossen werden. Die Meßküvetten wurden nach Gebrauch mit einem scharfen A. dest.-Strahl vorgereinigt und vergälltem Ethanol für 5 min überschichtet. Anschließendes Abspülen mit A. dest. und Trocknen im N<sub>2</sub>-Strahl vervollständigte die Reinigung. Die Meßküvetten erlaubten einen Austausch des Badmediums (ca. 1,5 ml·min<sup>-1</sup>) mittels zweier Peristaltikpumpen. Ein zweiter an einem Mikromanipulator angebrachter externer Zulauf

(über Druck, bzw. Schwerkraft reguliert) garantierte eine schnelle Zugriffszeit für externe Effektoren und Inhibitoren. Während des Austausches verschiedener Badmedien wurde darauf geachtet, das Volumen des in der Meßküvette befindlichen Badmediums niedrig zu halten (100  $\mu$ l), um einen kompletten Austausch (mind. das 20fache des Badvolumens) zu gewährleisten.

### 3.8.3 Membrankonfigurationen

Die Patch-Pipette wurde unter 400facher Vergrößerung an eine Vakuole herangefahren. Durch Absenkung des Überdrucks, bzw. Anlegen eines Unterdruckes, konnte bei sauberen Vakuolen in etwa 50% aller Fälle die "vacuole-attached"-Konfiguration erreicht werden (Abdichtungswiderstand  $\geq 10 \text{ G}\Omega$ , NEHER & SAKMANN 1992). Entsprechend der Konvention für elektrophysiologische Messungen an mit einer einfachen Biomembran umgebenen Endosomen (BERTL et al. 1992, SILVERSTEIN et al. 1993) wird die Potentialdifferenz über dem Tonoplasten ( $\Delta\psi_m$ ) definiert als:  $\Delta\psi_m = V_m = V_{\text{Zytosol}} - V_{\text{vakuole}}$ . Diese Konvention betrachtet das vakuoläre Lumen gegenüber dem extrazellulären Raum funktional gleichwertig. Dies bedeutet, daß die in früheren Publikationen definierten „inside-out-“ und „outside-out-Konfigurationen“ hier in umgekehrter Weise behandelt werden (s. Abb. 3.5). Durch Abziehen der Pipette wurde die "cytosolic-side in"-Konfiguration ("ci-patch") erzielt (AMTMANN & SANDERS 1997), d. h. die vakuoläre lumenale Seite war dem Badmedium exponiert.

Nach BERTL et al. (1992) folgt für die Richtung der Ionenbewegungen und der angelegten Spannungen am Verstärker:

- Das Anlegen einer positiven Haltespannung am Verstärker bedeutet eine positive Haltespannung am Tonoplasten.
- Ein positiver oder auswärts gerichteter Strom bedeutet einen Kationenausstrom aus dem Zytosol (Pipette) in die Vakuole (Bad).
- Ein negativer oder einwärts gerichteter Strom bedeutet einen Kationenstrom aus der Vakuole (Bad) in das Zytoplasma (Pipette).

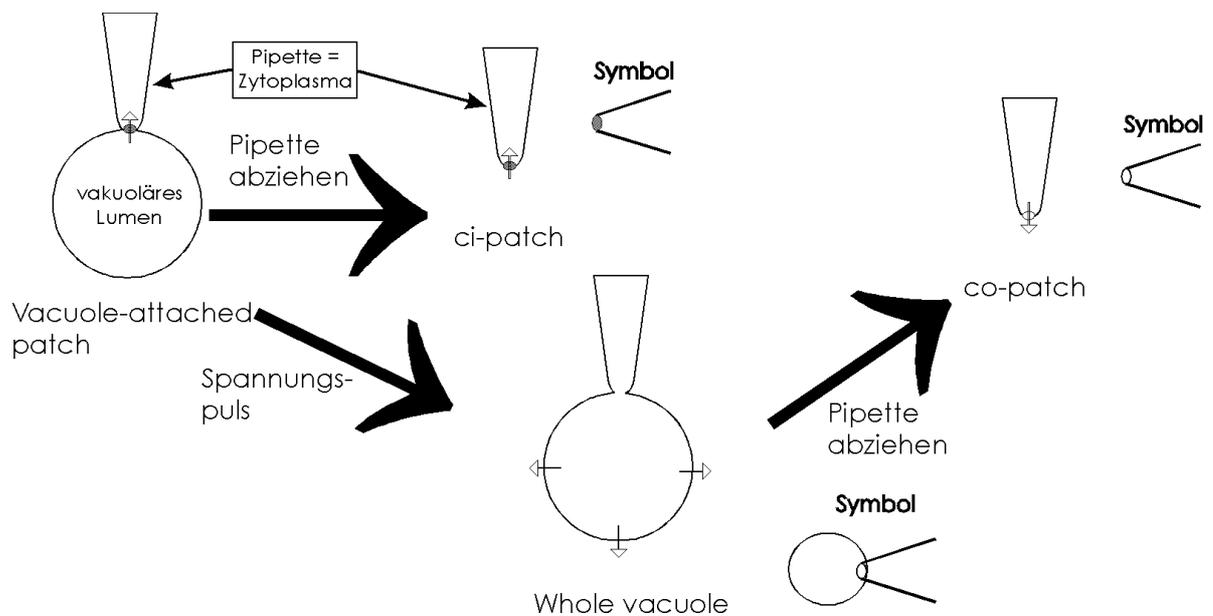


Abb. 3.5: Schema der verschiedenen Membrankonfigurationen. Die Pfeile verdeutlichen die Richtung des negativen Stromes innerhalb der Patch-Clamp-Konfiguration, d. h. vom vakuolärem Lumen in das Zytoplasma. *co* (cytosolic-side out: Exponierung der Tonoplastenoberfläche zum Bad hin); *ci* (cytosolic-side in: Exponierung des Tonoplastenlumens zum Bad hin; verändert, nach HAMILI et al. 1981).

Für die Erzeugung des "whole vacuole"-Modus ("*wv*") wurde ein Spannungssprung von -1V auf +1V (Dauer: 20 ms) appliziert (HEDRICH & NEHER 1987), d. h. die zytoplasmatische Seite war dem Badmedium exponiert. Das Erreichen des "*wv*"-Modus konnte durch den Anstieg des Rauschens und der Membrankapazität beobachtet werden. Durch Abziehen der Pipette aus dem "*wv*"-Modus wurde die "cytosolic-side ot"-Konfiguration ("*co*-patch") erzielt.

### 3.8.4 Berechnung der Selektivitäten aus der Strom-Spannungs-Kennlinie

Die mit dem DAT-Recorder mit einer "sample rate" von 46 kHz aufgenommenen Kanalereignisse wurden einer weiteren computerunterstützten Analyse mit dem Unterprogramm Fetchan des Programmpakets PCLAMP (Version 5.51, Axon Instruments) unterzogen. Nach einer ersten Filterung mit 10 kHz (PC-Verstärker EPC-7) wurden sie einer zweiten Filterung bei 350 - 550 Hz (8-pole bessel filter, KEMO) unterzogen. Die Daten wurden dann mit einer Aufnahmerate von 100 - 200  $\mu$ s auf der Festplatte digitalisiert, was mit der gewählten Filterung verlässliche Aussagen hinsichtlich der Offen- und Geschlossenzeiten eines Kanals erlaubt (COLQUHOUN & SIGWORTH 1985). Bei den Daten handelt es sich um mindestens 3 reproduzierte Versuchsabläufe. Die auf der Festplatte digitalisierten Daten der Kanalereignisse

wurden zur Erstellung einer Strom-Spannungs-Kennlinie folgendermaßen behandelt:

Die ermittelten Stromamplituden wurden gegen die angelegte Spannung in ein Koordinatensystem aufgetragen. Soweit ein Kanal eine "ohmsche" Abhängigkeit, also eine lineare Strom-Spannungs-Kennlinie aufwies, konnte die Messung durch eine Regressionsgerade beschrieben werden (Excel 5), wobei die Leitfähigkeit mit  $g = \frac{I}{U}$  direkt abgelesen werden konnte. Mit der Regressionsgerade für die einzelnen Messungen konnte mit  $I_{ges} = 0$  das Umkehrpotential ( $E_{rev}$ ) nach Goldman-Hodgkin-Katz mit:

$$E_{rev} = \frac{R \cdot T}{F \cdot z_i} \cdot \ln \frac{P_{K^+} \cdot [K^+]_v + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_v + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_c}{P_{K^+} \cdot [K^+]_c + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_c + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_v} \quad (11)$$

ermittelt werden, wobei R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur in Grad Kelvin, F die Faradaykonstante und  $z_i$  die Wertigkeit des Ions angibt.

Das Umkehrpotential ( $E_{rev}$ ) erlaubt aufgrund der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung die Berechnung der Selektivitäten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\chi$  als Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten.

$$\text{Mit } \alpha = \frac{P_{Cl^-}}{P_{K^+}} \text{ und } \beta = \frac{P_{Na^+}}{P_{K^+}}, \quad (12),(13)$$

$$\text{kann für } \alpha = \frac{[K^+]_v - e^x \cdot [K^+]_c}{e^x \cdot [Cl^-]_v - [Cl^-]_c} \quad (14)$$

$$\text{mit } x = \frac{E_{rev} \cdot F}{R \cdot T}$$

und unter Berücksichtigung von  $\alpha$

$$\text{für } \beta = \frac{[K^+]_v - e^x \cdot \left( [K^+]_c + \alpha \cdot [Cl^-]_v \right) + \alpha [Cl^-]_c}{e^x \cdot [Na^+]_c - [Na^+]_v} \quad (15)$$

gesetzt werden.

Treten im Medium parallel sowohl ein- als auch zweiwertige Ionen auf, die das Umkehrpotential beeinflussen, so kann Gleichung (11) wegen der verschiedenen Ladungen der zu charakterisierenden Ionen ( $z_i$ ) nicht angewandt werden. Abhilfe leistet die Goldman-Hodgkin-Katz-Stromgleichung (HODGKIN & KATZ 1949), wonach für  $K^+$

$$I_{K^+} = \frac{F^2 \cdot P_{K^+} \cdot E_{rev}}{R \cdot T} \cdot \frac{\left( [K^+]_v - [K^+]_c \cdot e^x \right)}{1 - e^x} \quad (16)$$

gilt. Entsprechend wurde für  $Na^+$  und  $Cl^-$  verfahren.

Für  $Ca^{2+}$  gilt

$$I_{Ca^{2+}} = \frac{4F^2 \cdot P_{Ca^{2+}} \cdot E_{rev}}{R \cdot T} \cdot \frac{\left( [Ca^{2+}]_v - [Ca^{2+}]_c \cdot e^{2x} \right)}{1 - e^{2x}} \quad (17)$$

Der Gesamtstrom ( $I_{ges}$ ) ist

$$I_{ges} = I_{K^+} + I_{Na^+} + I_{Ca^{2+}} + I_{Cl^-} \quad (18)$$

Wegen unterschiedlicher Nenner in Gleichung (16) und (17) muß ein neuer Permeabilitätskoeffizient für  $Ca^{2+}$  definiert werden. Mit

$$P'_{Ca^{2+}} = \frac{P_{Ca^{2+}}}{1 + e^x} \quad (19)$$

womit Gleichung (16) zu

$$I_{Ca^{2+}} = \frac{4F^2 \cdot P'_{Ca^{2+}} \cdot E_{rev}}{R \cdot T} \cdot \frac{\left( [Ca^{2+}]_v - [Ca^{2+}]_c \cdot e^{2x} \right)}{1 - e^{2x}} \quad (20)$$

wird.

Für  $E_{rev} = E_m$  wird  $I_{ges} = 0$ , bzw.

$$0 = P_{K^+} \left( [K^+]_v - [K^+]_c \cdot e^x \right) + P_{Na^+} \left( [Na^+]_v - [Na^+]_c \cdot e^x \right) + 4P'_{Ca^{2+}} \left( [Ca^{2+}]_v - [Ca^{2+}]_c \cdot e^{2x} \right) \quad (21)$$

Unter der Voraussetzung, daß  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  und  $Ca^{2+}$  unabhängig voneinander permeieren und weiterhin  $Na^+$  und  $Cl^-$  vernachlässigt werden, gilt

$$\frac{P_{Ca^{2+}}}{P_{K^+}} = \frac{[K^+]_v - e^x \cdot [K^+]_c}{4 \left( e^{2x} \cdot [Ca^{2+}]_c - [Ca^{2+}]_v \right)} \quad (22)$$

und mit Gleichung (19)

$$\chi = \frac{P_{Ca^{2+}}}{P_{K^+}} = \frac{[K^+]_v - e^x \cdot [K^+]_c}{4 \left( e^{2x} \cdot [Ca^{2+}]_c - [Ca^{2+}]_v \right)} \cdot (1 + e^x) \quad (23)$$

Falls  $Na^+$  und  $Cl^-$  mit in die Kalkulation einbezogen werden soll, gilt jedoch

$$\chi = \frac{P_{Ca^{2+}}}{P_{K^+}} = \frac{\beta \left( [Na^+]_v - e^x \cdot [Na^+]_c \right) + \alpha \left( [Cl^-]_c - e^x \cdot [Cl^-]_v \right) + [K^+]_v - e^x \cdot [K^+]_c}{4 \left( e^{2x} \cdot [Ca^{2+}]_c - [Ca^{2+}]_v \right)} \cdot (1 + e^x)$$

als Gleichung (24).

Zur Berechnung der Selektivität von  $Ba^{2+}$  und  $Sr^{2+}$  gegenüber  $K^+$  eines hochselektiven  $Ca^{2+}$ -Kanals (s. Kap. 4.3.2.3) wurde angenommen, daß die Konzentration von  $Ba^{2+}$  und  $Sr^{2+}$  auf der zytoplasmatischen Seite  $1 \mu M$  nicht überschritt.

Die Permeabilität von  $Mg^{2+}$  zur Berechnung der  $Ca^{2+}$ -,  $Ba^{2+}$ - und  $Sr^{2+}$ -Selektivität wurde mit

$$\delta = \frac{P_{Mg^{2+}}}{P_{K^+}} = \frac{\left[ -4\chi_{Mg^{2+}} \left( e^{2x} \cdot [Mg^{2+}]_c - [Mg^{2+}]_v \right) / (1 + e^x) \right] + [K^+]_v - e^x \cdot [K^+]_c}{4 \left( e^{2x} \cdot [X^{2+}]_c - [X^{2+}]_v \right)} \cdot (1 + e^x) \quad (25)$$

berücksichtigt.

Die Permeabilität von  $Ca^{2+}$  zur Berechnung der  $Cl^-$ -Selektivität des schnell aktivierbaren Kationenkanals (s. Kap. 4.3.1.1) wurde mit

$$\varepsilon = \frac{[K^+]_v - e^x \cdot [K^+]_c + \left[ -4\chi \left( e^{2x} \cdot [Ca^{2+}]_c - [Ca^{2+}]_v \right) / (1 + e^x) \right]}{e^x \cdot [Cl^-]_v - [Cl^-]_c} \quad (26)$$

berücksichtigt.

### 3.8.5 Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit

Bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Messungen waren bis zu 5 Kanäle gleichzeitig aktiv. Dementsprechend zeigen die Kanalstrom-Amplituden-Diagramme bis zu 5 überlagerte Kanalereignisse, bzw. bis zu 5 Spuren von Stromamplituden. Das Auftreten von mehreren Kanälen bei sogenannten Einzelkanalmessungen problematisiert die Analyse der mittleren Offenwahrscheinlichkeit und Offenzeit, da die Kenntnis der genauen Kanalanzahl erforderlich ist (JACKSON 1985). Gleichzeitige Öffnungsereignisse aller Kanäle waren im Kanalstrom-Amplituden-Diagramm nicht zu beobachten, da eine geringe Offenwahrscheinlichkeit ( $< 20\%$ ) der einzelnen Kanäle vorlag. Somit erschienen weniger Kanalereignisse als Kanäle im Patch vorhanden waren, womit eine Berechnung der wahrscheinlichsten Kanalanzahl notwendig wurde. Zur Berechnung der wahrscheinlichsten Kanalanzahl wurde die in REIFARTH et al. (1994) beschriebene Methode verwendet, d.h. die Binomialverteilung wurde unter der Voraussetzung angewandt,

daß die Kanäle unabhängig voneinander arbeiteten, statistisch gesehen ein identisches Verhalten zeigten und Ereignisse derselben Qualität vorlagen.

Um die Binomialverteilung zur Ermittlung der Offenwahrscheinlichkeit anwenden zu können, wurde die Ereigniswahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Spur aus den Öffnungsereignissen der jeweiligen Spur errechnet.

Binomialverteilung:

$$P(S) = \frac{C! \cdot (P_E)^S \cdot (1 - P_E)^{C - S}}{S! \cdot (C - S)!} \quad (27)$$

mit  $P(S)$  = Ereigniswahrscheinlichkeit für das Auftreten der Grundlinie oder einer bestimmten Spur, wobei:

$S$  = die jeweilige Spur,  $S = 0$  kennzeichnet die Grundlinie,

$C$  = wahrscheinlichste Kanalanzahl

$P_E$  = durchschnittliche Ereigniswahrscheinlichkeit eines der  $C$  Kanäle

Die in Fetchan ermittelten Öffnungsereignisse der Spuren entsprachen den nicht normierten Ereigniswahrscheinlichkeiten ( $P'(S)$ ):

$P'(0)$  = Alle Öffnungsereignisse von Spur 1 mit Überlagerungen (entspricht ungefähr den Geschlossenereignissen)

$P'(1)$  = Öffnungsereignisse von Spur 1 ohne Überlagerungen, usw. bis

$P'(N)$  = Öffnungsereignisse der letzten Spur  $N$

Hieraus erfolgte die Normierung der  $P'(S)$ , wobei die Summe aller  $P(S)$  1 ergeben mußte:

$$P(S) = \frac{P'(S)}{\sum_{S=0}^N P'(S)} \quad (28)$$

Die erhaltenen Werte für  $P(S)$  ergaben eine Binomialverteilung, die einer bestimmten Kanalanzahl ( $C$ ) am besten entsprach. Außer den  $P(S)$ -Werten wurde für die Näherung der wahrscheinlichsten Kanalanzahl noch die durchschnittliche Ereigniswahrscheinlichkeit ( $P_E$ ) benötigt und wie folgt berechnet:

$$P_E \approx 1 - \sqrt[K]{P(0)} \quad \text{mit } K = \text{vermuteter Kanalzahl} \quad (29)$$

Die mittlere Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals  $P_{O_m}$  berechnete sich nunmehr aus

$$P_{O_m} = \frac{(P_{O_1} + P_{O_2} + \dots + P_{O_S})}{K} \quad (30)$$

wobei  $P_{O_S}$  Offenwahrscheinlichkeit der  $S$  Spuren bedeutet

$$P_{o_s} = \frac{(t_{o_s} \cdot N_s)}{t_{ges}} = \frac{t_{o_s}}{t_{ges}} \quad (31)$$

mit  $t_{o_s}$  = Gesamtoffenzeit,  $t_{ges}$  = Gesamtmeßdauer und  $N$  = Anzahl der Ereignisse.

Für die Auswertung der mittleren Offenwahrscheinlichkeit wurden Meßabschnitte mit 30 Sekunden Dauer verwendet, die keine Aktivität anderer Kanäle zeigten.

### 3.8.6 „Liquid-Junction“-Potentiale

Bei Patch-Clamp-Messungen mit Medien unterschiedlicher Ionenzusammensetzung treten sogenannte „Liquid-Junction“-Potentiale ( $E_L$ ) auf (BARRY & LYNCH 1991), die überwiegend durch die unterschiedlichen Beweglichkeiten ( $u_i$ ) der beteiligten Ionen entstehen. Diese können durch eine abgewandelte „Liquid-Junction“-Potential-Gleichung nach Henderson als Differenz der Potentiale des Badmediums ( $E^S$ ) und des Pipettenmediums ( $E^P$ ) berechnet werden:

$$E^S - E^P = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \frac{\sum_{i=1}^N \left[ (z_i \cdot u_i) (a_i^S - a_i^P) \right]}{\sum_{i=1}^N \left[ (z_i^2 \cdot u_i) (a_i^S - a_i^P) \right]} \cdot \ln \frac{\sum_{i=1}^N z_i^2 \cdot u_i \cdot a_i^P}{\sum_{i=1}^N z_i^2 \cdot u_i \cdot a_i^S} \quad (32)$$

mit:  $z_i$  = Valenz des Ions  $i$ ,  $u_i$  = Beweglichkeit des Ions  $i$  [ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mol}$ ],  $a_i^P$  = Aktivität des Ions  $i$  [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ] im Pipettenmedium,  $a_i^S$  = Aktivität des Ions  $i$  [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ] im Badmedium.

Eine weitere Möglichkeit zur Abschätzung des „Liquid-Junction“-Potentials besteht durch die direkte Messung nach NEHER (1992). Das Potential einer weit geöffneten Referenzelektrode (3 M KCl) wird hierbei gegenüber den mit den Testmedien befüllten Bad und Patch-Pipette gemessen. Zur Korrektur wurde die direkte Messung nach NEHER (1992) verwendet (s. Tab. 3.4).

Die verwendeten Lösungen wurden bei Messungen im *ci*-Modus mit Mannitol auf eine Osmolarität von 400 mOsm eingestellt. Für Messungen im *wv*- und *co*-Modus wurden Lösungen mit einer Osmolarität von 600 mOsm genommen. Zur Korrektur der  $E_L$ -Potentiale wurden für die Lösungen folgende Werte festgestellt:

Tabelle 3.4: Ionen-Zusammensetzung und Liquid-junction-Potentiale ( $L_j$ ) der verwendeten Lösungen (Angaben der Ionenkonzentrationen in mM). Die Puffer zur Einstellung der pH-Werte waren HEPES/TRIS (10 mM/ pH 7,2 - 7,4) und MES/TRIS (10 mM/ pH 5,6). Das angelegte Haltepotential ( $\psi_m$ ) wurde gegenüber dem im Experiment gemessenen Potential ( $\psi_{\text{Experiment}}$ ) in folgender Weise korrigiert:

*co-* und *vv*-Konfiguration:  $\psi_m = \psi_{\text{Experiment}} - L_j$

*ci*-Konfiguration:  $\psi_m = \psi_{\text{Experiment}} + L_j$

Für alle anderen verwendeten Lösungen wurden keine  $L_j$ -Potentiale bestimmt, da diese aufgrund der Ionen-Zusammensetzung vernachlässigbar waren.

	Pipette						Bad						
Kap.	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	$L_j$ [mV]
4.3.1 4.3.2 4.3.3	10	5	1	-	22	5,2	100	0,001	1	-	202	7,4	+22,9 ± 0,1
4.3.2.1 4.3.2.2	100	0,1	1	2	102	7,2	10	5	1	2	20	7,2 5,6	-18,4 ± 0,3
4.3.2.2	100	0,1	1	2	102	7,2	10	50	1	2	20	7,2 5,6	-11,8 ± 0,4
Kap.	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	$L_j$ [mV]
4.3.4.2 4.3.5.2	100	1	2	106	-	7,2	1	50	2	106	-	7,2	-6,9 ± 0,2
Kap.	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	$L_j$ [mV]
4.3.2.3	100	0,1	1	100	4	7,2	10	50	1	100	12	7,2	-7,2 ± 0,1
Kap.	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	K <sup>+</sup>	Ba <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	$L_j$ [mV]
4.3.2.3	100	0,1	1	100	4	7,2	10	50	1	100	12	7,2	-7,1 ± 0,2
Kap.	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	K <sup>+</sup>	Sr <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	$L_j$ [mV]
4.3.2.3	100	0,1	1	100	4	7,2	10	50	1	100	12	7,2	-7,6
Kap.	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	K <sup>+</sup>		Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	pH	$L_j$ [mV]
4.3.2.3	100	0,1	1	100	4	7,2	10	-	50	100	10	7,2	-8

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Der pH-Gradient über dem Tonoplasten

Der Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten  $\Delta\mu_{H^+}/F$  (protonentreibende Kraft) über dem Plasmalemma und Tonoplasten einer Pflanzenzelle geschieht mit Hilfe von Elektroenzymen, die unter Hydrolyse energiereicher Phosphatverbindungen Protonen gegen einen Gradienten verschieben („Protonenpumpen“, SPANSWICK 1981, REA & SANDERS 1987). Auf diese Weise wird sowohl ein elektrischer Potentialgradient ( $\Delta\Psi_m$ ) als auch ein pH-Gradient ( $\Delta pH$ ) über der betreffenden Membran generiert, die sich entsprechend der chemiosmotischen Hypothese von Mitchell (1961) als gleichwertige Komponenten zum elektrochemischen Protonengradienten addieren:

$$\frac{\Delta\mu_{H^+}}{F} = \Delta\Psi_m - \frac{2,3 \cdot RT}{F} \cdot \Delta pH .$$

Während die ATP-getriebene Protonenpumpe des Plasmalemmas einen elektrischen Gradienten (Zytoplasma negativ) und einen pH-Gradienten zwischen Zytoplasma und Apoplast (sauer) aufbaut (SLAYMAN 1974, GRIGNON & SENTENAC 1991), generieren die protonentranslozierenden Enzyme am Tonoplasten, die ATP und Pyrophosphat als Substrat benutzen, einen steilen pH-Gradienten zwischen Zytoplasma und Vakuole (vakuoläres Lumen sauer, SZE 1985, REA & SANDERS 1987). Den eben genannten primär aktiven Transportprozessen, die am Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten beteiligt sind, werden die sekundär aktiven Transportprozesse an die Seite gestellt, die diese konservierte Energie als Triebkraft benutzen (z. B.  $H^+/Ca^{2+}$ -Antiport).

In Kapitel 4.1 erfolgt mit Hilfe des Indikatorfarbstoffes Acridinorange (AO) eine Charakterisierung der hergestellten Vakuolensuspension, hinsichtlich der für die Energetisierung der Vakuole spezifischen Protonenpumpen. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Aktivität der tonoplastenständigen vakuolären  $H^+$ -ATPase (v- $H^+$ -ATPase) und Pyrophosphatase (v-PPase), die Größe des von ihnen generierten transmembranen pH-Gradienten sowie der Einfluß von  $Ca^{2+}$  auf diesen gelegt.

Die vakuolären pH-Werte wurden in Abhängigkeit von der erhaltenen Absorptionsänderung bei 490 nm ( $\Delta A_{490}$ ) gemäß Kapitel 3.7.1 errechnet. Die nach Kapitel 3.5 isolierten Vakuolen konnten nach der Aufreinigung mit einem internen pH von  $5,7 \pm 0,3$  einen pH-Gradienten von 1,5 Einheiten gegenüber dem Versuchsmedium aufrecht erhalten.

#### 4.1.1 Die vakuoläre v-H<sup>+</sup>-ATPase

In pflanzlichen Zellen kann die zytosolische ATP-Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  bis 2 mM variieren (ROBERTS et al. 1985, JOHNSON et al. 1989, WU & ASSMANN 1995). Um den durch die v-H<sup>+</sup>-ATPase generierten pH-Gradienten sowie dessen Kinetik in Abhängigkeit von der applizierten ATP-Konzentrationen beschreiben zu können, wurde die Aktivität der v-H<sup>+</sup>-ATPase im AO-Versuch untersucht. Die Wirkung verschiedener ATP-Konzentrationen auf die durch die v-H<sup>+</sup>-ATPase generierte Protonentranslokation zeigt Abbildung 4.1. Schon bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  ATP wurde das „steady state“ der maximalen Ansäuerung der Vakuole zu 94 % erreicht. Nach Zugabe von sättigenden ATP-Konzentrationen wurden die Vakuolen innerhalb von 15 - 35 Minuten durch die v-H<sup>+</sup>-ATPase auf einen internen pH von  $4,8 \pm 0,2$  angesäuert. Geringe ATP-Konzentrationen (20 - 40  $\mu\text{M}$ ) führten noch zu einer Absenkung des vakuolären pH um 0,2 pH Einheiten. Die halbmaximale ATP-Konzentration zur Etablierung des durch die v-H<sup>+</sup>-ATPase generierten pH-Gradienten wurde auf 125  $\mu\text{M}$  taxiert.

Bafilomycin, ein 16-gliedriges Macrolid-Antibiotikum aus *Streptomyces spec.*, bewirkt im nanomolaren Konzentrationsbereich eine spezifische Inhibition der v-H<sup>+</sup>-ATPase (BOWMAN et al. 1988, RAUTIALLA et al. 1993, WHITE 1994). Diese spezifische Inhibition ermöglicht die Unterscheidung von direkt abhängigen gegenüber sekundär aktiven, ATP-abhängigen Transportprozessen. An Vakuolenpräparationen von *Z. mays* L. wurde die Wirkung von Bafilomycin auf den durch die v-H<sup>+</sup>-ATPase generierten pH-Gradienten untersucht. Die Inhibition der v-H<sup>+</sup>-ATPase durch Bafilomycin ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Eine vollständige Hemmung des Protonentransports war bereits bei einer Konzentration von 1 nM festzustellen. Die halbmaximale Inhibition des von der v-H<sup>+</sup>-ATPase generierten pH-Gradienten durch Bafilomycin wurde auf 120 pM abgeschätzt.

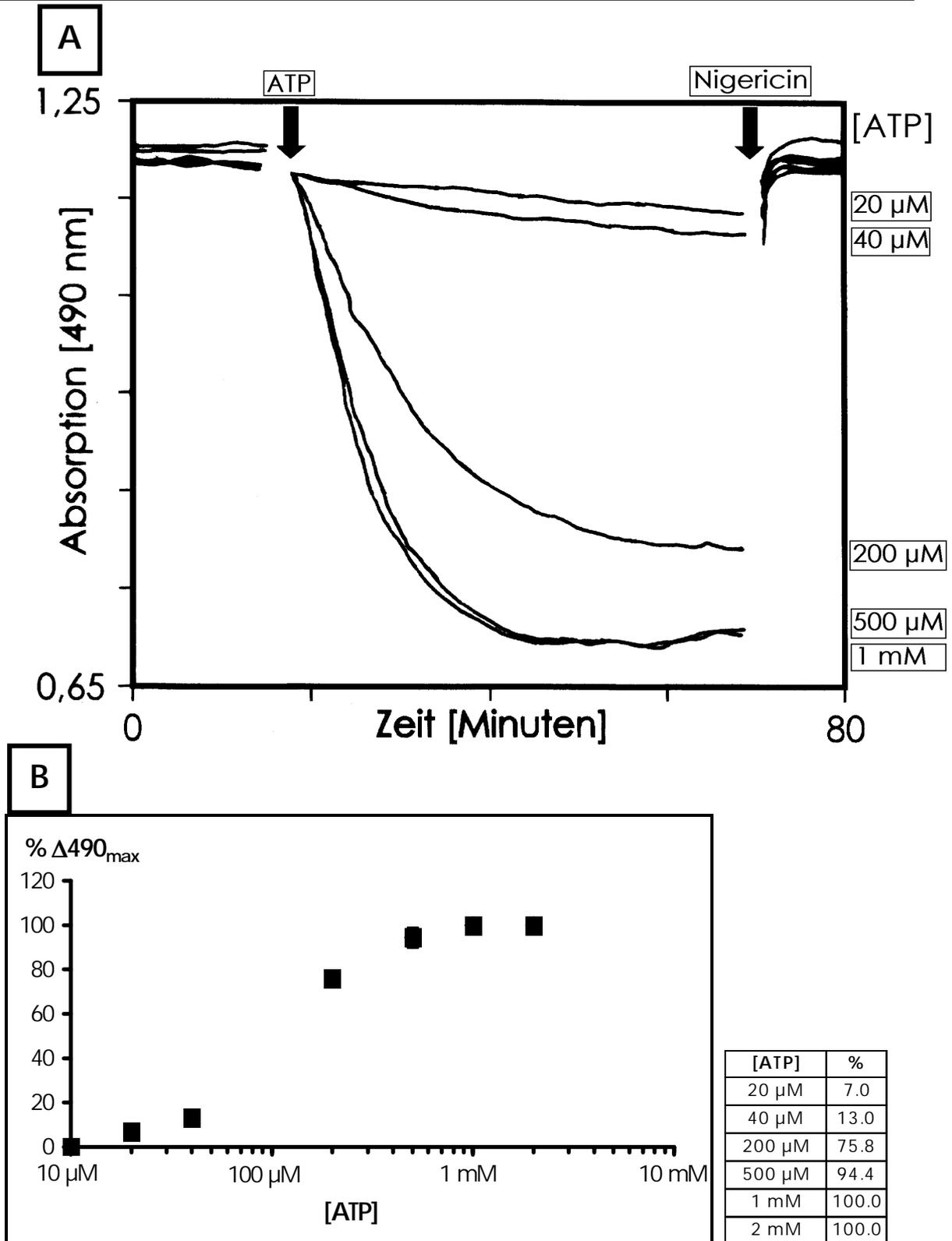


Abb. 4.1: Die vakuoläre v-H<sup>+</sup>-ATPase.

A: Wirkung von verschiedenen ATP-Konzentrationen auf den Protonentransport der v-H<sup>+</sup>-ATPase im Acridinorange-Versuch. Zum indizierten Zeitpunkt wurden jeweils 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und 1 mM ATP zugegeben (Pfeil links). Der generierte Protonengradient wurde anschließend mit 2,3  $\mu\text{M}$  Nigericin zerstört (Pfeil rechts).

B: Maximale Absorptionsänderung bei  $\lambda = 490 \text{ nm}$  als Funktion der applizierten ATP-Konzentration.

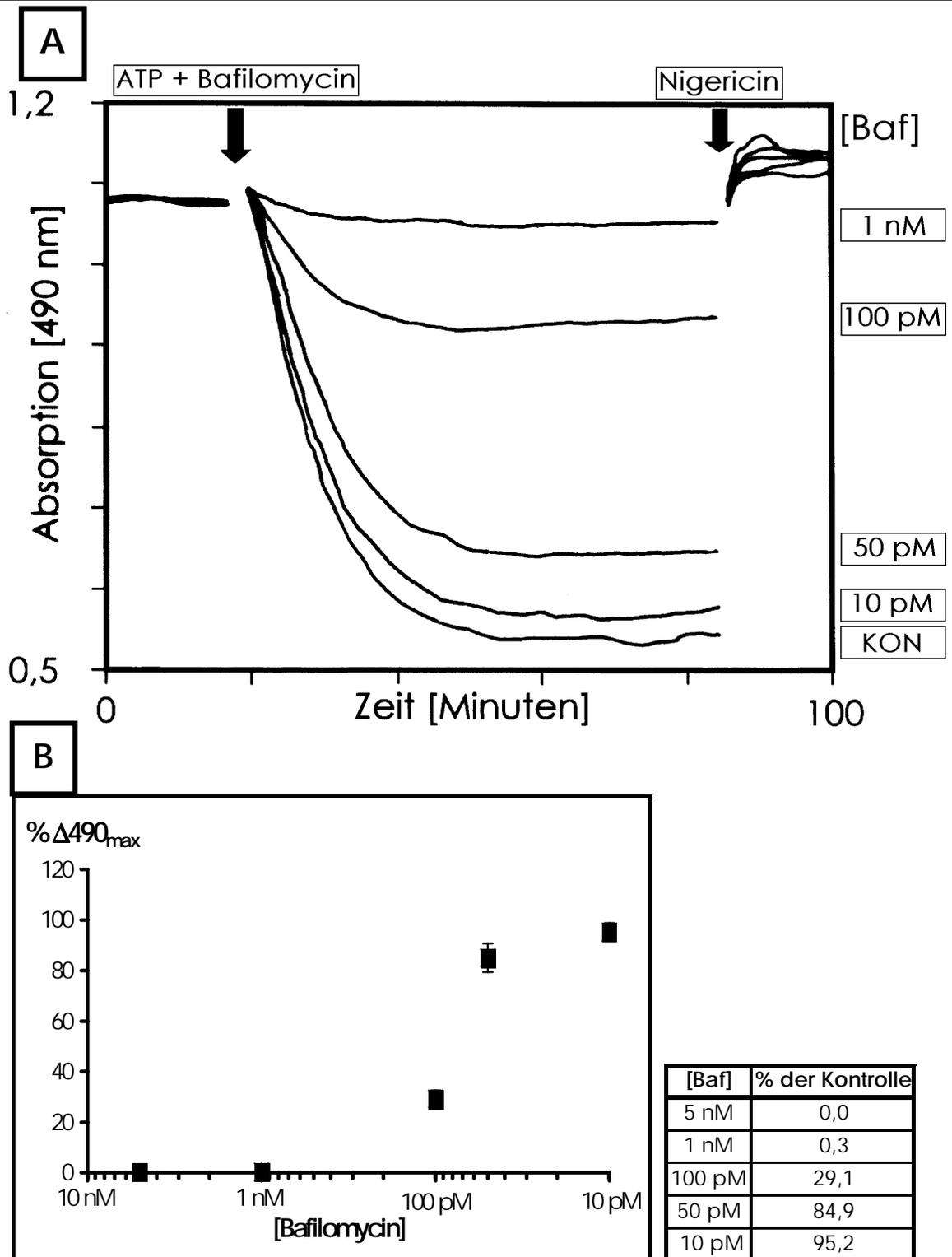


Abb. 4.2: Inhibition der  $v\text{-H}^+$ -ATPase durch Bafilomycin

A: Wirkung von Bafilomycin (10 pM bis 1 nM) auf den durch die  $v\text{-H}^+$ -ATPase generierten pH-Gradienten im Acridinorange-Versuch. Gleichzeitige Applikation der indizierten Bafilomycin-Konzentrationen und 2 mM ATP (Pfeil links). Der generierte Protonengradient wurde mit 2,3  $\mu\text{M}$  Nigericin zerstört (Pfeil rechts). KON: Kontrolle ohne Bafilomycin.

B: Maximale Absorptionsänderung bei  $\lambda = 490 \text{ nm}$  als Funktion der applizierten ATP-Konzentration Inhibition der  $v\text{-H}^+$ -ATPase durch Bafilomycin im Acridinorange-Versuch bei gleichzeitiger Applikation von Bafilomycin und 2 mM ATP (Endkonzentration).

#### 4.1.2 Der $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluß auf den pH-Gradienten über dem Tonoplasten

Da an der pflanzlichen Vakuole ein  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiport-Mechanismus vermutet wird (MARTINOIA 1992, BARKLA & PANTOJA 1996), stellte sich die Frage, inwiefern die Applikation von  $\text{Ca}^{2+}$  den durch ATP und PPI generierten Protonengradienten beeinflusst. Aus diesem Grunde wurde die Einwirkung verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf den Protonengradienten nach Erreichen des „steady states“ der Ansäuerung untersucht. Abbildung 4.3 zeigt den partiellen und konzentrationsabhängigen Abbau des durch die v- $\text{H}^{+}$ -ATPase generierten Protonengradienten durch  $\text{Ca}^{2+}$ . Der Protonengradient wurde in Gegenwart von 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  verringert. Geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen hatten keinen beobachtbaren Einfluß auf den Versuchsverlauf.

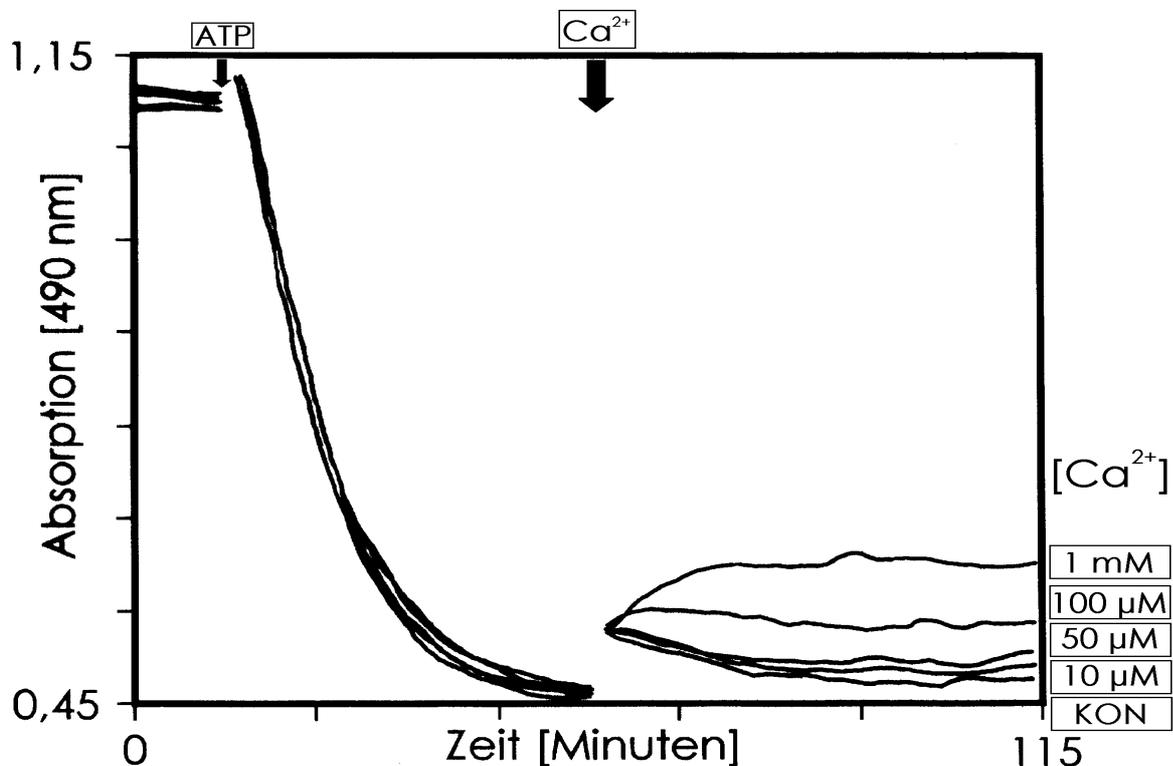


Abb. 4.3:  $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluß auf den pH-Gradienten über dem Tonoplasten.

Der Einfluß verschiedener  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen auf den durch die v- $\text{H}^{+}$ -ATPase generierten Protonengradienten von *Z. mays* L. Vakuolen. Nach der Applikation von 2 mM ATP (Pfeil links) wurde dem Versuchsmedium 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  zugegeben (Pfeil rechts). KON: Kontrolle ohne  $\text{CaCl}_2$ -Applikation.

Wurde  $\text{CaCl}_2$  gleichzeitig mit ATP zu Versuchsbeginn appliziert, zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine analoge, partielle und konzentrationsabhängige Behinderung des durch die v- $\text{H}^{+}$ -ATPase generierten Protonengradienten durch  $\text{Ca}^{2+}$  (s. Abb. 4.4).

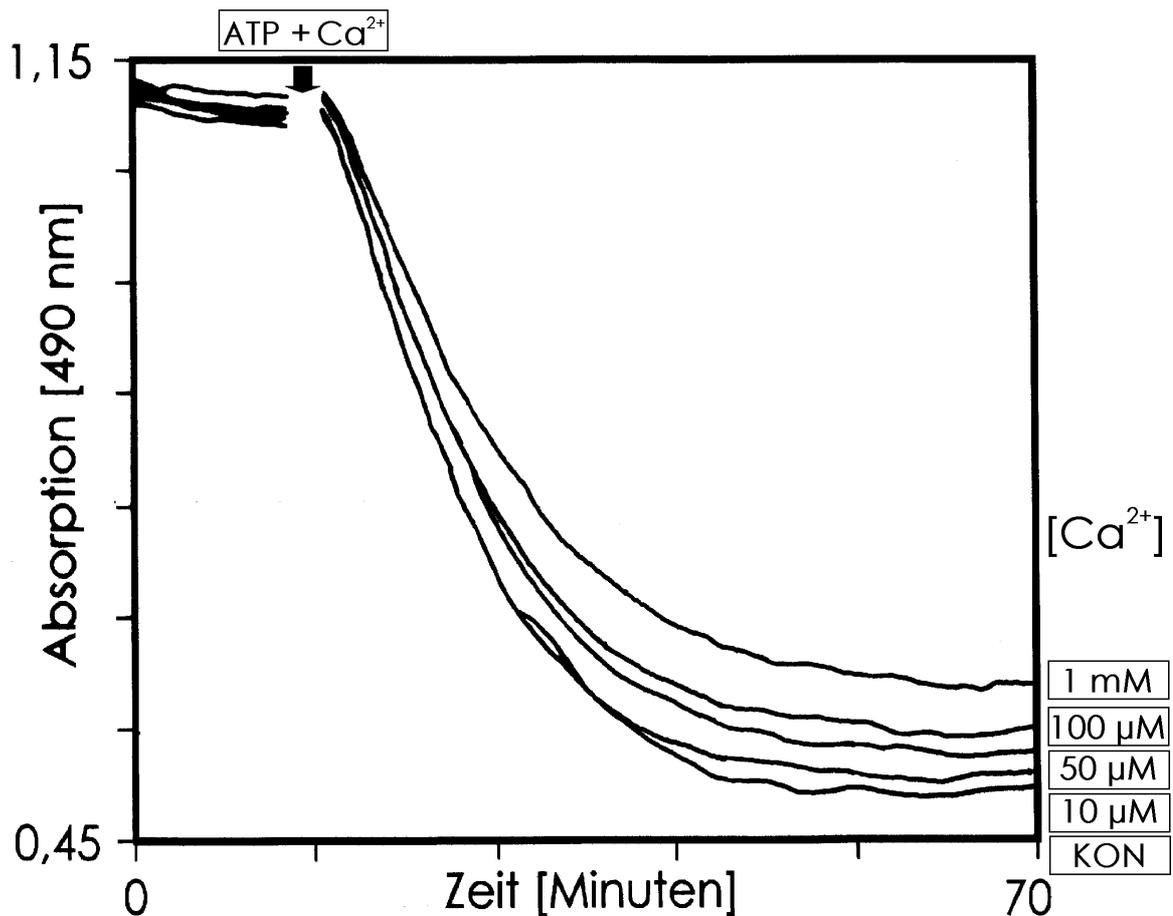


Abb. 4.4: Ca<sup>2+</sup>-Einfluß auf den pH-Gradienten über dem Tonoplasten. Der Einfluß verschiedener CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen auf den durch die v-H<sup>+</sup>-ATPase generierten Protonengradienten von *Z. mays* L. Vakuolen. Dem Versuchsmedium wurden gleichzeitig 2 mM ATP und 1 mM, 100 µM, 50 µM sowie 10 µM CaCl<sub>2</sub> zugegeben (Pfeil). KON: Kontrolle ohne CaCl<sub>2</sub>-Applikation.

Der Einfluß von Ca<sup>2+</sup> auf die Protonentranslokation der v-Pyrphosphatase wurde in entsprechender Weise untersucht (s. Abb. 4.5). Die v-PPase bewirkte nach Zugabe sättigender PPI-Konzentrationen (0,2 mM PPI) eine Ansäuerung des vakuolären pH von  $4,6 \pm 0,5$  auf das Niveau des „steady state“ der v-H<sup>+</sup>-ATPase. Durch die langsamere Transportrate der v-PPase wurde die maximale Ansäuerung erst nach 3 - 5 Stunden erreicht. Der durch die v-PPase generierte Protonengradient zeigte einen partiellen und konzentrationsabhängigen Abbau nach der Applikation von CaCl<sub>2</sub>. Der Protonengradient wurde in Gegenwart von 1 mM, 100 µM, 50 µM und 10 µM CaCl<sub>2</sub> verringert. Wiederum hatten geringere Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen keinen meßbaren Einfluß auf die Absorptionskinetik.

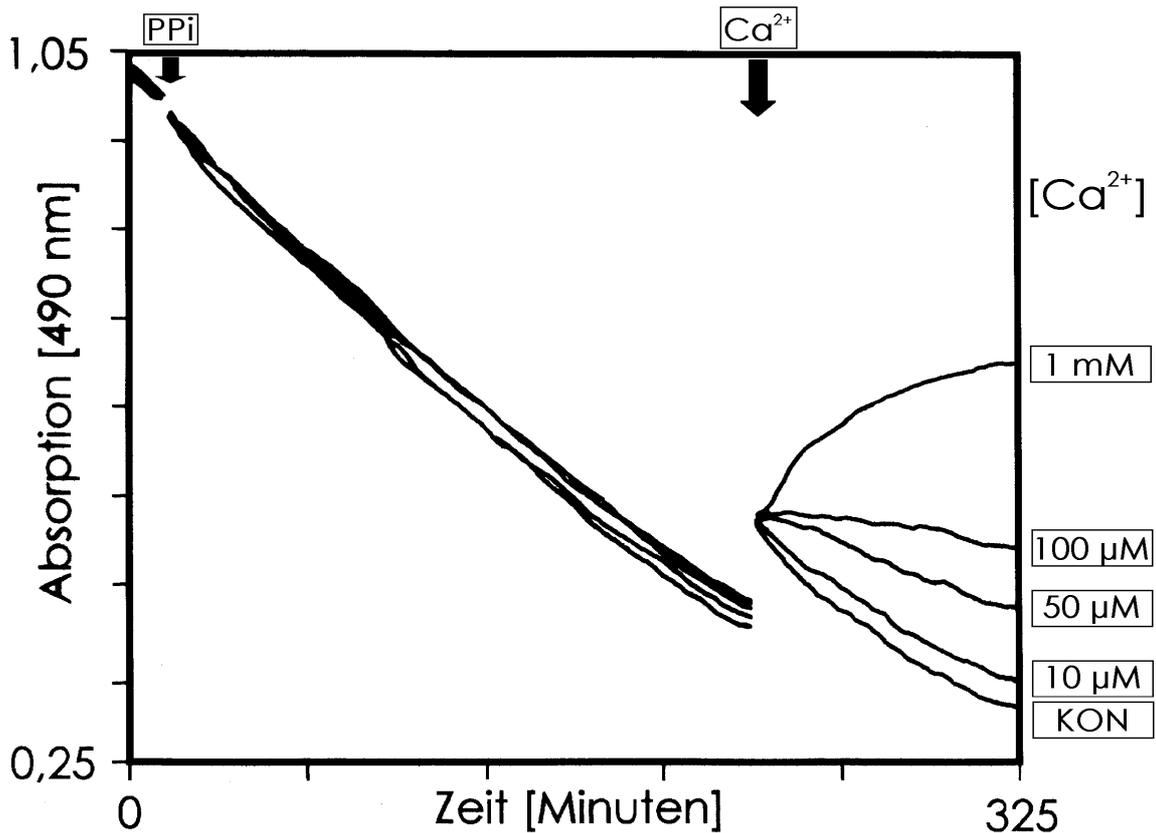


Abb. 4.5:  $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluß auf den pH-Gradienten über dem Tonoplasten. Der Einfluß verschiedener  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen auf den durch die  $v$ -Pyrophosphatase generierten Protonengradienten von *Z. mays* L. Vakuolen. Nach der Applikation von 0,2 mM PPI (Pfeil links) wurde dem Versuchsmedium 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  zugegeben (Pfeil rechts). KON: Kontrolle ohne  $\text{CaCl}_2$ -Applikation.

## 4.2 Der $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient über dem Tonoplasten

Die Aufrechterhaltung einer niedrigen zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird durch primär und sekundär aktive Transportprozesse, die  $\text{Ca}^{2+}$  gegen einen Gradienten in den extrazytosolischen Raum (Apoplast, Vakuole, Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrium, Plastiden) transportieren, ermöglicht.

Neben einem, noch hypothetischen, aber in Abb. 4.3 - 4.5 angedeuteten sekundär aktiven Transportmechanismus für  $\text{Ca}^{2+}$ , einem  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter (s. Kap 4.1.2), wird ein tonoplastenständiger primär aktiver Transportmechanismus für  $\text{Ca}^{2+}$  vermutet, eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

Mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiver Mini-Elektroden wurde dazu die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die Vakuole untersucht, wobei mittels Bafilomycin (Kap. 4.1.1) zwischen primär und sekundär aktiven Transportmechanismus unterschieden werden konnte. Wie in

Kapitel 3.5 und 3.6 beschrieben, wurden die Versuche mit BAPTA, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer zur Einstellung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und einer aufkonzentrierten Vakuolensuspension durchgeführt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bzw. -abgabe von *Z. mays* L. Vakuolen wurde als  $\text{Ca}^{2+}$ -Abnahme bzw. -anstieg im Versuchsmedium bestimmt.

#### 4.2.1 ATP-abhängiger $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in die Vakuole von *Z. mays* L. Koleoptil-Protooplasten

Eine ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme der *Z. mays* L. Vakuolen wurde in einem Bereich von 16 nM bis 5,1  $\mu\text{M}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$  untersucht. Zur Kontrolle der Aufnahme wurde dem Versuchsmedium zu Versuchsende der Porenbildner Digitonin (1  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, führte die Applikation von ATP in diesem Versuch zu einer Abnahme der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme war jedoch nicht stabil nachzuweisen. Es wurden Versuche mit Vakuolendichten von  $4 \cdot 10^5$  Vakuolen $\cdot\text{ml}^{-1}$  bis zu  $1,2 \cdot 10^6$  Vakuolen $\cdot\text{ml}^{-1}$  unternommen. Die Aufkonzentrierung der Vakuolen führte jedoch zu keiner Stabilisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme.

In ca. 25 % aller Versuche zeigte sich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme im Bereich der hier verwendeten ATP-Konzentrationen von 20 - 500  $\mu\text{M}$ . Die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  erwies sich als unabhängig von sekundär aktiven Transportmechanismen, da parallele Kontrollen mit 1 nM Bafilomycin auch zu einer Abnahme des freien  $\text{Ca}^{2+}$  im Versuchsmedium führte (s. Abb. 4.7A). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß durch den Tonoplasten zeigte eine Abhängigkeit von der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium. Wie aus Abbildung 4.7B ersichtlich ist, erreichte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate bei einer ATP-Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  ab einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ca. 800 nM eine Sättigung. Der durchschnittliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß durch den Tonoplasten entsprach in diesem Bereich  $152 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Eine weitere Erhöhung der ATP-Konzentration im Versuchsmedium führte zu keiner weiteren Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate (s. Abb. 4.7B). Wiederum erreichte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate bei ATP-Konzentrationen von 40 bzw. 200  $\mu\text{M}$  ab einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ca. 400 nM eine Sättigung. Der durchschnittliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß durch den Tonoplasten entsprach in diesem Bereich  $149 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

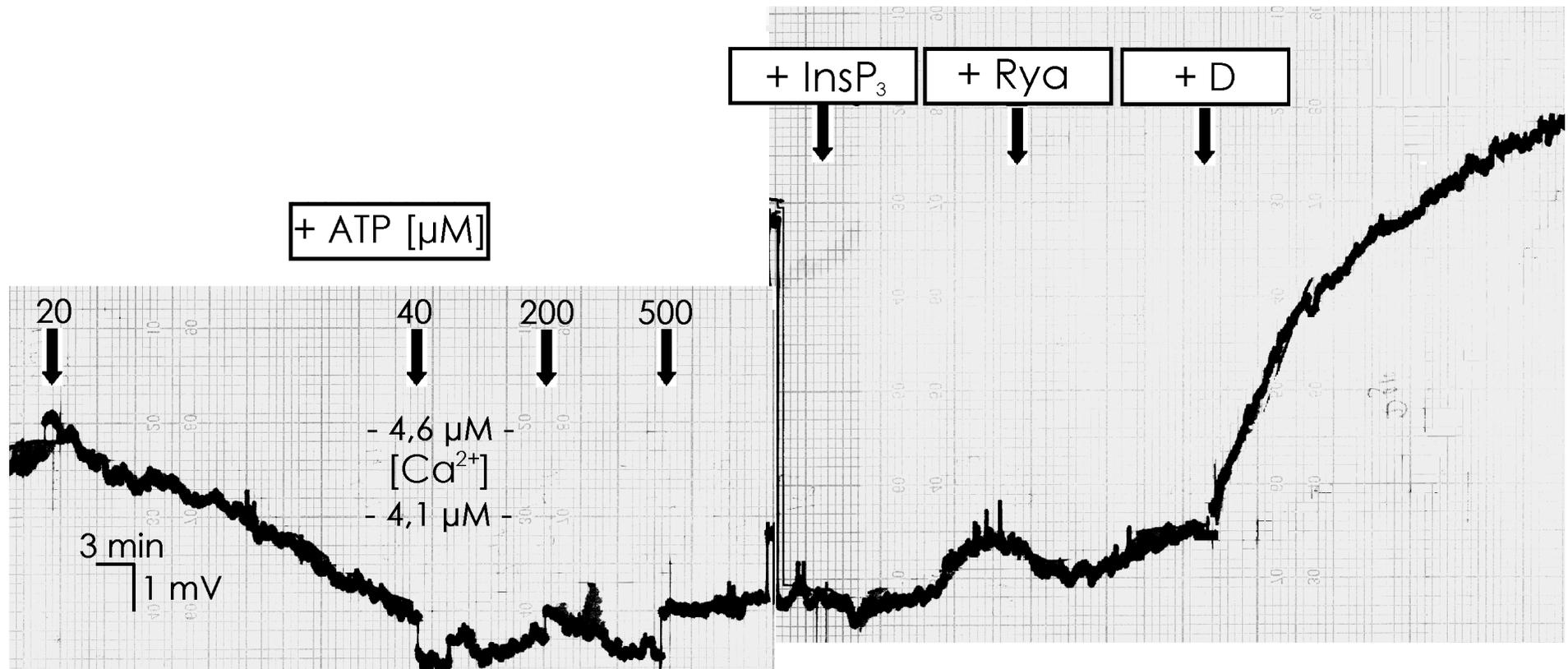


Abb. 4.6: Versuchsablauf zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport an einer Vakuolensuspension: Nach der Kalibrierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Elektroden (s. Abb. 3.2) wurde eine Vakuolensuspension mit  $890000 \text{ Vakuolen} \cdot \text{ml}^{-1}$  mit  $50 \mu\text{M}$  BAPTA auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $4,6 \mu\text{M}$  gepuffert. Durch Zugabe von ATP (linke Reihe der Pfeile, Konzentration in  $\mu\text{M}$ ) ist eine Abnahme des freien  $\text{Ca}^{2+}$  in der Vakuolensuspension zu erkennen. Nach der ATP-Zugabe erfolgte eine Korrektur des Linienschreibers. Im Anschluß an ca. 60 min der ATP-Einwirkung erfolgte die Zugabe der Effektoren. Nacheinander wurden jeweils  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  und Ryanodin (Rya) appliziert (obere Reihe der Pfeile). Es erfolgte die Freisetzung von  $0,4$  und  $0 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Nach der Zugabe der Effektoren wurde das freie  $\text{Ca}^{2+}$  der gesamten Vakuolensuspension durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  Digitonin (D) bestimmt.

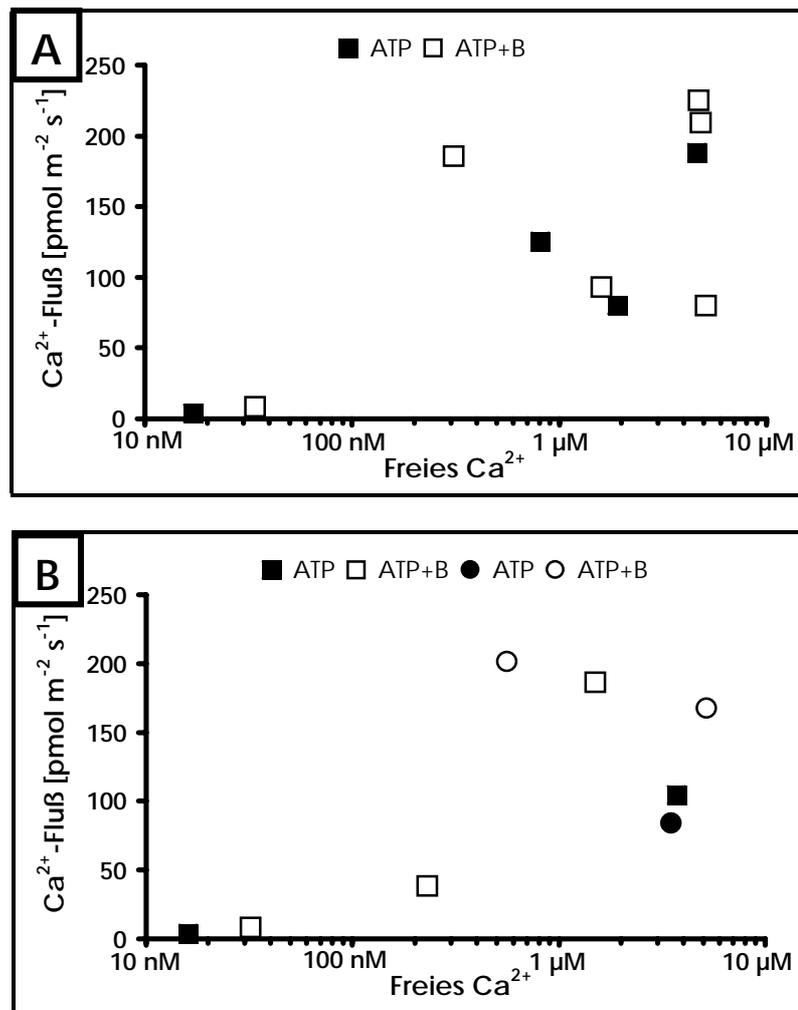


Abb. 4.7: ATP-abhängiger Ca<sup>2+</sup>-Transport in die Vakuole.

