

Technische Universität München
Fachgebiet Angewandte Holzbiologie
Department für Biogene Rohstoffe und Technologie der Landnutzung

**Elektrophysiologie des Kaliumtransports über die
Plasmamembran
an ausgewählten Zelltypen der
Modellbaumart
*Populus tremula L. x Populus tremuloides Michx.***

Andrea Stinzing

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Rainer Matyssek
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Jörg Fromm
2. Univ.-Prof. Dr. Rainer Hedrich
(Julius-Maximilians-Universität Würzburg)

Die Dissertation wurde am 29. November 2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 6. Februar 2007 angenommen.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Fachgebiet Angewandte Holzbiologie des Departments für Biogene Rohstoffe und Technologie der Landnutzung der Technischen Universität München in enger Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik am Julius-von-Sachs-Institut der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg angefertigt.

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. Jörg Fromm, der mich während der gesamten Erstellungsphase der Arbeit durch großes Vertrauen unterstützte und mir sehr große Freiräume gewährte. Weiterhin danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Ermöglichung der engen Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, die damit verbundenen hilfreichen Anregungen sowie für die Übernahme des Zweitkorrektors. Herrn Univ.-Prof. Dr. Rainer Matyssek danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Besonders danke ich den Mitarbeiterinnen des Fachgebietes Angewandte Holzbiologie Monika Rinas und Anja Vieler für ihre Unterstützung bei mikroskopischen Untersuchungen und EDX - Analysen am Rasterelektronenmikroskop. Dr. Natalya Ivashikina vom Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik danke ich für das Einlernen in die Patch-Clamp-Technik und PD Dr. Irene Marten für die freundschaftliche Unterstützung bei allen Fragen zur Patch-Clamp-Technik. Allen namentlich nicht genannten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen beider Arbeitsgruppen danke ich für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Gedanklich baut diese Arbeit auf der Dissertation von Katharina Langer vom Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg und der Dissertation von Christa Wind vom Fachgebiet Angewandte Holzbiologie der Technischen Universität München auf. Beiden danke ich für die freundschaftliche und gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die die vorliegende Arbeit finanziell unterstützt hat.

Ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die meine Entscheidung zu promovieren respektiert, mir den Rücken frei gehalten und so diese Arbeit ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Anatomie und Stofftransport	3
1.2 Bedeutung des Kaliums für das Holzwachstum	7
1.3 Ionenkanäle und Transporter	9
1.4 Elektrophysiologie	13
1.5 Zielsetzung	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	19
2.1.1 Sterilkultur	19
2.1.2 Suspensionskultur	20
2.1.3 Hydrokultur	21
2.1.4 Aeroponische Kultur	22
2.1.5 Freilandkultur	22
2.2 Präparation des Pflanzenmaterials für Patch-Clamp-Experimente	22
2.2.1 Mechanische Isolation von Faserprotoplasten	24
2.2.2 Enzymatische Isolation von Suspensionskulturprotoplasten	25
2.2.3 Enzymatische Isolation von Knospenprotoplasten	26
2.2.4 Enzymatische Isolation von Wurzelprotoplasten	27
2.2.5 Enzymlösungen	27
2.3 Patch-Clamp-Technik	28
2.3.1 Messprinzip der Patch-Clamp Apparatur	29
2.3.2 Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik	30
2.3.3 Ersatzschaltbild des Patch-Clamp-Verstärkers	31
2.3.4 Korrektur von Spannungsfehlern und Kapazitäten	33
2.3.5 Herstellung der Patch-Glasmikroelektroden	33
2.3.6 Korrektur von Potentialdifferenzen	35
2.3.7 Vorzeichenkonvention	36
2.3.8 Datenerfassung	37
2.3.9 Datenauswertung	40
2.3.10 Patch-Clamp-Lösungen	43
2.4 Membranpotentialmessungen mit der Einstichttechnik	46

2.4.1	Vorbereitung des Pflanzenmaterials	46
2.4.2	Messprinzip der Einstichtechnik und Datenerfassung	48
2.4.3	Pipetten und Elektroden	49
2.4.4	Korrektur des "Offset"-Potentials	49
2.4.5	Versuchsanordnung und Lösungen	49
2.4.6	Datenauswertung	50
2.5	Mikroskopie	51
2.5.1	Lichtmikroskopie	51
2.5.2	Energiedispersive Röntgenanalyse (EDXA) im Rasterelektronenmikroskop (REM)	51
3.	ERGEBNISSE	53
3.1	Untersuchungen an Faserprotoplasten	53
3.1.1	Isolation von Faserprotoplasten	53
3.1.2	Elektrophysiologie an Faserprotoplasten	58
3.2	Untersuchungen an Protoplasten aus Suspensionskultur	62
3.2.1	Isolation von Protoplasten aus Suspensionskultur	62
3.2.2	Elektrophysiologie an Suspensionskultur-Protoplasten	63
3.2.3	Lichtmikroskopische Untersuchung von Suspensionskulturzellen.	73
3.2.4	EDX-Analyse zum Einfluss der Kaliumernährung auf den K ⁺ -Gehalt der Zellen	74
3.3	Untersuchungen an Knospenprotoplasten	76
3.3.1	Protoplastenisolation aus Knospen	76
3.3.2	Elektrophysiologische Untersuchungen an Knospenprotoplasten	79
3.4	Untersuchungen an Wurzelprotoplasten	87
3.4.1	Isolation von Wurzelprotoplasten	87
3.4.2	Elektrophysiologie an Wurzelprotoplasten	87
3.5	Untersuchungen an intakten Pflanzen	90
3.5.1	Membranpotentialmessungen an Strahlzellen von intakten Pflanzen	90
3.5.2	Lichtmikroskopische Untersuchung der für Membranpotentialmessungen verwendeten Triebe	91
4.	DISKUSSION	93
4.1	Faserprotoplasten	94
4.2	Protoplasten aus Suspensionskultur	101
4.3	Knospenprotoplasten	111
4.4	Wurzelprotoplasten	115
4.5	Strahlzellen	116
5.	SCHLUSSFOLGERUNG	119

6.	ZUSAMMENFASSUNG	123
7.	LITERATUR	127
8.	ANHANG	135
8.1	Abbildungsverzeichnis	135
8.2	Tabellenverzeichnis	137
8.3	Veröffentlichungen	137

Abkürzungsverzeichnis

-	minus	ca.	zirca
%	Prozent	Ca ²⁺	Calcium-Ion
*	multipliziert mit	CaCl ₂	Calciumchlorid
/	geteilt durch	CC	Geleitzelle (<u>companion cell</u>)
~	ungefähr	Cl ⁻	Chlorid-Ion
+	plus	cm	<u>Zentimeter</u>
=	ist gleich	C _m	Membrankapazität, langsame Kapazität
°C	Grad <u>Celsius</u>	cm ²	Quadratcentimeter
μ	<u>Mikro</u>	CNBD	<u>Cyclic-nucleotide-binding-domain</u>
μF	<u>Mikrofarad</u>	CNGC	<u>Cyclic-nucleotide-gated-channels</u>
μm	<u>Mikrometer</u>	CO ₂	Kohlendioxid
μM	<u>Mikromolar</u>	C _p	Pipettenkapazität
2,4 D	<u>2,4 Dichlorophenoxy</u> essigsäure	C _s	spezifische Membrankapazität
A	Ampère	Cs ⁺	Cäsium-Ion
<i>a</i>	außen	d.h.	das heißt
A1	Operationsverstärker	DEVC	<u>Double-Electrode-Voltage-Clamp</u>
A2	Differenzverstärker	e ⁻	Elektron
Abb.	<u>Abbildung</u>	E	Enzymlösung
AD/DA	<u>Analog - Digital / Digital - Analog</u>	E _{Ca}	Nernstpotential für Calcium
Ag ⁺	Silber-Ion	E _{Cl}	Nernstpotential für Chlor
AKT	<u>Arabidopsis thaliana K⁺-Transporter</u>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AtKC	<u>Arabidopsis thaliana K⁺-Channel</u>	EDXA	Energie <u>d</u> ispersive <u>Röntgenstrahl</u> analyse
<i>b</i>	<u>Breite</u>	EGTA	Ethylenglykol-bis (2-aminoethylether)- N,N'tetraessigsäure
Ba ²⁺	<u>Barium-Ion</u>	E _K	Nernstpotential für Kalium
BAP	6- <u>Benzylaminopurin</u>	E _{Mg}	Nernstpotential für Magnesium
bp	Basenpaare	engl.	englisch
BSA	<u>Bovin-serum-albumin</u>	e _o	Elementarladung
bzw.	<u>beziehungsweise</u>	Es	Lösung für Einstichmessungen
C	Coulomb		
C	Kapazität in Farad (F)		

EST	<u>Expressed Sequence Tags</u>	KCO	<u>K</u> ⁺ <u>channel outward rectifier</u>
et al.	und andere	KG	Lösung für Patch-Clamp-
exp	Exponentialfunktion		Messungen
		kHz	Kilohertz
<i>F</i>	Faraday Konstante	Kir	<u>K</u> ⁺ <u>inward rectifiers</u>
F	Faser	KORC	<u>K</u> ⁺ <u>outward rectifying</u>
FCC	fusiforme Initialzelle (<u>fusiform</u>		<u>conductance</u>
	<u>cambial cell</u>)	KPT	<u>K</u> ⁺ <u>channel <i>Populus tremula</i></u>
		KT	<u>K</u> ⁺ - <u>Transporter</u>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	KUP	<u>K</u> ⁺ <u>uptake transporter</u>
g	Gramm	kV	Kilovolt
GORK	<u>Guardcell Outward Rectifying</u>		
	<u>K</u> ⁺ <u>channel</u>	<i>l</i>	Länge
<i>G_s</i>	elektrische Serienleitfähigkeit	l	Liter
GΩ	Gigaohm	L.	Carl von Linné
		ln	natürlicher Logarithmus
<i>h</i>	Höhe		
h	Stunden	M	<u>Molar</u>
H ⁺	Proton	mA	<u>Milliampère</u>
HAK	<u>high-affinity K</u> ⁺ - <u>transporter</u>	MES	2-(N-Morpholino)-
HCl	Salzsäure		ethansulfonsäure
Heynh.	G. Heynhold	mg	<u>Milligramm</u>
		Mg ²⁺	Magnesium-Ion
<i>i</i>	innen	Michx.	André Michaux
<i>I</i>	Strom in Ampère (A)	min	<u>Minuten</u>
IBA	Indolbuttersäure	ml	<u>Milliliter</u>
<i>I_f</i>	Rückkopplungsstrom	mm	<u>Millimeter</u>
<i>I_F</i>	Strom des Folgepulses	mM	<u>Millimolar</u>
<i>I_{Leak}</i>	Leckstrom	mosm	<u>Milliosmol</u>
<i>I_{SS}</i>	Gleichgewichtsstrom	ms	<u>Millisekunde</u>
	(<u>steady state</u> Strom)	MS	<u>Murashige & Skoog</u>
		mV	<u>Millivolt</u>
J/K	Joule pro Kelvin		
		n	Anzahl
<i>k</i>	Boltzmann Konstante	nA	<u>Nanoampère</u>
K	Knospe	Na ⁺	<u>Natrium-Ion</u>
K ⁺	Kalium-Ion	nm	<u>Nanometer</u>
KAT	<u>K</u> ⁺ - <u>Transporter <i>Arabidopsis</i></u>		
	<i>thaliana</i>	Ω	Ohm

Ø	Durchmesser	TM	transmembran
P	Porenregion	Torr.	J. Torrey
pA	<u>P</u> ico <u>a</u> mpère	TPK	<u>t</u> andem- <u>p</u> ore <u>K</u> ⁺ channel
PBS	<u>P</u> hosphatate <u>b</u> uffered <u>s</u> alt solution	TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
P_c	Geschlossenwahrscheinlichkeit		
P_o	Offenwahrscheinlichkeit	U	Spannung in Volt
PTK	<u>P</u> opulus <u>t</u> remula <u>K</u> ⁺ channel	$U_{1/2}$	Membranspannung bei halbmaximaler
PtKUP	<u>P</u> opulus <u>t</u> remula <u>K</u> ⁺ uptake transporter		Offenwahrscheinlichkeit
PTORK	<u>P</u> opulus <u>t</u> remula <u>O</u> utward <u>R</u> ectifying <u>K</u> ⁺ channel	U_{cmd}	Kommandospannung
PVP	Polyvenylpyrrolidone	U_{EL}	Elektrodenpotential
R	Gas Konstante	U_F	Spannung des Folgepulses
r	Rotorradius	U_H	Haltespannung
R	Widerstand in Ohm (Ω)	U_{LJP}	<u>L</u> iquid <u>J</u> unction <u>P</u> otential, Diffusionspotentialdifferenz
RCC	isodiametrische Strahlinitialzelle (<u>r</u> ay <u>c</u> ambial <u>c</u> ell)	U_M	korrigierte Membranspannung
rel.	<u>r</u> elativ	U_m	Membranspannung
REM	<u>R</u> asterelektronen <u>m</u> ikroskop	U_{OFF}	Offsetpotentialdifferenz
R_f	Messwiderstand	U_{out}	Ausgangsspannung
R_m	Membranwiderstand	U_{rev}	Umkehrpotential, Nullstromspannung
R_{mI}	Widerstand eines Ionenkanals	U_{Rs}	Potentialdifferenz des Zugriffswiderstandes
rpm	Umdrehungen pro Minute	U_T	Testspannung
R_s	Zugriffswiderstand, Serienwiderstand	U_V	Offsetpotential des Verstärkers
		U_{VP}	Vorpulsspannung
S	sekundäre Zellwand	V	Volt
SE	Siebelement (<u>s</u> ieve <u>e</u> lement)	VK	<u>v</u> acuolar <u>K</u> ⁺ -channel
Sep.	<u>S</u> eptember		
SKOR	<u>S</u> telar <u>K</u> ⁺ <u>O</u> utward <u>R</u> ectifying channel	W	<u>W</u> urzel
SuK	<u>S</u> uspensions <u>k</u> ultur	w/v	Gewicht / Volumen (<u>w</u> eight / <u>v</u> olume)
T	absolute Temperatur in Kelvin	z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
t	Zeitpunkt	z_g	Elementarladungsäquivalent(e)
Tab.	<u>T</u> abelle		
TEA	Tetraethylammonium	Δ	Differenz

π	Osmolalität	τ_m	langsame Zeitkonstante
τ	Zeitkonstante	Ψ	Potential

1. Einleitung

Die rasant fortschreitende Verknappung der fossilen Energiereserven (Erdöl, Kohle und Erdgas) und der mit der Verbrennung fossiler Rohstoffe verbundene Anstieg an CO₂ in der Atmosphäre haben zu einem steigenden ökonomischen und ökologischen Interesse an umweltfreundlichen und nachhaltig nutzbaren Rohstoffquellen geführt. Bäume und Wälder sind wichtige Quellen für nachwachsenden, nachhaltig nutzbaren Rohstoff. Der von den Bäumen produzierte Rohstoff Holz wird als der zukunftsfähige Rohstoff des 21. Jahrhunderts betrachtet (Informationsdienst Holz, Sep. 2001). Er stellt den größten Anteil der Biomasse der Erde dar (Savidge, 1996, Chaffey, 1999a). Das weltweit genutzte Holzvolumen steigt bereits seit Jahren langsam an. Über die Hälfte des geernteten Holzes wird dabei energetisch genutzt und deckt derzeit ca. 6% des Weltprimärenergiebedarfs (Informationsdienst Holz, Sep. 2001). Der übrige Anteil des geernteten Holzes wird hauptsächlich als Baustoff und als Zellstofflieferant für die Papierproduktion verwendet. Vor- und Nachteile des Rohstoffes Holz sind seine unterschiedlichen Eigenschaften, die gut erforscht sind. Sie ermöglichen zum einen eine vielseitige und individuelle Verwendung, erschweren zum anderen aber seine rationelle und großtechnische Verarbeitung (Informationsdienst Holz, Sep. 2001). Außerdem besitzt Holz aufgrund seiner chemischen Bestandteile (Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektine) ein hohes Potential, fossile Rohstoffe in Zukunft als Chemierohstoff zu ersetzen (Informationsdienst Holz, Sep. 2001). Auch unter ökologischen Gesichtspunkten werden Bäume und ihre Nutzung immer wichtiger. Bäume entziehen der Atmosphäre bei ihrem Wachstum das Treibhausgas CO₂ und binden es in der produzierten Biomasse. Eine Erhöhung der weltweiten Holzproduktion durch zusätzliche Aufforstungen könnte somit genutzt werden, um den Anstieg des CO₂-Gehaltes in der Atmosphäre zu verlangsamen. Außerdem könnte die Substitution fossiler Rohstoffe durch nachhaltig genutztes Holz dazu beitragen, den CO₂-Gehalt der Atmosphäre langfristig auf einem gleich bleibenden Wert zu stabilisieren. Die oben beschriebene Bedeutung von Holz als Rohstoff lässt in naher Zukunft einen zunehmend steigenden Bedarf an Holz erwarten. Derzeit steht dem steigenden Bedarf jedoch noch eine jährliche Abnahme der Waldfläche um 0,4% der Gesamtwaldfläche der Erde durch Rodungen in den Tropen gegenüber (Informationsdienst Holz, Sep. 2001). Um den steigenden Holzbedarf durch Produktionssteigerung auf Dauer nachhaltig zu decken, und um besseres Holz mit bestimmten Eigenschaften produzieren zu können, besteht ein zunehmendes Interesse, die biologischen Grundlagen der Holzbildung und des Holzwachstums zu klären. Im Zentrum der Untersuchungen steht dabei das für die Holzbildung verantwortliche

sekundäre vaskuläre System. Es besteht aus dem vaskulären Kambium, das bei der Zellteilung nach außen Phloemzellen (Bast) und nach innen Xylemzellen (Holz) abgibt (Chaffey, 1999a; Lachaud et al., 1999). Anatomische Untersuchungen der kambialen Aktivität bilden dabei die Grundlage für weitere Analysen der physiologischen Zusammenhänge auf molekularer und biochemischer Ebene. Um derartige Untersuchungen systematisch durchführen und die gewonnenen Informationen zu einem stimmigen Bild zusammenfügen zu können, ist der Einsatz eines Modellsystems mit einem kleinen überschaubaren Genom notwendig geworden. Das Modellsystem Nummer eins der Pflanzenphysiologie ist derzeit die einjährige Pflanze *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.. Allerdings unterscheiden sich Bäume von *Arabidopsis* in erster Linie durch ein mehrjähriges Wachstum. Charakteristisch für Bäume ist die Holzbildung während des sekundären Dickenwachstums. Aufgrund ihrer Mehrjährigkeit sind Bäume außerdem saisonalen Temperaturunterschieden ausgesetzt. Diese führen in den gemäßigten Breiten im Winter zur Dormanz (Winterruhe) von Apikalmeristem und sekundärem Seitenmeristem. Steigende Temperaturen im Frühjahr führen wieder zur Aktivierung der Meristeme. Aufgrund der genannten Unterschiede sind die an *Arabidopsis thaliana* und anderen einjährigen nicht verholzenden Pflanzen gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf Bäume zu übertragen (Taylor, 2002). In den vergangenen Jahren wurde die Gattung *Populus* (Pappel) als Modellbaum etabliert. Sie besitzt im Verhältnis zu anderen Baumgattungen ein relativ kleines Genom mit einer geschätzten Größe zwischen $4,5 \times 10^8$ bis $5,5 \times 10^8$ Basenpaaren (bp) (Taylor, 2002), dessen Sequenzierung abgeschlossen ist. Weitere Vorteile für die Verwendung der Gattung *Populus* als Modellbaum sind ihre Transformierbarkeit, die gut untersuchte Anatomie, das schnelle Wachstum und ihre wirtschaftliche Bedeutung. Von Vorteil ist außerdem ihre Eignung für immunocytochemische und hormonelle Untersuchungen (Chaffey, 1999a)

1.1 Anatomie und Stofftransport

Das äußere Erscheinungsbild von Bäumen ist meist gekennzeichnet von einem durchgehenden oberirdischen Leittrieb, der im unteren Bereich unverzweigt ist und als Stamm bezeichnet wird. Im oberen Bereich ist der Leittrieb verzweigt und bildet die Baumkrone. Unterirdisch besitzen Bäume als Pendant zur Krone ein reich verzweigtes Wurzelsystem. Wachstum erfolgt zum einen als Streckungswachstum im Anschluss an Zellteilungsprozesse der Apikalmeristeme an Spross- und Wurzelspitze. Für die Holzbildung entscheidend ist jedoch das sekundäre Dickenwachstum. Ermöglicht wird es durch den für Holzgewächse typischerweise geschlossenen Kambiumzylinder, einem sekundären Seitenmeristem, das über die Vorstufe eines Prokambiumrings aus dem Apikalmeristem entsteht (Schütt, P., Koch, W., 1978). Der Kambiumzylinder besteht aus einer Schicht teilungsfähiger Initialzellen (Schütt, P., Koch, W., 1978; Mellerowicz et al., 2001). Die tangentielle Sicht auf das Kambium zeigt den komplexen Aufbau des Gewebes aus zwei Zelltypen (Mellerowicz et al., 2001). Radial abgeflachte und axial gestreckte, spitze fusiforme Initialen wechseln sich dabei regelmäßig mit axial angeordneten Reihen isodiametrischer Strahlinitialzellen ab (*Abb. 1.1.*).

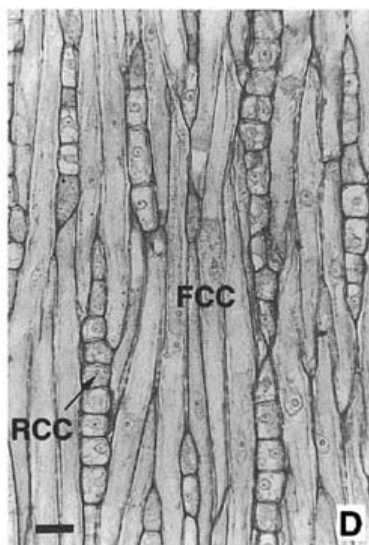


Abb. 1.1. Tangentiale Aufsicht auf das Kambium eines Pappelhybrids (aus Mellerowicz et al., 2001).

Axial gestreckte, spitze fusiforme Initialen (FCC) wechseln mit axial angeordneten Reihen isodiametrischer Strahlinitialzellen (RCC) ab.

Durch Einbau tangentialer Zellwände in die Initialzellen kommt es zur periklinen Zellteilung. Neu gebildete Zellen bleiben zunächst teilungsfähig und werden als Xylem- bzw. Phloemmutterzellen bezeichnet (Lachaud et al., 1999; Mellerowicz et al., 2001). Zusammen

mit den Initialzellen bilden sie ein mehrschichtiges Kambium (Schütt, P., Koch, W., 1978; Mellerowicz et al., 2001). Die Anordnung neu gebildeter Zellen erfolgt in radialen Reihen, was bei Holz- und Baststrahlen besonders deutlich in Erscheinung tritt. Die fortlaufende perikline Zellteilung und Ausdifferenzierung der nach innen gebildeten Xylem-Zellen führt zu einer Verlagerung des Kambiums nach außen (Mellerowicz et al., 2001). Um die dadurch notwendig gewordene Umfangserweiterung zu ermöglichen und dennoch den Kambiumzylinder geschlossen zu halten, teilen sich die Initialen durch Einbau radialer Zellwände antiklin. Die neu gebildeten Initialzellen bilden dabei den Ausgangspunkt für die Entstehung neuer radialer Zellreihen durch perikline Teilung der Kambiumzellen. Charakteristisch für die Zellen des aktiven Kambiums sind die große zentrale Vakuole, der sie umgebende schmale Cytoplasmasaum sowie die dünne Zellwand (Arend, M. and Fromm, J., 2003). An das Kambium schließt sich in radialer Richtung nach innen die Xylemstreckungszone und nach außen die Phloemstreckungszone an. In diesem Entwicklungsstadium ist die Zellwand der gerade neu gebildeten Zellen sehr dehnbar. Bei Wasseraufnahme in die Vakuole einer Zelle kommt es deshalb zur Volumenzunahme der gesamten Zelle, wodurch die einzelnen Zellen ihre charakteristische Form und Größe erhalten. Diese für die Entwicklung der Zellen notwendige Volumenzunahme wird als Zellstreckung bezeichnet und ist namensgebend für den ersten Differenzierungsschritt der Zellen zu Xylem beziehungsweise zu Phloem. Im zweiten Differenzierungsschritt wird die Primärwand durch Auflagern von Sekundärwänden (S1 – S2) und Tertiärwand verstärkt. Mit Ausnahme parenchymatischer Zellen werden Xylemzellen zusätzlich durch Einlagerung von Lignin in die Zellwände versteift. Der Differenzierungsprozess endet schließlich im programmierten Zelltod mit dem Absterben der Zellen (Mellerowicz et al., 2001). Eine Ausnahme bilden wiederum die parenchymatischen Zellen des Xylems und des Phloems, die nach erfolgter Zelldifferenzierung nicht absterben. Die Entwicklung der neu gebildeten Zellen bis zur vollständigen Ausdifferenzierung bzw. Zelltod erfolgt unter anderem unter dem Einfluss von Phytohormonen (Savidge, 1996, Mellerowicz et al., 2001). In Abhängigkeit vom Typ der Initialzelle entstehen dabei durch unterschiedlich starke Zellstreckung und Zellwandneubildung charakteristische Zelltypen mit spezifischen Eigenschaften. Bei der in der vorliegenden Dissertation untersuchten Pappel, entwickeln sich Zellen, die auf der Xylemseite aus den gleichförmigen fusiformen Initialzellen entstehen, zu Gefäßelementen, Holzfasern und Längsparenchym. Die aus den isodiametrischen Strahlinitialzellen gebildeten Zellen entwickeln sich zu parenchymatischen Holzstrahlzellen mit und ohne Kontakt zu Gefäßen (Mellerowicz et al., 2001). Während der Zellstreckung besitzen Gefäßelemente und

Xylemfasern genau wie das Kambium eine große Zentralvakuole und einen schmalen mit Cytoplasma gefüllten Streifen entlang der Zellwand (Arend, M. and Fromm, J., 2003). Die Strahlzellen bestehen dagegen überwiegend aus Cytoplasma (Arend, M., 2001). Im zweiten Differenzierungsschritt verkleinern sich die großlumigen Zentralvakuolen der Gefäßelemente und Fasern durch Schrumpfung und Zerfall in Teilvakuolen (Arend, M., 2001). Gleichzeitig erfolgt bei allen Zelltypen die Auflagerung der einzelnen Zellwände. Als erstes ist die Zellwandauflagerung bei den Gefäßelementen abgeschlossen. Diese großlumigen Zellen des Xylems sterben von allen Zellen als erste ab. Sie dienen dem Wassertransport im Baum. Die Auflagerung der Zellwände im zweiten Differenzierungsschritt dauert bei Xylemfasern länger als bei den Gefäßelementen. Die Fasern haben einen kleineren Außendurchmesser als die Gefäßelemente. Die Fasern sind außerdem englumig, haben dicke Zellwände und dienen vor allem nach ihrem Absterben der Festigung des Baumes. Die axial orientierten Zellen des Längsparenchyms sowie die radial orientierten parenchymatischen Holzstrahlzellen dienen als lebende Zellen dem vertikalen und radialen Stofftransport im Xylem sowie der Speicherspeicherung. Auf der Phloemseite entwickeln sich die aus den fusiformen Initialzellen gebildeten Zellen zu Parenchymzellen, dem Verbund aus einem Siebelement und einer bis mehreren Geleitzellen (SE/CC-Komplex) oder zu Bastfasern weiter. Aus den isodiametrischen Strahlinitialzellen entwickeln sich parenchymatische Zellen, die analog zu den Holzstrahlen im Xylem die Baststrahlen im Phloem bilden. Eine Besonderheit der Phloemdifferenzierung ist der SE/CC-Komplex (engl. sieve element / companion cell). Er geht aus einer inäqualen Teilung einer kambialen Mutterzelle in Siebelement und Geleitzelle hervor. Die ungleiche Teilung der kambialen Mutterzelle wird mit der Zellstreckung sichtbar. Das Siebelement wird dabei großlumig, während die Geleitzellen kleiner bleiben. Trotz Teilung bilden die beiden Zellen jedoch nach wie vor eine Einheit, was im Laufe der weiteren Differenzierung deutlich wird. Zellkern und Vakuole des Siebelementes sowie die meisten Mitochondrien (Heß, D., 1999) werden aufgelöst, während alle Zellbestandteile in der plasmareichen Geleitzelle erhalten bleiben. Das mit nicht lignifizierten Zellwänden verstärkte Siebelement übernimmt nach abgeschlossener Differenzierung den Transport der in den Blättern gebildeten Assimilate. Die Geleitzelle hingegen ist über zahlreiche Tüpfel mit dem Siebelement verbunden und übernimmt dessen Versorgung, wodurch der gesamte SE/CC-Komplex auch nach der Differenzierung nicht abstirbt. Die abgestorbenen Bastfasern haben ebenso wie die Xylemfasern enge Lumina und dienen der Festigung, während parenchymatische Baststrahlen dem radialen Stofftransport dienen. Im Gegensatz zum Xylem wird das Phloem mit Ausnahme der abgestorbenen Bastfasern von lebenden

parenchymatischen Zellen dominiert.

Damit das beschriebene Wachstum durch Zellteilung und Zellstreckung bis zur vollständigen Differenzierung der Zellen überhaupt möglich ist, müssen alle lebenden Zellen des Baumes mit Wasser und Nährstoffen aus dem Boden und mit in der Krone gebildeten Assimilaten versorgt werden. Dazu werden im Bodenwasser gelöste Nährstoffe zusammen mit dem Wasser von der Wurzel aufgenommen (Heß, D., 1999). Wasser und Nährstoffe werden zunächst apoplastisch außerhalb der lebenden Zellen transportiert, um schließlich von den Wurzelzellen kontrolliert in den Symplasten aufgenommen zu werden. Im Symplasten passieren Wasser und Nährstoffe die auf apoplastischem Weg undurchlässige Endodermis (Caspary-Streifen) und gelangen dann in den Zentralzylinder (Heß, D., 1999). Dort werden Wasser und Nährstoffe zum aufwärts gerichteten Langstreckentransport vom Symplasten an das apoplastische Leitungssystem des Xylems abgegeben, welches von den röhrenförmig aneinander gereihten Gefäßelementen gebildet wird. Andererseits werden in den photosynthetisch aktiven Blättern gebildete Assimilate über das von den Siebelementen gebildete Leitungssystem des Phloems abwärts zu Stamm und Wurzel transportiert. Überschüssige, nicht für Stoffwechselprozesse benötigte Assimilate werden dort gespeichert (Heß, D., 1999). Ein Teil der Assimilate wird jedoch zur Versorgung der Meristeme und Streckungszonen sowie der jungen, wachsenden Blätter nach oben geleitet. Der Transport erfolgt hier ebenfalls im Phloem (Heß, D., 1999). Neben dem axialen Langstreckentransport der Nährstoffe in Xylem und Phloem kommt es zusätzlich über die Strahlen zu einem radialen Nährstofftransport zwischen Xylem und Phloem (Lachaud et al., 1999; Mellerowicz et al., 2001), wodurch das Kambium mit Nährstoffen versorgt wird. So kommt z. B. Kalium in den ausdifferenzierten Holzstrahlzellen in höherer Konzentration vor als in den neu gebildeten Zellen der Streckungszone (Dünisch et al., 1998). In Verbindung mit dem Nachweis von erhöhten Kaliumkonzentrationen in sich differenzierenden Tracheiden spricht dieser Befund für einen radialen Transport von Kalium zum Kambium über den eine Versorgung fusiformer Zellen mit diesem zur Zellstreckung benötigten Mineral erfolgen kann (Dünisch et al., 1998).