A: Die Abhängigkeit des Ca<sup>2+</sup>-Flusses durch den Tonoplasten von der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium. In den Versuchsansätzen befanden sich 20 μM ATP (■) bzw. 20 μM ATP und 1 nM Bafilomycin (□).

B: Die Abhängigkeit des Ca<sup>2+</sup>-Flusses durch den Tonoplasten von der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium. In den Versuchsansätzen befanden sich 40 μM ATP (■); 40 μM ATP und 1 nM Bafilomycin (□); 200 μM ATP (●); 200 μM ATP und 1 nM Bafilomycin (○).

Durch die Berechnung der durch Digitonin bzw. Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Agonisten freigesetzten Ca<sup>2+</sup>-Menge auf das im Versuch verwendete Vakuolenvolumen zeigte sich, daß die Vakuolen auch ohne eine erkennbare Aufnahme von Ca<sup>2+</sup> freies Ca<sup>2+</sup> in der Konzentration von mindestens 0,27 mM enthielten.

#### 4.2.2 Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung durch Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Agonisten

Die in Kapitel 4.2.1 dargestellte Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme der Vakuole von *Z. mays* L. wirft die Frage auf, ob die pflanzliche Vakuole nur als passives intrazelluläres Ca<sup>2+</sup>-Depot fungiert, in das Ca<sup>2+</sup> unter Energieaufwand aus dem Zytoplasma transportiert wird,

oder ob die pflanzliche Vakuole aktiv und steuernd, durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und -Freisetzung, in die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase eingreifen kann.

Dies schien angemessen, da langjährige Untersuchungen an Mais-Koleoptilen zeigten, daß externe Stimuli wie Indol-3-Essigsäure (FELLE 1988a), Abzissinsäure (GEHRING et al. 1990b), gravitropische Stimuli (GEHRING et al. 1990a) und seitlich appliziertes Licht (GEHRING et al. 1990a) zu einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen. Da an Mais-Koleoptilen bisher noch keine plasmalemma-ständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle nachgewiesen wurden, die zu einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen könnten, erschien es naheliegend die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuole zu untersuchen.

Nach dem bisherigen Kenntnisstand wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Endoorganellen als Bestandteil einer oder mehrerer Signaltransduktionsketten in pflanzlichen und tierischen Zellen angesehen. Da eine Aktivierung des Phosphoinositid-Metabolismus durch IES und Phytochrom in etiolierten Geweben von *Z. mays* L. demonstriert werden konnte (POLEVOI et al. 1996, GURON et al. 1992), wurde die Einwirkung des „second-messengers“ Inositol-1,4,5-triphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung der Vakuolensuspension untersucht.

Weiterhin wurde die Einwirkung von Ryanodin, ein Agonist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Endoorganellen in pflanzlichen und tierischen Zellen untersucht (MEISSNER 1994, ALLEN et al. 1995).

### **Inositol-1,4,5-triphosphat-induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung**

Einen typischen Versuch mit  $\text{InsP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß zeigt Abbildung 4.8. Die durch mind. 500  $\mu\text{M}$  MgATP energetisierten Vakuolenpräparationen von *Z. mays* L. setzten nach der Applikation von 1  $\mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  in 77 % aller Versuche ( $n = 17$ ) durchschnittlich 9 % des bereits aufgenommenen bzw. noch enthaltenen  $\text{Ca}^{2+}$  frei. Die freigesetzte Menge betrug 10 - 400 nM, in Abhängigkeit der eingesetzten Vakuolenmenge. Die durchschnittlich freigesetzte Menge betrug 21 nM pro  $10^5$  Vakuolen. Eine Aufnahme des freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  innerhalb der nächsten 15 Minuten war nicht beobachtbar.

Wurde die durch  $\text{InsP}_3$  freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge in Abhängigkeit der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium gesetzt, so zeigte sich im Bereich von 470 nM bis

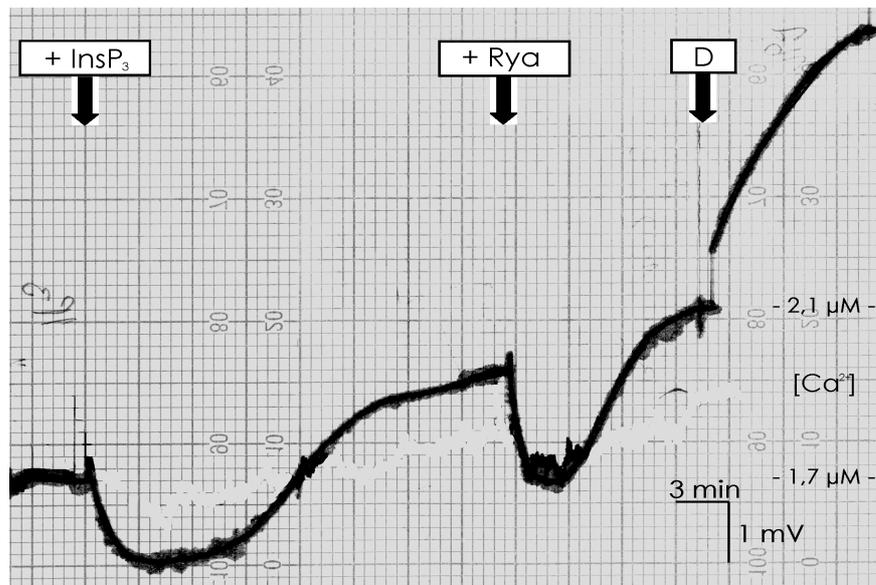


Abb. 4.8: InsP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung.

Änderung der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium von *Z. mays* L. Vakuolen nach Zugabe von 1 μM InsP<sub>3</sub>, 1 μM Ryanodin und 1 μM Digitonin. Eine Vakuolensuspension mit 435000 Vakuolen·ml<sup>-1</sup> wurde mit 40 μM BAPTA auf eine Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 1,7 μM gepuffert. Die Zugabe der Effektoren erfolgte im Anschluß an eine ca. 60 minütige ATP-Einwirkung (500 μM).

5,8 μM eine Abnahme der freigesetzten Ca<sup>2+</sup>-Menge bei ansteigender freier Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium (s. Abb. 4.9A (■)).

Die Darstellung des Flusses durch den Tonoplasten in Abhängigkeit der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium zeigt Abbildung 4.9B (■). Der Ca<sup>2+</sup>-Fluß zeigte keine signifikante Abhängigkeit von der externen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und entsprach ab einer freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 1 μM durchschnittlich 124 pmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

Wurde 1 μM InsP<sub>3</sub> nach der Applikation von 1 μM Ryanodin zugesetzt (s. Abb. 4.10), so führte die zusätzliche Applikation von 1 μM InsP<sub>3</sub> in 73 % der Versuche (n = 11) zu einer weiteren Freisetzung von durchschnittlich 22 % (56 nM pro 10<sup>5</sup> Vakuolen) des bereits aufgenommenen bzw. noch enthaltenen Ca<sup>2+</sup>. Die Freisetzung des Ca<sup>2+</sup> war unabhängig von dem durch die v-H<sup>+</sup>-ATPase generierten Protonengradienten. Wurde die durch InsP<sub>3</sub> freigesetzte Ca<sup>2+</sup>-Menge nach vorheriger Ryanodinzugabe in Abhängigkeit der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium gesetzt, so zeigte sich im Bereich von 340 nM bis 5,4 μM eine Zunahme der freigesetzten Ca<sup>2+</sup>-Menge bei ansteigender freier Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium (s. Abb. 4.9A (○)).

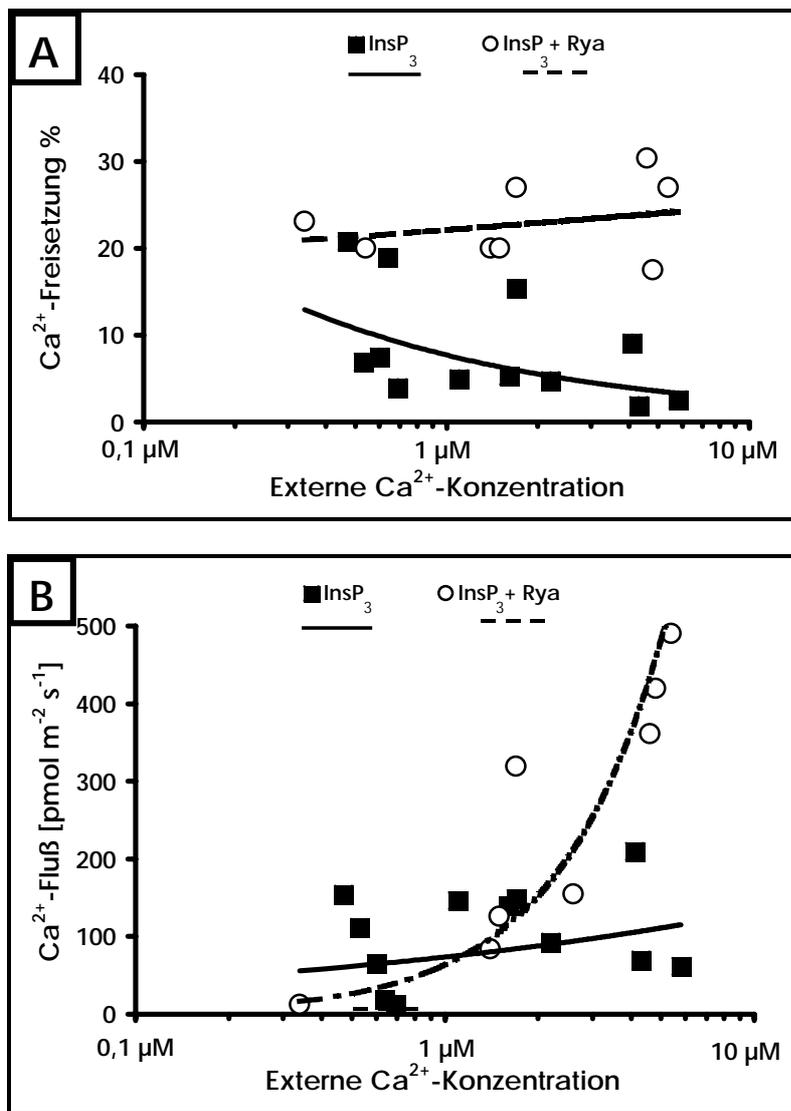


Abb. 4.9: InsP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung.

A: Der Effekt der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium auf die durch 1 μM InsP<sub>3</sub> induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung von *Z. mays* L. Vakuolen:

InsP<sub>3</sub>: Zugabe von 1 μM InsP<sub>3</sub> vor Zugabe von 1 μM Ryanodin (■; Mittelwert: durchgezogene Linie).

InsP<sub>3</sub> + Rya: Zugabe von 1 μM InsP<sub>3</sub> nach Zugabe von 1 μM Ryanodin (○; Mittelwert: unterbrochene Linie).

B: Der Effekt der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium auf den durch 1 μM InsP<sub>3</sub> induzierten Ca<sup>2+</sup>-Fluß durch den Tonoplasten von *Z. mays* L. Vakuolen:

InsP<sub>3</sub>: Zugabe von 1 μM InsP<sub>3</sub> vor Zugabe von 1 μM Ryanodin (■; Mittelwert: durchgezogene Linie)

InsP<sub>3</sub> + Rya: Zugabe von 1 μM InsP<sub>3</sub> nach Zugabe von 1 μM Ryanodin (○; Mittelwert: unterbrochene Linie).

Die Darstellung des Flusses durch den Tonoplasten in Abhängigkeit der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium zeigt Abbildung 4.9B (○). Der Ca<sup>2+</sup>-Fluß zeigte eine deutliche Zunahme bei ansteigender externer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration.

### Ryanodin-induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung

Neben  $\text{InsP}_3$  wird mittlerweile auch Ryanodin als weiterer Agonist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Endoorganellen in pflanzlichen und tierischen Zellen angesehen (MEISSNER 1994, ALLEN et al. 1995). In Versuchen zur Ryanodin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung mit tierischen Zell-Mikrosomen zeigte sich, daß Ryanodin in submikro- bis mikromolarer Konzentration als Agonist zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, hingegen in hoher mikromolarer Konzentration zur Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung führte (GALIONE & SUMMERHILL 1995).

Einen typischen Versuch mit Ryanodin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß zeigt Abbildung 4.10. Die durch mindestens  $500 \mu\text{M}$  ATP energetisierten Vakuolenpräparationen von *Z. mays* L. setzten in 73 % der Versuche nach der Applikation von  $1 \mu\text{M}$  Ryanodin durchschnittlich 22 % ( $14 \text{ nM}$  pro  $10^5$  Vakuolen ( $n = 15$ )) des bereits aufgenommenen bzw. noch enthaltenen  $\text{Ca}^{2+}$  frei. Die freigesetzte Menge betrug  $10 \text{ nM}$  bis  $1 \mu\text{M}$ , in Abhängigkeit der eingesetzten Vakuolenmenge. Eine Aufnahme des freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  war innerhalb der nächsten 15 Minuten nicht zu erkennen.

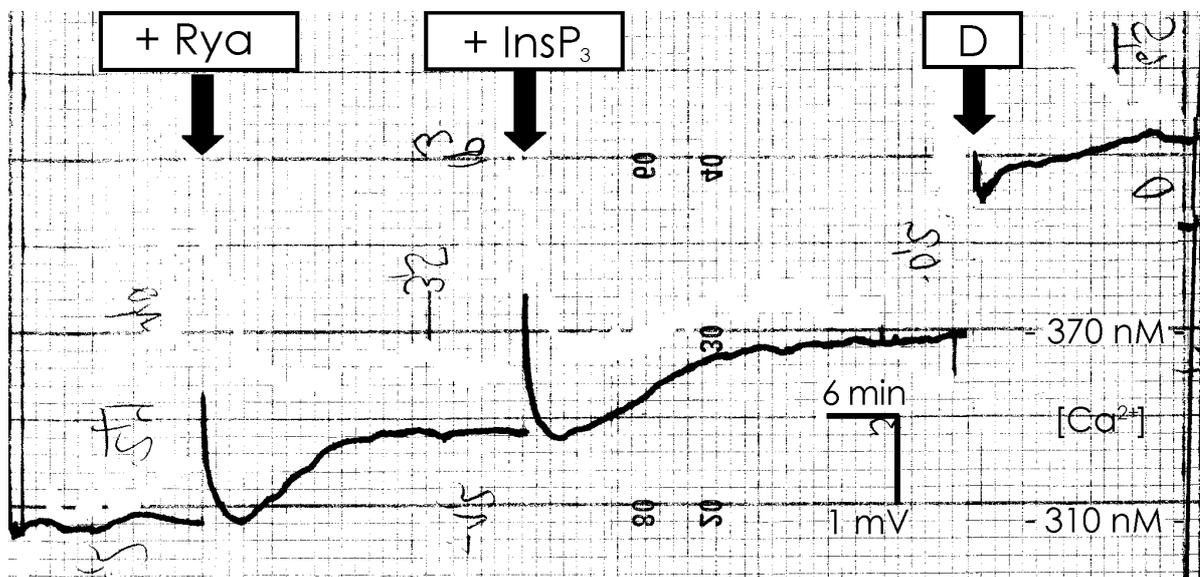


Abb. 4.10: Ryanodin-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung.

Änderung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium von *Z. mays* L. Vakuolen nach Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  Ryanodin,  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  und  $1 \mu\text{M}$  Digitonin. Eine Vakuolensuspension mit  $690000 \text{ Vakuolen} \cdot \text{ml}^{-1}$  wurde mit  $60 \mu\text{M}$  BAPTA auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $310 \text{ nM}$  gepuffert. Die Zugabe der Effektoren erfolgte im Anschluß an eine ca. 60 minütige ATP-Einwirkung ( $500 \mu\text{M}$ ).

Wurde die durch Ryanodin freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge in Abhängigkeit der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium gesetzt, so zeigte sich im Bereich von 105 nM bis 5,9  $\mu\text{M}$  eine Abnahme der freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge bei ansteigender freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium (s. Abb. 4.11A (■)).

Die Darstellung des Flusses über dem Tonoplasten in Abhängigkeit der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium (s. Abb. 4.11B (■)) zeigte hingegen eine deutliche Zunahme bei ansteigender externer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

Wurde 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin nach der Applikation von 1  $\mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  zugesetzt (s. Abb. 4.8), so führte die zusätzliche Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin in 73 % der Versuche ( $n = 11$ ) zu einer weiteren Freisetzung von durchschnittlich 14 nM pro  $10^5$  Vakuolen des bereits aufgenommenen bzw. noch enthaltenen  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Freisetzung des  $\text{Ca}^{2+}$  war unabhängig von dem durch die v- $\text{H}^+$ -ATPase generierten Protonengradienten.

Wurde die durch Ryanodin freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge nach vorheriger  $\text{InsP}_3$ -Zugabe in Abhängigkeit der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium gesetzt, so zeigte sich im Bereich von 430 nM bis 4,4  $\mu\text{M}$  wiederum eine Abnahme der freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge bei ansteigender freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium (s. Abb. 4.11A (○)). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß durch den Tonoplasten (s. Abb. 4.11B (○)) zeigte hingegen abermals eine deutliche Zunahme bei ansteigender externer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und entsprach ab einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  durchschnittlich  $133 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

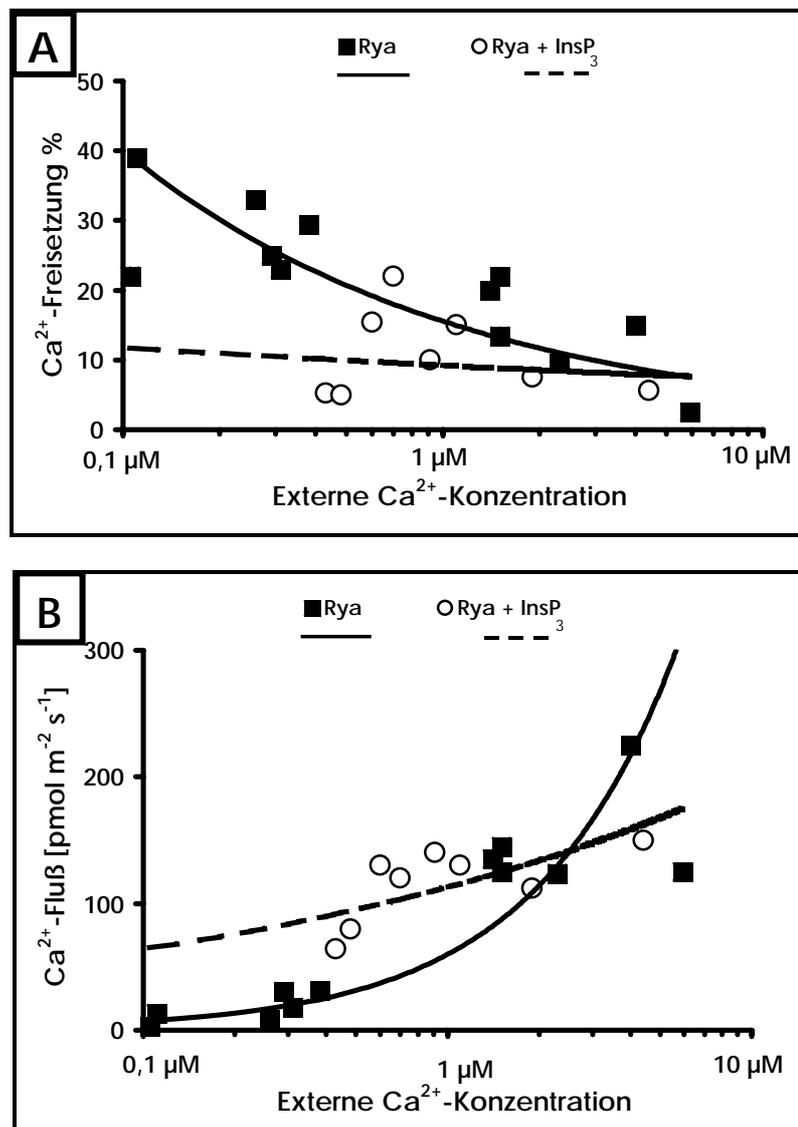


Abb. 4.11: Ryanodin-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung.

A: Der Effekt der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium auf die durch 1 μM Ryanodin induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung von *Z. mays* L. Vakuolen:

Rya: Zugabe von 1 μM Ryanodin vor Zugabe von 1 μM InsP<sub>3</sub> (■, Mittelwert: durchgezogene Linie).

Rya + InsP<sub>3</sub>: Zugabe von 1 μM Ryanodin nach Zugabe von 1 μM InsP<sub>3</sub> (○, Mittelwert: unterbrochene Linie).

B: Der Effekt der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Versuchsmedium auf den durch 1 μM Ryanodin induzierten Ca<sup>2+</sup>-Fluß durch den Tonoplasten von *Z. mays* L. Vakuolen:

Rya: Zugabe von 1 μM Ryanodin vor Zugabe von 1 μM InsP<sub>3</sub> (■, Mittelwert: durchgezogene Linie).

Rya + InsP<sub>3</sub>: Zugabe von 1 μM Ryanodin nach Zugabe von 1 μM InsP<sub>3</sub> (○, Mittelwert: unterbrochene Linie).

### 4.3 Ca<sup>2+</sup>-selektive und nichtselektive Ionenkanäle im Tonoplasten von *Z. mays* L.

Vakuolensuspensionen aus Koleoptilprotoplasten von *Z. mays* L. setzten nach Applikation der Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Agonisten InsP<sub>3</sub> und Ryanodin Ca<sup>2+</sup> frei (s. Kap. 4.2.2).

Zur Identifizierung und Charakterisierung der für die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung verantwortlichen Ionenkanäle wurden Versuche mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik unternommen. Zur Charakterisierung des Gesamtstroms durch den Tonoplasten wurde die whole-vacuole-Konfiguration (*wv*) und zur Identifizierung der spezifischen Ionenkanäle die cytosolic-side out-Konfiguration (*co*, d.h. die zytosolische Seite war dem Badmedium exponiert) verwendet. Um gleichzeitig einen durch Ca<sup>2+</sup>-Agonisten aktivierbaren Ca<sup>2+</sup>-Strom aus der Vakuole in das Zytoplasma sowie einen K<sup>+</sup>-Strom aus dem Zytoplasma in die Vakuole untersuchen zu können, wurde über dem Tonoplasten ein asymmetrischer Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup>-Gradient vorgegeben. Dabei wurde das vermutlich nicht permierende Glukonat-Ion (Glu<sup>-</sup>) gegenüber Cl<sup>-</sup> bevorzugt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde mit 1 µM vorgegeben.

Unter den vorgegebenen Bedingungen konnte in der *co*-Konfiguration ein schnell aktivierbarer Ionenkanal mit 19 pS Leitfähigkeit (Symbol ◆, s. Kap. 4.3.1), ein durch InsP<sub>3</sub> aktivierbarer Ionenkanal mit 12 pS Leitfähigkeit (Symbol ■, s. Kap. 4.3.2), sowie ein durch Ryanodin aktivierbarer Ionenkanal mit 122 pS Leitfähigkeit (Symbol □, s. Kap. 4.3.3), nachgewiesen werden (s. Abb. 4.12A).

Zur weiteren Charakterisierung dieser Ionenkanäle wurden anschließend Messungen in der cytosolic-side in-Konfiguration (*ci*, d.h. die vakuoläre lumenale Seite war dem Badmedium exponiert) unternommen.

Wurde die vorgegebene zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 1 µM auf 1 mM erhöht, so konnten in der *ci*-Konfiguration außer dem schon erwähnten schnell aktivierbaren Ionenkanal mit 19 pS Leitfähigkeit zwei weitere Ionenkanäle mit 37 pS Leitfähigkeit (Symbol ●, s. Kap. 4.3.4) und 7 pS Leitfähigkeit (Symbol ▲, s. Kap. 4.3.5) nachgewiesen werden (s. Abb. 4.12B).

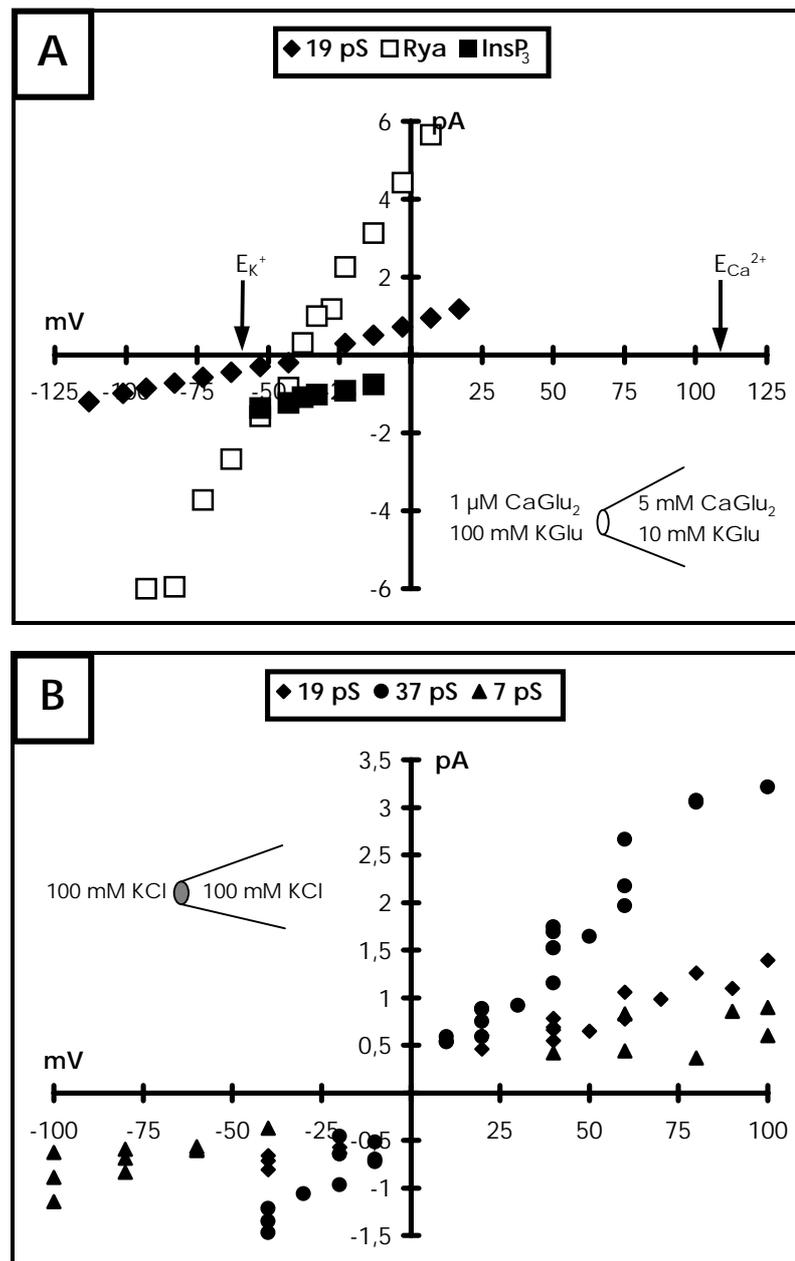


Abb. 4.12: Ca<sup>2+</sup>-selektive und nichtselektive Ionenkanäle.

A: Die Strom-Spannungs-Kennlinien der bei einer vorgegebenen zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 1  $\mu$ M am Tonoplasten aus Koleoptil-Protooplasten von *Z. mays* L. auftretenden Ionenkanälen in der *co*-Konfiguration (Mittelwerte und Standardabweichungen):

Schnell aktivierbarer Ionenkanal (19 pS, ◆), Ryanodin-aktivierbarer Ionenkanal (122 pS, □), InsP<sub>3</sub>-aktivierbarer Ionenkanal (12 pS, ■).

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 10 mM KGlu, 5 mM CaGlu<sub>2</sub>, pH 5,2;

Bad: 100 mM KGlu, 1  $\mu$ M CaGlu<sub>2</sub>, pH 7,4.

B: Die Strom-Spannungs-Kennlinien der bei einer vorgegebenen zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 1 mM am Tonoplasten aus Koleoptil-Protooplasten von *Z. mays* L. auftretenden Ionenkanälen in der *ct*-Konfiguration:

Schnell aktivierbarer Ionenkanal (19 pS, ◆), Ionenkanal mit 37 pS Leitfähigkeit (●), Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit (▲).

Die Ionenkonzentrationen waren 100 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 mM MgCl<sub>2</sub> in der Pipette (pH 7,2) und im Bad (pH 7,2).

### 4.3.1 Ein schnell aktivierbarer Ionenkanal

Wurde bei *Z. mays* L.-Vakuolen nach dem Erreichen der whole-vacuole-Konfiguration (*wv*) die Pipettenlösung mit der vakuolär luminalen Lösung für 10 min ausgetauscht, so zeigte sich bei einer vorgegebenen zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  im Bad bei Spannungsschritten von +55 bis -100 mV ein schnell aktivierbarer Strom durch den Tonoplasten (s. Abb. 4.13A). Der schnell aktivierbare

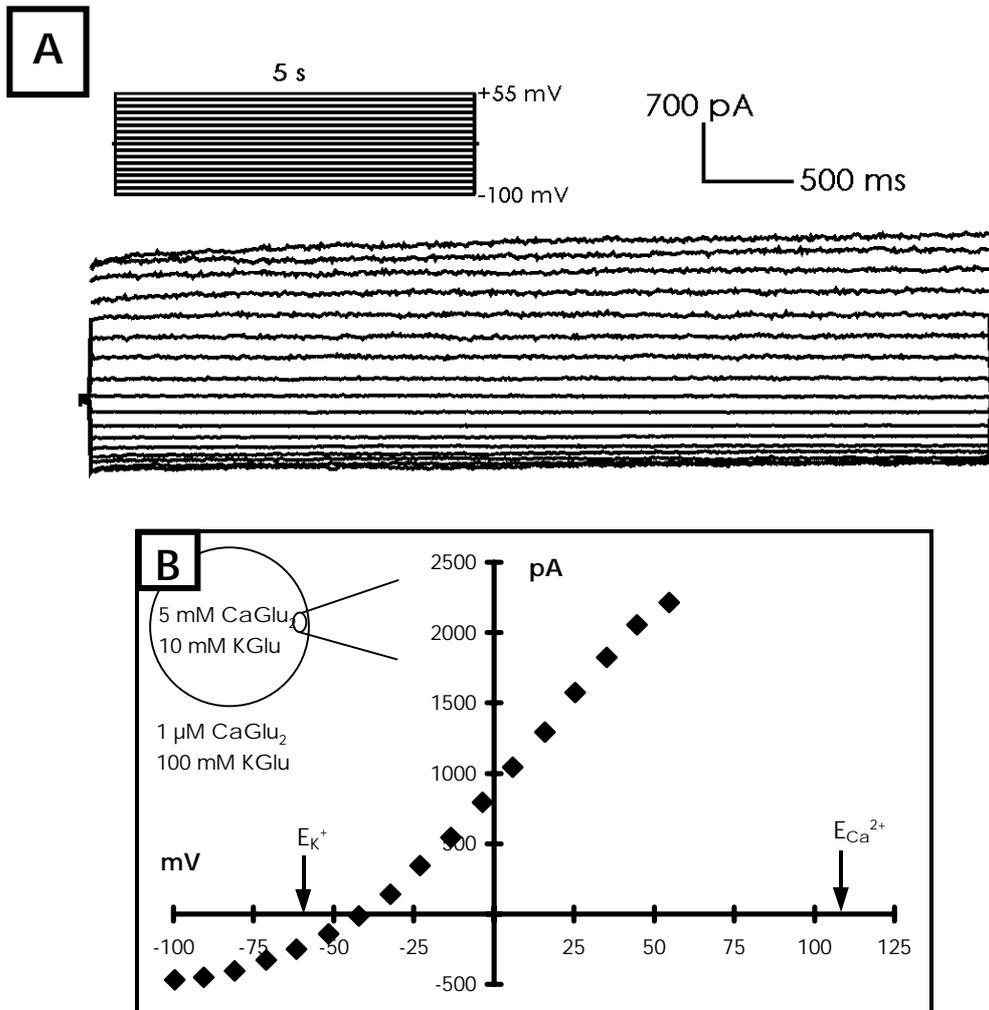


Abb. 4.13: Der schnell aktivierbare Ionenkanal.

A: Strom durch den Tonoplasten einer *Z. mays* L.-Vakuole ( $32 \mu\text{m}$ ) aus Koleoptil-Protoplasten bei Spannungsschritten von +55 bis -100 mV. Messung in der *wv*-Konfiguration. Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 10 mM  $\text{KGlu}$ , 5 mM  $\text{CaGlu}_2$ , pH 5,2;

Bad: 100 mM  $\text{KGlu}$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{CaGlu}_2$ , pH 7,4

B: Die Strom-Spannungs-Kennlinie aus oben gezeigter Messung.

Das Gleichgewichts-Potential<sup>1</sup> für  $\text{K}^+$  ( $E_{\text{K}^+}$ ) lag bei -59 mV und für  $\text{Ca}^{2+}$  ( $E_{\text{Ca}^{2+}}$ ) bei +109 mV. Der Schnittpunkt mit der Abszisse, welche das Umkehrpotential ( $E_{\text{rev}}$ ) indiziert, lag bei -38 mV.

<sup>1</sup> Definition des Gleichgewichts-Potentials:  $E_x = \frac{R \cdot T}{F \cdot z} \cdot \ln \frac{[X]_v}{[X]_c}$

Strom ging innerhalb von 0 bis 100 ms sowohl bei negativen als auch bei positiven Haltepotentialen in Sättigung über. Die schnelle Aktivierungszeit vom Typ des Fast Vacuolar-Kanals (FV, HEDRICH & NEHER 1987) unterscheidet den schnell aktivierbaren Strom von der langsamen Aktivierungszeit des sogenannten Slow-Vacuolar-Kanals (SV, HEDRICH & NEHER 1987), die im Bereich von 500 ms bis mehrere Sekunden liegt.

Um die Selektivität des schnell aktivierbaren Gesamtstroms für  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  zu untersuchen, wurden in Pipette (sprich vakuoläres Lumen) und Bad (sprich zyttoplasmatischer Raum) asymmetrische  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen und pH-Werte vorgegeben (s. Legende Abb. 4.13). Wird der resultierende Strom gegen die angelegte Spannung aufgetragen, so erhielt man eine Strom-Spannungs-Kennlinie, deren Umkehrpotential ( $E_{\text{rev}}$ ) bei  $-38 \text{ mV}$  ( $\pm 3,8 \text{ mV}$ ) lag (s. Abb. 4.13B). Unter der Annahme, daß der schnell aktivierbare Gesamtstrom für Glukonat-Ionen keine Permeabilität besaß, errechnete sich unter Verwendung von Gleichung (23) für den schnell aktivierbaren Gesamtstrom eine Selektivität von  $\text{K}^+$  über  $\text{Ca}^{2+}$  von 1,3. Dies bedeutet, daß der schnell aktivierbare Strom durch den Tonoplasten unter diesen Bedingungen keine besondere Diskriminierung zwischen dem einwertigen  $\text{K}^+$ -Kation und dem zweiwertigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kation zeigte.

Somit wies der schnell aktivierbare Strom unter diesen Bedingungen einen nach

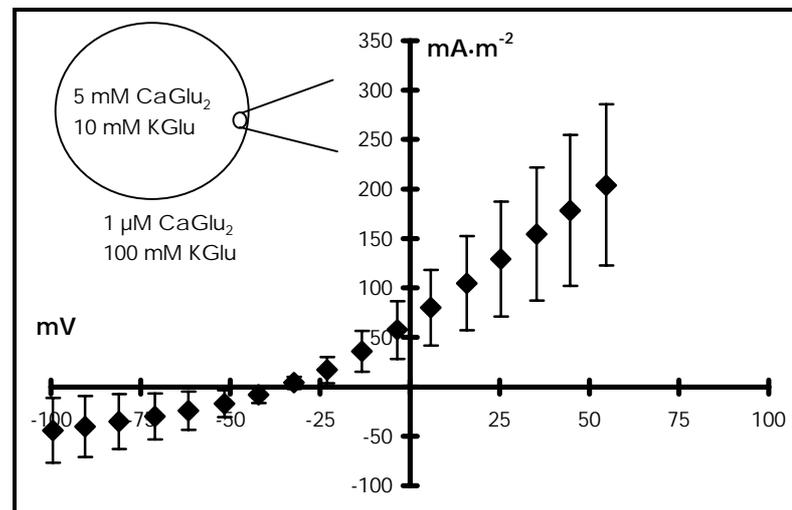


Abb. 4.14: Der schnell aktivierbare Ionenkanal.

Die durchschnittliche Stromdichte ( $\text{mA}\cdot\text{m}^{-2}$ ) des schnell aktivierbaren Stromes durch den Tonoplasten von Vakuolen aus *Z. mays* L.-Koleoptil-Protoplasten. Messungen in der *wv*-Konfiguration. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.13 angegeben.  $n = 24$ .

außen (d. h. vom Zytoplasma in die Vakuole) schwach gleichrichtenden Kationenstrom bei positiven Tonoplastenpotentialen auf. Die Stromdichte des schnell aktivierbaren Stroms ist in Abbildung 4.14 dargestellt. Im physiologischen Bereich des Tonoplastenpotentials zeigte sich im Bereich von -20 bis -50 mV ein schwacher Kationeneinstrom von 8 bis 17 mA·m<sup>-2</sup>.

Wurde der schnell aktivierbare Ionenkanal durch einen Potentialsprung von 0 mV auf +55 mV aktiviert und anschließend durch eine Absenkung des Haltepotentials in Spannungsschritten auf -100 mV deaktiviert, so zeigten auch die Deaktivierungsströme eine Umkehrung im Bereich des oben genannten Umkehrpotentials (s. Abb. 4.15).

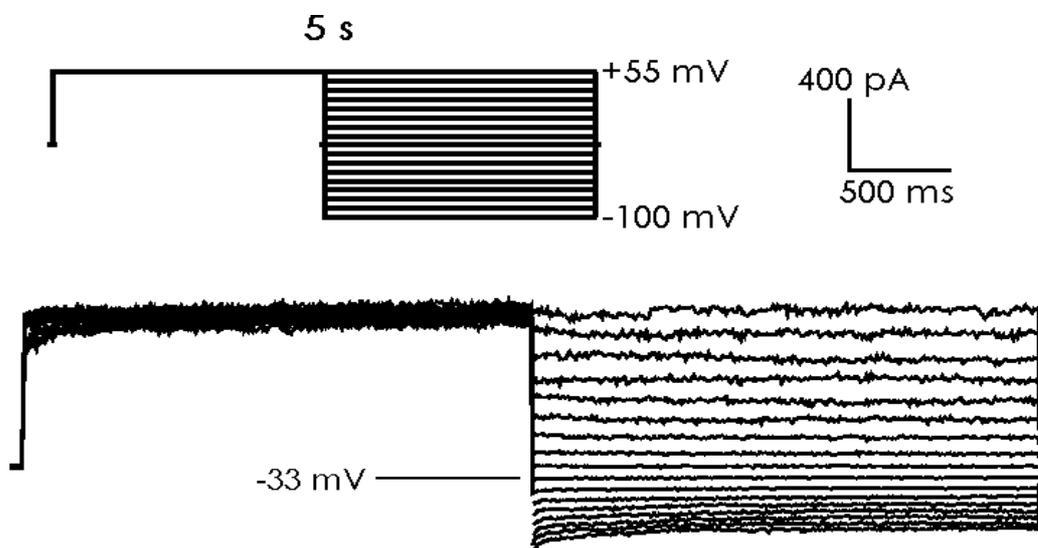


Abb. 4.15: Der schnell aktivierbare Ionenkanal. Deaktivierungsströme durch den Tonoplasten einer *Z. mays* L.-Vakuole (36  $\mu$ m) aus Koleoptil-Protoplasten. Nach einem Potentialsprung von 0 mV auf +55 mV von 2,5 s Dauer wurde das Haltepotential in Spannungsschritten auf -100 mV erniedrigt. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.13 angegeben.

Um nachzuweisen, daß der schnell aktivierbare Strom durch den Tonoplasten von einem spezifischen Ionenkanal verursacht wird, wurden Versuche im *co*-Modus unternommen.

Wurde im *co*-Modus das Haltepotential in Spannungsschritten von +55 bis -100 mV verändert, zeigten sich sofort einsetzende Kanalereignisse eines Ionenkanals mit ca. 19 pS Leitfähigkeit (s. Abb. 4.16). Sofort einsetzende Kanalereignisse des schnell aktivierbaren Ionenkanals aus *Z. mays* L. sprechen wiederum für einen Ionenkanal

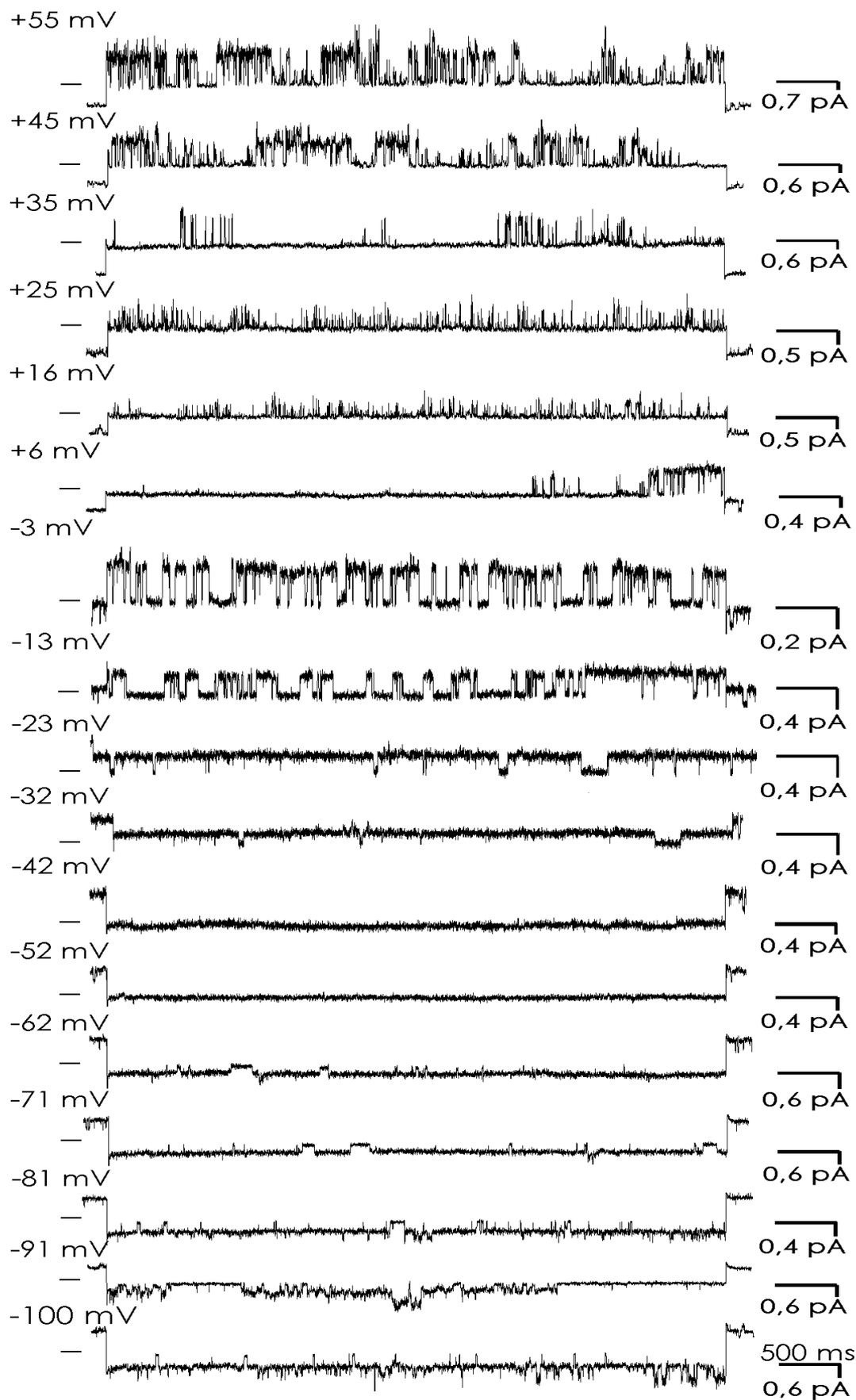


Abb. 4.16: Der schnell aktivierbare Ionenkanal.

Kanalereignisse des schnell aktivierbaren Ionenkanals bei Spannungsschritten von +55 bis -100 mV einer  $co$ -Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.13 angegeben. - = Grundlinie.

des FV-Typs in monokotyledonen Pflanzen (TIKHONOVA et al. 1997). Dagegen wiesen die Einzelkanalereignisse des SV-Kanals aus Mesophyllzellen von *Hordeum vulgare* L. innerhalb einer Sekunde eine deutliche Zunahme gleichzeitig öffnender Ionenkanäle auf (POTTOSIN et al. 1997).

Wurde das Haltepotential in der *co*-Konfiguration stufenweise verändert, konnten die Öffnungsamplituden der Kanalereignisse des schnell aktivierbaren Ionenkanals besser beobachtet werden (s. Abb. 4.17A). Mitunter konnten in der *co*-Konfiguration Kanalereignisse kleinerer Öffnungsamplituden festgestellt werden (s. Abb. 4.16A (-100 mV) und 4.17A (-3 mV)). Da die kleineren Amplituden ein Verhältnis von  $\frac{1}{2}$  und  $\frac{1}{4}$  gegenüber der Öffnungsamplitude des schnell aktivierbaren Ionenkanals hatten, kann vermutet werden, daß es sich um Unterleitfähigkeiten handelte.

Wurden die Amplituden der Öffnungsereignisse (s. Abb. 4.17B) gegen das angelegte Haltepotential aufgetragen, erhielt man eine Strom-Spannungs-Kennlinie des untersuchten Ionenkanals (s. Abb. 4.18A).

Die Zunahme der Stromamplituden zeigte im positiven Bereich der Haltespannungen eine leichte Gleichrichtung mit einer Leitfähigkeit von 22 pS. Im negativen Spannungsbereich sank die Leitfähigkeit auf 14 pS. Im mittleren Teil betrug die Leitfähigkeit 19 pS. Das Umkehrpotential des schnell aktivierbaren Ionenkanals betrug unter den vorgegebenen Bedingungen -37,8 mV ( $\pm 0,9$  mV). Somit stimmte das Umkehrpotential der Einzelkanalanalyse des schnell aktivierbaren Ionenkanals mit dem Umkehrpotential des schnell aktivierbaren Stroms durch den Tonoplasten überein. Unter der Annahme, daß der schnell aktivierbare Ionenkanal für Glukonat-Ionen keine Permeabilität besaß, errechnete sich unter Verwendung von Gleichung (23) für den schnell aktivierbaren Ionenkanal wiederum eine Selektivität von  $K^+$  über  $Ca^{2+}$  von 1,3. Unter den vorgegebenen Bedingungen konnte somit am schnell aktivierbaren Ionenkanal aus *Z. mays* L. erstmals eine Selektivität für  $Ca^{2+}$  bei Ionenkanälen des FV-Typs nachgewiesen werden.

Die Offenzeiten des schnell aktivierbaren Ionenkanals lagen bei Einzelkanalmessungen weitgehend unter 50 ms (s. Abb. 4.18B). Es zeigte sich eine deutliche Verkürzung der Offenzeit bei negativen Haltepotentialen.

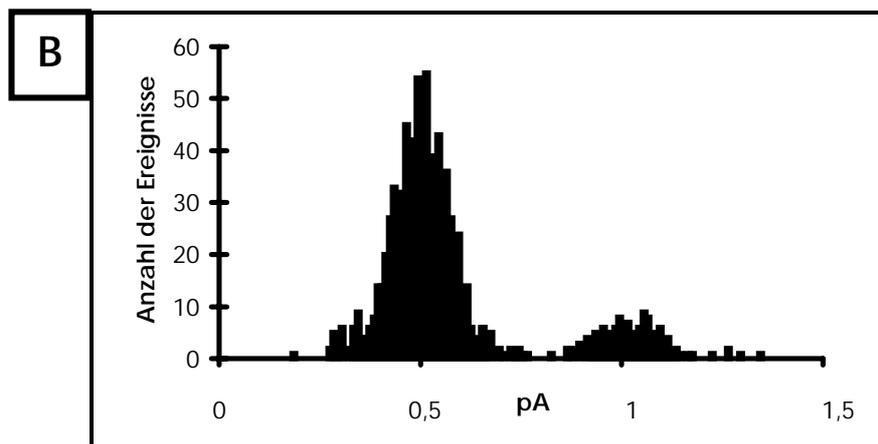
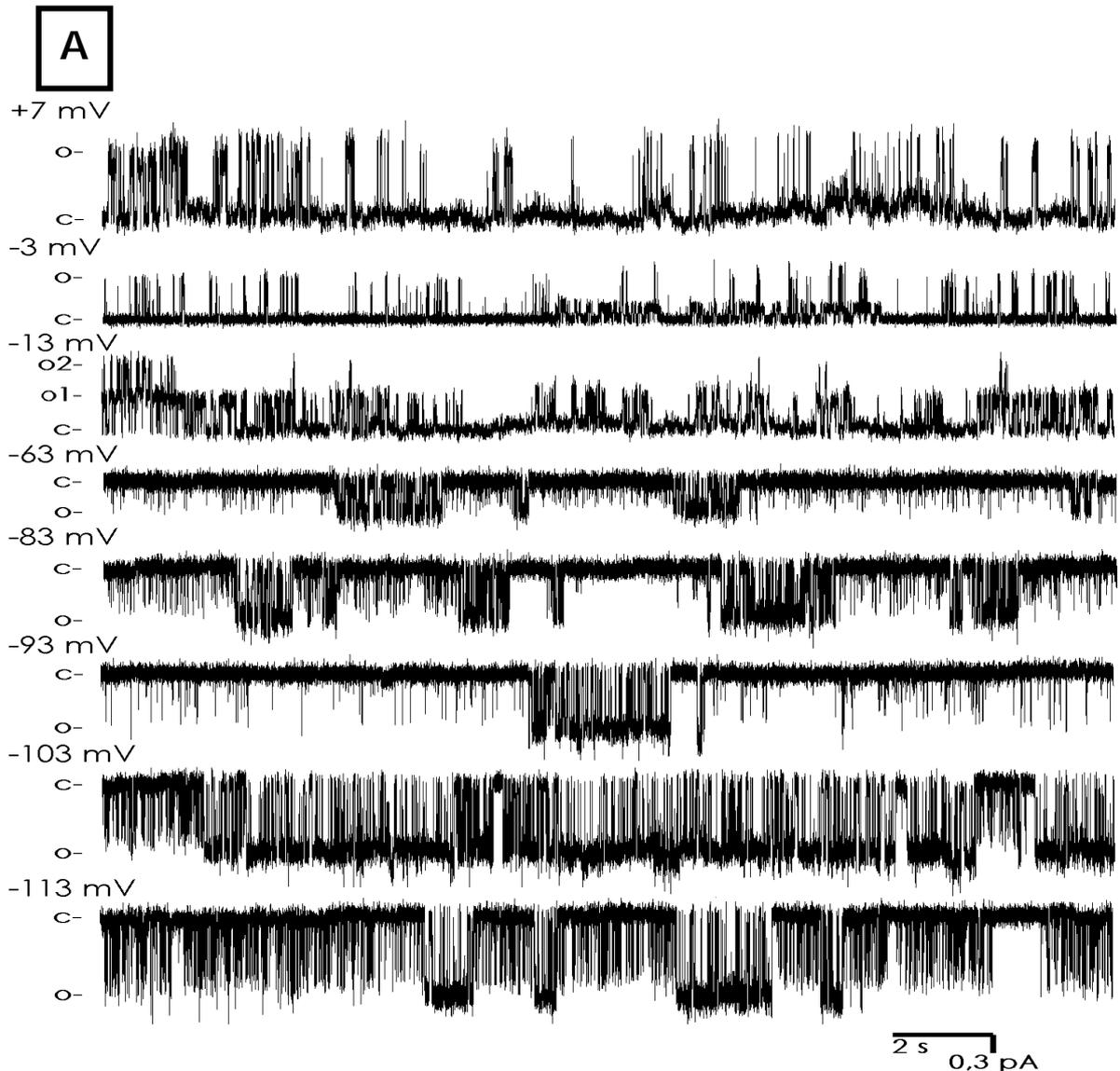


Abb. 4.17: Der schnell aktivierbare Ionenkanal.

A: Kanalereignisse des schnell aktivierbaren Ionenkanals bei kontinuierlicher Veränderung des Haltepotentials einer *co*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.13 angegeben.

c- = Grundlinie, o- = Öffnungsebene, o1- bis o2- = Öffnungsebenen parallel auftretender Ionenkanäle.

B: Amplitudenhistogramm der oben dargestellten Kanalereignisse des schnell aktivierbaren Ionenkanals bei einer Haltespannung von -13 mV. Das gezeigte zweite Maximum entsteht durch die Addition der Stromamplituden zweier offener Kanäle.

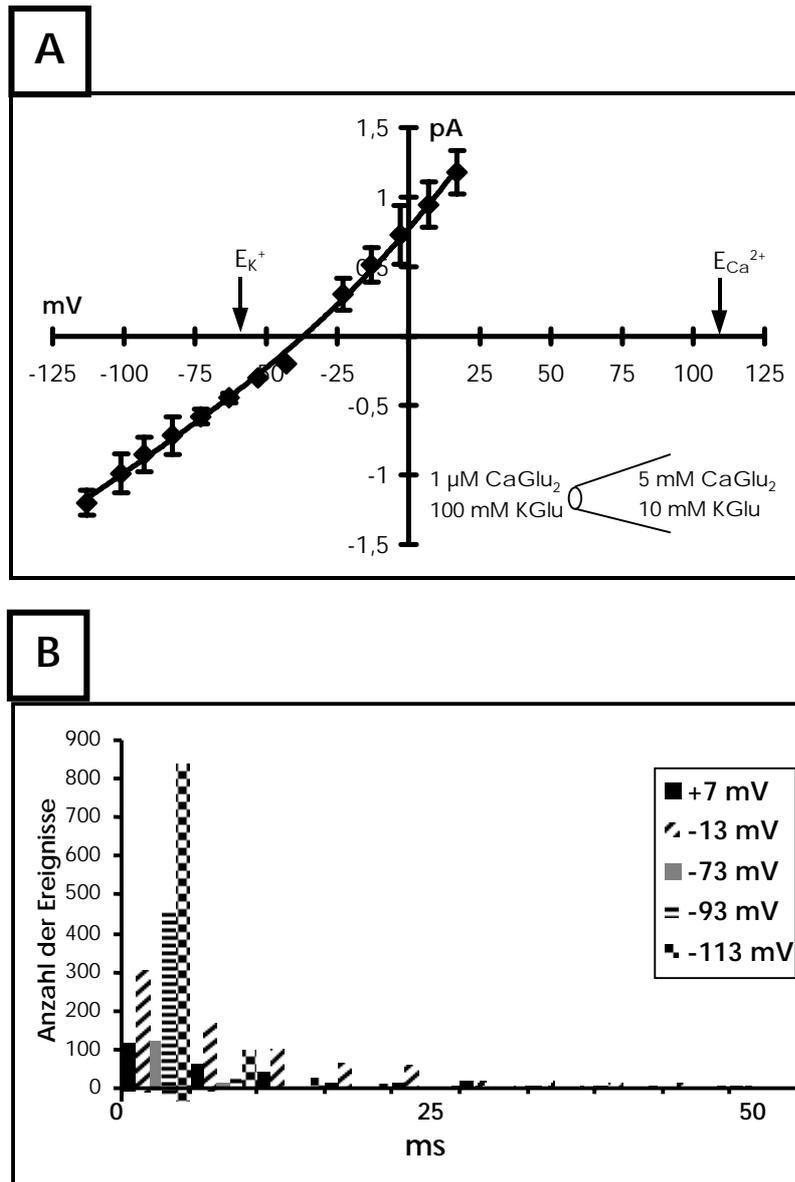


Abb. 4.18: Der schnell aktivierbare Ionenkanal.

A: Die Strom-Spannungs-Kennlinie von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. in der *co*-Konfiguration. Die Stromamplituden des schnell aktivierbaren Ionenkanals wurden gegen die Haltepotentiale aufgetragen. Mittelwert und Standardabweichung aus 8 Messungen. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.13 angegeben.

B: Die Offenzeiten des schnell aktivierbaren Ionenkanals während einer Einzelkanalmessung mit zwei sichtbaren Ionenkanälen bei den indizierten Haltepotentials (s. Abb. 4.17A). Zur anschaulichen Darstellung wurde die maximale Öffnungszeit auf 50 ms normiert, da längere Ereignisse nicht mehr als Ereigniswerte darzustellen waren.

#### 4.3.1.1 Symmetrische und asymmetrische KCl-Konzentration

Um eine Übersicht über das Auftreten weiterer Ionenkanaltypen und ihrer Leitfähigkeit zu gewinnen, wurden Messungen bei gleichen KCl-Konzentrationen (100 mM) auf zytoplasmatischer (Pipette) und luminal vakuolärer Seite (Bad) in der *ci*-Konfiguration unternommen. Außer dem schnell aktivierbaren Ionenkanal konnten noch zwei weitere Ionenkanäle aufgrund der Leitfähigkeiten von 37 pS und 7 pS nachgewiesen werden (s. Abb. 4.19, Kap. 4.3.4 und 4.3.5). Zur besseren Abdichtung und zur Stabilisierung des Tonoplasten wurden bei den weiteren Messungen in der *ci*-Konfiguration 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 mM MgCl<sub>2</sub> in Bad und Pipette zugesetzt. Der schnell aktivierbare Ionenkanal war auch bei dieser unphysiologisch hohen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen auf der zytoplasmatischen Seite in der Einzelkanalanalyse nachweisbar. Im Bereich von +100 mV bis -40 mV zeigte der schnell aktivierbare Ionenkanal durch die lineare Zunahme der Stromamplituden (s. Abb. 4.19) sowohl im positiven als auch im negativen Bereich der Haltespannungen ein ohmsches Verhalten mit einer Leitfähigkeit von ca. 19 pS, wobei das Umkehrpotential erwartungsgemäß bei 0 mV lag, da die Gleichgewichts-Potentiale von K<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> wegen der identischen Verteilung ebenso bei einer Spannung von Null liegen.

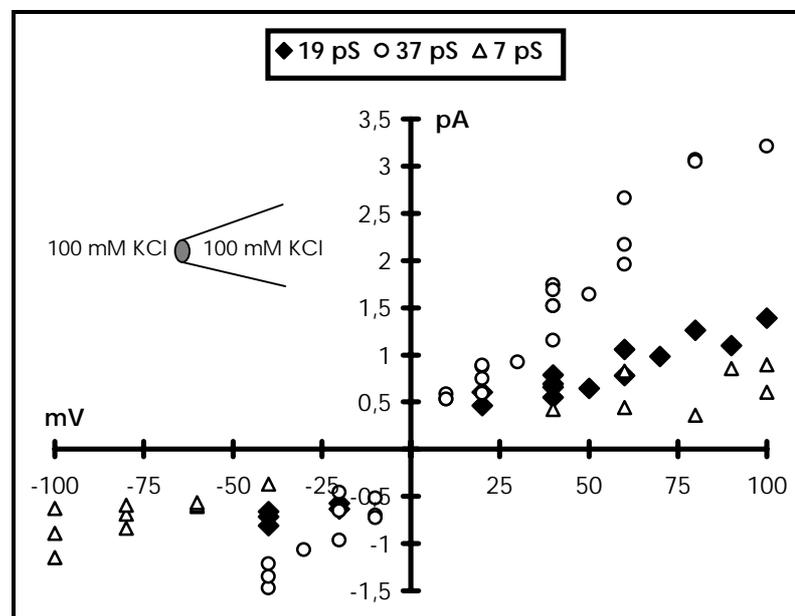


Abb. 4.19: Symmetrische KCl-Konzentrationen.

Die Strom-Spannungs-Kennlinien von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. in der *ci*-Konfiguration. Die Stromamplituden des schnell aktivierbaren Ionenkanals (19 pS, ◆) wurden gegen die Haltepotentiale aufgetragen. Zum Vergleich sind die Strom-Spannungs-Kennlinien der Ionenkanäle mit 37 pS (○) und 7 pS (△) dargestellt. Die Ionenkonzentrationen waren 100 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 mM MgCl<sub>2</sub> in der Pipette (pH 7,2) und im Bad (pH 7,2).

Unter Verwendung asymmetrischer KCl-Konzentrationen in Pipette und Bad wurden Messungen zur Selektivität des schnell aktivierbaren Ionenkanals unternommen. Die Strom-Spannungs-Kennlinie in Abbildung 4.21A zeigte wiederum ein lineares ohmsches Verhalten des Ionenkanals mit einer Leitfähigkeit von ca. 19 pS. Das Umkehrpotential wies mit -34,2 mV eine deutliche Verschiebung in Richtung des Gleichgewichts-Potentials für  $K^+$  auf. Nach Gleichung (14) ergab sich somit für den schnell aktivierbaren Ionenkanal eine Selektivität von  $K^+$  über  $Cl^-$  von 6,2. Diese Berechnung gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, daß  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  keinen Einfluß auf das Umkehrpotential haben. Wurde bei der Berechnung der Selektivität nach Gleichung (26) die relative Permeabilität von  $K^+$  gegenüber  $Ca^{2+}$  (s. o.) mit 0,7 für den Ionenkanal berücksichtigt, ergab sich eine Selektivität von  $K^+$  über  $Cl^-$  von 7,2. Wie bei Messungen in der *co*-Konfiguration (s. Abb. 4.17) zeigten die Kanalereignisse im *ci*-Modus (Abb. 4.20) ein analoges Verhalten des schnell aktivierbaren Ionenkanals. Bei negativen Haltepotentialen zeigten sich mitunter sehr lange Öffnungszeiten von über 1 Sekunde Dauer (s. Abb. 4.21B), welche nur von sehr kurzen Geschlossenzuständen unterbrochen wurden. Dieses Öffnungsverhalten konnte jedoch auch durch gehäufte kurze Offenzustände abgelöst werden. Im positiven Spannungsbereich änderte sich das Öffnungsverhalten des Ionenkanals. Eine Spannungserhöhung im positiven Bereich zeigte eine deutliche Aktivierung des Ionenkanals, was sich durch die Ausbildung des zwei- bis fünffachen Amplitudenmaximums als Summe der Einzelmaxima darstellte. Es zeigten sich diskrete Öffnungen, die eine Dauer von 500 ms überschreiten konnten. Der schnell aktivierbare Ionenkanal zeigte somit im *ci*-Patch die Eigenschaften eines spannungsabhängigen Ionenkanals, welcher durch die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit vornehmlich im positiven Spannungsbereich öffnet.

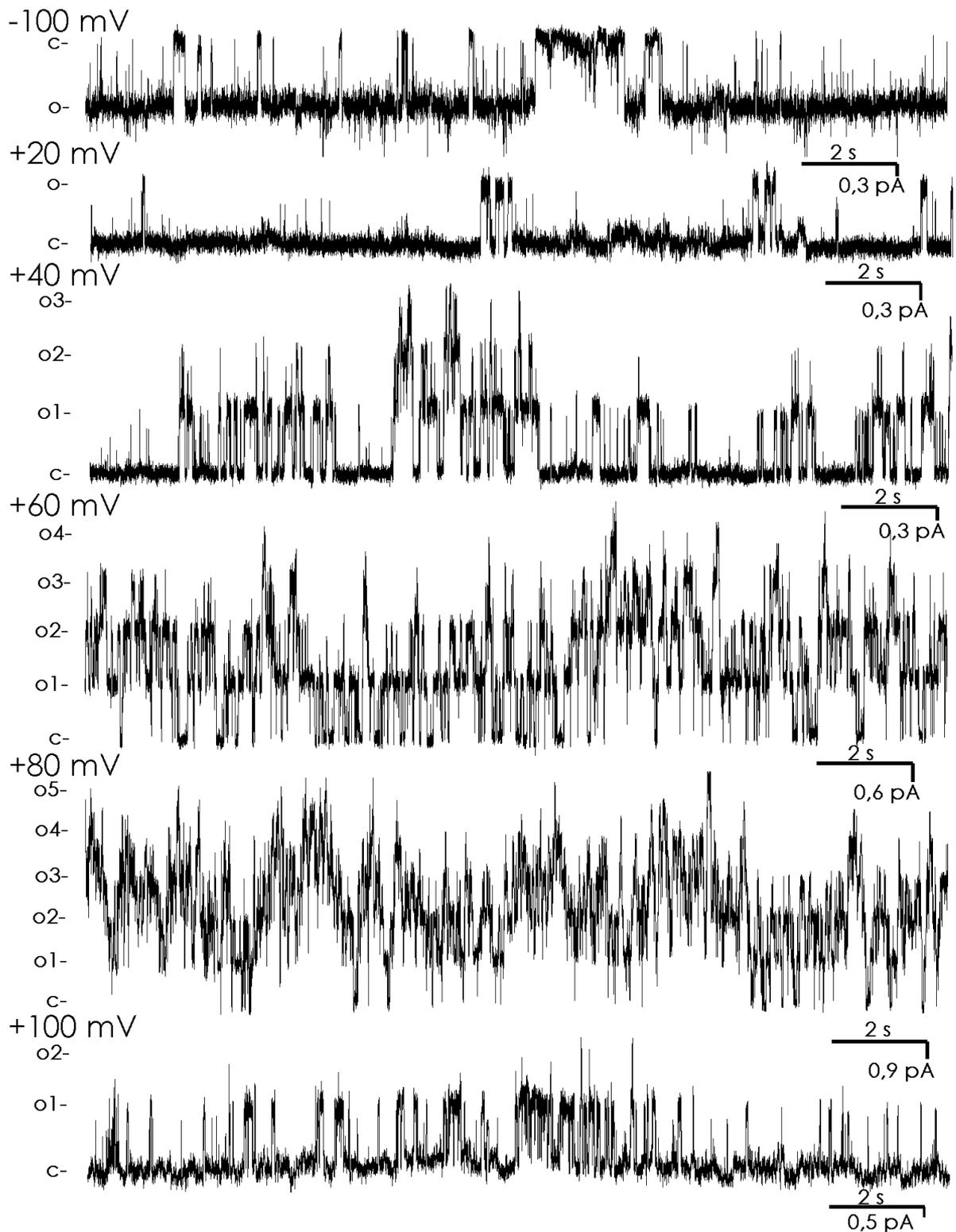


Abb. 4.20: Asymmetrische KCl-Konzentration.

Kanalereignisse des schnell aktivierbaren Ionenkanals bei den indizierten Spannungen von *ci*-Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Die Ionenkonzentrationen waren 100 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 mM MgCl<sub>2</sub> in der Pipette (pH 7,2), sowie 10 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 mM MgCl<sub>2</sub> im Bad (pH 7,2).

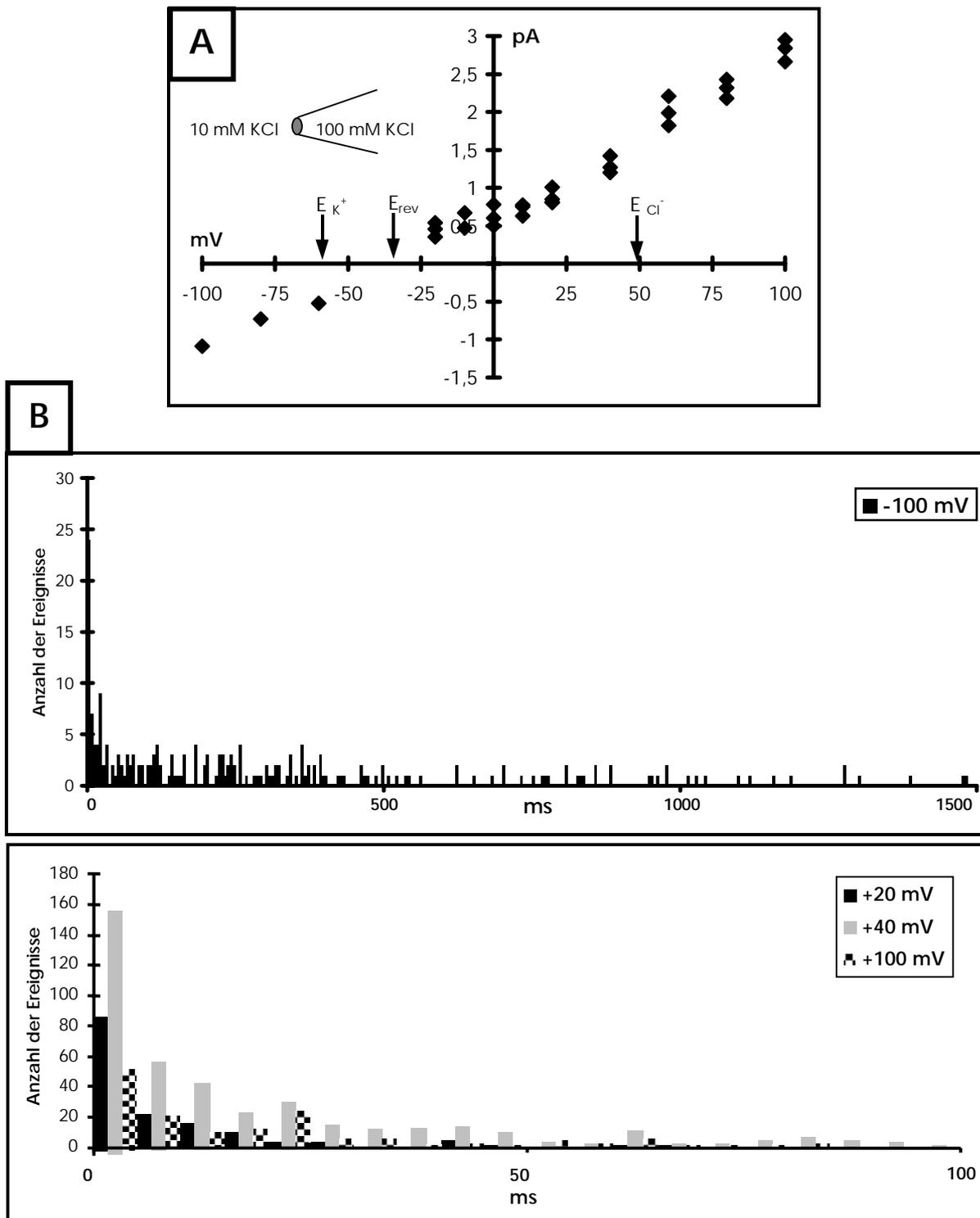


Abb. 4.21: Asymmetrische KCl-Konzentration.

A: Die Strom-Spannungs-Kennlinie des schnell aktivierbaren Ionenkanals von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. in der *ci*-Konfiguration. Das Gleichgewichtspotential für  $K^+$  ( $E_{K^+}$ ) lag bei  $-59$  mV, für  $Cl^-$  bei  $+49$  mV. Ionenkonzentrationen wie in Legende Abb. 4.20 angegeben.

B: Offenzeiten des schnell aktivierbaren Ionenkanals bei den indizierten Haltespannungen einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Zur anschaulichen Darstellung wurde die maximale Öffnungszeit des unteren Diagramms auf 100 ms normiert, da längere Ereignisse nicht mehr als Ereigniswerte darzustellen waren.

#### 4.3.1.2 Selektivität für $\text{Na}^+$ und $\text{Rb}^+$

Zur Überprüfung der Permeabilität für  $\text{Na}^+$  wurden Versuche mit asymmetrischen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Konzentrationen in Bad und Pipette unternommen. Die Ionenkonzentrationen betragen 100 mM NaCl und 1 mM KCl im Bad sowie 1 mM NaCl und 100 mM KCl in der Pipette. Die Strom-Spannungs-Kennlinie (s. Abb. 4.22) zeigte, daß der schnell aktivierbare Ionenkanal mit einer Leitfähigkeit von 19 pS neben  $\text{K}^+$  auch  $\text{Na}^+$  transportierte. Bei der Berechnung der Selektivität nach Gleichung (15) wurde die relative Permeabilität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Cl}^-$  (s.o.) mit 6,2 für den Ionenkanal berücksichtigt. Bei einem Umkehrpotential von -7,2 mV ergab sich eine Selektivität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Na}^+$  von 1,7. Die Offenzeiten wurden durch die asymmetrischen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Konzentrationen nicht beeinflusst (nicht gezeigt).

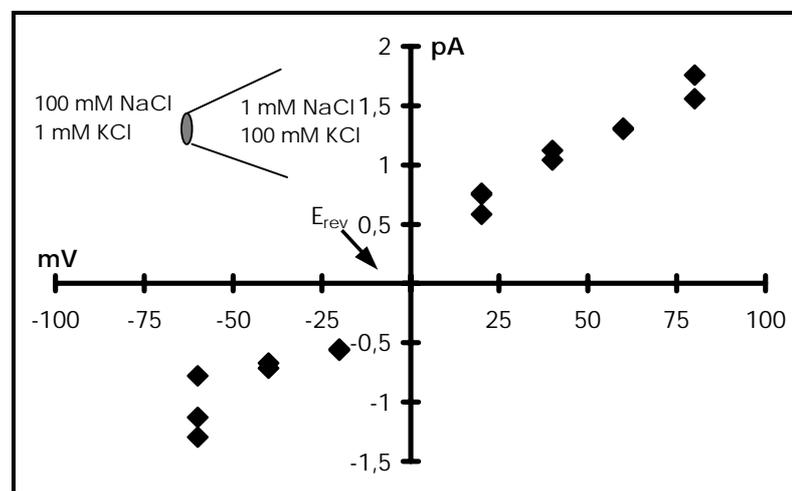


Abb.: 4.22: Selektivität für  $\text{Na}^+$ .

Die Strom-Spannungs-Kennlinie des schnell aktivierbaren Ionenkanals von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* in der *ci*-Konfiguration. Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KCl, 1 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Bad: 1 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Die Gleichgewichts-Potentiale für  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  liegen bei -118 mV und +118 mV.

$\text{Rb}^+$  ist ein weiterer Vertreter monovalenter Kationen aus der Reihe der Alkali-metalle und wird zur Überprüfung ihrer Permeabilität eingesetzt (HEDRICH & DIETRICH 1996). Für den schnell aktivierbaren Ionenkanal ergab sich eine Permeabilität für  $\text{Rb}^+$ . Wie Abbildung 4.23 zeigt, waren auch im negativen Spannungsbereich diskrete Öffnungsereignisse erkennbar. Jedoch tendierte der Ionenkanal zu übergangslosen Abschnitten mit kurzen gehäuften Offenzuständen, was sich bei den Offenzeiten durch die starke Zunahme der kürzeren Öffnungs-

zeiten bemerkbar machte (s. Abb. 4.24B). Im positiven Spannungsbereich war wiederum eine Zunahme der Kanalereignisse sowie eine Zunahme parallel auftretender Ionenkanäle zu erkennen. Bei der Strom-Spannungs-Kennlinie (s. Abb. 4.24A) zeigte sich die Leitfähigkeit mit 19 pS weiterhin unverändert. Für das erhaltene Umkehrpotential von -4,3 mV ergab sich somit für den schnell aktivierbaren Ionenkanal, unter Einbeziehung der relativen Permeabilität von  $K^+$  gegenüber  $Cl^-$  mit 6,2, eine Selektivität von  $K^+$  gegenüber  $Rb^+$  von 1,4.

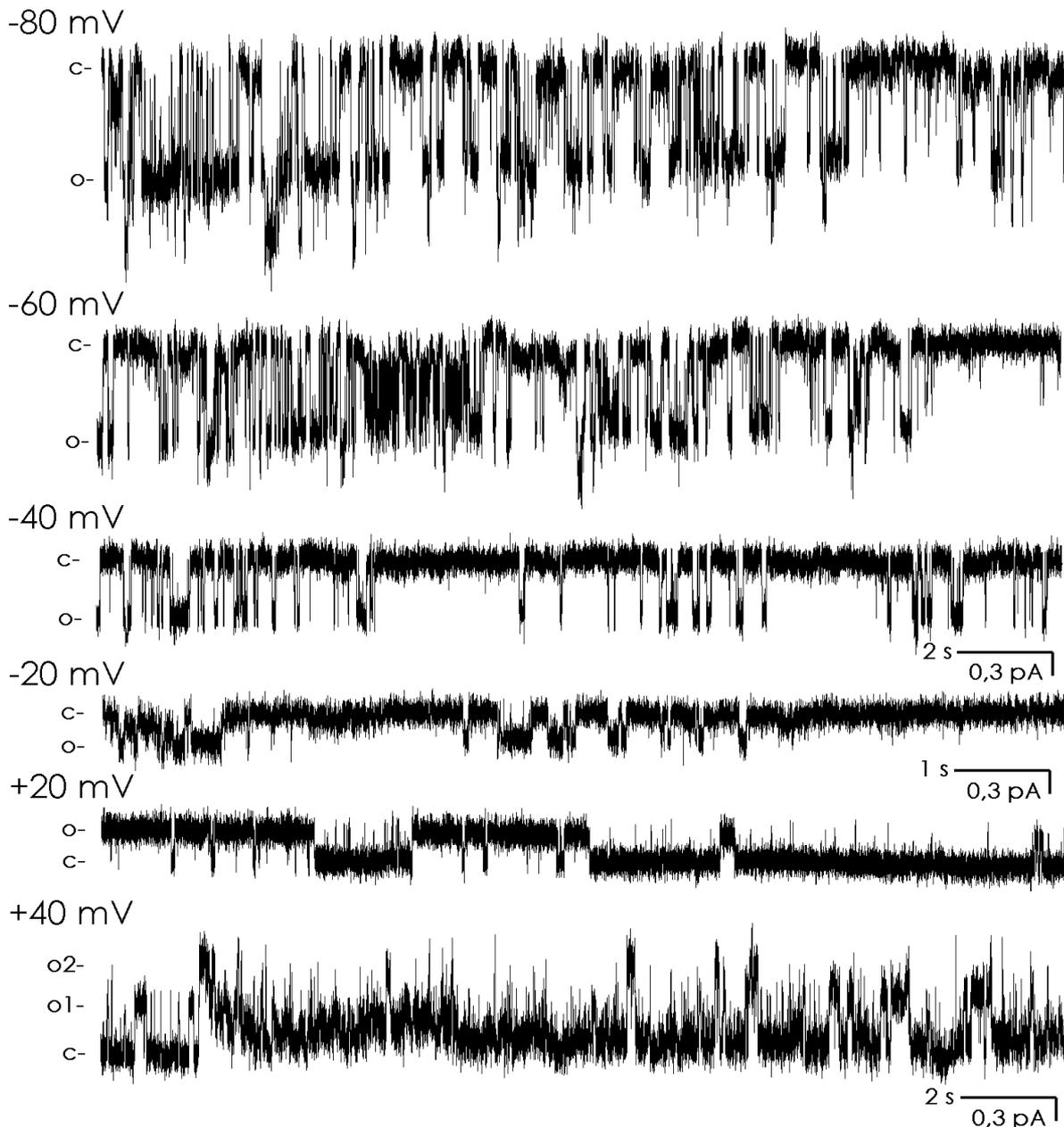


Abb. 4.23: Selektivität für  $Rb^+$ .

Kanalereignisse des schnell aktivierbaren Ionenkanals bei den indizierten Spannungen einer *c*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KCl, 1 mM RbCl, 1 mM  $CaCl_2$  und 2 mM  $MgCl_2$  (pH 7,2).

Bad: 1 mM KCl, 100 mM RbCl, 1 mM  $CaCl_2$  und 2 mM  $MgCl_2$  (pH 7,2).

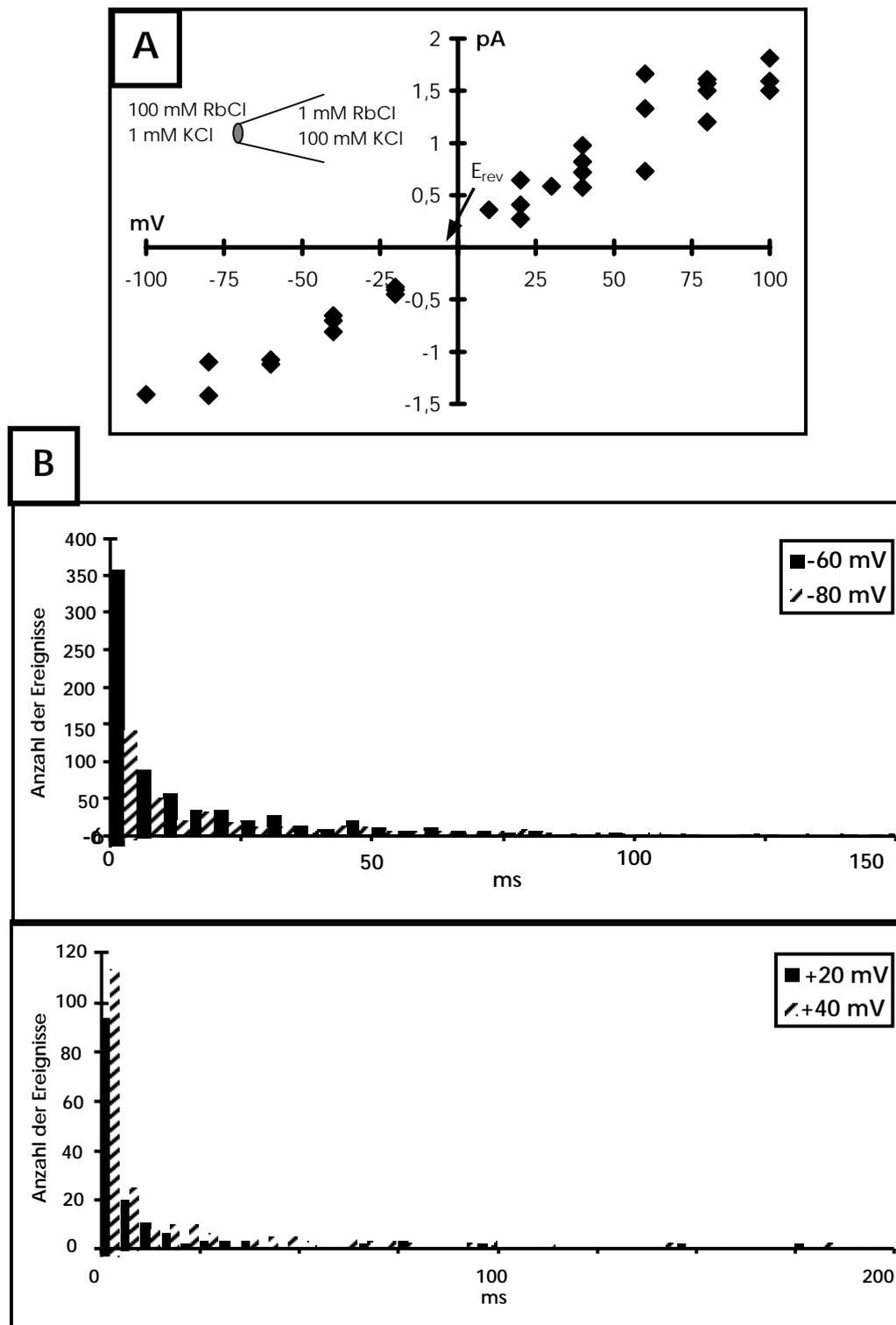


Abb. 4.24: Selektivität für  $\text{Rb}^+$ .

A: Die Strom-Spannungs-Kennlinie des schnell aktivierbaren Ionenkanals von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. in der *ci*-Konfiguration. Ionenkonzentrationen wie in Legende Abb. 4.23 angegeben.

Die Gleichgewichts-Potentiale lagen bei +118 mV ( $\text{Rb}^+$ ) und -118 mV ( $\text{K}^+$ ).

B: Offenzeiten des schnell aktivierbaren Ionenkanals bei den indizierten Haltepotentialen während einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L.

#### 4.3.2 Ein durch Inositol-1,4,5-triphosphat aktivierbarer hochselektiver $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal

Vakuolensuspensionen von *Z. mays* L. setzten nach der Applikation von  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$   $\text{Ca}^{2+}$  frei (Abb. 4.8). Um den für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung verantwortlichen Ionenkanal zu charakterisieren wurden Versuche in der *wv*-, *co*- und *ci*-Konfiguration unternommen.

Der Strom durch den Tonoplasten von *Z. mays* L.-Vakuolen wurde im *wv*-Modus bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  auf der zytoplasmatischen Seite von einem schnell aktivierbaren Ionenkanal mit einer Leitfähigkeit von ca.  $19 \text{ pS}$  getragen (s. Kap. 4.3.1 und Abb. 4.25 oben). Wurden unter diesen Bedingungen dem Bad (sprich zytoplasmatische Seite)  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  zugesetzt, so war eine Zunahme des Stromes durch den Tonoplasten sowohl bei negativen als auch bei positiven Haltepotentialen zu beobachten (s. Abb. 4.25 unten).

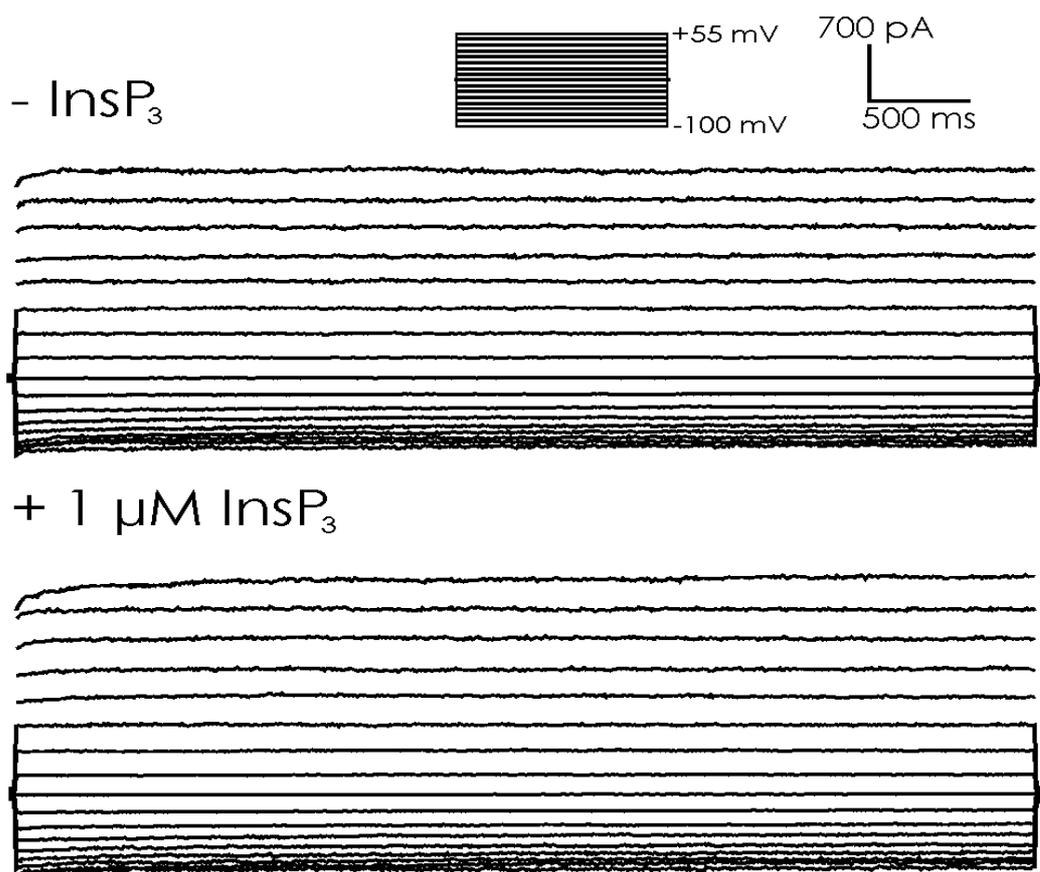


Abb. 4.25: Der  $\text{InsP}_3$ -induzierbare Strom.

Der Einfluß von  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  auf den Strom durch den Tonoplasten einer Vakuole ( $45 \mu\text{m}$ ) aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. bei Spannungsschritten von  $+55$  bis  $-100 \text{ mV}$ . Messung in der *wv*-Konfiguration.

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette:  $10 \text{ mM}$   $\text{KGlu}$ ,  $5 \text{ mM}$   $\text{CaGlu}_2$ ,  $\text{pH } 5,2$ ; Bad:  $100 \text{ mM}$   $\text{KGlu}$ ,  $1 \mu\text{M}$   $\text{CaGlu}_2$ ,  $\text{pH } 7,4$

Wurde der Strom durch den Tonoplasten vor und nach Applikation von  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  gegenüber der Spannung aufgetragen, so zeigte die Strom-Spannungs-Kennlinie (s. Abb. 4.26A) nicht nur eine Steigerung des Gesamtstroms, sondern auch eine Verschiebung des Umkehrpotentials des Gesamtstroms in Richtung des Gleichgewichts-Potentials für  $\text{Ca}^{2+}$ . Wurde der Strom durch den Tonoplasten vor der Applikation von  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  vom Strom durch den Tonoplasten nach der Applikation von  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  subtrahiert, so wies der daraus resultierende Differenzstrom ein Umkehrpotential von  $+36,7 \text{ mV}$  ( $\pm 3,2 \text{ mV}$ ,  $n = 4$ ) auf (s. Abb. 4.26B). Unter Verwendung von Gleichung (23) ergab sich für den Ionenstrom eine hohe Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$

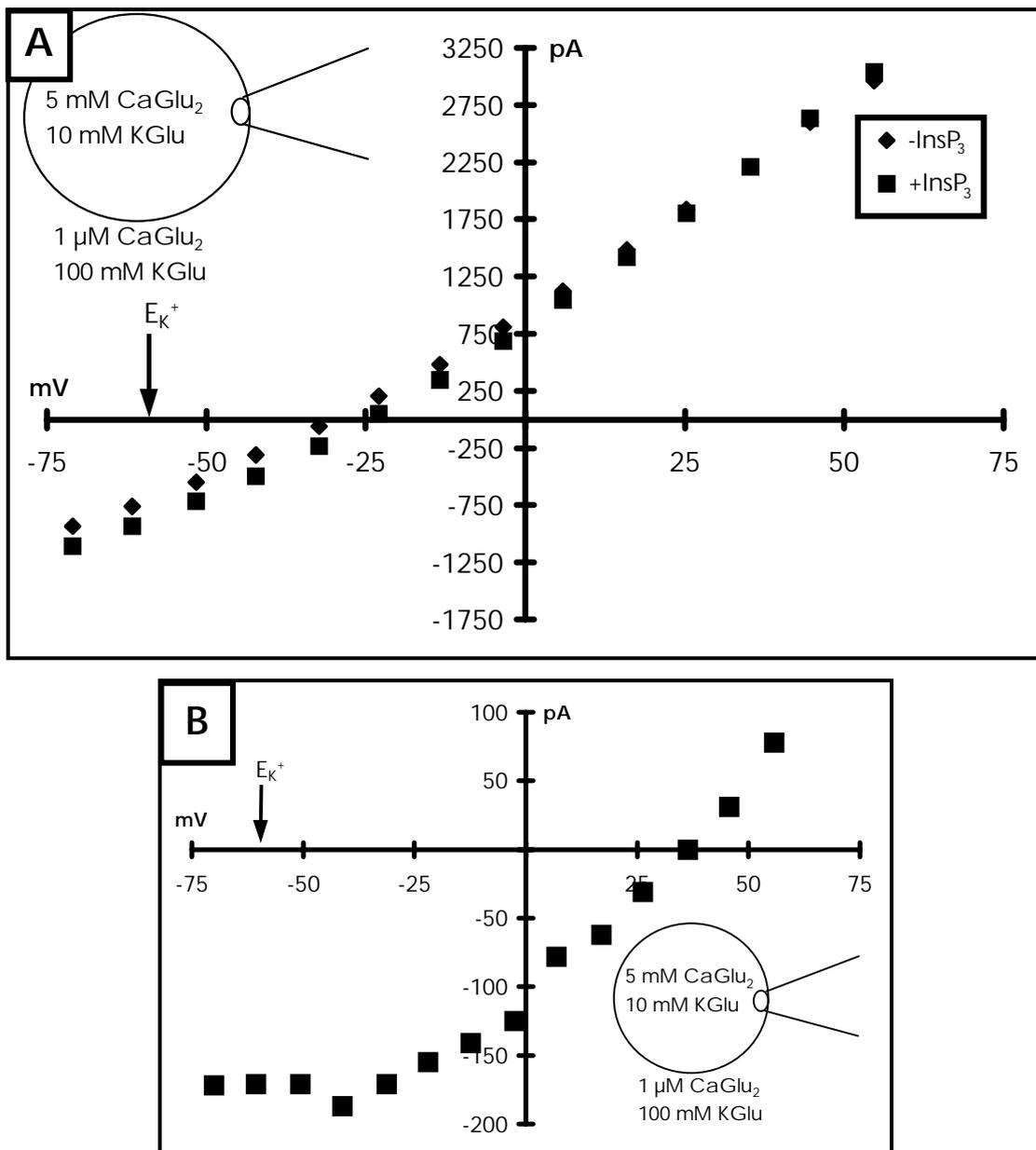


Abb. 4.26: Der  $\text{InsP}_3$ -induzierbare Differenzstrom.

A: Die Strom-Spannungs-Kennlinien der Messung aus Abb. 4.25.

B: Die Differenz der Strom-Spannungs-Kennlinien der Messung aus Abb. 4.25.

über  $K^+$  von 106:1. Der durch  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  induzierte Ionenstrom durch den Tonoplasten betrug hierbei bei  $-80 \text{ mV}$  durchschnittlich  $-23 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$ , bzw.  $+17 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$  bei  $+55 \text{ mV}$  (s. Abb. 4.27) und wies ein entsprechendes Umkehrpotential von  $+36,3 \text{ mV}$  auf. Dies könnte der Aktivierung eines hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals entsprechen.

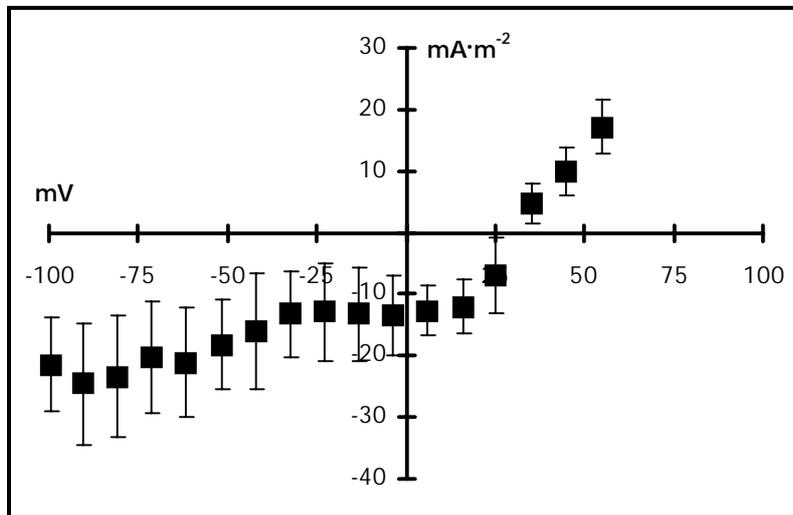


Abb. 4.27: Der  $\text{InsP}_3$ -induzierbare Differenzstrom.

Die Stromdichte ( $\text{mA}\cdot\text{m}^{-2}$ ) des  $\text{InsP}_3$ -aktivierbaren Stromes durch den Tonoplasten aus Vakuolen ( $n = 4$ ) von *Z. mays* L.-Koleoptil-Protoplasten. Messungen in der *uv*-Konfiguration. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.25 angegeben.

Um nachzuweisen, daß der durch  $\text{InsP}_3$  aktivierbare Differenzstrom durch den Tonoplasten durch einen spezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal verursacht wird, wurden Versuche in der *co*-Konfiguration unternommen. Die Einzelkanalanalyse in der *co*-Konfiguration mit  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  auf der zytoplasmatischen Seite zeigte das Vorkommen eines hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals (s. Abb. 4.28). Die lineare Zunahme der Stromamplituden sowohl im positiven als auch im negativen Bereich der Haltespannungen wies auf ein „ohmsches“ Verhalten des Ionenkanals hin. Der vakuoläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal besaß eine Leitfähigkeit von ca.  $12 \text{ pS}$ . Unter Verwendung von Regressionsgeraden wurde ein Umkehrpotential von  $+38,1 \text{ mV}$  ( $\pm 2,6 \text{ mV}$ ,  $n = 4$ ) ermittelt. Somit stimmte das Umkehrpotential der Einzelkanalanalyse mit dem Umkehrpotential der Gesamtstromanalyse überein. Unter der Annahme, daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal für  $\text{Glu}^-$ -Ionen keine Permeabilität besaß, errechnete sich unter Verwendung von Gleichung (23) für den durch  $\text{InsP}_3$  aktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal wiederum eine hohe Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  über  $K^+$  von 117. Übereinstimmend konnten ALEXANDRE et al. (1990) und ALLEN & SANDERS (1994b) einen durch  $\text{InsP}_3$  aktivierbaren, hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom mit

einer Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  über  $\text{K}^+$  von 100 - 800 an Vakuolen von *Beta vulgaris* L. demonstrieren.

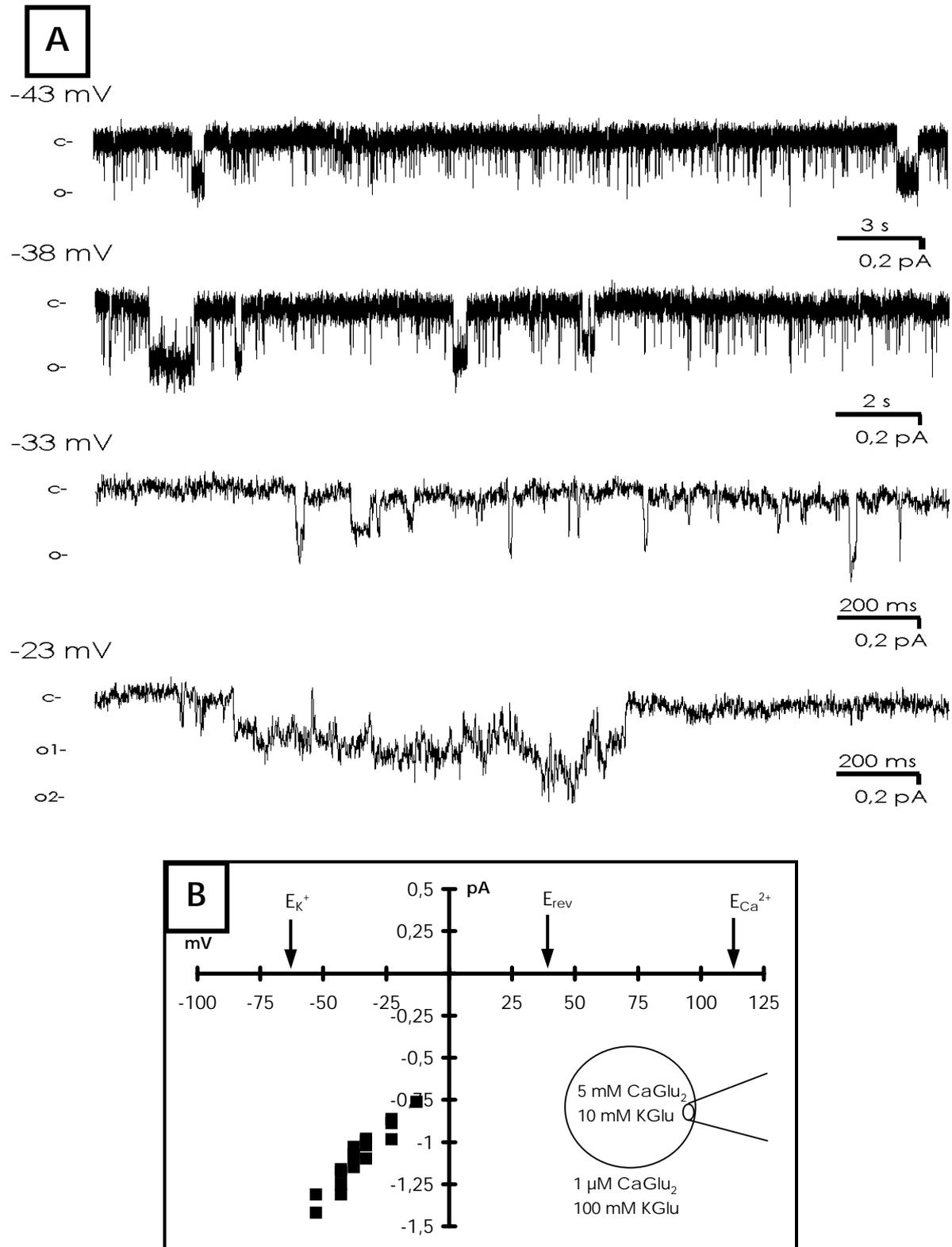


Abb. 4.28: Der  $\text{InsP}_3$ -aktivierbare hochselektive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal.

A: Kanalereignisse des hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals mit einer Leitfähigkeit von 12 pS bei den indizierten Spannungen einer  $c\omega$ -Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-  
Protoplasten von *Z. mays* L. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.25 angegeben.

B: Die Strom-Spannungs-Kennlinie des hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals.

#### 4.3.2.1 Die Offenwahrscheinlichkeit des $\text{InsP}_3$ -aktivierbaren hochselektiven $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in der *ci*-Konfiguration

Um das Öffnungsverhalten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bezüglich physiologischer Regulationsmechanismen auf der vakuolären Seite zu testen, wurden Versuche in der *ci*-Konfiguration unternommen. In den Lösungen wurde die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration auf 2 mM in Bad und Pipette erhöht, um einen eventuellen Einfluß von  $\text{Cl}^-$  auf die Offenwahrscheinlichkeit untersuchen zu können, da auch die Anwesenheit von Anionen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beeinflussen kann (HASSELBACH & MIGALA 1992). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der zytoplasmatischen Seite wurde auf 0,1 mM erhöht und zusätzlich 1  $\mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  zugesetzt. Unter diesen Voraussetzungen konnten in ca. 5 % der Versuche die Öffnungsereignisse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals beobachtet werden.

Abbildung 4.29A zeigt die typischen Öffnungsereignisse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals während einer Messung unter oben genannten Bedingungen. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal zeigte ein spannungsabhängiges Öffnungsverhalten, wobei nur bei schwach positiven und negativen Haltepotentialen Öffnungsereignisse zu beobachten waren. Für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal war eine lineare Zunahme der Amplitude mit einer Leitfähigkeit von ca. 12 pS zu erkennen (s. Abb. 4.29B). Unter Verwendung von Gleichung (23) ergab sich mit dem Umkehrpotential von +32,6 mV eine Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  von 105. Eine Zunahme des Haltepotentials im negativen Spannungsbereich führte zu einer Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in der *ci*-Konfiguration. Dies war durch das parallele Öffnen mehrerer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu erkennen. Ein Anstieg des Haltepotentials über -70 mV hinaus führte jedoch wieder zu einer Reduzierung der Kanalaktivierung und dem charakteristischen Auftreten von Offenzuständen geringerer Leitfähigkeit. Auch die Offenzeiten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals verhielten sich spannungsabhängig. Abbildung 4.30A zeigt die Offenzeiten der oberen Spur bei einer Messung mit bis zu zwei sichtbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen. Während bei niedrigen Haltepotentialen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal Offenzeiten bis zu 400 ms aufwies, verkürzten sich die Offenzeiten bei höheren Haltespannungen. Sie verblieben relativ konstant unter 100 ms. Zur Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals mußten durch das Auftreten von mehreren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen während der Messung die wahrscheinlichste Kanalanzahl pro Versuch berechnet werden (s. Kap. 3.8.5). Für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ergab sich ein Maximum der Offenwahrscheinlichkeit bei -75 mV (s. Abb. 4.30B).

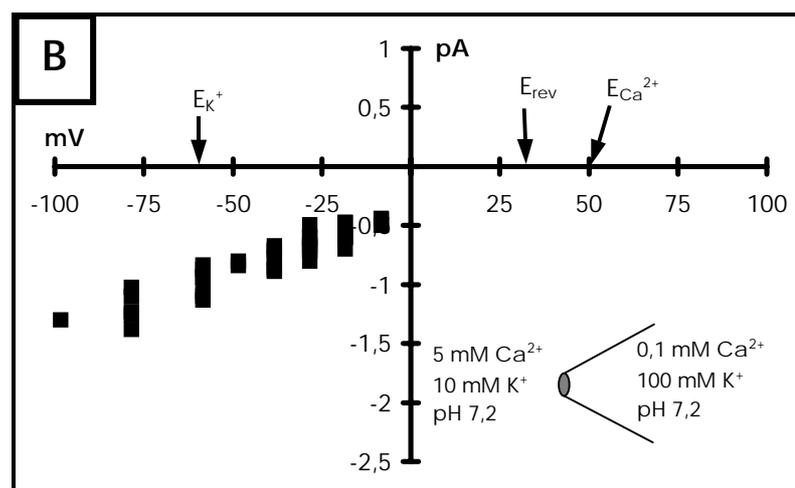
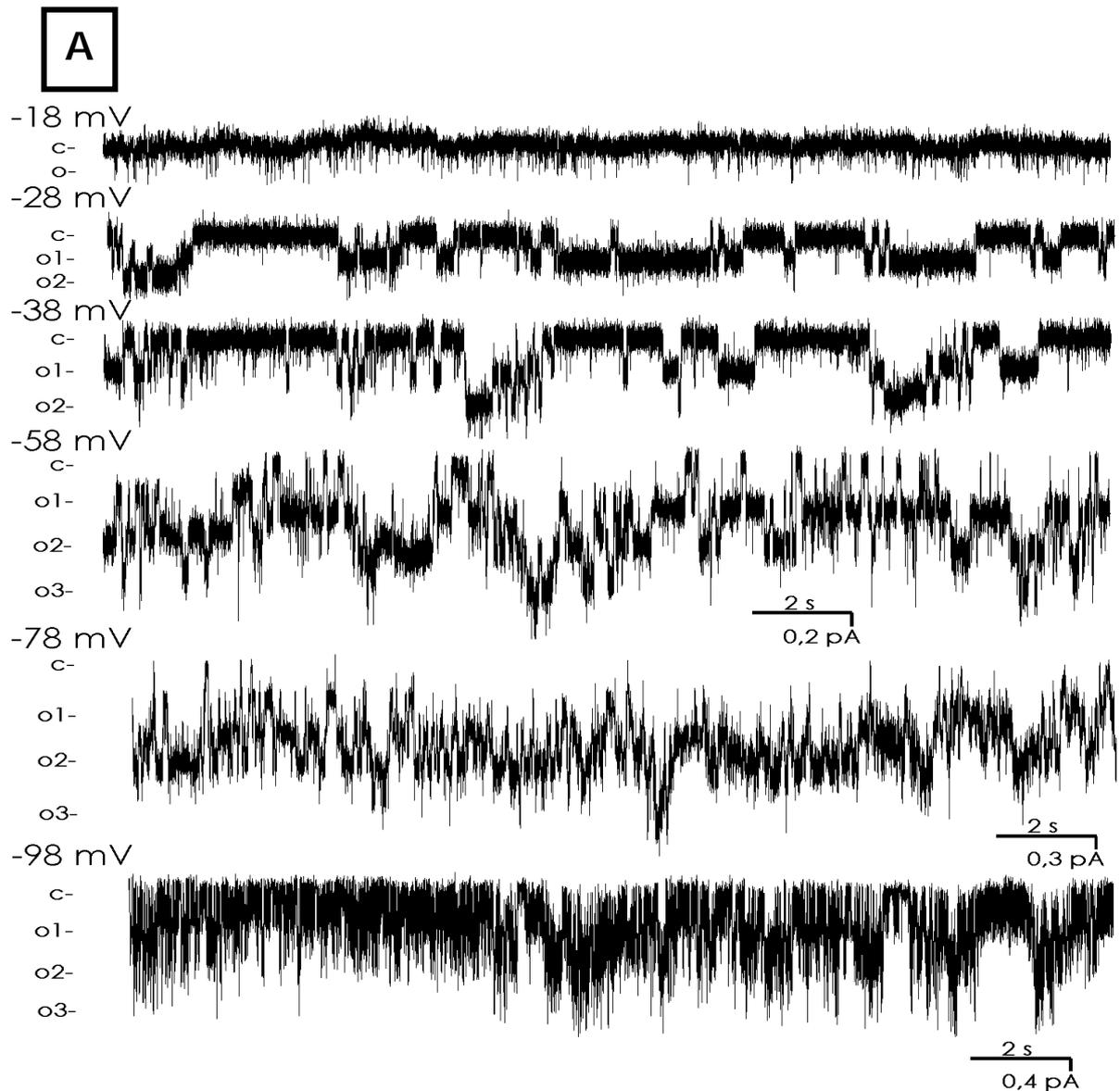


Abb. 4.29: Der  $InsP_3$ -aktivierbare hochselektive  $Ca^{2+}$ -Kanal in der *ci*-Konfiguration.

A: Kanalereignisse des  $Ca^{2+}$ -Kanals bei den indizierten Haltepotentialen während einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L.

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM K<sub>2</sub>Glu; 0,1 mM CaGlu<sub>2</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,2).

Bad: 10 mM K<sub>2</sub>Glu, 5 mM CaGlu<sub>2</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,2).

B: Strom-Spannungs-Kennlinie des hochselektiven  $Ca^{2+}$ -Kanals.

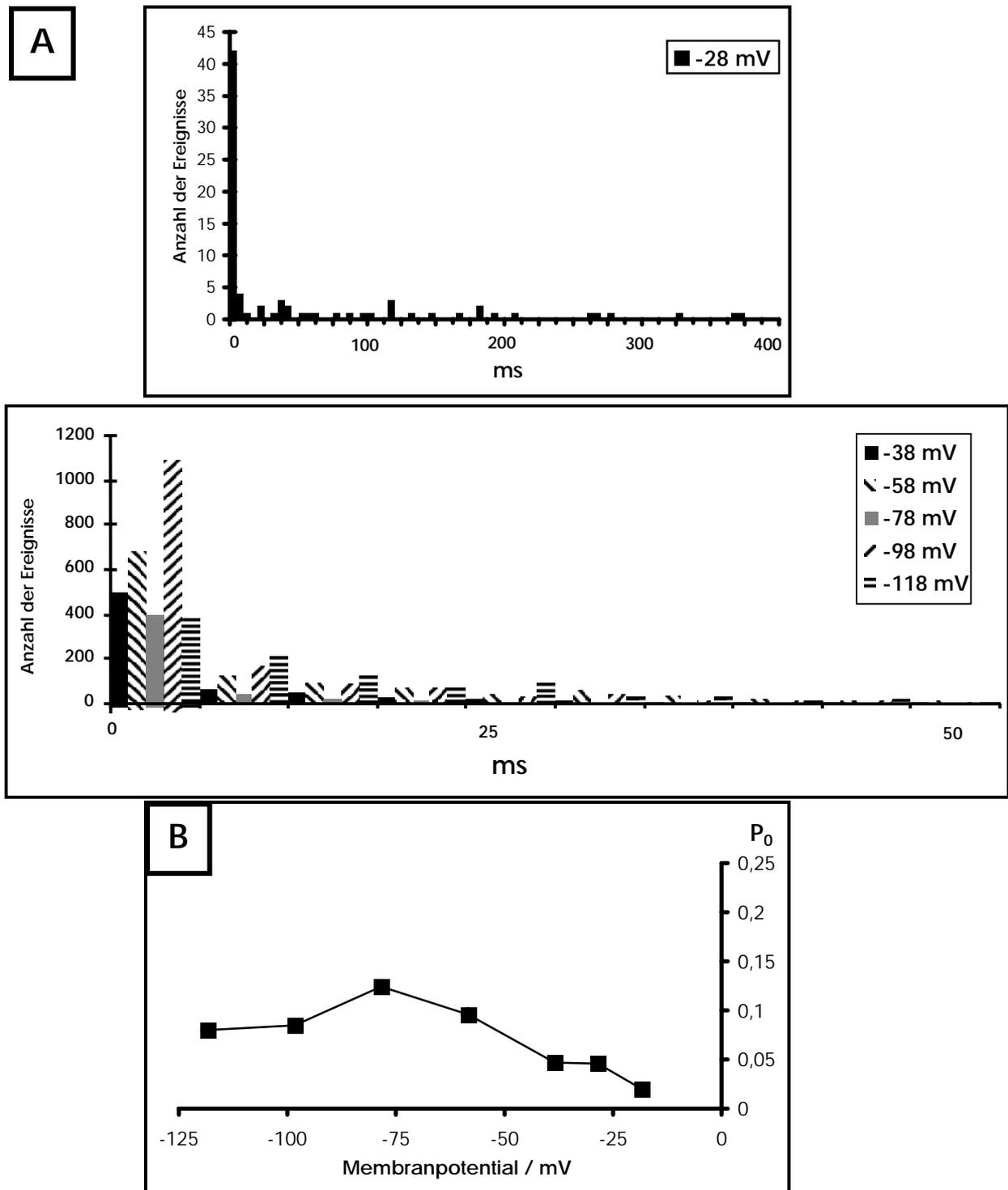


Abb. 4.30: Der  $\text{InsP}_3$ -aktivierbare hochselektive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in der *ci*-Konfiguration.

A: Die Offenzeiten der oberen Spur (P(1)) des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei Haltespannungen von -18 mV bis -118 mV während einer *ci*-Messung mit zwei sichtbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.29 angegeben. Im oberen Diagramm (-28 mV) sind Öffnungen von bis zu 400 ms Dauer erkennlich. Im unteren Diagramm wurde zur anschaulichen Darstellung die maximale Öffnungszeit auf 50 ms normiert, da längere Ereignisse nicht mehr als Ereigniswerte darzustellen waren.

B: Die Offenwahrscheinlichkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den indizierten Haltespannungen von -18 mV bis -118 mV aus *ci*-Messungen am Tonoplasten von *Z. mays* L.

#### 4.3.2.2 Der Einfluß der pH-Absenkung und der Erhöhung der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der vakuolären Seite auf die Offenwahrscheinlichkeit

##### pH-Absenkung

Da das pH von *Z. mays* L.-Vakuolen Werte von pH 4,6 annehmen kann (s. Kap. 4.1.1), wurden in der *ci*-Konfiguration Versuche mit der Absenkung des pH auf der vakuolären Seite unternommen. Dies schien angemessen, da insbesondere ALLEN & SANDERS (1994a) durch ein Absenken des pH auf der vakuolären Seite von pH 7,3 auf pH 5,5 eine drastische Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit eines spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals von *Vicia faba* L.-Schließzellvakuolen feststellten. Abbildung 4.31A zeigt die Kanalereignisse eines der wenigen Fälle der sichtbaren Einwirkung einer pH-Absenkung auf der vakuolären Seite von pH 7,2 auf pH 5,6 auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal während einer Messung. Nach dem Austausch des Bades war eine Abnahme der Kanalaktivität zu erkennen, die auch im Amplituden-Histogramm (Abb. 4.32A) durch den kompletten Ausfall des vierten und weitgehenden Ausfall des dritten Kanalmaximums erkennbar ist. Weiterhin war eine Verkürzung der Offenzeiten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals erkennbar. Dies zeigte sich in der Zunahme der Ereignisse im Amplituden-Histogramm, sowie in der Zunahme der Ereignisse mit kurzen Offenzeiten (Abb. 4.31B). Insgesamt ergab sich durch diese Effekte eine Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit um ca. 20 %, wohingegen ALLEN & SANDERS (1994a) fast den kompletten Ausfall der Kanalaktivität beobachteten. In der Mehrzahl der Versuche ( $n = 5$ ) konnte jedoch überhaupt keine Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit festgestellt werden. Die Strom-Spannungs-Kennlinie (s. Abb. 4.32B) wies mit einem Umkehrpotential von +34,4 mV weiterhin eine hohe Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  von 126 auf, bei einer Leitfähigkeit von 12 pS.

##### Erhöhung der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Um den Einfluß einer Anhebung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der vakuolären Seite auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal zu untersuchen, wurde im Anschluß an die Messungen mit 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  das Bad durch eine 50 millimolare  $\text{Ca}^{2+}$ -Glu<sup>-</sup>-Lösung ausgetauscht. Dies schien angebracht, da JOHANNES et al. (1992) bei einem vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal aus *Beta vulgaris* L. eine von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der vakuolären Seite abhängige Sättigung des Ionenkanalstroms zeigen konnten. Die Erhöhung der

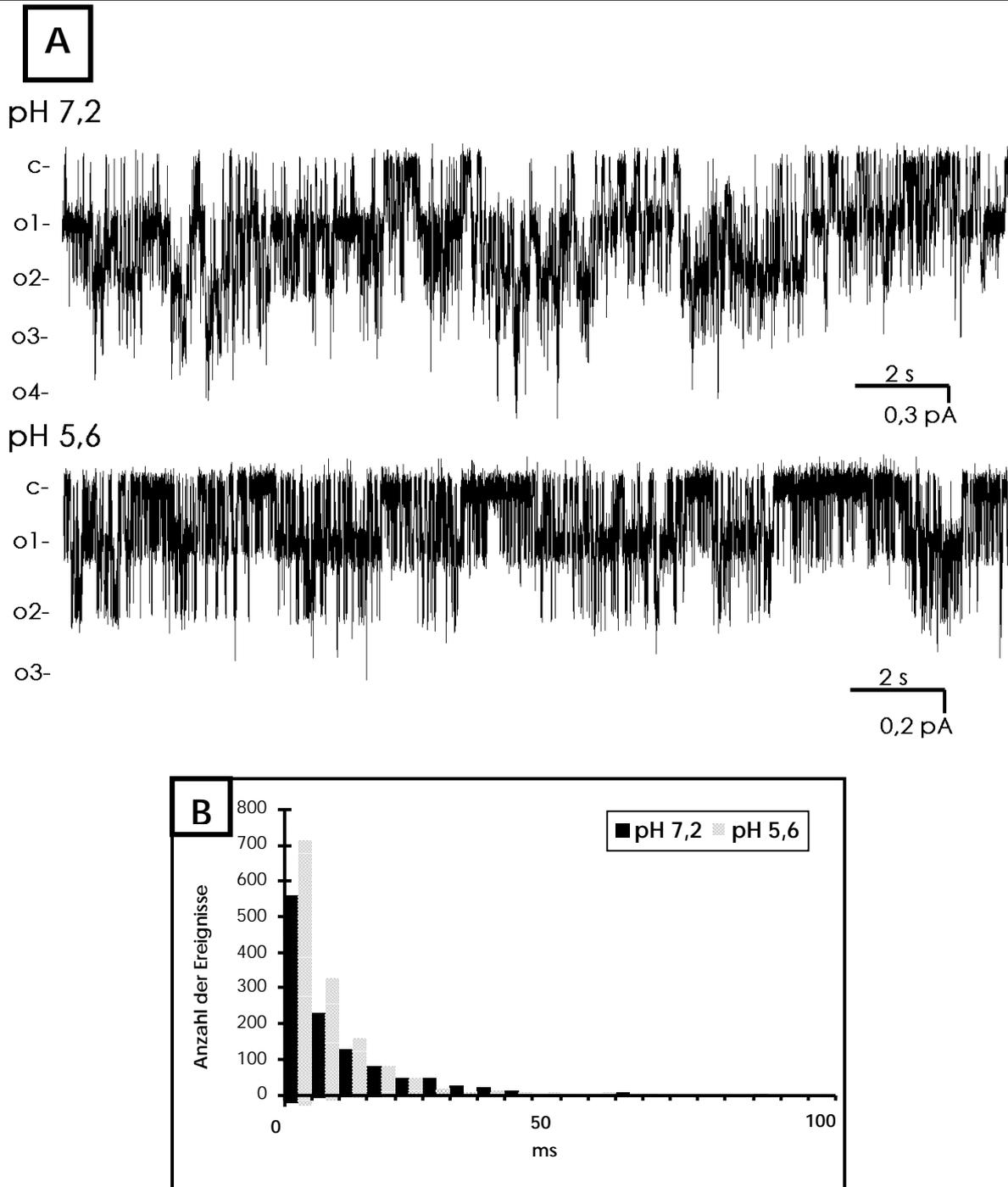


Abb. 4.31: pH-Absenkung auf der vakuolären Seite.