1.2 Bedeutung des Kaliums für das Holzwachstum

Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, wird die Holzbildung vornehmlich von der Aktivität des Kambiums bestimmt. Der Holzzuwachs hängt dabei von der Zellteilungsrate des Kambiums und von der Streckung der neu gebildeten Zellen ab. Beide Wachstumsfaktoren werden unter anderem von der Versorgung mit Nährstoffen beeinflusst. Eine besondere Bedeutung hat in diesem Zusammenhang der anorganische Nährstoff Kalium, der in der pflanzlichen Zelle als positiv geladenes Ion (K^+) vorkommt. So zeigten Untersuchungen von Arend (Arend, M., 2001) zur saisonalen Kaliumverteilung im Gewebe von Zweigquerschnitten von *Populus trichocarpa* Torr. et Gray eine deutliche Zunahme des Kaliumgehaltes in Kambium und Xylemdifferenzierungszone während der Aktivierung des Kambiums im Frühjahr. Mit abnehmender kambialer Aktivität im Juni sank der Kaliumgehalt des Kambiums wieder ab, um im Herbst wieder gleiche Konzentrationen wie in den benachbarten Geweben Xylem und Phloem zu erlangen. Die niedrigsten Kaliumgehalte des Kambiums wurden Ende Januar gemessen. Diese Besserversorgung des aktiven Kambiums und der Xylemstreckungszone wurden von Arend (2001) und Wind (2003) mit Kaliumernährungsversuchen mit dem Ziel untersucht, den Einfluss der K^+ -Versorgung auf die kambiale Zellteilungsrate und die Zellstreckung zu bestimmen. Die Ergebnisse belegen einen direkten Einfluss der Kaliumversorgung der Pflanzen auf das Holzwachstum. So besaßen gut mit Kalium versorgte Pflanzen in radialer Orientierung deutlich mehr Kambiumzellen und mehr differenzierende Xylemzellen als kaliumunterversorgte Pflanzen (Wind, C., 2003). Das deutet auf eine höhere Zellteilungsrate bei gut versorgten Pflanzen hin. Auch ein Einfluss der Kaliumversorgung der Pflanzen auf die Größe der gebildeten Xylemzellen wurde bei den genannten Kaliumernährungsversuchen beobachtet. So konnte Arend mit verbesserter Kaliumversorgung an *Populus trichocarpa* eine Zunahme der Gefäß-Querschnittsflächen nachweisen, während die Querschnittsflächen von Fasern nicht beeinflusst wurden (Arend, M., 2001). Untersuchungen an *Populus tremula* x *Populus tremuloides* zeigten ebenfalls eine Auswirkung der Kaliumversorgung der Pflanzen auf die Zellgröße. Hier nahm mit zunehmender Kaliumversorgung der Pflanzen die Querschnittsfläche der einzelnen Gefäße ab (Wind, C., 2003). Insgesamt erhöhte sich jedoch die Anzahl der neu gebildeten Gefäßelemente (Wind, C., 2003), so dass mit zunehmender Kaliumversorgung genau wie bei der größeren Querschnittsfläche der einzelnen Gefäße die Wasser leitende Fläche über den Zweigquerschnitt zunahm. Auch bei dieser Untersuchung blieben die Querschnittsflächen der Fasern von der Kaliumversorgung der Pflanzen unbeeinflusst. Durch Applikation von Tetraethylammonium (TEA), einem Hemmstoff von Kaliumkanälen und damit des

Kaliumtransportes, wurde der direkte Einfluss von Kalium auf den Gefäßquerschnitt nachgewiesen. Unter dem Einfluss von TEA wiesen gut mit Kalium versorgte Pflanzen ähnliche Gefäßquerschnittsflächen wie Kaliumunterversorgte Pflanzen auf (Arend, M., 2001). Untersuchungen an Fichte belegen ebenfalls den direkten Einfluss von Kalium auf das Zellwachstum. So enthielten die großlumigeren Frühholztracheiden während der Zellstreckung deutlich höhere Kaliumgehalte als Kambiumzellen, Siebzellen und Tracheiden während der Sekundärwandbildung. Spätholztracheiden, die kleinere Lumina ausbilden, enthielten im Vergleich zu den Kambiumzellen hingegen nur geringfügig höhere Kaliumgehalte (Dünisch et al. 1998). Die genannten Arbeiten belegen, dass der Kaliumgehalt einer Zelle während der Zellstreckung maßgeblich deren Wachstum beeinflusst. Je höher der Kaliumgehalt der Zelle ist, desto größer ist der erreichte Zelldurchmesser. Aufgrund seiner hohen Konzentration in der pflanzlichen Zelle (100 – 200 mM) gilt Kalium als das wichtigste ionisch vorliegende pflanzliche Osmotikum (Walker et al., 1996; Shabala, S., 2003; Rodriguez-Navarro, A., 2000). Für das Zellwachstum ist insbesondere der Kaliumgehalt der Vakuole von Bedeutung in der bei normal versorgten Pflanzen im Vergleich zum Cytoplasma das meiste Kalium gespeichert ist (Walker et al., 1996). Während der Zellstreckung führt diese gegenüber dem Cytoplasma und dem Apoplasten höhere Kaliumkonzentration der Vakuole zu dem für die Zellstreckung benötigten Wassereinstrom. Ist der Kaliumgehalt der Vakuole aufgrund einer Besserversorgung der Pflanze erhöht, kann es zu einem verstärkten Wassereinstrom in die Zelle und somit zur Bildung größerer Zellen kommen. Untersuchungen zum Einfluss der Kaliumversorgung auf die Kaliumgehalte von Cytoplasma und Vakuole in Wurzelzellen von Gerste unterstreichen die Bedeutung der Kaliumversorgung für das Holzwachstum (Walker et al., 1996). Die Untersuchungen belegen, dass insbesondere der für die Zellstreckung entscheidende Kaliumgehalt der Vakuole von der Kaliumernährung der Pflanze beeinflusst wird. So zeigen die Wurzelzellen bei Mangelernährung vornehmlich eine Abnahme des Kaliumgehaltes der Vakuole während der Kaliumgehalt des Cytoplasmas weitgehend unverändert bleibt (Walker et al., 1996). Dies steht in Einklang mit den bei niedrigeren Kaliumgehalten von Xylemzellen beobachteten geringeren Zelldurchmessern. Neben Kalium als dem wichtigsten Osmotikum sind jedoch noch weitere Substanzen wie Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , Polyamine, Zucker und organische Säuren wie Malat an Aufbau und Regulation des osmotischen Potentials beteiligt. Bei einer Kaliummangelversorgung kann Kalium außerdem zur Aufrechterhaltung des Turgor durch weitere osmotisch wirkende Substanzen wie z.B. Natrium (Na^+) substituiert werden (Rodriguez-Navarro, A., 2000; Mäser et al., 2002).

1.3 Ionenkanäle und Transporter

Die für das Holzwachstum lebensnotwendigen Nährstoffe wie z.B. Kalium wandern auf ihrem Weg zu den Verbrauchsorten (engl. Sink) mehrfach zwischen Apoplast und Symplast hin und her (siehe Kapitel 1.1). Sie müssen dabei jedes Mal die Plasmamembran passieren. Der strukturelle Aufbau aller Zellmembranen aus einer Lipiddoppelschicht verhindert jedoch den ungehinderten Durchtritt von wasserlöslichen, d.h. lipophoben Substanzen wie z.B. von im Wasser gelösten K^+ -Ionen. Der essentielle Transport von wasserlöslichen Molekülen erfolgt deshalb kontrolliert durch in die Lipiddoppelschicht eingelassene Transportproteine. Die Proteine bilden eine hydrophile Pore, die den Durchtritt von Wasser und gelösten Ionen ermöglicht. Bei den membranintegralen Transportproteinen werden Kanäle, Transporter und Pumpen unterschieden. Die Kanäle und Transporter leiten ihre Substrate entlang des elektrochemischen Potentialgradienten. Das Öffnen und Schließen kann dabei durch die Membranspannung und/oder Liganden gesteuert werden. Während die aktivierten Kanäle auf beiden Membranseiten gleichzeitig geöffnet sind, werden die Transporter immer auf einer Membranseite geschlossen gehalten. Eine Konformationsänderung des Proteins sorgt in diesem Fall für das Öffnen auf der anderen Membranseite. Der Transmembrantransport entlang des elektrochemischen Potentialgradienten selbst, ist im Normalfall passiv. Allerdings wird dieser elektrochemische Potentialgradient meistens unter Energieverbrauch gezielt aufgebaut, weshalb von einem sekundär aktiven Transport gesprochen wird (Heß, D., 1999). Mit Verantwortlich hierfür sind Pumpen die primär aktiv H^+ oder Ca^{2+} unter Energieverbrauch gegen den elektrochemischen Potentialgradienten von einer Membranseite auf die andere transportieren.

Besonders intensiv erforscht wurde der Transmembrantransport des Hauptnährelementes Kalium (Mäser et al., 2001). So wurden die Mechanismen der Kaliumaufnahme und des Kaliumtransportes in verschiedenen Zelltypen von Wurzel, Spross und Blatt untersucht (Hedrich and Roelfsema, 1999). Das als Kation vorliegende Kalium (K^+) passiert die Zellmembranen wie z.B. das Plasmalemma und den Tonoplasten mit Hilfe von Kaliumkanälen und Kalium-Transportern. Die Kaliumkanäle können drei Kanal-Familien (Shaker-, TPK-, Kir-Familie) zugeordnet werden, die sich anhand ihres Bauplans voneinander unterscheiden lassen (Abb. 1.2.). Die Kanäle der Shaker-Familie (z.B. SKOR, engl.: Ste \bar{l} ar K⁺ Outward Rectifying channel) bestehen aus vier α -Untereinheiten, die um eine zentrale Pore angeordnet, ein funktionelles Kanalprotein bilden (MacKinnon, R., 1991). Jede α -Untereinheit setzt sich aus sechs hydrophoben Transmembranen-Domänen (TM) und einer Porenregion (P) zusammen, die sich zwischen der fünften und sechsten TM-Domäne befindet.

Während die Porenregion Teil des Selektivitätsfilters ist, fungiert die vierte TM-Domäne als Spannungssensor. Die Familie der Shaker-Kanäle ist bislang die am gründlichsten untersuchte Gruppe pflanzlicher Transportsysteme (Véry and Sentenac, 2002). So konnten bereits die meisten in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* nachgewiesenen Shaker-Kanäle gewebespezifisch lokalisiert und in heterologen Testsystemen charakterisiert werden (Véry and Sentenac, 2002). Die Kanäle der TPK-Familie (engl. tandem-pore K^+ channel, z.B. KCO1 = TPK1) zeigen hingegen eine strukturelle Homologie zu der bei Tieren bekannten KCNK-Familie (Becker et al., 2004) deren Untereinheiten nur aus vier Transmembranen-Domänen und zwei Porenregionen bestehen. Die erste Porenregion befindet sich bei dieser Kanal-Familie zwischen der ersten und der zweiten TM-Domäne. Die zweite Porenregion befindet sich zwischen der dritten und der vierten Transmembranen-Domäne (Véry and Sentenac, 2002). Die Kanäle der Kir-Familie (z.B. KCO3) bilden die dritte Gruppe der Kaliumkanäle. Die Untereinheiten der Kir-Familie bestehen aus zwei Transmembranen-Domänen mit nur einer Porenregion zwischen der ersten und der zweiten Transmembranen-Domäne (Véry and Sentenac, 2002).

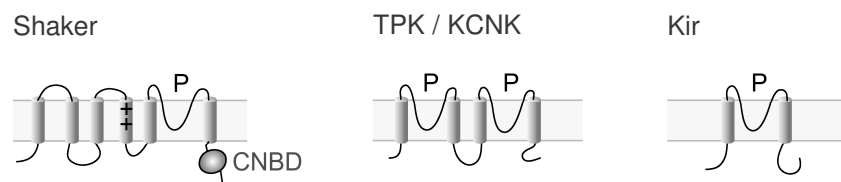


Abb. 1.2. Familien pflanzlicher Kaliumkanäle (aus Véry and Sentenac, 2002).

Zylinder symbolisieren Transmembrane-Domänen, die von einer Seite zur anderen Seite der Membran reichen. Die Porenregionen sind mit P gekennzeichnet. CNBD symbolisiert eine Bindestelle für cyclische Nucleotide. ++ symbolisiert positiv geladene Aminosäuren des Spannungssensors.

Den Kanälen der Shaker-Familie gilt bei dem in der vorliegenden Dissertation untersuchten Modellbaum Pappel besonderes Augenmerk. Anhand von EST's (engl.: Expressed Sequences Tags; Sterky et al., 1998) konnten für den Pappelhybrid *Populus tremula x Populus tremuloides* bereits drei zu *Arabidopsis thaliana* homologe Kaliumkanäle kloniert und jeweils einer der fünf bekannten Shaker-Unterfamilien zugeordnet werden (Abb. 1.3., Langer, K., 2003). Dabei wurde der zum Kaliumkanal GORK aus *Arabidopsis thaliana* (Guardcell Outward Rectifying K^+ channel, Ache et al., 2000) homologe Kaliumkanal der Pappel PTORK (Populus tremula Outward Rectifying K^+ channel; Langer et al., 2002) der SKOR-Unterfamilie (Stelar K⁺ Outward Rectifying channel, Gaymard et al., 1998), PTK2 (Populus tremula K^+ channel 2; Langer et al., 2002) der AKT2/3-Unterfamilie (Arabidopsis thaliana K^+ -Transporter 2/3) und KPT1 (K^+ channel Populus tremula 1; Langer, K., 2003; Langer et al., 2004) der KAT1-

Unterfamilie (K^+ -Transporter *Arabidopsis thaliana* 1) zugeordnet.

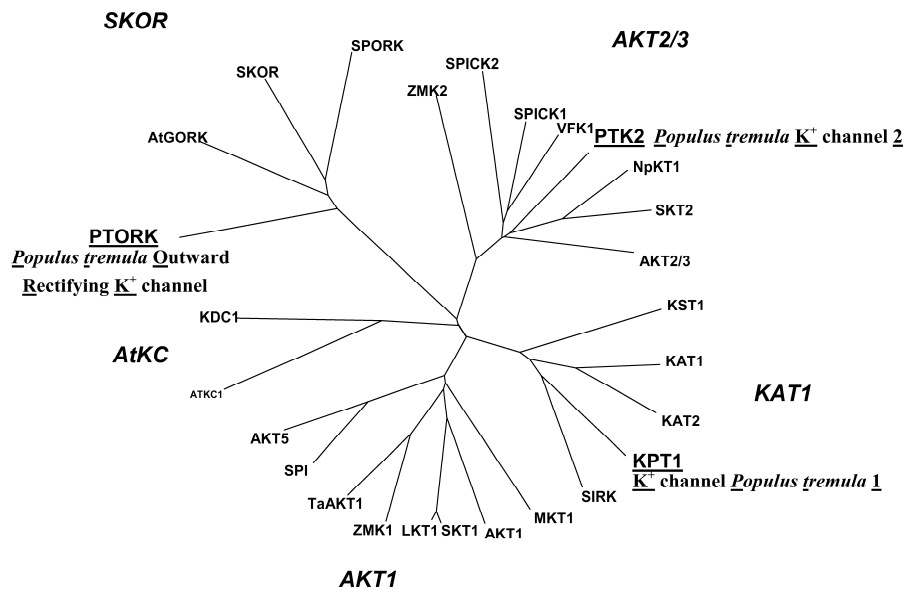


Abb. 1.3. Phylogenetischer Baum pflanzlicher K^+ -Kanäle des Shaker-Typs mit hervorgehobenen Pappel-Kanälen und den fünf Unterfamilien (kursiv) aus (Langer, K., 2003).

Neben den drei bereits genannten Kanalfamilien Shaker, TPK und Kir bietet eine vierte Kanal-Familie möglicherweise einen weiteren Weg für den transmembranen Kalium-Transport. Es handelt sich hierbei um Kanäle der CNGC-Familie (engl.: cyclic-nucleotide-gated-channels). Die Untereinheiten besitzen wie diejenigen der Shaker-Familie sechs Transmembrane-Domänen und eine Porenregion. Neben der Bindestelle für cyclische Nukleotide besitzen sie eine weitere für Calmodulin. Im Gegensatz zu den hoch kaliumselektiven Shaker-Kanälen handelt es sich bei den CNG-Kanälen vermutlich um schwach selektive Kationen-Kanäle, die für Kalium, Natrium und/oder Calcium permeabel sind (Véry and Sentenac, 2002). Weitere für den pflanzlichen Kalium-Transport zuständige Proteine gehören der Familie der KT/KUP/HAK-Transporter an. Ihre genaue Struktur und funktionelle Aggregation aus Untereinheiten ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Es werden je Untereinheit 12 Transmembrane-Domänen vermutet (Kim et al., 1998). Mit PtKUP1 (*Populus tremula* K^+ uptake transporter 1) konnte aus der Pappel bislang ein Transporter dieser Familie identifiziert werden (Langer, K., 2003; Langer et al., 2002). Mit Hilfe von Expressionsanalysen der jeweiligen Gene in verschiedenen Geweben, wie z.B. junge 'sink'-Blätter, ältere 'source'-Blätter, Petiolen, Xylem, Phloem, Wurzel und Suspensionskultur, konnten die aus der Pappel isolierten Kanäle und Transporter grob

lokalisiert werden (Langer, K., 2003). *PTORK* konnte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden, war jedoch unterschiedlich stark exprimiert. *PTK2* konnte ebenfalls mit Ausnahme der Wurzelprobe in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Die stärkste Expression dieser beiden Kanalgene wurde in ansteigender Reihenfolge in Xylem, Petiole und Phloem registriert. Die Expressionsrate von *PTK2* dominierte jedoch in den meisten Gewebeproben. *PTORK* war lediglich im Xylem und in Zellkultur sowie in der Wurzelprobe höher exprimiert, für welche *PTK2* überhaupt nicht nachgewiesen werden konnte. *KPT1* wurde dagegen fast ausschließlich in Schließzellen exprimiert (Langer et al., 2004). Der Kalium-Transporter *PtKUP1* konnte nur in geringen Mengen, dafür wiederum in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden (Langer, K., 2003). Die beiden Shaker-Kanäle *PTORK* und *PTK2* wurden zusätzlich mit Hilfe von immunohistochemischen Nachweisverfahren auf zellulärer Ebene lokalisiert (Wind, C., 2003; Arend et al., 2005). Mit den an Zweigquerschnitten durchgeführten Untersuchungen konnte *PTORK* in Siebröhren, in sich differenzierenden Faserzellen und in Kontaktzellen des Holzstrahlparenchyms lokalisiert werden. *PTK2* wurde in parenchymatischen Zellen des Phloems und im Strahlparenchym lokalisiert (Wind, C., 2003; Arend et al., 2005).

1.4 Elektrophysiologie

Mit Hilfe elektrophysiologischer Messmethoden wie der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Technik (engl.: Double-Electrode-Voltage-Clamp, DEVC) und der Patch-Clamp-Technik (siehe Kapitel 2.3) lassen sich bereits klonierte Kanalgene *in vitro* funktionell charakterisieren. Voraussetzung hierfür ist eine erfolgreiche Expression der Gene in heterologen Testsystemen wie *Xenopus laevis* Oozyten, Insektenzellen (Gaymard et al., 1996) oder homolog in Pflanzenzellen (Bei et al., 1998; Hossy et al., 2005).

Für die funktionelle Charakterisierung wird der Ionenfluss durch geöffnete Kanalproteine als elektrischer Strom gemessen und graphisch in Abhängigkeit von Zeit oder Spannung dargestellt (siehe auch Kapitel 2.3). Von Bedeutung sind hierbei besonders die Richtung in die der Strom fließt und die Frage, ob die Spannung der Membran, in die das Kanalprotein eingelagert ist, den Stromfluss reguliert. Weiterhin ist die Frage, ob der Stromfluss durch bestimmte Substanzen gefördert oder gehemmt werden kann von Bedeutung. Bei der funktionellen Charakterisierung lassen sich Kaliumkanäle anhand ihres spannungsabhängigen Verhaltens zunächst drei Gruppen zuordnen. Die erste Gruppe ist durch eine starke Spannungsabhängigkeit gekennzeichnet die bei Depolarisation der Membran auswärtsgerichtete Ionenströme vermittelt. Die zweite Gruppe weist ebenfalls eine starke Spannungsabhängigkeit auf ist jedoch im Gegensatz zur ersten Gruppe durch einen bei Hyperpolarisation auftretenden einwärtsgerichteten Ionenstrom gekennzeichnet. Die dritte Kanalgruppe ist schließlich durch eine schwache Spannungsabhängigkeit des Ionenstroms gekennzeichnet (Véry and Sentenac, 2002). Kanäle dieser Gruppe vermitteln sowohl Auswärtsströme als auch Einwärtsströme. Auch die fünf Unterfamilien der Shaker-Familie (Abb. 1.3.), lassen sich diesen drei Kanalgruppen zuordnen. So vermitteln Kanäle der SKOR-Unterfamilie spannungsabhängig auswärtsgerichtete Kaliumströme, den KAT1, AKT1 und AtKC Unterfamilien zugehörige Kanäle vermitteln spannungsabhängig einwärtsgerichtete Ionenströme während Kanäle der AKT2/3-Unterfamilie durch schwache Spannungsabhängigkeit gekennzeichnet sind. Für die drei Shaker-Unterfamilien SKOR, KAT1 und AKT2/3 denen die klonierten Pappelkanäle zugeordnet wurden, sollen an dieser Stelle außerdem weitere funktionelle Kanalmerkmale genannt werden. Wie oben bereits angedeutet zeigen der SKOR-Unterfamilie zugeordnete Kaliumkanäle wie auch Kaliumkanäle der KAT1-Unterfamilie oder Kanäle anderer Familien, ein deutlich von Zeit und Membranspannung abhängiges Öffnungsverhalten. Für Auswärtsgleichrichter charakteristisch öffnen die Kanäle der SKOR-Unterfamilie jedoch erst wenn das Membranpotential depolarisiert ist, und eine positivere Spannung als im zellulären Ruhezustand angenommen

hat. Das Membranpotential bei dem sich die Summe der in der Membran befindlichen SKOR-Kanäle zu öffnen beginnt, wird als Aktivierungspotential bezeichnet. Es verhält sich kaliumabhängig und verschiebt sich bei zunehmender externer Kaliumkonzentration mit dem Nernstpotential für Kalium (E_K) in positiver Richtung. Der bei geöffneten Kanälen zu messende Kaliumstrom ist auswärts-gerichtet, zeigt eine sigmoide Aktivierungskinetik und steigt mit zunehmender Depolarisation kontinuierlich an. (*Abb. 1.4.*, Gaymard et al., 1998). Bei externen Kaliumkonzentrationen größer 10 mM K^+ verhält sich auch der Ionenstrom kaliumabhängig und nimmt mit zunehmender Kaliumkonzentration ab (Gaymard et al., 1998). Der Ionenstrom ist außerdem durch die Kaliumkanal-Blocker Barium (Ba) und Tetraethylammonium (TEA) hemmbar (*Abb. 1.4 C.*, Gaymard et al., 1998). Auch pH-Wert Änderungen beeinflussen den Kaliumstrom, so bewirkt sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Ansäuerung eine Reduktion des mit *Xenopus*-Oozyten gemessenen makroskopischen Kaliumstroms (Lacombe et al., 2000 A).

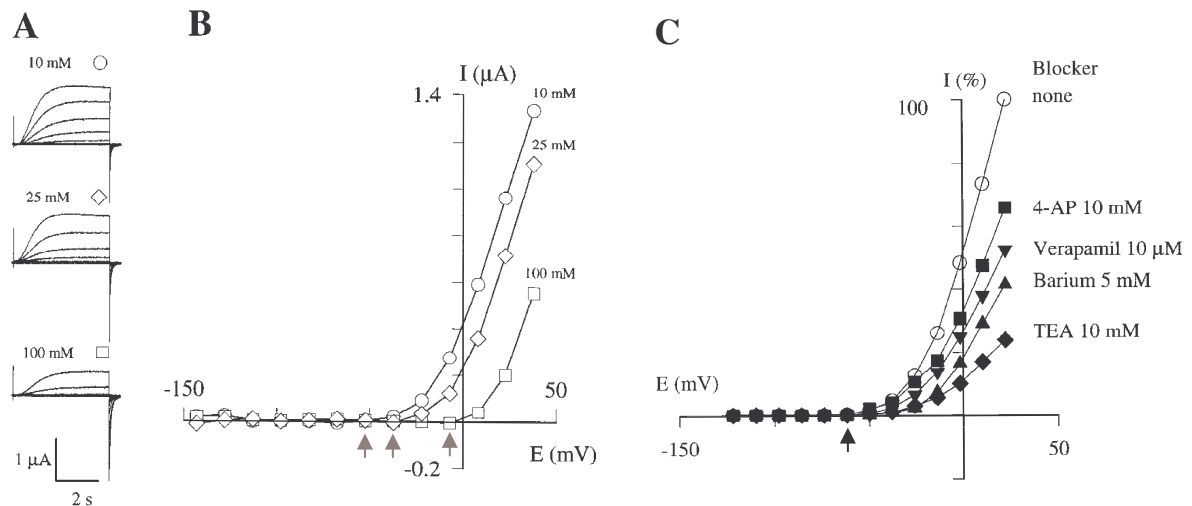


Abb. 1.4. Stromspuren und Stromspannungskennlinien von *Xenopus* Oozyten, die den auswärtsgerichtenden Kaliumkanal SKOR exprimierten (aus Gaynard et al., 1998).

A: Stromspuren bei unterschiedlichen externen Kaliumkonzentrationen zeigen bei gleicher Membranspannung mit abnehmender externer Kaliumkonzentration eine Zunahme des Ionenstroms verursacht durch eine zunehmende Depolarisation der Membran (siehe B).

B: Strom-Spannung-Kennlinien bei unterschiedlichen externen Kaliumkonzentrationen spiegeln die Kaliumsensitivität des SKOR-Kanals wieder. Pfeile kennzeichnen die für die Kaliumsensitivität charakteristische Verschiebung der Aktivierungsschwelle mit zunehmender externer K^+ -Konzentration zu positiveren Membranpotentialen.

C: Strom-Spannung-Kennlinien des SKOR-Kanals unter Standardbedingungen ohne Blocker (\circ bei 1 mM $CaCl_2$, 1,5 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES [pH 7.4], 10 mM KCl) sowie bei Zugabe der Blocker 4-aminopyridine (\blacksquare), Verapamil (\blacktriangledown), Barium (\blacktriangle) und TEA (\blacklozenge) zur externen Messlösung zeigen eine durch Barium und TEA verursachte Reduktion des Ionenstroms bei gleich bleibender Aktivierungsschwelle (Pfeil).

Kaliumkanäle der KAT1-Unterfamilie zeigen wie die Kanäle der SKOR-Unterfamilie ein von Zeit und Membranspannung abhängiges Öffnungsverhalten (Brüggemann et al., 1999). Im Gegensatz zu SKOR aktiviert KAT1 vornehmlich bei Hyperpolarisation (Hedrich et al., 1995; Latorre et al., 2003), wenn die Membranspannung negativere Werte als im Ruhezustand annimmt. Er vermittelt einwärts-gerichtete Kaliumströme die mit zunehmender Hyperpolarisation der Membran kontinuierlich verstärkt werden (Abb. 1.5.). Eine Verringerung der externen Kaliumkonzentration führt zu einer kaliumsensitiven Abnahme des Ionenstroms. Wird die externe Kaliumkonzentration weiter erniedrigt kommt es bei sehr niedrigen Kaliumwerten zu auswärts-gerichteten Ionenströmen (Véry et al. 1995). Im Gegensatz zum Ionenstrom wird das Aktivierungsverhalten des KAT1-Kanals jedoch nicht von der externen Kaliumkonzentration reguliert (Véry et al. 1995). Eine extrazelluläre Ansäuerung verursacht eine Zunahme des Kaliumeinstroms sowie eine Verschiebung des Aktivierungspotentials zu positiveren Werten (Hedrich et al., 1995). Durch extrazelluläres Cäsium (Cs^+) ist KAT1 außerdem spannungsabhängig blockierbar (Hedrich et al., 1995; Becker et al., 1996).

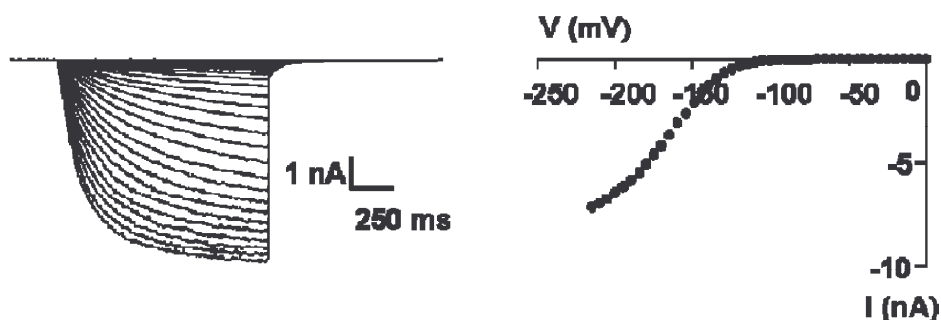


Abb. 1.5. Stromspuren und Stromspannungskennlinie von KAT1 exprimierenden *Xenopus* Oozyten (aus Latorre et al., 2003).

Stromspuren (links) und Stromspannungskennlinie (rechts) zeigen eine Zunahme des einwärts-gerichteten Ionenstroms bei zunehmender Hyperpolarisation der Membran unter dem Einfluss von jeweils 110 mM K^+ in interner und externer Messlösung.

Die AKT2/3-Unterfamilie zeigt als dritte Shaker-Unterfamilie im Gegensatz zur SKOR-Unterfamilie und der KAT1-Unterfamilie ein nur schwach spannungsabhängiges Öffnungsverhalten (Marten et al., 1999; Lacombe et al., 2000 B). Der Ionenstrom von AKT2/3 wird von einer leckartig sofort auftretenden instantanen Stromkomponente und einer zusätzlichen zeitabhängigen Komponente geprägt (Abb. 1.6.). Der durch Hyperpolarisation aktivierte Kaliumstrom von AKT2/3 ist bei hyperpolarisierenden Membranspannungen nach innen orientiert, fließt aber bei depolarisierenden Membranspannungen nach außen. Er ist durch die Kaliumkanal-Blocker Cs^+ (Abb. 1.6.), Ba^{2+} und TEA^+ reversibel blockierbar. Charakteristisch für AKT2/3 ist außerdem die blockierende Wirkung die externes Calcium (Ca^{2+}) oder ein niedriger apoplastischer pH-Wert auf den Ionenstrom ausüben (Marten et al., 1999).

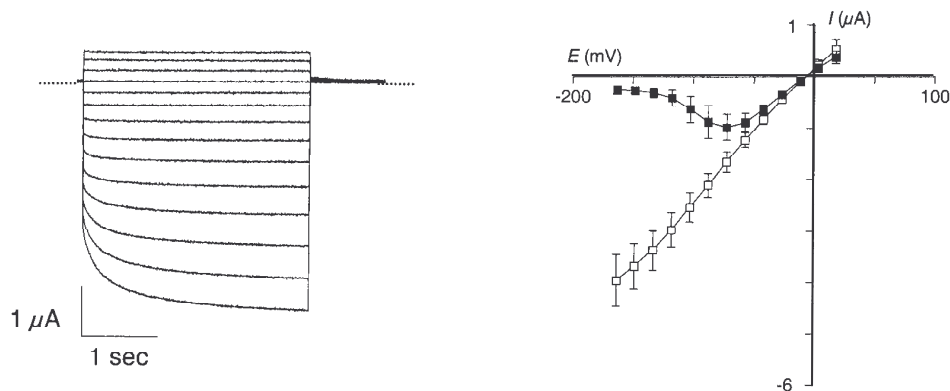


Abb. 1.6. Stromspuren und Stromspannungskennlinie von AKT2/3 exprimierenden *Xenopus* Oozyten (aus Lacombe et al., 2000).

Stromspuren mit leckartigem instantanem Strom zu Beginn der einzelnen Messungen (links) und Stromspannungskennlinien unter Standardbedingungen (offene Quadrate; 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 5 mM Hepes-NaOH, pH 7,4) sowie unter dem blockierenden Einfluss von extrazellulärem Cäsium (geschlossene Quadrate; rechts).

Neben der oben genannten *in vitro* Charakterisierung von Kanalgengen kann mit elektrophysiologischen Messmethoden wie der Patch-Clamp-Technik außerdem *in vivo* eine funktionelle Charakterisierung von Ionenströmen erfolgen. Eine Zuordnung des vermittelnden Kanalgens erfolgt in diesem Fall jedoch indirekt. So kann angenommen werden, dass die Ionenströme bei Übereinstimmung mit den *in vitro* beobachteten Charakteristika eines Ionenkanals und bei gleichzeitiger Expression des entsprechenden Gens in dem untersuchten Zelltyp sehr wahrscheinlich durch diesen Kanaltyp vermittelt werden.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den Zusammenhang von Kaliumtransport und kaliumabhängigen Holzwachstum der Pappel mit elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden zu vertiefen. Dazu sollten verschiedene Zelltypen des Modellbaumes *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx., die potentiell am Kaliumtransport innerhalb des Baumes beteiligt sind, *in vivo* auf das Vorhandensein von Kaliumkanälen in der Plasmamembran elektrophysiologisch analysiert werden.

Im Einzelnen sollten dazu

- Isolationsmethoden entwickelt werden, mit deren Hilfe aus den für die Patch-Clamp-Untersuchungen vorgesehenen Zelltypen Protoplasten isoliert werden können.

Darüber hinaus sollten die folgenden Aspekte untersucht werden:

- Ionenströme in jungen Xylemfasern, die dem Kaliumkanal PTORK zugeordnet werden können, der mittels immunohistochemischer Lokalisation für diesen Zelltyp nachgewiesen werden konnte (Wind, C. 2003)
- Einfluss einer unterschiedlichen Kaliumversorgung von Suspensionskultur auf Ausmaß und Orientierung der Kaliumströme von isolierten Protoplasten und mögliche Zusammenhänge zum kaliumabhängigen Holzzuwachs
- Veränderungen in Amplitude und Orientierung der Kaliumströme in isolierten Knosprotoplasten während des Austriebs
- Reaktionen des Membranpotentials von Strahlzellen aus Kambium- und Zellexpansionszone intakter Pflanzen auf Veränderungen der apoplastischen Kaliumkonzentration

Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten schließlich darüber Aufschluss geben wie die Größenentwicklung der untersuchten Zelltypen durch Kaliumtransport und Kaliumernährung reguliert wird. Da Größenunterschiede der Zellen die Holzqualität entscheidend beeinflussen können, sollten die gewonnenen Erkenntnisse außerdem in Hinblick auf ihre Bedeutung für die Anlage kurzumtriebiger Pappelplantagen betrachtet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Die Untersuchungen wurden an Pflanzen und an Suspensionskultur von Klon T89 der Pappel-Hybride *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx. durchgeführt (Tuominen et al., 1994). Der Klon wurde kontinuierlich unter sterilen Bedingungen vegetativ vermehrt (siehe Kapitel 2.1.1). Das Wachstum der Sterilkultur (siehe Kapitel 2.1.1) erfolgte in einer Klimakammer unter Langtag-Bedingungen bei 22°C für 16 h im Licht und bei 17°C für 8 h in Dunkelheit. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren¹. Bewurzelte Sprosse aus Sterilkultur wurden unsteril unter denselben Klimabedingungen in Hydrokultur weiter kultiviert (siehe Kapitel 2.1.3). Ungefähr drei Monate alte Hydrokulturpflanzen wurden in Erde getopft und in der Vegetationsperiode ins Freiland (siehe Kapitel 2.1.5) gepflanzt. Dort wuchsen sie unter natürlichen Bedingungen heran. Kallus von Klon T89 wurde bei Dunkelheit in Suspensionskultur vermehrt (siehe Kapitel 2.1.2).