A: Kanalereignisse des hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals während einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. bei einem Haltepotential von  $-28$  mV. Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KGlu, 0,1 mM  $\text{CaGlu}_2$  und 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Bad: 10 mM KGlu, 5 mM  $\text{CaGlu}_2$  und 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2; pH 5,6).

B: Die Einwirkung der pH-Absenkung auf der vakuolären Seite auf die Offenzeiten (erste Spur (P(1))).

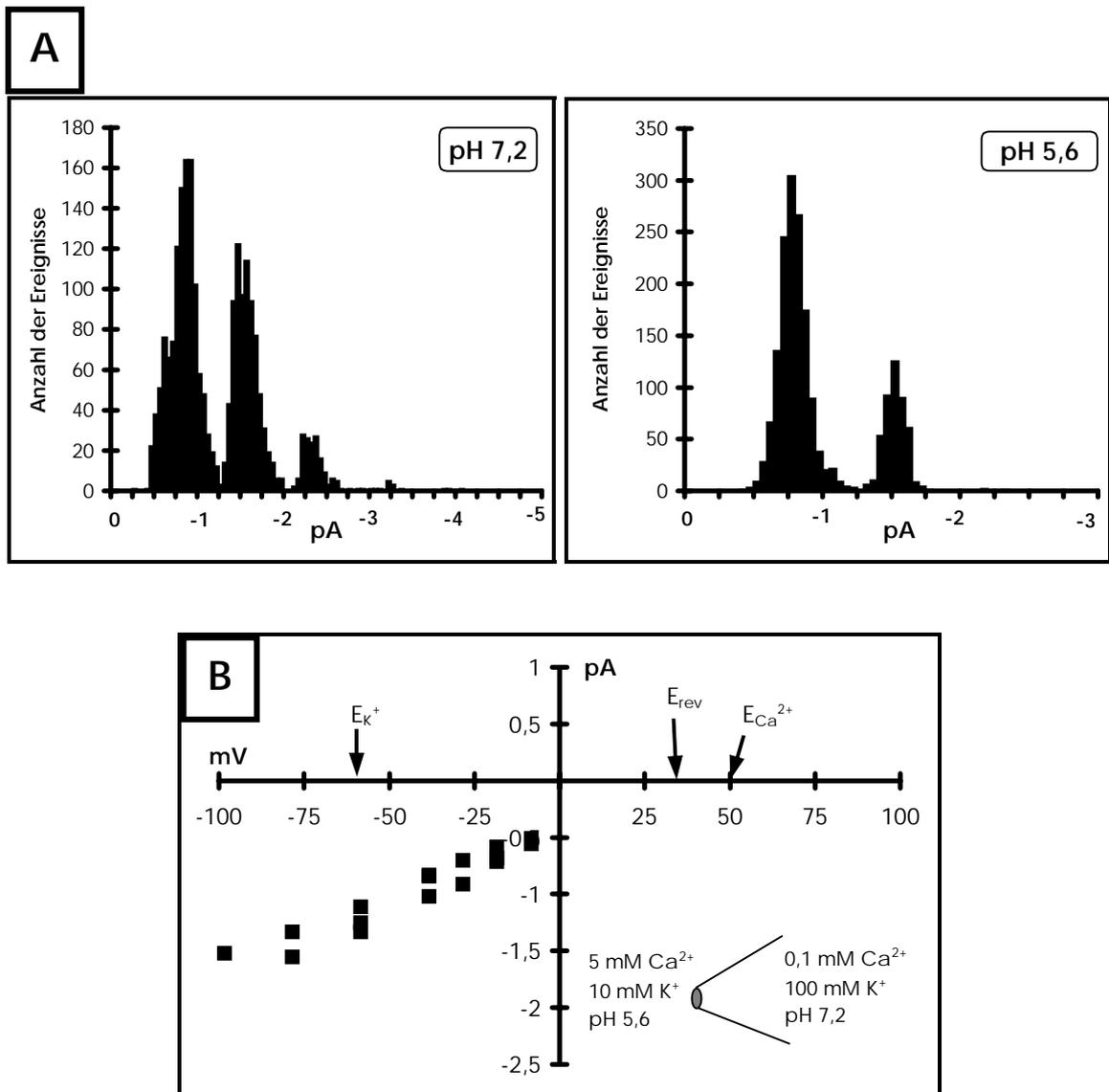


Abb. 4.32: pH-Absenkung auf der vakuolären Seite.

A: Amplituden-Histogramm des hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals (s. Abb. 4.31A).

B: Die Strom-Spannungs-Kennlinie von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. in der *ci*-Konfiguration. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.31 angegeben.

$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der vakuolären Seite führte zu einer vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewichtspotential abhängigen Verschiebung des Umkehrpotentials von +32,6 auf +64,9 mV (s. Abb. 4.33A). Mit dem Umkehrpotential von +64,9 mV ergab sich eine Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^{+}$  von 121. Auffallend bei den Messungen mit erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen war das vermehrte Auftreten von Offenzuständen geringerer Leitfähigkeit (nicht gezeigt). Auch nach einer Absenkung des pH-Wertes auf der vakuolären Seite von pH 7,2 auf pH 5,6 zeigte sich keine Änderung der

Verhältnisse. Bei einer Leitfähigkeit von 12 pS (s. Abb. 4.33B) ergab sich mit dem Umkehrpotential von +66,1 mV eine Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  von 139.

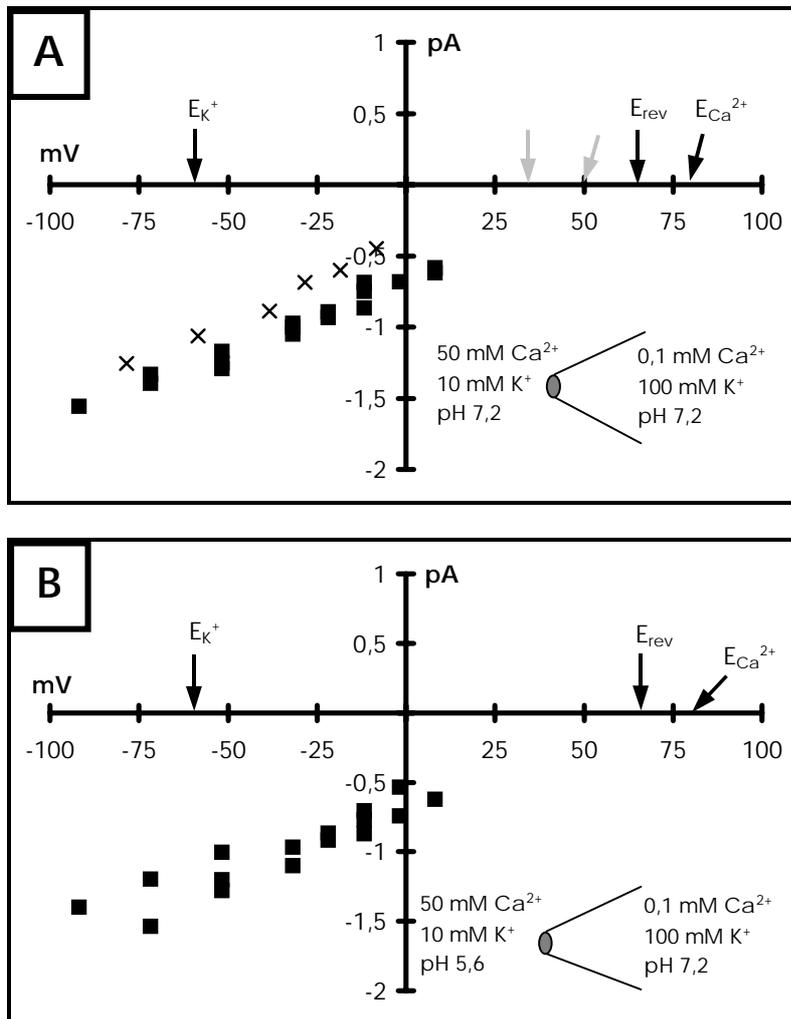


Abb. 4.33: Einfluß des  $\text{Ca}^{2+}$  und des pH auf der vakuolären Seite.

**A:  $\text{Ca}^{2+}$**

Die Strom-Spannungs-Kennlinie von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-  
Protoplasten von *Z. mays* L. in der *ci*-Konfiguration. Zum besseren Vergleich der  
Verschiebung des Umkehrpotentials wurde im Diagramm eine Messung mit 5 mM  
 $\text{Ca}^{2+}$  (x) gegenüber den Messungen mit 50 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (■) aufgetragen.

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM K<sub>2</sub>Glu; 0,1 mM CaGlu<sub>2</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,2).

Bad: 10 mM K<sub>2</sub>Glu, 5 mM (x) oder 50 mM CaGlu<sub>2</sub> (■) und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,2).

Die Gleichgewichts-Potentiale für  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  lagen bei -59 und +50, bzw. +79,5 mV.

**B: pH**

Strom-Spannungs-Kennlinie des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals von Messungen in der *ci*-Konfiguration  
am Tonoplasten aus Koleoptil-*Protoplasten* von *Z. mays* L.

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM K<sub>2</sub>Glu; 0,1 mM CaGlu<sub>2</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,2).

Bad: 10 mM K<sub>2</sub>Glu, 50 mM CaGlu<sub>2</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 5,6).

#### 4.3.2.3 Selektivität für Ionen der Berylliumgruppe

##### Magnesium ( $Mg^{2+}$ )

Zur weiteren Charakterisierung des  $InsP_3$ -aktivierbaren hochselektiven  $Ca^{2+}$ -Kanals wurde die Leitfähigkeit und Selektivität für zweiwertige Kationen der Berylliumgruppe untersucht. Diese Untersuchung kann Aufschluß über den Selektivitätsfilter des  $Ca^{2+}$ -Kanals ergeben (HILLE 1992, PINEROS & TESTER 1995) und schien von besonderem Interesse, da bis zu diesem Zeitpunkt für tonoplastenständige  $InsP_3$ -aktivierbare  $Ca^{2+}$ -Kanäle nur eine Leitfähigkeitsreihe in der  $wv$ -Konfiguration nachgewiesen werden konnte ( $Ca^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+}$ , ALEXANDRE & LASALLES 1992).

Zur Feststellung des Öffnungsverhaltens und der Offenzeiten wurden die Versuche mit 50 mM  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  bzw.  $Mg^{2+}$  und 10 mM  $K^+$  auf der vakuolären Seite, sowie 0,1 mM  $Ca^{2+}$  und 100 mM  $K^+$  auf der zytoplasmatischen Seite durchgeführt (s. Legende Abb. 4.34). Für die  $Ca^{2+}$ -Kontrolle (50 mM) resultierte aus dem Umkehrpotential von +64,8 mV eine Selektivität von  $Ca^{2+}$  gegenüber  $K^+$  von 121. Die Leitfähigkeit betrug 12 pS. Da sich die Selektivität von  $Ca^{2+}$  gegenüber  $K^+$  unter Verwendung von 100 mM  $Cl^-$  auf zytoplasmatischer und vakuolärer Seite nicht merklich verringerte, kann vermutet werden, daß der durch  $InsP_3$  aktivierbare, hochselektive  $Ca^{2+}$ -Kanal keine nennenswerte Permeabilität für  $Cl^-$  besitzt.

Wurde das  $Ca^{2+}$ -Bad durch das  $Mg^{2+}$ -Bad ausgetauscht, wies der  $Ca^{2+}$ -Kanal keine diskreten Öffnungen mehr auf (Abb. 4.34A).  $Mg^{2+}$  als Ladungsträger führte in dieser hohen vakuolären Konzentration zu stark flickernden Öffnungsereignissen mit sehr kurzen Offenzeiten. Dies könnte auf eine sterische Blockierung des  $Ca^{2+}$ -Kanals durch  $Mg^{2+}$  hinweisen, die z.B. von ryanodinabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen des sarkoplasmatischen Retikulums bekannt ist (MEISSNER et al. 1986). Das Umkehrpotential verschob sich bei einer Leitfähigkeit von 15,5 pS deutlich in Richtung des Gleichgewichtspotentials für  $K^+$  (s. Abb. 4.34B). Das Umkehrpotential von +9,7 mV hat mit Gleichung (23) eine Reduzierung der Selektivität für  $Mg^{2+}$  gegenüber  $K^+$  von 1,7 zur Folge.

Unter Einbeziehung der relativen Permeabilität von  $Mg^{2+}$  gegenüber  $K^+$  mit 1,7, ergab sich mit Gleichung (26) für die  $Ca^{2+}$ -Kontrolle (50 mM) eine Steigerung der Selektivität von  $Ca^{2+}$  gegenüber  $K^+$  von 129.

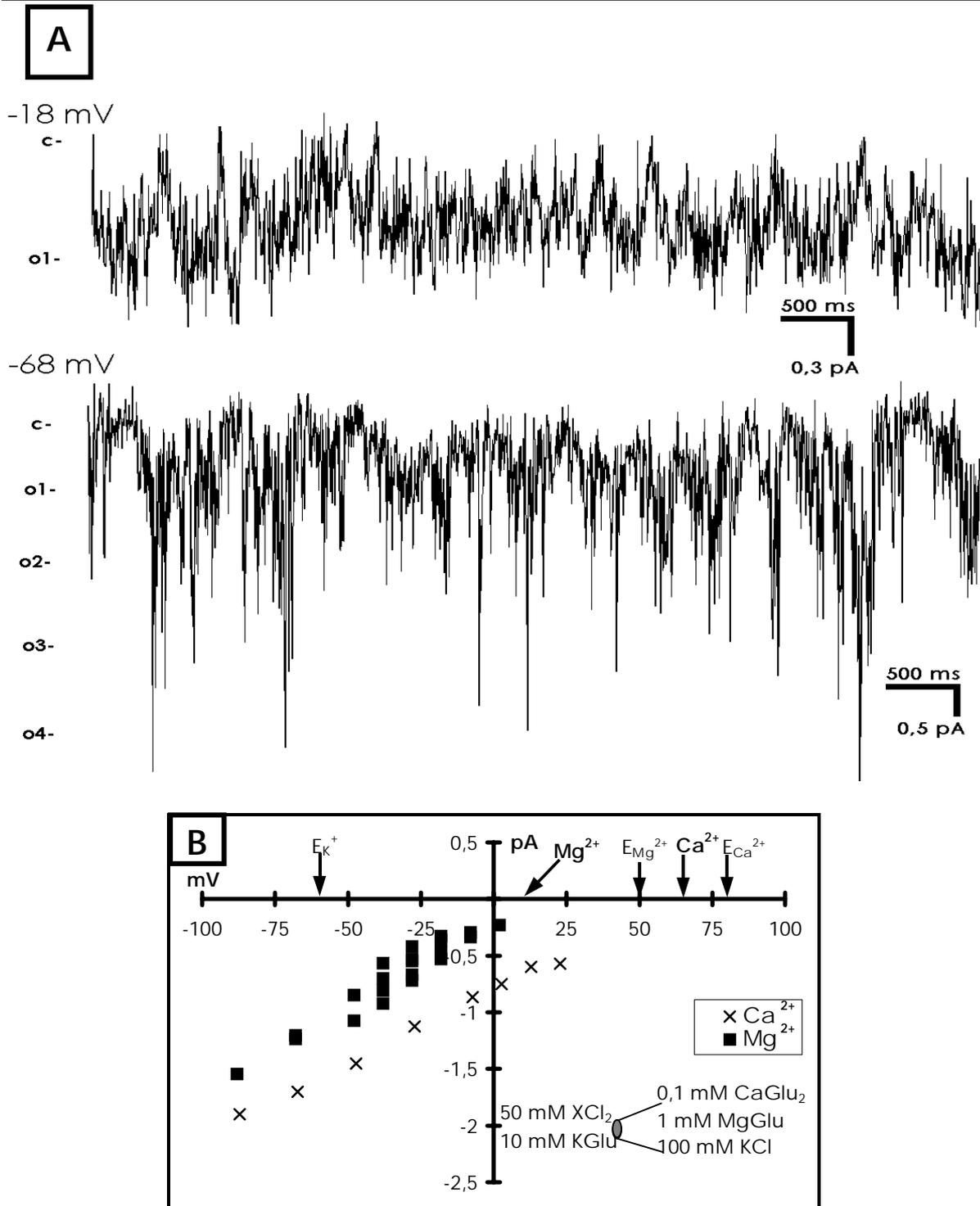


Abb. 4.34:  $\text{Mg}^{2+}$  als Ladungsträger.

A: Kanalereignisse des hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals während einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. bei den indizierten Haltepotentialen.

B: Strom-Spannungskurve des hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals.

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM  $\text{KCl}$ ; 0,1 mM  $\text{CaGlu}_2$  und 1 mM  $\text{MgGlu}_2$  (pH 7,2).

Bad (x): 10 mM  $\text{KGlu}$ , 50 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM  $\text{MgGlu}_2$  (pH 7,2).

Bad (■): 10 mM  $\text{KGlu}$ , 50 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Die Gleichgewichts-Potentiale für  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  waren -59, +50 und +79,5 mV.

**Barium ( $\text{Ba}^{2+}$ )**

Wurde  $\text{Ca}^{2+}$  auf der vakuolären Seite durch  $\text{Ba}^{2+}$  ersetzt (Abb. 4.35B), verschob der nun durch  $\text{Ba}^{2+}$  getragene einwärtsgerichtete Kationenstrom das Umkehrpotential in Richtung des Gleichgewichtspotentials für  $\text{K}^+$  auf +32,1 mV. Bei einer erhöhten Leitfähigkeit von 21,1 pS ergab sich mit Gleichung (23) eine Selektivität von  $\text{Ba}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  von 8. Unter Einbeziehung der relativen Permeabilität von  $\text{Mg}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  mit 1,7, ergab sich mit Gleichung (26) eine Selektivität von  $\text{Ba}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  von 8. Die hier vorgefundene Erhöhung der Leitfähigkeit von 12 auf 21,1 pS mit  $\text{Ba}^{2+}$  als Ladungsträger steht somit im Widerspruch gegenüber der von ALEXANDRE & LASALLES (1992) nachgewiesenen Leitfähigkeitsreihe ( $\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$ ).

Die Offenzeiten blieben gegenüber Messungen mit  $\text{Ca}^{2+}$  als Ladungsträger unbeeinflusst, wobei aber wiederum bei höheren negativen Haltepotentialen vermehrt Offenzustände geringerer Leitfähigkeit auftraten (s. Abb. 4.35A).

**Strontium ( $\text{Sr}^{2+}$ )**

Auch für  $\text{Sr}^{2+}$  als Ladungsträger zeigte sich eine Verschiebung des Umkehrpotentials in Richtung des Gleichgewicht-Potentials für  $\text{K}^+$ . Jedoch fiel die Selektivitätsverschiebung im Vergleich mit  $\text{Ba}^{2+}$  schwächer aus. Aus dem Umkehrpotential von +44,1 mV ergab sich mit Gleichung (23) eine Selektivität von  $\text{Sr}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  von 18, wobei die Leitfähigkeit ca. 17 pS betrug (s. Abb. 4.36B). Die hier vorgefundene Erhöhung der Leitfähigkeit von 12 auf 17 pS mit  $\text{Sr}^{2+}$  als Ladungsträger steht somit abermals im Widerspruch gegenüber der von ALEXANDRE & LASALLES (1992) nachgewiesenen Leitfähigkeitsreihe ( $\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$ ).

Unter Einbeziehung der relativen Permeabilität von  $\text{Mg}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  mit 1,7, ergab sich mit Gleichung (26) eine Erhöhung der Selektivität von  $\text{Sr}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  von 20. Die Offenzeiten und das Öffnungsverhalten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals änderten sich mit  $\text{Sr}^{2+}$  als Ladungsträger nicht sichtbar (s. Abb. 4.36A).

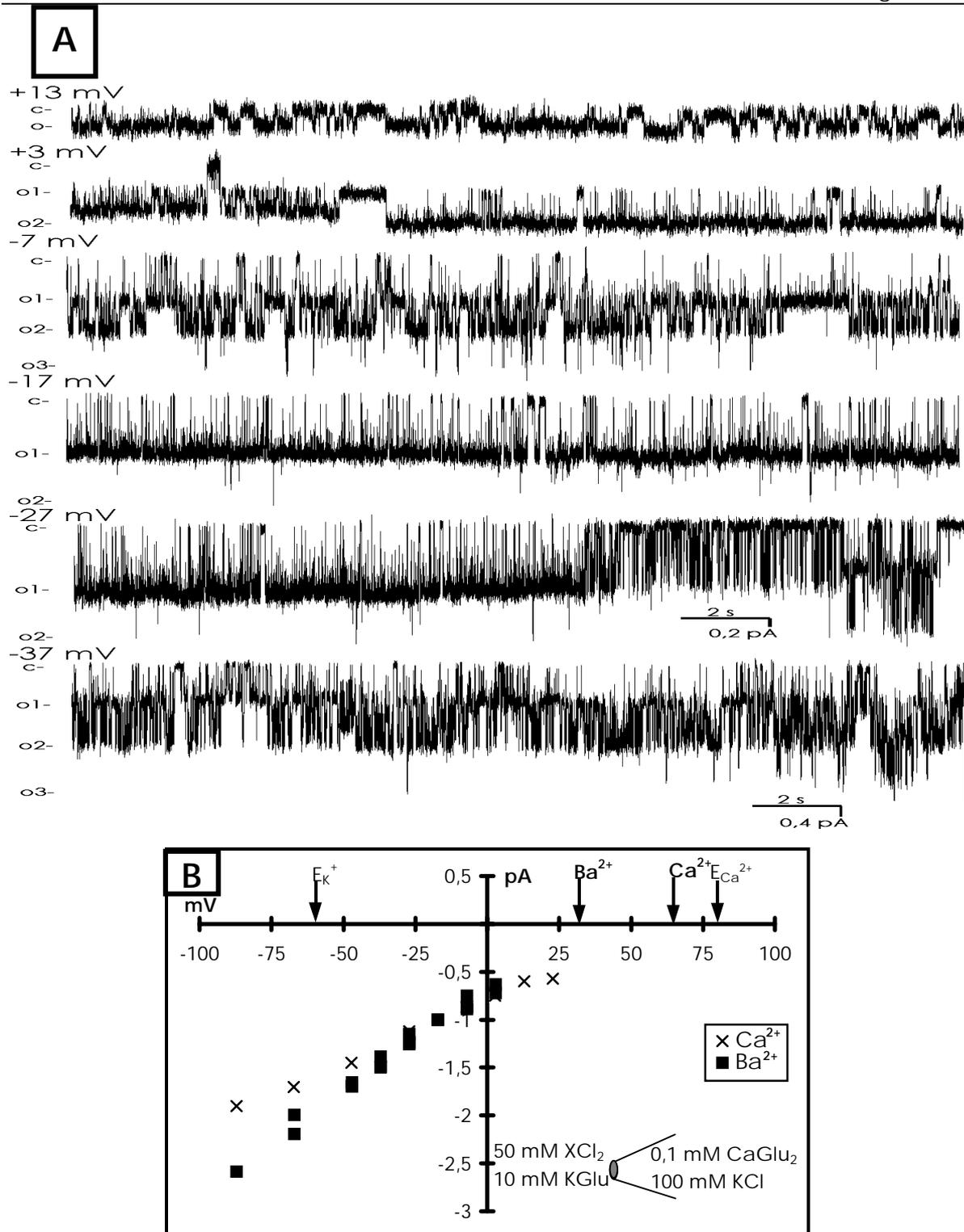


Abb. 4.35: Ba<sup>2+</sup> als Ladungsträger.

A: Kanalereignisse des hochselektiven Ca<sup>2+</sup>-Kanals während einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L.

B: Strom-Spannungs-Kennlinie des hochselektiven Ca<sup>2+</sup>-Kanals.

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KCl; 0,1 mM CaGlu<sub>2</sub> und 1 mM MgGlu<sub>2</sub> (pH 7,2).

Bad (x): 10 mM KGlu, 50 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM MgGlu<sub>2</sub> (pH 7,2).

Bad (■): 10 mM KGlu, 50 mM BaCl<sub>2</sub> und 1 mM MgGlu<sub>2</sub> (pH 7,2).

Die Gleichgewichts-Potentiale für K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> lagen bei -59 und +79,5 mV<sup>2</sup>.

<sup>2</sup>Für Ba<sup>2+</sup> und Sr<sup>2+</sup> konnten keine Gleichgewichts-Potentiale bestimmt werden, da die Kationen nur auf der vakuolären Seite vorlagen (s. Kap. 3.8.4).

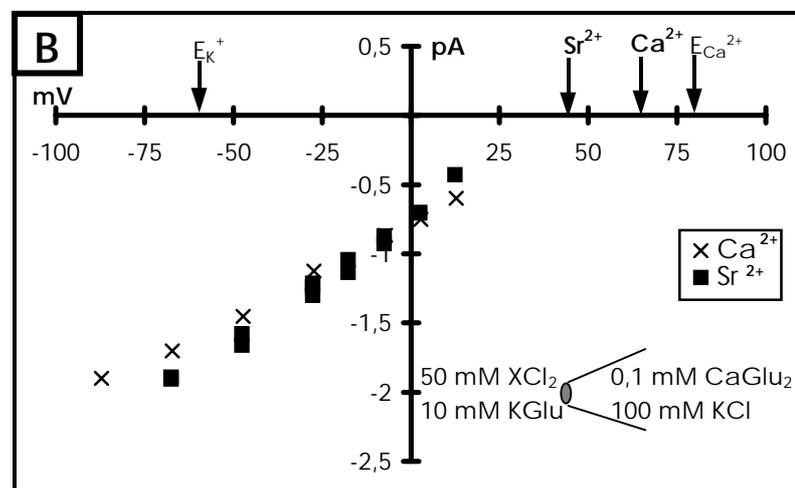
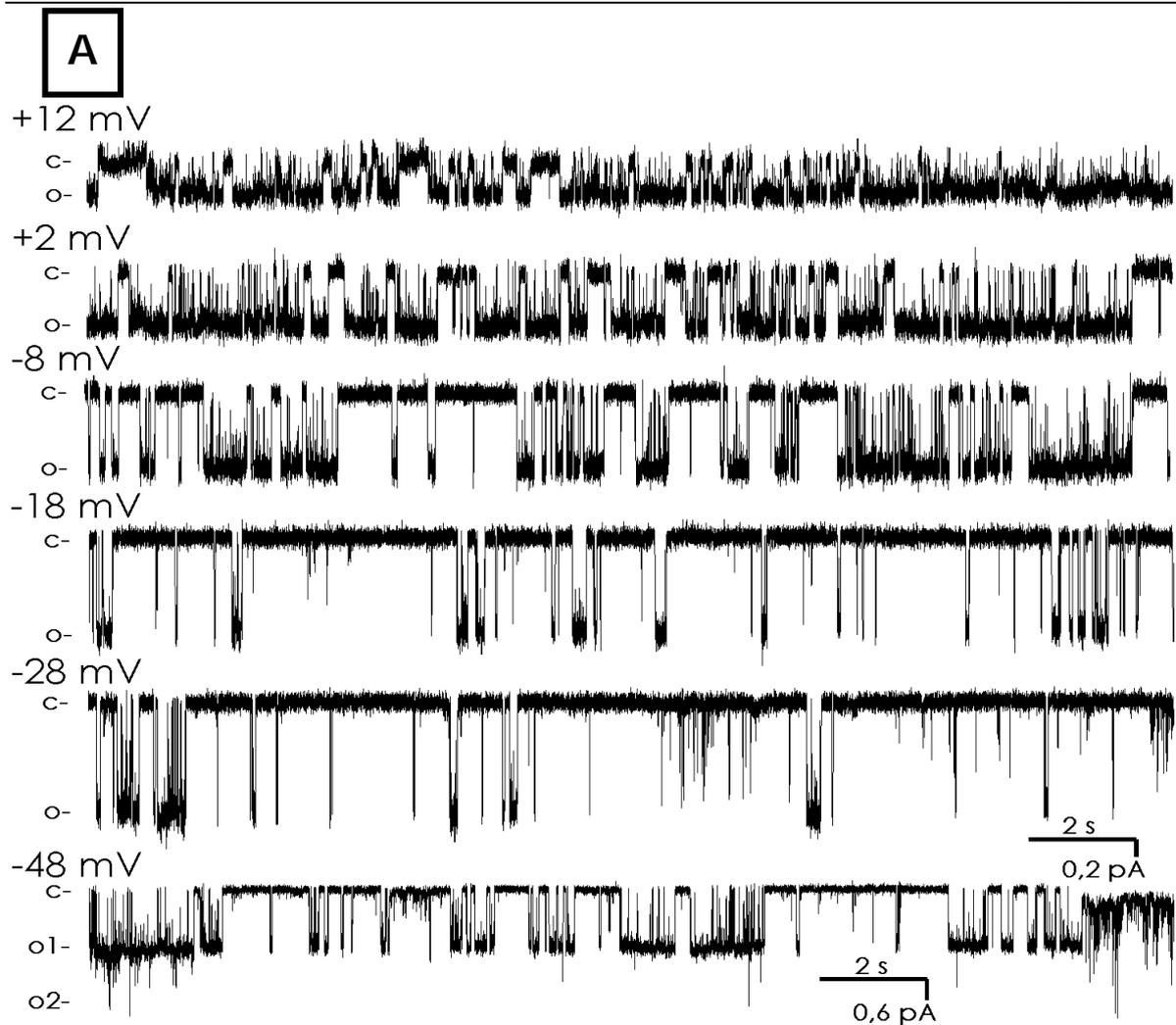


Abb. 4.36:  $\text{Sr}^{2+}$  als Ladungsträger.

A: Kanalereignisse des hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals während einer  $cI$ -Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L.

B: Strom-Spannungs-Kennlinie des hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals.

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KCl; 0,1 mM  $\text{CaGlu}_2$  und 1 mM  $\text{MgGlu}_2$  (pH 7,2).

Bad (x): 10 mM KGlu, 50 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM  $\text{MgGlu}_2$  (pH 7,2).

Bad (■): 10 mM KGlu, 50 mM  $\text{SrCl}_2$  und 1 mM  $\text{MgGlu}_2$  (pH 7,2).

Die Gleichgewichts-Potentiale für  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  lagen bei -59 und +79,5 mV.

#### 4.3.2.4 Hemmung durch Ionenkanalblocker auf der vakuolären Seite

##### Lanthan ( $\text{La}^{3+}$ )

Zur weiteren Charakterisierung des hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals wurde die Permeabilität für dreiwertige Kationen aus der Gruppe der Lanthanoiden untersucht. Das  $\text{La}^{3+}$ -Kation gilt als  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker in tierischen und pflanzlichen Zellen (HILLE 1992, PINEROS & TESTER 1995). Im Bereich von  $0,1 \mu\text{M}$  bis  $1 \text{mM}$  konnte für  $\text{La}^{3+}$  eine dosisabhängige Hemmung festgestellt werden (s. Abb. 4.37B), wenn es auf der vakuolären Seite appliziert wurde. Die Konzentration von  $1 \text{mM}$  führte zum vollkommenen Ausfall der Öffnungsereignisse. Niedrigere Konzentrationen führten zum teilweisen Ausfall der Öffnungsereignisse und dem vermehrten Auftreten von Offenzuständen geringerer Leitfähigkeit. Die Hemmung durch  $\text{La}^{3+}$  war reversibel, so daß nach dem Auswaschen wieder fast normale Öffnungsereignisse beobachtet werden konnten (s. Abb. 4.37C). Die halbmaximale Konzentration ( $K_{1/2}$ ) zur Hemmung der Offenwahrscheinlichkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals wurde unter den vorgegebenen Bedingungen auf  $8 \mu\text{M}$  abgeschätzt (s. Abb. 4.37D).

##### Gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ )

$\text{Gd}^{3+}$  ist ein weiteres Kation aus der Gruppe der Lanthanoiden, welches zur spezifischen Hemmung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen verwendet wird. So konnten ALLEN & SANDERS (1994) an Vakuolen von Schließzellen an *Vicia faba* L. eine dosisabhängige Hemmung ( $K_{1/2} = 10,3 \mu\text{M}$ ) auf der vakuolären Seite eines einwärtsrichtenden  $27 \text{pS}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals zeigen. Bei *Z. mays* L. Vakuolen wurden  $100 \mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  auf vakuolärer Seite getestet. Abbildung 4.38 zeigt die Einwirkung des  $\text{Gd}^{3+}$  auf das Öffnungsverhalten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals.  $\text{Gd}^{3+}$  bewirkt eine leichte Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit (13 %) durch eine Abnahme der Offenzeiten. Auch konnte ein vermehrtes Auftreten von Offenzuständen geringerer Leitfähigkeit beobachtet werden.

##### Zink ( $\text{Zn}^{2+}$ )

$\text{Zn}^{2+}$  ist ein Kation der II. Nebengruppe und wird zur Hemmung von Ionenkanälen verwendet. JOHANNES et al. (1992) konnten an tonoplastenangereicherten Mikrosomen von *Beta vulgaris* L. eine dosisabhängige Hemmung ( $K_{1/2} = 327 \mu\text{M}$ ) des spannungssensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstroms auf der zytoplasmatischen Seite feststellen. An

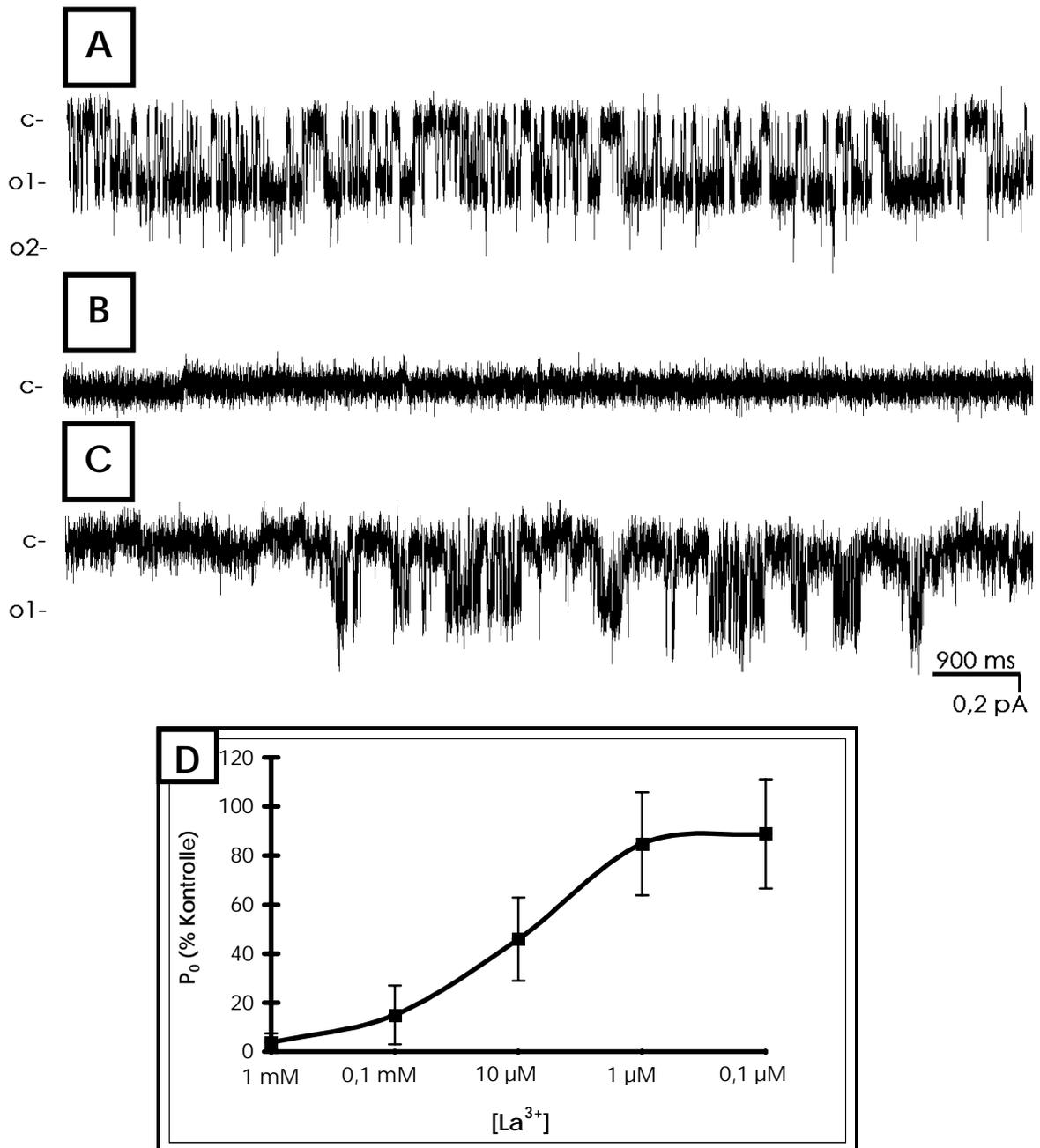


Abb. 4.37: Hemmung des hochselektiven Ca<sup>2+</sup>-Kanals durch La<sup>3+</sup>.

A) Kanalereignisse einer *c*-Messung bei -28 mV als Kontrolle vor der Zugabe von La<sup>3+</sup>.

B) Zugabe von 1 mM La<sup>3+</sup> in das Bad (vakuoläre Seite) blockierte den Ca<sup>2+</sup>-Kanal vollkommen.

C) Kanalereignisse nach dem Auswaschen des La<sup>3+</sup>.

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM K<sub>2</sub>Glu; 0,1 mM CaGlu<sub>2</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,2).

Bad: 10 mM K<sub>2</sub>Glu, 50 mM CaGlu<sub>2</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 5,6).

D) Dosis-Wirkungskurve der Hemmung der Offenwahrscheinlichkeit (P<sub>0</sub>) des hochselektiven Ca<sup>2+</sup>-Kanals durch La<sup>3+</sup> auf der vakuolären Seite.

*Z. mays* L. Vakuolen wurde die Konzentration von 1 mM  $Zn^{2+}$  auf der vakuolären Seite getestet. Abbildung 4.39 zeigt eine deutliche Hemmung von 80 % der Offenwahrscheinlichkeit des  $Ca^{2+}$ -Kanals. Die Hemmung war reversibel.

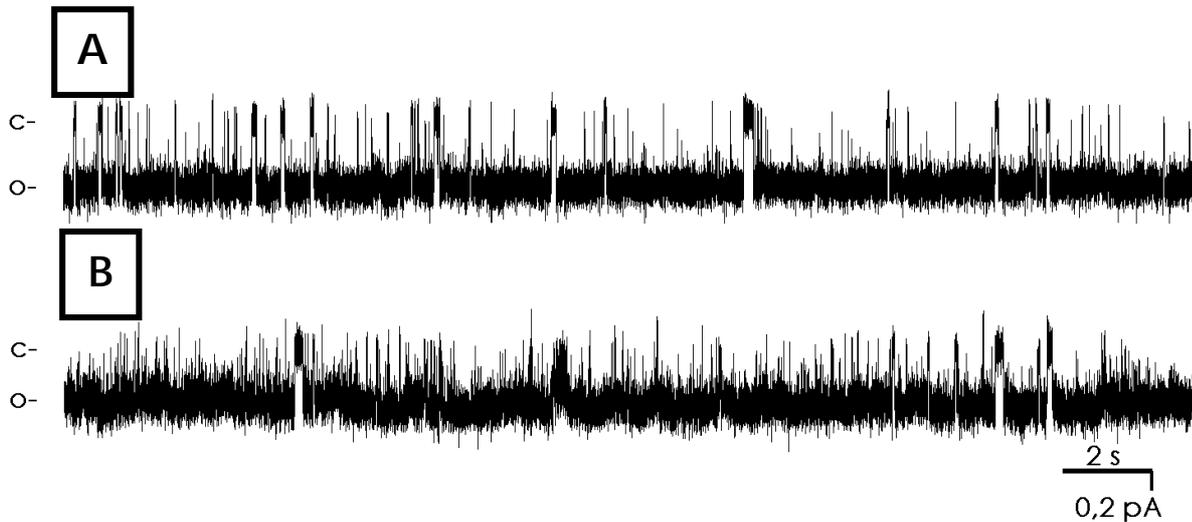


Abb. 4.38: Hemmung des hochselektiven  $Ca^{2+}$ -Kanals durch  $Gd^{3+}$ .

A) Kanalereignisse einer *c*-Messung bei -28 mV als Kontrolle vor der Zugabe von  $Gd^{3+}$ .

B) Die Zugabe von 0,1 mM  $Gd^{3+}$  in das Bad blockierte den  $Ca^{2+}$ -Kanal. Die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals wurde durch  $Gd^{3+}$  um  $13\% \pm 12\%$  reduziert.

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KGlu; 0,1 mM  $CaGlu_2$  und 1 mM  $MgCl_2$  (pH 7,2).

Bad: 10 mM KGlu, 50 mM  $CaGlu_2$  und 1 mM  $MgCl_2$  (pH 7,2).

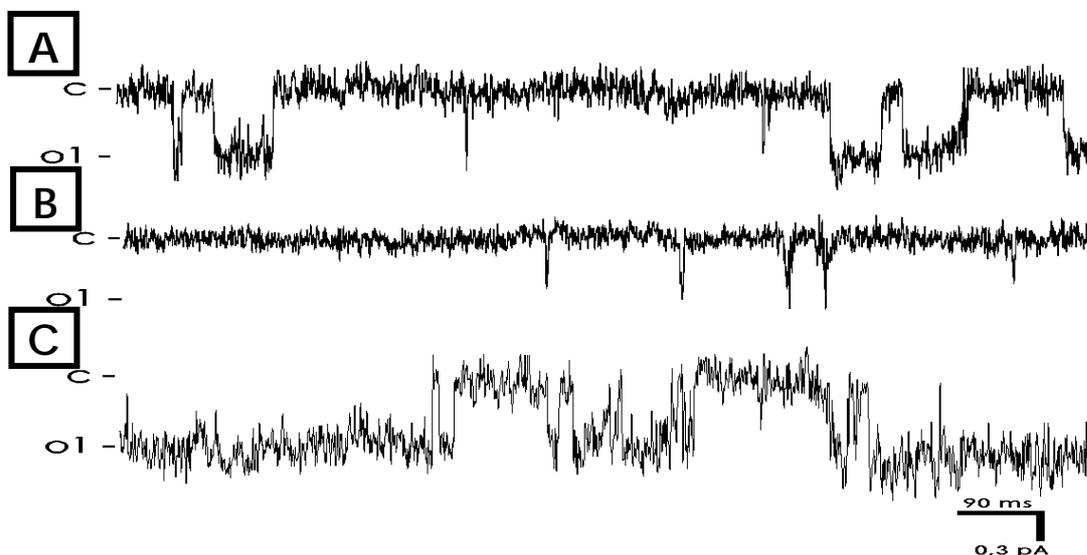


Abb. 4.39: Hemmung des hochselektiven  $Ca^{2+}$ -Kanals durch  $Zn^{2+}$ .

A) Kanalereignisse einer *c*-Messung bei -28 mV als Kontrolle vor der Zugabe von  $Zn^{2+}$ .

B) Zugabe von 1 mM  $Zn^{2+}$  in das Bad blockierte den  $Ca^{2+}$ -Kanal.

C) Kanalereignisse nach dem Auswaschen von  $Zn^{2+}$ .

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KGlu; 0,1 mM  $CaGlu_2$  und 1 mM  $MgCl_2$  (pH 7,2).

Bad: 10 mM KGlu, 50 mM  $CaGlu_2$  und 1 mM  $MgCl_2$  (pH 5,6).

### 4.3.3 Ein durch Ryanodin aktivierbarer Ionenkanal

Vakuolensuspensionen von *Z. mays* L. setzten nach der Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin  $\text{Ca}^{2+}$  frei (Abb. 4.10). Um den für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung verantwortlichen Ionenkanal zu charakterisieren, wurden Versuche in der *wv*- und *co*-Konfiguration unternommen.

Der Strom durch den Tonoplasten von *Z. mays* L.-Vakuolen wurde im *wv*-Modus bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf der zytoplasmatischen Seite von einem schnell aktivierbaren Ionenkanal mit einer Leitfähigkeit von 19 pS getragen (s. Kap. 4.3.1 und Abb. 4.40 oben). Wurden unter diesen Bedingungen dem Bad (sprich zytoplasmatische Seite) 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin zugesetzt, so war eine Zunahme des Stromes durch den Tonoplasten sowohl bei negativen als auch bei positiven Haltepotentialen zu beobachten (s. Abb. 4.40 unten).

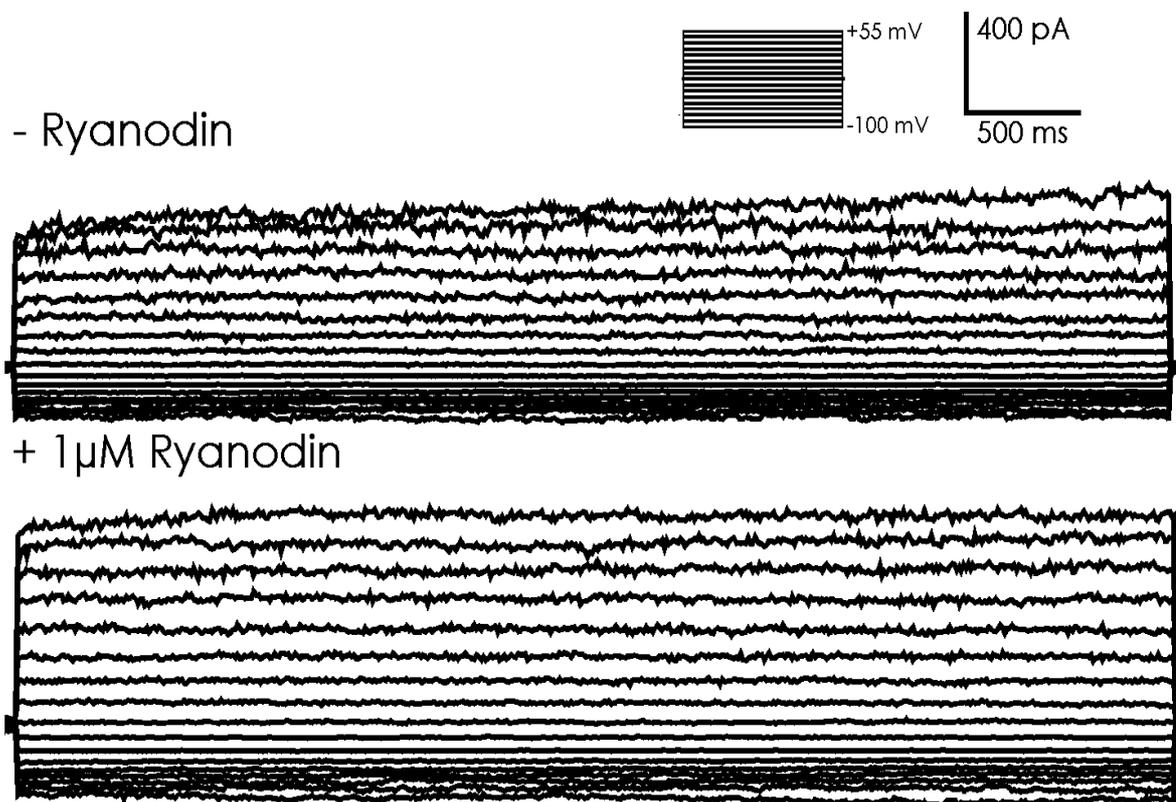


Abb. 4.40: Der Ryanodin-induzierbare Strom.

Der Einfluß von 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin auf den Strom durch den Tonoplasten einer Vakuole (45  $\mu\text{m}$ ) aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. bei Spannungsschritten von +55 bis -100 mV. Messung in der *wv*-Konfiguration.

Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 10 mM KGlu, 5 mM CaGlu<sub>2</sub>, pH 5,2.

Bad: 100 mM KGlu, 1  $\mu\text{M}$  CaGlu<sub>2</sub>, pH 7,4.

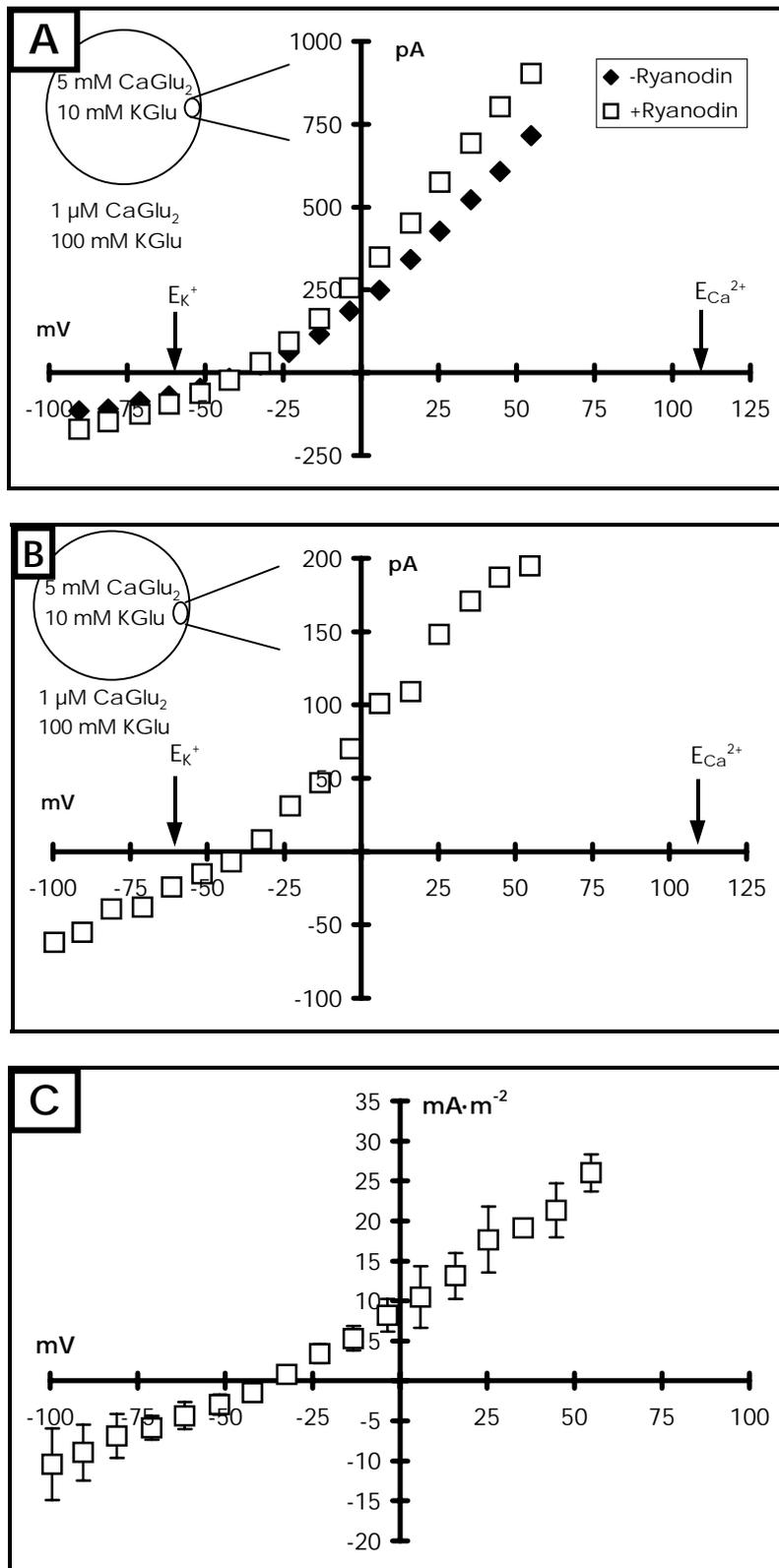


Abb. 4.41: Der Ryanodin-induzierbare Differenzstrom.

A: Die Strom-Spannungs-Kennlinien der Messung aus Abb. 4.40.

B: Die Differenz der Strom-Spannungs-Kennlinien der Messung aus Abb. 4.40.

C: Die Stromdichte (mA·m<sup>-2</sup>) des Ryanodin-aktivierbaren Stromes durch den Tonoplasten von Vakuolen aus *Z. mays* L. Koleoptil-Protooplasten. Messungen in der *ww*-Konfiguration (n = 4). Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.40 angegeben.

Wurde der Strom durch den Tonoplasten vor und nach Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin gegenüber der Spannung aufgetragen, so zeigte die Strom-Spannungskennlinie (s. Abb. 4.41A) eine Steigerung des Gesamtstroms. Wurde der Strom durch den Tonoplasten vor der Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin vom Strom durch den Tonoplasten nach der Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin substrahiert, so zeigte der daraus resultierende Differenzstrom ein Umkehrpotential von -38 mV ( $\pm 4$  mV, s. Abb. 4.41B). Unter der Annahme, daß der durch Ryanodin aktivierbare Ionenstrom für Glukonat-Ionen keine Permeabilität besitzt, ergab sich unter Verwendung von Gleichung (23) für den Ionenstrom eine Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  über  $\text{K}^+$  von 0,8. Der durch 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin induzierte Strom betrug hierbei bei -80 mV durchschnittlich -10  $\text{mA}\cdot\text{m}^{-2}$ , bzw. +26  $\text{mA}\cdot\text{m}^{-2}$  bei +55 mV (s. Abb. 4.41C). Da das Umkehrpotential des durch Ryanodin aktivierbaren Ionenstroms unter den vorgegebenen Bedingungen sich nicht signifikant vom Umkehrpotential des schnell aktivierbaren Ionenkanals (-37,8 mV,  $\pm 0,9$  mV, s. Kap. 4.3.1) unterschied, könnte es sich somit um eine durch Ryanodin verursachte Aktivierung des schnell aktivierbaren Ionenkanals oder um die Aktivierung eines weiteren Ionenkanals mit gleichen Umkehrpotential handeln.

Um nachzuweisen, daß der durch Ryanodin aktivierbare Differenzstrom durch den Tonoplasten durch einen spezifischen Ionenkanal verursacht wurde, wurden Versuche in der *co*-Konfiguration unternommen. Um eine spannungsabhängige Aktivierung des durch Ryanodin aktivierbaren Ionenkanals darstellen zu können wurde das Haltepotential in Spannungsschritten von +55 bis -100 mV verändert. Abbildung 4.42 zeigt neben der Aktivierung des schnell aktivierbaren Ionenkanals mit der Leitfähigkeit von 19 pS im Kontrollversuch (s. Abb. 4.42, linke Seite) nach Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin die Aktivierung eines weiteren Ionenkanals mit größerer Leitfähigkeit, sowohl bei positiven als auch bei negativen Haltepotentialen (s. Abb. 4.42, rechte Seite). Übereinstimmende Ergebnisse unter Verwendung von Pulsprotokollen, d. h. schnelle Öffnungsereignisse ohne klar erkennbare Amplitude konnten auch MUIR et al. (1997) am Tonoplasten von *B. vulgaris* L. zeigen. In vereinzelt Messungen konnten jedoch auch bei kontinuierlicher Veränderung des Haltepotentials diskrete Öffnungsereignisse des durch Ryanodin aktivierbaren Ionenkanals beobachtet werden (s. Abb. 4.43). Der durch Ryanodin aktivierbare Ionenkanal hatte unter den vorgegebenen Bedingungen eine Leitfähigkeit von

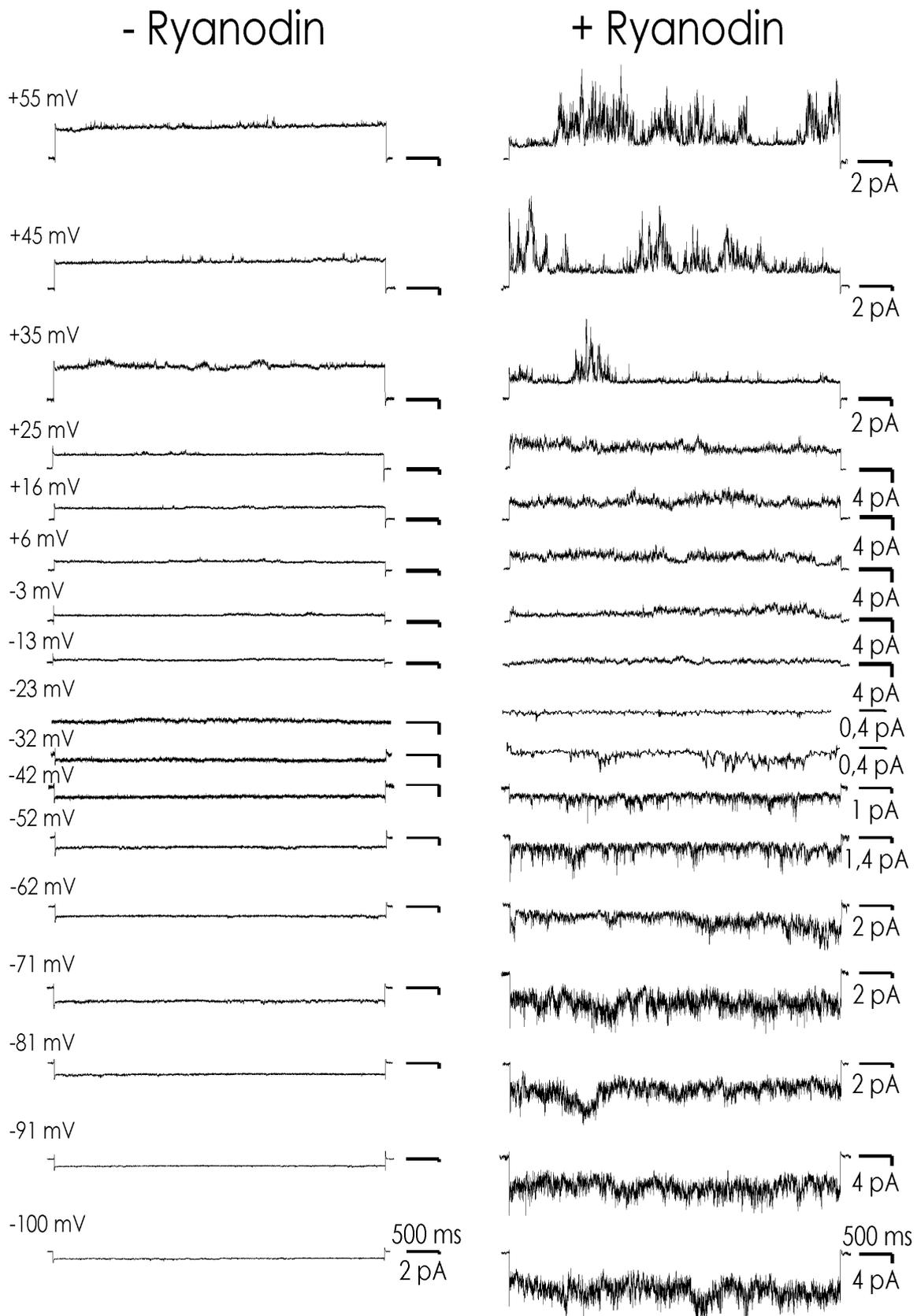


Abb. 4.42: Der Ryanodin-aktivierbare Ionenkanal. Die Aktivierung des Ionenkanals durch 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin bei Spannungsschritten von +55 bis -100 mV einer *co*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.40 angegeben.

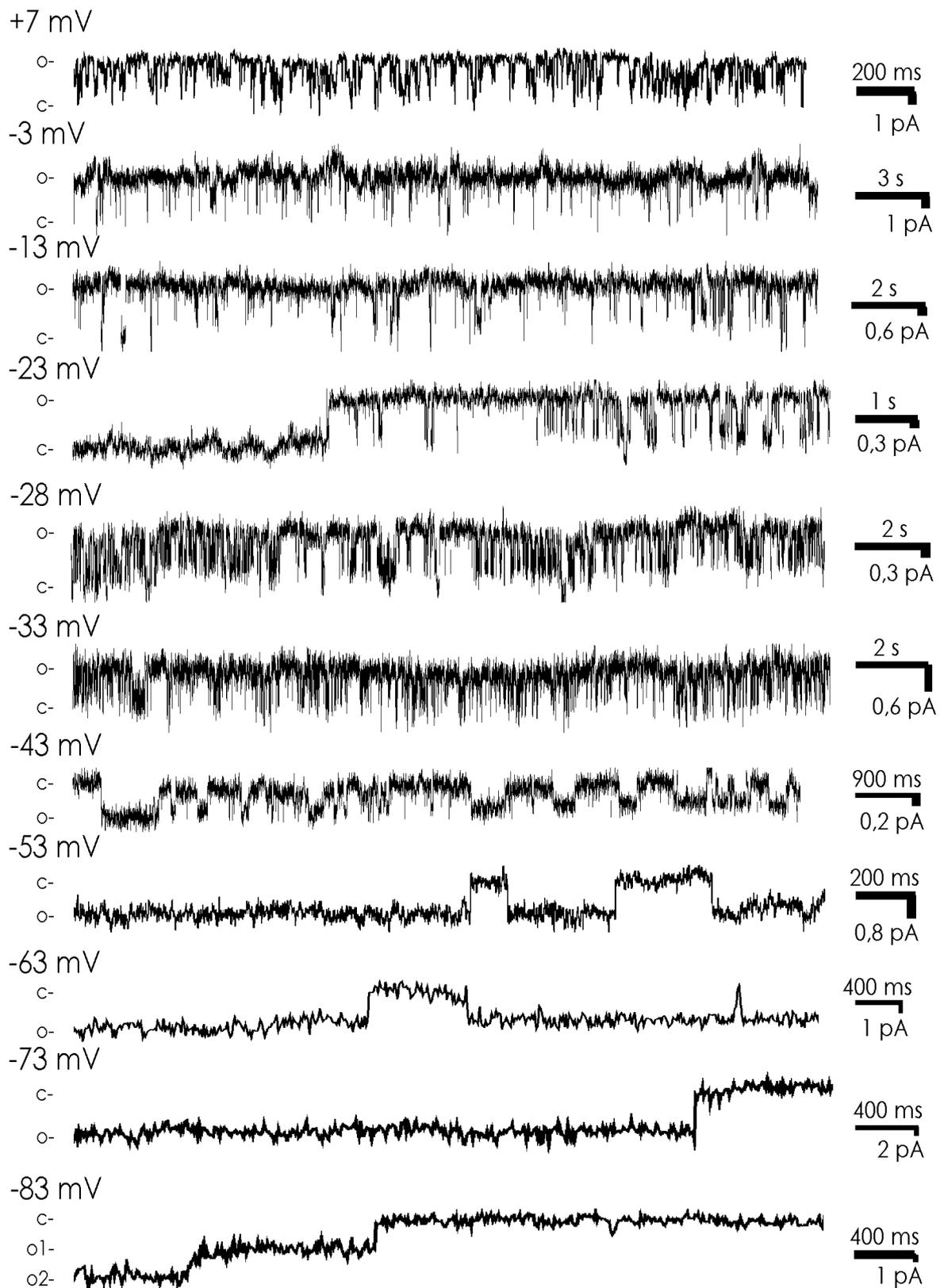


Abb. 4.43: Der Ryanodin-aktivierbare Ionenkanal. Kanäleereignisse des durch Ryanodin aktivierbaren Ionenkanals bei kontinuierlicher Veränderung des Haltepotentials aus *co*-Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.40 angegeben.

durchschnittlich 122 pS, bei einem Umkehrpotential von 38,2 mV ( $\pm 1,8$  mV, s. Abb. 4.44). Somit stimmte das Umkehrpotential der Einzelkanalanalyse mit dem Umkehrpotential der Gesamtstromanalyse überein. Unter der Annahme, daß der durch Ryanodin aktivierbare Ionenkanal für Glukonat-Ionen keine Permeabilität besitzt, errechnete sich unter Verwendung von Gleichung (23) eine Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  über  $\text{K}^+$  von 0,8. Trotz der nicht bedeutenden Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  über  $\text{K}^+$ , ermöglichte der Ryanodin-aktivierbare Ionenkanal bei einem über dem Tonoplasten vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten (Vakuole [mM], Zytoplasma [ $\mu\text{M}$ ], s. Abb. 4. 10) einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport durch den Tonoplasten.

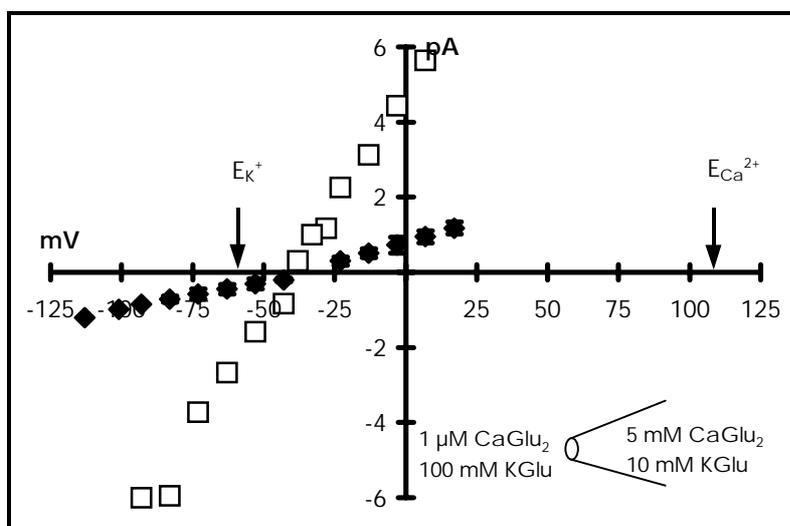


Abb. 4.44: Der Ryanodin-aktivierbare Ionenkanal.

Die Strom-Spannungs-Kennlinie des durch Ryanodin aktivierbaren Ionenkanals von Messungen am Tonoplasten aus Koeoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. in der *co*-Konfiguration. Zum besseren Vergleich wurde die Strom-Spannungs-Kennlinie des schnell aktivierbaren Ionenkanal (19 pS,  $\blacklozenge$ ) gegenüber der Strom-Spannungs-Kennlinie des Ryanodin-aktivierbaren Ionenkanal (122 pS,  $\square$ ) aufgetragen. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 8 ( $\blacklozenge$ ) und 5 ( $\square$ ) Messungen. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.40 angegeben.

#### 4.3.3.1 Aktivierung durch zyklische ADP-Ribose

Zyklische Adenosin-Diphosphat-Ribose (cADPR) gilt neben  $\text{InsP}_3$  mittlerweile als weiterer intrazellulärer Botenstoff der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signaltransduktion. So konnten CLAPPER et al. (1987) und GALIONE et al. (1991) an Seeigel-Eier-Homogenat eine durch cADPR induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nachweisen. Eine cADPR-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung konnte bisher nicht nur im Tierreich sondern auch an pflanzlichen Vakuolen von *B. vulgaris* L. demonstriert werden (ALLEN et al. 1995). Als Mechanismus der cADPR induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wird hierbei die Aktivierung

des Ryanodin-Rezeptor-Komplexes durch Bindung an eine Rezeptor-Untereinheit betrachtet (WALSETH et al. 1993, GALIONE & SUMMERHILL 1995). Abbildung 4.45 zeigt neben der Aktivierung des schnell aktivierbaren Ionenkanals mit der Leitfähigkeit von 19 pS im Kontrollversuch nach Applikation von 1  $\mu\text{M}$  cADPR die Aktivierung eines weiteren Ionenkanals mit größerer Leitfähigkeit sowohl bei positiven als auch bei negativen Haltepotentialen. Die Analogie der schnellen Öffnungsereignisse ohne klar erkennbare Amplitude und die vom Haltepotential abhängige Umkehr der Amplituden ließ die Vermutung zu, daß es sich hier um eine cADPR-abhängige Aktivierung des durch Ryanodin aktivierbaren Ionenkanals handelte (s. Abb. 4.45).

#### 4.3.3.2 Hemmung durch Ruthenium Rot

Ruthenium Rot gilt neben  $\text{Mg}^{2+}$  und Procain als spezifischer Antagonist der Ryanodin- und cADPR-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (MEISSNER et al. 1986, GALIONE et al. 1991). ALLEN et al. (1995) konnten mit 100  $\mu\text{M}$  Ruthenium Rot auf der zytoplasmatischen Seite in der *co*-Konfiguration an pflanzlichen Vakuolen von *B. vulgaris* L. eine Hemmung der durch cADPR aktivierten Öffnungsereignisse demonstrieren.

Bei *Z. mays* L. Vakuolen wurden die Konzentrationen von 1 und 100  $\mu\text{M}$  Ruthenium Rot auf der zytoplasmatischen Seite getestet. Abbildung 4.46 zeigt die Einwirkung von 100  $\mu\text{M}$  Ruthenium Rot auf das Öffnungsverhalten des durch Ryanodin aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in der Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin. Ruthenium Rot bewirkte einen kompletten Ausfall der Öffnungsereignisse.

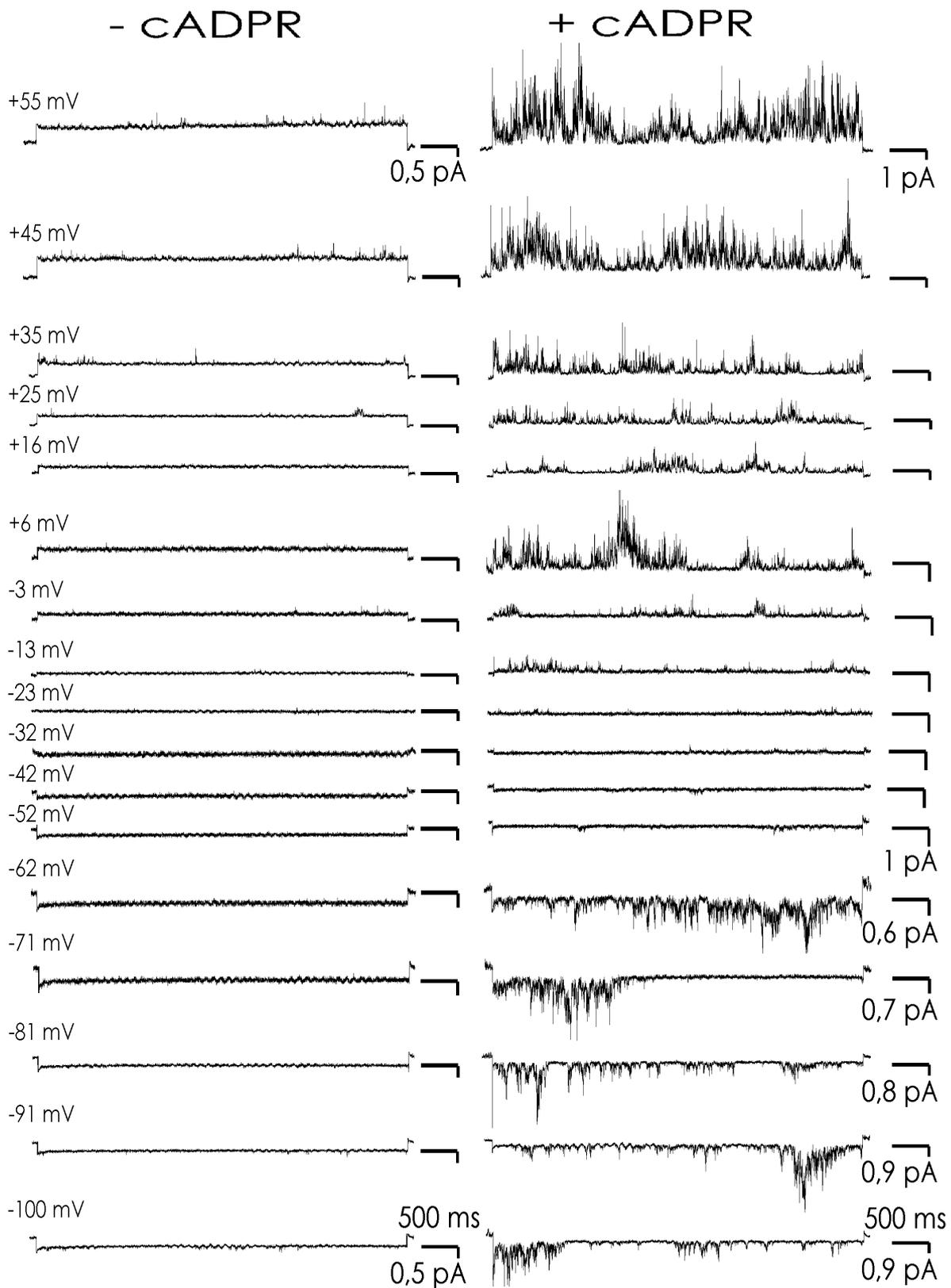


Abb. 4.45: Aktivierung des Ryanodin-aktivierbaren Ionenkanals durch cADPR. Die Aktivierung eines Ionenkanals durch 1  $\mu$ M cADP-Ribose bei Spannungsschritten von +55 bis -100 mV einer *co*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.40 angegeben.

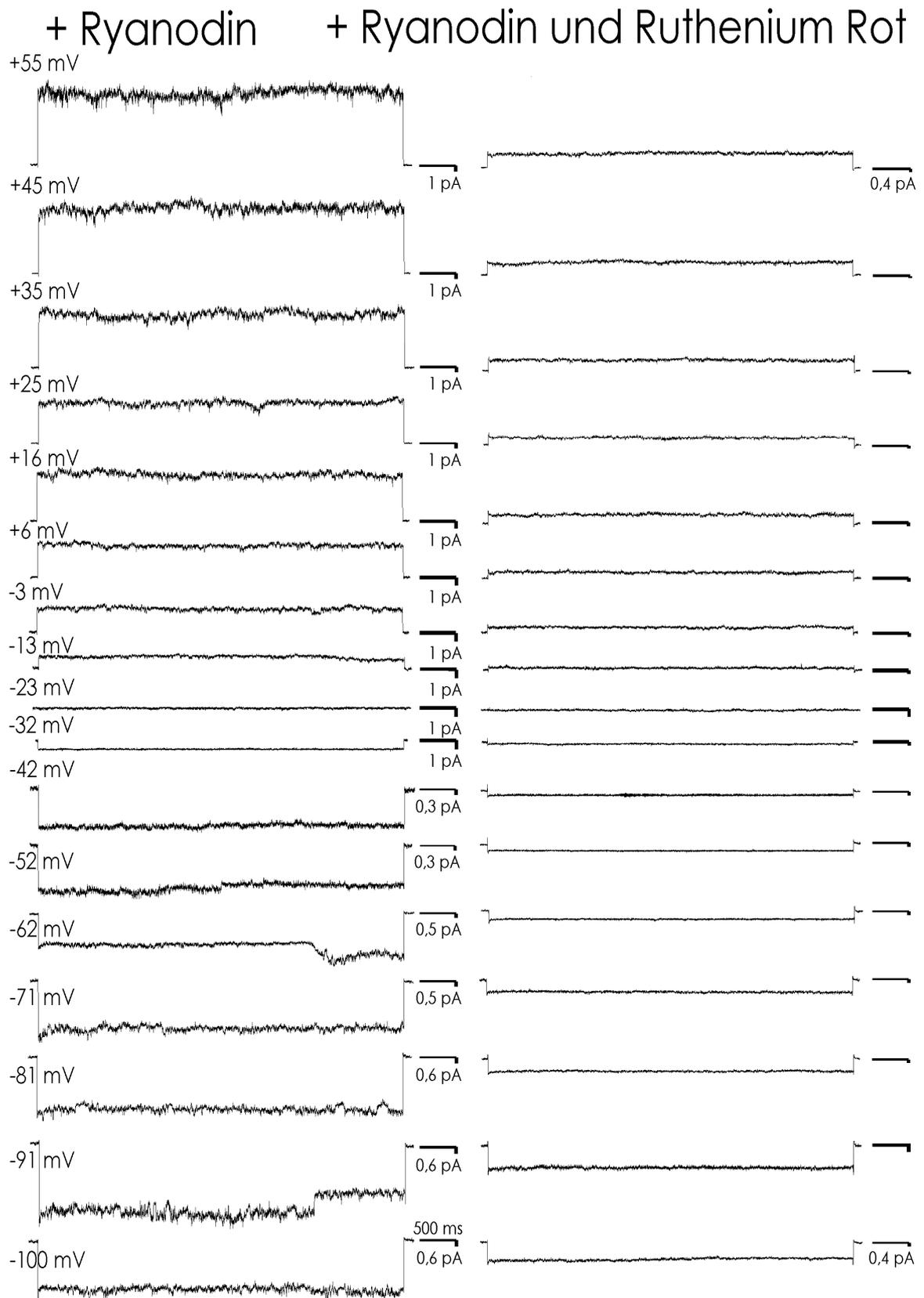


Abb. 4.46: Hemmung des Ryanodin-aktivierbaren Ionenkanals.

Die Hemmung des durch Ryanodin ( $1 \mu\text{M}$ ) aktivierten Ionenkanals durch  $100 \mu\text{M}$  Ruthenium-Rot bei Spannungsschritten von +55 bis -100 mV einer *co*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.40 angegeben.

#### 4.3.4 Ein Ionenkanal mit 37 pS Leitfähigkeit

##### 4.3.4.1 Symmetrische und asymmetrische KCl-Konzentration

Bei Messungen mit symmetrischen KCl-Konzentrationen (100 mM KCl) auf zytoplasmatischer (Pipette) und vakuolärer Seite (Bad) zeigte sich ein weiterer Ionenkanal mit einer Leitfähigkeit von 37 pS (Symbol: ●, Abb. 4.47). Der Ionenkanal wies ein ohmsches Verhalten auf, wobei das Umkehrpotential erwartungsgemäß bei 0 mV lag. Die Öffnungsereignisse (s. Abb. 4.48) zeigen ein typisches Merkmal des Ionen-

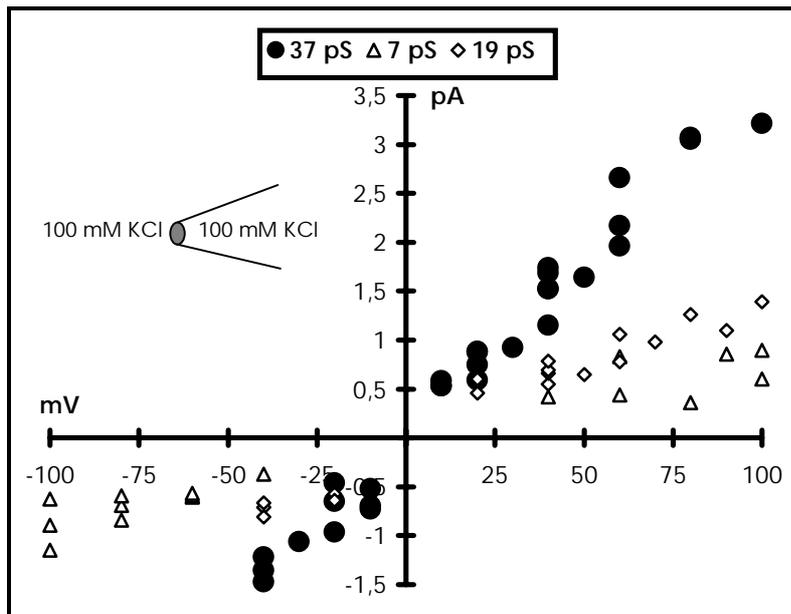


Abb. 4.47: Symmetrische KCl-Konzentration.

Die Strom-Spannungs-Kennlinien von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. in der *ci*-Konfiguration. Die Stromamplituden des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit (●) wurden gegen die Haltepotentiale aufgetragen. Zum Vergleich sind die Strom-Spannungs-Kennlinien der Ionenkanäle mit 7 pS (Δ) und 19 pS (◇) dargestellt. Die Ionenkonzentrationen waren 100 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 mM MgCl<sub>2</sub> in der Pipette (pH 7,2) und im Bad (pH 7,2).

kanals unter den vorgegebenen Bedingungen: Im negativen Spannungsbereich (s. -40 mV) zeichnete sich der Ionenkanal durch gehäufte Offenzustände innerhalb langer Geschlossenzustände aus (s. Abb. 4.48). Es zeigten sich keine diskreten Öffnungen des Ionenkanals. Vielmehr waren die Öffnungszeiten durch schnelle An- und Ausschalt ereignisse unterbrochen. Auch sehr kurze Öffnungen, welche sich den gehäufte Offenzustände anschlossen (sog. Nachereignisse) waren zu erkennen. Dieses Verhalten spiegelte sich in den Offenzeiten des Ionenkanals deutlich wieder (s. Abb. 4.49). Im positiven Spannungsbereich änderte sich das Öffnungs-

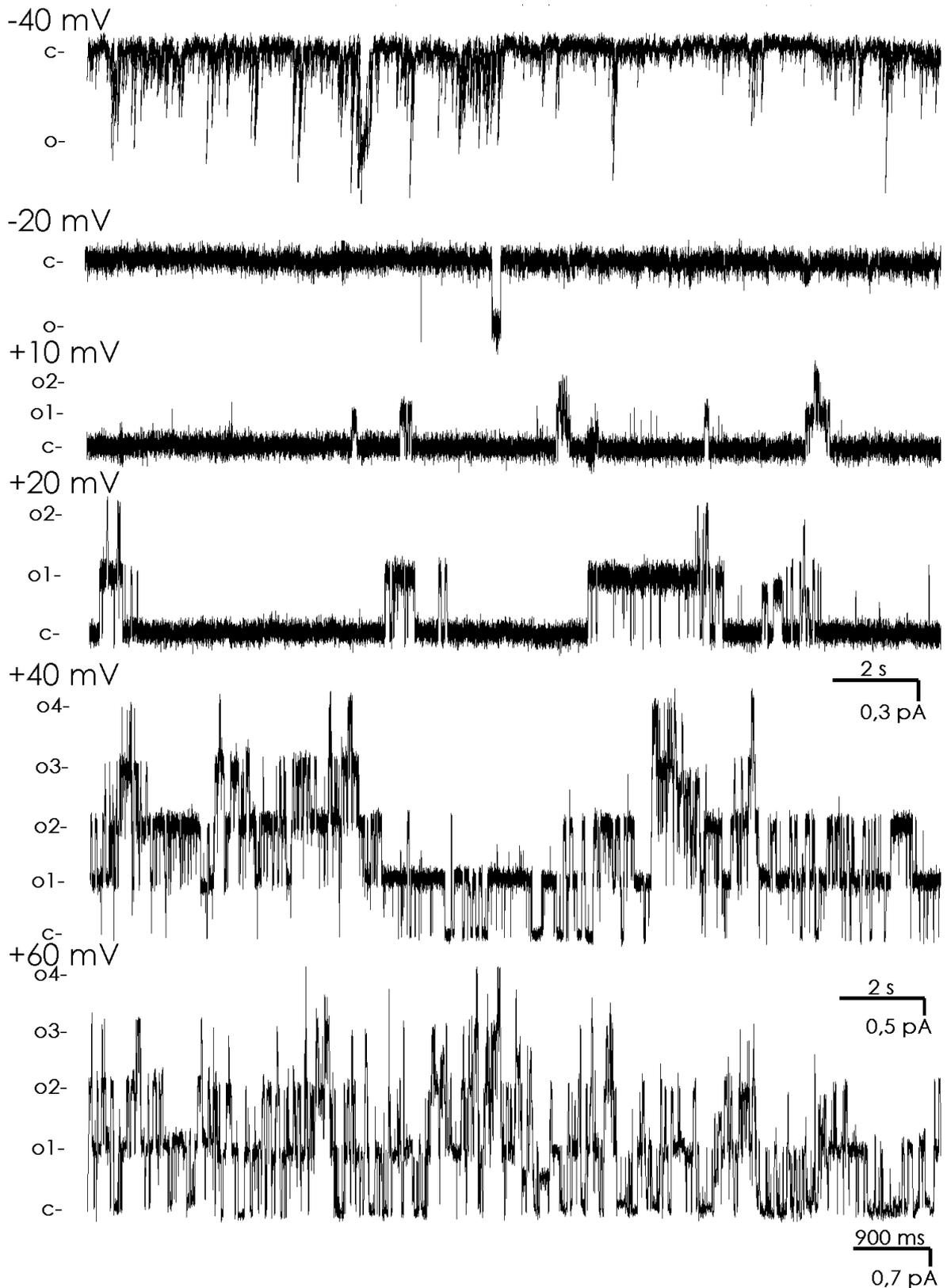


Abb. 4.48: Symmetrische KCl-Konzentration. Kanaleignisse des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit bei den indizierten Spannungen einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Ionenkonzentrationen wie in Abb. 4.47 angegeben.

verhalten des Ionenkanals grundlegend. Es zeigten sich diskrete Öffnungen die eine Dauer von 500 ms überschreiten konnten. Eine weitere Spannungserhöhung im positiven Bereich zeigte eine deutliche Aktivierung des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit, was sich durch die Ausbildung des zwei- bis fünffachen Amplitudenmaximums als Summe des Einzelmaximums darstellt. Der Ionenkanal zeigte somit in der *c*-Konfiguration die Eigenschaften eines spannungsabhängigen Ionenkanals, der durch die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit vornehmlich im positiven Spannungsbereich öffnete.

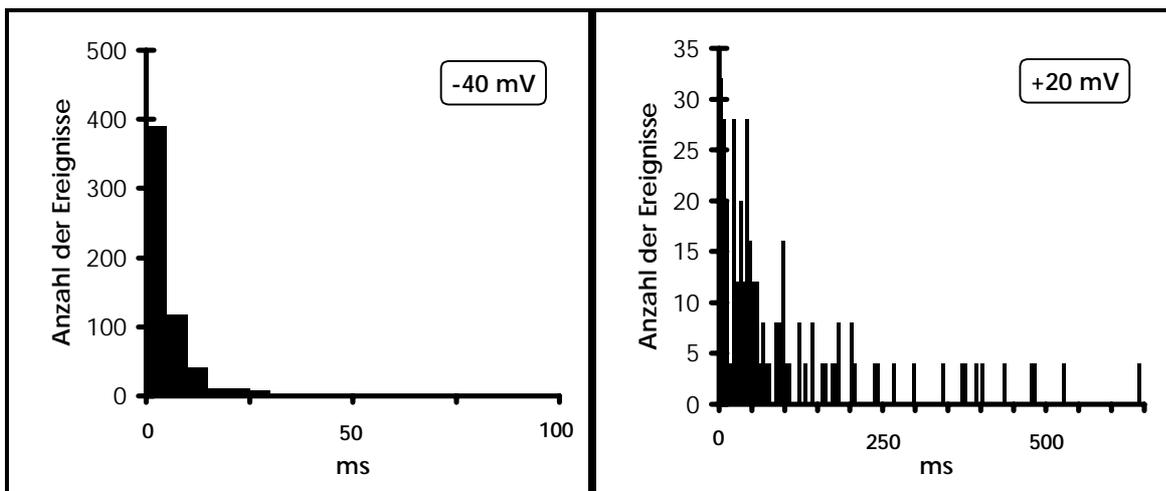


Abb.: 4.49: Symmetrische KCl-Konzentration.

Offenzeiten des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit bei einer Haltespannung von -40 mV und +20 mV während einer *c*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L.

Ionenkonzentrationen wie in Legende Abb. 4.47 angegeben.

Unter Verwendung asymmetrischer KCl-Konzentrationen in Pipette und Bad wurden Messungen zur Identifizierung der unterschiedlichen Selektivitäten des Ionenkanals unternommen. Für den Ionenkanal mit 37 pS Leitfähigkeit zeigte sich mit einem Umkehrpotential von -36,1 mV eine Verschiebung in Richtung des Gleichgewichtspotential für  $K^+$  (s. Abb. 4.50B). Nach Gleichung (14) ergab sich somit eine Selektivität von  $K^+$  über  $Cl^-$  von 7. Diese Berechnung gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, daß  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  keinen Einfluß auf das Umkehrpotential hatten. Die Offenzeiten des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit zeigten sich gegenüber den Messungen unter symmetrischen KCl-Konzentrationen weitgehend unverändert (nicht gezeigt).

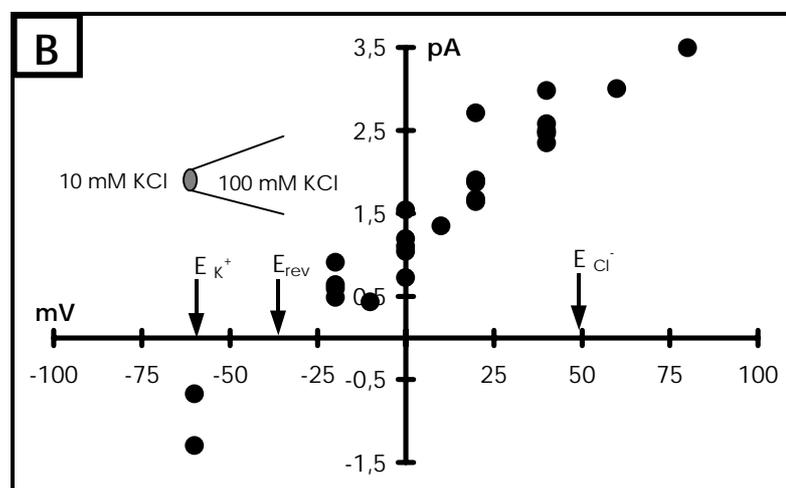
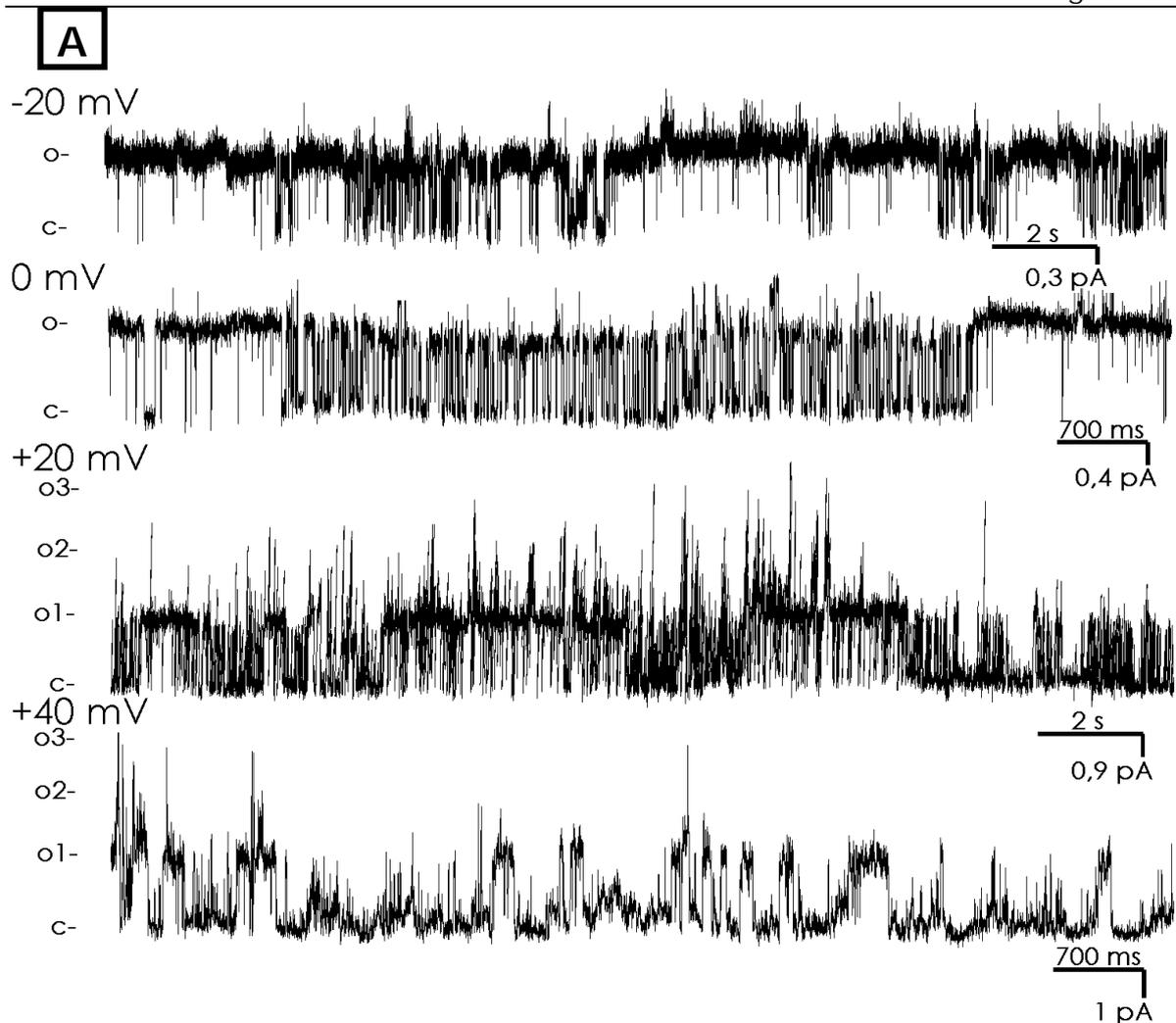


Abb. 4.50: Asymmetrische KCl-Konzentration.

A: Kanaleigenschaften des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit bei den indizierten Spannungen einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Die Ionenkonzentrationen waren 100 mM KCl, 1 mM  $CaCl_2$  und 2 mM  $MgCl_2$  in der Pipette (pH 7,2), sowie 10 mM KCl, 1 mM  $CaCl_2$  und 2 mM  $MgCl_2$  im Bad (pH 7,2).

B: Die Strom-Spannung-Kennlinie von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. in der *ci*-Konfiguration bei asymmetrischen KCl-Konzentrationen.

Das Gleichgewichts-Potential für  $K^+$  lag bei -59 mV, für  $Cl^-$  bei +49 mV.

#### 4.3.4.2 Selektivität für $\text{Ca}^{2+}$

Zur Identifikation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit wurde, nach Messungen mit symmetrischer oder asymmetrischer KCl-Konzentration, der Ionenkanal durch Badwechsel einer 50 millimolaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der vakuolären Seite unterworfen. Somit konnte der eventuell hemmende Effekt hoher vakuolärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen festgestellt werden. Abbildung 4.51A zeigt, daß die Öffnungseignisse sowohl bei negativen und positiven Haltepotentialen nur aus indiskreten flickernden Öffnungen bestanden. Die Strom-Spannungs-Kennlinie wies für den Ionenkanal von 37 pS Leitfähigkeit ein Umkehrpotential von -7,3 mV auf (Abb. 4.51B). Unter Verwendung von Gleichung (23) ergab sich somit eine Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  von 0,7. Wurde die relative Permeabilität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Cl}^-$  mit 7 berücksichtigt (Gleichung 26) verblieb der Wert bei 0,6.

#### 4.3.4.3 Selektivität für $\text{Na}^+$ und $\text{Rb}^+$

Zur Überprüfung der Permeabilität für  $\text{Na}^+$  wurden Versuche mit asymmetrischen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Konzentrationen in Bad und Pipette unternommen. Die Strom-Spannungs-Kennlinie zeigte, daß der Ionenkanal mit 37 pS Leitfähigkeit neben  $\text{K}^+$  auch  $\text{Na}^+$  transportierte. Bei der Berechnung der Selektivität wurde die relative Permeabilität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Cl}^-$  (s.o.) mit 7 berücksichtigt. Unter Anwendung der Gleichung (15) ließ sich mit einem Umkehrpotential von +3,7 mV (s. Abb. 4.52) für den Ionenkanal eine Selektivität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Na}^+$  von 1 errechnen.

Die Offenzeiten des Ionenkanales zeigten sich mit  $\text{Na}^+$  gegenüber den Messungen mit symmetrischen und asymmetrischen KCl-Konzentrationen unverändert (nicht gezeigt).

Wurde  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Rb}^+$  ausgetauscht, ergab sich für den Ionenkanal mit 37 pS Leitfähigkeit eine Permeabilität für  $\text{Rb}^+$ . Die Kanalereignisse (s. Abb. 4.53A) zeigten, daß  $\text{Rb}^+$  das Öffnungsverhalten des Ionenkanales gegenüber symmetrischen und asymmetrischen KCl-Konzentrationen nicht verändert. Wiederum waren kurze Öffnungszeiten bei negativen Haltepotentialen und verlängerte Offenzeiten mit diskreten Kanalöffnungen bei positiven Haltepotentialen zu erkennen. Auch die

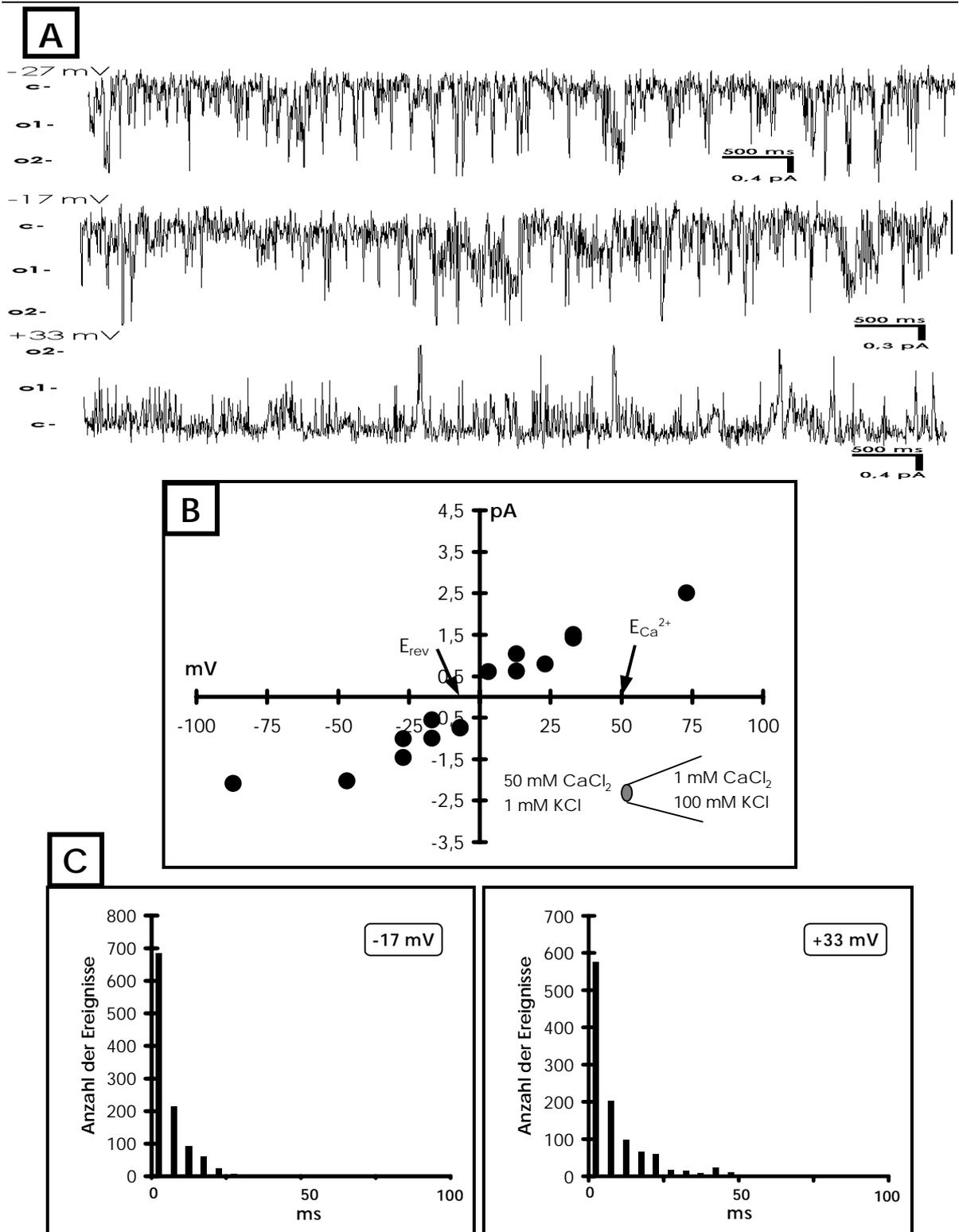


Abb. 4.51: Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ .

A: Kanalereignisse des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit bei den indizierten Spannungen einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Bad: 1 mM KCl, 50 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

B: Die Strom-Spannungs-Kennlinie des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit.

Die Gleichgewichts-Potentiale lagen bei +50 mV ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und -108 mV ( $\text{K}^+$ ).

C: Die Offenzeiten des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit bei einer Haltespannung von -17 mV und +33 mV während einer *ci*-Messung.

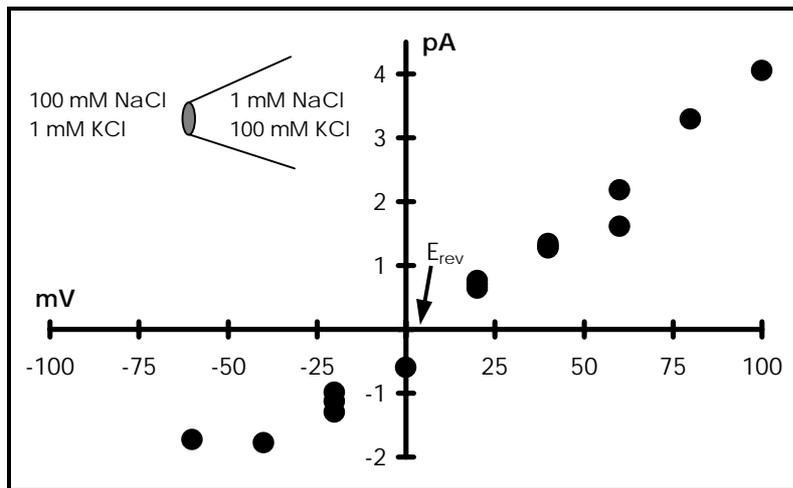


Abb. 4.52: Selektivität für  $\text{Na}^+$ .

Die Strom-Spannungs-Kennlinie des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. in der *ci*-Konfiguration. Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KCl, 1 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Bad: 1 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Die Gleichgewichts-Potentiale lagen bei +118 mV ( $\text{Na}^+$ ) und -118 mV ( $\text{K}^+$ ).

Leitfähigkeit blieb mit 37 pS von  $\text{Rb}^+$  unbeeinflusst, wobei das Umkehrpotential gegenüber den Bedingungen der asymmetrischen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Konzentrationen mit -3,2 mV bei  $\text{Rb}^+$  mehr in Richtung des Gleichgewichts-Potentials für  $\text{K}^+$  verschoben wurde (s. Abb. 4.53B). Unter Einbeziehung der relativen Permeabilität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Cl}^-$  mit 7 ergab sich für den Ionenkanal eine Selektivität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Rb}^+$  von 1,3.

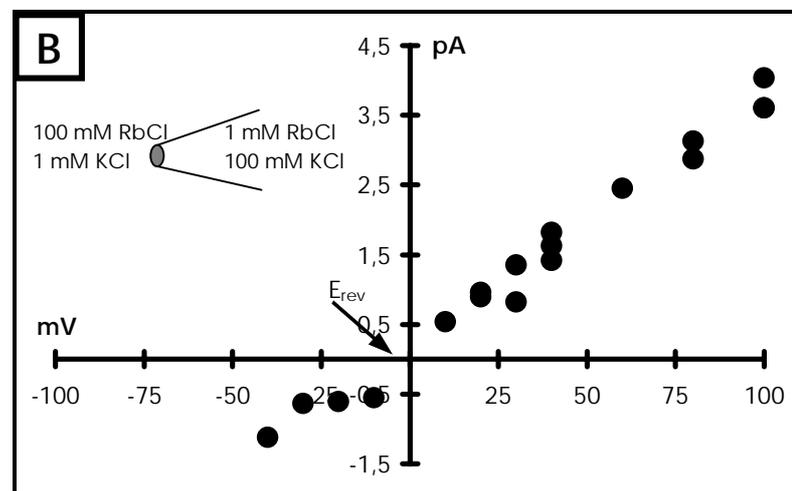
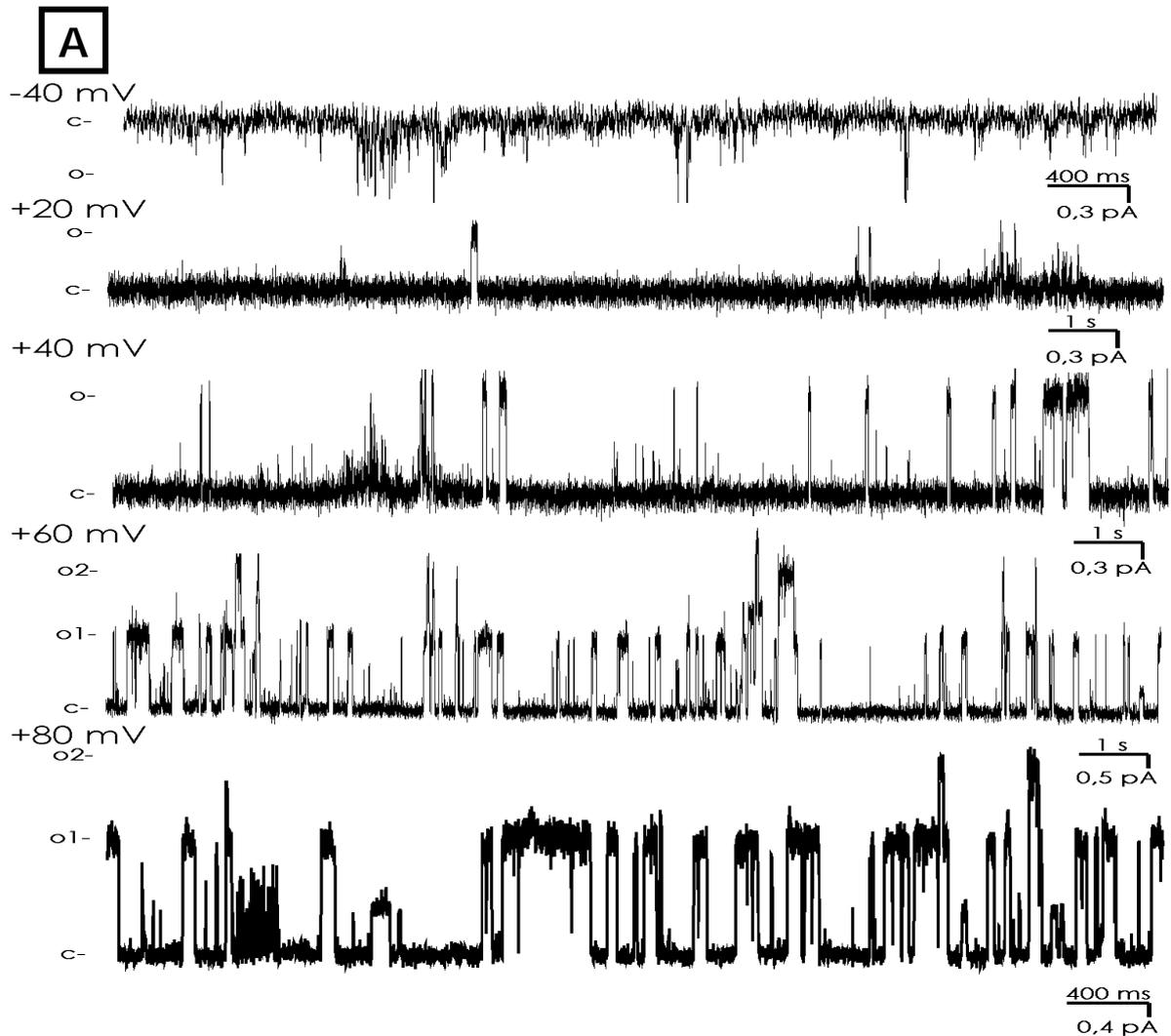


Abb. 4.53: Selektivität für  $\text{Rb}^+$ .

A: Einzel-Kanalereignisse des Ionenkanals mit 37 pS Leitfähigkeit bei den indizierten Spannungen einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KCl, 1 mM RbCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Bad: 1 mM KCl, 100 mM RbCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

B: Die Strom-Spannungs-Kennlinie des Ionenkanals mit 37 pS Ionenkanals. Die Gleichgewichts-Potentiale lagen bei +118 mV ( $\text{Rb}^+$ ) und -118 mV ( $\text{K}^+$ ).

### 4.3.5 Ein Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit

#### 4.3.5.1 Symmetrische und asymmetrische KCl-Konzentration

Bei Messungen mit symmetrischen KCl-Konzentrationen (100 mM KCl) auf zyttoplasmatischer (Pipette) und luminal vakuolärer Seite (Bad) zeigte sich ein weiterer Ionenkanal mit einer Leitfähigkeit von 7 pS (s. Abb. 4.54). Die lineare Zunahme der Stromamplituden sowohl im negativen als auch im positiven Bereich der Haltepotentiale wies auf ein ohmsches Verhalten des Ionenkanals hin, wobei das Umkehrpotential erwartungsgemäß bei 0 mV lag (Symbol: ▲, s. Abb. 4.55A).

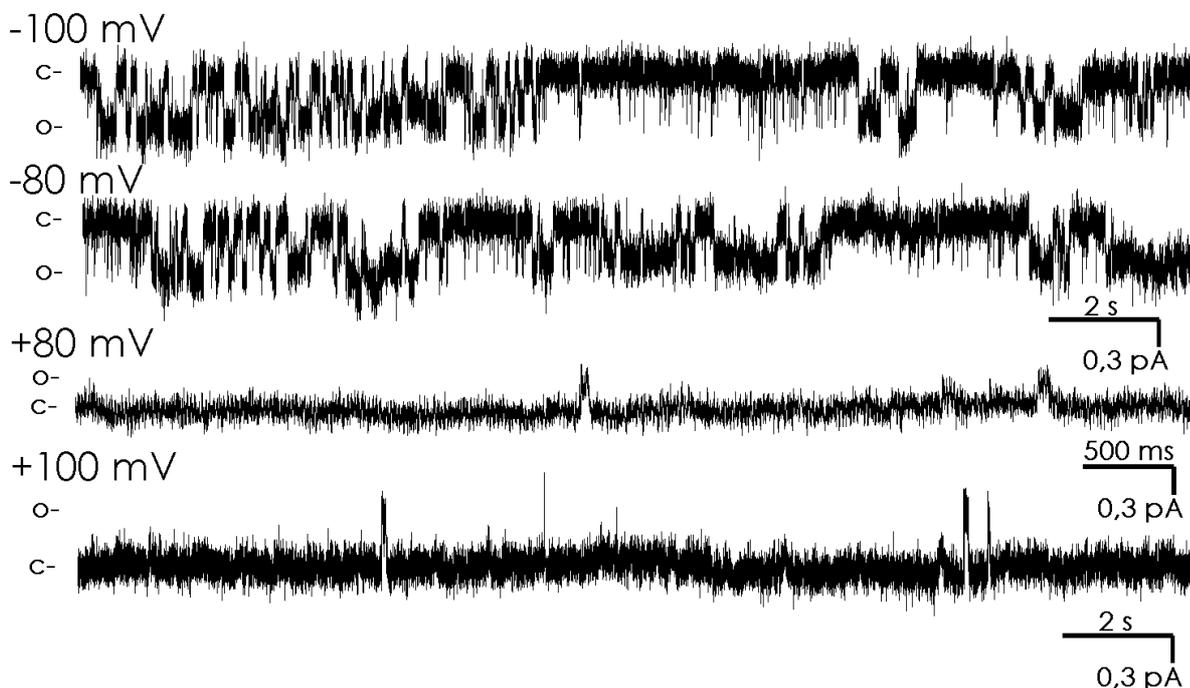


Abb. 4.54: Symmetrische KCl-Konzentration.

Kanalereignisse des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit bei den indizierten Spannungen von *ci*-Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Die Ionenkonzentrationen waren 100 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 mM MgCl<sub>2</sub> in der Pipette (pH 7,2) und im Bad (pH 7,2).

Die Offenzeiten des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit (s. Abb. 4.55B) zeigten unter diesen Bedingungen ein gegenüber den Ionenkanälen mit 37 pS und 19 pS Leitfähigkeit verändertes Verhalten. Der Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit zeigte eine eindeutige Präferenz bei negativen Haltespannungen mit diskreten Öffnungen von bis zu 500 ms Dauer. Im positiven Bereich der Haltespannungen zeigten sich wenig diskrete Öffnungen mit Öffnungszeiten unter 100 ms. Gegenüber den anderen Ionenkanälen war keine spannungsabhängige Aktivierung des Ionenkanals mit

7 pS Leitfähigkeit, sowohl im positiven als auch im negativen Bereich der Haltepotentiale zu erkennen.

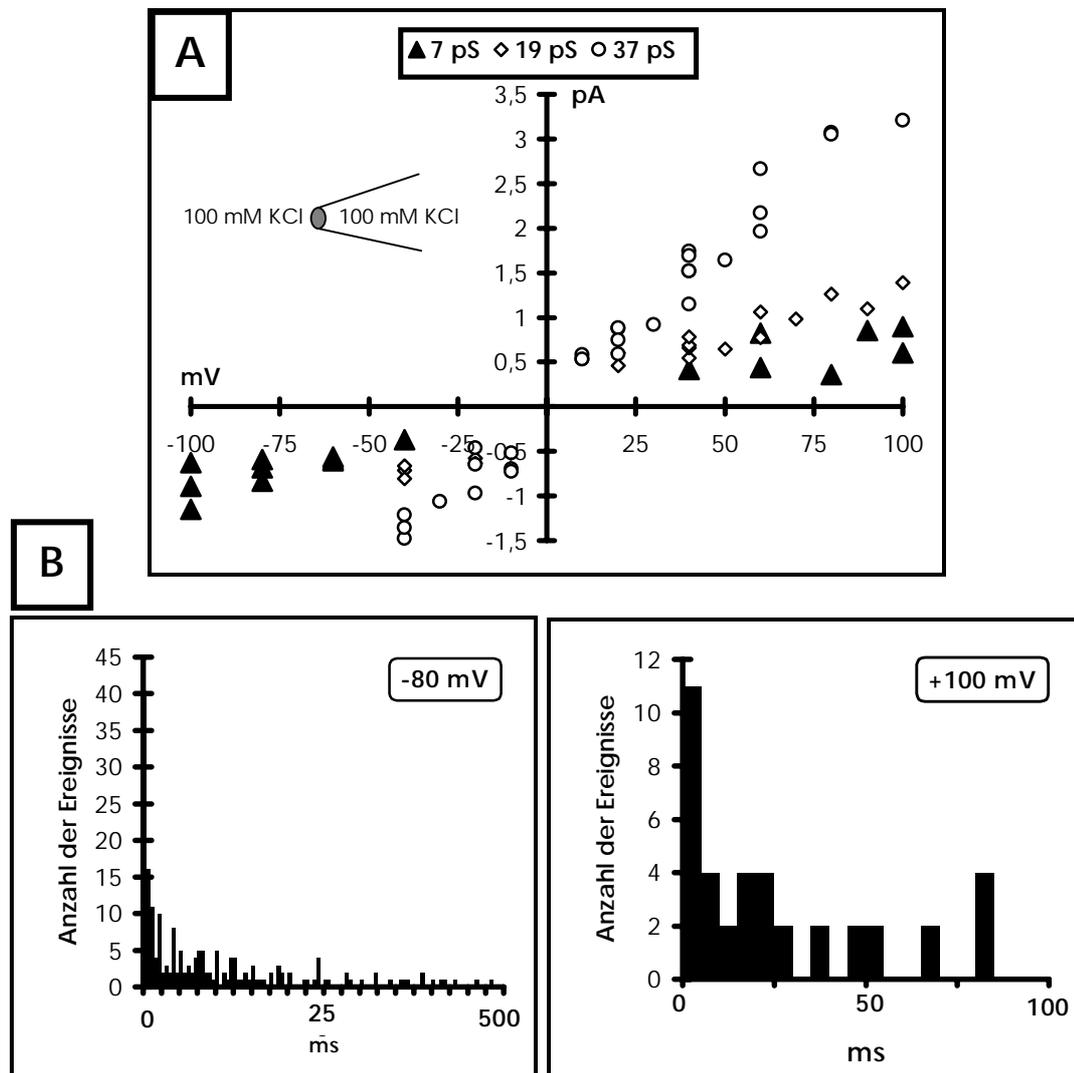


Abb. 4.55: Symmetrische KCl-Konzentration.

A: Die Strom-Spannungs-Kennlinie des Ionenkanals mit 7 pS (▲) Leitfähigkeit von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protooplasten von *Z. mays* L. in der *ci*-Konfiguration bei symmetrischen KCl-Konzentrationen. Zum Vergleich sind die Strom-Spannungs-Kennlinien der Ionenkanäle mit 19 pS (◇) und 37 pS (○) dargestellt.

B: Offenzeiten des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit bei -80 und +100 mV Haltepotentialen.

Unter Verwendung asymmetrischer KCl-Konzentrationen in Pipette und Bad wurden Messungen zur Selektivität des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit unternommen. Die Strom-Spannungs-Kennlinie in Abbildung 4.56B zeigte eine deutliche Verschiebung des mit Hilfe von Regressionsgeraden ermittelten Umkehrpotentials in Richtung des Gleichgewichts-Potentials für  $K^+$  auf. Mit -20 mV lag eine Selektivität von  $K^+$  gegenüber  $Cl^-$  von 2,7 vor. Der Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit zeigte somit

gegenüber den anderen Ionenkanälen eine schwächere Diskriminierung von  $\text{Cl}^-$  gegenüber  $\text{K}^+$ . Wiederum war ein lineares ohmsches Verhalten des Ionenkanals mit einer Leitfähigkeit von 7 pS zu erkennen. Die Offenzeiten zeigten sich bei den asymmetrischen KCl-Konzentrationen gegenüber symmetrischen nicht verändert.

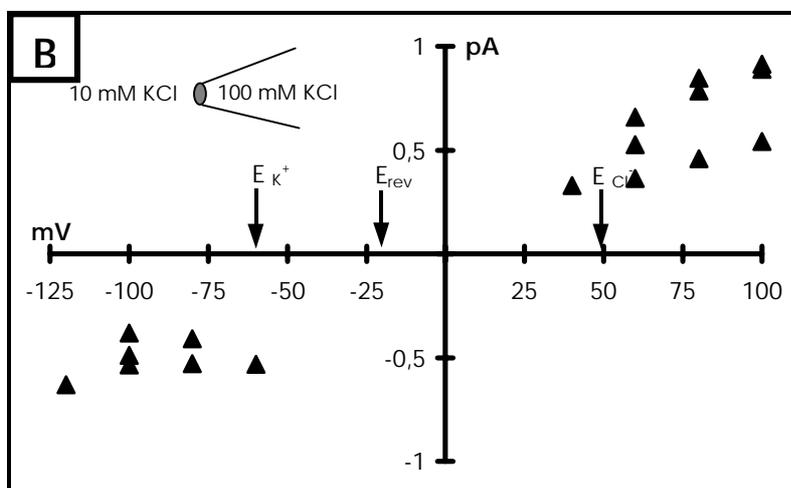
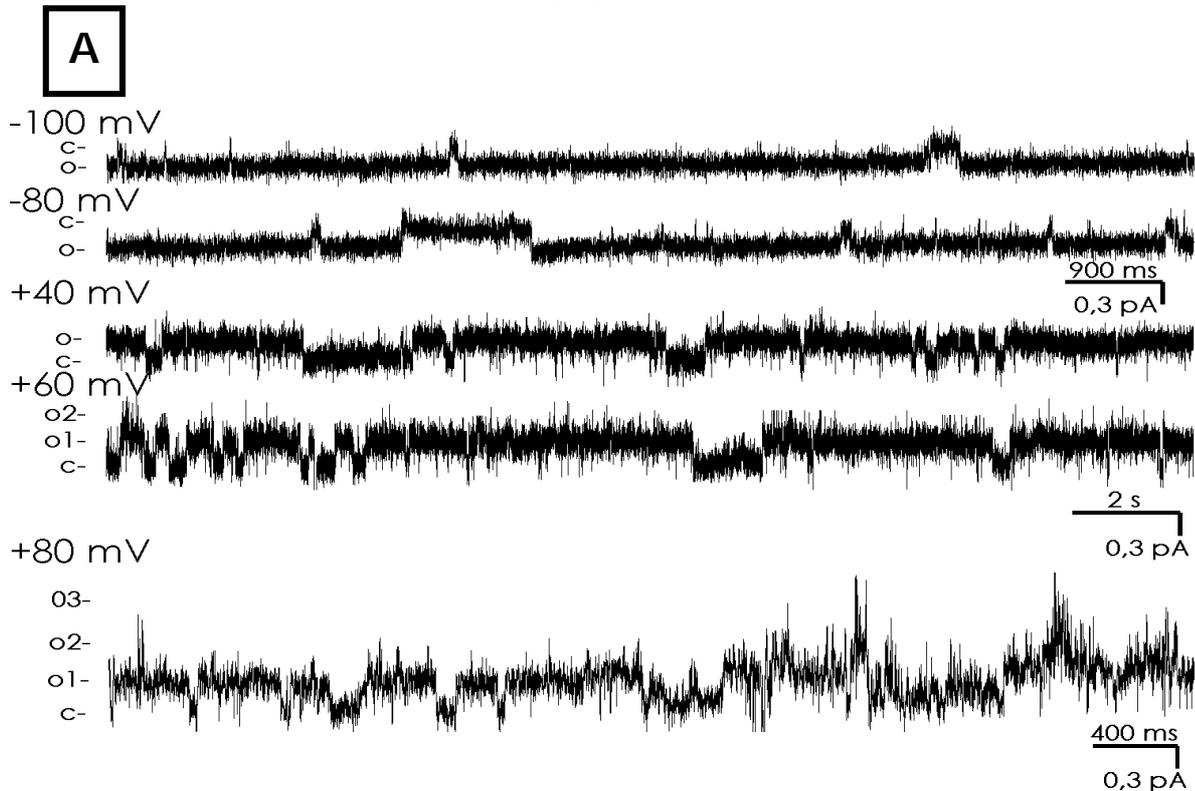


Abb. 4.56: Asymmetrische KCl-Konzentration.