2.1.1 Sterilkultur

Für die Untersuchungen wurde eine sterile Linie des Pappel-Hybrid-Klons *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx. T89 benutzt, der freundlicherweise von PD U. Nehls, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt wurde. Dazu wurden die von K. Langer benannten Arbeitsschritte II und III (Langer, K., 2003) angewandt. Der von K. Langer benannte Arbeitsschritt I (Langer, K., 2003) diente der Erzeugung steriler Sprosse aus Kallusgewebe. Nachfolgend werden jedoch nur die zum Erhalt und Vermehrung der Kultur verwendeten Arbeitsschritte II und III beschrieben.

Die Kultur der sterilen Sprosse erfolgte auf Agar-Medien unterschiedlicher Zusammensetzung. Für den zweiten Arbeitsschritt wurde Medium II in Magenta-Gefäßen verwendet, das dem Sprosslängenwachstum diente. Etwa 3 bis 4 Wochen alte, auf Medium II gewachsene Sprosse wurden unter einer sterilen Werkbank² mit einer Schere abgetrennt. Ein Teil der abgetrennten Sprossspitzen wurde zum Erhalt der Kultur erneut in Magenta-Gefäße mit Medium II gesteckt (Schritt II). Im dritten Arbeitsschritt wurde ein weiterer Teil der Sprossspitzen zum Bewurzeln mit der Schnittstelle in Medium III in 0,5 l Weckgläsern

¹ Typ: TLD 58W/840 Super 80, Philips

² NUAIRE, Biological Safety Cabinets Class II, Zapf Instrumente, Sarstedt, Deutschland

gesteckt. In beiden Arbeitsschritten wurden 4 bis 5 Sprosse pro Gefäß verwendet. Nach 4 bis 6 Wochen hatten die Sprosse in den Weckgläsern 4 bis 6 cm lange Wurzeln gebildet und wurden in Hydrokultur überführt (siehe Kapitel 2.1.3). Die Sterilkulturmedien setzten sich wie folgt zusammen:

Sterilkultur Medium II (pro 1 l):

4,4 g MS³-Medium
 0,2 mg BAP (6-Benzylaminopurin, Sigma)
 0,1 mg IBA (Indolbuttersäure, Duchefa)
 20 g Sacharose
 pH 5,8 (1 M KOH)
 7 g Agar (Roth, # 4508.1), autoklavieren

Sterilkultur Medium III (pro 1 l):

2,2 g MS-Medium
 10 g Sacharose
 pH 5,8 (1 M KOH)
 7 g Agar, autoklavieren

2.1.2 Suspensionskultur

Die ebenfalls von K. Langer aus Sprosstücken von *Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx. T89 gewonnene sterile Kalluskultur (Langer, K., 2003) wurde in 250 ml Erlenmeyerkolben in Flüssigmedium vermehrt. Die Kolben wurden abgedunkelt bei 26°C und 133 rpm geschüttelt⁴. Einmal pro Woche wurde unter einer sterilen Werkbank⁵ das alte Nährmedium abgegossen und überschüssige Kultur entnommen, bis der Boden des Kolbens gerade noch bedeckt war. Anschließend wurden große Kalli mit einem Spatel zerdrückt und ca. 50 bis 75 ml neues Medium zugegeben.

Die Suspensionskultur wurde in Suspensionskultur-Medien mit unterschiedlicher Kaliumkonzentration (SuK I – III) angezogen. SuK I enthält 20 mM K⁺ (MS Medium), SuK II 1,05 mM K⁺ (1 mM KNO₃) und SuK III 0,15 mM K⁺ (0,1 mM KNO₃). Für SuK II und III wurde eine bei Hoagland und Arnon (1950) beschriebene Rezeptur wie folgt modifiziert.

SuK I (pro 1 l)

4,4 g MS-Medium
 20 g Sacharose
 5 µM 2,4 D (2,4 Dichlorphenoxyessigsäure)
 pH 5,8 (1 M KOH), autoklavieren

³ MS Medium = Murashige & Skoog, Makro- und Mikroelemente, #M0255, Duchefa

⁴ Schütteler: GFL 3017, Gesellschaft für Labortechnik mbH, 30927 Burgwedel

⁵ NUAIRE, Biological Safety Cabinets Class II, Zapf Instrumente, Sarstedt, Deutschland

SuK II (1mM KNO₃)

1 mM KNO₃
 5 mM Mg(NO₃)₂
 5 mM Ca(NO₃)₂
 2 mM MgSO₄
 1 mM NaH₂PO₄
 50 µM KCl
 40 µM FeNaEDTA
 25 µM H₃BO₃
 5 µM MnSO₄
 2 µM ZnSO₄
 0,5 µM CuSO₄
 5 g/l MES
 20 g/l Saccarose
 5 µM 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D)
 400 µl MS-Vitamine
 pH 5,8 (1 M KOH), autoklavieren

SuK III (0,1 mM KNO₃)

0,1 mM KNO₃
 5 mM Mg(NO₃)₂
 5 mM Ca(NO₃)₂
 2 mM MgSO₄
 1 mM NaH₂PO₄
 50 µM KCl
 40 µM FeNaEDTA
 25 µM H₃BO₃
 5 µM MnSO₄
 2 µM ZnSO₄
 0,5 µM CuSO₄
 5 g/l MES
 20 g/l Saccarose
 5 µM 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D)
 400 µl MS-Vitamine
 pH 5,8 (1 M KOH), autoklavieren

2.1.3 Hydrokultur

Bewurzelte Sprosse aus der Sterilkultur wurden zunächst in 100 ml Glaskolben mit engem Hals überführt und in Flüssigmedium kultiviert. Der aus dem Kolben herausragende Spross wurde bis zur Bildung neuer Blätter durch eine transparente Plastiktüte vor Austrocknung geschützt. Um Algenbildung in der Nährlösung zu verhindern, wurden die Kolben abgedunkelt. Einmal pro Woche wurde das Hydrokultur-Medium ausgetauscht (Langer, K., 2003). Pflanzen ab einer Höhe von 10 cm bis 15 cm wurden in 300 ml Glaskolben überführt und genauso behandelt wie in den 100 ml Kolben. Zur Anzucht höherer Pflanzen wurden die Pflanzen aus 100 ml Kolben entweder einzeln in 3 l Zylindern oder zu je vier Pflanzen in 5 l Nährlösung in Wannen⁶ aus Polyethylen weiterkultiviert. Das Hydrokulturmedium in den Zylindern und Wannen wurde nicht mehr ausgetauscht, sondern die verbrauchte Menge wöchentlich nachgefüllt. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Wurzeln wurde gewährleistet, indem dem Hydrokulturmedium Druckluft über Belüftungssteine⁷ zugeführt wurde. Alle Hydrokulturgefäße waren gegen übermäßiges Verdunsten abgedeckt. Die Wannen wurden mit 2 cm starken Styroporplatten abgedeckt, die auf dem Nährmedium schwammen und sich so dem Pegel des Hydrokultur-Mediums anpassten. Die Styroporplatten waren mit vier Löchern versehen, durch die die Wurzeln in das Medium reichten. Das Hydrokulturmedium setzte sich zusammen aus:

⁶ CURVER-BOX (l= 35 cm / b = 27 cm / h = 22 cm)

⁷ Aquariumausströmer: AQUA FIZZZZ 10“ (25 cm), Art.#A-982, 25488 HAGEN, Deutschland

1,5 mM KH_2PO_4
 2,0 mM KNO_3
 1,0 mM CaCl_2
 1,0 mM MgSO_4
 18 μM FeNaEDTA
 8,1 μM H_3BO_3
 1,5 μM MnCl_2
 pH 6,0

2.1.4 Aeroponische Kultur

Bei einer aeroponischen Kultivierung wurden in Hydrokultur angezogene Pflanzen aus 100 ml Kolben mit den Wurzeln in den Luftraum einer abgedeckten Wanne mit den Maßen 90 x 60 x 80 cm (*l x b x h*) gesteckt. Zur Versorgung der Wurzeln mit Wasser und Nährstoffen wurde die Wanne bis zu einem Viertel mit Hydrokultur-Medium (siehe Kapitel 2.1.3) gefüllt, welches mittels eines Raumluftbefeuchters⁸ in 15-minütigen Zyklen jeweils mit einer Dauer von zehn Minuten zerstäubt wurde (Siefritz, F., 2002).

2.1.5 Freilandkultur

Ein Teil der in Hydrokultur angezogenen Pappeln wurden nach dreimonatiger Kultur in 100 ml Kolben in Erde getopft. In der Vegetationsperiode wurden die ca. einen Meter hohen Pflanzen an einen sonnigen Standort ins Freiland gepflanzt. Anschließendes Wachstum erfolgte freistehend auf lehmigen Boden unter natürlichen Bedingungen.

2.2 Präparation des Pflanzenmaterials für Patch-Clamp-Experimente

Um die Patch-Clamp-Technik an pflanzlichen Zellen anwenden zu können, müssen die betreffenden Zellen zunächst als zellwandfreie Protoplasten aus dem Gewebeverband herausgelöst werden. Wichtig ist die Verwendung frischer Zellen für die Untersuchungen, weshalb die Protoplasten jeweils am Tag des Experimentes isoliert wurden. Dazu wurde das Gewebe entweder für eine mechanische Isolation in Waschlösung (Faserprotoplasten) oder für einen enzymatischen Abbau der Zellwand in Enzymlösung (Zellkultur, Knospen, Wurzeln) inkubiert. Zu diesem Zweck wurde das Gewebe zusammen mit der Lösung in Kunststoff-Petrischalen ($\text{Ø} = 3,5$ cm) gegeben. Damit die Protoplasten weder zu stark schrumpften noch durch zu starkes Schwellen platzten, musste die zur Inkubation verwendete

⁸ Defensor 550, Aixair, Schweiz

Lösung ungefähr auf den osmotischen Druck der Zellen eingestellt werden. Als Orientierungshilfe wurde die ungefähre Osmolalität der verschiedenen Gewebe mit einem Dampfdruck Mikro-Osmometer⁹ ermittelt. Zur Bestimmung der Osmolalität von Faserprotoplasten wurde ein Messplättchen aus Filterpapier an freigelegtem Xylem gerieben, bis es vollständig mit dem Gewebesaft getränkt war. Zur Bestimmung der Osmolalität von Suspensionskultur, Knospen oder Wurzeln wurde das Gewebe auf ein Messplättchen gelegt und der Gewebesaft durch Drücken mit der Deckelseite eines 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßes ausgepresst. Anschließend wurde das Messplättchen mit der Seite, die Gewebekontakt hatte, nach unten in die Messkammer gelegt und die Messung durchgeführt. Bei der mechanischen Isolierung war es wichtig, den Protoplasten beim Zerreißen der Zellwand vor Verletzung zu schützen. Zu diesem Zweck wurde das Gewebe in hypertonischer Lösung inkubiert. Aufgrund des im Vergleich zum Cytoplasma höheren osmotischen Potentials $\psi_{\pi a}$ der Lösung, wurde eine Wasserabgabe und somit ein Schrumpfen des Protoplasten ausgelöst. Die geschrumpften Protoplasten erwiesen sich gegenüber mechanischen Einflüssen unempfindlicher. Anschließendes Waschen mit zumindest leicht hypotonischer Lösung, deren osmotisches Potential $\psi_{\pi a}$ geringer als das des Cytoplasmas ($\psi_{\pi i}$) war, führte zum erneuten Schwellen und Austreten der Protoplasten aus dem verletzten Zellwandgerüst. Die Inkubation in Enzymlösung erfolgte in einem Wasserbadschüttler¹⁰ bei 30°C sowie bei einer für den jeweiligen Gewebetyp spezifischen Schüttelgeschwindigkeit und Inkubationsdauer (siehe Kapitel 2.2.2 -2.2.4; Kapitel 2.2.5, *Tab. 2.1.*).

Nach erfolgter Inkubation wurden die verschiedenen Protoplasten-Suspensionen zum Entfernen störender Gewebereste über ein mit Waschlösung¹¹ befeuchtetes Nylonnetz (50 μm Maschenweite) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff gefiltert. Weitere 10 – 15 ml Waschlösung wurden zum Auswaschen von noch am Gewebe haftenden Protoplasten in das Zentrifugenröhrchen gefiltert. Anschließend wurden die Protoplasten-Suspensionen mit einer Zentrifuge¹² bei 4°C, einer Anfangsbeschleunigung von 3 Umdrehungen pro Minute, einer für den jeweiligen Protoplastentyp spezifischen Rotationsgeschwindigkeit und einer ebenso für den Protoplastentyp spezifischen Zeitdauer, ohne abschließendes Bremsen zentrifugiert, und der Überstand abgegossen. Die Zentrifugiergeschwindigkeit in Umdrehungen pro Minute (rpm) wurde über den Rotorradius (r) der Zentrifuge in das Vielfache der Erdbeschleunigung

⁹ VAPROTM, Modell 5520, Dr. B. G. Schlag GmbH, 51465 Bergisch Gladbach, Deutschland

¹⁰ OLS 2000, Grant Instruments, Cambridge, Ltd, ENGLAND

¹¹ 1 mM CaCl_2 und D-Sorbit zum Einstellen der benötigten Osmolalität (π)

¹² Beckmann GS-15R Centrifuge, Beckmann Instruments, Inc., Palo Alto, Ca, USA

g umgerechnet (Gleichung [1]).

$$g = 1,12 * r \text{ (rpm/1000)}^2 \quad [1]$$
$$r = 150 \text{ mm}$$

Alle gewebespezifischen Isolationsfaktoren sind in den Isolationsprotokollen (siehe Kapitel 2.2.2 -2.2.4; Kapitel 2.2.5, *Tab. 2.1.*) angegeben.

Das Pellet, das beim Zentrifugieren von enzymatisch isolierten Protoplasten entstand, wurde in 15 ml Waschlösung suspendiert, ein weiteres Mal zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Alle gereinigten Protoplasten wurden anschließend in 500 μ l Waschlösung auf Eis gelagert. Das äußerst sorgfältige und gründliche Reinigen der Plasmamembran ist notwendig, um den Aufbau des für Patch-Clamp-Messungen essentiellen, hohen Abdichtwiderstandes (siehe Kapitel 2.3.1) zwischen Pipette und Membran zu ermöglichen (Hamill et al., 1981). Für die Patch-Clamp-Experimente wurden deshalb unter dem Lichtmikroskop¹³ saubere, rund und vital aussehende Protoplasten ausgewählt.

2.2.1 Mechanische Isolation von Faserprotoplasten

Zur Isolation von Faserprotoplasten wurden von einer dreijährigen, im Freiland wachsenden Pappel während der Vegetationsperiode (im Zeitraum vom 29.04.02 bis 08.08.02) diesjährige Zweige geerntet. Nach Entfernen der Nodien wurde die Rinde der 1-2 cm langen Zweigstücke mit einem Skalpell mehrfach längs eingeschnitten und alternierend abgezogen, so dass sich Partien mit und ohne Rinde abwechselten (*Abb. 2.1.*).

¹³ Axiovert 25, Zeiss, Deutschland



Abb. 2.1. Präparation eines Internodiums von *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx. zur Isolation von Faserprotoplasten.

Die Rinde der Zweigstücke wurde mit einem Skalpell mehrfach längs eingeschnitten und alternierend abgezogen. Partien mit und ohne Rinde wechselten sich ab. *Links:* Aufsicht auf ein präpariertes Internodium von der Seite. *Rechts:* Aufsicht auf die Querschnittfläche des präparierten Internodiums.

Anschließend wurden die Zweigstücke zunächst für 5 min in 2-fach destilliertes Wasser gegeben, um die bei der Präparation verletzten Zellen abzutöten. Dann wurden die Zweigstücke für 30 min in hypertonische Waschlösung (1 M Sorbitol, 1 mM CaCl₂) und abschließend in hypotonische Waschlösung (280 mosm/kg Sorbitol, 1 mM CaCl₂, bzw. 480 mosm/kg Sorbitol, 1 mM CaCl₂) überführt. Um die Osmolalitäten der verschiedenen Lösungen nicht zu sehr zu verändern, wurden die Zweigstücke vor dem Eintauchen in die jeweils nächste Lösung auf saugfähigem Papier abgetupft. Beim Eintauchen der Zweigstücke in die hypotonische Lösung wurden die verbliebenen Rindenstreifen mit einer Pinzette abgezogen. Nach ca. 5 min wurde die Protoplastensuspension gefiltert und bei einer Beschleunigung von 107 x g für 11 min zentrifugiert (siehe Kapitel 2.2)

2.2.2 Enzymatische Isolation von Suspensionskulturprotoplasten

Aus der mit verschiedenen Medien versorgten Suspensionskultur (siehe Kapitel 2.1.2) wurden zwei bis fünf Tage nach Wechsel des Zellkulturmediums enzymatisch Protoplasten isoliert. Dazu wurde mit einer Rasierklinge junges und weißes Gewebe am Rand der Kalli abgetrennt. Das Gewebe wurde leicht gequetscht und in 2 ml Enzymlösung im Wasserbadschüttler bei 90 rpm für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die gewonnene Suspension aus

Protoplasten 2-mal mit Waschlösung der jeweiligen Osmolalität gewaschen und bei $60 \times g$ für 10 min zentrifugiert.

Für die Isolation von Protoplasten aus SuK Medium I (MS Medium = 20 mM K^+) wurde Enzymlösung E1 (siehe Kapitel 2.2.5) mit einer Osmolalität von $\pi = 550$ mosm/kg und Waschlösung mit einer Osmolalität von $\pi = 480$ mosm/kg verwendet. Zur Isolation von Protoplasten aus SuK II (1,05 mM K^+) und SuK III (0,15 mM K^+) wurde Enzymlösung E2 (siehe Kapitel 2.2.5) mit einer Osmolalität von $\pi = 280$ mosm/kg und Waschlösung mit einer Osmolalität von $\pi = 280$ mosm/kg verwendet.

2.2.3 Enzymatische Isolation von Knospenprotoplasten

Während des Übergangs der Knospen vom geschlossenen in den offenen Zustand wurden Protoplasten aus Knospen isoliert, die bei der Ernte den drei Knospenstadien (Stadium 1 = fest geschlossene Knospen; Stadium 2 = Knospen schwellen; Stadium 3 = Knospen treiben aus, die Knospenschuppen fallen fast von alleine ab; Langer et al., 2004) zugeordnet worden waren. Dazu wurden pro Präparation im Zeitraum von 10.03.04 (Stadium 1) bis 23.04.04 (Stadium 3) drei Lateralknospen (Seitenknospen) von 1-jährigen Zweigen einer 3-jährigen Pappel geerntet. Die Knospen wurden mit den Fingerspitzen vom Zweig gebrochen. Mit einer Pinzette wurden die Knospenschuppen und alle Nebenblätter mit bräunlicher Spitzenfärbung entfernt. Die Blattanlagen einschließlich des Vegetationskegels wurden mit einer Rasierklinge quer in dünne Streifen bzw. in Scheiben geschnitten. Diese wurden vom 10.03.04 bis 14.04.04 bei Raumtemperatur für 3 Stunden ohne Schütteln in Waschlösung mit einer Osmolalität von $\pi = 805$ mosm/kg inkubiert. Anschließend wurde das Material im Wasserbadschüttler bei 70 rpm für 1,5 Stunden in 2 ml der Enzymlösung E3 (siehe Kapitel 2.2.5) inkubiert. E3 hatte eine Osmolalität von $\pi = 795$ mosm/kg und wurde ursprünglich zur Isolation von Maisnebenzellen eingesetzt (Majore et al., 2002). Die Protoplasten wurden 2-mal mit Waschlösung der Osmolalität $\pi = 805$ mosm/kg gewaschen und jeweils bei $107 \times g$ für 12 min zentrifugiert. Ab 14.04.04 waren die Knospen geschwollen, die Knospenschuppen konnten sehr leicht entfernt werden (Stadium 2) und isolierte Protoplasten ließen sich nur noch sehr schwierig für die Patch-Clamp-Messungen verwenden. Deshalb wurde die Protoplastenisolation wie nachfolgend beschrieben leicht abgewandelt. Die in Streifen geschnittenen Knospen wurden direkt in Enzymlösung (E3) (siehe Kapitel 2.2.5) mit niedrigerer Osmolalität ($\pi = 548$ mosm/kg) ohne vorangegangenes Einweichen in Waschlösung inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit Waschlösung ebenfalls niedrigerer Osmolalität ($\pi = 526$ mosm/kg; siehe Kapitel 2.2.5).

2.2.4 Enzymatische Isolation von Wurzelprotoplasten

Zur Isolation der Wurzelprotoplasten wurden 1–2 cm lange neu gebildete Wurzeln aus aeroponischer Kultur (siehe Kapitel 2.1.4) geerntet und im Wasserbadschüttler 1 Stunde lang bei 90 rpm in 2,5 ml Enzymlösung E2 (siehe Kapitel 2.2.5) der Osmolalität $\pi = 288$ mosm/kg inkubiert. Die Protoplasten wurden einmal mit Waschlösung der Osmolalität $\pi = 161$ mosm/kg gewaschen und bei $42 \times g$ für 10 min zentrifugiert.

2.2.5 Enzymlösungen

Die Enzymlösungen wurden nach Einstellen der benötigten Osmolalität mit Hilfe eines Dampfdruck-Mikro-Osmometers¹⁴ außerdem für 10 min bei maximaler Beschleunigung ($3250 \times g$) zentrifugiert. Hiermit wurden in den verwendeten Enzymen als Verunreinigung enthaltene Stärkekörner entfernt um die isolierten Protoplasten beim Waschen und anschließenden Abzentrifugieren nicht zu beschädigen. Die Lösungen wurden zu 2 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. Nachfolgend ist die Zusammensetzung der verwendeten Enzymlösungen aufgelistet.

Enzymlösung: (E1)

2 % (w/v)	Cellulase (Onozuka R10)
1 % (w/v)	Macerozym (Onozuka R10)
0,5 % (w/v)	BSA (Serva)
10 mM	Na-Ascorbat, (Ascorbic acid - Sodium salt)
1 mM	CaCl ₂ HCl pH 5,5
π (mosm/kg)	D-Sorbit

Enzymlösung: (E2)

0,8 % (w/v)	Cellulase (Onozuka R10)
0,1 % (w/v)	Pektolyase (Sigma)
0,5 % (w/v)	BSA (Serva), (Albumin bovine)
0,5 % (w/v)	PVP (Sigma), (Polyvinylpyrrolidone)
1 mM	CaCl ₂
8 mM	MES/KOH pH 5,5
π (mosm/kg)	D-Sorbit

Enzymlösung: (E3)

0,6 % (w/v)	Cellulase Onozuka RS
0,064 % (w/v)	Pektolyase Y-23 (Sigma,)
0,4 % (w/v)	Mazerozym R 10 (SERVA)
0,8 % (w/v)	BSA
0,4 % (w/v)	PVP-40
0,8 mM	CaCl ₂ pH 6,5 mit HCl oder KOH
π (mosm/kg)	Manitol

¹⁴ VAPRO™, Modell 5520, Dr. B. G. Schlag GmbH, 51465 Bergisch Gladbach, Deutschland

Waschlösung:

1 mM CaCl₂
 π (mosm/kg) D-Sorbit

Da die Osmolalität π (mosm/kg) der Enzymlösungen mit dem Protoplastentyp variierte, ist die jeweils eingestellte Osmolalität den jeweiligen Isolationsprotokollen (siehe Kapitel 2.2.2 bis 2.2.4) oder *Tabelle 2.1.* zu entnehmen.

Typ	Inkubation:				Waschen:	Zentrifugieren:	
	Lösung	mosm/kg	Dauer	rpm	mosm/kg	g-Zahl	Dauer
F I	Waschlösung	1000	0,5 h	-	280	107	11 min
F II	Waschlösung	1000	0,5 h	-	480	107	11 min
SuK I	2 ml E1	550	1 h	90	480	60	10 min
SuK II	2 ml E2	280	1 h	90	280	60	10 min
SuK III	2 ml E2	280	1 h	90	280	60	10 min
K I	2 ml E3	795	1,5 h	70	805	107	12 min
K II	2 ml E3	548	1,5 h	70	526	107	12 min
W	2,5 ml E2	288	1 h	90	161	42	10 min

Tab. 2.1. Auflistung der Protoplastenspezifischen Isolationsbedingungen.

Die für die Isolation verwendeten Protoplastentypen sind der Spalte „Typ“ zu entnehmen. F I = Faserprotoplasten: zur Untersuchung in Lösungen niedriger Osmolalität; F II = Faserprotoplasten: zur Untersuchung in Lösungen höherer Osmolalität; SuK = Suspensionskulturprotoplasten aus Kultur mit Medium I, II, III, (siehe Kapitel 2.1.2); K = Knospenprotoplasten: K I aus Isolation vor dem 14.04.04, K II aus Isolation nach den 14.04.04; W = Wurzelprotoplasten. Die Spalte „Inkubation“ zeigt die jeweils für die Protoplastenisolation verwendeten Inkubationslösungen, deren Osmolalität π (mosm/kg), die Inkubationsdauer in Stunden (h) sowie die Schüttelgeschwindigkeit (rpm) des Wasserbadschüttlers. Die Spalte „Waschen“ zeigt die Osmolalität π (mosm/kg) der verwendeten Waschlösung. Die Spalte „Zentrifugieren“ zeigt die jeweils beim Zentrifugieren eingestellte g-Zahl und Dauer (min).

2.3 Patch-Clamp-Technik

Mit der Patch-Clamp-Technik ist es möglich, den Transport von Ionen durch biologische Membranen als elektrischen Strom zu messen. Biologische Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, die für Ionen und polare Moleküle kaum durchlässig ist. Ionen werden unter anderem durch Ionenkanäle, die in die Membran eingelagert sind, passiv von einer

Seite der Membran zur anderen Seite der Membran transportiert. Mit der Patch-Clamp-Technik konnte erstmals bei geklemmter Membranspannung (*clamp*) der Ionentransport durch ein Kanalprotein, das sich innerhalb eines von einer Mikropipette umschlossenen Membranflecks (*patch*) befand, direkt als Einzelkanalstrom gemessen werden (Hamill et al., 1981). Außerdem können mit dieser Methode in der ‚Ganzzelleableitung‘ (*whole-cell*) alle in der Zellmembran geöffneten Ionenkanäle über die Messung eines Summenstroms elektrisch erfasst und untersucht werden. Der Messplatzaufbau und die Patch-Clamp-Ableitungen wurden größtenteils nach den Anleitungen von Hamill et al. (1981) und Penner (1995) durchgeführt und werden im Folgenden nur kurz beschrieben.

2.3.1 Messprinzip der Patch-Clamp Apparatur

Frisch isolierte und mit Waschlösung gereinigte Protoplasten werden in eine Messkammer mit Badlösung gegeben, so dass sie sedimentieren können. Eine Glasmikroelektrode (Patch-Pipette) wird zur Hälfte mit einem Elektrolyt (interne Lösung) gefüllt. Um das Anlagern von Partikeln und somit das Verstopfen der Pipettenspitze zu verhindern, wird ein leichter Überdruck auf die Pipettenlösung appliziert. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wird die Pipette unter optischer Kontrolle durch ein inverses Lichtmikroskop¹⁵ an einen runden und vital aussehenden Protoplasten herangefahren. Nachdem der Überdruck weggenommen wird, wird die Mikropipette auf die Membran (Plasmalemma) des Protoplasten aufgesetzt. Gleichzeitig wird über die Mikropipette ein leichter Unterdruck angelegt, worüber die Membran an die Pipette gesaugt wird. Das Plasmalemma lagert sich dabei im Öffnungsbereich auf der Innenseite der Pipette an. Es bildet sich ein kontinuierlich bis in den G Ω -Bereich steigender („seal-Vorgang“) hoher Abdichtwiderstand aus, der als „*Gigaseal*“ bezeichnet wird. Dieser „*Gigaseal*“ isoliert die Pipettenlösung elektrisch von der Badlösung und verringert dadurch das Hintergrundrauschen stark. Ausgehend von der beim Abdichtvorgang entstandenen *Cell-attached*-Konfiguration sind weitere Patch-Clamp-Konfigurationen möglich. Diese sind nachfolgend in Kapitel 2.3.2 erläutert und in *Abb. 2.2.* graphisch dargestellt.

¹⁵ Axiovert 25, Zeiss, Deutschland

2.3.2 Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik

- Die Cell-attached-Konfiguration (on-cell-Konfiguration = Patch),

liegt nach Erreichen des hohen Abdichtwiderstandes im $G\Omega$ -Bereich vor. Die Membran des Protoplasten bleibt in dieser Konfiguration intakt, so dass sich das Cytoplasma nicht mit der Pipettenlösung mischt und alle zellulären Prozesse erhalten bleiben. In dieser Konfiguration ist die Messung von Einzelkanälen möglich. Da die Membran intakt bleibt, kann in dieser Versuchsanordnung das Cytoplasma nicht kontrolliert sondern lediglich der Einfluss extrazellulärer Bedingungen modelliert und untersucht werden.

- Die Inside-out-Konfiguration,

hier wird ausgehend von der *Cell-attached*-Konfiguration die Pipette von der Protoplastenmembran abgezogen. Dabei löst sich ein kleiner Membranteil aus der Zelle, wobei der hohe Abdichtwiderstand erhalten bleibt. Die Innenseite der Membran ist jetzt der Badlösung exponiert. Bei geklemmter Membranspannung sind Einzelkanalstrommessungen ohne zellulären Einfluss möglich. Die Bedingungen der internen Membranseite werden dabei von der Badlösung und diejenigen der externen Membranseite von der Pipettenlösung simuliert und kontrolliert.

- Die Whole-cell-Konfiguration (Ganzzelleableitung),

wird nach Erreichen der *Cell-attached*-Konfiguration durch einen kurzen kräftigen Unterdruck erreicht, der die Membran unter der Pipette ohne den Verlust des Gigaseals zerstört. Der Unterdruck kann durch einen kurzen elektrischen Puls, dem sogenannten „ZAP“ (-600 mV für 100 μ s), unterstützt werden. Die Pipettenlösung mischt sich hierbei mit dem Cytoplasma und kontrolliert die internen Bedingungen. Die externen Bedingungen werden von der Badlösung vorgegeben. In dieser Konfiguration wird bei geklemmter Membranspannung der Stromfluss durch die Gesamtheit aller in der Membran vorkommenden Ionenkanäle als Summenstrom erfasst.

- Die Outside-out-Konfiguration,

wird durch Abziehen der Pipette von einem Protoplasten in der *Whole-cell*-Konfiguration erreicht. An der Pipette bleibt ein kleiner Membranfleck haften. Die Orientierung der Membran bleibt dabei erhalten, so dass die interne Kontrolle von der Pipettenlösung und die externe Kontrolle von der Badlösung übernommen werden.

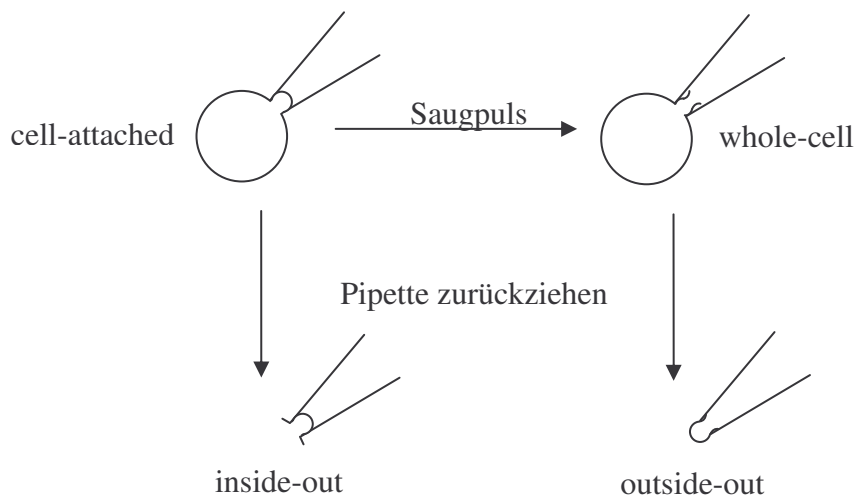


Abb. 2.2. Die vier gebräuchlichsten Patch-Clamp-Konfigurationen (in Anlehnung an Hamill et al. 1981).