A: Kanalereignisse des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit bei den indizierten Spannungen einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Die Ionenkonzentrationen waren 100 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  in der Pipette (pH 7,2) sowie 10 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  im Bad (pH 7,2).

B: Die Strom-Spannungs-Kennlinie des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit. Das Gleichgewichts-Potential für  $\text{K}^+$  ( $E_{\text{K}^+}$ ) lag bei -59 mV, für  $\text{Cl}^-$  bei +49 mV.

#### 4.3.5.2 Selektivität für $\text{Ca}^{2+}$

Auch der Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit wurde nach Messungen unter symmetrischer oder asymmetrischer KCl-Konzentrationen durch Badwechsel einer 50 millimolaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der vakuolären Seite unterworfen. Abbildung 4.57A zeigt, daß der Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit auch bei hohen

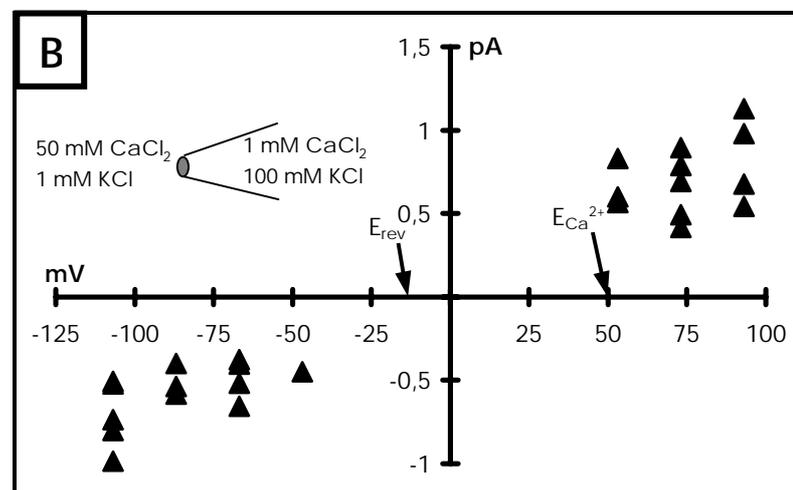
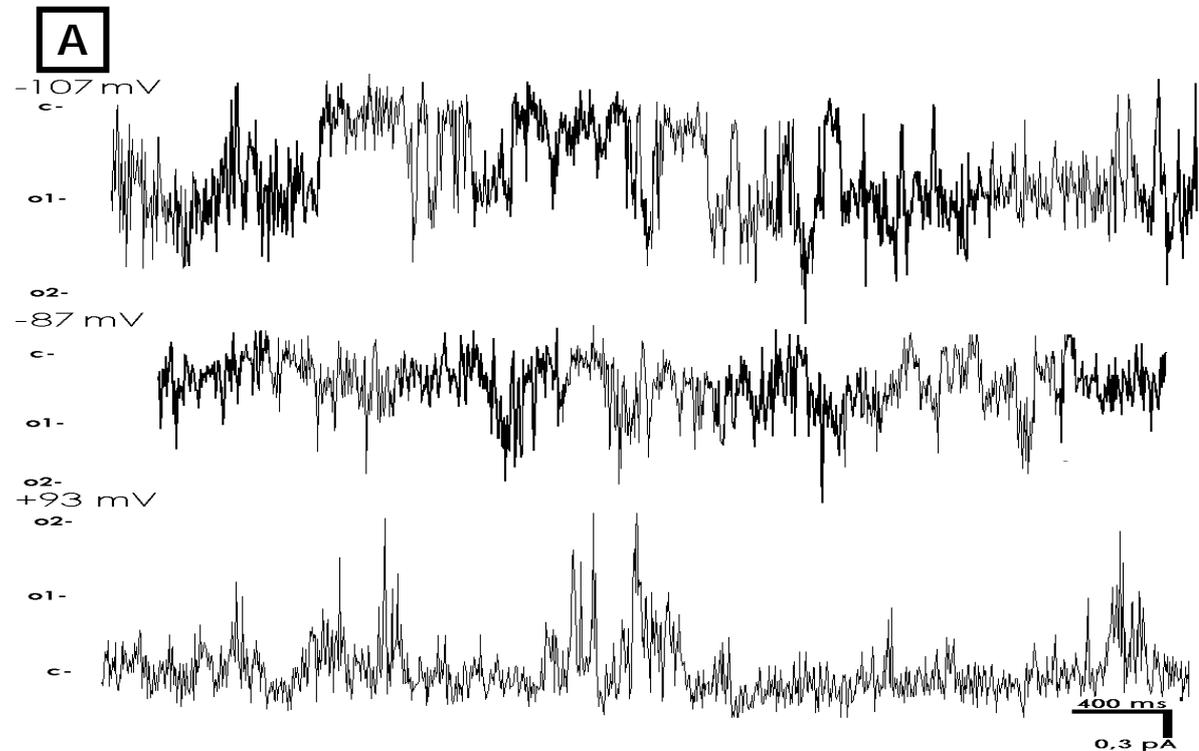


Abb. 4.57: Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ .

A: Kanalereignisse des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit bei den indizierten Spannungen einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Bad: 1 mM KCl, 50 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

B: Die Strom-Spannungs-Kennlinie des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit. Die Gleichgewichts-Potentiale lagen bei +50 mV ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und -108 mV ( $\text{K}^+$ ).

$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf der vakuolären Seite einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport ermöglichte. Die Messungen zur Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$  ergaben unter Verwendung von Regressionsgeraden ein Umkehrpotential von  $-13,7 \text{ mV}$  (s. Abb.: 4.57B). Unter Verwendung von Gleichung (23) ergab sich somit eine Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  gegen-

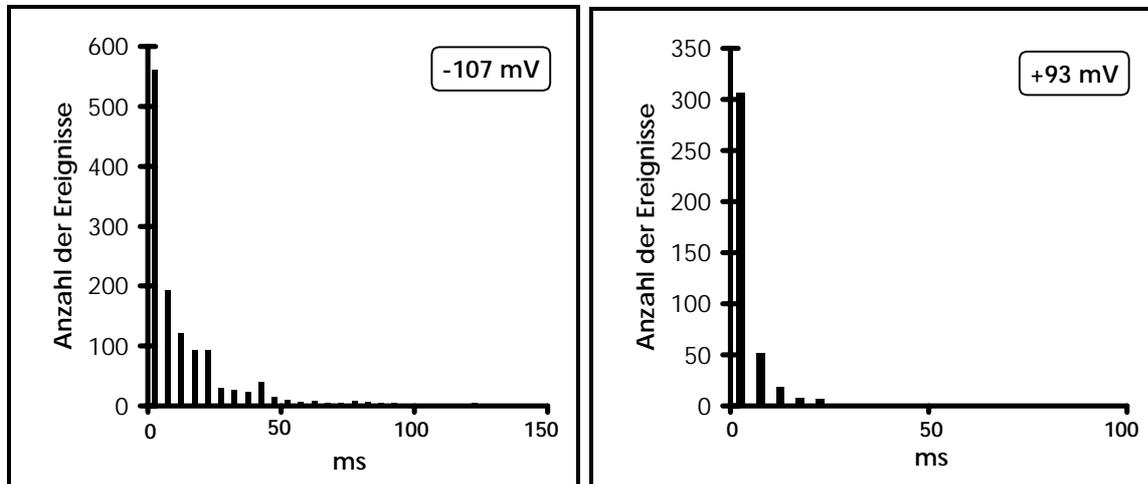


Abb. 4.58: Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ .

Die Offenzeiten des Ionenkanals mit  $7 \text{ pS}$  Leitfähigkeit bei einer Haltespannung von  $-107$  und  $+93 \text{ mV}$  während einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. Ionenkonzentrationen wie in Legende Abb. 4.57 angegeben.

über  $\text{K}^+$  von  $0,5$ . Wurde die relative Permeabilität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Cl}^-$  mit  $2,7$  berücksichtigt (Gleichung 24) verbleibt der Wert bei  $0,3$ .

Die Offenzeiten (s. Abb. 4.58) zeigten, daß hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf der vakuolären Seite sowohl bei positiven als auch bei negativen Haltespannungen eine Verkürzung der Öffnungsereignisse bewirkten.

#### 4.3.5.3 Selektivität für $\text{Na}^+$ und $\text{Rb}^+$

Die Überprüfung der Selektivität für  $\text{Na}^+$  zeigte, daß der Ionenkanal mit  $7 \text{ pS}$  Leitfähigkeit bei einem Umkehrpotential von  $8,7 \text{ mV}$  neben  $\text{K}^+$  auch  $\text{Na}^+$  transportierte (s. Abb. 4.59B). Unter Einbeziehung der relativen Permeabilität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Cl}^-$  mit  $2,7$  ergab sich für den Ionenkanal mit  $7 \text{ pS}$  Leitfähigkeit eine Selektivität von  $\text{Na}^+$  gegenüber  $\text{K}^+$  von  $1,1$ .

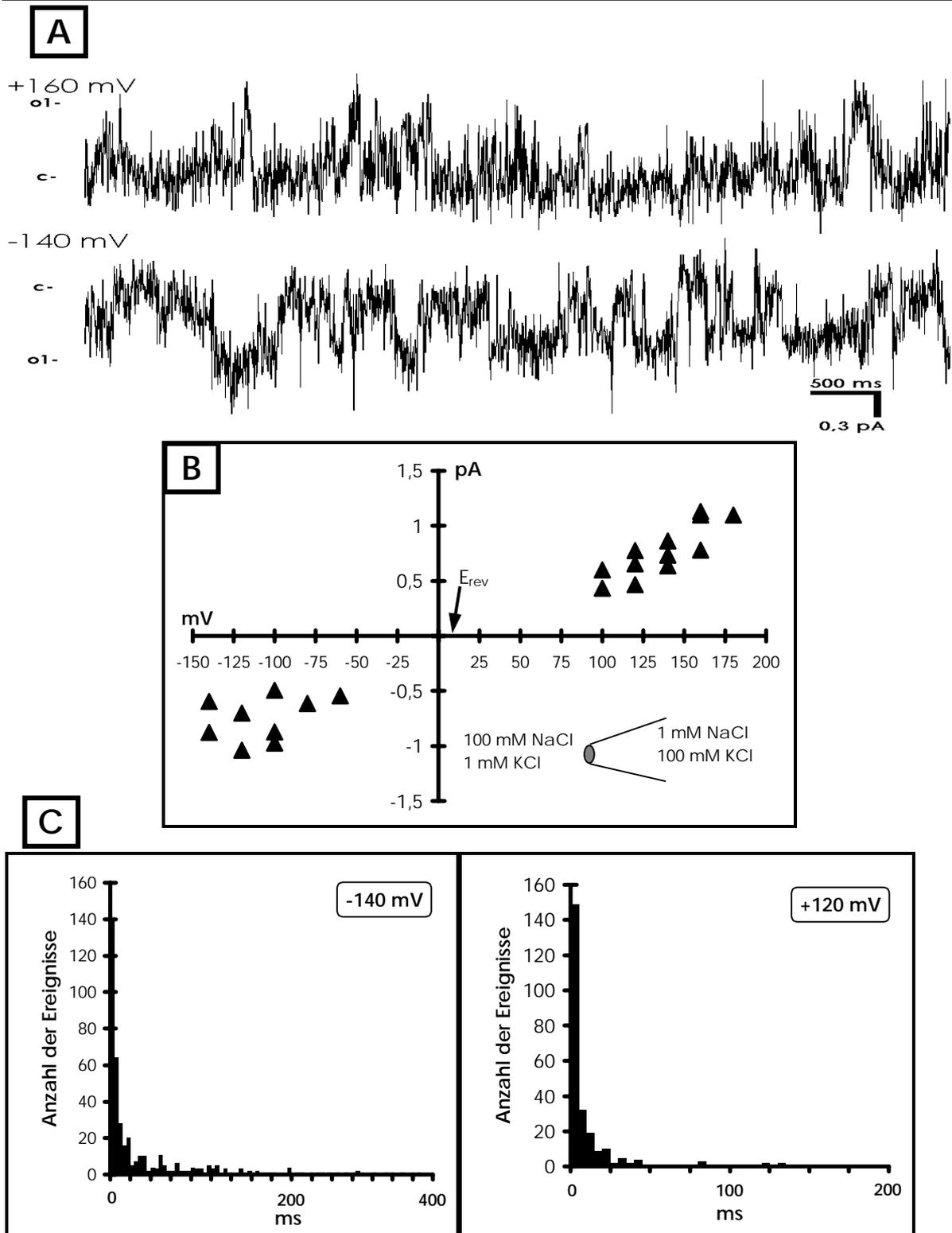


Abb. 4.59: Selektivität für  $\text{Na}^+$ .

A: Kanalereignisse des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit bei den indizierten Spannungen einer *ci*-Messung am Tonoplasten aus Koloepitil-Protoplasten von *Z. mays* L. Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KCl, 1 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Bad: 1 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

B: Die Strom-Spannungs-Kennlinie des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit. Die Gleichgewichts-Potentiale für  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  lagen bei -118 mV und +118 mV.

C: Offenzeiten des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit bei -140 und +120 mV Haltespannung.

Die Offenzeiten zeigten sich gegenüber den symmetrischen und asymmetrischen KCl-Konzentrationen nicht wesentlich verändert (s. Abb. 4.59C). Im Gegensatz zu den Ionenkanälen mit 39 und 19 pS Leitfähigkeit zeigte der Kanal mit 7 pS Leitfähigkeit jedoch auch bei hohen unphysiologischen Haltepotentialen diskrete Öffnungsereignisse.

Für den Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit ergab sich gegenüber den anderen Ionenkanälen die höchste Permeabilität für den Transport von  $\text{Rb}^+$  (s. Abb. 4.60). Mit einem Umkehrpotential von +23,8 mV errechnete sich unter Einbeziehung der relativen Permeabilität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Cl}^-$  mit 2,7 eine Selektivität von  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Rb}^+$  von 0,4.

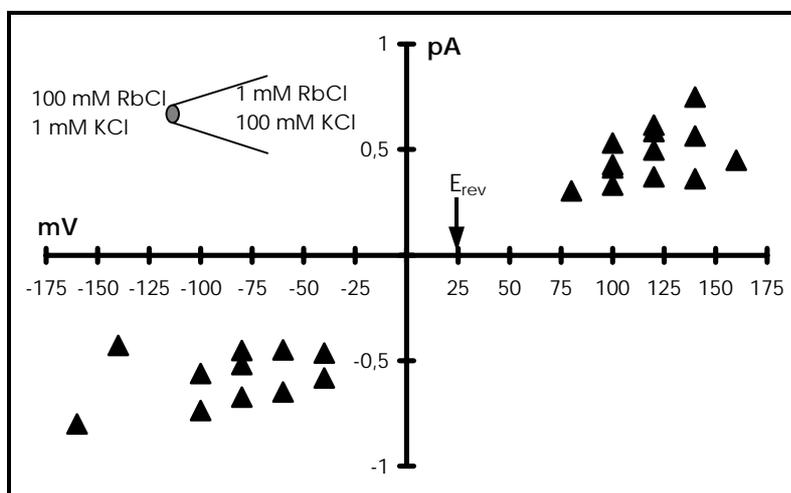


Abb. 4.60: Selektivität für  $\text{Rb}^+$ .

Die Strom-Spannungs-Kennlinie des Ionenkanals mit 7 pS Leitfähigkeit von Messungen am Tonoplasten aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. in der *ci*-Konfiguration. Die Ionenkonzentrationen waren:

Pipette: 100 mM KCl, 1 mM RbCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Bad: 1 mM KCl, 100 mM RbCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2).

Die Gleichgewichts-Potentiale lagen bei +118 mV ( $\text{Rb}^+$ ) und -118 mV ( $\text{K}^+$ ).

## 5. Diskussion

Für den pflanzlichen und tierischen Organismus ist  $\text{Ca}^{2+}$  u. a. ein essentielles Kation für die Steuerung physiologischer Prozesse des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Modifikationen in der freien zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$ ) wurden nach unterschiedlichsten Stimuli festgestellt.

So wurde durch exogene Applikation vieler Pflanzenwuchsstoffe, wie Abzissinsäure (GEHRING et al. 1990b, MCAINSH et al. 1990, SCHROEDER & HAGIWARA 1990, GILROY et al. 1991, IRVING et al. 1992), Indol-3-Essigsäure (FELLE 1988a, GEHRING et al. 1990b, IRVING et al. 1992) und Kinetin (IRVING et al. 1992) ein Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  beobachtet.

Weitere Stimuli, die  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  beeinflussen können sind Rotlicht (ERMOLAYEVA et al. 1997, SHACKLOCK et al. 1992), Blaulicht (LONG & JENKINS 1998), Schwerkraft (GEHRING 1990a), Berührung und Temperatur (KNIGHT et al. 1991), oxidativer Streß (MCAINSH et al. 1996),  $\text{CO}_2$  (WEBB et al. 1996) und Interaktion mit Mikroorganismen und Pilzen.

Die Modifikationen der freien  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  werden als Teil einer oder mehrerer Signaltransduktionsketten aufgefaßt und weisen erhebliche Variationen hinsichtlich der Höhe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, ihrer Dauer oder dem Ort ihrer Freisetzung auf (BUSH 1995, MALHÓ et al. 1998). Die Aufrechterhaltung einer niedrigen  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  ist die Grundvoraussetzung zur Eignung von  $\text{Ca}^{2+}$  als chemischer Botenstoff bei  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Antworten. Für *Z. mays* L.-Koleoptilen wurden für  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  Werte von ca. 120 nM mit Hilfe ionenselektiver Mikroelektroden bestimmt (FELLE 1988a). Ähnliche Werte wurden auch mit Fluoreszenzfarbstoffen festgestellt (GEHRING et al. 1990a, b). Hingegen wurde in der Vakuole von *Z. mays* L. ca. 2 mM freies  $\text{Ca}^{2+}$  gemessen (FELLE 1988b), wobei auch die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im extrazellulären apoplastischen Raum im millimolaren Bereich angegeben wird. Weitere Zellorganelle, welche eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beinhalten, die über dem zytoplasmatischen Spiegel liegt, sind das Endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien und Chloroplasten. Somit kann ein Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über das Plamalemma oder die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Depots erfolgen. Die Rolle eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch das Plamalemma konnte bei verschiedenen Pflanzen mittels pharmakologischer und Isotopen-Fluß-Studien (DE SILVA et al. 1985, MAC-ROBBIE

1989, MCAINSH et al. 1991),  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging (GILROY et al. 1991, MCAINSH et al. 1992) und Patch-Clamp-Technik (SCHROEDER & HAGIWARA 1990, COSGROVE & HEDRICH 1991) vorgestellt werden.

Eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Depots konnte mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Techniken (GILROY et al. 1991, MCAINSH et al. 1992) gezeigt werden, wobei auch der Einfluß  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierender Agenzien wie  $\text{InsP}_3$  (GILROY et al. 1990) und zyklische ADP-Ribose (ALLEN et al. 1995) nachgewiesen wurde.

FELLE (1988a) konnte in Koleoptilen von *Z. mays* L. nach Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Indolyl-3-Essigsäure nach einer 3 - 5 minütigen lag-Phase einen langfristigen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  aufzeigen. Der Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  wurde von oszillierenden Schwankungen mit einem Intervall von ca. 30 min begleitet, welche wiederum mit oszillierenden Schwankungen des Membranpotentials und des zytoplasmatischen pH korrespondierten. Weitere längerfristige Veränderungen von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  in Koleoptilen von *Z. mays* L. wurden nach Zugabe der "Phytohormone" Abzissinsäure (GEHRING et al. 1990b) und Gibberelinsäure (GILROY & JONES 1992) beobachtet. Neben diesen länger anhaltenden Änderungen von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  wurden auch in anderen Pflanzen kurzfristige, transiente Änderungen von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  gemessen. So berichteten KNIGHT et al. (1991) von einem schnellen, transienten Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  nach Elicitorgaben bei Tabakkeimlingen. Weiterhin zeigten EHRHARDT et al. (1996)  $\text{Ca}^{2+}$ -„Spiking“ in Wurzelhaaren von *Medicago sativa* L. nach Zugabe von Nodfaktoren.

Die Information eines chemischen Botenstoffes wie  $\text{Ca}^{2+}$  kann neben der Permanenz des Signals auch über seine sterische Verteilung weitergegeben werden. Besonders deutlich wird dies an spezialisierten Organen mit Spitzenwachstum wie der Pollenschlauch von *Lilium longiflorum* L. oder dem Rhizoid von *Fucus serratus* (NOBILING & REISS 1987, BROWNLEE & WOOD 1986), an welchen stationäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten beschrieben wurden. Bei Wurzelhaaren von *Sinapis alba* L. konnten HERRMANN & FELLE (1995) in der Wachstumszone eine  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  von 0,5 - 2  $\mu\text{M}$  bestimmen, während sie in den basalen Regionen niedriger war (0,1 - 0,3  $\mu\text{M}$ ).

In Kontrast zu tierischen Systemen sind in der pflanzlichen Zelle die Mechanismen der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signaltransduktion bislang nur ansatzweise untersucht. Im Besonderen stellt sich die Frage nach der

Involvierung der Vakuole als bedeutendes pflanzliches Kompartiment in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signaltransduktion. Die Rolle der pflanzlichen Vakuole bei der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase wurde lange Zeit unterschätzt. Galt die Vakuole lange Zeit als "passives" Speicherorganell, so zeigen neuere Untersuchungen die aktive Beteiligung der Vakuole an  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Signaltransduktion.

### **5.1 Die Energetisierung der sekundär aktiven Transportprozesse durch die v- $\text{H}^+$ -ATPase und die v-PPase**

An Vakuolensuspensionen von *Z. mays* L. konnte gezeigt werden, daß die tonoplastenständige v- $\text{H}^+$ -ATPase und die v-PPase die Vakuole auf einen pH-Wert von  $4,8 \pm 0,2$  bzw.  $4,6 \pm 0,4$  ansäuern. Die halbmaximale Inhibition der Protonentranslokation der v- $\text{H}^+$ -ATPase durch Bafilomycin wurde auf 120 pM extrapoliert (s. Kap. 4.1).

Die tonoplastenständige v- $\text{H}^+$ -ATPase und v-PPase transportieren unter ATP- bzw. PPI-Spaltung parallel Protonen in das vakuoläre Lumen und bauen einen steilen pH-Gradienten zwischen Zytoplasma und Vakuole auf, wobei der elektrische Potentialgradient mit ca. 15 - 25 mV (Zytoplasma negativ) zu vernachlässigen ist (SZE 1985, REA & SANDERS 1987, JOHANNES & FELLE 1990, FELLE 1991, DAVIES 1997).

Den primär aktiven Transportprozessen, die am Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten beteiligt sind, werden die sog. sekundär aktiven Transportprozesse an die Seite gestellt, die diese konservierte Energie als Triebkraft benutzen. Der über dem Tonoplasten liegende elektrochemische Protonengradient ermöglicht die Aufnahme einer Vielzahl von Stoffwechselprodukten wie Glukose, Anthocyane, Phenylalanin und Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  (RAUSCH 1991; MULDER-KRIEGER 1994; HOMEYER et al. 1989; SCHUMAKER & SZE 1985, 1986; PFEIFFER & HAGER 1993; BLUMWALD & POOLE 1987).

Die nach Kapitel 3.5 isolierten und aufgereinigten Vakuolen wiesen vor Energetisierung bei einem internen pH von  $5,7 \pm 0,2$  einen transmembranen pH-Gradienten von 1,5 Einheiten auf. Übereinstimmend konnte mit Hilfe der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Technik, sowie der pH-Indikatoren Quinacrin und Acridinorange an Vakuolenpräparationen von *Catharanthus roseus* L. und *Chenopodium rubrum* L. pH-Werte isolierter Vakuolen zwischen 5,5 und 5,7 gemessen werden (GUERN et al. 1989, HOFFMANN 1988, LOMMEL 1996). Hingegen stellten BRODMERKEL (1994) und WILHELMI (1994) für eine

Vakuolenpräparation aus *Z. mays* L.-Koleoptil-Protoplasten vor Energetisierung einen internen pH-Wert von 4,9 fest, was vermutlich durch die unterschiedliche Präparation herrührt (s. Kap. 3.4). Ursachen für die Aufrechterhaltung von unterschiedlichen pH-Gradienten über dem Tonoplasten in Abwesenheit energieliefernder Substrate können in einer niedrigen Permeabilität des Tonoplasten für Protonen, einer hohen vakuolären Pufferkapazität oder den über das Donnanpotential gebundenen Protonen zu suchen sein. An isolierten Vakuolen aus *Ch. rubrum* L. (HOFFMANN 1988) und *Beta vulgaris* L. (NIEMITZ & WILLENBRINK 1985) konnte ein solcher pH-Donnangradient festgestellt werden.

Die Aktivität der v-H<sup>+</sup>-ATPase senkte das pH des vakuolären Lumens innerhalb von 15 - 35 min auf einen pH-Wert von 4,8 ± 0,2 (s. Abb. 4.1A), wobei der pH-Gradient innerhalb eines Zeitraumes von 100 min konstant gehalten werden konnte. Die halbmaximale Aktivierung der Protonentranslokation der v-H<sup>+</sup>-ATPase durch ATP wurde auf 125 µM abgeschätzt (s. Abb. 4.1B).

Der pH-Gradient zwischen Vakuole und Versuchsmedium wurde durch die v-H<sup>+</sup>-ATPase um 0,9 Einheiten erhöht, wogegen BRODMERKEL (1994) und WILHELM (1994) durch die Aktivität der v-H<sup>+</sup>-ATPase an *Z. mays* L. Vakuolen nur eine zusätzliche Erhöhung des pH-Gradienten um 0,2 pH Einheiten feststellten. Insgesamt entsprach der pH-Gradient zwischen Vakuole und Versuchsmedium mit 2,4 pH-Einheiten den in dieser Arbeit vorgestellten Werten. Die erreichte Ansäuerung der Vakuole im Bereich von pH 4,8 ist ein häufiger Bereich für Vakuolen aus Pflanzen und Pilzen, wobei ein ATP/H<sup>+</sup>-Kopplungsverhältnis von 3 angenommen wird (DAVIES 1997). Jedoch erscheint ein ATP/H<sup>+</sup>-Kopplungsverhältnis von 3 knapp bemessen zu sein. Bei einer angenommenen mittleren ATP-Hydrolyseenergie (ΔG) von ca. 10

$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  kann mit  $E_p = \frac{\Delta G}{nF} + \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]_v}{[H^+]_c}$ , wobei  $E_p$  das Umkehrpotential der v-H<sup>+</sup>-

ATPase und  $n$  die Stöchiometrie angibt, eine maximale protonentreibende Kraft (pmf) von ca.  $\Delta\mu_{H^+}/F = -145 \text{ mV}$  (d. h.  $\Delta\text{pH} = 145\text{mV}/59\text{mV} = 2,46$ ) aufgebaut werden (s. u.). Die v-H<sup>+</sup>-ATPase würde somit, ohne Berücksichtigung von Leckströmen, an ihrem thermodynamischen Limit arbeiten. Ein ATP/H<sup>+</sup>-Kopplungsverhältnis von 2 ( $\Delta\mu_{H^+}/F = -217 \text{ mV}$ ,  $\Delta\text{pH} = 3,7$ ) hingegen würde der v-H<sup>+</sup>-ATPase die Arbeit weiter entfernt vom thermodynamischen Gleichgewicht erlauben und scheint für eine Regulation der Pumpaktivität günstiger zu sein (JOHANNES & FELLE 1990).

Die Aktivität der v-PPase senkte das pH des vakuolären Lumens innerhalb von 3 - 5 h auf einen pH-Wert von  $4,6 \pm 0,4$  (s. Abb. 4.5) und liegt damit im Bereich bisheriger Publikationen (MARIGO et al. 1988, LOMMEL 1996).

Nach gleichzeitiger Zugabe von ATP und PPI konnte eine leichte Zeitverkürzung bis zur Einstellung des Gleichgewichts gegenüber der Kontrolle nur mit ATP beobachtet werden (nicht gezeigt).

### Die Bestimmung der protonentreibenden Kraft an Vakuolen von *Z. mays* L.

Nach der chemiosmotischen Hypothese von MITCHELL (1961) wird der über dem Tonoplasten liegende elektrochemische Protonengradient durch die beiden tonoplastenständigen Protonenpumpen erzeugt. Dieses auch als protonentreibende Kraft (pmf) bezeichnete Potential der Protonen ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) setzt sich aus dem Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) und dem transmembranen pH-Gradienten zwischen dem Versuchsmedium (Zytoplasma) und der Vakuole zusammen:

$$pmf = \frac{\Delta G}{F} = \frac{\Delta\mu_{H^+}}{F} = \Delta\Psi_m - \frac{2,3 \cdot RT}{F} \cdot \Delta pH$$

Dabei steht F für die Faradaykonstante,  $\Delta G$  für die freie Energie, R für die Gaskonstante und T für die absolute Temperatur. Bei einer Temperatur von 25°C kann der Term  $2,3 \cdot R \cdot T / F$  gleich +59 mV gesetzt werden. Unter der Voraussetzung eines Tonoplastenpotentials von -25 mV (Zytoplasma negativ, FELLE 1991, BERTL et al. 1992) sowie eines pH-Gradienten von 2,4 Einheiten zwischen Vakuole und Versuchsmedium, errechnet sich die protonentreibende Kraft für Vakuolen aus *Z. mays* L.-Koleoptil-Protoplasten auf  $\Delta\mu_{H^+}/F = -167$  mV.

## 5.2 Ca<sup>2+</sup>-Transport am Tonoplasten

### 5.2.1 Transport des Ca<sup>2+</sup> in die Vakuole

#### H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiport

In bisherigen Veröffentlichungen wurde die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme an der pflanzlichen Vakuole zumeist als H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiport interpretiert. Der pflanzliche H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporter hat wie sein tierisches Pendant eine niedrige Affinität für Ca<sup>2+</sup>. Im Vergleich zu Ca<sup>2+</sup>-ATPasen zeichnen sich jedoch H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporter mit halbmaximalen Transportraten im Bereich von 4 - 200  $\mu$ M als hochkapazitive Systeme aus (BLUMWALD & POOLE 1986, SCHUMAKER & SZE 1990, BLACKFORD et al. 1990, CHANSON 1991,

PFEIFFER & HAGER 1993). Somit stellte sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, ob am Tonoplasten von *Z. mays* L. Koleoptilen ein entsprechender Aufnahmemechanismus vorliegen könnte.

Nach Applikation von 10  $\mu\text{M}$  bis 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  auf den im Gleichgewicht befindlichen Protonengradienten, zeigten Vakuolensuspensionen von *Z. mays* L. einen partiellen, konzentrationsabhängigen Abbau desselben (s. Abb. 4.3 bis 4.5).

Für einen hypothetischen  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter kann die protonentreibende Kraft als Energiequelle zum Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das vakuoläre Lumen genutzt werden. Die Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$  durch sekundär aktive Transportprozesse erfordert eine enge Koppelung an Primärenergie, wobei aus thermodynamischen Abwägungen der Grad der tatsächlich erreichten Akkumulation nur gleich oder weniger sein kann als die Triebkraft, also

$$\frac{\Delta G}{F} = E_T (2-n) + 59 [n(\text{pH}_V - \text{pH}_Z) + \text{pCa}_Z - \text{pCa}_V]$$

mit  $E_T$  für das Tonoplastenpotential,  $n$  für die Menge an transportierten  $\text{H}^+$ -Ionen,  $\text{pCa}$  für den negativen Logarithmus der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma ( $z$ ) und in der Vakuole ( $v$ ).

Unter der Voraussetzung einer zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  (FELLE 1988b) und einem transmembranen pH-Gradienten von 2,4 ergibt sich, ohne Berücksichtigung des Tonoplastenpotentials, für einen hypothetischen  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter mit einer Transportrate von einem Protonen pro  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion ( $n=1$ ) im Gleichgewicht eine Verteilung von

$$\text{pCa}_V = \text{pH}_V - \text{pH}_Z + \text{pCa}_Z,$$

d. h. eine theoretische  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation von 25  $\mu\text{M}$  in der Vakuole. Dieser Wert verbleibt auch bei einer Berücksichtigung von  $E_T$  mit -25 mV unterhalb 100  $\mu\text{M}$  und stimmt nicht mit der durch Digitonin durchschnittlich freigesetzten vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 270  $\mu\text{M}$  überein (Kap. 4.2.1), wobei die festgestellte vakuoläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration noch um den Faktor 6 unterhalb der von FELLE (1988b) festgestellten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ca. 2 mM liegt. Um eine Akkumulation von 0,27 mM  $\text{Ca}^{2+}$  zu ermöglichen, müßte der pH in der Vakuole auf mindestens pH 3,76 abgesenkt werden.

Wird die Transportrate auf  $n=2$  erhöht, ergibt sich hingegen nach

$$\text{pCa}_V = 2(\text{pH}_V - \text{pH}_Z) + \text{pCa}_Z$$

im Gleichgewicht eine theoretische Akkumulation von ca. 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und stimmt in der Größenordnung mit den in Maiskoleoptilen erhaltenen Werten überein.

Da FELLE (1988b) die vakuoläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mittels ionenselektiver Mikroelektroden aus intakten Mais-Koleoptilen bestimmte, ist die durch Digitonin durchschnittlich freigesetzte verminderte vakuoläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wohl durch passiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom während der Präparation zu erklären.

Wurde der transmembrane Protonengradient durch die v- $\text{H}^+$ -ATPase generiert, zeigte sich nach der Applikation von  $\text{Ca}^{2+}$  im Gleichgewicht der vakuolären pH-Absenkung ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Acridinorange-Absorption. Dies war bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  nachweisbar (Abb. 4.3). Auch bei gleichzeitiger Applikation von ATP und  $\text{Ca}^{2+}$  zu Versuchsbeginn konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme des aufgebauten pH-Gradienten beobachtet werden. Die Nachweisgrenze lag wiederum bei 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (Abb. 4.4).

Wurde der transmembrane Protonengradient durch die Pyrophosphatase generiert, zeigte sich nach der Applikation im steady-state ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Acridinorange-Absorption (Abb. 4.5). Der Abbau des pH-Gradienten fiel jedoch bei der Pyrophosphatase wesentlich stärker aus, bei einer unveränderten Nachweisgrenze von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Dies ist vermutlich nicht auf einen  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter zurückzuführen, sondern nach REA et al. (1992) auf eine Modulation der Aktivität der Pyrophosphatase durch zytoplasmatisches freies  $\text{Ca}^{2+}$  anzusehen. Eine andere Hypothese (MAESHIMA 1991) sieht die Ursache der Aktivitätshemmung in der Substratkonkurrenz zwischen  $\text{MgPPi}$  und  $\text{CaPPi}$ . Auch LOMMEL & FELLE (1997) beobachteten eine Reduzierung der Phosphatspaltung bei der v-PPase noch bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Somit erscheint die konzentrationsabhängige Abnahme des aufgebauten pH-Gradienten im v-PPase-Versuch nicht als aussagekräftiger Beweis eines  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiport. Vielmehr scheint  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  ein Regulator der v-PPase zu sein (REA & POOLE 1993).

Leistungsfähigere Argumente für die Existenz eines  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters zeigen die Versuche mit der v- $\text{H}^+$ -ATPase. Im Gegensatz zur v-PPase wurde hier bei verschiedenen Pflanzen keine Beeinflussung der Substrathydrolyse bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  (*Vigna radiata* L., MAESHIMA 1991), bzw. 1 mM (*B. vulgaris* L., REA et al. 1992; *Ch. album* L., LOMMEL & FELLE 1997) nachgewiesen. Somit weist die

beobachtete Abnahme des pH-Gradienten im Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 1 mM (Abb. 4.3 und 4.4) auf einen  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter hin.

Die Existenz eines  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters muß noch unter anderen Aspekten kritisch betrachtet werden. Oben ergab die Kalkulation einer von der protonentreibenden Kraft getriebene  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme für einen hypothetischen  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter mit einer Stöchiometrie von zwei Protonen pro  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion eine theoretische Akkumulation von 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in der Vakuole. Jedoch wurden bisher nur Stöchiometrien von 1:1 berichtet (SCHUMAKER & SZE 1984, 1985). Dies würde bedeuten, daß das vakuoläre pH einen Wert von mindestens pH 3,76 erreichen müßte, um eine Akkumulation von 270  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  in der Vakuole zu ermöglichen. Die bei Vakuolen aus *Z. mays* L. erreichte Ansäuerung der v-PPase und v- $\text{H}^+$ -ATPase lag jedoch bei pH 4,6 und pH 4,8, womit eine Stöchiometrie von 2:1 angenommen werden muß.

Ein weiteres Problem für die physiologische Bedeutung eines  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters liegt in den berichteten halbmaximalen Transportraten. Bei einer  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  von 0,1 - 1  $\mu\text{M}$  (FELLE 1993) würden die beschriebenen  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter an ihrer unteren Kapazitätsgrenze arbeiten. So berichteten BLUMWALD & POOLE (1986) von einer  $K_{\text{mCa}^{2+}}$  von 41,7  $\mu\text{M}$  an Tonoplastenvesikeln aus *B. vulgaris* L., wogegen SCHUMAKER & SZE (1990) eine  $K_{\text{mCa}^{2+}}$  von 15  $\mu\text{M}$  an Tonoplastenvesikeln aus *Avena*-Wurzeln feststellten. Die beobachtete Abnahme des pH-Gradienten im Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  entspricht den festgestellten  $K_{\text{mCa}^{2+}}$ . Eventuell könnte ein solcher Antiporter bei durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ausgelösten Erhöhungen von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  arbeiten. Erst kürzlich zeigte die Veröffentlichung von HIRSCHI et al. (1996) den Nachweis der mutmaßlichen Gene für einen hoch- und niedrigaffinen tonoplasten-ständigen  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter (CAX1, 2) in *Arabidopsis thaliana* L.

Eine weitere Möglichkeit legten PFEIFFER & HAGER (1993) nahe. Sie wiesen am Tonoplasten von Maiswurzeln einen  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter nach, welcher unter physiologischen Bedingungen als  $\text{H}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Antiporter arbeitet. Neben der Aktivität dieses Antiporters konnten sie am Tonoplasten von Maiswurzeln noch die Aktivität einer  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase dokumentieren.

### **$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase**

Vakuolensuspensionen aus Koleoptil-Protoplasten von *Z. mays* L. nahmen  $\text{Ca}^{2+}$  aktiv aus dem Versuchsmedium auf (s. Abb. 4.6). Die beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme war

ATP-abhängig und konnte durch Bafilomycin, welches einem  $H^+/Ca^{2+}$ -Antiporter die Triebkraft entzieht (Kap. 4.1), nicht gehemmt werden. Schon bei einer ATP-Konzentration von  $20 \mu M$  (Abb. 4.7A) ging ab einer freien  $Ca^{2+}$ -Konzentration von ca.  $800 \text{ nM}$  die  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in Sättigung über. Der durchschnittliche Fluß durch den Tonoplasten entsprach in diesem Bereich  $152 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Diese Ergebnisse sprechen für einen primär aktiven Transportmechanismus, eine tonoplastenständige  $Ca^{2+}$ -ATPase.

Pflanzliche  $Ca^{2+}$ -ATPasen zeichnen sich gegenüber protonentranslozierenden ATPasen durch eine höhere Affinität gegenüber ATP aus. So wurden für pflanzliche  $Ca^{2+}$ -ATPasen aus verschiedenen Mikrosomenpräparationen  $K_{mATP}$  von  $13 \mu M$  (ER, LIB & WEILER 1994),  $50 \mu M$  (ER, BRAUER et al. 1990),  $73 \mu M$  (ER, BUCKHOUT 1984),  $370 \mu M$  (PL, GIANNINI et al. 1987) und  $410 \mu M$  (TN, PFEIFFER & HAGER 1993) ermittelt. Somit ist die Beobachtung, daß der durch  $20 \mu M$  ATP induzierte  $Ca^{2+}$ -Strom durch den Tonoplasten durch höhere ATP-Konzentrationen nicht mehr steigerbar ist ein Indiz für einen primär aktiven Transportmechanismus, einer  $Ca^{2+}$ -ATPase mit einer niedrigen  $K_{mATP}$ . Auch LOMMEL & FELLE (1997) konnten an tonoplastenangereicherten Mikrosomen eine Sättigung der  $Ca^{2+}$ -Aufnahme ab  $500 \mu M$  ATP und an Vakuolenpräparationen unter  $250 \mu M$  ATP nachweisen. Infolge einer höheren unspezifischen Bindung von ATP an die Mikrosomenmembran scheinen Mikrosomenpräparationen eine höhere  $K_{mATP}$  als Vakuolenpräparationen aufzuweisen.

LOMMEL & FELLE (1997) konnten für die vom freien  $Ca^{2+}$  abhängige Enzymkinetik einen sigmoiden Kurvenverlauf nachweisen. Dieser wies im Bereich der physiologischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration seine größte Steigung auf. Ab einer  $Ca^{2+}$ -Konzentration von  $600 - 700 \text{ nM}$  konnte eine Sättigung der Aufnahme mit einem Fluß von  $90 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  nur mit gleichzeitigem Einsatz von Bafilomycin gemessen werden. Dies stimmt mit den hier vorgefundenen Daten ( $152 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  für  $20 \mu M$  ATP,  $149 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  für  $40 - 200 \mu M$  ATP) gut überein. Jedoch konnte für Vakuolen aus *Z. mays* L. auch mit Bafilomycin kein sigmoider Kurvenverlauf festgestellt werden. Dies mag jedoch an der zu geringen Anzahl der Versuche im submikromolaren Bereich liegen.

Unter Verwendung von tonoplastenangereicherten Vesikeln konnten auch FUKUMOTO & VENIS (1986) an Apfelvesikeln, DUPONT et al. (1990) an Vesikeln aus

Wurzeln von *Hordeum vulgare* L. und PFEIFFER & HAGER (1993) an Vesikeln aus Wurzeln von *Z. mays* L. eine tonoplastenständige ATPase nachweisen.

Direkte Nachweise einer  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase an Vakuolenpräparationen konnten bisher nur ASKERLUND (1997,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme) und LOMMEL & FELLE (1997, Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abnahme im Versuchsmedium mit Indo-1) vorlegen. ASKERLUND (1997) konnte in Vakuolenpräparationen mit Anti- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Antikörpern das Vorkommen einer 111 kD tonoplastenspezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bei *Brassica oleracea* L. nachweisen. Diese erwies sich durch Calmodulin stimulierbar. MALSTRÖM et al. (1997) konnten hierbei erst kürzlich das vermeintliche Gen der tonoplastenspezifischen durch Calmodulin stimulierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in *B. oleracea* L. (BCA1) nachweisen.

## 5.2.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung

### 5.2.2.1 Inositol-1,4,5-triphosphat

Vakuolensuspensionen von *Z. mays* L. setzten nach Applikation von 1  $\mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  innerhalb von 10 - 15 min durchschnittlich 9 % des bereits aufgenommenen bzw. noch enthaltenen  $\text{Ca}^{2+}$  frei (s. Abb. 4.8). Es konnte nachgewiesen werden, daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom durch den Tonoplasten durch einen  $\text{InsP}_3$ -aktivierbaren hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal mit 12 pS Leitfähigkeit erfolgte (s. Kap. 4.3.2).

### **$\text{InsP}_3$ -abhängige Signaltransduktion**

In tierischen und pflanzlichen Zellen ist  $\text{InsP}_3$  eine wichtige Komponente der Signaltransduktion für externe Stimuli (BERRIDGE & IRVINE 1989, FELLE 1993). Die Bindung externer Stimuli an Zelloberflächenrezeptoren aktiviert hierbei via G-Proteine die Phospholipase C, die wiederum im aktivierten Zustand Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat hydrolysiert und somit  $\text{InsP}_3$  und vermutlich Diacylglycerol (DAG) freisetzt.  $\text{InsP}_3$  kann nun z.B. an den  $\text{InsP}_3$ -Rezeptor-Kanal-Komplex des Endoplasmatischen Retikulums (ER) binden und  $\text{Ca}^{2+}$  aus diesem Organell freisetzen. Dabei ist das Vorkommen der drei bisher bekannten Isoformen des  $\text{InsP}_3$ -Rezeptor-Kanal-Komplexes ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) nicht nur an das ER gebunden (BERRIDGE 1993). In Pflanzen sind nunmehr viele Komponenten des auf  $\text{InsP}_3$  basierenden Signaltransduktionsweges nachgewiesen worden (COTÉ & CRAIN 1993, DRØBAK 1993). So wurde Phospho-

lipase C sowohl in mono- (PICAL et al. 1992, MELIN et al. 1992) als auch in dikotyledonen Pflanzen (HIRAYAMA et al. 1995, FRANKLIN-TONG et al. 1996, PICAL et al. 1997) nachgewiesen. Wurde zunächst auch in pflanzlichen Zellen das ER als Ziel-Organell zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung des auf  $\text{InsP}_3$  beruhenden Signaltransduktionsweges angesehen, so konnte bisher kein klarer Beweis dafür angetreten werden. Jedoch steht das ER weiterhin zur Diskussion (MUIR & SANDERS 1997). Das Vorkommen des  $\text{InsP}_3\text{R}$  in Pflanzen und die Rolle der Vakuole als Organell der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurde von DRØBAK & FERGUSON (1985) vorgeschlagen. RANJEVA et al. (1988) wiesen erstmals die  $\text{InsP}_3$ -induzierte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intakten Vakuolen von *Acer pseudoplatanus* L.-Suspensionszellen direkt nach. Bisher wurden nur zwei weitere direkte Nachweise der  $\text{InsP}_3$ -induzierten Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intakten Vakuolen von *Ch. rubrum* L. (LOMMEL 1996) und *Ch. album* L. (LOMMEL & FELLE 1997) veröffentlicht.

### **$\text{InsP}_3$ -abhängige $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Vakuolensuspensionen von *Z. mays* L. nach Applikation von  $\text{InsP}_3$  mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom von durchschnittlich 21 nM pro  $10^5$  Vakuolen·ml<sup>-1</sup> reagierten (Abb. 4.8).  $\text{Ca}^{2+}$  wurde innerhalb von 10 - 15 min freigesetzt. Eine erneute Aufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Medium konnte nicht gemessen werden. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung war abhängig von der externen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Abb. 4.9A (■)). Im Gegensatz dazu war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß durch den Tonoplasten unabhängig von der externen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Abb. 4.9B (■)).

Unter der Annahme, daß das Zytosol 10 % des Zellvolumens ausmacht, würde  $\text{InsP}_3$  innerhalb dieser Zeitspanne zu einem Anstieg des  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  von 120  $\mu\text{M}$  führen. Entsprechende Abschätzungen wurden auch mit 200  $\mu\text{M}$  von RANJEVA et al. (1988) und mit 63  $\mu\text{M}$  von LOMMEL (1996) berichtet. Jedoch wurde in den oben genannten Publikationen die gesamte Freisetzung innerhalb einer Minute erreicht. Diese Abschätzungen berücksichtigen jedoch nicht die zytoplasmatische Pufferkapazität (s. Kap. 5.2.3). Zum besseren Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung dient eine Berechnung des Flusses durch den Tonoplasten. Hierbei ergeben sich Werte von 79 pmol·m<sup>-2</sup>·min<sup>-1</sup> für *A. pseudoplatanus* L. (RANJEVA et al. 1988, eigene Berechnung

unter Annahme eines durchschnittlichen Vakuolendurchmessers von 23,8  $\mu\text{m}$ ), 9,5  $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  für *Ch. album* L. (LOMMEL 1996) und 6,3  $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  für *Z. mays* L. Für die zweite Applikation von  $\text{InsP}_3$  nach Ryanodin-Einwirkung ergab sich eine Steigerung des Flusses auf 17  $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Eine  $\text{InsP}_3$ -induzierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuole konnte durch indirekte Nachweismethoden auch von anderen Arbeitsgruppen über radioaktive und fluorimetrische Nachweisverfahren mit Hilfe von Mikrosomen und tonoplastenangereicherten Vesikeln aus verschiedenen pflanzlichen Geweben erhärtet werden (SCHUMAKER & SZE 1987, BROSNAN & SANDERS 1990, BELDE et al. 1993, CANUT et al. 1994). Hierbei konnten REDDY & POOVAIAH (1987) an Mikrosomen aus *Z. mays* L.-Koleoptilen einen  $\text{InsP}_3$ -sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Pool nachweisen. Es wurden jedoch keine aufgereinigten Mikrosomen verwendet, womit keine genaue Aussage hinsichtlich der Herkunft (Apoplast, ER oder Vakuole) des  $\text{InsP}_3$ -sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Pools gemacht werden konnte. Mit den in dieser Arbeit vorliegenden Daten erscheint die Vakuole als Quelle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung sehr wahrscheinlich.  $\text{InsP}_3$  setzte bei den oben genannten Versuchen bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  durchschnittlich 28 % des aufgenommenen  $\text{Ca}^{2+}$  frei. Hierbei lag die  $K_m$  mit 8  $\mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  um den Faktor 10 höher als bei Vakuolen (0,2  $\mu\text{M}$ , RANJEVA et al. 1988) bzw. Mikrosomen (0,6  $\mu\text{M}$ , SCHUMAKER & SZE 1987; 0,54  $\mu\text{M}$ , BROSNAN & SANDERS 1990). Dieser Befund kann durch die hohe unspezifische Bindungskapazität der Mikrosomenmembran von *Z. mays* L. gegenüber Dikotyledonen erklärt werden (MUIR et al. 1997).

Interessanterweise wurde an Mikrosomen aus *Z. mays* L.-Koleoptilen eine Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bei ansteigender externer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beobachtet. Dies konnte auch mit Vakuolensuspensionen von *Z. mays* L. im Bereich von 470 nM bis 5,8  $\mu\text{M}$  freien  $\text{Ca}^{2+}$  nachgewiesen werden (Abb. 4.9A (■)). Eine entsprechende  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der  $\text{InsP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, mit einer glockenförmigen Dosis-Wirkungskurve, wurde in tierischen Zellen nachgewiesen (BEZPROZVANNY et al. 1991, FINCH et al. 1991, IINO & ENDO 1992). In pflanzlichen Zellen scheint somit eine kooperative Hemmung der  $\text{InsP}_3$ -Bindungsstelle durch  $\text{Ca}^{2+}$  nachweisbar zu sein, wie sie an tierischen Systemen beobachtet wurde (WORLEY et al. 1987, BEZPROZVANNY et al. 1991, SUÁREZ-ISLA et al. 1991). Dies ist beachtenswert, da es vermutlich eine Grundvoraussetzung der  $\text{InsP}_3$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nach dem "one-pool"-Modell ist (s. Kap. 5.2.3).

Im Gegensatz dazu zeigte der  $\text{InsP}_3$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß durch den Tonoplasten bei *Z. mays* L. Vakuolen keine signifikante Abhängigkeit von der externen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und entsprach ab einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  durchschnittlich  $124 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Abb. 4.9B (■)). Übereinstimmend berichteten ALLEN & SANDERS (1994b) von einem durch  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  unbeeinflussten, durch  $\text{InsP}_3$  aktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Differenzstrom durch den Tonoplasten von *B. vulgaris* L. Eine Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bei ansteigender externer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und gleichbleibenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß durch den Tonoplasten könnte durch eine ligandeninduzierte, zeitabhängige Inaktivierung des  $\text{InsP}_3\text{R}$  durch  $\text{InsP}_3$  erklärbar zu sein, die von HAJNÓCZKY & THOMAS (1994, 1997) an Hepatozyten nachgewiesen wurde.

In der Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  Ryanodin zeigte sich im Bereich von  $340 \text{ nM}$  bis  $5,4 \mu\text{M}$  freien  $\text{Ca}^{2+}$  eine Steigerung der  $\text{InsP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (Abb. 4.9A, (o)). Diese entgegengesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit wurde durch eine Verdoppelung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Flusses durch den Tonoplasten auf  $279 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  verursacht (Abb. 4.9B, (o)) und spricht für eine positive Kooperation beider  $\text{Ca}^{2+}$ -Agonisten. Im umgekehrten Fall trat nur eine schwache Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Flusses durch den Tonoplasten auf. Eine Sensitivität der  $\text{InsP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung gegenüber Agonisten des Ryanodin-Rezeptor- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Komplexes konnte auch in tierischen Systemen gezeigt werden (OSIPCHUK et al. 1990, WAKUI et al. 1990). Im Gegensatz dazu zeigte MUIR et al. (1997) an tonoplastenangereicherten Mikrosomen aus *B. oleracea* L., daß  $100 \mu\text{M}$  Ryanodin keinen Einfluß auf die  $\text{InsP}_3$ -sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung hat.

### **Der durch $\text{InsP}_3$ aktivierbare hochselektive $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß nach Applikation von  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  die Vakuolen von *Z. mays* L. im *wv*-Modus einen durch  $\text{InsP}_3$  aktivierbaren Differenzstrom durch den Tonoplasten aufwiesen (Abb. 4.25 und 4.26). Mit einer Selektivität ( $P_{\text{Ca}^{2+}}:P_{\text{K}^+}$ ) von  $105 - 139 : 1$  war dieser Differenzstrom hochselektiv für  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$ .

Ein weiterer direkter Nachweis des tonoplastenständigen  $\text{InsP}_3\text{R}$  wurde bisher nur an Vakuolen aus der Speicherwurzel von *B. vulgaris* L. erbracht (ALEXANDRE et al. 1990, ALLEN & SANDERS 1994b). Hierbei konnte ein durch  $\text{InsP}_3$  aktivierbarer Differenzstrom durch den Tonoplasten im *wv*-Modus nachgewiesen werden. Mit einer

Selektivität ( $P_{Ca^{2+}}:P_{K^+}$ ) von 100 - 800:1 war dieser Differenzstrom hochselektiv für  $Ca^{2+}$  (ALLEN & SANDERS 1994b). Der Strom war mit einer  $K_m$  von 0,2  $\mu M$  für  $InsP_3$  spezifisch, während andere Phosphoinositide nur max. 15 % des Ausstroms induzierten (ALEXANDRE et al. 1990).

Die durch  $InsP_3$  induzierte Stromdichte (Abb. 4.27) lag für *Z. mays* L. Vakuolen mit 23  $mA \cdot m^{-2}$  bei -80 mV bzw. 17  $mA \cdot m^{-2}$  bei +55 mV im Bereich der bei *B. vulgaris* L. berichteten Stromdichten (50  $mA \cdot m^{-2}$  bei -80 mV, bzw. 5  $mA \cdot m^{-2}$  bei +80 mV; ALLEN & SANDERS 1994b). Bei höheren negativen Tonoplastenpotentialen wies der bei *Z. mays* L. im *vv*-Modus durch  $InsP_3$  aktivierbare Differenzstrom gegenüber *B. vulgaris* L. eine Sättigung auf (Abb. 4.26B und Abb. 4.27). Bei einer Offenwahrscheinlichkeit von ca. 10 % im Bereich des physiologischen Tonoplastenpotentials (Abb. 4.30B) errechnete sich unter den vorgegebenen Bedingungen eine  $InsP_3R$ -Dichte von ca. 1  $InsP_3R \cdot 7 \mu m^{-2}$ . Eine korrespondierende Abschätzung mit 1200  $InsP_3R$  pro Vakuole (45  $\mu m$ ), d. h. ca. 1  $InsP_3R \cdot 5 \mu m^{-2}$  zeigten ALEXANDRE et al. (1990). Somit erscheint die Dichte des  $InsP_3R$  im Vergleich zu anderen Ionenkanälen im Tonoplasten, wie dem Slow-Vacuolar-Kanal in Vakuolen aus Meso-phyllzellen von *H. vulgare* L. (1 Kanal  $\cdot \mu m^{-2}$ , POTTOSIN et al. 1997), wesentlich geringer zu sein.

In der *co*-Konfiguration konnten bei *B. vulgaris* L. auch Nachweise auf Einzelkanalniveau erbracht werden. Die Permeabilitätsverhältnisse von  $Ca^{2+}$  gegenüber  $K^+$  mit 100 - 800:1 (ALLEN & SANDERS 1994b) legten nahe, daß der hochselektive  $Ca^{2+}$ -Strom durch einen  $InsP_3$ -aktivierbaren  $Ca^{2+}$ -Kanal getragen wurde. Die Leitfähigkeit des durch  $InsP_3$ -aktivierbaren  $Ca^{2+}$ -Kanals betrug 30 und 50 pS (ALEXANDRE et al. 1990, ALEXANDRE & LASSALLES 1992), bzw. 11, 51 und 182 pS (ALLEN & SANDERS 1994b). Die Anwesenheit verschiedener Leitfähigkeiten läßt auf das Vorkommen weiterer  $InsP_3R$ -Isoformen, bzw. das Auftreten von Unterleitfähigkeiten eines  $InsP_3R$  in *B. vulgaris* L. schließen. Beide Arbeitsgruppen berichteten über sehr schnelle Öffnungsereignisse und vielfache Öffnungsamplituden in der *co*-Konfiguration. Dies erschwerte die Festlegung auf eine diskrete Leitfähigkeit. Bisher zeigte nur die Publikation von ALEXANDRE & LASSALLES (1992) diskrete Öffnungsereignisse des  $InsP_3R$  (Unterleitfähigkeiten von 30 und 50 pS bei einer Meß-Dauer von 1 s).

Hingegen beträgt die Leitfähigkeit des  $InsP_3R$  bei Vakuolen aus *Z. mays* L. 12 pS mit 5 mM  $Ca^{2+}$  als Ladungsträger auf der vakuolären Seite. Dies konnte sowohl in der *co*- als auch in der *ci*-Konfiguration (Abb. 4.28B, 4.29B) nachgewiesen werden. Die Selektivität von  $Ca^{2+}$  gegenüber  $K^+$  mit 105 - 139:1 in der *co*-Konfiguration und *ci*-

Konfiguration legen auch hier nahe, daß der hochselektive  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom durch diesen  $\text{InsP}_3$ -aktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal mit 12 pS Leitfähigkeit getragen wurde. In der *ci*-Konfiguration lassen sich Gründe für sehr schnelle Öffnungsereignisse und vielfache Öffnungsamplituden erkennen. Bei einer vorgegebenen moderaten physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 5 mM auf der vakuolären Seite zeigte sich bei zunehmenden negativen Tonoplastenpotentialen eine Zunahme des Auftretens von Unterleitfähigkeiten und Kanalampplituden (Abb. 4.29A). Weiterhin reduzierten sich die Offenzeiten des  $\text{InsP}_3\text{R}$  bei niedrigen Haltepotentialen von 400 ms zu Offenzeiten bei höheren Haltespannungen von unter 100 ms (Abb. 4.30A). Dabei war ein häufigeres Auftreten von Öffnungsamplituden kleinerer Leitfähigkeit klar zu erkennen. Insgesamt spiegelt die aus den Offenzeiten in der *ci*-Konfiguration abgeleitete spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit (Abb. 4.30B) gut den im *wv*-Modus gemessenen durch  $\text{InsP}_3$  aktivierten Differenzstrom wieder. Hierbei zeigte sich, daß der  $\text{InsP}_3\text{R}$  aus *Z. mays* L. gerade im physiologischen Bereich der Tonoplastenpotentiale für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuole geeignet war. Auch ALEXANDRE et al. (1990) konnten in der *co*-Konfiguration eine spannungsabhängige Aktivierung im Bereich der physiologischen Tonoplastenpotentiale für den  $\text{InsP}_3\text{R}$  nachweisen. Im Gegensatz zur Offenwahrscheinlichkeit des  $\text{InsP}_3\text{R}$  aus *Z. mays* L. (Abb. 4.30B) zeigte sich jedoch keine Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit bei hohen angelegten negativen Tonoplastenpotentialen.

Unter Berücksichtigung eines bei physiologischen Tonoplastenpotentialen durch  $\text{InsP}_3$  induzierbaren in das Zytoplasma gerichteten hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms von ca.  $20 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$  ergibt sich hinsichtlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuolensuspension folgende Abschätzung:

Ein induzierbarer  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom von  $20 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$  bedeutet eine Transportrate von  $6,2\cdot 10^{16}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen. Hingegen bedeutet der durch die Vakuolensuspension erreichte maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß durch den Tonoplasten (s. o.) von  $279 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  eine Transportrate von  $1,68\cdot 10^{14}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen. D. h. der induzierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom von  $20 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$  hat eine ca. 370fach höhere Transportrate und würde einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß durch den Tonoplasten von ca.  $103 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erlauben.

Die mit der Patch-Clamp-Technik erhaltenen Transportraten stehen somit im Widerspruch gegenüber an intakten Vakuolen gemessenen Transportraten für Agonisten-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen. Dies kann auf eine De-Regu-

lierung der Ionenkanalaktivität durch fehlende vakuoläre Regulatoren hinweisen. Jedoch erscheint für eine weiterführende Diskussion die Einführung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusionskoeffizienten und der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferkapazität notwendig (s. Kap. 5.2.3).

### **Der Einfluß des vakuolären pH und der vakuolären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf den $\text{InsP}_3\text{R}$**

Der Befund, daß große vakuoläre pH-Schwankungen bzw. große Änderungen der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Kap. 4.3.2.2) kaum Einfluß auf die Offenwahrscheinlichkeit in der *ci*-Konfiguration hatten, kann auf eine durch Agonisten aktivierbare Regulation hinweisen. So konnten ALLEN & SANDERS (1994a) an einem spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (27 pS,  $P_{\text{Ca}^{2+}}:P_{\text{K}^+}=6$ ) von *V. faba* L.-Schließzellvakuolen durch ein kontinuierliches Absenken des pH auf der vakuolären Seite von pH 7,3 auf pH 5,5 eine drastische Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit von ca. 22 % auf ca. 1 % beobachten. Dies macht insofern Sinn, da ein nur durch die Spannung regulierter tonoplastenständiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ohne weitere Regulationsgrößen zu einem schnellen Verlust des in der Vakuole gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$  führen würde. Ein durch zytoplasmatische Agonisten gesteuerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bedarf solch einer Steuerung nicht unbedingt. Vielmehr sollte ein durch zytoplasmatische Agonisten gesteuerter tonoplastenständiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal relativ unempfindlich gegen Änderungen des vakuolären Milieus sein, da für einen  $\text{InsP}_3$ -abhängigen Signaltransduktionsweg eine konstant verfügbares  $\text{Ca}^{2+}$ -Depot erwartet werden sollte. Unter der Voraussetzung, daß sich der  $\text{InsP}_3\text{R}$  gegenüber tierischen Zellen nicht wesentlich genetisch verändert hat, verbleiben noch weitere zytoplasmatische Regulationsstellen zur Feinregulierung der  $\text{InsP}_3$ -Antwort (FERRIS & SNYDER 1992).

Die experimentelle Erhöhung der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 5 auf 50 mM führte in der *ci*-Konfiguration zu einer vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewichtspotential abhängigen Verschiebung des Umkehrpotentials von +32,6 mV auf +64,9 mV (s. Abb. 4.33). Dies stimmt mit den Ergebnissen von ALEXANDRE et al. (1990) für den  $\text{InsP}_3\text{R}$  aus *B. vulgaris* L. überein und konnte auch für andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle nachgewiesen werden (z. B. ALLEN & SANDERS 1994a).

Eine Beeinflussung der Offenwahrscheinlichkeit des  $\text{InsP}_3\text{R}$  aus *Z. mays* L. durch die Erhöhung der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 5 auf 50 mM konnte nicht beob-

achtet werden. Hingegen konnten JOHANNES & SANDERS (1995) im Konzentrationsbereich von 0,03 - 5 mM vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$  eine deutliche Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit des spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals aus *B. vulgaris* L. feststellen. Dies war mit einer Verschiebung der Spannungsaktivierung zu weniger negativen Tonoplastenpotentialen verbunden. Ebenso konnten ALLEN & SANDERS (1994a) bei einer Zunahme der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 5 auf 10 mM eine deutliche Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit im Bereich der physiologischen Tonoplastenpotentiale des spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals aus *V. faba* L.-Schließzellen feststellen.

Dies könnte auf eine unterschiedliche Regulation durch vakuoläres  $\text{Ca}^{2+}$  zwischen  $\text{InsP}_3$ -aktivierbaren und spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen hinweisen.

### Die Selektivität für divalente Kationen des $\text{InsP}_3\text{R}$

Wurde  $\text{Ca}^{2+}$  als divalenter Ladungsträger auf der vakuolären Seite bei einer vorgegebenen Konzentration von 50 mM gegenüber divalenten Kationen der Berylliumgruppe ausgetauscht (Kap. 4.3.2.3), so zeigte die Leitfähigkeit des  $\text{InsP}_3\text{R}$  folgende Abhängigkeit:  $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} = 21,1 : 17 : 15,5 : 12$  pS (Abb. 4.34 bis 4.36). Damit konnte erstmals auf Einzelkanalniveau für pflanzliche  $\text{InsP}_3\text{R}$  eine Leitfähigkeits- und Selektivitätsreihe (s. u.) erstellt werden. Eine entgegengesetzte Leitfähigkeitsreihe zeigten ALEXANDRE & LASSALLES (1992) am  $\text{InsP}_3$ -aktivierbaren Ausstrom divalenter Kationen von Vakuolen aus *B. vulgaris* L. Bei einer vorgegebenen vakuolären Konzentration von 5 mM des respektiven divalenten Kations war die Leitfähigkeitsreihe im *wv*-Modus:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$ . Ob die im *wv*-Modus aus *B. vulgaris* L. erhaltene Leitfähigkeitsreihe der Leitfähigkeit des  $\text{InsP}_3\text{R}$  oder einer veränderten Offenwahrscheinlichkeit entspricht, bleibt ungewiß.

Die Selektivitätsreihe des  $\text{InsP}_3\text{R}$  aus *Z. mays* L. zeigte für divalente Kationen im wesentlichen die Umkehrung der Leitfähigkeitsreihe:  $P_{\text{Ca}^{2+}} \gg P_{\text{Sr}^{2+}} > P_{\text{Ba}^{2+}} > P_{\text{Mg}^{2+}} > P_{\text{K}^+} = 121 : 18 : 8 : 1,7 : 1$  (Kap. 4.3.2.3). Für den  $\text{InsP}_3\text{R}$  von *B. vulgaris* L. wurde bisher keine Selektivitätsreihe bestimmt.

Die Umkehrung der Selektivitätsreihe gegenüber der Leitfähigkeitsreihe steht im Einklang mit dem spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal aus Vakuolen von *B. vulgaris* L.-Wurzelzellen und *V. faba* L.-Schließzellen (ALLEN & SANDERS 1994a, JOHANNES & SANDERS 1995). Es deutet darauf hin, daß auch der wesentlich  $\text{Ca}^{2+}$ -selektivere  $\text{InsP}_3\text{R}$  aus *Z. mays* L. keine voneinander unabhängige Ionenpermeabilität besitzt und die Ionen um die Ionen-Bindungsstellen innerhalb der Kanalpore konkurrieren.

Mg<sup>2+</sup> als Ladungsträger [50 mM] führte bei dem InsP<sub>3</sub>R aus *Z. mays* L. in dieser hohen vakuolären Konzentration zu stark flickernden Öffnungsereignissen mit sehr kurzen Offenzeiten (Abb. 4.36A). Dies könnte auf eine sterische Blockierung des InsP<sub>3</sub>R durch Mg<sup>2+</sup> hinweisen, die z.B. von Ryanodin-aktivierbaren Ca<sup>2+</sup>-Kanälen des sarkoplasmatischen Retikulums bekannt ist (MEISSNER et al. 1986).

### Pharmakologie des InsP<sub>3</sub>R

Das Lanthan-Kation gilt als Ca<sup>2+</sup>-Kanalblocker in tierischen und pflanzlichen Zellen (HILLE 1992, PINEROS & TESTER 1995).

Für La<sup>3+</sup> konnte im Konzentrationsbereich von 0,1 µM bis 1 mM auf der vakuolären Seite eine dosisabhängige Hemmung für den InsP<sub>3</sub>R aus *Z. mays* L. festgestellt werden (Abb. 4.37A-C). Die halbmaximale Inhibition durch La<sup>3+</sup> konnte auf 8 µM abgeschätzt werden (Abb. 4.37D).

Übereinstimmend konnten KLÜSENER et al. (1995) am ER-Ca<sup>2+</sup>-Kanal von *B. dioica* Jacq. die halbmaximale Inhibition durch La<sup>3+</sup> auf 9 µM bestimmen. GELLI & BLUMWALD (1993) konnten ebenfalls eine Hemmung durch La<sup>3+</sup> an einem spannungsabhängigen und InsP<sub>3</sub>-insensitiven Ca<sup>2+</sup>-Kanal aus Vakuolen von *B. vulgaris* L.-Zellkulturzellen feststellen. Auch an spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen des Plasmalemmas von *Lycopersicon esculentum* L. konnten GELLI & BLUMWALD (1997) mit 10 µM La<sup>3+</sup> eine Hemmung nachweisen. Die Verwendung von La<sup>3+</sup> als "spezifischer" Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blocker erscheint somit im submillimolaren Konzentrationsbereich berechtigt zu sein. Eine K<sub>i</sub> von 8 µM für den durch InsP<sub>3</sub> aktivierbaren Ca<sup>2+</sup>-Kanal aus *Z. mays* L. weist darauf hin. Jedoch erscheint eine Verwendung im millimolaren Konzentrationsbereich pharmakologisch irrelevant. So zeigten LEWIS & SPALDING (1998) bei einer Konzentration von 10 mM La<sup>3+</sup> auf der apoplastischen Seite eine Hemmung des durch Blaulicht aktivierbaren plasmalemmaständigen Anionenkanals aus *A. thaliana* L.

Das Gadolinium-Kation (Gd<sup>3+</sup>) ist ein weiteres Kation aus der Gruppe der Lanthanoiden, welches zur spezifischen Hemmung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen verwendet wird. Für Gd<sup>3+</sup> konnte bei einer Konzentration von 100 µM auf der vakuolären Seite eine reversible 13%ige Hemmung der Offenwahrscheinlichkeit für den InsP<sub>3</sub>R aus *Z. mays* L. festgestellt werden (Abb. 4.38).

JOHANNES et al. (1992) konnten an tonoplastenangereicherten Mikrosomen aus *B. vulgaris* L.-Speicherwurzeln mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  eine 34%ige Hemmung der  $\text{InsP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und eine 91%ige Hemmung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung beobachten. Dies spricht für eine pharmakologische Relevanz für  $\text{Gd}^{3+}$  zur Unterscheidung zwischen spannungsabhängigen und  $\text{InsP}_3$ -aktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen. Spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle scheinen eine höhere Sensitivität gegenüber  $\text{Gd}^{3+}$  aufzuweisen. So konnten ALLEN & SANDERS (1994a) an Vakuolen von Schließzellen aus *Vicia faba* L. eine dosisabhängige Hemmung ( $K_{1/2} = 10,3 \mu\text{M}$ ) auf der vakuolären Seite eines einwärtsrichtenden 27 pS  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals zeigen. Weiterhin konnten KLÜSENER et al. (1995) am spannungsabhängigen ER- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal von *B. dioica* Jacq. die halbmaximale Inhibition durch  $\text{Gd}^{3+}$  auf 1  $\mu\text{M}$  bestimmen.

$\text{Zn}^{2+}$  ist ein Kation der II. Nebengruppe und wird ebenfalls zur Hemmung von  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Ionenkanälen verwendet.

Für  $\text{Zn}^{2+}$  konnte bei einer Konzentration 1 mM auf der vakuolären Seite eine reversible 80%ige Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit für den  $\text{InsP}_3\text{R}$  aus *Z. mays* L. festgestellt werden (Abb. 4.39).

Im Gegensatz dazu konnten JOHANNES et al. (1992) an tonoplastenangereicherten Mikrosomen aus *B. vulgaris* L.-Speicherwurzeln mit 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  nur eine 4%ige Hemmung der  $\text{InsP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und eine 80%ige Hemmung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung beobachten. Die wesentlich höhere Sensitivität des  $\text{InsP}_3\text{R}$  aus *Z. mays* L. für  $\text{Zn}^{2+}$  ist hierbei nicht durch eine höhere unspezifische Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  an die Mikrosomenmembran erklärbar. Auch die oben schon genannten Patch-Clamp-Publikationen wurden unter Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  (ALEXANDRE et al. 1990) und 200  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  (ALLEN & SANDERS 1994b) auf der zytoplasmatischen Seite durchgeführt.  $\text{Zn}^{2+}$  wurde dort zur Reduzierung von Störströmen, d. h. von in die Vakuole gerichteten Ionenströmen, verwendet. Möglicherweise könnte eine unterschiedliche Sensitivität durch die Verwendung von  $\text{Zn}^{2+}$  auf der vakuolären Seite vorliegen. So konnten KLÜSENER et al. (1995) am spannungsabhängigen ER- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal von *B. dioica* Jacq. demonstrieren, daß  $\text{Gd}^{3+}$  den ER- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal nur blockierte, wenn es an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintrittsseite präsent war. Umgekehrt war keine Blockierung nachzuweisen.

### 5.2.2.2 Ryanodin

Vakuolensuspensionen von *Z. mays* L. setzten nach Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin innerhalb von 10 - 15 min durchschnittlich 22 % des bereits aufgenommenen bzw. noch enthaltenen  $\text{Ca}^{2+}$  frei (s. Abb. 4.10). Es konnte nachgewiesen werden, daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom durch einen Ryanodin-aktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal mit 122 pS Leitfähigkeit erfolgte (s. Kap. 4.3.3).

### InsP<sub>3</sub>-unabhängige Signaltransduktion

Der Ryanodin-Rezeptor- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Komplex (RyR) scheint eine weitere wichtige Komponente für eine InsP<sub>3</sub>-unabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion in eukaryotischen Zellen zu sein. Jedoch erscheint die Benennung nach dem Pflanzenalkaloid Ryanodin mittlerweile problematisch, da inzwischen mit der zyklischen Adenosin-Diphosphat-Ribose (cADPR) vermutlich ein zelltypischer Agonist des RyR bekannt ist. In tierischen Geweben gilt auch hier das Vorkommen von mindestens drei Isoformen des RyR als gesichert (BERRIDGE 1993, MEISSNER 1994). Gegenüber der InsP<sub>3</sub>-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktionskette (s. o.) fehlt aber in der InsP<sub>3</sub>-unabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion via RyR bisher der Weg von der Bindung externer Stimuli an Zelloberflächenrezeptoren bis zur Entstehung des vermutlichen Agonisten cADPR.

Als erstes Indiz, daß cADPR als  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender Agonist in Eukaryoten fungiert, war die Feststellung, daß ein Metabolit von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) die Fähigkeit zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in Seeigel-Eiern besaß (CLAPPER et al. 1987, LEE et al. 1989) und als cADPR identifiziert wurde (LEE et al. 1989). cADPR entsteht durch die Synthese aus  $\text{NAD}^+$  mittels der ADP-Ribosyl-Zyklase und wird durch die cADPR-Hydrolase zu ADP-Ribose degradiert. Mittlerweile sind auch bifunktionale Enzyme, welche sowohl Zyklase- und Hydrolase-Aktivität besitzen, bekannt (HOWARD et al. 1993, ZOCCHI et al. 1993, HIRATA et al. 1994).

Verschiedene Untersuchungen konnten hierbei zeigen, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch cADPR von InsP<sub>3</sub> unabhängig ist. So wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch cADPR im Gegensatz zu InsP<sub>3</sub> durch vorherige Applikation von Ryanodin und Koffein unterdrückt (GALIONE et al. 1991). Auch 8-Azido-cADPR und 8-Amino-cADPR blockieren als cADPR-Antagonisten die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch cADPR, aber nicht durch InsP<sub>3</sub> (LEE et al. 1993, WALSETH & LEE 1993). Weiterhin blockieren Ruthenium Rot, Procain und  $\text{Mg}^{2+}$  die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch cADPR, nicht aber durch InsP<sub>3</sub>

(GALIONE et al. 1991, GRAEFF et al. 1995). Gerade die letztgenannten Antagonisten, welche auch als Antagonisten des RyR bekannt sind (SMITH et al. 1985, MEISSNER et al. 1986, XU et al. 1993), weisen darauf hin, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch cADPR via RyR erfolgt. Diese Ansicht wird unterstützt durch die Aktivierung von RyR durch cADPR (MÉSZARÓS et al. 1993). Es wird vermutet, daß cADPR an eine Adenin-Nukleotid bindende Rezeptor-Untereinheit des RyR bindet (WALSETH et al. 1993, SITSAPESAN et al. 1994, GALIONE & SUMMERHILL 1995).

Durch Ryanodin-aktivierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung von tonoplastenangereicherten Mikrosomen aus *B. vulgaris* L. konnten ALLEN et al. (1995) erstmals das Vorkommen des RyR in Pflanzen nachweisen. Mittels der Patch-Clamp-Technik konnten ALLEN et al. (1995) erstmals auch einen durch cADPR aktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Differenzstrom durch den Tonoplasten aus Vakuolen von *B. vulgaris* L. feststellen.

### **Ryanodin-aktivierbare $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuolensuspension**

In der vorliegenden Arbeit konnte an intakten Vakuolen erstmalig direkt nachgewiesen werden, daß pflanzliche Vakuolen eine Ryanodin-aktivierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aufweisen.

Vakuolen von *Z. mays* L. reagierten nach Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Ryanodin mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom von durchschnittlich 14 nM pro  $10^{-5}$  Vakuolen·ml<sup>-1</sup> (Abb. 4.10).  $\text{Ca}^{2+}$  wurde innerhalb von 10 - 15 min freigesetzt. Eine erneute  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme aus dem Medium konnte nicht nachgewiesen werden. Übereinstimmend zur  $\text{InsP}_3$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (s. o.) würde die Ryanodin-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung innerhalb dieser Zeitspanne zu einem relevanten Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  führen.

Wurde die durch Ryanodin freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge in Abhängigkeit der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium gesetzt, so zeigte sich eine Abnahme der freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge bei ansteigender freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium (Abb. 4.11A, (■)). Im submikromolaren Bereich wurden durchschnittlich 29 %, im mikromolaren Bereich durchschnittlich 14 % der enthaltenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge freigesetzt. Dies entspricht veröffentlichten Daten von tonoplastenangereicherten Mikrosomenpräparationen aus *B. vulgaris* L. (17 %  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch 100  $\mu\text{M}$  Ryanodin bei 10  $\mu\text{M}$  externen  $\text{Ca}^{2+}$ , ALLEN et al. 1995). ALLEN et al. (1995) konnten jedoch keine Abhängigkeit von der externen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration feststellen.

Die Darstellung des Flusses durch den Tonoplasten in Abhängigkeit der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Versuchsmedium (Abb. 4.11B (■)) zeigte hingegen eine deutliche Zunahme bei ansteigender externer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und entsprach ab einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  durchschnittlich  $147 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Eine Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Flusses durch den Tonoplasten bei ansteigender externer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im gezeigten Bereich steht im Einklang mit Einzelkanalmessungen,  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß- und Ryanodin-Bindungs-Studien am RyR von Skelettmuskeln (LAVIER et al. 1997, MEISSNER et al. 1997). Als Ursache wird die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an RyR-aktivierende Hochaffinitäts-Bindungsstellen ( $K_{\text{Ca}^{2+}} < 1 \mu\text{M}$ ) angesehen.

Wurde Ryanodin in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  appliziert zeigte sich keine Steigerung der Ryanodin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (Abb. 4.11A, (O)). Somit scheint die Reihenfolge der Applikation der Agonisten von Bedeutung zu sein (s. o.). In der Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$   $\text{InsP}_3$  zeigte sich jedoch eine schwache Zunahme des Ryanodin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Flusses (Abb. 4.11B, (O)). Dieser entsprach ab einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  durchschnittlich  $199 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### Der Ryanodin-aktivierbare $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Vakuolen von *Z. mays* L. nach Applikation von  $1 \mu\text{M}$  Ryanodin im *wv*-Modus einen durch Ryanodin aktivierbaren Differenzstrom aufwiesen (Abb. 4.40 und 4.41). Dieser Differenzstrom war mit einem Permeabilitätsverhältnis ( $P_{\text{Ca}^{2+}}:P_{\text{K}^+}$ ) von 0,8 selektiv für  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ein weiterer direkter Nachweis eines tonoplastenständigen RyR mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik konnte bisher nur an Vakuolen aus der Speicherwurzel von *B. vulgaris* L. erbracht werden. ALLEN et al. (1995) konnten einen durch cADPR aktivierbaren Differenzstrom durch den Tonoplasten im *wv*-Modus nachweisen. Vergleichbar zu Vakuolen von *Z. mays* L. war der Differenzstrom mit einem Permeabilitätsverhältnis ( $P_{\text{Ca}^{2+}}:P_{\text{K}^+}$ ) von 9 - 27:1 selektiv für  $\text{Ca}^{2+}$ , jedoch in höherem Ausmaße. Der Strom war mit einer  $K_m$  von  $32 \mu\text{M}$  für cADPR spezifisch.

Eine relativ geringe Selektivität gegenüber monovalenten Kationen scheint hierbei ein allgemeines Merkmal der RyR zu sein. So berichten LIU et al. (1989) von einem

Permeabilitätsverhältnis von  $P_{Ca^{2+}}:P_{Na^{+}} \sim 5$ ,  $P_{Ca^{2+}}:P_{K^{+}} \sim 6$  (SMITH et al. 1988, MA et al. 1988),  $P_{Ca^{2+}}:P_{K^{+}} \sim 19$  (HYMEL et al. 1988) und  $P_{Ca^{2+}}:P_{K^{+}} \sim 3,8$  (XU et al. 1993).

Die durch Ryanodin induzierte Stromdichte (Abb. 4.41C) liegt für *Z. mays* L.-Vakuolen mit  $7 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-2}$  bei -80 mV und  $26 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-2}$  bei +55 mV im Bereich der bei *B. vulgaris* L. berichteten durch cADPR induzierten Stromdichte ( $50 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-2}$  bei -80 mV, bzw.  $5 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-2}$  bei +80 mV; ALLEN et al. 1995).

Die Messungen in der *co*-Konfiguration legen nahe, daß der durch Ryanodin aktivierbare RyR im Tonoplasten von *Z. mays* L. unter den vorgegebenen Bedingungen eine Leitfähigkeit von ca. 122 pS besitzt (Abb. 4.43 und 4.44). Dies korrespondiert mit Leitfähigkeiten von RyR aus verschiedenen tierischen Geweben, wenn  $Ca^{2+}$  als Ladungsträger auf der *trans*-Seite (zytoplasmatisch) verwendet wurde: 100 pS (53 mM  $Ca^{2+}$ , SMITH et al. 1986, 1988; LIU et al. 1989), 100 und 125 pS (53 mM  $Ca^{2+}$ , EHRLICH & WATRAS 1988) und 103 pS (50 mM  $Ca^{2+}$ , SITSAPESAN & WILLIAMS 1996). Leitfähigkeiten zwischen 100 - 150 pS mit  $Ca^{2+}$  als Ladungsträger (MEISSNER 1994) scheinen somit ein allgemeines Merkmal der eukaryotischen RyR zu sein. Jedoch ist die Leitfähigkeit der RyR stark vom vorgegebenen Ladungsträger abhängig. Bei Verwendung monovalenter Kationen als Ladungsträger konnte eine Steigerung der Leitfähigkeit bis zu 800 pS beobachtet werden (MEISSNER 1994).

Im Gegensatz dazu konnten ALLEN et al. (1995) bei *B. vulgaris* L. keinen definierten, durch cADPR aktivierbaren Ionenkanal nachweisen. Bei *B. vulgaris* L. konnte nur die Aktivierung eines weiteren Ionenkanals mit schnellen Öffnungsereignissen ohne klar erkennbare Amplitude gezeigt werden. In gleicher Weise wurde die Aktivierung des RyR durch Ryanodin (MUIR et al. 1997) im Tonoplasten von *B. vulgaris* L. dargestellt. Diesbezüglich konnte die Aktivierung des RyR mittels Spannungsschritten von +55 bis -100 mV aus dem Tonoplasten von *Z. mays* L. durch Ryanodin (Abb. 4.42) und cADPR (Abb. 4.45) in der *co*-Konfiguration auch nur als schnelle Öffnungsereignisse eines weiteren Ionenkanals ohne klar erkennbare Amplitude nachgewiesen werden.

Als "spezifische" Antagonisten der Ryanodin- und cADPR-abhängigen  $Ca^{2+}$ -Freisetzung gelten neben  $Mg^{2+}$  (MEISSNER et al. 1986, LAVER et al. 1997) und Procain (GALIONE et al. 1991) auch Ruthenium Rot (GALIONE et al. 1991). Entsprechend konnte mit 1 und 100  $\mu\text{M}$  Ruthenium Rot auf der zytoplasmatischen Seite eine Hemmung der Öffnungsereignisse des durch 1  $\mu\text{M}$  cADPR und Ryanodin aktivierten RyR von *Z. mays* L. nachgewiesen werden (Abb. 4.46). Übereinstimmend konnten

ALLEN et al. (1995) mit 100  $\mu\text{M}$  Ruthenium Rot auf der zytoplasmatischen Seite eine Blockierung der durch cADPR induzierten Öffnungsereignisse an *B. vulgaris* L. in der *co*-Konfiguration nachweisen.

Mittlerweile kann Ruthenium Rot jedoch nicht mehr als spezifischer RyR-Blocker angesehen werden, womit eine diagnostische Aussage höchst fraglich erscheint. So konnten WHITE (1996) eine Reduzierung der Leitfähigkeit eines plasmalemmaständigen Kationenkanals aus *Secale cereale* L.-Wurzeln und PINEROS & TESTER (1998) eine irreversible Blockierung eines plasmalemmaständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals aus *Avena*-Wurzeln nachweisen.

### 5.2.2.3 Andere Kationenkanäle

#### Der schnell aktivierbare Ionenkanal

Der Strom durch den Tonoplasten von Vakuolen aus *Z. mays* L. Koleoptil-Proto-plasten ging bei einer vorgegebenen  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  von 1  $\mu\text{M}$  innerhalb von maximal 100 ms sowohl bei negativen als auch bei positiven Haltepotentialen in Sättigung über (Abb. 4.13A). Dabei zeigte die Übereinstimmung des Umkehrpotentials von Gesamtstrom- und Einzelkanalanalyse, daß der Strom durch den Tonoplasten von einem Kationenkanal mit ca. 19 pS Leitfähigkeit getragen wurde (Abb. 4.13B und 4.18A). Dieser Kationenkanal vom East-Vacuolar-Typ (FV) dominiert den Strom durch den Tonoplasten bei physiologischen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und konnte bisher noch im Tonoplasten von *B. vulgaris* L. (HEDRICH & NEHER 1987), *V. faba* L.-Schließzellen (ALLEN & SANDERS 1996, ALLEN et al. 1998) und *H. vulgare* L.-Mesophyllzellen (TIKHONOVA et al. 1997, BRÜGGEMANN et al. 1999) nachgewiesen werden.

Ein weiteres spezifisches Merkmal der bisher beschriebenen FV-Kanäle ist eine spannungsabhängige gleichrichtende Aktivierung bei unphysiologischen positiven Haltepotentialen, sowie eine reduzierte Leitfähigkeit bei Haltepotentialen zwischen -20 und -60 mV. Dies konnte auch für den FV-Kanal von Vakuolen aus *Z. mays* L. Koleoptil-Proto-plasten in der Gesamtstromanalyse (Abb. 4.13B) und in der Einzelkanalanalyse, sowohl in der *co*-Konfiguration (Abb. 4.16) als auch in der *ci*-Konfiguration (Abb. 4.20) gezeigt werden.

Bezüglich der beschriebenen Leitfähigkeiten des Ionenkanals zeigte sich mit 19 pS eine gute Übereinstimmung mit dem FV-Kanal aus *H. vulgare* L.-Mesophyllzellen (20 pS). Für *B. vulgaris* L. wurde eine größere Leitfähigkeit (30 - 40 pS), bei *V. faba* L.-Schließzellen hingegen eine kleinere Leitfähigkeit mit 6,4 pS festgestellt.

Der FV-Kanal von Vakuolen aus *Z. mays* L. Koleoptil-Protoplasten zeigte eine Selektivitätsreihe mit  $P_{K^+}:P_{Ca^{2+}}:P_{Na^+}:P_{Rb^+}:P_{Cl^-} = 1:0,8:1,7:1,4:0,16$ . Mit einer Selektivität von  $K^+$  über  $Cl^-$  von 6,2 zeigte der FV-Kanal von Vakuolen aus *Z. mays* L. Koleoptil-Protoplasten (Abb. 4.20 und 4.21A) eine vergleichbare Selektivität wie der FV-Kanal von *B. vulgaris* L. ( $P_{K^+}:P_{Cl^-} = 6:1$ ). Eine höhere Selektivität für  $K^+$  wurde für die FV-Kanäle aus *H. vulgare* L.-Mesophyllzellen ( $P_{K^+}:P_{Cl^-} = 30:1$ ) und *V. faba* L.-Schließzellen ( $P_{K^+}:P_{Cl^-} = 150:1$ ) unter relativ vergleichbaren Bedingungen festgestellt.

Für  $Ca^{2+}$  wurde für den FV-Kanal aus *Z. mays* L. (Abb. 4.13B und 4.18A) erstmals eine Selektivität festgestellt. Die beobachtete Selektivität für  $Ca^{2+}$  mag hierbei durch das hohe molare  $Ca^{2+}/K^+$ -Verhältnis auf der vakuolären Seite begründbar sein. Eventuell zeigt der hier vorgestellte schnell aktivierbare Ionenkanal vom FV-Typ die Charakteristik eines sogenannten Multi-Ion-Pore-Kanals (HILLE 1992). D. h., wegen des Selektivitätsfilters in der Kanalpore zeigt der Ionenkanal keine von einander unabhängige Bewegung der unterschiedlichen Ionenarten. TIKHONOVA et al. (1997) konnten eine voneinander abhängige Permeabilität von  $Ca^{2+}$  gegenüber  $K^+$  für den FV-Kanal aus Mesophyllzellen von *H. vulgare* L. zeigen.

Der schnell aktivierbare Kationenkanal aus dem Tonoplasten von *Z. mays* L.-Koleoptilzellen entspricht somit dem Typus eines FV-Kanals. Infolgedessen besitzt der Tonoplast von Koleoptilzellen aus *Z. mays* L. bei physiologischen zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen eine signifikante Permeabilität für  $K^+$ . Der FV-Kanal kann somit zur zellulären Osmoregulation beitragen und das Tonoplastenpotential in der Nähe des  $K^+$ -Gleichgewichtspotential einregulieren.

### **Der Ionenkanal mit 37 pS Leitfähigkeit**

Im Gegensatz zum FV-Kanal, war der Ionenkanal mit 37 pS Leitfähigkeit bei einer vorgegebenen zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration von 1  $\mu$ M bei Einzelkanalmessungen nicht nachzuweisen. Der Ionenkanal mit 37 pS Leitfähigkeit konnte nur bei einer unphysiologisch hohen zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration von 1 mM in der *ci*-Konfiguration nachgewiesen werden. Infolgedessen kann eine Aktivierung durch hohe zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen vermutet werden, die allerdings durch die  $Ca^{2+}$ -Toxizität in diesem Konzentrationsbereich nur lokal erhöht sein könnte.

Die vermutete Regulation durch die hohe zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und eine spannungsabhängige Aktivierung bei positiven Tonoplastenpotentialen (Abb. 4.48, 4.50 und 4.53) sind die typischen Merkmale für tonoplastenständige Ionenkanäle des Slow-Vacuolar-Typs (SV).

Die Leitfähigkeit von 37 pS in symmetrischen 100 mM KCl (Abb. 4.47) korrespondiert mit veröffentlichten Leitfähigkeiten monokotyledoner Pflanzen von 30 pS und 26 pS im positiven Spannungsbereich bei Mesophyll- und Aleuronzellen aus *H. vulgare* L. (POTTOSIN et al. 1997, BETHKE & JONES 1994). Für andere SV-Kanäle aus Schließzellen, Zellen der Aleuronschicht, Wurzelzellen und Zellkulturzellen höherer Pflanzen, sowie im Thallus von Farnen und Grünalgen wurden jedoch größere Leitfähigkeiten des Einzelkanals von 51 - 281 pS unter symmetrischen KCl-Konzentrationen berichtet (HEDRICH et al. 1986; HEDRICH & NEHER 1987; HEDRICH et al. 1988; MAATHUIS & PRINS 1991; PANTOJA et al. 1992a, b; REIFARTH et al. 1994; AMODEO et al. 1994; LINZ & KÖHLER 1994; WARD & SCHROEDER 1994; SCHULZ-LESSDORF & HEDRICH 1995).

Die Selektivitätsreihe mit  $P_{\text{K}^+}:P_{\text{Ca}^{2+}}:P_{\text{Na}^+}:P_{\text{Rb}^+}:P_{\text{Cl}^-} = 1:0,7:1:1,3:0,14$  für den Ionenkanal mit 37 pS Leitfähigkeit liegt im Bereich der für SV-Kanäle veröffentlichten Daten. Der SV-Kanal aus Aleuronzellen von *H. vulgare* L. (BETHKE & JONES 1994) wies jedoch mit  $P_{\text{K}^+}:P_{\text{Cl}^-} = 23$  eine höhere Selektivität für  $\text{K}^+$  gegenüber  $\text{Cl}^-$  auf.

Aufgrund der hier und in anderen Arbeiten festgestellten Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\text{Ca}^{2+}}:P_{\text{K}^+} = 5$ , WARD & SCHROEDER 1994;  $P_{\text{Ca}^{2+}}:P_{\text{K}^+} < 0,5$ , ALLEN & SANDERS 1995, 1996; SCHULZ-LESSDORF & HEDRICH 1995) und der Aktivierbarkeit durch ansteigende zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (HEDRICH & NEHER 1987, REIFARTH et al. 1994) wurde für den SV-Kanal eine Rolle für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuole vermutet (WARD & SCHROEDER 1994, WARD et al. 1995, ALLEN & SANDERS 1996, BARKLA & PANTOJA 1996). Jedoch zeigte die detaillierte Untersuchung von POTTOSIN et al. (1997), daß die Spannungs- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des SV-Kanals eine Rolle bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuole unwahrscheinlich machen (s. Kap. 5.2.3). Somit verbleibt die physiologische Funktion des SV-Kanals im Unklaren, obwohl er ubiquitär im pflanzlichen Tonoplasten vorkommt.

### Der Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit

Die relativ unspezifische Selektivität gegenüber mono- und divalenten Kationen und Anionen, mit der Selektivitätsreihe von  $P_{\text{K}^+}:P_{\text{Ca}^{2+}}:P_{\text{Na}^+}:P_{\text{Rb}^+}:P_{\text{Cl}^-} = 1 : 0,5 : 0,9 : 0,4 : 0,4$  (Kap. 4.3.5) für den Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit korrespondiert mit dem

oben beschriebenen SV-Typ. Durch die geringe Leitfähigkeit konnte der Ionenkanal jedoch erst bei unphysiologisch hohen Tonoplastenpotentialen beobachtet werden, wobei aber keine spannungsabhängige Aktivierung festgestellt werden konnte. Aufgrund der relativ unspezifischen Selektivität gegenüber mono- und divalenten Kationen und Anionen könnte der Ionenkanal mit 7 pS Leitfähigkeit für den Transport organischer Säuren zuständig sein.

### 5.2.3 Die Bedeutung der $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Ionenkanäle für die zytoplasmatische $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation und die zelluläre Signalübertragung

#### Entstehungsorte von $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen

Pflanzliche und tierische Zellen können prinzipiell zwei verschiedene Entstehungsorte für zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale benutzen:  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritt durch das Plasmalemma und  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Depots.

Die Erzeugung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen und -Oszillationen mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritt durch das Plasmalemma konnte für Schließzellen (MCAINSH et al. 1995) und *Fucus*-Rhizoide (TAYLOR et al. 1996) nahegelegt werden.

Als intrazellulärer Entstehungsort von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen in pflanzlichen und tierischen Zellen wird mittlerweile auch das Nukleoplasma angesehen, wobei das Nukleoplasma durchaus als intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ -Depot betrachtet werden kann (GERASIMENKO et al. 1995, STEHNO-BITTEL et al. 1995). Es wurde festgestellt, daß zytoplasmatische

$\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhungen im Nukleoplasma  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen auslösen können (LIPP et al. 1997), die vermutlich durch Aktivierung von  $\text{InsP}_3\text{R}$  und  $\text{RyR}$  der Kernhülle entstehen (HUMBERT et al. 1996, LIPP et al. 1997). Auch in pflanzlichen Zellen wird die Entstehung von zytoplasmatischen, bzw. nukleoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen und "-Spikes" am Nukleus-ER Komplex angenommen (GILROY et al. 1991, EHRHARDT et al. 1996, FRANKLIN-TONG et al. 1996, MALHÓ & TREWAVAS 1996).

Die pflanzliche Vakuole wird ebenfalls als intrazellulärer Entstehungsort von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen betrachtet. So konnten GILROY et al. (1991) in Schließzellen von *Commelina communis* nach Herabsetzung der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration die Entstehung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen am Tonoplasten beobachten.

Die Entstehung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen am ER konnte im Gegensatz zu tierischen Zellen in pflanzlichen Zellen bisher nicht nachgewiesen werden.



Die Entstehung von zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -„Spikes“ am Chloroplasten konnte an der einzelligen Grünalge *Eremosphaera viridis* demonstriert werden, wobei eine Beteiligung anderer intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Depots vermutet wird (BAUER et al. 1997).

Zum Verständnis der Entstehung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, der Bedeutung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Depots und zur Funktion verschiedener intrazellulärer second messenger ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{InsP}_3$ , cADPR) ist eine Betrachtung der „Signal“-Reichweite der verschiedenen second messenger notwendig.

### **$\text{Ca}^{2+}$ -Diffusionskoeffizient und -Pufferkapazität**

Die Diffusion von  $\text{Ca}^{2+}$  ist im Zytoplasma gegenüber einer wäßrigen Lösung wesentlich verlangsamt. In verschiedenen tierischen Zellen wurden für  $\text{Ca}^{2+}$  Diffusionskoeffizienten im Zytoplasma festgestellt, die 20 - 1000fach geringer als in Wasser waren (VON TSCHARNER et al. 1986, ALLBRITTON et al. 1992, CONNOR 1993). Die Verzögerung der Diffusion wird hierbei durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an zytosolische Phosphatverbindungen wie ATP [200  $\mu\text{M}$  - 2 mM] und PPI ([50 - 390  $\mu\text{M}$ ], EDWARDS et al. 1984, SMYTH & BLACK 1984), sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine, wie Calmodulin verursacht. Für pflanzliche Zellen wurde die zytosolische Konzentration von Calmodulin auf ca. 5 - 20  $\mu\text{M}$  abgeschätzt (LING & ASSMANN 1992, FISHER et al. 1996), die zytosolische Gesamtkonzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinbindungsstellen wurde hingegen in tierischen Zellen auf ca. 0,8 mM taxiert (VON TSCHARNER et al. 1986). Neben diesen mehr oder weniger passiven Diffusionsbarrieren für  $\text{Ca}^{2+}$ , trägt noch der aktive Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  in die pflanzlichen Endoorganelle, durch die in dieser Arbeit vorgestellten primär aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und sekundär aktiven  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter, maßgeblich zur Aufrechterhaltung einer submikromolaren zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und eines niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusionskoeffizienten bei. Hierbei ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusionskoeffizient nicht als statischer Wert aufzufassen, da Veränderungen der Bindungsstrenge der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Proteinbindungsstellen sowie die Regulation der Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (z. B. durch Calmodulin, ASKERLUND (1997)) diesen höchst dynamisch gestalten können.

Nennenswert ist hierbei, daß der eben beschriebene niedrige zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusionskoeffizient zum Verständnis der in pflanzlichen und tierischen Zellen beobachtbaren Phänome der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten, -Wellen und -Oszillationen, bzw.

für die Funktion der "second-messenger", wie  $\text{InsP}_3$  und cADPR beiträgt. ALLBRITTON et al. (1992) kalkulierten für eine punktförmige Freisetzung von  $\text{InsP}_3$  ( $[1,5 \mu\text{M}]$ ), bei einer von der  $\text{InsP}_3$ -Konzentration unabhängigen zytoplasmatischen Diffusionskonstante von  $268 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , eine Diffusions-Reichweite von  $24 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Hingegen kalkulierten sie für eine punktförmige Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[5 \mu\text{M}]$ ), bei einer von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängigen zytoplasmatischen Diffusionskonstante von  $13 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , eine Diffusions-Reichweite von  $5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Diese Abschätzung stimmt mit den bisher festgestellten Reichweiten von  $\text{Ca}^{2+}$  bei lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen gut überein ( $0,5 - 5 \mu\text{M}$ , BOOTHAM & BERRIDGE 1995). D. h. die relativ immobilen zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer begrenzen die punktförmige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals auf einen lokalen Bezirk, wenn dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nicht auf eine andere Weise weitergeleitet wird. Andererseits eignet sich  $\text{InsP}_3$  mit einer kalkulierten Diffusions-Reichweite von  $24 \mu\text{m}$  als globaler Informationsträger in Zellen.

ALLBRITTON et al. (1992) führten auch Versuche zur zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferkapazität durch. Hierbei wurde festgestellt, daß die Applikation von  $13 \mu\text{M}$  oder  $100 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zu einem Anstieg der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ca.  $100 \text{ nM}$  auf  $1 \mu\text{M}$  oder  $20 \mu\text{M}$  erfolgte.

Unter Verwendung dieser Hintergrunddaten ergibt sich folgende Abschätzung für die physiologische Relevanz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports durch den Tonoplasten von *Z. mays* L. Bei einer abgeschätzten  $\text{InsP}_3\text{R}$ -Dichte von einem  $\text{InsP}_3\text{R} \cdot 7 \mu\text{m}^2$  (s. Kap. 5.2.2) und einer Leitfähigkeit von ca.  $1 \text{ pA}$  im Bereich der physiologischen Tonoplastenpotentiale (s. Abb. 4.28B), ergibt sich für einen  $\text{InsP}_3\text{R}$  eine Transportrate von ca.  $3 \cdot 10^6 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen pro  $7 \mu\text{m}^2$  Tonoplastenoberfläche. Für eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  von  $100 \text{ nM}$  auf  $1 \mu\text{M}$  (durch Freisetzung von  $13 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , s. o.) in einem Volumen von  $7 \mu\text{m}^3$  müßte bei einer Transportrate von  $3 \cdot 10^6 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ca.  $0,3 \text{ ms}$  öffnen. Bei einer Volumenhöhe von  $5 \mu\text{M}$  ( $35 \mu\text{m}^3$ ) würde die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  von  $100 \text{ nM}$  auf  $1 \mu\text{M}$  eine Öffnung von  $10 \text{ ms}$  Dauer beanspruchen. Unter Verwendung einer 370fach geringeren Transportrate (Vakuolensuspension) ergeben sich Öffnungszeiten von  $130 \text{ ms}$  und  $2,5 \text{ s}$ . D. h. die mit der Vakuolensuspension erhaltenen Transportraten liegen an der Grenze der physiologischen Relevanz, da im physiologischen Bereich der Tonoplastenpotentiale die Offenzeiten des  $\text{InsP}_3\text{R}$  weitgehend unter  $50 \text{ ms}$  lagen (Abb. 4.30A).

Da der  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusionskoeffizient und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferkapazität nicht als statische Werte aufzufassen sind, wurden Kalkulationen mit höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferkapazitäten vorgenommen. Bei einer 80fachen Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferkapazität (d. h. 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung resultieren in 1  $\mu\text{M}$  freies zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ ) würde eine Öffnungszeit von 30 ms ( $7 \mu\text{m}^3$ ) und 560 ms ( $35 \mu\text{m}^3$ ) benötigt. Eine 1000fache Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferkapazität (d. h. 13000  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung resultieren in 1  $\mu\text{M}$  freies zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ ) bedarf hingegen einer Offenzeit von 360 ms ( $7 \mu\text{m}^3$ ) und 7,2 s ( $35 \mu\text{m}^3$ ). Somit wären auch hier die Grenzen der physiologischen Relevanz für die mit der Patch-Clamp-Technik erhaltenen Transportraten erreicht. Dies aber nur unter dem Vorbehalt, daß kein lokal gehäuftes Auftreten des  $\text{InsP}_3\text{R}$  vorliegt.

Die Abschätzungen zeigen somit, daß der  $\text{InsP}_3$ -aktivierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom durch den Tonoplasten von *Z. mays* L. zur Generierung eines zytosomatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals geeignet ist. Ähnliche Abschätzungen ergeben sich für den Ryanodin-aktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom. Da die mit der Vakuolensuspension gemessenen Transportraten für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase,  $\text{InsP}_3\text{R}$  und RyR gerade im untersten Bereich der physiologischen Relevanz liegen, ist anzunehmen, daß präparations- oder systembedingte Schädigungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter vorliegen. Jedoch zeigte auch der Einsatz von Protease-Inhibitoren keine Steigerung der Transportraten.

### **Aspekte zur räumlichen Organisation der $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter**

Grundlegender Unterschied bei der Verteilung von RyR und  $\text{InsP}_3\text{R}$  zwischen tierischen und pflanzlichen Zellen ist die räumliche Verteilung der Rezeptoren durch das Vorkommen der RyR und  $\text{InsP}_3\text{R}$  im pflanzlichen Tonoplasten. Dies ist bemerkenswert, da bei der Forschung an tierischen Zellen sich mittlerweile die Meinung durchgesetzt hat, daß in verschiedenen Systemen die Merkmale der komplexen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen und -Oszillationen letztendlich nicht durch Zufall, sondern durch die Proportionen der Verteilung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter innerhalb einer individuellen Zelle entstehen, welches "Ca<sup>2+</sup>-Fingerabdruck" benannt wurde (PRENTKI et al. 1988). Daß im Grunde genommen die räumliche Organisation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter die Antwortcharakteristik bestimmen kann, beinhaltet die oben angesprochene Limitation der  $\text{Ca}^{2+}$ -, RyR-Agonisten- und  $\text{InsP}_3$ -Diffusion im Zytoplasma. Die limitierte Reichweite der  $\text{Ca}^{2+}$ -, RyR-Agonisten- und  $\text{InsP}_3$ -Diffusion bedingt eine strategische Verteilung von

intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Depots innerhalb der Zellregionen, wo eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung benötigt wird (THOMAS et al. 1996). Eine strategische Verteilung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Depots ist auch dann notwendig, wenn eine diffusionsunabhängige Form der  $\text{Ca}^{2+}$ -Weiterleitung, wie die sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung an Vakuolen angenommen wird (WARD et al. 1995).

### **InsP<sub>3</sub>R und RyR als Entstehungsorte komplexer $\text{Ca}^{2+}$ -Signale**

Als kleinste Elementar-Einheit der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wird das Öffnen eines individuellen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Ionenkanals betrachtet, wobei aufgrund der freigesetzten, "gequantelten"  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge bei tierischen Zellen zwischen RyR (sog. "quarks") und InsP<sub>3</sub>R (sog. "blibs") unterschieden wurde (BOOTMAN & BERRIDGE 1995, CLAPHAM 1995, BERRIDGE 1997). Diese scheinen in tierischen Zellen in lokalen Kanal-verbänden als nächsthöhere Organisationstufe vereinigt zu sein, die wiederum eine "gequantelte"  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge (sog. "puffs") freisetzen können. Solche intrazellulären, lokal begrenzten Orte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurden auch in Pollenschläuchen, Protoplasten und Schließzellen bei Aufnahmen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen vorgefunden, und könnten das pflanzliche Pendant der oben aufgeführten tierischen Strukturen sein (GILROY et al. 1991; SHACKLOCK et al. 1992; MALHÓ et al. 1994, 1995). Die elementaren Einheiten für agonistenabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in tierischen Zellen werden als Initiationspunkte bei der Entstehung von zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen angesehen (s. u.), wobei diese abhängig vom Zelltyp aus RyR oder InsP<sub>3</sub>R bestehen können (BOOTMAN & BERRIDGE 1995). Hierbei konnte an Oozyten von *Xenopus laevis* festgestellt werden, daß niedrige zytoplasmatische InsP<sub>3</sub>-Dosen die keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen generieren, dosisabhängig die Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -"Puffs" regulieren (THOMAS et al. 1996). Solch kleine Fluktuationen von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  in der Nähe der "Ruhekonzentration" von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  scheinen hierbei nicht einfach ein "weißes Rauschen" ohne Informationsinhalt darzustellen, sondern können für biologische Systeme mittels des Prinzips der stochastischen Resonanz Information beinhalten (BEZRUKOV & VODYANOV 1995).

Neben den oben schon erwähnten lokal begrenzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen wurden in pflanzlichen Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -„Spikes“,  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen beobachtet (KNIGHT et al. 1991, MALHÓ & TREWAVAS 1996, FELLE 1988a).

$\text{Ca}^{2+}$ -„Spikes“, d. h. vorübergehende lokale Erhöhungen von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$ , konnten in transgenischen Tabakkeimlingen durch verschiedenste externe Stimuli (Licht, Temperatur u. a.) ausgelöst werden (KNIGHT et al. 1991, MALHÓ et al. 1998). Hierbei zeigte jeder externe Stimulus ein spezifisches Muster des  $\text{Ca}^{2+}$ -„Spikes“ hinsichtlich der Zeit bis zum Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, der Dauer bis zum Erreichen der maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, der Amplitude und der Dauer der Abklingzeit. Bemerkenswert ist hierbei, daß in individuellen tierischen Zellen verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Agonisten zur charakteristischen Veränderung des Musters der  $\text{Ca}^{2+}$ -„Spikes“, insbesondere der Abklingzeit, führen können (ROONEY et al. 1989, PETERSEN et al. 1991). Durch das Vorkommen von RyR und  $\text{InsP}_3\text{R}$  im Tonoplasten scheint die Vakuole auch zur Generierung solcher Signale geeignet. Die Verdoppelung des  $\text{InsP}_3$ -induzierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Flusses in Gegenwart von Ryanodin (Abb. 4.9B (o)) weist darauf hin, daß die Vakuole durch die differenzierte Aktivierung beider Rezeptorsysteme ein beträchtliches Potential zur Variation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen besitzt.

Diese spezifischen Muster eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals scheinen hierbei grundlegende Informationselemente der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signaltransduktion zu sein. DOLMETSCH et al. (1997) konnten anhand der Proteintranslokation, Proteinphosphorylation und Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren in B-Lymphozyten zeigen, daß die Amplitude und Dauer eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, aufgrund differenzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und kinetischen Verhaltens, zu einer unterschiedlichen Aktivierung verschiedener physiologischer Prozesse führen kann. Somit scheinen bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signaltransduktion Amplituden- und Frequenzmodulation des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals eine wichtige Rolle bei der zellulären „Informationsverarbeitung“ zu spielen (BERRIDGE 1997, ITO et al. 1997). Eine Frequenzmodulation des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals konnten MCAINSH et al. (1995) durch Veränderung der externen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an Schließzellen von *C. communis* zeigen. Die Dekodierung frequenzmodulierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale scheint hierbei durch die frequenzabhängige Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ - und Calmodulin-abhängiger Proteinkinasen möglich zu sein (BRAUN & SCHULMAN 1995, DE KONINCK & SCHULMAN 1998).

Neben diesen einfachen lokalen Erhöhungen von  $[Ca^{2+}_{zyt}]$  stellt sich die Frage nach dem Entstehungs-Mechanismus der in Maiskoleoptilen vorgefundenen zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Oszillationen und der Einbindung der Vakuole in diese. Kann die Vakuole als Initiator von komplexen  $Ca^{2+}$ -Signalen fungieren? Nehmen wir als Gedankenbeispiel die Reaktion von Auxin auf die Koleoptile von *Z. mays* L. (FELLE 1988a) und setzen einfach voraus, daß Auxin nach Bindung an einem Oberflächenrezeptor zur vermuteten Freisetzung von  $InsP_3$  durch Phospholipase C in Maiskoleoptilen führt (POLEVOI et al. 1996).

Ist das Plasmalemma-Signal der  $InsP_3$ -abhängigen Signaltransduktionskette klein, werden nur geringe Konzentrationen an  $InsP_3$  gebildet.  $InsP_3$  kann nun als "globaler" Informationsbote durch das Zytoplasma diffundieren, wobei jedoch nur wenige  $InsP_3R$  aktiviert werden, was vermutlich zur oben beschriebenen lokal begrenzten "gequantelten"  $Ca^{2+}$ -Freisetzung führen würde. Die Generation von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Wellen oder -Oszillationen aus Endoorganellen, mit  $InsP_3R$  als Initiationspunkt kann nach dem "one-pool"-Modell (LECHLEITER & CLAPHAM 1992, DELISLE & WELSH 1992) folgendermaßen begründet werden. Durch die glocken-förmige  $[Ca^{2+}_{zyt}]$ -Abhängigkeit des  $InsP_3R$ , mit einer Aktivierung im niedrigen  $[Ca^{2+}_{zyt}]$ -Bereich und einer Inhibition im hohen  $[Ca^{2+}_{zyt}]$ -Bereich (Abb. 4.9A (■)) könnte der  $InsP_3R$  als selbstregulierter,  $InsP_3$ -abhängiger  $Ca^{2+}$ -induzierter  $Ca^{2+}$ -Freisetzung-Kanal funktionieren. In der Gegenwart einer konstant niedrigen  $InsP_3$ -Konzentration würde der  $InsP_3R$  mit einer langsamen Rate  $Ca^{2+}$  freisetzen, bis die lokale  $[Ca^{2+}_{zyt}]$  einen Punkt erreicht, wo die  $InsP_3R$ -Sensibilisierung zu greifen beginnt. Dieser Punkt könnte aber auch durch eine höhere zytoplasmatische  $InsP_3$ -Konzentration und eine damit verbundene vermehrte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung, sowie durch eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}_{zyt}]$  durch plasmalemmaständige  $Ca^{2+}$ -Kanäle erreicht werden. An diesem Punkt führt der positive Rückkopplungseffekt des freigesetzten  $Ca^{2+}$  am  $InsP_3R$  zu einer beschleunigten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung, die ein  $Ca^{2+}$ - "Spike" zum Resultat haben könnte. Das extern appliziertes Auxin zu einem  $Ca^{2+}$ - "Spike" führen kann, zeigen Messungen an transgenischen Tabak (MALHÓ et al. 1998). Daß FELLE (1988a) mittels  $Ca^{2+}$ -selektiven Mikroelektroden an *Z. mays* L.-Koleoptilen keine  $Ca^{2+}$ - "Spikes" beobachten konnte, mag eventuell an der zu geringen zeitlichen Auflösung und Sensitivität der Mikroelektroden gegenüber hoch auflösenden Messungen mit  $Ca^{2+}$ -

sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen liegen (BAUER et al. 1997, SCHÖNKNECHT et al. 1998). Die lokale Diffusion des freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  kann nun wiederum andere nahe gelegene  $\text{InsP}_3\text{R}$  sensibilisieren und zum gleichen autokatalytischen Prozeß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung führen. In dieser Weise könnte durch die räumliche Verteilung der  $\text{InsP}_3\text{R}$  eine zyttoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle über dem Tonoplasten durch  $\text{InsP}_3$ -abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung entstehen. Hierbei können bei einer konstanten  $\text{InsP}_3$ -Konzentration durch negative Rückkopplung des  $\text{InsP}_3\text{R}$  durch  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$ , bzw. durch die eigene Inaktivierung des  $\text{InsP}_3\text{R}$  auch Oszillationen von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  erklärt werden (HAJNÓCZKY & THOMAS 1994, 1997).

Wegen der pH-Abhängigkeit der  $\text{InsP}_3$ -Bindung am  $\text{InsP}_3\text{R}$  (WORLEY et al. 1987, BROSNAN & SANDERS 1993) ist auch an eine mögliche Interaktion mit zytosolischen pH-Oszillationen zu denken, die in *Z. mays* L. nach Auxineinwirkung beobachtet wurden (FELLE et al. 1986, 1992; FELLE 1988a). Unter Berücksichtigung der tonoplastenständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und deren Steuerung durch Calmodulin, ergibt sich mit den tonoplastenständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen ein weiteres oszillationsfähiges System. Hierbei führt  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zur einer Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen, die nun wiederum das freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  verstärkt in den Tonoplasten transportieren. Wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch den ansteigenden transmembranen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten positiv rückgekoppelt, wie es am ER- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal von *B. dioica* Jacq. demonstriert wurde (KLÜSENER et al. 1995), ergibt sich ein oszillationsfähiges System. Gerade ein solcher oszillierender Membrankreislauf könnte für tonoplastengebundene  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Proteine ein Signal darstellen (RASMUSSEN 1989).

### **Interaktion von $\text{InsP}_3\text{R}$ und RyR mit weiteren $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Ionenkanälen?**

Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuole mit  $\text{InsP}_3\text{R}$  und RyR als Entstehungspunkt ist auch durch die direkte und indirekte Aktivierung anderer tonoplastenständiger Ionenkanäle denkbar.

Die Aktivierung des  $\text{InsP}_3\text{R}$  und RyR könnte aufgrund des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstroms zu einer Depolarisation des Tonoplastenpotentials führen. Im Falle des RyR, der eine wesentlich geringere Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{K}^+$  hat, würde sich jedoch das Tonoplastenpotential mehr in Richtung  $E_{\text{K}^+}$  bewegen. Durch die Depolarisation des Tonoplastenpotentials könnten nun spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geöffnet wer-

den, die eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuole erlauben. JOHANNES et al. (1992) konnten an tonoplastenangereicherten Vesikeln aus *B. vulgaris* L. nach künstlich eingeleiteter Depolarisation eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle demonstrieren.

Weiterhin ist an eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch den SV-Kanal, bzw. depolarisationsinduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch den FV-Kanal zu denken (s. Kap. 5.2.3). Beide Ionenkanaltypen sind im Tonoplasten von *Z. mays* L. vorhanden, besitzen unter den in dieser Arbeit vorgegebenen Bedingungen eine Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  und werden durch positive Tonoplastenpotentiale aktiviert. Durch die gegenüber  $\text{InsP}_3\text{R}$  wesentlich höhere Kanaldichte von mind. einen FV- oder SV-Kanal- $\mu\text{m}^{-2}$  (TIKHONOVA et al. 1997, POTTOSIN et al. 1997) könnten diese Kationenkanäle, auch bei einer unter physiologischen Bedingungen scheinbar zu vernachlässigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate in das Zytoplasma (POTTOSIN et al. 1997), bei der Generierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen, z. B. durch Sensibilisierung von RyR und  $\text{InsP}_3\text{R}$ , eine wichtige Rolle spielen.