2.3.3 Ersatzschaltbild des Patch-Clamp-Verstärkers

Der ‚gepatchte‘ Protoplast ist über die Glasmikroelektrode mit dem Vorverstärker der Patch-Clamp-Apparatur elektrisch verbunden. Eine in die Badlösung reichende Referenzelektrode (Erde) schließt über den Erdungsanschluss am Vorverstärker, der direkt mit der Kontrolleinheit verbunden ist, den elektrischen Kreislauf. Der Vorverstärker arbeitet nach dem Prinzip eines Strom-Spannungswandlers. Strom, der durch das elektrisch isolierte Membranareal fließt, wird im Spannungsklemmenmodus gemessen (Abb. 2.3.).

Die Kontrolleinheit der *Patch-Clamp*-Apparatur generiert eine Kommandospannung U_{cmd} , die an den Vorverstärker geleitet wird (Abb. 2.3.). Die Kommandospannung liegt dort am Operationsverstärker A1 an, der einen so hohen Eingangswiderstand besitzt, dass die anliegende Spannung gemessen werden kann, ohne dass Strom fließt. Der Operationsverstärker A1 ist eine spannungskontrollierte Spannungsquelle. Er bestimmt die Spannungsdifferenz zwischen Messelektrode und Kommandospannung durch Abzug der Elektrodenpotentialspannung. Die von A1 ausgegebene Spannung liegt an einem großen Messwiderstand (R_f) an (Abb. 2.3.), über den solange ein Rückkopplungsstrom (I_f) fließt, bis der Spannungsunterschied ausgeglichen ist. Für die in der Ganzzelleableitung durchgeführten Messungen wurde ein Messwiderstand von 500 M Ω verwendet, mit dem Strommessungen bis 25 nA möglich sind. Am Differenzverstärker A2 wird schließlich durch Subtraktion der Kommandospannung (U_{cmd}) vom Ausgang A1 der Spannungsabfall über den Messwiderstand bestimmt, der durch einen Stromfluss durch die Ionenkanäle in der Membran verursacht wird.

Die von A2 ermittelte Ausgangsspannung (U_{out}) ist proportional zur Spannung über dem Messwiderstand und damit proportional zum Rückkopplungsstrom (I_f).

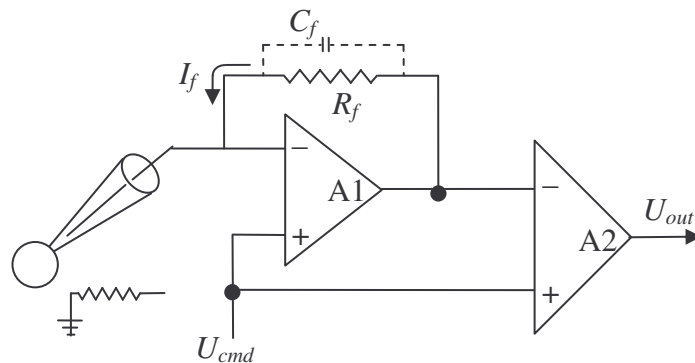


Abb. 2.3. Schaltkreis eines Patch-Clamp-Vorverstärkers (nach Sigworth, 1995)

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaft der Lipiddoppelschicht wirkt die Membran des Protoplasten wie ein elektrischer Isolator. Sie trennt das elektrisch leitende Cytoplasma von der ebenfalls elektrisch leitenden Lösung des Apoplasten. In einem elektrischen Ersatzschaltbild kann sie deshalb als Plattenkondensator dargestellt werden (Abb. 2.4.). In die Membran eingelagerte Ionenkanäle unterbrechen in Abhängigkeit vom Öffnungsgrad die Isolierung des Plattenkondensators und werden deshalb als parallel geschalteter Membranwiderstand (R_m) dargestellt (Abb. 2.4.). Der Membranwiderstand (R_m) ergibt sich dabei aus der Summe der ebenfalls parallel geschalteten Einzelwiderstände der Ionenkanäle (R_{ml}). Wird für den Membrankondensator (C_m) eine für Membranen spezifische Kapazität (C_s) von etwa $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ angenommen beträgt die Membranstärke ca. 5 nm (Hille, B., 2001).

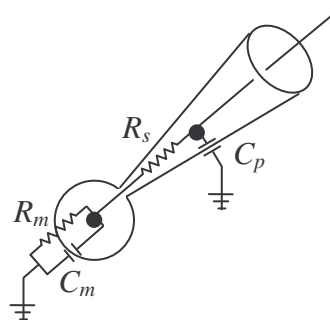


Abb. 2.4. Ersatzschaltbild der Plasmamembran in der Ganzzelleableitung

2.3.4 Korrektur von Spannungsfehlern und Kapazitäten

Neben der Membran besitzen in dem beschriebenen Messkreislauf außerdem der Messwiderstand, die Elektroden und die Pipette kapazitive Eigenschaften. Wird in der Spannungsklemme die Kommandospannung geändert, kommt es zu einem Umladen der genannten Kondensatoren und somit zu schnell ansteigenden und mit der Zeitkonstante $\tau = R \cdot C$ exponentiell abfallenden kapazitiven Strömen. Um eine kurzzeitige Sättigung des Messwiderstandes zu verhindern, und um somit die Messkurven zu glätten, wurden die kapazitiven Ströme durch kapazitive Rückkopplung in einem Rückkopplungsverstärker der Messapparatur ausgeglichen. Dabei wurden die schnellen kapazitiven Transienten der Pipettenkapazität (C_p siehe *Abb. 2.4.*) und die langsamen kapazitiven Transienten der Membrankapazität (C_m) in der Ganzzelleableitung mit unabhängigen Korrekturkreisläufen elektronisch kompensiert.

Die langsame Zeitkonstante (τ_m) in der Ganzzelleableitung wird zum einen von der Membrankapazität (C_m) und zum anderen vom Zugriffswiderstand (R_s) an der Pipettenöffnung bedingt. Da trotz elektronischer Kompensation kapazitive Transienten die gemessenen Ionenkanalströme (I) überlagern, wurden die ersten Millisekunden nach einem Spannungswechsel nicht zur Datenauswertung herangezogen.

Der Zugriffswiderstand (R_s) liegt in Serie vor dem Membranwiderstand (R_m siehe *Abb.2.4.*). Ein Teil der an der Messelektrode angelegten Spannung zur Polarisierung der Membran fällt daher über dem Zugriffswiderstand ab. Je kleiner der Zugriffswiderstand ist, desto genauer stimmt die Membranspannung (U_m) mit der Kommandospannung (U_{cmd}) überein. Die Membranspannung wurde deshalb bei der Datenauswertung nach Gleichung [2] korrigiert.

$$U_m = U_{cmd} - R_s * I \quad [2]$$

2.3.5 Herstellung der Patch-Glasmikroelektroden

Als Mess- und Referenzelektrode wurde ein mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht¹⁶ verwendet. Die Beschichtung erfolgte nach Bedarf durch Elektrolyse in 0,1 M HCl oder 3 M KCl. Dabei werden an der Anode (Silberdraht) Chlorid-Ionen aus der Lösung angelagert (*Abb. 2.5.*). An der Kathode gast durch Verbindung freier Elektronen mit Protonen (H^+) Wasserstoff aus.

¹⁶ Bezugsquelle WPI, Berlin, Deutschland

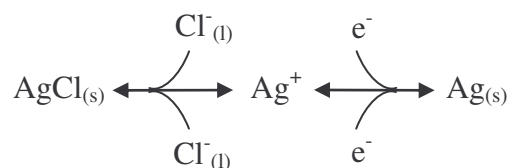


Abb. 2.5. Reversible Vorgänge an Mess- und Referenzelektrode

Bei elektrolytischer Beschichtung gibt Silberdraht ($\text{Ag}_{(s)}$) aus seiner äußeren Schicht Elektronen (e^-) ab und wird positiv geladen (Ag^+). Aufgrund der positiven Ladung des Silberdrahtes, lagern sich negativ geladene Chlorid-Ionen (Cl^-) aus der Lösung am Silberdraht an und bilden zusammen mit dem geladenen Silber eine Silber-Chlorid Schicht ($\text{AgCl}_{(s)}$).

Während des Messvorgangs kommt es in Abhängigkeit der Stromflussrichtung zu Aufbau und Abbau der Silberchloridschicht an Mess- und Referenzelektrode

Diese Reaktion ist reversibel und findet auch während des Messvorganges statt. In Abhängigkeit von der Flussrichtung des Stroms kommt es an den Elektroden entweder zur Abgabe von Cl^- -Ionen in die Lösung oder zur weiteren Anlagerung von Cl^- -Ionen und Bildung von Silberchlorid. Stabile Messungen mit Ag/AgCl -Elektroden sind nur möglich, solange beide Elektroden mit der Silberchloridschicht umgeben sind. Diese bleibt länger erhalten, sofern die Elektroden in Lösungen mit Cl^- -Ionen eintauchen und die oben beschriebenen Reaktionen ablaufen können. Die Elektrolytlösung der Pipette enthält deshalb mindestens 4 mM Cl^- -Ionen. Für die Referenzelektrode wurden die Cl^- -Ionen zur Verringerung der Diffusionspotentialdifferenz (siehe Kapitel 2.3.6) bei einem Lösungstausch nicht in der Badlösung mit angeboten. Deshalb wurde die Referenzelektrode mit einem zur Hälfte als Elektrolyt mit 3 M KCl - Lösung gefülltem Polyvinylschlauch überzogen. Dieser war gegen ein Vermischen des Elektrolyts mit der Badlösung mit einem Agarpfropfen (2 % Agar, 3 M KCl) verschlossen.

Die Mikropipetten wurden aus Borosilikat-Hartglaskapillaren¹⁷ ohne Filament am Tag der Messung hergestellt. Die Kapillaren waren auf 80 mm gekürzt, und zur besseren Ausbildung des hohen Abdichtwiderstandes von innen mit einer dünnen Silikonschicht¹⁸ benetzt worden, die bei 60°C mindestens sechs Stunden getrocknet wurde. Mit einem vertikalen zweistufigen Ziehgerät¹⁹ (Patch Pipette Puller) wurden die Kapillaren im ersten Schritt mittig verjüngt, um einen ausreichend kleinen Pipettendurchmesser zu erhalten. Im zweiten Schritt wurde durch

¹⁷ 1,5-1,8*100 mm, Kimax-51, Kimble products, Vineland, NJ, USA

¹⁸ Sigmacote® SL – 2 Chlorinated organosiloxane in heptane, Sigma

¹⁹ L/M -3P-A Patch Pipette Puller: List electronic, Darmstadt, Deutschland

weiteres Verjüngen in der Mitte eine Sollbruchstelle erzeugt. An dieser bricht die Glaskapillare in zwei Mikropipetten auseinander. Die Mikropipetten wurden in einem weiteren Schritt im Bereich der Spitze mit einem Tropfen Silikon²⁰ beschichtet, das mit einem heißen Luftstrom aus der Microforge-Apperatur²¹ gehärtet wurde. Diese hydrophobe Beschichtung reduziert im Kontaktbereich mit der Badlösung kapazitive Beladungs- und Entladungsvorgänge an der Glaspipette und verringert somit das Hintergrundrauschen während der Messung. Anschließend wurden die scharfen Bruchkanten der Pipettenöffnung mit der Microforge-Apparatur hitzepoliert, damit der Protoplast beim Abdichtvorgang nicht beschädigt wird. Zum Befüllen der Pipette mit Elektrolytlösung wurde die Pipettenspitze zunächst in die Lösung getaucht. Mit einer 50 ml Spritze wurde ein interner Unterdruck erzeugt, durch den die Lösung in die Pipettenspitze gesaugt wurde. Anschließend wurde die Pipette von hinten mit einer Spritze ohne Blasenbildung zur Hälfte gefüllt. Da der für die Messungen erforderliche, hohe Abdichtwiderstand nur erreicht werden kann, wenn das Pipettenglas sehr sauber ist, wurden nur steril filtrierte Pipettenlösungen verwendet (Porenweite der Filter: 0,2 µm). Darüber hinaus wurde für jeden Protoplasten eine neue Pipette verwendet.

2.3.6 Korrektur von Potentialdifferenzen

Werden, wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, an den beiden Elektroden Elektrolytlösungen unterschiedlicher Ionenkonzentration verwendet, kommt es durch Ausbildung verschiedener Potentiale zwischen den Elektroden und den sie umgebenden Lösungen zu einer Potentialdifferenz zwischen den Elektroden (Elektrodenpotential U_{El}). Des Weiteren treten Diffusionspotentialdifferenzen an den Grenzflächen zwischen verschiedenen Lösungen (*Liquid Junction Potentials* U_{LJP}) wie zwischen der Pipettenlösung und der Badlösung auf. Die verschiedenen Potentialdifferenzen (U_{El} , U_{LJP}) die auch insgesamt als Offset-Potential (U_{off}) bezeichnet werden, wurden nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung und nach Ablassen des angelegten Überdruckes (siehe Kapitel 2.3.1) elektronisch kompensiert. Der Abgleich von U_{off} erfolgte vor jedem Experiment bei einer Kommandospannung von 0 mV solange bis kein Strom mehr floss:

²⁰ Sylgard® 184 silicone elastomer kit, Dow Corning, USA

²¹ Pipette Forge L/M-CPZ 101, List Medical, Darmstadt, Deutschland

$$U_{LJP} + U_{El} = U_V + U_{off} + U_{cmd} \quad [3]$$

U_V steht dabei für das Offsetpotential des Verstärkers und U_{cmd} für die Kommandospannung. Wird die Pipette auf die Membran aufgesetzt, entfällt jedoch die Grenzflächenpotentialdifferenz (U_{LJP}) zwischen der Pipettenlösung und der Badlösung. Um nun die tatsächliche im Spannungsklemmenmodus angelegte Membranspannung U_m zu erhalten, muss daher die Kommandospannung U_{cmd} um die fehlende Grenzflächenpotentialdifferenz (U_{LJP}) bei der Datenauswertung nachträglich korrigiert werden.

$$U_m = U_{cmd} - U_{LJP} \quad [4]$$

Hierzu wurde U_{LJP} nach Neher (1992) experimentell bestimmt.

Kontinuierlich an der Pipettenöffnung und an der Referenzelektrodenöffnung in die Badlösung diffundierendes Elektrolyt verändert sukzessiv die Grenzflächenpotentialdifferenzen. Um diese jedoch konstant zu halten, wurde die Badlösung fortlaufend durch zwei an die Messkammer angeschlossene Peristaltik-Pumpen²² gegen frische Badlösung ausgetauscht.

2.3.7 Vorzeichenkonvention

Biologische Membranen besitzen aufgrund unterschiedlicher Ladungsverteilung zwischen der dem Cytoplasma zugewandten und der dem Cytoplasma abgewandten Membranseite ein Membranpotential. Das Membranpotential des Plasmalemmas wird relativ zur extrazellulären Seite angegeben und ergibt die Membranspannung U . Zur Ermittlung der Membranspannung wird das Potential der dem Cytoplasma abgewandten Membranseite von dem im Cytoplasma herrschenden Potential abgezogen (Hille, B., 2001).

Der Ionenstrom durch die Membran erfolgt in Abhängigkeit von der Membranspannung. Ein negativer Stromfluss entspricht einem Einstrom von Kationen in das Zellinnere oder einem Ausstrom von Anionen aus dem Cytoplasma in den extrazellulären Raum. Umgekehrt stellt ein positiver Strom ein Kationenausstrom bzw. ein Anioneneinstrom dar.

²² Pharmacia LKB-Pump P1 Pharmacia

2.3.8 Datenerfassung

An den verschiedenen von *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx. isolierten Protoplastentypen (siehe Kapitel 2.2-2.2.4) wurden Patch-Clamp-Experimente in der Ganzzelleableitung (*whole-cell*-Konfiguration) (siehe Kapitel 2.3.2) mit der nachfolgend beschriebenen Messapparatur und den beschriebenen Pulsprotokollen durchgeführt.

Messapparatur

Die Ionenströme wurden mit einem Patch-Clamp-Verstärker²³ in Abhängigkeit vom Membranpotential aufgezeichnet. Das am Vorverstärker gemessene analoge Signal wurde von einem im Verstärker integrierten Filter mit 10 kHz vorgefiltert und anschließend über einen externen low-pass 8-Pol-Bessel Filter bei 2 kHz weiter gefiltert. Um das gefilterte Signal auf einem Messrechner²⁴ speichern zu können, wurde es dann über einen 16-bit-AD/DA-Wandler²⁵ in ein digitales Signal umgewandelt. Die Sample-Rate betrug in der Regel das 2,5-fache der Filterfrequenz. Mit Hilfe der Software „Pulse“²⁶ wurde die an der Patch-Elektrode anliegende Spannung kontrolliert und gezielt Spannungsänderungen nach standardisierten Pulsprotokollen (siehe Spannungspulsprotokolle) durchgeführt. Die Strom- und Spannungssignale konnten dabei während der Messung auf einem Software-Oszilloskop des Messrechners kontrolliert werden.

Spannungspulsprotokolle

Die Ausbildung des hochohmigen Abdichtwiderstandes wurde mit einem rechteckigen Spannungspuls (± 20 mV; 20 ms) relativ zur Kommandospannung verfolgt. Mit zunehmendem Abdichtwiderstand verringerte sich die Pulsstromamplitude entsprechend, bis sie nur noch wenige pA betrug. Dadurch wurden die schnellen kapazitiven Transienten, die durch das Meßsystem verursacht wurden, immer deutlicher ausgebildet. Der anschließende Übergang in die Ganzzellkonfiguration konnte durch das plötzliche Auftreten von langsam abklingenden kapazitiven Transienten verfolgt werden. Alle kapazitiven Transienten wurden vor Beginn der Messung elektronisch kompensiert (siehe Kapitel 2.3.4). Anschließend wurde eine Haltespannung (U_H) an die Membran angelegt, bei der fast alle Ionenkanäle geschlossen

²³ EPC-7, HEKA, Lambrecht, Deutschland

²⁴ Apple, Power Macintosh

²⁵ ITC-16, Instrutech Corp., Elmont, N.Y., USA

²⁶ Version 8.11 HEKA electronic, Lambrecht, Germany

waren und somit kaum Strom floss. Um den Einfluss der Membranspannung auf die Aktivität der Ionenkanäle und somit auf den Ionenstrom zu untersuchen, wurden sowohl Einfach- als auch Doppelspannungspulsprotokolle verwendet.

Einfachspannungspulsprotokolle

Das Einfachspannungspulsprotokoll (Abb. 2.6.) bestand aus vier Segmenten. Ausgehend von der Haltespannung (U_H), bei der die zu untersuchenden Ionenkanäle geschlossen waren, wurde eine Testspannung (U_T) appliziert. Die Dauer der Testspannung (Δt) wurde so gewählt, dass sich während der Messung gegen Ende des Pulssegmentes von U_T ein Gleichgewichtsstrom (I_{SS}) einstellte. Im sich anschließenden Folgepuls (U_F) wurde wieder ein Potential²⁷ angelegt, bei dem sich die untersuchten Ionenkanäle schließen, da ihre Offenwahrscheinlichkeit bei diesem Potential nahezu Null beträgt. Aufgrund des konstanten Folgepulses (U_F) ist auch die treibende Kraft für den Strom (I_F) unabhängig vom vorangegangenen Testpuls immer gleich. Allerdings kann der I_F zum Zeitpunkt t_0 zur Ermittlung der relativen Offenwahrscheinlichkeit (P_o) der Ionenkanäle, die durch den vorangegangenen U_T -Puls aktiviert wurden, verwendet werden. Der Zeitpunkt t_0 wurde dazu wenige Millisekunden nach Beginn des Folgepulses gesetzt, damit die nicht kompensierbaren kapazitiven Transienten bereits abgeklungen waren (siehe Kapitel 2.3.4). Im letzten Segment wurde wieder die Haltespannung (U_H) appliziert. Nach einer Ruhephase von fünf Sekunden bei dieser Haltespannung, während der die Ionenkanäle im geschlossenen Zustand gehalten wurden, wurde der nächste Puls mit einer um 20 mV niedrigeren Testspannung appliziert. Je nach Experiment wurden Testspannungen im Bereich von maximal 80 mV und -200 mV von einer Dauer zwischen 0,2 s und 1,5 s bzw. 10 s appliziert.

²⁷ -80 mV bei der Untersuchung auswärts-gerichteter Kaliumkanäle

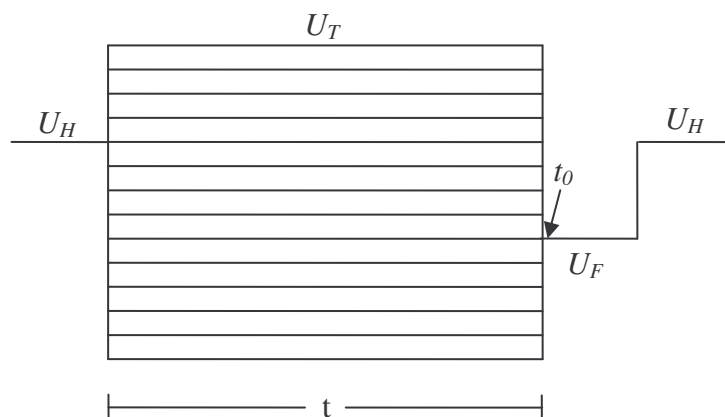


Abb. 2.6. Einfachspannungspulsprotokoll.

Ein Einfachspannungspuls setzt sich zusammen aus der Haltespannung U_H , der Testspannung U_T mit der Dauer t (0,2 s; 1,5 s oder 10 s), der Spannung des Folgepulses U_F und endet wieder mit der Haltespannung U_H . Die einzelnen Linien der Testspannung U_T symbolisieren die zeitlich nacheinander applizierten Spannungspulse mit einem Unterschied der Testspannung von jeweils 20 mV. Der Pfeil im Folgepuls symbolisiert den zur Ermittlung der relativen Offenwahrscheinlichkeit herangezogenen Zeitpunkt t_0

Doppelspannungspulsprotokolle

Bei einem Doppelspannungspulsprotokoll (Abb. 2.7.) wurde ein Einfachspannungspulsprotokoll um eine, für alle applizierten Einzeltestspannungen identische, Vorpulsspannung (U_{VP}) erweitert. Die Vorpulsspannung aktivierte vor jedem Einzeltestpuls die gleiche Anzahl von Kanälen. Aus den zum Zeitpunkt t_0 gemessenen Stromantworten auf die Testspannung wurde das Umkehrpotential ermittelt. Am Ende des Testpulssegmentes stellte sich analog zum Einfachspannungspulsprotokoll in Abhängigkeit von der angelegten Testspannung ein Gleichgewichtsstrom (I_{SS}) ein. In Abhängigkeit vom Aktivierungsverhalten der untersuchten Kanäle wurde als Vorpulsspannung entweder eine hyperpolarisierende oder eine depolarisierende Spannung verwendet.

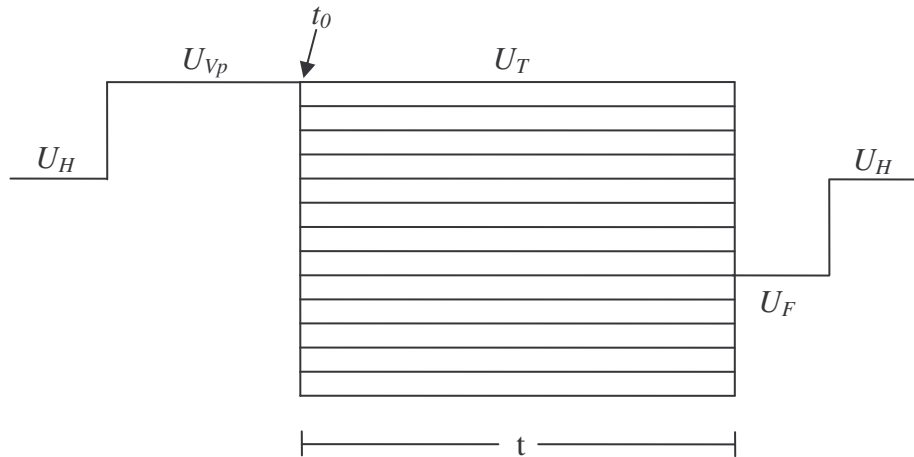


Abb. 2.7. Doppelspannungspulsprotokoll.

Ein Doppelspannungspuls setzt sich zusammen aus der Haltespannung U_H , der Vorpulsspannung U_{VP} , der Testspannung U_T mit der Dauer t , der Spannung des Folgepulses U_F und endet wieder mit der Haltespannung U_H . Die Vorpulsspannung aktiviert bei unterschiedlichen Testspannungen die gleiche Anzahl an Kanälen. Die einzelnen Linien der Testspannung U_T symbolisieren die zeitlich nacheinander applizierten Spannungspulse mit einem Unterschied der Testspannung von jeweils 20 mV. Der Pfeil zu Beginn des Testpulses symbolisiert den zur Ermittlung der Umkehrspannung herangezogenen Zeitpunkt t_0

2.3.9 Datenauswertung

Die mit den in Kapitel 2.3.8 beschriebenen Spannungspulsprotokollen gewonnenen Rohdaten wurden im ersten Auswertungsschritt, zur Selektion aller für die Ermittlung von Gleichgewichtsströmen, Umkehrspannung und relativer Offenwahrscheinlichkeit benötigten Daten, mit dem Programm Pulse-Fit²⁸ bearbeitet. Für die sich anschließenden Auswertungsschritte wurden die jeweiligen Daten mit den Programmen Igor Pro²⁹, SigmaPlott³⁰ und Excel³¹ weiterbearbeitet.

Für die Ermittlung der

- Gleichgewichtsströme (I_{SS}) wurden ca. 5 ms lange Pulsabschnitte gegen Ende der

²⁸ Version 8.62, HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland

²⁹ Version π (3.14), WaveMetrics, USA

³⁰ 2000 spss science

³¹ Microsoft

Testpulse von Einfach- und Doppelspannungspulsexperimenten selektiert und getrennt nach Testspannung der Mittelwert berechnet. Die zugehörigen Testspannungen wurden in allen Fällen gemäß Gleichung [4] $U_m = U_{cmd} - U_{LJP}$ (siehe Kapitel 2.3.6) um die jeweilige Grenzflächenpotentialdifferenz (U_{LJP}) korrigiert. Für eine bessere Vergleichbarkeit der I_{SS} bei sich unterscheidenden Messbedingungen wurden die I_{SS} der verschiedenen Messbedingungen auf den Maximalstrom der Messbedingungen mit den stärkeren Ionenströmen normiert (I_{SS} (norm)). Diese wurden anschließend als Strom-Spannungskennlinie (I/U) gegen die um U_{LJP} korrigierte Membranspannung aufgetragen (siehe Kapitel 3.1.2, *Abb. 3.6.*; Kapitel 3.2.2, *Abb. 3.12.*; Kapitel 3.3.2, *Abb. 3.26 B*). In den meisten Fällen wurde für die Membranspannung (U_m) im Anschluss an die Korrektur der Grenzflächenpotentialdifferenz außerdem eine Korrektur der, durch den Zugriffswiderstand (R_s) entstandenen Spannungsfehler vorgenommen. Dazu wurde zunächst mit dem Kehrwert der am Verstärker abgelesenen elektrischen Serien Leitfähigkeit (G_s) der Zugriffswiderstand (R_s) ermittelt ($R_s = 1 / G_s$). Zur Bestimmung des durch R_s verursachten Spannungsfehlers (U_{R_s}) wurde (R_s) mit dem Gleichgewichtsstrom (I_{SS}) multipliziert ($U_{R_s} = I_{SS} * R_s / 1000$). Das Produkt wurde anschließend von der Membranspannung (U_m) subtrahiert ($U_M = U_m - U_{R_s}$). Darüber hinaus wurden die Gleichgewichtsströme (I_{SS}) durch Abzug von Leckströmen (I_{Leak}) korrigiert. Zu diesem Zweck wurden für den Spannungsbereich der gegen die korrigierten Membranspannung (U_M) aufgetragenen Gleichgewichtsströme (I_{SS}) für den kein Stromfluss erwartet wurde die Ausgleichsgerade ($t + a * U_M$) bestimmt mit deren Hilfe die Leckströme berechnet werden konnten. Zur besseren Vergleichbarkeit der Gleichgewichtsströme der unterschiedlich großen Protoplasten wurden die korrigierten (I_{SS}) durch Division mit der während der Messung aufgezeichneten Membrankapazität (C_m) normiert (I_{SS} / C_m (pA/pF)). Als Strom-Spannungskennlinie (I/U) wurden die korrigierten und normierten I_{SS} gegen die ebenfalls korrigierte Membranspannung (U_M) aufgetragen (siehe Kapitel 3.2.2, *Abb. 3.9.*; *Abb. 3.16.*; Kapitel 3.3.2, *Abb. 3.24.*; *Abb. 3.26 A*; *Abb. 3.28.*).

- Umkehrspannung (U_{rev}) wurden die Ionenströme zu Beginn der Testpulse von Doppelspannungspulsexperimenten abgegriffen (siehe Kapitel 2.3.8, *Abb. 2.7.*, Zeitpunkt t_0). Dazu wurden die Testpulse im Bereich der ersten 100 ms nach

Abklingen der kapazitiven Ströme mit einer Exponentialfunktion gefittet. Der Strom zu Beginn des Textpulses wurde aus den Parametern der Exponentialfunktionen ermittelt und gegen die korrigierte Membranspannung (U_M) aufgetragen. Diese Strom-Spannungskennlinie wurde schließlich im Bereich der Kreuzung der Kennlinie mit der Spannungsachse nach Möglichkeit mit einer Polynomfunktion ersten Grades gefittet. Mit Hilfe dieser Polynomfunktion wurde das Umkehrpotential (U_{rev}), das aufgrund seiner Lage auch als Nullstrompotential bezeichnet wird, ermittelt.

- Offenwahrscheinlichkeit (P_o) wurden die Ionenströme zu Beginn der Folgepulse (U_F) von Einfach- und Doppelspannungspulsexperimenten abgegriffen (siehe Kapitel 2.3.8, Abb. 2.6., Zeitpunkt t_0). Dazu wurden analog zur Bestimmung der Umkehrspannung die Abklingströme im Bereich von ca. 100 ms nach Abklingen der kapazitiven Ströme mit einer Exponentialfunktion gefittet und die Ströme zum Zeitpunkt t_0 berechnet. Zur besseren Darstellung wurden die negativen Ströme mit (-1) multipliziert. Anschließend wurden die Ströme auf den Maximalstrom oder den zweitmaximalen Strom normiert und gegen die korrigierte Membranspannung (U_M) aufgetragen. Der auf diese Weise erzeugte Graph wurde abschließend mit einer Boltzmann Funktion gemäß Gleichung [5] gefittet.

$$P_o = (P_o + P_c) * \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{z_g * e_o * (U_M - U_{1/2})}{k * T}\right)} \quad [5]$$

P_o = Offenwahrscheinlichkeit (alle Kanäle sind geöffnet)

P_c = Geschlossenwahrscheinlichkeit (alle Kanäle sind geschlossen)

z_g = Elementarladungäquivalent (e)

e_o = Elementarladung $1,6021773 * 10^{-19}$ C

U_M = korrigierte Membranspannung

$U_{1/2}$ = Membranspannung bei halbmaximaler Offenwahrscheinlichkeit

k = Boltzmann Konstante $1,3807 * 10^{-23}$ J/K

T = absolute Temperatur in Kelvin

- Protoplastengröße wurde die während der Messung aufgezeichnete langsame Kapazität (C_m) genutzt um mit Gleichung [6] den Protoplastendurchmesser (\emptyset) zu bestimmen.

$$\emptyset = 2 * \sqrt{\frac{C_m / C_s}{4 * 3,14}} \quad [6]$$

C_s = spezifische Membrankapazität $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$

2.3.10 Patch-Clamp-Lösungen

Bei der Zusammenstellung der Lösungen wurde die Orientierung der jeweiligen Lösung zur Membran berücksichtigt (siehe Kapitel 2.3.2). Die intrazelluläre Lösung (siehe Kapitel 2.3.1), die auch als Pipettenlösung bezeichnet wird, äquilibriert bei den durchgeführten Ganzzelleableitungen mit dem Zellinnern und kontrolliert so die Zusammensetzung des Cytoplasmas. Die Badlösung (siehe Kapitel 2.3.1) hingegen ersetzt als extrazelluläres Medium die Lösung des Apoplasten.

Um die K^+ Kanäle in der Plasmamembran selektiv untersuchen zu können, wurde den Lösungen als dominierendes Kation K^+ zugegeben, während als Gegenion das impermeable Anion Gluconat⁻ verwendet wurde. Zur leichteren Ausbildung des hochohmigen Abdichtwiderstandes wurde extrazellulär 20 mM Ca^{2+} -Ionen (*KG 30 – 20 Ca* siehe unten) angeboten, welche durch Ausbildung von Salzbrücken zwischen den negativ geladenen Oberflächen förderlich auf den Widerstand wirken. Nach Erreichen der Ganzzellkonfiguration wurde die Lösung gegen weitere extrazelluläre Lösungen ausgetauscht. Der Pipettenlösung wurde 10 mM EGTA zugegeben, um einer Inhibition der Ionenströme durch freie Ca^{2+} -Ionen im Cytoplasma (Schröder & Hagiwara, 1989) vorzubeugen.

Bei der Herstellung der unten aufgeführten Lösungen wurde zunächst der pH-Wert eingestellt. Anschließend wurden die Lösungen unter zu Hilfenahme eines Dampfdruck-Mikro-Osmometers³² mit D-Sorbit auf die Osmolalität π (mosm/kg) des jeweiligen Zelltyps (siehe Tabelle 2.2.) eingestellt.