Die pflanzliche Vakuole scheint somit ein wichtiger Bestandteil der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation und zellulären Signalübertragung zu sein. Obwohl der Tonoplast mit  $\text{InsP}_3\text{R}$  und RyR,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter im Prinzip zur Erzeugung komplexer zytoplasmatischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale befähigt ist, kann der Tonoplast aber nur als ein Glied in der Kette der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation und zellulären Signalübertragung betrachtet werden. So zeigten BAUER et al. (1997), daß der RyR-Agonist Koffein in *E. viridis* repetitive  $\text{Ca}^{2+}$ -„Spikes“ aus intrazellulären Depots generiert, diese  $\text{Ca}^{2+}$ -„Spikes“ vermutlich aber wiederum abhängig von der Aktivität plasmalemmständiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sind. Allerdings scheinen nicht nur intra- und extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Depots einer einzigen Zelle, sondern verschiedene pflanzliche Zellen miteinander „kommunizieren“ zu können (ROBARDS & LUCAS 1990, TUCKER & BOSS 1996, STAEHELIN 1997).

### Aussicht

Mit den hier vorgelegten Resultaten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports durch den Tonoplasten von *Z. mays* L. sind die bisher bekannten Transportmechanismen für  $\text{Ca}^{2+}$  an der pflanzlichen Vakuole aufgezeigt worden. Sie weisen darauf hin, daß mit der

isolierten Vakuole von *Z. mays* L. in einem zellfreien System weitere Untersuchungen zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport möglich sind.

Für die weitere grundlegende Erforschung des  $\text{InsP}_3\text{R}$  und  $\text{RyR}$  im Tonoplasten von *Z. mays* L. bietet sich natürlich die Patch-Clamp-Technik an. Hier ist u. a. an das Öffnungsverhalten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gegenüber physiologischer  $\text{K}^+$ -Gradienten,  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$ -Regulierung,  $\text{pH}_{\text{zyt}}$ -Regulierung und Dosis-Wirkungskurven der Agonisten zu denken. Um diese Messungen im *wv*-Modus bei physiologischen  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  zu erleichtern, sollte jedoch ein "spezifischer" Inhibitor des FV-Kanals gefunden werden. Weiterhin ist an die Regulierung des  $\text{InsP}_3\text{R}$  durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, ATP u. a. zu denken (FERRIS et al. 1990, 1991). Ähnliches gilt für die Regulation des  $\text{RyR}$  (MEISSNER 1994).

Für Messungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports in die Vakuole via  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase scheint jedoch die Patch-Clamp nicht geeignet zu sein. Die hier und in anderen Arbeiten mit Vakuolen-suspensionen gemessenen Flußraten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports durch den Tonoplasten ergeben einen Strom, der im Bereich von einem pA pro Vakuole liegt. Dies ist im *wv*-Modus nicht auflösbar. Der scheinbar limitierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport der Vakuolensuspension (s. o.) könnte jedoch mittels neuer Meßmethoden, die Messungen an Einzel-Vakuolen erlauben, optimiert werden. Die Freisetzung von einzelnen Vakuolen mittels EDTA befüllten Mikropipetten erlaubt hierbei eine wesentlich schonendere und schnellere Präparation der Vakuolen. Für Messungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports in die Vakuole bzw. agonistenabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, sei unter elektrophysiologischen Gesichtspunkten die "microelectrode ion-flux estimation"-Technik erwähnt (NEWMAN et al. 1987), die schon bei Messungen zum  $\text{H}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport durch das Plasmalemma von *Z. mays* L.-Protoplasten erfolgreich angewandt wurde (SHABALA et al. 1998). Gegenüber Messungen mit tonoplastenangereicherten Vesikeln erscheint hier die Aufrechterhaltung der natürlichen Membrantopologie des Tonoplasten von großem Wert.

Die Verwendung immunozytochemischer und fluoreszenzoptischer Methoden könnte auch wertvoll zur Etablierung des zellfreien Systems Vakuole sein. So würde die Verwendung von Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen zur Darstellung der räumlichen Verteilung von  $\text{RyR}$ ,  $\text{InsP}_3\text{R}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen am Tonoplasten beitragen (THEODOULOU et al. 1994). In gleicher Weise könnte durch die verbesserten Dar-

stellungsmöglichkeiten der digitalen, bildgebenden Fluoreszenzmikroskopie, mittels neuer  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluoreszenzfarbstoffe und  $\text{Mn}^{2+}$ -„Quenching“ die Rolle und das Vorkommen von RyR,  $\text{InsP}_3\text{R}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen am Tonoplasten der pflanzlichen Zelle aufgeklärt werden. Gerade hier böte sich die Möglichkeit des Vergleiches zwischen *in vitro* Untersuchungen an der Vakuole, und *in vivo* Untersuchungen am Protoplasten bzw. an der ganzen Koleoptile an (GEHRING et al. 1990a, b; HAJNÓCZKY & THOMAS 1997).

## 6. Zusammenfassung

An isolierten Einzel-Vakuolen und Vakuolensuspensionen aus *Z. mays* L.-Koleoptilen konnte erstmals gleichzeitig an einem Objekt mittels Patch-Clamp-Technik (Ganzvakuolenableitung: *ww*-Konfiguration, Einzelkanalanalyse: *co*- und *ci*-Konfiguration), extravakuolärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Bestimmung ( $\text{Ca}^{2+}$ -selektive Mini-Elektroden) und intravakuolärer pH-Bestimmung (Acridinorangeabsorption) direkte Nachweise zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in die Vakuole ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter), sowie zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuole (InsP<sub>3</sub>-Rezeptor-Kanal-Komplex (InsP<sub>3</sub>R) und Ryanodin-Rezeptor-Kanal-Komplex (RyR)) erbracht werden.

I.  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in die Vakuole durch primär aktive  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und sekundär aktiven  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter:

Mit Vakuolensuspensionen wurden Versuche zur Aktivität der zur Energetisierung des sekundär aktiven  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters verantwortlichen Protonenpumpen, der vakuolären  $\text{H}^+$ -ATPase (*v*- $\text{H}^+$ -ATPase) und Pyrophosphatase (PPase), durchgeführt.

Die Vakuolen von *Z. mays* L. wiesen nach der Präparation zum Versuchsmedium einen pH-Gradienten von 1,5 Einheiten auf. Die Aktivität der *v*- $\text{H}^+$ -ATPase und PPase resultierte in einer weiteren Absenkung des vakuolären pH um 0,9 Einheiten auf pH  $4,8 \pm 0,2$  in einem Zeitraum von 30 min bzw. 4 - 6 h. Die halbmaximale Aktivierung der Protonentranslokation der *v*- $\text{H}^+$ -ATPase durch ATP wurde auf 125  $\mu\text{M}$  bestimmt. Die halbmaximale Inhibition der Protonentranslokation der *v*- $\text{H}^+$ -ATPase durch Bafilomycin wurde auf 120 pM bestimmt.

An Vakuolensuspensionen konnte ein ATP-abhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in die Vakuole beobachtet werden, der durch Bafilomycin nicht hemmbar war. Der ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß hatte eine maximale Transportrate von  $152 \text{ pmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Die Auswirkung von 10  $\mu\text{M}$  bis 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  auf den im Gleichgewicht befindlichen Protonengradienten zeigte einen partiellen, konzentrationsabhängigen Abbau desselben. Die Ergebnisse sprechen für die Existenz einer tonoplastenständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters.

## II. $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuole durch $\text{InsP}_3\text{R}$ und $\text{RyR}$ :

Vakuolensuspensionen von *Z. mays* L. reagierten auf den Zusatz von Inositol-1,4,5-triphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) und Ryanodin mit einer von  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}]$  abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung.

Der  $\text{InsP}_3$ -aktivierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß hatte eine Transportrate von  $124 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und war in Gegenwart von Ryanodin auf  $279 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  steigerbar.

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik konnte in der *wv*-Konfiguration und Einzelkanalanalysen (*co*- und *ci*-Konfiguration) nachgewiesen werden, daß die durch  $\text{InsP}_3$  induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung der Vakuolensuspension von einem  $\text{InsP}_3$ -aktivierbaren und hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) mit 12 pS Leitfähigkeit verursacht wurde. Die  $\text{InsP}_3\text{R}$ -Dichte wurde zu  $1 \text{ InsP}_3\text{R}\cdot 7 \mu\text{m}^{-2}$ , bei einer Transportrate von  $103 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  bestimmt. Der  $\text{InsP}_3\text{R}$  hatte die relative Selektivitätsreihe von  $P_{\text{Ca}^{2+}}: P_{\text{Sr}^{2+}}: P_{\text{Ba}^{2+}}: P_{\text{Mg}^{2+}}: P_{\text{K}^+} = 105 - 139 : 18 : 8 : 1,7 : 1$ . Die Leitfähigkeitsreihe des  $\text{InsP}_3\text{R}$  war ( $[50 \text{ mM } \text{X}^{2+}]$  auf der vakuolären Seite):  $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \approx \text{Ca}^{2+} = 21,1 : 17 : 15,5 : 12 \text{ pS}$ . Dies spricht für eine voneinander abhängige Permeation divalenter Kationen durch die Kanalpore.

Der  $\text{InsP}_3\text{R}$  war durch  $\text{La}^{3+}$  (halbmaximale Inhibition  $8 \mu\text{M}$ ),  $100 \mu\text{M } \text{Gd}^{3+}$  und  $1 \text{ mM } \text{Zn}^{2+}$  auf der vakuolären Seite reversibel hemmbar.

Der Ryanodin-aktivierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß durch den Tonoplasten hatte eine Transportrate von  $147 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und war in Gegenwart von  $\text{InsP}_3$  auf  $199 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  steigerbar.

Durch Analysen in der *wv*- und *co*-Konfiguration konnte nachgewiesen werden, daß die durch Ryanodin induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung der Vakuolensuspension von einem tonoplastenständigen, Ryanodin-aktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ( $\text{RyR}$ ) mit 122 pS Leitfähigkeit verursacht wurde. Der  $\text{RyR}$  hatte die relative Permeabilität von  $P_{\text{Ca}^{2+}}: P_{\text{K}^+} = 0,8:1$ . Der  $\text{RyR}$  war durch  $1 \mu\text{M}$  zyklische Adenosin-Diphosphat-Ribose aktivierbar und durch  $1 - 100 \mu\text{M}$  Ruthenium Rot hemmbar.

Eine Abschätzung der gemessenen Agonisten-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten ergab, unter Berücksichtigung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusionskonstante und -Pufferkapazität, daß  $\text{InsP}_3\text{R}$  und  $\text{RyR}$  ein Potential zur Generierung zytoplasmatischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale besitzen.

III. Am Tonoplasten aus *Z. mays* L. Koleoptil-Protoplasten konnten drei weitere Kationenkanäle nachgewiesen werden:

1. In der *wv*-, *co*- und *ci*-Konfiguration konnte ein spannungsabhängiger Kationenkanal vom Fast-Vacuolar-Typ (FV) mit einer Leitfähigkeit von 19 pS nachgewiesen werden. Der FV-Kanal hatte die relativen Permeabilitäten von  $P_{K^+}:P_{Ca^{2+}}:P_{Na^+}:P_{Rb^+}:P_{Cl^-} = 1:0,8:1,7:1,4:0,16$ . Bei einer normalen zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration besitzt der FV-Kanal ein Potential zur Einregulierung der zytoplasmatischen  $K^+$ -Homöostase.

2. In der *ci*-Konfiguration konnte ein spannungsabhängiger Kationenkanal vom Slow-Vacuolar-Typ (SV) mit einer Leitfähigkeit von 37 pS nachgewiesen werden. Der SV-Kanal hatte die relativen Permeabilitäten von  $P_{K^+}:P_{Ca^{2+}}:P_{Na^+}:P_{Rb^+}:P_{Cl^-} = 1:0,7:1:1,3:0,14$ .

3. In der *ci*-Konfiguration konnte ein spannungunabhängiger Kationenkanal mit einer Leitfähigkeit von 7 pS nachgewiesen werden. Der Kationenkanal hatte die relativen Permeabilitäten von  $P_{K^+}:P_{Ca^{2+}}:P_{Na^+}:P_{Rb^+}:P_{Cl^-} = 1 : 0,5 : 0,9 : 0,4 : 0,4$ .

## 7. Literatur

Alexandre J., Lassalles J. P. & Kado R. T. (1990):

Opening of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate.

Nature 343, 567-570

Alexandre J. & Lassalles J. P. (1992):

Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release by  $\text{InsP}_3$  in plants and the effect of buffers on  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion.

Philosophical Transactions of the Royal Society, London, Series B 338, 53-61

Allbritton N. L., Meyer T. & Stryer L. (1992):

Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-triphosphate.

Nature 258, 1812-1815

Allen G. J. & Sanders D. (1994a):

Two voltage-gated, calcium release channels coreside in the vacuolar membrane of broad bean guard cells.

Plant Cell 6, 685-694

Allen G. J. & Sanders D. (1994b):

Osmotic stress enhances the competence of *Beta vulgaris* vacuoles to respond to inositol 1,4,5-trisphosphate.

Plant Journal 6, 687-695

Allen G. J. & Sanders D. (1995):

Calcineurin, a type 2B protein phosphatase, modulates the  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable SV-ion channel of stomatal guard cells.

Plant Cell 7, 1473-1483

Allen G. J., Muir S. R. & Sanders D. (1995):

Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from individual plant vacuoles by both  $\text{InsP}_3$  and cyclic ADP-ribose.

Science 268, 735-737

Allen G. J. & Sanders D. (1996):

Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium.

Plant Journal 10, 1055-1069

Allen G. J., Amtmann A. & Sanders D. (1998):

Calcium-dependent and calcium-independent  $\text{K}^+$  mobilization channels in *Vicia faba* guard cell vacuoles.

Journal of Experimental Botany 49, 305-318

Amodeo G., Escobar A. & Zeiger E. (1994):

A cationic channel in the guard cell tonoplast of *Allium cepa*.

Plant Physiology 105, 999-1006

Amtmann A. & Sanders D. (1997):

A unified procedure for the correction of liquid junction potentials in patch clamp experiments on endo- and plasmamembranes.

Journal of Experimental Botany 48, 361-364

Askerlund P. (1997):

Calmodulin-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in the vacuolar and plasma membrane in cauliflower.

Plant Physiology 114, 999-1007

Barkla B. J. & Pantoja O. (1996):

Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants.

Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47, 159-184

Barry P. H. & Lynch W. L. (1991):

Liquid junction potentials and small effects in patch-clamp analysis.

Journal of Membrane Biology 121, 101-117

- Bauer C. S., Plieth C., Hansen U.-P., Sattelmacher B., Simonis W., Schönknecht G. (1997):  
Repetitive  $\text{Ca}^{2+}$  spikes in a unicellular green alga.  
FEBS Letters 405, 390-393
- Belde P. J. M., Vossen J. H., Borst-Pauwels G. W. F. H. & Theuvenet A. P. R. (1993):  
Inositol 1,4,5-trisphosphate releases  $\text{Ca}^{2+}$  from vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*.  
FEBS Letters 323, 113-118
- Berridge M. J. & Irvine R. F. (1989):  
Inositol phosphates and cell signalling.  
Nature 341, 197-205
- Berridge M. J. (1993):  
Inositol triphosphate and calcium-signalling.  
Nature 361, 315-325
- Berridge M. J. (1997):  
The AM and FM of calcium signalling.  
Nature 386, 759-760
- Bertl A. et al. (1992):  
Electrical measurements on endomembranes.  
Science 258, 873
- Bethke P. C. & Jones R. L. (1994):  
 $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin modulates ion channel activity in storage protein vacuoles of barley aleurone cells.  
Plant Cell 6, 277-285
- Bezprozvanny I., Watras J. & Ehrlich B. E. (1991):  
Bell-shaped calcium-response curves of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum.  
Nature 351, 751-754
- Bezrukov S. M. & Vodydanoy I. (1995):  
Noise-induced enhancement of signal transduction across voltage-dependent ion channels.  
Nature 378, 362-364
- Blackford S., Rea P. A. & Sanders D. (1990):  
Voltage sensitivity of  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiport in isolated tonoplast vesicles in higher plant tonoplast suggests a role in vacuolar calcium accumulation.  
Journal of Biological Chemistry 265, 9617-9620
- Blumwald E. & Poole R. J. (1986):  
Kinetics of  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris* L.  
Plant Physiology 80, 727-731
- Blumwald E. & Poole R. J. (1987):  
Salt tolerance in suspension cultures of sugar beet: induction of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport activity at the tonoplast by growth in salt.  
Plant Physiology 83, 884-887
- Boller T., Dürr M. & Wiemken A. (1975):  
Characterization of a specific transport system for arginine in isolated yeast vacuoles.  
European Journal of Biochemistry 54, 81-91
- Bootman M. D. & Berridge M. J. (1995):  
The elemental principles of calcium signaling.  
Cell 83, 675-678

- Bowman E. J., Siebers A. & Altendorf K. H. (1988):  
Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells and plant cells.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 85, 7972-7976
- Brauer D., Schubert C. & Tsu S. I. (1990):  
Characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -translocating ATPase from corn root microsomes.  
Physiologia Plantarum 78, 335-344
- Braun A. P. & Schulman H. (1995):  
The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: From form to function.  
Annual Review of Physiology 57, 417-445
- Brodmerkel A. (1994):  
Isolierung intakter Vakuolen aus Koleoptilen von *Zea mays* L. und Untersuchungen des pH-Gradienten über dem Protoplasten.  
Wissenschaftliche Hausarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Brosnan J. M. & Sanders D. (1990):  
Inositol trisphosphate-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release in beet microsomes is inhibited by heparin.  
FEBS Letters 260, 70-72
- Brosnan J. M. & Sanders D. (1993):  
Identification and characterization of high affinity binding sites for inositol trisphosphate in red beet.  
Plant Cell 5, 931-940
- Brownlee C. & Wood J. W. (1986):  
A gradient of cytoplasmic free calcium in growing rhizoid cells of *Fucus serratus*.  
Nature 320, 624-626
- Brüggemann L. I., Pottosin I. I. & Schönknecht G. (1999):  
Selectivity of the fast activating vacuolar cation channel.  
Journal of Experimental Botany 335, 873-876
- Buckhout T. J. (1984):  
Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in purified endoplasmic reticulum vesicles from *Lepidium sativum* L. roots.  
Plant Physiology 76, 962-967
- Bush D. S. (1995):  
Calcium regulation in plant cells and its role in signalling.  
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 46, 95-122
- Canut H., Carrasco A., Thuleau P., Graziana A. & Ranjeva R. (1994):  
Mobilization of vacuolar calcium through the tonoplast.  
in: Biochemical mechanisms involved in plant growth regulation; C.J. Smith, J. Gallon, D. Chiatante & G. Zocchi (eds.); Clarendon Press, Oxford, 231-243
- Chanson A. (1991):  
A  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiport system driven by the tonoplast pyrophosphate-dependent proton pump from maize roots.  
Journal of Plant Physiology 137, 471-476
- Chaumont F., Barrieu F., Herman E. M. & Chrispeels M. J. (1998):  
Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation.  
Plant Physiology 117, 1143-1152
- Clapham D. E. (1995):  
Calcium signaling.  
Cell 80, 259-68

- Clapper D. L., Walseth T. F., Dargie P. J. & Lee H. C. (1987):  
Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin eggs microsomes desensitized to inositol triphosphate.  
Journal of Biological Chemistry 262, 9561-9568
- Colquhoun, D. & Hawkes, A. G. (1985):  
The principles of stochastic interpretation of ion-channel mechanisms.  
in: Single-channel recording; 2. Aufl., B. Sakmann & E. Neher (eds.), Plenum Press, New York & London, 135-175
- Colquhoun D. & Sigworth F. J. (1985):  
Fitting and statistical analysis of single-channel records.  
in: Single-channel recording; 2. Aufl., B. Sakmann & E. Neher (eds.), Plenum Press, New York & London, 191-263
- Connor J. A. (1993):  
Intracellular calcium mobilization by inositol triphosphate: intracellular movement and compartmentalization.  
Cell Calcium 14, 185-200
- Cosgrove D. J. & Hedrich R. (1991):  
Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L.  
Planta 186, 143-153
- Cote G. G. & Crain R. C. (1993):  
Biochemistry of phosphoinositides.  
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44, 333-56
- Darwin C. & Darwin F. (1880):  
The power of movements in plants.  
John Murray, London
- Davies J. M. (1997):  
Vacuolar energization: pumps, shunts and stress.  
Journal of Experimental Botany 48, 633-641
- De Koninck P. & Schulman H. (1998):  
Sensitivity of CaM Kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations.  
Science 279, 227-230
- DeLisle S. & Welsh M. J. (1992):  
Inositol trisphosphate is required for the propagation of calcium waves in *Xenopus* oocytes.  
Journal of Biological Chemistry 267, 7963-7966
- De Silva D. L. R., Hetherington A. M. & Mansfield T. A. (1985):  
Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening.  
New Phytologist 100, 473-482
- Dolmetsch R. E., Lewis, R. S., Goodnow C. C. & Healy J. I. (1997):  
Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration.  
Nature 386, 855-858
- Dove S. K., Cooke F. T., Douglas M. R., Sayers L. G., Parker P. J. & Mitchell R. H. (1997):  
Osmotic stress activates phosphatidyl-3,5-bisphosphate synthesis.  
Nature 390, 187-192
- Drøbak B. K. & Ferguson I. B. (1985):  
Release of Ca<sup>2+</sup> from plant hypocotyl microsomes by inositol-(1,4,5)-trisphosphate.  
Biochemical and Biophysical Research Communications 130, 1241-1246

- Drøbak B. K. (1993):  
Plant phosphoinositides and intracellular signalling.  
Plant Physiology 102, 705-709
- DuPont F. M., Bush D. S., Windle J. J. & Jones R. L. (1990):  
Calcium and proton transport in membrane vesicles from barley roots.  
Plant Physiology 94, 179-188
- Edwards J., ap Rees T., Wilson P. M. & Morrell S. (1984):  
Measurement of the inorganic pyrophosphate in tissues of *Pisum sativum* L.  
Planta 162, 188-191
- Ehrhardt D. W., Wais R. & Long S. R. (1996):  
Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals.  
Cell 85, 7-20
- Ehrlich B. E. & Watras J. (1988):  
Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum.  
Nature 336, 583-586
- Ermolayeva E., Sanders D. & Johannes E. (1997):  
Ionic mechanism and role of phytochrome-mediated membrane depolarisation in caulonemal  
branch initial formation in the moss *Physcomitrella patens*.  
Planta 201, 109-118
- Felle H., Brummer B., Bertl A. & Parish R. W. (1986):  
Indole-3-acetic acid and fusicoccin cause cytosolic acidification of corn coleoptile cells.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 83, 8992-8995
- Felle H. (1988a):  
Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles.  
Planta 174, 495-499
- Felle H. (1988b):  
Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: interaction of  $Ca^{2+}$  and pH?  
Planta 176, 248-255
- Felle H. (1988c):  
Short-term pH regulation in plants.  
Physiologia Plantarum 74, 583-591
- Felle H. (1991):  
The control of cytoplasmic levels of  $Ca^{2+}$  and  $H^+$  in plants.  
in Plant signalling, plasma membrane and change of state, Penel C. & Greppin H. (eds.), Université de  
Genève, 79-104
- Felle H., Rück A. & Peters W. S. (1992):  
The role of cytosolic calcium, pH and auxin-induced electrical responses for elongation growth in  
maize.  
in: Karssen C. M., van Loon L. C. & Vreugdenhil D. (eds.): Progress in Plant growth regulation, Kluwer  
Academic Publishers, Dordrecht, 663-667
- Felle H. (1993):  
Developmental physiology: signal transduction.  
Progress in Botany 54, 254-267
- Ferris C. D., Haganir R. L. & Snyder S. H. (1990):  
Calcium flux mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in reconstituted lipid vesicles is  
allosterically regulated by adenine nucleotides.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 87, 2147-2151

- Ferris C. D., Haganir R. L., Bredt D. S., Cameron A. M. & Snyder S. H. (1991):  
Inositol triphosphate receptor: Phosphorylation by protein kinase C and calcium-calmodulin dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 88, 2232-2235
- Ferris C. D. & Snyder S. H. (1992):  
Inositol 1,4,5-triphosphate-activated calcium channels.  
Annual Review of Physiology 54, 469-488
- Finch E. A., Turner T. J. & Goldin S. M. (1991):  
Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-triphosphate-induced calcium release.  
Science 252, 443-446
- Fisher D. D., Gilroy S. & Cyr R. J. (1996):  
Evidence for opposing effects of calmodulin on cortical microtubules.  
Plant Physiology 112, 1079-1087
- Franklin-Tong V. E., Drøbak B. K., Allan A. C., Watkins P. A. C. & Trewavas, A. J. (1996):  
Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow moving calcium wave propagated by inositol triphosphate.  
Plant Cell 8, 1305-1321
- Frohnmeier H., Grabov A. & Blatt M. R. (1998):  
A role for the vacuole in auxin-mediated control of cytosolic pH by *Vicia mesophyll* and guard cells.  
Plant Journal 13, 109-116
- Fukumoto M. & Venis M. A. (1986):  
ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in tonoplast vesicles from apple fruit.  
Plant Cell Physiology 27, 491-497
- Galione A., Lee H. C. & Busa W. B. (1991):  
 $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose.  
Science 253, 1143-1146
- Galione A. & Summerhill R. (1995):  
Regulation of ryanodine receptors by cyclic ADP-ribose.  
In: Sorrentino V. (ed.), Ryanodine receptors. CRC Press
- Gambale F., Bregante M., Stragapede F. & Cantu A. M. (1996):  
Ionic channels of the sugar beet tonoplast are regulated by a multi-ion single-file permeation mechanism.  
Journal of Membrane Biology 154, 69-79
- Gehring C. A., Williams D. A., Cody S. H. & Parish R. W. (1990a):  
Phototropism and geotropism in maize coleoptils are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium.  
Nature 345, 528-530
- Gehring C. A., Irving H. R. & Parish R. W. (1990b):  
Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 87, 9645-9649
- Gelli A. & Blumwald E. (1993):  
Calcium retrieval from vacuolar pools.  
Plant Physiology 102, 1139-1146
- Gelli A. & Blumwald E. (1997):  
Hyperpolarization-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels in the plasma membrane of tomato cells.  
Journal of Membrane Biology 155, 35-45

- Gerasimenko O. V., Gerasimenko J. V., Tepikin A. V. & Petersen O. H. (1995):  
ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the nuclear envelope.  
Cell 80, 439-444
- Giannini J. L., Gildensoph L. H., Reynolds-Niesmann I. & Briskin D. P. (1987):  
Calcium transport in sealed vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue, characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$  pumping ATPase associated with the endoplasmic reticulum.  
Plant Physiology 85, 1129-1136
- Gilroy S., Read N. D. & Trewavas A. J. (1990):  
Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure.  
Nature 346, 769-771
- Gilroy S., Fricker M. D., Read N. D. & Trewavas A. J. (1991):  
Role of calcium in signal transduction of *Commelina* guard cells.  
Plant Cell 3, 333-344
- Gilroy S. & Jones R. L. (1992):  
Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 89, 3591-3595
- Gogarten-Boekels M., Gogarten J. P. & Bentrup F. W. (1985):  
Kinetics and specificity of ATP-dependent proton translocation measured with acridine orange in microsomal fractions from green suspension cells of *Chenopodium rubrum* L.  
Journal of Plant Physiology 118, 309-325
- Graeff R., Podein R. J., Aarhus R. & Lee H. C. (1995):  
Magnesium ions but not ATP inhibit cyclic ADP-ribose-induced calcium release.  
Biochemical and Biophysical Research Communications 206, 786-791
- Grignon C. & Sentenac H. (1991):  
pH and ionic conditions in the apoplast.  
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42, 103-128
- Guern J., Mathieu Y., Kurkdjian A., Manigault P. J., Gillet B. & Beloeil C. (1989):  
Regulation of vacuolar pH of plant cells.  
Plant Physiology 89, 27-36
- Guron K., Chandok M. R. & Sopory S. K. (1992):  
Phytochrome-mediated rapid changes in the level of phosphoinositides in etiolated leaves of *Zea mays*.  
Photochemistry and Photobiology 56, 691-695
- Hager A., Menzel H. & Krauss A. (1971):  
Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum.  
Planta 100, 47-75
- Hager A. & Helmle M. (1981):  
Properties of an ATP-fueled,  $\text{Cl}^-$ -dependent proton pump localized in membranes of microsomal vesicles from maize coleoptiles.  
Zeitschrift für Naturforschung 36c, 997-1008
- Hager A. & Biber W. (1984):  
Functional and regulatory properties of  $\text{H}^+$  pumps at the tonoplast and plasma membrane of *Zea mays* coleoptiles.  
Zeitschrift für Naturforschung 39, 927-937

- Hajnóczky G. & Thomas A. P. (1994):  
The inositol trisphosphate calcium channel is inactivated by inositol trisphosphate.  
Nature 370, 474-477
- Hajnóczky G. & Thomas A. P. (1997):  
Minimal requirements for calcium oscillations driven by the IP<sub>3</sub> receptor.  
EMBO Journal 16, 3533-3543
- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B. & Sigworth F. J. (1981):  
Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.  
Pflügers Archiv 391, 85-100
- Haschke H. P. & Lüttge U. (1973):  
β-Indolyllessigsäure-(IES)-abhängiger K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauschmechanismus und Streckungswachstum bei *Avena*-Koleoptilen.  
Zeitschrift für Naturforschung 28, 555-558
- Haschke H. P. & Lüttge U. (1975):  
Stoichiometric correlation of malate accumulation with auxin-dependent K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-exchange and growth in *Avena* coleoptile segments.  
Plant Physiology 56, 696-698
- Hasselbach W. & Migala A. (1992):  
Modulation by monovalent anions of calcium and caffeine induced calcium release from heavy sarcoplasmic reticulum vesicles.  
Zeitschrift für Naturforschung 47, 440-448
- Hedrich R., Flügge U.-I. & Fernandez J. M. (1986):  
Patch-clamp studies of ion transport in isolated plant vacuoles.  
FEBS Letters 204, 228-232
- Hedrich R. & Neher E. (1987):  
Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles.  
Nature 329, 833-835
- Hedrich R., Barbier-Brygoo H., Felle H., Flügge U.-I., Lüttge U., Maathuis F. J. M. et al. (1988):  
General mechanisms for solute transport across the tonoplast of plant vacuoles: a patch-clamp survey of ion channels and proton pumps.  
Botanica Acta 101, 7-13
- Hedrich R. & Dietrich P. (1996):  
Plant K<sup>+</sup> channels: Similarity and diversity.  
Botanica Acta 109, 94-101
- Herrmann A. & Felle H. (1995):  
Tip growth in root hair cells of *Sinapis alba* L.: significance of internal and external Ca<sup>2+</sup> and pH.  
New Phytologist 129, 523-533
- Hetherington A. M. & Trewavas A. J. (1984):  
Activation of a pea membrane protein kinase by calcium.  
Planta 161, 409-417
- Hille B. (1992):  
Ionic channels of excitable membranes.  
2nd edition, Sunderland, MA : Sinauer Associates Inc.
- Hirata Y., Kimura N., Sato K., Ohsugi Y., Takasawa S., Okamoto H., Ishikawa J., Kaisho T., Ishihara K. & Hirano T. (1994):  
ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1.  
FEBS Letters 356, 244-248

- Hirayama T., Ohto C., Mizoguchi T. & Shinozaki K. (1995):  
A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 92, 3903-3907
- Hirschi K. D., Zhen R.-G., Cunningham K. W., Rea P. A. & Fink G. R. (1996):  
CAX1, an  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter from *Arabidopsis*.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 93, 8782-8786
- Hodgkin A. L. & Katz B. (1949):  
The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.  
Journal of Physiology 108, 37-77
- Hoffmann B. (1988):  
Untersuchungen zum Aminosäure- und Protonentransport an Zellen und isolierten Vakuolen einer photoautotrophen Zellkultur von *Chenopodium rubrum* L.  
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Homeyer U., Litek K., Huchzemeyer B. & Schultz G. (1989):  
Uptake of phenylalanin into barley aleuron vacuoles is driven by adenosine triphosphatase and pyrophosphatase.  
Plant Physiology 89, 1388-1393
- Howard M., Grimaldi J. C., Bazan J. F., Lund F. E., Santos-Argumedo L., Parkhouse R. M. E., Walseth T. F. & Lee H. C. (1993):  
Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD 38.  
Science 262, 1056-1059
- Humbert J., Matter N., Artault J., Koppler P. & Malviya A. N. (1996):  
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane indicating regulation of nuclear calcium signalling by inositol 1,4,5-trisphosphate.  
Journal of Biological Chemistry 271, 478-485
- Hymel L., Inui M., Fleischer S. & Schindler H. (1988):  
Purified ryanodine receptor of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum forms  $\text{Ca}^{2+}$ -activated oligomeric  $\text{Ca}^{2+}$  channels in planar bilayers.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 85, 441-445
- Iino M. (1990):  
Phototropism: mechanisms and ecological implications.  
Plant, Cell and Environment 13, 633-650
- Iino M. & Endo M. (1992):  
Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release.  
Nature 360, 767-843
- Irving H. R., Gehring C. A., Parish R. W. (1992):  
Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 89, 1790-1794
- Ito K., Miyashita Y. & Kasai H. (1997):  
Micromolar and submicromolar  $\text{Ca}^{2+}$  spikes regulating distinct cellular functions in pancreatic acinar cells.  
EMBO Journal 16, 242-251
- Jackson M. B. (1985):  
Stochastic behaviour of many-channel membrane system.  
Biophysical Journal 47, 129-137

- Johannes E. (1989):  
Untersuchungen zur pH-Regulation bei *Riccia fluitans*: Aminosäuretransport und Protonentranslokation am Plasmalemma und Tonoplasten.  
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Johannes E. & Felle H. (1990):  
Proton gradient across the tonoplast of *Riccia fluitans* as a result of the joint action of two electroenzymes.  
Plant Physiology 93, 412-417
- Johannes E., Brosnan J. M. & Sanders D. (1992):  
Parallel pathways for intracellular calcium release from the vacuole of higher plants.  
Plant Journal 2, 97-102
- Johannes E. & Sanders D. (1995):  
Luminal calcium modulates unitary conductance and gating of a plant vacuole calcium release channel.  
Journal of Membrane Biology 146, 211-224
- Johnson J., Cobb B. G. & Drew M. C. (1989):  
Hypoxic induction of anoxia tolerance in root tips of *Zea mays*.  
Plant Physiology 91, 837-841
- Ketchum K. A. & Poole R. J. (1991):  
Cytosolic calcium regulates a potassium current in Corn (*Zea mays*) protoplasts.  
Journal of Membrane Biology 119, 277-288
- Klüsener B., Boheim G., Liß H., Engelberth J. & Weiler E. W. (1995):  
Gadolinium sensitive, voltage-dependent calcium release channels in the endoplasmic reticulum of a higher plant mechanoreceptor organ.  
EMBO Journal 14, 2708-2714
- Knight M. R., Campbell A. K., Smith S. M. & Trewavas A. J. (1991):  
Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium.  
Nature 352, 524-526
- Kutschera U. & Fröhlich M. (1992):  
Osmotic relations during elongation growth in coleoptiles of five cereal species.  
Plant Physiology 139, 519-522
- Laver D. R., Baynes T. M. & Dulhunty A. F. (1997):  
Magnesium inhibition of ryanodine-receptor calcium channels: Evidence for two independent mechanisms.  
Journal of Membrane Biology 156, 213-229
- Lechleiter J. D. & Clapham D. E. (1992):  
Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *X. laevis* oocytes.  
Cell 69, 283-294
- Lee H. C., Walseth T. F., Bratt G. T., Hayes R. N. & Clapper D. L. (1989):  
Structural determination of a cyclic metabolite of NAD<sup>+</sup> with intracellular Ca<sup>2+</sup>-mobilizing activity.  
Journal of Biological Chemistry 264, 1608-1615
- Lee H. C., Aarhus R. & Walseth T. F. (1993):  
Calcium mobilization by dual receptors during fertilization of sea urchin eggs.  
Science 261, 352-355
- Lewis B. D. & Spalding E. P. (1998):  
Nonselective block by La<sup>3+</sup> of *Arabidopsis* ion channels involved in signal transduction.  
Journal of Membrane Biology 162, 81-90

- Ling V. & Assmann S. M. (1992):  
Cellular distribution of calmodulin and calmodulin-binding proteins in *Vicia faba* L.  
Plant Physiology 100, 970-978
- Linz K. W. & Köhler K. (1994):  
Vacuolar ion currents in the primitive green alga *Eremosphaera viridis*: the electrical properties are suggestive of both the Characeae and higher plants.  
Protoplasma 179, 34-45
- Lipp P., Thomas D., Berridge M. & Bootman M. D. (1997):  
Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs.  
EMBO Journal 16, 7166-7173
- Liß H. & Weiler E. W. (1994):  
Ion-translocating ATPases in tendrils of *Bryonia dioica* Jacq.  
Planta 194, 169-180
- Liu Q.-Y., Lai A. F., Rousseau E., Jones R. V. & Meissner G. (1989):  
Multiple conductance states of the purified calcium release channel complex from skeletal sarcoplasmic reticulum.  
Biophysical Journal 55, 415-424
- Lommel C. (1996):  
Untersuchungen zum Protonen-, Calcium- und Betacyantransport an Vakuolen und Membranvesikeln von *Chenopodium* Suspensionskulturen.  
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Lommel C. & Felle H. H. (1997):  
Transport of  $\text{Ca}^{2+}$  across the tonoplast of intact vacuoles from *Chenopodium album* L. suspension cells: ATP-dependent import and inositol-1,4,5-triphosphate-induced release.  
Planta 201, 477-486
- Long J. C. & Jenkins G. I. (1998):  
Involvement of plasma membrane redox activity and calcium homeostasis in the UV-B and UV-A/blue light induction of gene expression in *Arabidopsis*.  
Plant Cell 10, 2077-2086
- Luan S., Li W., Rusnak F., Assmann S. M. & Schreiber S. L. (1993):  
Immunorepressants implicate protein phosphatase regulation of  $\text{K}^+$  channels in guard cells.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 90, 2202-2206
- Ma J., Fill C., Knudson C. M., Campbell K. P. & Coronado R. (1988):  
Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction-type channel.  
Science 242, 99-102
- Maathuis F. J. M. & Prins H. B. A. (1991):  
Patch clamp studies on root cells vacuoles of a salt-tolerant and salt-sensitive *Plantago* species.  
Plant Physiology 29, 23-28
- MacRobbie E. A. C. (1989):  
Calcium influx at the plasmalemma of isolated guard cells of *Commelina communis*. Effects of abscisic acid.  
Planta 178, 231-241
- Maeshima M. (1991):  
 $\text{H}^+$ -translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles.  
European Journal of Biochemistry 196, 11-17
- Malhó R., Read N. D., Pais M. S. & Trewavas A. J. (1994):  
Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth.  
Plant Journal 5, 331-341

- Malhó R., Read N. D., Trewavas A. J. & Pais M. S. (1995):  
Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation.  
*Plant Cell* 7, 1173-1184
- Malhó R. & Trewavas A. J. (1996):  
Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation.  
*Plant Cell* 8, 1935-1949
- Malhó R., Moutinho A., van der Luit A. & Trewavas A. J. (1998):  
Spatial characteristics of calcium signalling: the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling.  
*Philosophical Transactions of the Royal Society, London, Series B* 353, 1463-1473
- Malström S., Askerlund P. & Palmgren M. G. (1997):  
A calmodulin-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from plant vacuolar membranes with a putative regulatory domain at its N-terminus.  
*FEBS Letters* 400, 324-328
- Mandala S. & Taiz L. (1985):  
Proton transport in isolated vacuoles from corn coleoptiles.  
*Plant Physiology* 78, 104-109
- Marigo G., Bouyssou H. & Laborie D. (1988):  
Evidence of malate transport into vacuoles isolated from *Catharanthus roseus* cells.  
*Botanica Acta* 101, 187-191
- Martinoia E., Heck U. & Wiemken A. (1981):  
Vacuoles as storage compartments of nitrate in barley leaves.  
*Nature* 289, 292-294
- Martinoia E. (1992):  
Transport processes in vacuoles in higher plants.  
*Botanica Acta* 105, 232-245
- Maurel C. (1997):  
Aquaporins and water permeability of plant membranes.  
*Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 399-429
- McAinsh M. R., Brownlee C. & Hetherington A. M. (1990):  
Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  precedes stomatal closure.  
*Nature* 343, 186-188
- McAinsh M. R., Brownlee C. & Hetherington A. M. (1991):  
Partial inhibition of ABA-induced stomatal closure by calcium channel blockers.  
*Proceedings of the Royal Society of London* 243, 195-201
- McAinsh M. R., Brownlee C. & Hetherington A. M. (1992):  
Visualizing changes in cytosolic-free  $\text{Ca}^{2+}$  during the response of stomatal guard cells to abscisic acid.  
*Plant Cell* 4, 1113-1122
- McAinsh M. R., Clayton H., Mansfield T. A. & Hetherington A. M. (1996):  
Changes in stomatal behaviour and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress.  
*Plant Physiology* 111, 1031-1042
- Meissner G., Darling E. & Eveleth J. (1986):  
Kinetics of rapid  $\text{Ca}^{2+}$  release by sarcoplasmic reticulum. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and adenine nucleotids.  
*Biochemistry* 25, 236-244
- Meissner G. (1994):  
Ryanodine receptor/  $\text{Ca}^{2+}$  release channels and their regulation by endogenous effectors.  
*Annual Review of Physiology* 56, 485-508

- Meissner G., Rios E., Tripathy A. & Pasek D. A. (1997):  
Regulation of skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) by  $\text{Ca}^{2+}$  and monovalent cations and anions.  
Journal of Biological Chemistry 272, 1628-1638
- Melin P. M., Pical C., Jergil B. & Sommarin M. (1992):  
Polyphosphoinositide phospholipase C in wheat root plasma membranes. Partial purification and characterization.  
Biochimica et Biophysica Acta 123, 163-169
- Mészáros L. G., Bak J. & Chu A. (1993):  
Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel.  
Nature 364, 76-79
- Mitchell P. (1961):  
Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.  
Nature 191, 144-148
- Muir S. R. & Sanders D. (1996):  
Pharmacology of  $\text{Ca}^{2+}$  release from red beet microsomes suggests the presence of ryanodine receptor homologs in higher plants.  
FEBS Letters 395, 39-42
- Muir S. R. & Sanders D. (1997):  
Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release across nonvacuolar membranes in cauliflower.  
Plant Physiology 114, 1511-1521
- Muir S. R., Bewell M. A., Sanders D. & Allen G. J. (1997):  
Ligand-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels and  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in higher plants.  
Journal of Experimental Botany 48, 589-597
- Mulder-Krieger T. (1994):  
Anthocyanins as flower pigments  
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht NL.
- Neher E. (1992):  
Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments.  
Methods in Enzymology 207, 123-131
- Neher E. & Sakmann B. (1992):  
Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik.  
Spektrum der Wissenschaft 92, 48-56
- Newman I. A., Kochian L. V. Grusak M. A. & Lucas W. J. (1987):  
Fluxes of  $\text{H}^+$  and  $\text{K}^+$  in corn roots: Characterization and stoichiometries using ion-selective micro-electrodes.  
Plant Physiology 84, 1177-1184
- Niemitz C. & Willenbrink J. (1985):  
The function of tonoplast ATPase in intact vacuoles of red beet is governed by direct and indirect ion effects.  
Planta 166, 545-549
- Nobling R. & Reiss H. D. (1987):  
Quantitative analysis of calcium gradients in growing pollen tubes of *Lilium longiflorum*.  
Protoplasma 139, 20-24
- O'Neill S. D. & Spanswick R. M. (1984):  
Effects of vanadate on the plasma membrane of red beet and corn.  
Plant Physiology 75, 586-591

- Osipchuk Y. V., Wakui M., Yule D. I., Gallacher D. V. & Petersen O. H. (1990):  
Cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations evoked by receptor stimulation, G-Protein activation, internal application of inositol trisphosphate or  $\text{Ca}^{2+}$ : Simultaneous microfluorimetry and  $\text{Ca}^{2+}$  dependent  $\text{Cl}^-$  current recording in single pancreatic acinar cells.  
EMBO Journal 9, 697-704
- Pantoja O., Gelli A. & Blumwald E. (1992a):  
Voltage-dependent calcium channels in plant vacuoles.  
Science 255, 1567-1570
- Pantoja O., Dainty J. & Blumwald E. (1992b):  
Cytoplasmic chloride regulates cation channels in the vacuolar membrane of plant cells.  
Journal of Membrane Biology 125, 219-229
- Parvez M. M., Wakabayashi K., Hoson T. & Kamisaka S. (1996):  
Changes in cellular osmotic potential and mechanical properties of cell walls during light-induced inhibition of cell elongation in maize coleoptiles.  
Physiologia Plantarum 96, 179-185
- Parvez M. M., Wakabayashi K., Hoson T. & Kamisaka S. (1998):  
White light-induced sugar distribution controls growth and osmotic properties in the coleoptile and the first leaf in *Zea mays* seedlings.  
Physiologia Plantarum 102, 1-8
- Petersen C. C. H., Toescu E. C. & Petersen O. H. (1991):  
Different patterns of receptor-activated cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in single pancreatic acinar cells: Dependence on receptor type, agonist concentration and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  buffering.  
EMBO Journal 10, 527-533
- Pfeiffer W. & Hager A. (1993):  
A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and a  $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^+$ -antiporter are present on tonoplast membranes from roots of *Zea mays* L.  
Planta 191, 377-385
- Pical C., Sandelius A. S., Melin P. M. & Sommarin M. (1992):  
Polyphosphoinositide phospholipase C in plasma membranes of wheat (*Triticum aestivum* L.). Orientation of active site and activation by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ .  
Plant Physiology 100, 1296-1303
- Pical C., Kopka J., Müller-Röber B., Hetherington A. M. & Gray J. E. (1997):  
Isolation of two cDNA clones for phosphoinositide-specific phospholipase C from epidermal peels and guard cells of *Nicotiana rustica*.  
Plant Physiology 114, 748
- Pineros M. & Tester M. (1997):  
Calcium channels in higher plant cells: selectivity, regulation and pharmacology.  
Journal of Experimental Botany 48 (Special Issue), 551-557
- Polevoi V. V., Sinyutina N. F., Salamatova T. S., Inge-Vechtomova N. I., Tankelyun O. V., Sharova E. I. & Shishova M. F. (1996):  
Mechanism of auxin action: second messengers.  
in: Smith A. R. et al. (eds.), Plant hormone signal perception and transduction, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 223-231
- Pottosin I. I., Tikhonova L. I., Hedrich R. & Schönknecht G. (1997):  
Slowly activating vacuolar channels can not mediate  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release.  
Plant Journal 12, 1387-1398
- Prentki M., Glennon M. C., Thomas A. P., Morris R. L., Matschinsky F. M. & Corkey B. E. (1988):  
Cell-specific patterns of oscillating free  $\text{Ca}^{2+}$  in carbamylcholine-stimulated insulinoma cells.  
Journal of Biological Chemistry 263, 11044-11047

- Ranjeva R., Carrasco A. & Boudet A. M. (1988):  
Inositol trisphosphate stimulates the release of calcium from intact vacuoles isolated from *Acer* cells.  
FEBS Letters 230, 137-141
- Rasmussen H. (1989):  
Der Membrankreislauf von Calcium als intrazelluläres Signal.  
Spektrum der Wissenschaft 12, 128-135
- Rausch T., Butcher D. N. & Taiz L. (1987):  
Active glucose transport and proton pumping in tonoplast membrane of *Zea mays* L. coleoptiles are inhibited by Anti- H<sup>+</sup>-ATPase antibodies.  
Plant Physiology 85, 996-999
- Rausch T. (1991):  
The hexose transporters at the plasmalemma and tonoplast of higher plants.  
Physiologia Plantarum 82, 134-142
- Rautiainen T. J., Koskinen A. M. P. & Väänänen H. K. (1993):  
Purification of vacuolar ATPase with bafilomycin C1 chromatography.  
Biochemical and Biophysical Research Communications 194, 50-56
- Rea P. A. & Sanders D. (1987):  
Tonoplast energization: Two H<sup>+</sup> pumps, one membrane.  
Physiologia Plantarum 71, 131-141
- Rea P. A., Britten C. J., Jennings I. R., Calvert C. M., Leigh R. A. & Sanders D. (1992):  
Regulation of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase by free calcium.  
Plant Physiology 100, 1706-1715
- Rea P. A. & Poole R. J. (1993):  
Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase.  
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44, 157-180
- Reddy A. S. N. & Poovaiah B. W. (1987):  
Inositol 1,4,5-trisphosphate induced calcium release from corn coleoptile microsomes.  
Journal of Biochemistry 101, 569-573
- Reifarth F. W., Weiser T. & Bentrup F.-W. (1994):  
Voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependence of the K<sup>+</sup> channel in the vacuolar membrane of *Chenopodium rubrum* L. suspension cells.  
Biochimica et Biophysica Acta 1192, 79-87
- Robards A. W. & Lucas W. J. (1990):  
Plasmodesmata.  
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 41, 369-419
- Roberts J. M. K., Lane A. N., Clark R. A. & Nieman R. H. (1985):  
Relationships between the rate of synthesis of ATP and the concentrations of reactants and products of ATP hydrolysis in maize root tips, determined by <sup>31</sup>P.  
Archiv of Biochemistry and Biophysic 240, 712-722
- Rooney T. A., Sass E. J. & Thomas A. P. (1989):  
Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes.  
Journal of Biological Chemistry 264, 17131-17141
- Rubinstein B. & Light E. N. (1973):  
Indoleacetic-acid-enhanced chloride uptake into coleoptile cells.  
Planta 110, 43-56

- Rück A. (1990):  
Kanalanalysen an pflanzlichen Vakuolen von *Riccia fluitans* und an Cytoplasmatropfen von *Chara corallina* mit Hilfe der „Patch-Clamp-Technik“.  
Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Rück A. (1994):  
Eine „Patch-Clamp“-Studie am Plasmalemma von *Zea mays* Koleoptilen. Charakterisierung von Ionenkanälen, Auxinerkennung und Auxinwirkung auf die H<sup>+</sup>-ATPase.  
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Sakmann B. & Neher E. (1983):  
Single-channel recording.  
Plenum Press, New York
- Schönknecht G., Bauer C. S. & Simonis W. (1998):  
Light-dependent signal transduction and transient changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> in a unicellular green alga.  
Journal of Experimental Botany 49, 1-11
- Schroeder J. I. & Hagiwara S. (1990):  
Repetitive increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca<sup>2+</sup>-permeable channels.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 87, 9305-9309
- Schulz-Lessdorf B. & Hedrich R. (1995):  
Protons and calcium modulate SV-type channels in the vacuolar-lysosomal compartment - channel interaction with calmodulin inhibitors.  
Planta 197, 655-671
- Schumaker K. S. & Sze H. (1984):  
Properties of a H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter in oat root microsomal vesicles.  
Plant Physiology 75 (Supplement), 46
- Schumaker K. S. & Sze H. (1985):  
A Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport system is driven by the proton electrochemical gradient of a tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase from oat roots.  
Plant Physiology 79, 1111-1117
- Schumaker K. S. & Sze H. (1986):  
Calcium transport into the vacuole of oat roots. Characterization of Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity.  
Journal of Biological Chemistry 261, 12172-12178
- Schumaker K. S. & Sze H. (1987):  
Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca<sup>2+</sup> from vacuolar membrane vesicles of oat roots.  
Journal of Biological Chemistry 262, 3944-3946
- Schumaker K. S. & Sze H. (1990):  
Solubilization and reconstitution of the oat root vacuolar H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger.  
Plant Physiology 92, 340-345
- Shabala S., Newman I., Whittington J. & Juswono U. (1998):  
Protoplast ion fluxes: their measurement and variation with time, position and osmoticum.  
Planta 204, 146-152
- Shacklock P. S., Read N. D. & Trewavas A. J. (1992):  
Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorphogenesis.  
Nature 358, 753-755
- Silverstein T. et al. (1993):  
Transmembrane measurements across bioenergetic membranes.  
Biochimica et Biophysica Acta 1183, 1-3

- Sitsapesan R., McGarry S. J. & Williams A. J. (1994):  
Cyclic ADP-ribose competes with ATP for the adenine nucleotide binding site on the cardiac ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel.  
*Circulation Research* 75, 596-600
- Sitsapesan R. & Williams A. J. (1996):  
Modification of the conductance and gating properties of ryanodine receptors by suramin.  
*Journal of Membrane Biology* 153, 93-103
- Slayman C. L. (1974):  
Proton pumping and generalized energetics of transport. A review.  
in Zimmermann U., Dainty J. (eds.): *Membrane transport in plants*, Springer Verlag, New York, Berlin, 107-119
- Smith J. S., Coronado R. & Meissner G. (1985):  
Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels.  
*Nature* 316, 446-449
- Smith J. S., Coronado R. & Meissner G. (1986):  
Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.  
*Journal of General Physiology* 88, 573-588
- Smith J. S., Imagawa T., Ma J., Fill M., Campbell K. P. & Coronado R. (1988):  
Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum.  
*Journal of General Physiology* 92, 1-26
- Smyth D. A. & Black C. C. (1984):  
Measurement of the pyrophosphate content in plant tissues.  
*Plant Physiology* 75, 862-864
- Spanswick R. M. (1981):  
Electrogenic ion pumps.  
*Annual Review of Plant Physiology* 32, 267-289
- Srivastava A., Pines M. & Jacoby B. (1989):  
Enhanced potassium uptake and phosphatidylinositol-phosphate turnover by hypertonic mannitol shock.  
*Physiologia Plantarum* 77, 320-325
- Staehelein L. A. (1997):  
The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains.  
*Plant Journal* 11, 1151-1165
- Stehno-Bittel L., Perez-Terzic C. & Clapham D. E. (1995):  
Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  store.  
*Science* 270, 1835-1838
- Suárez-Isla B. A., Alcayaga C., Marengo J. J. & Bull R. (1991):  
Activation of inositol trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels of sarcoplasmic reticulum from frog skeletal muscle.  
*Journal of Physiology* 441, 575-591
- Sze H. (1985):  
 $\text{H}^+$ -translocating ATPases. Advances using membrane vesicles.  
*Annual Review of Plant Physiology* 36, 175-208
- Taylor A. R., Manison N. F. H., Fernandez C., Wood J. & Brownlee C. (1996):  
Spatial organization of calcium signaling involved in volume control in the *Fucus* rhizoid.  
*Plant Cell* 8, 2015-2031

- Theodoulou F. L., Dewey F. M. & Evans D. E. (1994):  
Calmodulin-stimulated ATPase of maize cells: functional reconstitution, monoclonal antibodies and subcellular localization.  
*Journal of Experimental Botany* 280, 1553-1564
- Thiel G., Rupnik M. & Zorec R. (1994):  
Raising the cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration increases the membrane capacitance of maize coleoptile protoplasts: Evidence for  $Ca^{2+}$ -stimulated exocytosis.  
*Planta* 195, 305-308
- Thomas A. P., Bird G. S. J., Hajnóczky G., Robb-Gaspers L. D. & Putney J. W. Jr. (1996):  
Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling.  
*FASEB Journal* 10, 1505-1517
- Tikhonova L. I., Pottosin I. I., Dietz K.-J. & Schönknecht G. (1997):  
Fast-activating cation channel in barley mesophyll vacuoles. Inhibition by calcium.  
*Plant Journal* 11, 1059-1070
- Tsien R. Y. & Rink T. J. (1980):  
Neutral carrier ion-selective microelectrodes for measurement of intracellular free calcium.  
*Biochimica et Biophysica Acta* 599, 623-628
- Tucker E. B. & Boss W. F. (1996):  
Mastoparan-induced intracellular  $Ca^{2+}$  fluxes may regulate cell-to-cell communications in plants.  
*Plant Physiology* 111, 459-467
- Von Tscherner V., Deranleau D. A. & Baggiolini M. (1986):  
Calcium fluxes and calcium buffering in human neutrophils.  
*Journal of Biological Chemistry* 261, 10163-10168
- Wagner G. (1987):  
Isolation of mature vacuoles of higher plants: General principles, criteria for purity and integrity.  
*Methods in Enzymology* 148, 55-73
- Wakui M., Osipchuk Y. V. & Petersen O. H. (1990):  
Receptor-activated cytoplasmic  $Ca^{2+}$  spiking mediated by inositol trisphosphate is due to  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release.  
*Cell* 63, 1025-1032
- Walseth T. F. & Lee H. C. (1993):  
Synthesis and characterization of antagonists of cyclic ADP-ribose.  
*Biochimica et Biophysica Acta* 1178, 235-242
- Walseth T. F., Aarhus R., Kerr J. A. & Lee H. C. (1993):  
Identification of cyclic ADP-ribose-binding proteins by photoaffinity labelling.  
*Journal of Biological Chemistry* 268, 26686-26690
- Ward J. M. & Schroeder J. I. (1994):  
Calcium-activated  $K^+$  channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure.  
*Plant Cell* 6, 669-683
- Ward J. M., Pei Z.-M. & Schroeder J. I. (1995):  
Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants.  
*Plant Cell* 7, 833-844
- Webb A. A. R., McAinsh M. R., Mansfield T. A. & Hetherington A. M. (1996):  
Carbon dioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium.  
*Plant Journal* 9, 297-304

- Weiser T. (1991):  
Elektrophysiologie am Tonoplasten von *Chenopodium rubrum* L. Suspensionskulturzellen: Untersuchungen zum Einfluß chaotroper Ionen auf die vakuoläre ATPase und zur Regulation und Pharmakologie des SV-Kanals.  
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Werner G., Hagenmaier H., Drautz H., Baumgartner A. & Zähler H. (1984):  
Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity.  
Journal of Antibiotics 37, 110-117
- White P. J. (1994):  
Bafilomycin A1 is a non-competitive inhibitor of the tonoplast  $H^+$ -ATPase of maize coleoptiles.  
Journal of Experimental Botany 45, 1397-1402
- White P. J. (1996):  
Specificity of ion channel inhibitors for the maxi cation channel in rye root plasma membranes.  
Journal of Experimental Botany 47, 713-716
- Wilhelmi S. (1994):  
Isolierung von Vakuolen aus *Zea mays* L. und Untersuchung des Protonen-Transportes am Tonoplasten.  
Wissenschaftliche Hausarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Worley P. F., Baraban J. M., Supattapone S., Wilson V. S. & Snyder S. H. (1987):  
Characterization of inositol tris-phosphate receptor binding in brain.  
Journal of Biological Chemistry 262, 12132-12136
- Wu W.-H. & Assmann S. M. (1995):  
Is ATP required for  $K^+$  channel activation in *Vicia* guard cells?  
Plant Physiology 107, 101-109
- Xu L., Jones R. & Meissner G. (1993):  
Effects of local anesthetics on single channel behavior of skeletal muscle calcium release channel.  
Journal of General Physiology 101, 207-233
- Zanker V. (1952):  
Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate („reversible Polymerisate“) des Acridineoranges durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wässriger Lösung.  
Zeitschrift für physikalische Chemie 199, 255-258
- Zbell B. & Walter-Back C. (1988):  
Signal transduction of auxin on isolated plant cell membranes: Indications for a rapid polyphosphoinositide response stimulated by IAA.  
Journal of Plant Physiology 133, 353-360
- Zocchi E., Franco L., Guida L., Benatti U., Bargellesi A., Malavasi F., Lee H. C. & De Flora A. (1993):  
A single protein immunologically identified as CD38 displays  $NAD^+$  glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes.  
Biochemical and Biophysical Research Communications 196, 1459-1465

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Gerald Albach  
Oppenrod, im August 1999

An dieser Stelle möchte ich das angenehme Klima im Hause erwähnen und mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Im Besonderen danke ich:

ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Hubert Felle. Seine fabelhafte Betreuung, fachliche Kompetenz, Geduld und anhaltende Motivation haben diese Arbeit erst ermöglicht.

den elektropsychologischen Vor- und Mitinsassen David Carden, Dr. Stefan Hanstein, Almut Herrmann, Dr. Christa Lommel, den „Mädels“, Dr. Winfried Peters und Dr. Anne Rück für Tips und Tricks sowie für die gute Laune bei den „Dienstbesprechungen“.

den Mitarbeitern der Werkstatt, die mit Rat und Tat immer eine technische Lösung fanden. Im Besonderen Herrn Uhmann für die aufopferungsvolle Entwicklung der Plattfischaquarien.

dem Herrn Redaktör, für die Durchsicht der SM-Literatur und die Gestaltung des Rahmenprogramms.

meiner Familie für ihre anhaltende moralische und materielle Unterstützung.

der Europäischen Gemeinschaft und der Graduiertenförderung des Landes Hessen für die finanzielle Unterstützung.