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt, D), ICN Biomedicals (Eschwege, D), Merck (Darmstadt, D), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D) und Sigma (München, D) bezogen.

³² VAPRO™, Modell 5520, Dr. B. G. Schlag GmbH, 51465 Bergisch Gladbach, Deutschland

PipettenlösungKG-150 (*interne Standardlösung*)

150 mM Kalium-Gluconat
 2 mM MgCl₂
 2 mM MgATP
 10 mM HEPES/Tris (pH 7,4)
 10 mM EGTA

BadlösungenKG 30 (*externe Standardlösung*)

1 mM CaCl₂
 30 mM K-Gluconat
 10 mM Mes/Tris (pH 5,6)

KG 3

1 mM CaCl₂
 3 mM K-Gluconat
 10 mM Mes/Tris (pH 5,6)

KG 90

1 mM CaCl₂
 90 mM K-Gluconat
 10 mM Mes/Tris (pH 5,6)

KG 30 – 20 Ca

20 mM CaCl₂
 30 mM K-Gluconat
 10 mM Mes/Tris (pH 5,6)

KG 3 – 20 Ca

20 mM CaCl₂
 3 mM K-Gluconat
 10 mM Mes/Tris (pH 5,6)

KG 30 – 5 Ba

1 mM CaCl₂
 30 mM K-Gluconat
 10 mM Mes/Tris (pH 5,6)
 5 mM BaCl₂

KG 30 – 10 Ba

1 mM CaCl₂
 30 mM K-Gluconat
 10 mM Mes/Tris (pH 5,6)
 10 mM BaCl₂

KG 30 – 5 Cs

1 mM CaCl₂
 30 mM K-Gluconat
 10 mM Mes/Tris (pH 5,6)
 5 mM CsCl

KG 30 – pH 7,4

1 mM CaCl₂
 30 mM K-Gluconat
 10 mM Tris/Mes (pH 7,4)

Protoplasten Lösungen	F I	F II	SuK I	SuK II	SuK III	K I	K II	W
KG 150	280	480	480	480	280	790	480	280
KG 30 – 20 Ca	282	482	478	471 288	287	789	474	285
KG 30	281	480	479	479 283	283		480	283
KG 30 – pH 7,4	280	477			278		473 (1x)	278
KG 3	281		478	478 273/2Ca	273/2Ca	794		273
KG 30 – 5 Ba	280							
KG 30 – 5 Cs				277				
KG 90			480	480				
KG 10 – 2 Ca					271			271
KG 30 – 10 Ba							483 (1x)	
KG 3 – 20 Ca						788		

Tab. 2.2. Auflistung aller untersuchten Protoplastentypen und der dafür verwendeten Patch-Clamp-Lösungen.

Die Zahlen geben die Osmolalität π (mosm/kg) der Lösungen an, die für den jeweiligen Protoplastentyp verwendet wurden.

F I = Faserprotoplasten: untersucht in Lösungen niedriger Osmolalität; F II = Faserprotoplasten: untersucht in Lösungen höherer Osmolalität; SuK = Suspensionskulturprotoplasten aus Kultur mit Medium I, II, III, (siehe Kapitel 2.1.2); K = Knospenprotoplasten: K I aus Isolation vor dem 14.04.04, K II aus Isolation nach den 14.04.04; W = Wurzelprotoplasten

2.4 Membranpotentialmessungen mit der Einstichttechnik

Die Einstichttechnik ermöglicht es, das Membranpotential (siehe Kapitel 2.3.7.) von Zellen einer intakten Pflanze zu untersuchen. Das Membranpotential stellt einen Spannungsunterschied zwischen zwei Lösungen mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen dar, die durch eine Membran voneinander getrennt sind. Es wird dabei maßgeblich von der Ionenkanalaktivität beeinflusst. Führt die Applikation von Messlösungen, die sich nur in der Konzentration eines Ions (z.B. K^+) unterscheiden, zu einer Änderung des Membranpotentials, kann mit dieser Methode indirekt auf die Beteiligung ionenselektiver Kanalproteine an der Potential-Änderung geschlossen werden. Die Untersuchungen wurden mit einem bei Roelfsema et al. (2004) beschriebenen, leicht abgewandelten Messplatzaufbau durchgeführt.

2.4.1 Vorbereitung des Pflanzenmaterials

Für die Einstichmessungen wurden 4 bis 6 Monate alte und 50 cm hohe, wachstumsaktive und unverzweigte Hydrokultur-Pflanzen (Anzucht in Wannen, siehe Kapitel 2.1.3) verwendet. Der Entwicklungszustand der verwendeten Pflanzen entsprach dem der diesjährigen Freilandtriebe, die zur Isolation von Faserprotoplasten (siehe Kapitel 2.2.1) verwendet wurden. Die Pflanzen wurden am Vortag der Messung geerntet und in ein mit Leitungswasser gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen mit durchbohrtem Deckel gestellt. Um das Auslaufen von Wasser zu verhindern wurde der Deckel des Zentrifugenröhrchens um den Zweig herum mit Knetmasse abgedichtet. Mit Ausnahme der obersten 4 -5 Blätter wurden alle Blätter vom Trieb entfernt. Um das Kambium und sich differenzierende Zellen von Außen zugänglich zu machen, wurde am Messtag ein Tangential- bis Radialschnitt zwischen zwei Nodien in einer Entfernung von 15 – 20 cm von der Triebspitze angebracht. Um ein Austrocknen zu vermeiden, wurde die Schnittstelle sofort mit Messlösung Es I (siehe Kapitel 2.4.5) befeuchtet. Anschließend wurde der Zweig mit der Schnittstelle nach oben in die Messkammer eingespannt. Sowohl der Eintritt des Zweiges in die Messkammer als auch der Austritt aus der Messkammer wurden mit Knetmasse abgedichtet und die Kammer vollständig mit Messlösung Es I gefüllt (*Abb. 2.8. A*). Der so präparierte Zweig wurde unter ein aufrechtes Mikroskop³³ gelegt, und zur Stabilisierung der Position mit zwei Halteklammern am Kreuztisch festgeklemmt. An den Auflagepunkten am Messtisch wurde der Zweig mit Hilfe eines vor der Präparation übergeschobenen Schrumpfschlauches (*Abb. 2.8. A (I)*) elektrisch von der Messapparatur isoliert. Für die Beobachtung des

³³ Axioskop 2FS, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

Präparates wurden ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung³⁴ und ein Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung³⁵ verwendet (Abb. 2.8. B). Da das Präparat sehr dick und mit der Mikroskopbeleuchtung³⁶ nicht zu durchleuchten war, wurde es zusätzlich mit einer Kaltlicht Lampe³⁷ von der Seite bestrahlt.

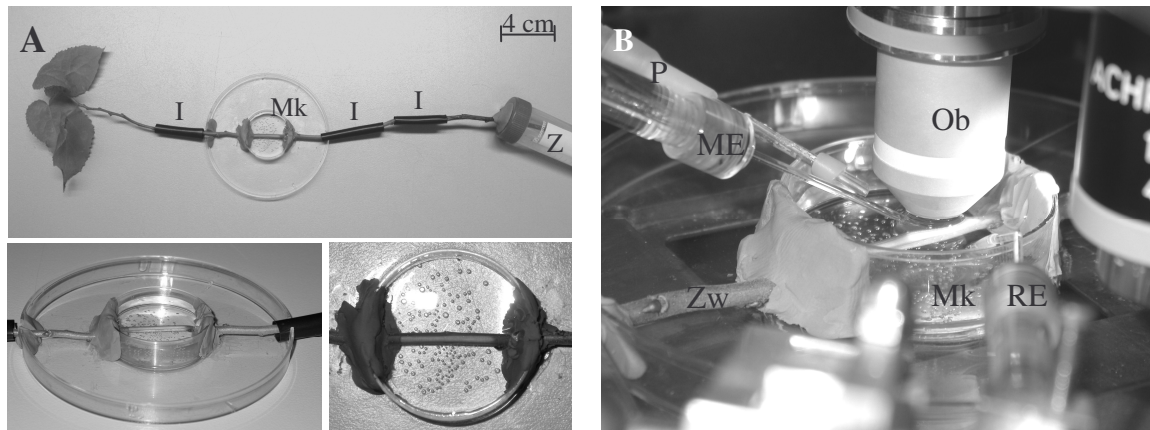


Abb. 2.8. Präparation einer Hydrokulturpflanze für Membranpotentialmessungen.

A: Vorbereitung des Zweiges. Bis auf vier Blätter an der Triebspitze wurden alle Blätter entfernt. Im Kontaktbereich mit dem Messtisch wurde eine Isolierung (I) aus Schrumpfschlauch angebracht. Der Zweig steckte in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Z), das Wasser-gefüllt und gegen Auslaufen mit Knetmasse abgedichtet war. Die Messstelle wurde in die Messkammer (Mk) eingespannt. Unten links ist eine Vergrößerung der gesamten Messkammer mit eingespanntem Zweig gezeigt. Die innere Kammer ist mit Messlösung gefüllt und am Zweigein- und Zweigaustritt mit Knetmasse gegen Auslaufen abgedichtet. Unten rechts ist die innere Messkammer mit der Knetabdichtung und der nach oben gerichteten Präparationsstelle am Zweig vergrößert dargestellt.

B: Messaufbau. Der Zweig (Zw) ist in die mit Messlösung gefüllte Messkammer (Mk) eingespannt. Das Wasserimmersionsobjektiv (Ob) fokussiert auf die Messstelle. Die Referenzelektrode (RE) reicht von vorne, die Messelektrode (ME) von der Seite und der Pumpenanschluss von hinten in die Messkammer.

³⁴ ACHROSTIGMAT 10x/0,25 440130, Zeiss, Deutschland

³⁵ ACHROPLAN 40x/0,80 w, Carl Zeiss, Deutschland

³⁶ SNT 12V 100W, Karl Zeiss, Deutschland

³⁷ KL 1500 electronic, doppelter Schwanenhals, Schott

2.4.2 Messprinzip der Einstichttechnik und Datenerfassung

In Analogie zum Messprinzip der Patch-Clamp-Technik (siehe Kapitel 2.3.1), wurde eine Glasmikropipette zur Hälfte mit Elektrolytlösung (1 M KCl) gefüllt und unter optischer Kontrolle mit einem Mikromanipulator³⁸ langsam an das Präparat herangefahren. Die Mikropipette wurde auf einer durch den Schnitt freigelegten Strahlzelle mit deutlich sichtbarem Protoplasten aufgelegt. Für die Messungen wurden Strahlzellen ohne verholzte Zellwände aus Kambium und Xylem-Expansionszone ausgewählt (Abb. 2.9.). Mit einem LN PIEZO STEPPER³⁹ wurde die Kapillare in einem Einstichwinkel von ca. 30° langsam weiter in das Gewebe gestochen bis sie eine unverletzte Zelle traf.

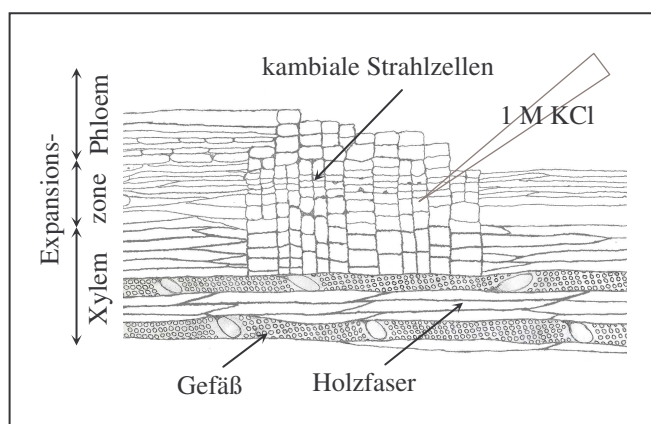


Abb. 2.9. Einstich in eine Strahlzelle der Expansionszone (Schemazeichnung)

Eine mit 1 M KCl gefüllte Kapillare (Δ) wurde in der freigelegten Expansionszone durch mehrere Zellen in eine intakte Strahlzelle der Xylem-Expansionszone eingestochen.

Die Mikropipette war über die Messelektrode mit einem Verstärker⁴⁰ für zwei Elektroden verbunden. Der elektrische Kreislauf wurde wie bei den Patch-Clamp-Messungen über eine frei in die Messlösung reichende Referenzelektrode (Abb. 2.8.) geschlossen. Um die freilaufende Membranspannung zu messen, wurde mit dem Verstärker der Stromfluss konstant gehalten. Der Zugang zu einer intakten Zelle äußerte sich durch einen sprunghaften Spannungsabfall auf Werte kleiner als -100 mV. Das Signal wurde weiter an den Clamp-Verstärker⁴¹ geleitet. Anschließend wurden die Messdaten mit einem Schreiber⁴² aufgezeichnet. Ein Austausch der Messlösung während einer Messung erfolgte durch Zugabe neuer Messlösung mit einer 5 ml Spritze am Grund der Messkammer solange, bis sich das Potential nicht mehr änderte. Da sich die gemessenen Potentiale mit schwankendem Lösungspegel änderten, wurde zur Stabilisierung des Potentials, alte und überschüssige

³⁸ Mikromanipulator 5171, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

³⁹ piezo translator P-280.30, Physik Instrumente, Waldbronn, Deutschland

⁴⁰ double microelectrode amplifier, VF 102, Bio Logic, Claix, Frankreich

⁴¹ clamp amplifier Type CA 100, Bio Logic, Claix, Frankreich

⁴² two line recorder, PM 8252A (89), Phillips, Holland

Messlösung mit einer Pumpe⁴³ von der Badoberfläche abgesaugt.

2.4.3 Pipetten und Elektroden

Die für die Einstichmessungen verwendeten Mikropipetten wurden mit einem auf verschiedene Parameter (Heat = 260, Fil = 3, Vel = 20, Del = 150, Pul = 160) programmierten Laser-Horizontal-Puller⁴⁴ aus Borosilikatglaskapillaren mit Filament⁴⁵ gezogen. Die verwendeten Elektroden wurden, wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, aus Silberdraht hergestellt. Die Messelektrode reichte in eine Glasmikropipette, die zur Hälfte mit 1 M KCl-Lösung als Elektrolyt gefüllt war. Die Referenzelektrode reichte in eine zur Hälfte mit einer 300 mM KCl-Lösung gefüllte Glaskapillare, die einen Außendurchmesser von 1 mm hatte und im Kontaktbereich zur Messlösung mit einem Agarpfropfen (1% Agar, 300 mM KCl) verschlossen war.

2.4.4 Korrektur des "Offset"-Potentials

Nach Eintauchen der Elektroden in die Messlösung wurde das *Offset*-Potential (U_{off} siehe Kapitel 2.3.6) entweder durch Abgleichen auf den Wert Null kompensiert oder notiert und bei der Datenauswertung vom gemessenen Potential nachträglich abgezogen.

2.4.5 Versuchsanordnung und Lösungen

Um den Einfluss von Kaliumkanälen auf das Membranpotential der jungen Strahlzellen zu untersuchen, wurde der apoplastische Kaliumgehalt durch unterschiedlich stark konzentrierte KCl-Messlösungen (Es) kontrolliert. Die KCl-Konzentration der verschiedenen Lösungen wurde dazu jeweils um den Faktor 10 verändert. Unter diesen Lösungsbedingungen und bei alleiniger Reaktion von hoch K^+ -selektiven Ionenkanälen würde sich das Membranpotential gemäß dem Nernst'schen Potential für Kalium (E_K , siehe Gleichung [7]) um 59 mV verschieben.

⁴³ Type N86 KN 18, KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland

⁴⁴ Model P-2000 Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA

⁴⁵ Nr. 1403547 Länge: 100 mm; Außen Ø: 1,0; Wandstärke: 0,21 mm; Filament 0,1 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland

$$E_K = \frac{RT}{F} * \ln \frac{[K^+]_a}{[K^+]_i} \quad [7]$$

Beginnend mit der am niedrigsten konzentrierten KCl-Lösung Es I wurde die Messlösung nach Erreichen einer stabilen Potentialmessung von mindestens 10 min jeweils gegen die um den Faktor 10 nächst höher konzentrierte KCl-Messlösung ausgetauscht. Nach Möglichkeit wurden die Lösungen in umgekehrter Reihenfolge wieder auf die am niedrigsten konzentrierte Messlösung zurückgetauscht.

Lösung der Einstichelektrode:

1 M KCl

Lösung der Referenzelektrode:

300 mM KCl

Messlösungen

Es I

1 mM KCl

1 mM CaCl₂

Es II

10 mM KCl

1 mM CaCl₂

Es III

100 mM KCl

1 mM CaCl₂

Der pH der Messlösungen wurde mit den Pufferlösungen 10 mM MES und 1 M Tris auf den Wert 6,0 eingestellt.

2.4.6 Datenauswertung

Für die Datenauswertung wurden Messungen herangezogen, die über einen Zeitraum von ein bis zwölf Minuten ein stabiles Membranpotential zeigten. Es wurden sowohl Einstichmessungen an verschiedenen Trieben als auch Einstichmessungen an jeweils anderen Zellen im selben Zweig als unabhängige Messungen ausgewertet.

2.5 Mikroskopie

2.5.1 Lichtmikroskopie

Kalli aus Suspensionskultur, die in SuK I und SuK III kultiviert worden waren (siehe Kapitel 2.1.1.4), wurden zur mikroskopischen Untersuchung eingebettet. Die Proben wurden zunächst 2 Stunden lang mit 4% (w/v) Formaldehyd (frisch depolymerisiert aus Paraformaldehyd) in PBS pH 7,0 fixiert. In einem weiteren Schritt wurde in Puffer gespült und anschließend in ansteigenden Konzentrationen von Ethanol entwässert. Das entwässerte Material wurde in Gelatine kapseln mit LR-White Acrylharz eingebettet und für 24 Stunden bei 60°C polymerisiert. Mit einem Mikrotom⁴⁶ wurden 1 µm starke Semidünnschnitte angefertigt und auf einen Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden mit Toluidin O angefärbt, mit dem Lichtmikroskop⁴⁷ betrachtet und mit der Digitalkamera⁴⁸ fotografiert. Darüber hinaus wurden - nach durchgeführter Einstichmessung - ca. 1 cm lange Zweigstücke aus dem untersuchten Zweigbereich zum Lagern in 98% Ethanol überführt. Die Zweigstücke wurden anschließend, wie oben für die Kalli beschrieben, eingebettet und untersucht. Beobachtungen und digitale Aufnahmen von nicht eingebettetem Zweigmaterial und Protoplasten wurden ebenfalls mit Lichtmikroskop⁴⁹ und Digitalkamera⁵⁰ durchgeführt.

2.5.2 Energiedispersive Röntgenanalyse (EDXA) im Rasterelektronenmikroskop (REM)

In SuK I und SuK III kultivierte Kalli (siehe Kapitel. 2.1.2) wurden zum Entfernen der Kulturlösung kurz in destilliertem Wasser gewaschen und auf saugfähigem Papier abgetupft. Die gewaschenen Kalli wurden in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan schockgefroren. Sie wurden anschließend gefriergetrocknet⁵¹ und in einem Sputtergerät⁵² 2 min bei 90 mA mit Chrom beschichtet. Die relative Massenkonzentration der Elemente ab der Ordnungszahl 9 (Fluor) im Gewebe der Proben wurde an einem

⁴⁶ MT 6000-XL, RMC Inc.

⁴⁷ Axiophot, Zeiss, Deutschland

⁴⁸ AxioCam, Zeiss, Deutschland

⁴⁹ Axioskop 2 MOT, Zeiss, Deutschland

⁵⁰ Spot Insight Color, Visitron systems GmbH

⁵¹ Gefriertrocknungsanlage GT 2 – E, Lyovac

⁵² K575, Emitech

Rasterelektronenmikroskop⁵³ in Verbindung mit einer energiedispersiven Röntgenanalyse (EDXA)⁵⁴ bestimmt.

Der zu analysierende Gewebebereich wurde im REM 500-fach bzw. 1000-fach vergrößert, die Beschleunigungsspannung betrug 15 kV, und eine Analyse dauerte 200 Sekunden. Das energiedispersive Röntgenspektrum eines jeden Analysepunktes wurde mit einem Analogschreiber aufgezeichnet. Anhand der Aufzeichnung wurde die relative Maßzahl für die Massenkonzentration des jeweiligen Elementes ermittelt. Sie ist das Verhältnis zwischen der Peakhöhe der elementspezifischen Röntgenstrahlung (elementspezifische K_{α} Strahlung) und dem entsprechenden unspezifischen Hintergrund (Abb. 2.10.).

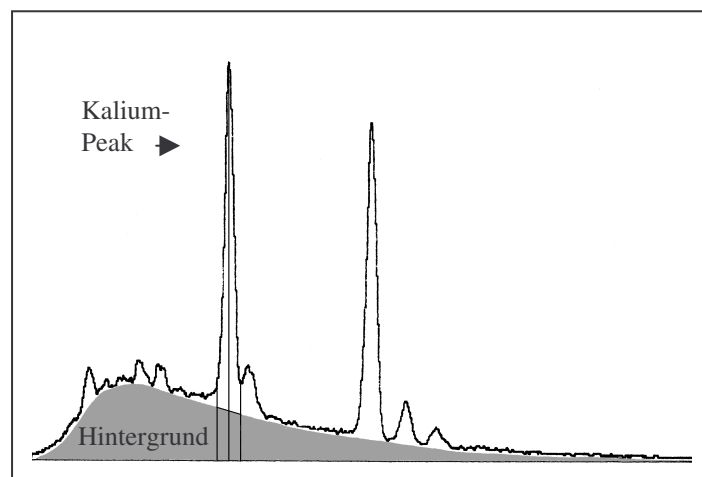


Abb. 2.10. EDXA-Spektrum.

Das Verhältnis aus der Peakhöhe und dem unspezifischer Hintergrund (grau) ergibt die relative Maßzahl für das untersuchte Element.

⁵³ REM AMR 1200 B, Leitz

⁵⁴ EDXA, KEVEX 4000

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen an Faserprotoplasten

3.1.1 Isolation von Faserprotoplasten

Um die Protoplasten junger Xylemfasern mit der Patch-Clamp-Technik untersuchen zu können, wurde zunächst die in Kapitel 2.2.1 beschriebene Isolationsmethode entwickelt. Da die jungen Xylemfasern wegen ihrer unter Kambium und Rinde verborgenen Lage nicht für enzymatische Aufschlussmethoden zur Protoplastenisolation zugänglich waren, wurde ein kombiniertes osmotisch-mechanisches Verfahren (siehe Kapitel 2.2) verwendet. Es nutzte den Vorteil, dass die Protoplasten im geschrumpften Zustand bei der mechanischen Verletzung der Zellen nicht beschädigt wurden. Um das Schrumpfen der Faserprotoplasten in der hypertonischen Waschlösung (1 M Sorbitol, 1 mM CaCl_2) zu beschleunigen, wurden von den Zweigstücken Rindenstreifen entfernt (siehe Kapitel 2.2.1, *Abb. 2.1.*). Die hypertonische Lösung hatte so direkten Kontakt zu benachbarten Xylem-, Kambium- und Phloemzellen. Nach 30minütiger Inkubation in der hypertonischen Waschlösung wurden die Zweigstücke in hypotonische Waschlösung (280 mosm/kg Sorbitol, 1 mM CaCl_2 , bzw. 480 mosm/kg Sorbitol, 1 mM CaCl_2) überführt. Dort wurden die jungen Faserzellen durch sofortiges Abziehen der verbliebenen Rindenstreifen zugänglich gemacht. Hierbei rissen die Faserzellen ab, wodurch über den Querschnitt verlaufende runde Öffnungen entstanden. Unterstützt durch die schwellend wirkende hypotonische Waschlösung traten die Faserprotoplasten aus diesen Öffnungen aus. Die so gewonnene und durch Zentrifugieren angereicherte Suspension aus Protoplasten und hypotonischer Waschlösung enthielt für beide Osmolalitäten (280 mosm/kg Sorbitol und 480 mosm/kg Sorbitol) zwei Protoplastentypen. Ein Protoplastentyp war transparent (*Abb. 3.1.A*). Er besaß eine deutlich sichtbare Vakuole und wenig Cytoplasma. Der zweite Protoplastentyp hatte eine granuliert Struktur und enthielt keine sichtbare Vakuole (*Abb. 3.1.B*). Da der erste Protoplastentyp, wie unten beschrieben, anhand lichtmikroskopischer Untersuchungen eindeutig jungen Faserzellen zugeordnet werden konnte und der zweite Protoplastentyp nicht zur Ausbildung des notwendigen „Giga-seals“ führte, wurden alle Patch-Clamp-Untersuchungen mit dem ersten Protoplastentyp durchgeführt. Die Osmolalität der Patch-Clamp-Lösungen wurde dazu auf den Wert der jeweiligen bei der Protoplastenisolation verwendeten hypotonischen Waschlösung eingestellt.

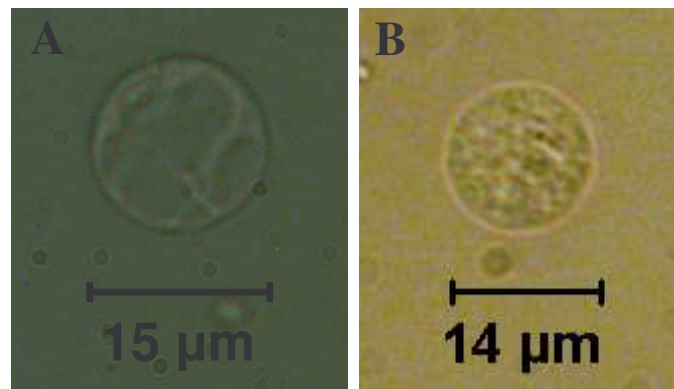


Abb. 3.1. Isolation von Protoplasten aus jungem Xylem

A: zeigt den aus jungen Fasern isolierten transparenten Protoplastentyp mit einer großen Vakuole und wenig Cytoplasma, der für Patch-Clamp-Untersuchungen verwendet wurde.

B: zeigt den in der Protoplastensuspension enthaltenen zweiten Protoplastentyp mit granulärer Struktur.

Um eine mögliche Auswirkung der unterschiedlichen Osmolalitäten der hypotonischen Waschlösungen auf die Größe der isolierten Protoplasten auszuschließen, wurde mit Hilfe der durchgeführten Patch-Clamp-Experimente die Größe der untersuchten Protoplasten bestimmt. Der Durchmesser wurde für jeden Protoplasten anhand der aufgezeichneten langsamen Kapazität und der für biologische Membranen spezifischen Kapazität von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ermittelt. Getrennt nach der zur Isolation verwendeten Osmolalität π der hypotonischen Waschlösung wurden Durchmesserwerte gebildet und in *Abbildung 3.2.* für $\pi = 280 \text{ mosm}/\text{kg}$ und $\pi = 480 \text{ mosm}/\text{kg}$ gegenübergestellt. In beiden Varianten lag der Mittelwert des Durchmessers bei $11 \mu\text{m}$. Für $\pi = 280 \text{ mosm}/\text{kg}$ betrug die Standardabweichung $3,336 \mu\text{m}$ ($n = 23$) und das Maximum der Häufigkeitsverteilung lag bei $13 \mu\text{m}$. Für $\pi = 480 \text{ mosm}/\text{kg}$ betrug die Standardabweichung $2,93 \mu\text{m}$ ($n = 17$) und das Maximum der Häufigkeitsverteilung lag bei $9 \mu\text{m}$. Die Durchmesser der Verteilungen reichten von $5 \mu\text{m}$ bis $16 \mu\text{m}$ für $\pi = 280 \text{ mosm}/\text{kg}$ und von $6 \mu\text{m}$ bis $17 \mu\text{m}$ für $\pi = 480 \text{ mosm}/\text{kg}$. Die identischen Mittelwerte als auch die nahezu identische Spreite der Durchmesser ließen keinen Einfluss der Osmolalität der Waschlösung auf den Durchmesser der Protoplasten erkennen. Die große Variabilität der Durchmesser deutete eher darauf hin, dass der Faserdurchmesser und der Durchmesser der Querschnittsöffnungen, an denen die Protoplasten austraten, den dominierenden Einfluss auf den Protoplastendurchmesser ausübten. Die Verschiebung des Maximums der Häufigkeitsverteilung von $13 \mu\text{m}$ bei $\pi = 280 \text{ mosm}/\text{kg}$ nach $9 \mu\text{m}$ bei $\pi = 480 \text{ mosm}/\text{kg}$ ließ jedoch einen möglichen Einfluss der Osmolalität der Waschlösungen auf den Durchmesser

der Protoplasten nicht ganz ausschließen. Da die Protoplasten für die Patch-clamp-Messungen selektiv und in geringer Zahl aus der Protoplastensuspension ausgewählt wurden, konnte allein aufgrund der Maxima der Häufigkeitsverteilungen diesbezüglich keine eindeutige Aussage getroffen werden.

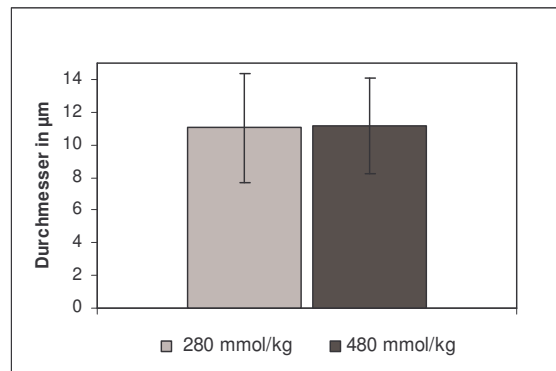


Abb. 3.2. Mittlerer Durchmesser von Faserprotoplasten in Abhängigkeit von der Osmolalität.

Für 280 mosm/kg liegt der Mittelwert des Durchmessers von 23 mit der Patch-Clamp-Technik untersuchten Protoplasten bei 11,06 µm (linke Säule). Für 480 mosm/kg liegt der Mittelwert des Durchmessers von 17 mit der Patch-Clamp-Technik untersuchten Protoplasten bei 11,14 µm (rechte Säule). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes.

Bestimmung des Protoplastentyps

Der isolierte Protoplastentyp A mit einer großen Vakuole und einem schmalen Cytoplasmaschlauch könnte nicht nur aus den zu isolierenden jungen Xylemfasern, sondern auch aus Gefäßen oder aus dem Kambium (Arend M. and Fromm J. 2003) stammen, da diese Zelltypen ebenfalls eine große Zentralvakuole enthalten. Deshalb waren zur Klärung des genauen Ursprungs der Protoplasten umfassendere lichtmikroskopische Untersuchungen notwendig. Mit den Untersuchungen sollte außerdem eine Verunreinigung der Protoplastensuspension mit Protoplasten aus dem Phloem ausgeschlossen werden. Für diese Untersuchungen wurden 1 cm lange Zweigstücke von ca. 1 m hohen in Hydrokultur (3 l Zylindern) gewachsenen Pflanzen verwendet (siehe Kapitel 2.1.3). Ihr Wuchsverhalten glich in Bezug auf Blattgröße und Holzbildung dem diesjähriger Triebe von im Freiland wachsenden zwei- bis dreijährigen Pflanzen. Auch eine mit diesen Hydrokultur-Pflanzen durchgeführte Protoplastenisolation lieferte die oben für die Freilandpflanzen beschriebene Protoplastensuspension. Die Zuordnung der isolierten Protoplastentypen erfolgte in zwei

Untersuchungsansätzen. Im ersten Untersuchungsansatz wurden von den Triebstücken mit einer Rasierklinge tangentiale und radiale Längsschnitte angefertigt. Diese wurden in hypertonische Waschlösung der Osmolalität $\pi = 1000 \text{ mosm/kg}$ auf einen Objektträger gegeben und anschließend abgedeckt und lichtmikroskopisch⁵⁵ betrachtet. Durch die manuelle Schnitttechnik verliefen die Tangentialschnitte nicht in derselben Schnittebene und enthielten teilweise auch ältere fast vollständig ausdifferenzierte Xylemfasern. Die Schnitte zeigten in den Zellen stark geschrumpfte Protoplasten (Abb. 3.3.), die durch die hohe Osmolalität der Waschlösung verursacht war.

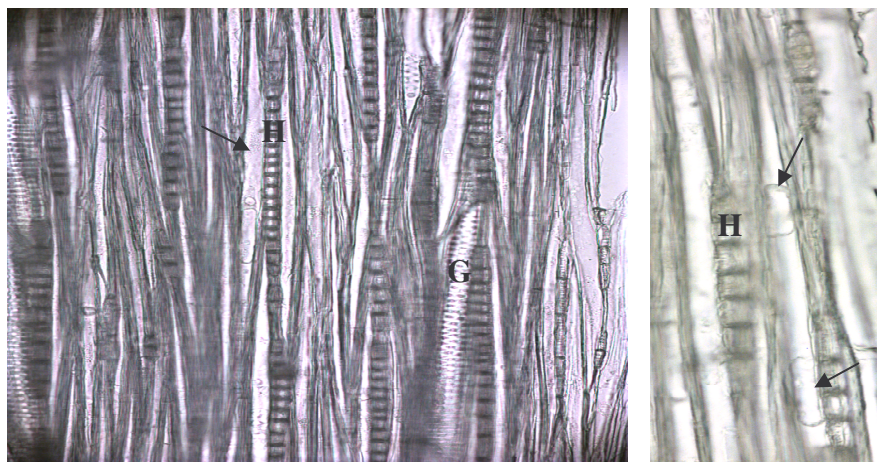


Abb. 3.3. Lichtmikroskopisch untersuchte Tangentialschnitte

Pfeile kennzeichnen Xylemfasern mit sichtbar geschrumpften Protoplasten. **H** = Holzstrahl, **G** = Gefäß

Strahlzellen, die im Tangentialschnitt als längs orientierte, einreihige Zellketten zwischen den ebenfalls längs orientierten Gefäßen und Fasern zu sehen waren, zeigten kugelige Protoplasten mit granulierter Struktur. Durch den Schnitt freigelegte Gefäße enthielten keine sichtbaren Protoplasten. Die Gefäße waren, wie bei Arend und Fromm 2003 beschrieben, bereits ausdifferenziert und abgestorben. Dem Kambium zuzuordnende undifferenzierte Zellen mit feinen, nicht verholzten Zellwänden zeigten stark geschrumpfte Protoplasten mit sehr feiner granulierter Strukturierung ohne sichtbare Vakuole. Die elektrophysiologisch zu untersuchenden Xylemfasern zeigten im Tangentialschnitt ein sehr variables Bild. Unter dem Einfluss der hypertonischen Waschlösung waren die Protoplasten zum Teil so stark geschrumpft, dass sich bereits in den geschlossenen Fasern zwei bis drei Teilprotoplasten gebildet hatten. So wurde innerhalb einer Faser z.B. ein transparenter Protoplast mit einer

⁵⁵ Inverses Mikroskop, Axiovert 35, Zeiss, Jena

großen Vakuole und wenig Cytoplasma, und ein Protoplast ohne sichtbare Vakuole und stark granuliertem Cytoplasma beobachtet. Auch zwei Protoplasten mit jeweils einer großen Vakuole konnten innerhalb einer Faser beobachtet werden. Ferner wurden in den älteren Fasern stark fragmentierte Protoplasten mit mehreren mittleren bis vielen kleinen Vakuolen und wenig Cytoplasma beobachtet. Protoplasten mit einer großen Vakuole und solche mit vielen kleinen Vakuolen konnten nicht in ein und derselben Faser beobachtet werden. Im Radialschnitt waren die Protoplasten innerhalb der Zellen nicht sehr deutlich zu erkennen, da die Strahlzellen die Fasern und Gefäße quer überlagerten.

Um das Austreten der Protoplasten aus den während der Isolation verletzten Zellen zu simulieren, wurde die eine Hälfte der Längsschnitte auf dem Objektträger zusätzlich mit einer Rasierklinge quer zum Faserverlauf geschnitten. Um eine Verunreinigung der Protoplastensuspension mit Phloemzellen auszuschließen, wurde bei der anderen Hälfte der Längsschnitte Phloem und Xylem durch Ziehen mit einer Uhrmacherpinzette getrennt. Nachdem die Präparate mit einem Deckglas abgedeckt worden waren, wurde bei gleichzeitiger mikroskopischer Beobachtung der Präparate hypotonische Waschlösung der Osmolalität $\pi = 450 \text{ mosm/kg}$ am Rand des Deckglases zupipettiert. Die zugegebene Waschlösung ($\pi = 450 \text{ mosm/kg}$) wurde kapillar unter das Deckglas gesaugt, wodurch sich die Osmolalität ($\pi = 1000 \text{ mosm/kg}$) der Waschlösung unter dem Deckglas erniedrigte. Waren die Tangential- und Radialschnitte mit einer Rasierklinge quer durchgeschnitten worden, traten an den Schnittflächen nach Zugabe hypotonischer Waschlösung mit der Osmolalität $\pi = 450 \text{ mosm/kg}$ aufgrund von Wasseraufnahme Protoplasten aus. Diese glichen optisch den innerhalb der Zellen beobachteten Protoplasten. An den Querschnittsflächen der Radialschnitte traten aus dem älteren Xylem Protoplasten mit vielen kleinen Vakuolen und wenig Cytoplasma und aus dem jüngeren Xylem Protoplasten mit einer, dafür aber großen Vakuole aus. Im Bereich des Kambiums konnte kein Austritt von Protoplasten beobachtet werden. Da die Längsschnitte mehrere Zellschichten dick waren, konnten die austretenden Protoplasten jedoch nur dem Zelltyp und der Entwicklungszone, nicht aber einzelnen Zellen zugeordnet werden. Die Einzelzellzuordnung wurde bei den Radialschnitten zusätzlich durch die quer verlaufenden Strahlzellen erschwert. Der Protoplastentyp A, der mit der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode isoliert wurde und eine große Vakuole besaß, konnte somit jungen Xylemfasern zugeschrieben werden. An Tangential- und Radialschnitten, bei denen Xylem und Phloem getrennt wurden, konnte beobachtet werden, dass die Trennung zwischen Kambium und dem jungen Xylem erfolgte, wobei das Kambium intakt blieb und zusammen mit dem Phloem abgezogen wurde. In einigen Fällen wurde sogar weiter entwickeltes Xylem

zusammen mit dem Phloem abgezogen. Beim Trennen von Phloem und Xylem wurden die jungen röhrenförmigen Xylemfasern so verletzt, dass an der Querschnittsfläche runde Öffnungen entstanden, an denen nach Lösungsaustausch Protoplasten austraten. Da die Trennung im Bereich junger Xylemfasern erfolgte und sowohl Kambium als auch Phloem unverletzt blieben, konnte eine Verunreinigung der Protoplastensuspension mit Phloemprotoplasten ausgeschlossen werden. Um zusätzlich zu überprüfen, ob der Protoplastentyp A mit der großen Vakuole nicht auch aus älteren Xylemfasern isoliert werden kann, wurden im zweiten Untersuchungsansatz die Triebstücke mit der Rinde in Waschlösung mit einer Osmolalität von $\pi = 1000$ mosm/kg inkubiert. Nach einer halben Stunde wurden die Zweigstücke aus der Lösung genommen, die Rinde abgezogen und das Holz zum Zerstören des neu gebildeten Xylems mit saugfähigem Papier trocken gerieben. In wenigen μl Waschlösung der Osmolalität $\pi = 1000$ mosm/kg wurden dann auf einer Glasplatte von den Zweigstücken 1 mm starke Querschnitte mit einer Rasierklinge abgeschnitten und in Waschlösung der Osmolalität $\pi = 280$ mosm/kg überführt. Anschließend wurde die Waschlösung auf das Vorhandensein von Protoplasten und deren Aussehen lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Waschlösung mit einer Osmolalität $\pi = 280$ mosm/kg enthielt transparente Protoplasten mit vielen Vakuolen. Protoplasten vom Typ A mit einer großen Vakuole fehlten vollständig. Somit konnte die Annahme dass der Protoplastentyp A nicht aus den älteren Faserzellen isoliert wurde, bestätigt werden.

3.1.2 Elektrophysiologie an Faserprotoplasten

Um die jungen Xylemfasern elektrophysiologisch auf den, mittels immunohistochemischer Lokalisation in den jungen Xylemfasern nachgewiesenen Kaliumkanal PTORK (Wind, C., 2003) zu untersuchen, wurden transparente Protoplasten vom Typ A (siehe Kapitel 3.1.1) verwendet. Alle Untersuchungen wurden in der Ganzzelleableitung der Patch-Clamp-Technik (siehe Kapitel 2.3.2) durchgeführt. Unter Standardbedingungen hatte der von der Pipettenlösung kontrollierte intrazelluläre K^+ -Gehalt eine Konzentration von 150 mM K^+ (KG – 150) und der von der Badlösung kontrollierte externe Gehalt an Kalium eine Konzentration von 30 mM K^+ (KG – 30, siehe Kapitel 2.3.10). Die Testpulse der angewendeten Einfach- und Doppelspannungspulsprotokolle (siehe Kapitel 2.3.8) hatten eine Länge von 1 s. Bei der Datenauswertung wurden die applizierten Testspannungen um das Grenzflächenpotential (U_{LJP} , siehe Kapitel 2.3.6) von -5 mV korrigiert. Die Haltespannung der Pulsprotokolle wurde für die Messungen bei -45 mV (U_{LJP} -korrigierter Wert) geklemmt. Die auf diese Weise untersuchten Faserprotoplasten zeigten bei depolarisierenden Membranspannungen auswärts-

gerichtete Ionenströme (Abb. 3.4.). Bei hyperpolarisierenden Membranspannungen traten gelegentlich einwärts-orientierte Ionenströme auf deren Stromspuren unregelmäßig verliefen und die nicht weiter untersucht wurden. Die auswärts-gerichteten Ionenströme glichen den Stromspuren des auswärts-gerichteten Kaliumkanals PTORK, der bereits in Oozyten des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) exprimiert und funktionell charakterisiert wurde (Langer et al., 2002).

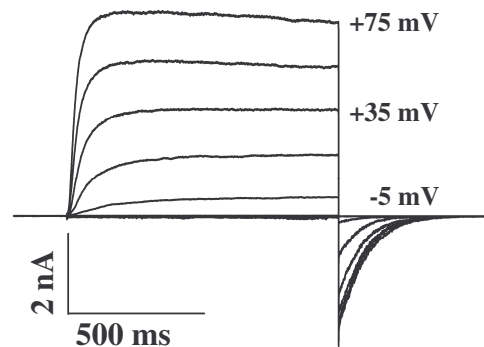


Abb. 3.4. Depolarisationsaktivierte, auswärts-gerichtete Ganzzellströme eines Faserprotoplasten.

Gezeigt sind Stromantworten auf ein Einzelspannungsprotokoll unter Standardbedingungen mit einer Dauer der Testspannung von 1 s. Es wurden Testspannungen von +75 mV bis -185 mV in 20 mV-Sprüngen appliziert. Die Haltespannung betrug -45 mV und die Spannung des Folgepulses -85 mV.

Um die in den jungen Faserprotoplasten gemessenen auswärts-gerichteten Ionenströme dem in jungen Faserzellen lokalisierten Kaliumkanal PTORK (Wind, C., 2003) zuzuordnen, wurde nach weiteren Gemeinsamkeiten der Ionenströme mit den Oozyten-Daten von PTORK und weiteren zu PTORK homologen Kaliumkanälen gesucht. So wurde die Dauer der Testspannung des Einfachspannungspulsprotokolls von 1 s auf 10 s verlängert. Unter den veränderten Bedingungen zeigten die Ionenströme von 10 untersuchten Protoplasten bei Verwendung der Standardmesslösungen eine zeit- und spannungsabhängige Inaktivierung. Die zeit- und spannungsabhängige Inaktivierung wurde bei einer von 30 auf 3 mM K^+ erniedrigten externen Kaliumkonzentration (KG – 3) verstärkt (Abb. 3.5.). Die *in vitro* Messungen von PTORK in *Xenopus*-Oozyten zeigten keine solche Inaktivierung (Langer et al., 2002). Übereinstimmung bestand jedoch mit *in vivo* Messungen des zu PTORK homologen Kaliumkanals GORK an Wurzelhaarprotoplasten von *Arabidopsis thaliana* (Ivashikina et al., 2001). Dieses Ergebnis bestärkte die Annahme, dass die in jungen

Faserzellen gemessenen Ionenströme durch den, mittels immunohistochemischer Lokalisation für diesen Zelltyp nachgewiesenen Kaliumkanal PTORK vermittelt wurden.

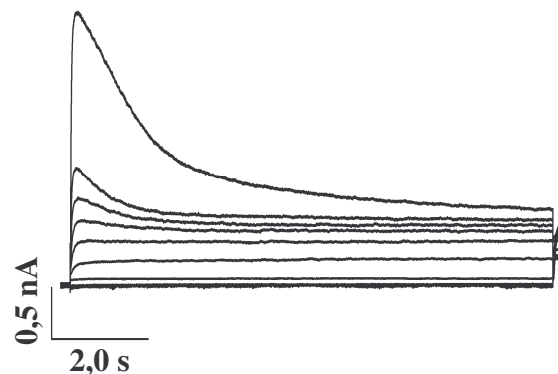


Abb. 3.5. Zeit- und spannungsabhängige Inaktivierung des auswärts-gerichteten Ionenstroms von Faserprotoplasten.

Die abgebildeten Originalstromspuren wurden mit einem auf 10 s verlängerten Testpuls unter Einfluss von 3 mM externem Kalium erzeugt. Appliziert wurden Testpulspspannungen von +75 bis -165mV. Die Haltespannung war auf -65 mV geklemmt.

Aufgrund der Ähnlichkeit der gemessenen Ionenströme mit denen von PTORK in *Xenopus*-Oozyten und denen von GORK in Wurzelhaarprotoplasten, wurden die Faserprotoplasten auf die Kaliumselektivität der Ionenkanäle untersucht. Dazu wurden zum einen die Ionenströme der Protoplasten unter Standardbedingungen und anschließend, nach Zugabe des Kaliumkanal-Blockers BaCl₂ (5 mM), in der externen Messlösung KG 30 – 5 Ba aufgezeichnet. Die auswärts-gerichteten Ionenströme waren unter dem Einfluss von BaCl₂ deutlich schwächer als unter Standardbedingungen (Abb. 3.6.).

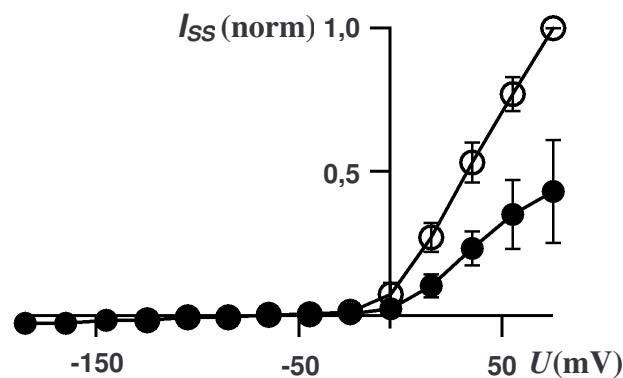


Abb. 3.6. Einfluss von Barium auf die Gleichgewichtsströme von Faserprotoplasten.

Die Daten zeigen die auf den Maximalstrom normierten Mittelwerte der Gleichgewichtsströme (I_{SS}) von drei Protoplasten unter Standardbedingungen (\circ = KG 30) und unter dem Einfluss von 5 mM BaCl₂ (\bullet). Die Standardabweichung des Mittelwertes ist als Fehlerbalken dargestellt.

Anhand von Doppelspannungspulsexperimenten wurde das Umkehrpotential (U_{rev}) in Abhängigkeit vom externen Kaliumgehalt ermittelt. Es betrug unter Standardbedingungen mit 150 mM internem und 30 mM externem Kalium -23 mV ($n = 5$). Bei einer Absenkung des externen Kaliumgehaltes um den Faktor 10 auf 3 mM K⁺, verschob sich das Umkehrpotential um -30,7 mV in negativer Richtung auf -53,7 mV ($n = 1$). Da eine kaliumabhängige Verschiebung des Umkehrpotentials für Kaliumkanäle charakteristisch ist, konnte aus dieser Beobachtung geschlossen werden, dass es sich bei dem untersuchten Kanal um einen Kaliumkanal handelte. Bei Betrachtung des Nernst'schen Potentials für Kalium (E_K) fiel jedoch eine Abweichung der ermittelten Werte zu dem E_K bei 30 mM K⁺ (-41,2 mV) und dem E_K bei 3 mM K⁺ (-100,2 mV) auf. Demnach müsste sich das Umkehrpotential bei einer 10-fachen Änderung der externen K⁺-Konzentration um -59 mV verschoben haben. Da die einzelnen Umkehrpotentiale von den theoretischen Werten abwichen und sich das Potential bei einer 10-fachen Änderung der externen K⁺-Konzentration lediglich um -30,7 mV verschob, konnte angenommen werden, dass der Kaliumkanal neben Kalium für weitere Ionen durchlässig war.

3.2 Untersuchungen an Protoplasten aus Suspensionskultur

3.2.1 Isolation von Protoplasten aus Suspensionskultur

Die Protoplasten wurden enzymatisch aus Suspensionskulturen gewonnen (siehe Kapitel 2.2.2), die mit verschiedenen K^+ -Konzentrationen (SuK I = 20 mM K^+ , SuK II = 1,05 mM K^+ oder SuK III = 0,15 mM K^+) versorgt worden waren (siehe Kapitel 2.1.2). Die isolierten Protoplasten waren transparent, besaßen eine große Vakuole und wenig Cytoplasma (Abb. 3.7.). Die aus den unterschiedlichen Kultivierungsansätzen gewonnenen Protoplasten zeigten optisch keine charakteristischen Unterschiede.



Abb. 3.7. Repräsentativer Protoplast aus SuK II versorgter Suspensionskultur

Da das Gewebe der Suspensionskulturen in SuK I-, SuK II- und SuK III-Medium (siehe Kapitel 2.1.2) verschiedene osmotische Bedingungen aufwies wurden die zur Protoplastenisolation benötigten Enzym- und Waschlösungen dem jeweiligen osmotischen Druck des Gewebes angepasst (siehe Kapitel 2.2.2). Protoplasten aus SuK I-Kultur wurden mit Lösungen der Osmolalität $\pi = 550$ mosm/kg und $\pi = 480$ mosm/kg isoliert. Protoplasten aus SuK II- und SuK III-Kultur wurden mit Lösungen der Osmolalität $\pi = 280$ mosm/kg isoliert. Da die unterschiedliche Osmolalität Einfluss auf die Größe der Protoplasten haben konnte, wurde mit Hilfe der durchgeführten Patch-Clamp-Experimente die Größe der untersuchten Protoplasten bestimmt. Der Durchmesser wurde für jeden Protoplasten anhand der aufgezeichneten langsamen Kapazität und der für biologische Membranen spezifischen Kapazität von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ermittelt. Der Mittelwert des Durchmessers aller untersuchten SuK I-Protoplasten lag bei $4,33 \mu\text{m}$, die Standardabweichung betrug $1,84$ ($n = 19$). Das Maximum der Häufigkeitsverteilung des Protoplastendurchmessers lag bei $5 \mu\text{m}$. Für SuK II-Protoplasten lag der Durchmesserwert bei $6,26 \mu\text{m}$, die Standardabweichung betrug $2,13$ ($n = 65$) und das Maximum der Häufigkeitsverteilung der Protoplastendurchmesser lag

bei 7 μm . Die SuK III-Protoplasten hatten einen Durchmesserwert von 5,86 μm , die Standardabweichung betrug 2,2 ($n = 14$) und das Maximum der Häufigkeitsverteilung lag bei 7 μm . Bei Betrachtung der Maxima der Häufigkeitsverteilungen hatten die schlecht mit Kalium versorgten SuK II- und SuK III-Protoplasten größere Durchmesser als die gut mit Kalium versorgten SuK I Protoplasten, die mit Lösungen höherer Osmolalität isoliert wurden.

3.2.2 Elektrophysiologie an Suspensionskultur-Protoplasten

Alle elektrophysiologischen Untersuchungen an Protoplasten aus Suspensionskultur wurden in der Ganzzelleableitung der Patch-Clamp-Technik (siehe Kapitel 2.3.2) durchgeführt. Unter Standardbedingungen betrug die von der Pipettenlösung kontrollierte intrazelluläre K^+ -Konzentration 150 mM K^+ (KG – 150) und der von der Badlösung kontrollierte extrazelluläre Kaliumgehalt 30 mM K^+ (KG – 30, siehe Kapitel 2.3.10). Die Testpulslänge der angewandten Pulsprotokolle betrug für Protoplasten aus SuK I und SuK II versorgter Suspensionskultur 1,5 s, und für SuK III versorgte Suspensionskultur 0,2 s. Alle applizierten Testspannungen wurden bei der Datenauswertung um das Grenzflächenpotential (U_{LJP} , siehe Kapitel 2.3.6) von -5 mV korrigiert. Bei einem Teil der untersuchten Protoplasten konnten entweder durch hyperpolarisierende Membranspannungen einwärts-gerichtete Ionenströme (*Abb. 3.8 A*) oder durch depolarisierende Membranspannungen auswärts-gerichtete Ionenströme (*Abb. 3.8 C*) induziert werden. Bei der Mehrzahl der untersuchten Protoplasten konnten sowohl einwärts- als auch auswärts-gerichtete Ionenströme aufgezeichnet werden (*Abb. 3.8 B*). Meistens dominierte dabei jedoch eine Stromkomponente.

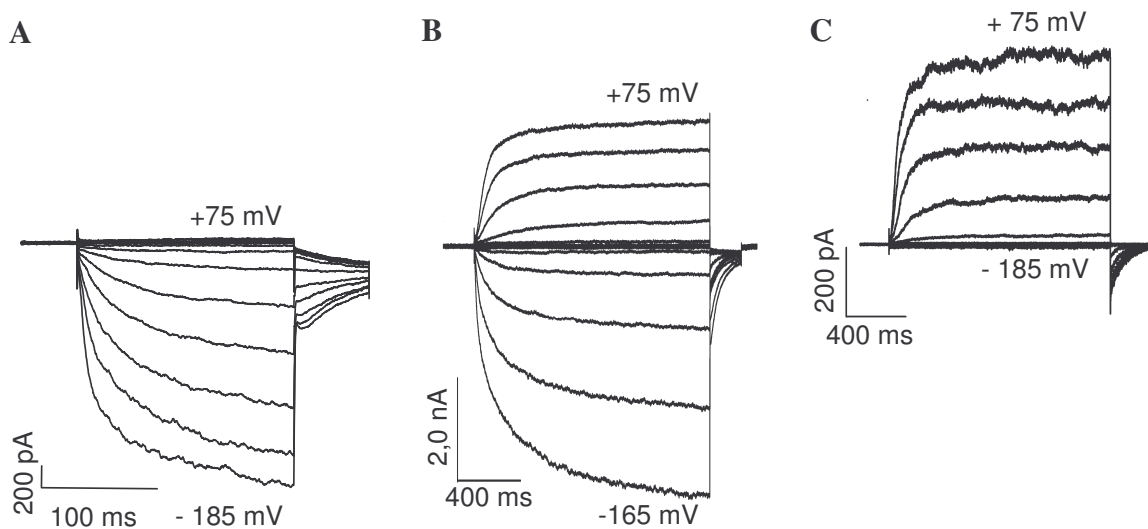


Abb. 3.8. Stromspuren von Suspensionskulturprotoplasten

Alle Stromspuren wurden in 20 mV-Schritten bei geklemmten Membranspannungen zwischen +75 mV und -185 mV aufgezeichnet.

A: Hyperpolarisations-aktivierte einwärts-gerichtete Ionenströme eines mit SuK III versorgten Protoplasten in Badlösung KG 30 – 20 Ca

B: Hyperpolarisations- und Depolarisations-aktivierte einwärts- und auswärts-gerichtete Ionenströme eines mit SuK II versorgten Protoplasten in KG 30 – 20 Ca

C: Depolarisations-induzierte auswärts-gerichtete Ionenströme eines mit SuK I versorgten Protoplasten in Badlösung KG 30 – 20 Ca.

a.) Einfluss der K⁺-Versorgung auf Gleichrichtung und Amplitude

Von Untersuchungen zum auswärts-gleichrichtenden Kaliumkanal SKOR aus *Arabidopsis thaliana* war bekannt, dass Kalium die Gen-Expression stimuliert was zu einer vermehrten Bildung der entsprechenden Kanalproteine führt (Gaymard et al., 1998). Ein hohes Kaliumangebot während der Wachstumsphase der Suspensionskultur sollte demnach die Gen-Expression des Auswärtskanals induzieren und zu einer erhöhten Bildung von Kanalproteinen führen. Infolgedessen sollte dann ein größerer Ausstrom bei gegebener Spannung gemessen werden. Für die Auswertung wurden alle Protoplasten, die entweder einen reinen oder einen dominierenden Ionenstrom derselben Orientierung zeigten, zu einer Gruppe zusammengefasst (Tab. 3.1). Die Gruppen, „dominierender Abgabestrom“ und „dominierender Aufnahmestrom“ wurden außerdem entsprechend der Kaliumversorgung der Suspensionskultur untergliedert. Ein entsprechend der Kaliumversorgung durchgeführter

Vergleich aller untersuchten Protoplasten deutete dabei auf einen Zusammenhang zwischen der gemessenen Stromstärke und der Ernährungssituation der Suspensionskultur hin. Bei sehr guter Versorgung der Suspensionskultur mit K^+ (SuK I) war die Zahl der Protoplasten mit dominierendem Abgabestrom doppelt so groß wie die Zahl der Protoplasten mit dominierendem Aufnahmestrom. Je schlechter die Versorgung der Suspensionskultur mit Kalium war (SuK III), desto häufiger war der gemessene Aufnahmestrom größer als der gemessene Abgabestrom (*Tab. 3.1.*). Die Spalte mit dem Verhältnis aus dominierendem Abgabestrom und dominierendem Aufnahmestrom verdeutlicht außerdem, dass mit abnehmender Kaliumernährung der Suspensionskultur der gemessene Abgabestrom schwächer und seltener wurde (*Tab. 3.1.*).

Kalium Versorgung der Suspensionskultur	Anzahl der Protoplasten (mit)			Verhältnis Abgabe/ Aufnahme
	gesamt	dominierendem Abgabestrom	dominierendem Aufnahmestrom	
SuK I (20 mM K^+)	27	15	7	2,14
SuK II (1,05 mM K^+)	73	11	53	0,21
SuK III (0,15 mM K^+)	14	1	12	0,08

Tab. 3.1. Stromrichtung der untersuchten Suspensionskultur-Protoplasten in Abhängigkeit von der Kaliumversorgung.

Der Anzahl aller Protoplasten sind die Anzahl der Protoplasten mit einem dominierenden Abgabestrom und die Anzahl der Protoplasten mit einem dominierendem Aufnahmestrom gegenüber gestellt. Die Anzahl der Protoplasten, bei denen weder Aufnahme- noch Abgabeströme dominierten ist nicht aufgelistet. Außerdem ist das Verhältnis aus der Anzahl der Protoplasten mit dominierenden Abgabe-/Aufnahmeströmen aufgeführt.

Eine Gegenüberstellung der Strom-Spannungskennlinie der Gleichgewichtsströme (I_{SS}) von Protoplasten aus mit SuK I bzw. SuK III versorgter Suspensionskultur (*Abb. 3.9.*) zeigte den Einfluss der Kaliumversorgung auf die Amplitude der gemessenen Ein- und Auswärtsströme. Der Mittelwert der Gleichgewichtsströme von Protoplasten aus mit K^+ gut versorgter Suspensionskultur (n=11, SuK I) zeigte einen deutlich größeren Auswärts- als Einwärtsstrom. Im Gegensatz dazu war bei den Gleichgewichtsströmen von Protoplasten aus der schlecht versorgten Kultur (n=5, SuK III) ein schwacher Auswärts- und ein starker Einwärtsstrom zu verzeichnen.

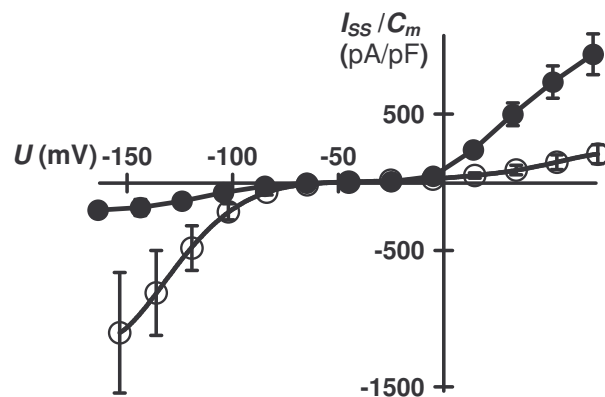


Abb. 3.9. Suspensionskultur: Abhängigkeit der Stromamplitude von der Kaliumversorgung

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler normierter Gleichgewichtsströme (I_{SS}) von Protoplasten aus gut (●) und schlecht (○) versorgter Suspensionskultur. Die Gleichgewichtsstromdichten (I_{SS}/C_m) sind gegen die angelegten Membranspannungen aufgetragen. Alle Messungen wurden mit KG 30 – 20 Ca als Badlösung durchgeführt. Die Haltespannung lag bei -85 mV für SuK I und -5 mV für SuK III.

b.) Charakterisierung der Einwärtsströme

Da Gluconat als impermeables Anion in den Lösungen verwendet wurde (siehe Kapitel 2.3.10), war davon auszugehen, dass die induzierten Ein- und Auswärtsströme durch Kationenkanäle vermittelt wurden. Um die beteiligten Kanaltypen weiter zu spezifizieren und zu klären, ob es sich dabei tatsächlich um K^+ -selektive Kanäle handelte, wurde die Zusammensetzung der Badlösung variiert. Da einwärts-gerichtete Ionenströme bei schlechter Kaliumversorgung der Suspensionskultur am stärksten ausgeprägt waren (siehe *Tab. 3.1.* und *Abb. 3.9.*), wurden zu ihrer Untersuchung vorwiegend Protoplasten aus SuK II und III verwendet. Als erstes wurden die Einwärtsströme auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem K^+ -Kanal-Blocker Cs^+ untersucht. Hierzu wurden die Ionenströme von SuK II Protoplasten zunächst in externer Standardlösung KG 30 gemessen. Anschließend wurde die Lösung gegen KG 30 – 5 Cs ausgetauscht. Diese Lösung enthielt 5 mM Cs^+ , das spezifisch die Aktivität einwärts-gerichteter Kaliumkanäle hemmt (Hedrich et al., 1995). Im vorliegenden Fall verschwand durch den Einsatz von Cs^+ der einwärts-gerichtete Strom vollständig (*Abb. 3.10.*).

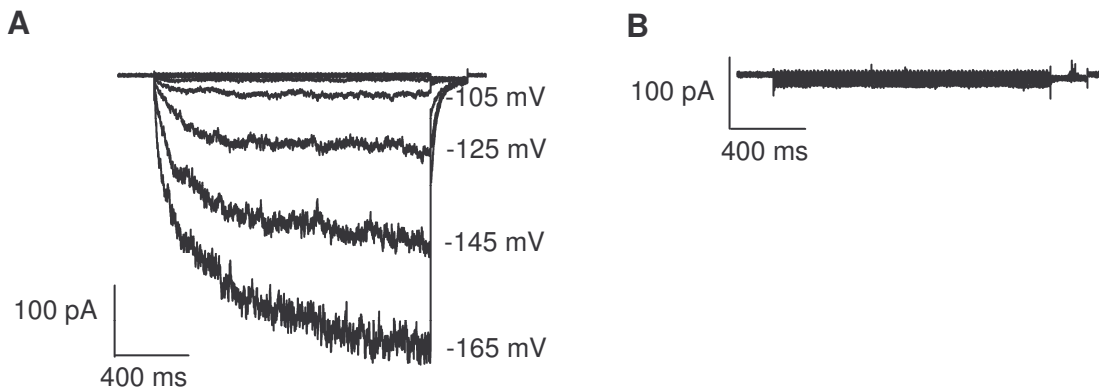


Abb. 3.10. Cäsium-Block der einwärts-gerichteten Ionenströme.

A: Einwärts-gerichtete Stromspuren eines mit SuK II versorgten Protoplasten unter Standard-Bedingungen.

B: Blockierung der Einwärtsströme nach Zugabe von 5 mM Cs⁺.

Danach wurde der Einfluss der Kaliumkonzentration auf den Einwärtsstrom untersucht, indem die K⁺-Konzentration von 30 mM auf 3 mM (KG 3) gesenkt wurde. Wie erwartet nahmen die einwärts-gerichteten Ionenströme mit der Reduktion der extrazellulären K⁺-Konzentration ab (Abb. 3.11.).

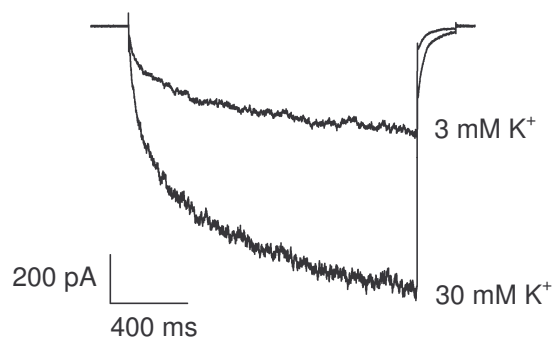


Abb. 3.11. Einfluss des externen Kaliumgehaltes auf den Ioneneinstrom.

Dargestellt sind Original-Stromspuren eines Protoplasten aus SuK III. Der Spannungspuls klemmte die Membranspannung für 1,5 s bei -185 mV. Die obere Spur zeigt die Stromantwort bei 3 mM K⁺. Die untere Spur zeigt die Stromantwort unter Standard-Bedingungen mit 30 mM externem K⁺.

Um den Effekt von extrazellulären Ca²⁺-Ionen auf die Einwärtsströme zu klären, wurde die Standardlösung KG 30 (1 mM CaCl₂) gegen eine Lösung mit erhöhter Ca²⁺-Konzentration (KG 30 – 20 Ca: 20 mM CaCl₂) ausgetauscht. SuK I-Protoplasten zeigten den stärksten Effekt

(siehe Tab. 3.2.) und wurden deshalb für diese Untersuchungen verwendet. Während die Stromamplituden (I_{ss}) in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 mit zunehmender Hyperpolarisation kontinuierlich anstiegen (Abb. 3.12. A, C), nahmen die Einwärtsströme im Bereich negativ von -150 mV trotz erhöhter treibender Kraft für den Einstrom in Gegenwart von 20 mM Ca^{2+} ab (Abb. 3.12. C). Unter diesen Bedingungen zeigten die Stromspuren zu Beginn der Testpulse einen markanten V-förmigen Kurvenverlauf. Dabei nahm der Strom in den ersten Millisekunden der Testpulse zunächst spannungsabhängig zu, um dann schlagartig wieder spannungsabhängig abzunehmen (Abb. 3.12. B, Testspannung -185 mV). Dieser Effekt deutete darauf hin, dass Einwärtsströme durch spannungsabhängig in die Kanalpore gezogene Ca^{2+} -Ionen gehemmt wurden. Das heißt, der Ca^{2+} -Block verstärkte sich mit zunehmender Hyperpolarisation was in einer zunehmend stärkeren Ausprägung des V-förmigen Kurvenverlaufes sichtbar wurde. Insgesamt waren die Stromamplituden im Bereich negativ von -105 mV unter dem Einfluss von 20 mM Ca^{2+} geringer als bei 1 mM Ca^{2+} in der extrazellulären Lösung (Abb. 3.12. A, B, C).

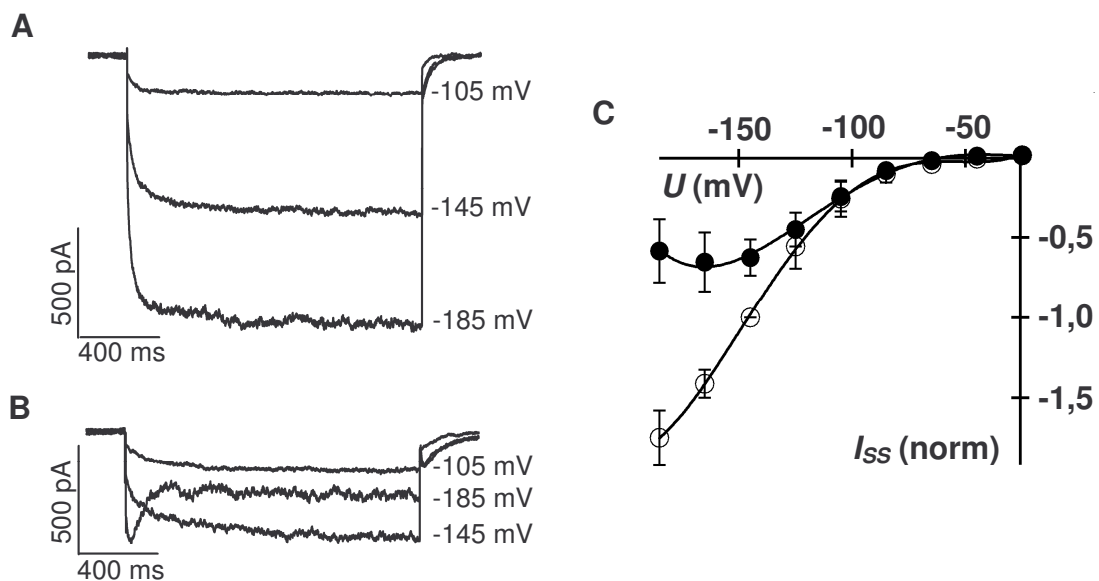


Abb. 3.12. Spannungsabhängiger Ca^{2+} -Block der einwärts-gerichteten Ionenströme

A: Hyperpolarisations-induzierte Stromantworten von SuK I Protoplasten in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 in KG 30.

B: Stromantworten desselben Protoplasten nach Wechsel von KG 30 auf KG 30 – 20 Ca.

C: Mittelwerte und Standardabweichung (σ) der Strom-Spannungskennlinien in KG 30 – 20 Ca (\bullet) und KG 30 (\circ) von 3 Protoplasten nach Normierung auf den Strom bei -145 mV in KG 30. Die Haltespannung betrug -45 mV.

Dieses Verhalten des einwärts-gerichteten Kaliumstroms stand im Einklang mit dem Ca^{2+} -abhängigen Verhalten des Pappel-Kaliumkanals PTK2 in *Xenopus*-Oozyten (Langer et al., 2002). Im Gegensatz zu den ‚*in vivo*‘-Untersuchungen an Suspensionskulturprotoplasten zeigten die ‚*in vitro*‘-Untersuchungen von PTK2 aber lediglich eine schwache Spannungsabhängigkeit des Ionenstroms. Deshalb konnte der untersuchte einwärts-gerichtete Kaliumstrom nicht eindeutig dem klonierten Kaliumkanal PTK2 zugeordnet werden.

Schließlich wurde der Einfluss der Kaliumversorgung auf den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Block untersucht (Tab. 3.2.). Wie in Tabelle 3.1. dargestellt, zeigten die am schlechtesten mit Kalium versorgten SuK III-Protoplasten dominante Einwärtsströme. Allerdings wurden nur 23% der untersuchten Einwärtsströme durch 20 mM extrazellulärem Calcium geblockt. SuK II-Protoplasten zeigten mit 55% einen deutlich höheren Ca^{2+} -Effekt. Den stärksten Effekt zeigten SuK I-Protoplasten mit 100%. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass mit zunehmender Kaliumversorgung der Suspensionskultur der Anteil der Protoplasten zunahm, die einen Ca^{2+} -abhängigen Block des einwärts-gerichteten Ionenstroms zeigten (Tab. 3.2.).

Kaliumversorgung der Suspensionskultur	Anzahl der Protoplasten (mit)			% Ca^{2+} -Block
	gesamt	Ioneneinstrom	Ca^{2+} -geblocktem Einstrom	
SuK I (20 mM K^+)	27	12	12	100
SuK II (1,05 mM K^+)	73	62	34	55
SuK III (0,15 mM K^+)	14	13	3	23

Tab. 3.2. Ca^{2+} -Block, in Abhängigkeit von der Kaliumversorgung der Suspensionskultur.

Die Spalte „ Ca^{2+} -geblockter Einstrom“ enthält die Anzahl der Protoplasten, deren einwärts-gerichteter Ionenstrom bei 20 mM K^+ in der Badlösung spannungsabhängig geblockt war. Die Spalte „% Ca^{2+} -Block“ gibt den Prozentsatz der Protoplasten mit einem Ioneneinstrom an, deren Einstrom durch 20 mM Ca^{2+} geblockt wurde.

c.) Charakterisierung der Auswärtsströme

Zur Untersuchung der spannungsabhängig aktivierten, auswärts-gerichteten Ionenströme (Abb. 3.13.) wurden SuK I-Protoplasten verwendet, Die auswärts-gerichteten Ströme aktivierten bei depolarisierenden Membranspannungen mit einer sigmoiden Kinetik (Abb. 3.13. Vergrößerung). Die gleiche Aktivierungskinetik zeigte der Pappel-Kaliumkanal PTORK in *Xenopus*-Oozyten (Langer et al., 2002).

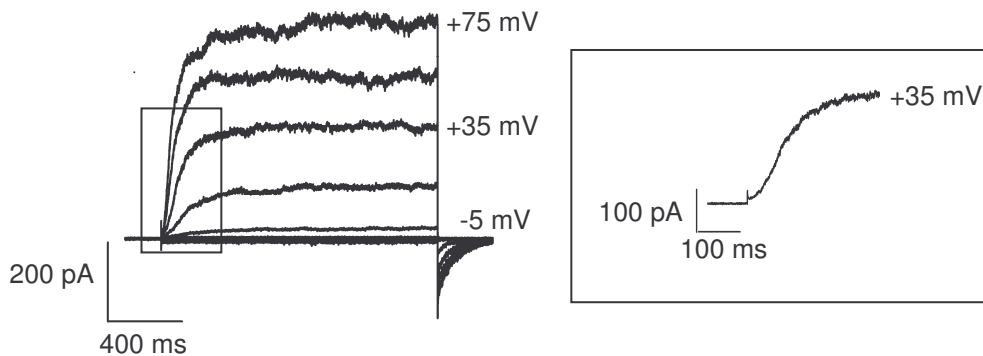


Abb. 3.13. Aktivierungskinetik auswärts-gerichteter Ionenströme

Repräsentative Stromantworten von SuK I-Protoplasten auf Testspannungen im Bereich von +75 mV bis -185 mV ausgehend von einer Haltespannung von -85 mV. Die rechts eingefügte Vergrößerung der bei +35 mV aufgezeichneten Stromspur verdeutlicht die S-förmige (sigmoide) Aktivierungskinetik des Ionenstroms.

Zur Identifizierung des zugrunde liegenden Kanaltyps wurden in Gegenwart unterschiedlicher extrazellulärer K^+ -Konzentrationen (3, 30, 90 mM K^+) Doppelspannungspulseexperimente an SuK I-Protoplasten durchgeführt und die jeweiligen Umkehrspannungen U_{rev} ermittelt. Ausgehend von -52 mV in 3 mM K^+ verschob sich die Umkehrspannung mit zunehmendem externem Kaliumgehalt zu immer positiveren Membranspannungen (Tab. 3.3. und Abb. 3.14.). Es konnte also eine deutliche Abhängigkeit der Umkehrspannung von der externen Kaliumkonzentration festgestellt werden. Die Werte der Umkehrspannung stimmten jedoch nicht eindeutig mit den Werten des Nernstpotentials für Kalium (E_K) überein (Tab. 3.3.). E_K liegt bei einem internen Kaliumgehalt von 150 mM K^+ und einem externen Kaliumgehalt von 3 mM K^+ bei -100 mV. Das Nernstpotential verschiebt sich ebenfalls bei Erhöhung der externen K^+ -Konzentration zu positiveren Werten (Tab. 3.3.). Entsprechend der Verschiebung des Umkehrpotentials konnte der den Auswärtsstrom verursachende Ionenkanal als Kaliumkanal identifiziert werden.

	3 mM K ⁺	30 mM K ⁺	90 mM K ⁺
U_{rev}	-52 mV	-25 mV	-7 mV
E_K	-100 mV	-41 mV	-13 mV

Tab. 3.3. Umkehrspannungen (U_{rev}) und Nernstpotentiale für Kalium (E_K) des Auswärtsstromes von SuK I-Protoplasten in Abhängigkeit von der externen K⁺-Konzentration.

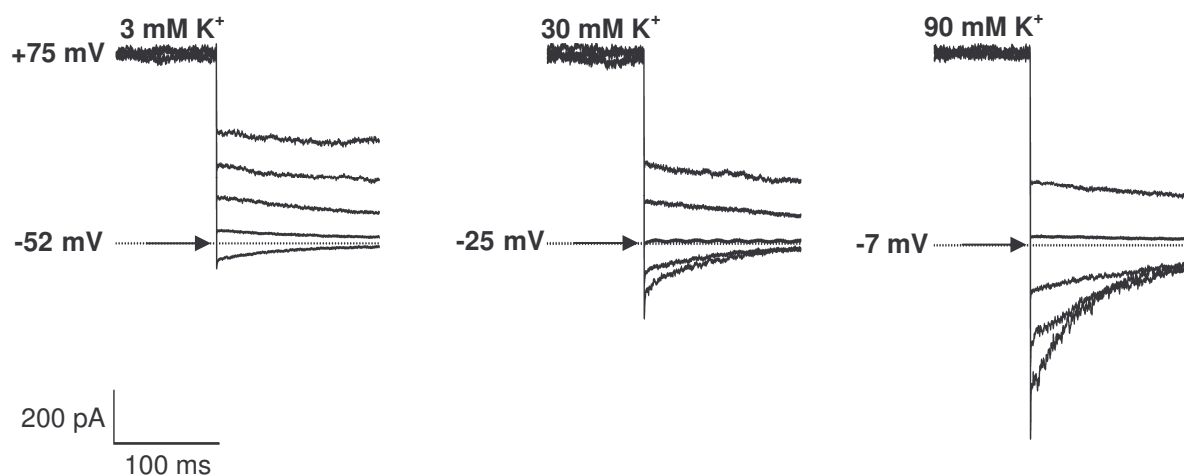


Abb. 3.14. Bestimmung des Umkehrpotentials der Auswärtsströme bei verschiedenen externen Kaliumkonzentrationen

Die Abbildung zeigt, von links nach rechts, drei Doppelspannungspulse bei einem Kaliumgehalt in der Badlösung von 3 mM, 30 mM und 90 mM K⁺. Ausgehend von einem Vorpuls von +75 mV wurden Testspannungen von +15 mV bis -65 mV appliziert. Die Nullstromspannungen (gepunktete Linie) zeigen die Umkehrspannung in mV und sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Zur Charakterisierung der Regulation der K⁺-Abgabekanäle wurden zusätzlich Einfachspannungspulseexperimente an SuK I-Protoplasten in Badlösung KG 3 und KG 30 durchgeführt. Aus den Folgepulsen von drei Protoplasten wurde die relative Offenwahrscheinlichkeit $rel. P_o$ (Abb. 3.15.) und damit verbunden das halbmaximale Aktivierungspotential $U_{1/2}$ bestimmt (Langer et al., 2002). Dabei verschob sich $U_{1/2}$ bei Erhöhung der externen Kaliumkonzentration von 3 auf 30 mM K⁺ um ~ 19 mV (von -6,1 mV \pm 3 mV nach 12,9 mV \pm 1,7) zu positiveren Potentialen (Abb. 3.15.). Das Elementarladungäquivalent (z_g) betrug für KG 3 = 1,6 (\pm 0,2) und für KG 30 = 2,0 (\pm 0,2). Das halbmaximale Aktivierungspotential $U_{1/2}$ verhielt sich bei Erhöhung der externen K⁺-

Konzentration genauso wie die Umkehrspannung U_{rev} , die sich ebenfalls zu positiveren Membranspannungen verschob. Dieses Kanalverhalten deutete darauf hin, dass mit zunehmender extrazellulärer K^+ -Konzentration die Membran stärker depolarisiert werden musste, um die auswärts-gerichteten Kaliumkanäle zu aktivieren.

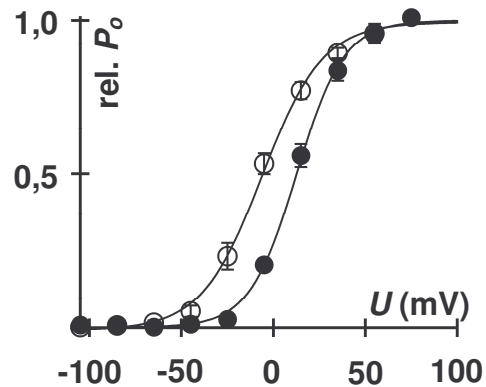


Abb. 3.15. Spannungsabhängigkeit der auswärts-gerichteten Ionenströme von SuK I-Protoplasten

Die relative Offenwahrscheinlichkeit (rel. P_o) des auswärts-rektifizierenden Ionenkanals wurde in KG 3 (\circ) und KG 30 (\bullet) ermittelt und als Funktion der Spannung dargestellt. Die Datenpunkte wurden mit einer Boltzmannfunktion beschrieben (durchgezogene Linie). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung ($n = 3$).

Da *in vitro* Messungen von PTORK in *Xenopus*-Oozyten sensitiv auf Änderungen des pH-Wertes reagierten, sollte dieses Merkmal auch *in vivo* an SuK II Protoplasten untersucht werden. Dazu wurden die Gleichgewichtsströme (I_{SS}) unter Standardbedingungen mit einem externen Kaliumgehalt von 30 mM und einem pH-Wert von 5,6 ($n = 3$) sowie unter Bedingungen, bei denen der pH-Wert der externen Lösung auf 7,4 angehoben wurde ($n = 3$), ermittelt. Die Gegenüberstellung der normierten Strom-Spannungskennlinien (Abb. 3.16.) der aufgezeichneten Gleichgewichtsströme zeigte keinen Einfluss des externen pH-Wertes auf die Ionenströme. Die *in vitro* Strommessungen zeigten jedoch mit dem Anheben des externen pH-Wertes von pH 5,6 auf pH 7,4 eine Zunahme des auswärts-gerichteten Ionenstroms, weshalb die in Suspensionskulturprotoplasten gefundenen auswärts-gerichteten Kaliumströme abschließend nicht eindeutig PTORK zuzuordnen waren.

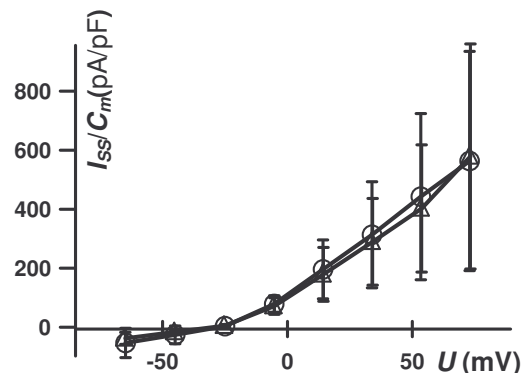


Abb. 3.16. Auswirkung des externen pH-Wertes auf die auswärts-gerichteten Ionenströme von SuK II-Protoplasten.

Mittelwerte von Gleichgewichtsströmen, die in der Standardbadlösung mit pH 5,6 (○ = KG 30, n = 3) und Mittelwerte von Gleichgewichtsströmen die bei pH 7,4 (△ = KG 30 – pH 7,4; n = 3) registriert wurden. Die Standardabweichung der Mittelwerte ist als Fehlerbalken dargestellt.

3.2.3 Lichtmikroskopische Untersuchung von Suspensionskulturzellen.

Ein möglicher Einfluss der unterschiedlichen Kaliumversorgung der Suspensionskultur (siehe Kapitel 2.1.2) auf die Anatomie der Zellen wurde lichtmikroskopisch an Kalli aus Kulturen mit guter und schlechter Kaliumversorgung untersucht. Die Suspensionskultur wurde zunächst mit SuK I (20 mM K⁺) versorgt. Ein Teil dieser Kultur wurde vor den Untersuchungen 2 Monate lang mit SuK III (0,15 mM K⁺) versorgt. 1 µm starke Schnitte der durchgehend SuK I-versorgten Kalli zeigten eine weitgehend gleichförmige Anordnung von rundlichen bis ovalen Zellen über die gesamte Schnittfläche (Abb. 3.17. links). Die SuK III-Kalli waren hingegen deutlich von ungleichmäßig geformten Zellen geprägt (Abb. 3.17. rechts). Zum einen enthielten sie Bereiche mit Zellen, die sich in Hinblick auf Größe, Form und Anordnung nicht von den Zellen der SuK I-Kalli unterschieden. Andere Bereiche enthielten jedoch sehr viel größere, lang gestreckte oder rundliche Zellen. Demzufolge beeinflusste die K⁺-Versorgung des Gewebes nicht nur die elektrischen Eigenschaften der Zellen, sondern auch ihre Morphologie

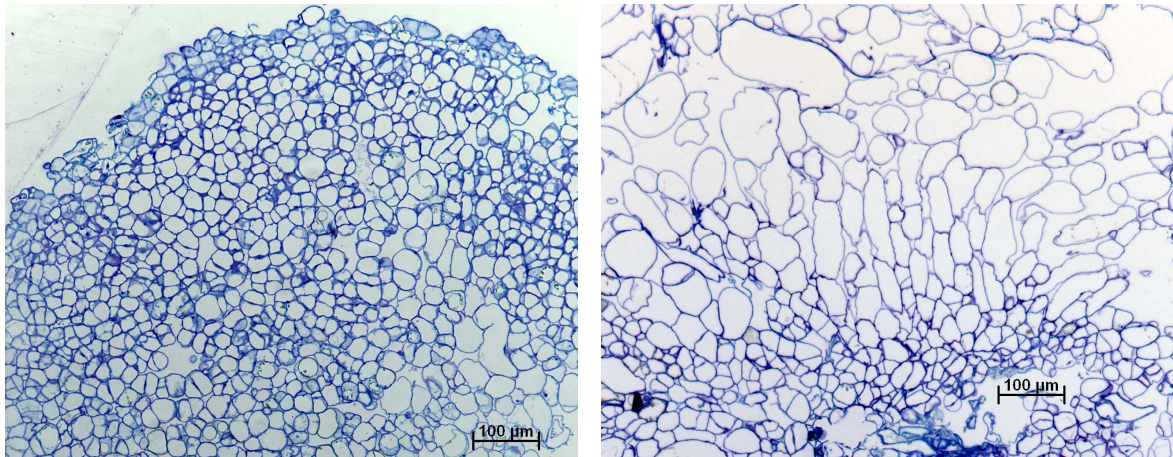


Abb. 3.17. Einfluss der Kaliumernährung auf die Morphologie der Suspensionskulturzellen

links: Ein Kallus aus SuK I-Suspensionskultur (20 mM K^+) zeigt ein gleichförmiges Erscheinungsbild mit annähernd gleich großen Zellen.

rechts: Ein Kallus aus SuK III- Suspensionskultur ($0,15 \text{ mM K}^+$) wird hingegen aus sehr unterschiedlich geformten Zellen aufgebaut.

3.2.4 EDX-Analyse zum Einfluss der Kaliumernährung auf den K^+ -Gehalt der Zellen

Mittels Röntgenmikroanalyse (EDXA) wurde am Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht, inwieweit die Kaliumversorgung der Suspensionskultur auch den Kaliumgehalt des Kallusgewebes beeinflusste. Zu diesem Zweck wurde der relative Kaliumgehalt innerhalb und außerhalb einzelner Zellen von zwei Monate lang mit SuK I (20 mM K^+) oder SuK III ($0,15 \text{ mM K}^+$) versorgten Kalli (siehe Kapitel 2.1.2) bestimmt. Die Auswertung (siehe Kapitel 2.5.2) zeigte für beide Kulturbedingungen im Vergleich zum Apoplasten einen geringfügig höheren relativen Kaliumgehalt innerhalb der Zellen (Abb. 3.18. A und B, $n = 5$). Der relative Kaliumgehalt der besser mit Kalium versorgten Kultur lag im Mittel leicht über der mit weniger Kalium versorgten Kultur (Abb. 3.18. C). Zusätzlich wurden Häufigkeitsverteilungen erstellt. Die Häufigkeitsverteilung des relativen Kaliumgehaltes der SuK III-Kultur (wenig Kalium) zeigte ihr Maximum bei einem relativen Kaliumgehalt von 1 (Abb. 3.18. D). Für die Häufigkeitsverteilung der SuK I-Kultur (viel Kalium) lag das Maximum des relativen Kaliumgehaltes bei 4 (Abb. 3.18. E). Die Verschiebung des Maximums verdeutlichte, dass das Kallusgewebe mit besserer Kaliumernährung auch höhere Kaliumgehalte gespeichert hatte.

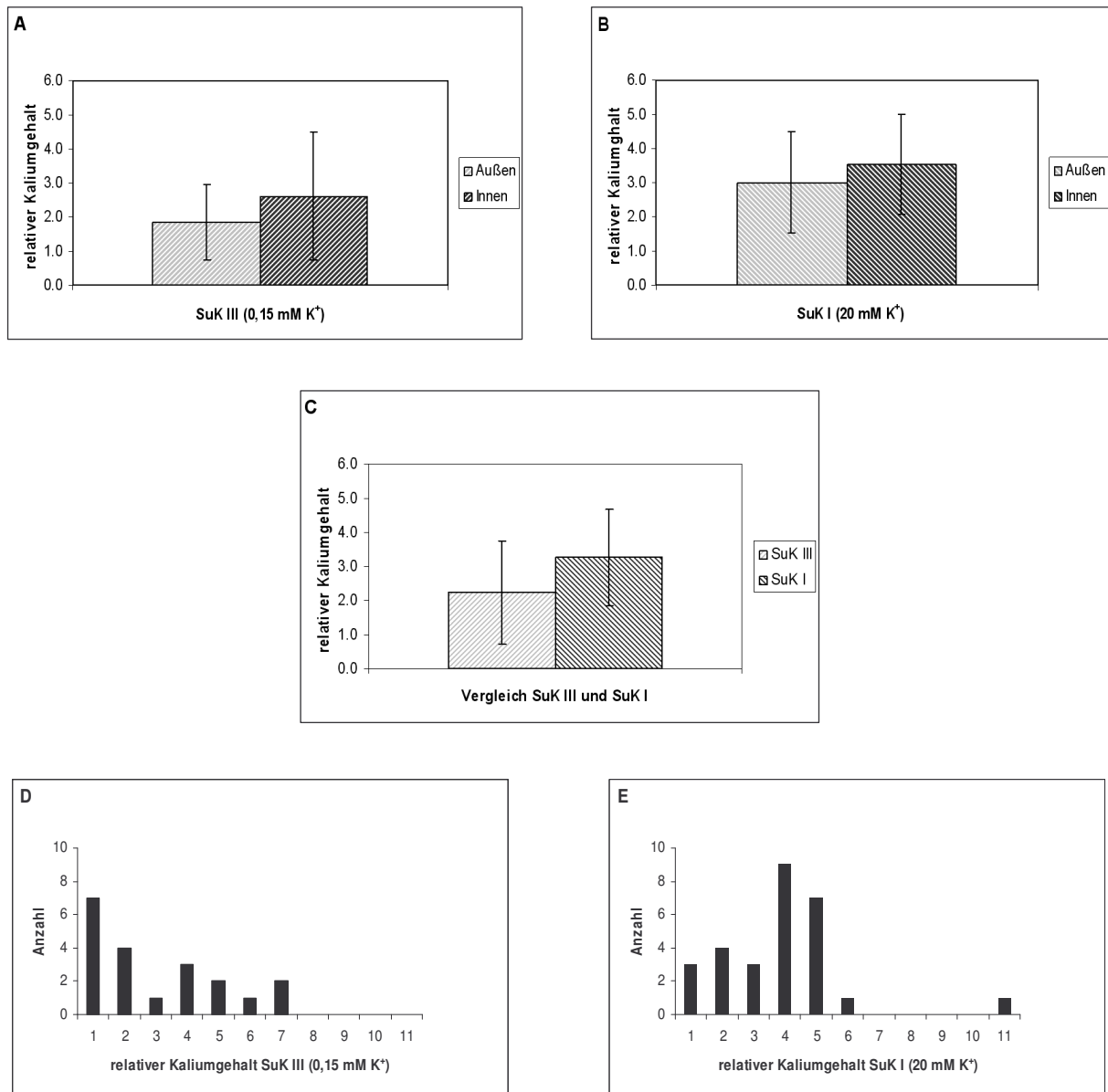


Abb. 3.18. Einfluss der Kaliumversorgung auf den relativen Kaliumgehalt des Kallusgewebes.

A, B: Es ist das Verhältnis von ‚Kaliumpeak‘ zum ‚unspezifischen Hintergrund‘ von je fünf EDXA Messungen innerhalb (Innen) und außerhalb (Außen) einzelner Zellen aus mit SuK I oder mit SuK III versorgten Suspensionskulturen (Mittelwerte und Standardabweichungen) gezeigt.

C: Gegenüberstellung der ‚Peak : Hintergrund-Verhältnisse‘ aus A und B (interne und externe Messungen aus A bzw. B wurden gemittelt).

D, E: Häufigkeitsverteilung aller EDXA-Messungen von mit SuK III ($n = 20$), und SuK I-versorgter ($n = 28$) Suspensionskultur.

3.3 Untersuchungen an Knospenprotoplasten

3.3.1 Protoplastenisolation aus Knospen

Die Knospenprotoplasten wurden aus Knospen von einjährigen Zweigen einer dreijährigen im Freiland wachsenden Pappel isoliert, welche drei verschiedenen Knospenstadien zugeordnet worden waren (siehe Kapitel 2.2.3). Erste Knospenprotoplasten wurden im Winter/Frühjahr 2003 mit einem Isolationsprotokoll isoliert, das von dem in Kapitel 2.2.3 zur Isolation von Knospenprotoplasten beschriebenen Protokoll abwich. 2003 wurden die Protoplasten ausschließlich von, dem dritten Stadium zuzuordnenden, stark geschwollenen Knospen mit einer Gewebe-Osmolalität von ca. 350 mosm/kg isoliert und nicht für elektrophysiologische Untersuchungen verwendet. Für die Isolation wurde das Knospengewebe für eine halbe Stunde in Enzymlösung E1 (siehe Kapitel 2.2.5) der Osmolalität $\pi = 547$ mosm/kg unter Schütteln mit 90 rpm bei 30°C im Wasserbadschüttler inkubiert. Anschließendes Waschen erfolgte mit Waschlösung der Osmolalität $\pi = 337$ mosm/kg. Zentrifugiert wurde wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben bei $107 \times g$ für nur 10 min anstelle von 12 min. Eine 2003 außerdem durchgeführte Untersuchung der Gewebe-Osmolalität (mosm/kg) von Knospen zeigte mit voranschreitender Knospenentwicklung eine deutliche Abnahme der Werte. So hatte das Knospengewebe mit beginnendem Knospenschwellen zu Beginn des zweiten Entwicklungsstadiums eine Osmolalität von ca. 800 mosm/kg. Als die Knospen zu Beginn des dritten Stadiums bereits stark geschwollen waren, war die Osmolalität auf ca. 350 mosm/kg abgesunken. Diese Beobachtung bestätigte sich bei der Isolation von Knospenprotoplasten im Winter/Frühjahr 2004. Unter Berücksichtigung der entwicklungspezifischen Gewebe-Osmolalität wurde ab 07.02.04 versucht mit der oben beschriebenen Isolationsmethode bereits aus Knospen des ersten Stadiums Protoplasten zu isolieren. Da aber 2004 mit dieser Methode keine Protoplastenisolation mehr möglich war, wurde das Protokoll solange angepasst bis mit dem in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Protokoll von 10.03.04 bis 23.04.04 erfolgreich Knospenprotoplasten isoliert werden konnten. Entsprechend der sich mit der Knospenentwicklung verändernden Gewebe-Osmolalität wurde auch die Osmolalität der für die Isolation verwendeten Enzymlösung E3 angepasst. So dass vom 10.03.04 bis 13.04.04 mit E3 der Osmolalität $\pi = 795$ mosm/kg aus Knospen des ersten und zweiten Stadiums Protoplasten isoliert wurden. Vom 14.04.04. bis 23.04.04 wurden mit E3 der Osmolalität $\pi = 548$ mosm/kg Protoplasten aus Knospen des fortgeschrittenen zweiten und des dritten Stadiums gewonnen. Die Entwicklung der Knospen spiegelte sich außerdem in der Zusammensetzung der aus den Knospen gewonnenen Protoplastensuspension wieder.

Diese wurden zu Beginn der Versuchsreihe von sehr kleinen Protoplasten dominiert, die keine sichtbare Vakuole hatten und dicht mit kleinen Chloroplasten gefüllt waren (Typ A, *Abb. 3.19. A*). In vereinzelt Fällen wurden auch kleine Protoplasten beobachtet, die neben Chloroplasten außerdem eine Vakuole besaßen. Mit voranschreitendem Schwellen der Knospen wurden größere Protoplasten isoliert. Die Suspension enthielt mit zunehmender Häufigkeit Protoplasten mit Vakuole (Typ B, *Abb. 3.19. B*). Des Weiteren wurden mit voranschreitender Knospenentwicklung auch Protoplasten gefunden, die transparent waren und größere Chloroplasten enthielten (Typ C, *Abb. 3.19. C*).

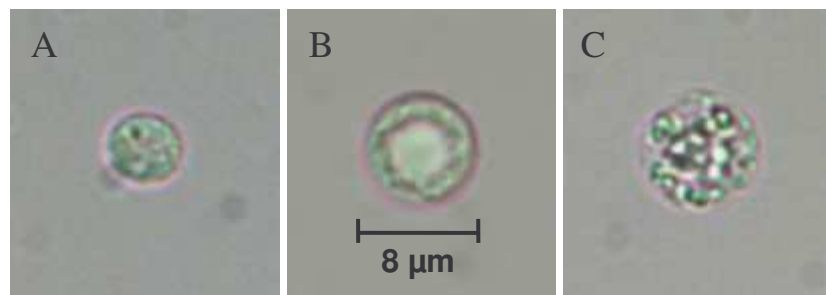


Abb. 3.19. Isolierung verschiedener Knospenprotoplasten im Versuchsverlauf

A: kleiner Protoplastentyp ohne Vakuole, mit vielen dicht gedrängten kleinen Chloroplasten (Typ A). B: Typ mit Vakuole (Typ B). C: transparenter Typ mit großen, deutlich sichtbaren Chloroplasten (Typ C).

Der Beginn der Veränderungen in der Zusammensetzung der Protoplastensuspension wurde bereits am 28.03.04 beobachtet, als mit der vor dem 14.04.04 verwendeten Enzymlyösung hoher Osmolalität aus Knospen des zweiten Entwicklungsstadiums Protoplasten isoliert wurden. Diese Suspensionen enthielten neben dem kleinen Protoplastentyp A schon einzelne Protoplasten vom Typ C (*Abb. 3.20*). Nach dem 14.04.04 bei niedriger Osmolalität aus geschwollenen Knospen mit leicht zu entfernenden Knospenschuppen (Ende 2. Stadium) gewonnene Protoplastensuspensionen enthielten überwiegend große Protoplasten vom Typ C mit großen sich deutlich voneinander abhebenden Chloroplasten.

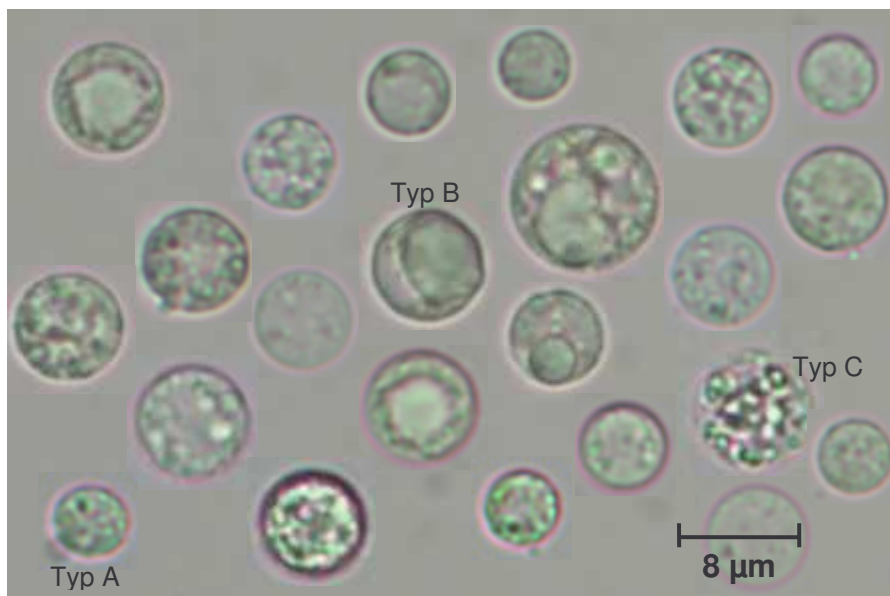


Abb. 3.20. Knospenprotoplasten Isolation vom 28.03.2004

Die am 28.03.2004 aus Knospen des zweiten Stadiums isolierte Protoplastensuspension enthält noch den Protoplastentyp A, sowie den Typ B und bereits vereinzelt schon den Typ C.

Die kontinuierliche Zunahme der Protoplastendurchmesser während der gesamten Versuchsreihe konnte mit Hilfe der durchgeführten Patch-Clamp-Experimente bestätigt werden. Für jeden der untersuchten Protoplasten wurde, wie in Kapitel 2.3.9 beschrieben, der Durchmesser ermittelt und getrennt nach der zur Isolation verwendeten Osmolalität wurden Durchmesserermittelwerte gebildet. Die Gegenüberstellung der beiden Mittelwerte vor und nach dem 14.04.2004 (*Abb. 3.21.*) zeigte deutlich größere Durchmesser nach dem 14.04.2004. So betrug der Durchmesser aller vor dem 14.04.2004 untersuchten Protoplasten im Mittel $8,6 \mu\text{m}$ ($n = 15$) und der Standardfehler $0,56$. Darüber hinaus lag das Maximum der Durchmesserhäufigkeitsverteilung mit $9 \mu\text{m}$ nahe dem Mittel von $8,6 \mu\text{m}$. Der kleinste ermittelte Durchmesser der Verteilung maß $5 \mu\text{m}$ und der größte $12 \mu\text{m}$. Der Durchmesserermittelwert aller nach dem 14.04.2004 untersuchten Knospenprotoplasten betrug $14,5 \mu\text{m}$ ($n = 24$) und der Standardfehler $0,67$. Der kleinste ermittelte Durchmesser maß $10 \mu\text{m}$ und der größte $23 \mu\text{m}$. Das Maximum der Häufigkeitsverteilung der Durchmesser lag mit $14 \mu\text{m}$ ebenfalls nahe dem Durchmesserermittelwert.

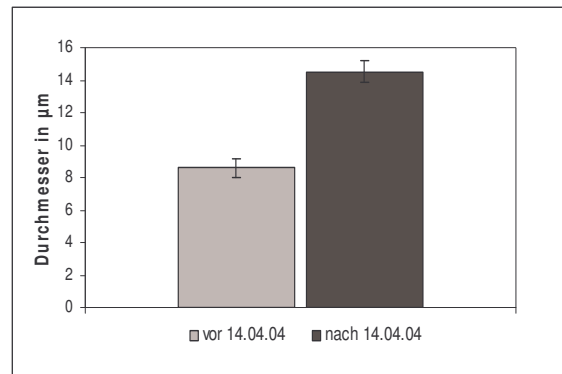


Abb. 3.21. Mittlerer Durchmesser von Knospenprotoplasten vor und nach dem 14.04.2004.

Der Mittelwert vor dem 14.04.2004 enthält Durchmesser von Protoplasten die in Lösungen hoher Osmolalität ($\pi = 790 \text{ mosm/kg}$) untersucht wurden. Der Mittelwert nach dem 14.04.2004 enthält Durchmesser von Protoplasten die in Lösungen niedrigerer Osmolalität ($\pi = 480 \text{ mosm/kg}$) untersucht wurden. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

3.3.2 Elektrophysiologische Untersuchungen an Knospenprotoplasten

Vom 10.03.2004 bis 23.04.2004 wurde auch der Einfluss der Knospenentwicklung auf die Ionenströme von Knospenprotoplasten untersucht. In dem genannten Zeitraum konnte der Übergang von der noch geschlossenen, ausgereiften Knospe bis zur Knospenöffnung beim Abfallen der Knospenschuppen erfasst werden. Bis zum 13.04.04 (Stadium 2) wurden für die Patch-Clamp-Messungen, entsprechend der in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Isolationsbedingungen, Lösungen mit einer Osmolalität von $\pi = 790 \text{ mosm/kg}$ verwendet. Mit zunehmendem Schwellen der Knospen wurde es immer schwieriger, den für die Patch-Clamp-Messungen erforderlichen hochohmigen Abdichtwiderstand zu erzielen. Deshalb mussten die Messbedingungen ab dem 14.04.2004 optimiert werden. Für die Messungen wurden Protoplasten verwendet, die in Enzymlösung niedrigerer Osmolalität isoliert worden waren. Außerdem wurde die Osmolalität der Messlösungen auf 480 mosm/kg herabgesetzt. Vor dem 14.04.04 (Stadium 1 und 2) wurden Protoplasten vom Typ A und B, und nach dem 14.04.04 (Stadium 2 und 3) vom Typ B und C untersucht (siehe Kapitel 3.3.1). Zudem wurden die Knospenprotoplasten für den gesamten Zeitraum mit Einfach- und Doppelspannungspulsprotokollen (siehe Kapitel 2.3.8) in der Ganzzelleableitung (siehe Kapitel 2.3.2) unter den in Tabelle 3.4. aufgeführten Lösungsbedingungen untersucht.

	Untersuchungszeitraum	
	10.03.2004 - 13.04.2004	14.04.2004 - 23.04.2004
Pipettenlösung KG 150	X	X
Badlösung KG 3 – 20 Ca	X	
Badlösung KG 30 – 20 Ca		X
Lösungswechsel auf		
Badlösung KG 3	X	
Badlösung KG 30		X

Tab. 3.4. Lösungsbedingungen, unter denen die Ganzzelleableitungen an Knospenprotoplasten durchgeführt wurden.

Als Pipettenlösung wurde im gesamten Untersuchungszeitraum KG 150 mit entsprechend angepasster Osmolalität verwendet. Als Badlösung wurde zunächst zur Ausbildung des hohen Abdichtwiderstandes KG 3 – 20 Ca bzw. KG 30 – 20Ca mit 20 mM CaCl_2 verwendet. Danach wurde die Badlösung gegen KG 3 oder KG 30 mit 1 mM CaCl_2 ausgetauscht.

Wie Tabelle 3.4. zeigt, wurden die Untersuchungen vom 10.03.2004 - 13.04.2004 nach Einstellung des Ganzzelleabgleichs mit 3 mM K^+ durchgeführt. Ab 14.04.2004 - 23.04.2004 wurde KG 30 verwendet. Entsprechend der verwendeten K^+ -Konzentration in der externen Lösung wurden die applizierten Testspannungen bei der Datenauswertung um das jeweilige Grenzflächenpotential (U_{LJP}) korrigiert. Vor dem 14.04.04 hatte U_{LJP} aufgrund der niedrigen externen K^+ -Konzentration den Wert -12. Nach dem 14.04.04 hatte U_{LJP} bei erhöhter K^+ -Konzentration den Wert -5 mV. Für den gesamten Untersuchungszeitraum zeigten die bei depolarisierenden Membranspannungen durchgeführten Ganzzelleableitungen spannungsabhängige auswärts-gerichtete Ionenströme (Abb. 3.22.) mit sigmoider Aktivierungskinetik (Abb. 3.22. C) deren Gleichgewichtspotential I_{SS} bereits nach 750 ms vollständig erreicht war. Die gemessenen Ionenströme glichen den PTORK-Messungen in *Xenopus*-Oozyten (Langer et al., 2002). Zudem zeigte der Vergleich der Stromspuren vor und nach dem 14.04.04 eine deutliche Zunahme der gemessenen Stromamplituden nach dem 14.04.04 (Abb. 3.22. A, B).

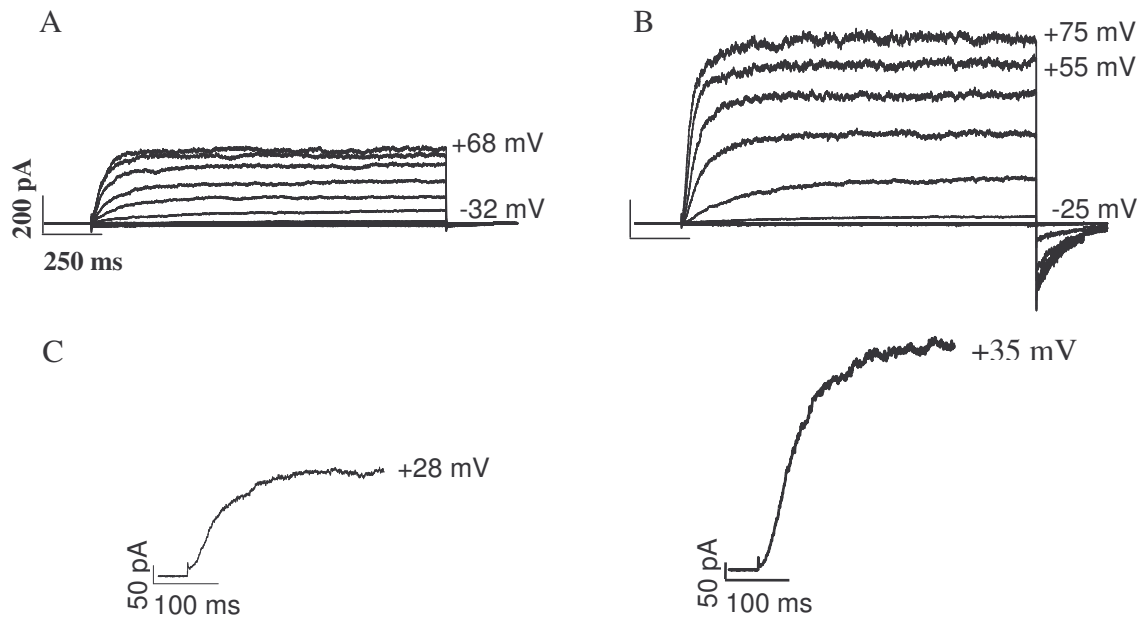


Abb. 3.22. Knospenprotoplasten zeigen auswärts-gerichtete Ionenströme.

Stromantworten auf ein Einfachspannungspulsprotokoll. Ausgehend von einer Haltespannung von -72 mV (A) (bzw. -65 mV (B)) wurden Testpulsspannungen im Bereich von $+68$ mV bis -232 mV (bzw. $+75$ mV bis -145 (B)) in 20 mV-Schritten appliziert. Die gemessene Stromstärke (pA) ist gegen die Messdauer aufgetragen. Beide Stromantworten sind gleich skaliert.

A: zeigt den Ionenausstrom eines vor dem 14.04.04 isolierten Protoplasten bei Testspannungen von $+68$ mV bis -232 mV. Die Kaliumkonzentration in der Badlösung betrug 3 mM K^+ .

B: zeigt den Ionenausstrom eines nach dem 14.04.04 isolierten Protoplasten bei Testspannungen von $+75$ mV bis -145 mV. Die Kaliumkonzentration in der Badlösung betrug 30 mM K^+ .

C: Die vergrößerten Stromspuren aus A und B verdeutlichen das sigmoide Aktivierungsverhalten des untersuchten Ionenstroms.

Wurde die Dauer der Testspannung von $1,5$ s auf 10 s verlängert, konnte bei der Testspannung von $+68$ mV vor bzw. $+75$ mV nach dem 14.04.04 bei je einer Messung eine schwache zeitabhängige Inaktivierung des Ionenstroms beobachtet werden (Abb. 3.23). *Xenopus*-Oozyten, die den Kaliumkanal PTORK exprimierten, zeigten hingegen keine Inaktivierung des Ionenstroms (Langer et al., 2002). Diese Beobachtung entsprach dem Ergebnis aus Untersuchungen des zu PTORK homologen Kaliumkanals GORK⁵⁶ in *Xenopus*-Oozyten und an Wurzelhaarprotoplasten von *Arabidopsis thaliana* (Ivashikina et al., 2001), der im Gegensatz zu den *in vitro* Daten *in vivo* ebenfalls eine Inaktivierung zeigte.

⁵⁶ engl. guard cell outward rectifying K^+ channel

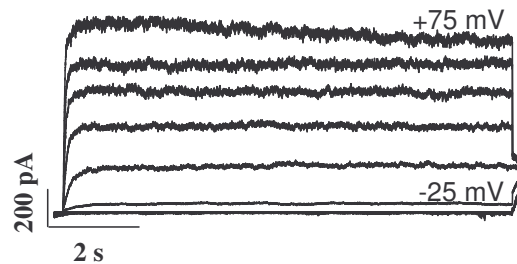


Abb. 3.23. Inaktivierung des auswärts-gerichteten Ionenstroms bei verlängerten Testpulsen.

Die Stromspuren zeigen die Stromantwort in pA eines nach dem 14.04.04 isolierten Protoplasten auf ein Einfachspannungspulsprotokoll mit einer Testpulslänge von 10 s. Die Haltespannung betrug -65 mV. Testpulsspannungen im Bereich von +75 mV bis -125 mV wurden in 20 mV-Schritten appliziert. Die Kaliumkonzentration in der Badlösung betrug 30 mM K^+ . Die Stromspur bei einer Testspannung von +75 mV zeigt eine schwache zeitabhängige Inaktivierung des gemessenen Stromflusses.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den auswärts-gerichteten Ionenströmen um Kaliumströme handelte, wurde ihre Empfindlichkeit gegenüber dem spezifischen K^+ -Kanal-Blocker Ba^{2+} überprüft. Bei je einem Protoplasten vor und nach dem 14.04.04 wurde deshalb die in Tabelle 3.4. aufgeführte Messreihe um einen zweiten Lösungswechsel mit KG 3 – 10 Ba bzw. KG 30 – 10 Ba ergänzt. Die Zugabe von 10 mM des Kaliumkanal-Blockers Barium zur jeweiligen Standardbadlösung führte in beiden Fällen zu einer Reduktion des gemessenen Ionenstroms (*Abb. 3.24*). Nach Rücktausch gegen die Standardbadlösung konnte wieder der ungeblockte Ionenstrom gemessen werden (nicht gezeigt). Das unter dem Einfluss von 10 mM Ba^{2+} beobachtete reversible Blocken der Ionenströme bestätigte die Annahme, dass es sich um K^+ -Kanal vermittelte Ströme handelte.

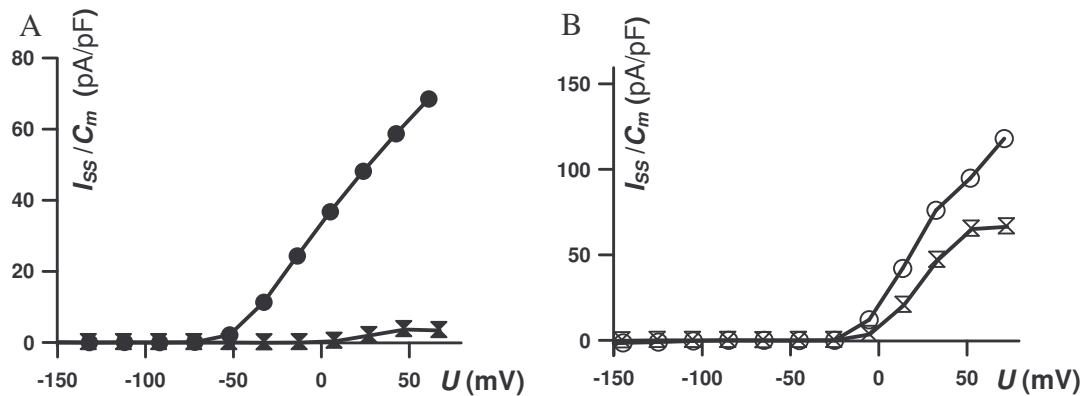


Abb. 3.24. Bariumblock

A und B zeigen auf die langsame Kapazität (C_m) normierte Gleichgewichtsströme (I_{ss}), die gegen die Messspannung (U) aufgetragen sind. Die geschlossenen Symbole in A beziehen sich dabei auf eine Messung vor dem 14.04.04 und die offenen Symbole in B auf die Messung nach dem 14.04.04.

A stellt die Gleichgewichtsströme in Standardbadlösung mit 3 mM K^+ (\bullet = KG 3) den Gleichgewichtsströmen mit zusätzlichen 10 mM $BaCl_2$ in der Badlösung (\blacktriangledown = KG 3 – 10 Ba) gegenüber. B zeigt dieselbe Versuchsanordnung nach dem 14.04.04 mit KG 30 als Standardlösung. (\circ = KG 30; \triangleright = KG 30 – 10 Ba).

Um den, den Ionenströmen zugrunde liegenden Kanaltyp näher zu bestimmen wurde anhand der aufgezeichneten Doppelspannungspulsexperimente das Umkehrpotential ermittelt. Entsprechend der externen Kaliumkonzentration wurde dieses für 3 mM K^+ aus den Untersuchungen vor dem 14.04.04 und für 30 mM K^+ aus denen nach dem 14.04.04 bestimmt, um einen Hinweis auf das für Kaliumkanäle charakteristische kaliumabhängige Verhalten zu bekommen. Vor dem 14.04.04 isolierte Protoplasten hatten dabei im Mittel ein Umkehrpotential von $-75,7 \pm 4,9$ mV ($n = 3$) während nach dem 14.04.04 untersuchte Protoplasten mit $-27,2 \pm 6,2$ mV ($n = 5$) ein deutlich positiveres Umkehrpotential besaßen. Demnach verschob sich das Umkehrpotential (U_{rev}) bei einer 10-fachen Erhöhung der externen K^+ -Konzentration um 48,5 mV in positiver Richtung. Anhand dieses kaliumabhängigen Verhaltens konnte die durch den Bariumblock bestärkte Annahme, dass es sich um einen von einem Kaliumkanal verursachten Kaliumstrom handelte, bestätigt werden. Zur Überprüfung des kaliumabhängigen Verhaltens des Umkehrpotentials (U_{rev}) wurden die Werte des Nernstpotentials für Kalium (E_K) herangezogen. Unter den Versuchsbedingungen mit einer internen Kaliumkonzentration von 150 mM K^+ und einer externen Kaliumkonzentration von 3 mM K^+ betrug dieses $-100,2$ mV. Bei gleicher interner Kaliumkonzentration und 30 mM externem K^+ betrug E_K $-41,2$ mV. Unter diesen Bedingungen verschob sich E_K bei der 10-fachen Erhöhung des K^+ -Gradienten also um

59 mV. Die gegenüber E_K geringere Verschiebung des Umkehrpotentials um nur 48,5 mV wurde in der graphischen Gegenüberstellung (Abb. 3.25.) durch ein Auseinanderdriften der beiden Ausgleichgeraden sichtbar. Dieses von den theoretischen Werten abweichende Verhalten des Umkehrpotentials deutete darauf hin, dass es sich zwar um einen K^+ -Kanal handelte, der aber nicht ausschließlich für K^+ permeabel war.

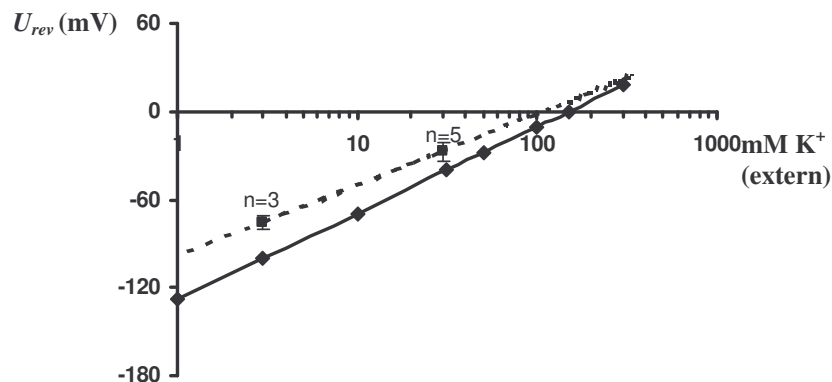


Abb. 3.25. Umkehrpotentiale und Nernspotentiale bei verschiedenen externen Kaliumgehalten

Die vor dem 14.04.04. (K^+ 3mM, $n = 3$) und nach dem 14.04.04 (K^+ 30 mM, $n = 5$) ermittelten Umkehrpotentiale (U_{rev}) sind gegen die jeweiligen externen K^+ -Konzentrationen aufgetragen. Die experimentell bestimmten U_{rev} (■) stimmen nicht vollkommen mit den Nernspotentialen für Kalium (E_K ◆) überein. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler

Um zusätzlich Informationen über das kaliumabhängige Aktivierungsverhalten des Kaliumkanals zu erhalten, wurden die Daten der Gleichgewichtsströme (I_{SS}) aus Einzelspannungspulsen mit einer Pulslänge von 1,5 s ausgewertet. Zum einen wurden dazu vor dem 14.04.04 unter Einfluss von 3 mM externem Kalium erzeugte I_{SS} gemittelt ($n=3$; externe Lösung KG 3, Osmolalität $\pi = 794$ mosm/kg). Entsprechend wurde mit nach dem 14.04.04 unter Einfluss von 30 mM externem Kalium gemessenen I_{SS} verfahren ($n=6$; externe Lösung KG 30; Osmolalität $\pi = 480$ mosm/kg). Zum anderen konnten die Gleichgewichtsströme eines einzelnen, vor dem 14.04.04 isolierten Protoplasten bei 3 mM und 30 mM externem K^+ und identischer Osmolalität der beiden Lösungen ausgewertet werden. Der Vergleich der Strom-Spannungskennlinien I/U der Mittelwerte vor und nach dem 14.04.04 bei 3 mM bzw. 30 mM K^+ zeigte eine kaliumabhängige Verschiebung des Aktivierungspotentials des Ionenkanals zu einer positiveren Membranspannung (Abb. 3.26. A). Das gleiche kaliumabhängige Verhalten zeigte die Einzeluntersuchung vor dem 14.04.04

(ohne Abbildung). Da hierbei externe Lösungen gleicher Osmolalität verwendet wurden, konnte bei den Messungen vor und nach dem 14.04.04 ein Einfluss der Osmolalität auf die Verschiebung der Aktivierungsschwelle ausgeschlossen werden. Dennoch verliefen die auf die Membrankapazität (C_m) normierten Strom-Spannungskennlinien in *Abbildung 3.26. A* aufgrund des unterschiedlichen Messzeitpunktes bei 3 mM und 30 mM nicht parallel. Um die kaliumabhängige Verschiebung des Aktivierungspotentials zu verdeutlichen, wurden die Strom-Spannungskennlinien bei 3 mM externem K^+ vor dem 14.04.04, und bei 30 mM K^+ nach dem 14.04.04, jeweils auf den maximalen Strom bei +65 mV normiert (*Abb. 3.26. B*). Anhand von *Abbildung 3.26 B* wurde eine Aktivierungsschwelle von ~ -75 mV bei 3 mM und ~ -25 mV bei 30 mM externem K^+ bestimmt. Beim Vergleich der graphisch ermittelten Werte der Aktivierungsschwelle stimmten diese annähernd mit dem Umkehrpotential von $-75,7$ mV bei 3 mM K^+ und $-27,2$ mV bei 30 mM K^+ überein.

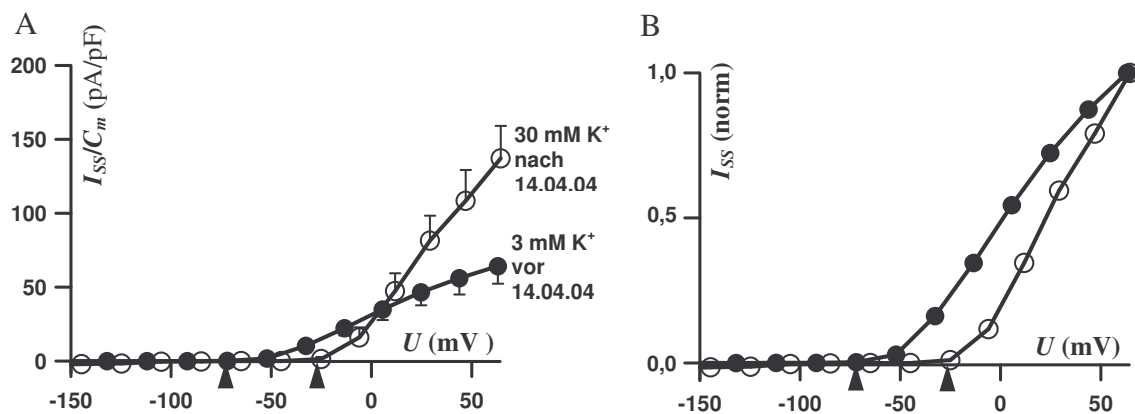


Abb. 3.26. Kaliumabhängigkeit des Aktivierungspotentials.

A zeigt gegen die Messspannung (U) aufgetragene Mittelwerte und Standardfehler der auf die langsame Kapazität (C_m), normierten Gleichgewichtsströme (I_{SS}): offene Kreise symbolisieren die Gleichgewichtsstromdichten, die nach dem 14.04.04 (\circ ; 30 mM K^+ , $n = 6$) aufgezeichnet wurden. Geschlossene Kreise repräsentieren Gleichgewichtsstromdichten, die vor dem 14.04.04 (\bullet ; 3 mM K^+ , $n = 3$) gemessen wurden. Die Aktivierungsschwelle (\blacktriangle) der nach dem 14.04.04 in 30 mM externem K^+ gemessenen Auswärtsströme verschob sich zu positiveren Membranpotentialen.

B: die in A gezeigten Mittelwerte wurden hier anstelle auf (C_m), auf den Maximalwert bei +65 mV normiert.

Die Untersuchungen zur Kaliumabhängigkeit des Ionenkanals wurden durch Bestimmung der relativen Offenwahrscheinlichkeit (rel. P_o) aus den Folgepulsen von vier nach dem 14.04.04 untersuchten Protoplasten ergänzt. Die auf den maximalen Wert bei 50 mV normierten

Einzelmessungen wurden mit einer Boltzmann-Verteilung beschrieben. Aus den einzelnen Parametern wurden das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung gebildet. Das halbmaximale Aktivierungspotential $U_{1/2}$ bei 30 mM externem K^+ -Gehalt betrug demnach $-0,5$ mV ($\pm 3,5$ mV), das Elementarladungsäquivalent z_g $-2,32$ ($\pm 0,27$). Für die graphische Darstellung (Abb. 3.27.) wurde der Mittelwert aller normierten Einzelmessungen mit der Boltzmann-Verteilung beschrieben. Die Parameterwerte lagen dabei mit $U_{1/2} = -0,73$ mV und $z_g = -2,28$ innerhalb der Streubreite der Standardabweichung. In der grafischen Darstellung der relativen Offenwahrscheinlichkeit (Abb. 3.27.) lag die Aktivierungsschwelle des Ionenkanals zwischen -40 und -50 mV. Dieses Ergebnis stimmte mit dem theoretischen Gleichgewichtspotential für Kalium $E_K = -41,2$ mV bei 30 mM externem und 150 mM internem K^+ -Gehalt überein. Daher konnte die Annahme, dass die Ionenströme von einem kaliumselektiven Ionenkanal verursacht wurden, zusätzlich bestätigt werden.

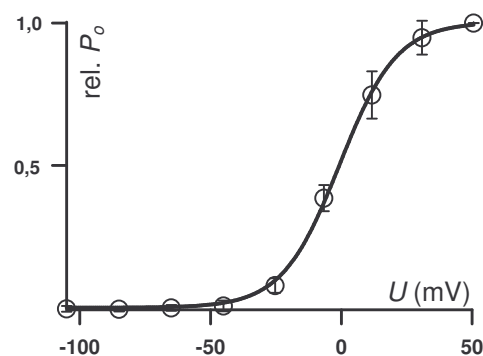


Abb. 3.27. Spannungsabhängige relative Offenwahrscheinlichkeit (rel. P_o)

Die Datenpunkte stellen Mittelwert und Standardabweichung von vier nach dem 14.04.04 isolierten Protoplasten dar, deren instantane Ströme auf den Maximalwert bei 50 mV normiert wurden. Der Kurvenverlauf wurde durch eine Boltzmann -Verteilung mit den Parametern $U_{1/2} = -0,73$ mV, $z_g = -2,28$ beschrieben (Linie).

Da sich PTORK *in vitro* pH-sensitiv verhielt sollten, wie zuvor die Suspensionskultur-Protoplasten (siehe Kapitel 3.2.2), nun auch die Knospenprotoplasten auf ein pH-Sensitives Verhalten des auswärts-gerichteten Ionenstroms untersucht werden. Bei einem nach dem 14.04.04 isolierten Protoplasten gelang ein zusätzlicher Austausch der Standardlösung KG 30 gegen KG 30 – pH 7,4. Der Vergleich der normierten Strom-Spannungskennlinie zeigte wie bei den Suspensionskultur-Protoplasten keine wesentliche Änderung des Auswärtsstroms bei Erhöhung des externen pH-Wertes von pH 5,6 auf pH 7,4 (Abb. 3.28.). Eine pH-abhängige Verschiebung des Aktivierungspotentials konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Da die

PTORK vermittelten *in vitro* Ströme aber bei Erhöhung des externen pH-Wertes von pH 5,6 auf pH 7,4 zunahm, deutete das beobachtete *in vivo* Verhalten nicht auf durch PTORK-Kanäle vermittelte Ströme der Knospenprotoplasten hin.

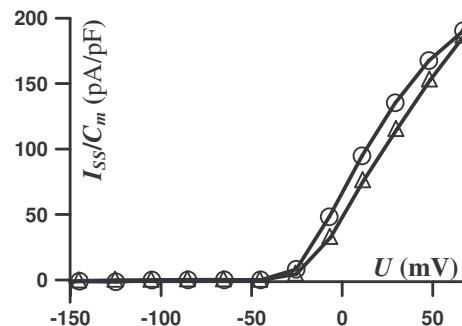


Abb. 3.28. Auswirkung des externen pH-Wertes auf die Auswärtsströme von Knospenprotoplasten

Runde Symbole repräsentieren die Gleichgewichtsströme, die in der Standardbadlösung mit pH 5,6 (○ = KG 30) aufgezeichnet wurden, während dreieckige Symbole Gleichgewichtsströme wiedergeben, die bei pH 7,4 (△ = KG 30 – pH 7,4) registriert wurden.

3.4 Untersuchungen an Wurzelprotoplasten

3.4.1 Isolation von Wurzelprotoplasten

Wurzelprotoplasten wurden enzymatisch aus neu gebildeten Wurzeln von Pappeln in aeroponischer Kultur isoliert (siehe Kapitel 2.2.4). Die Protoplasten waren transparent, ihre exakte zelluläre Herkunft konnte jedoch bislang nicht geklärt werden. Der Durchmesser eines einzelnen Protoplasten (3,7 μm) konnte anhand der während der Patch-Clamp-Messung aufgezeichneten langsamen Kapazität und der für biologische Membranen spezifischen Kapazität von 1 μF/cm² ermittelt werden.

3.4.2 Elektrophysiologie an Wurzelprotoplasten

Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden an zwei Wurzelprotoplasten in der Ganzzelleableitung der Patch-Clamp-Technik (siehe Kapitel 2.3.2) durchgeführt. Unter Standardbedingungen betrug die von der Pipettenlösung kontrollierte intrazelluläre K⁺-Konzentration 150 mM K⁺ (KG – 150) und der von der Badlösung kontrollierte extrazelluläre Kaliumgehalt 3 mM K⁺ (KG – 3, siehe Kapitel 2.3.10). Die Osmolalität (π) aller für Wurzelprotoplasten verwendeten Lösungen wurde auf π = 280 eingestellt. Die Testpulslänge

des angewandten Pulsprotokolls betrug 0,2 s. Die applizierten Testspannungen wurden bei der Datenauswertung um das Grenzflächenpotential (U_{LJP} , siehe Kapitel 2.3.6) von -5 mV korrigiert. Beide Protoplasten zeigten bei depolarisierenden Membranspannungen auswärtsgerichtete Ionenströme mit sigmoider Aktivierungskinetik (Abb. 3.29. und Abb. 3.30.). Die gemessenen Ionenströme glichen den Stromspuren von PTORK in *Xenopus*-Oozyten (Langer et al., 2002) und denen des zu PTORK homologen GORK, die an Wurzelhaarprotoplasten von *Arabidopsis thaliana* gemessen wurden (Ivashikina et al., 2001). Daher lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den untersuchten Protoplasten der Pappel ebenfalls um Wurzelhaarprotoplasten handelte.

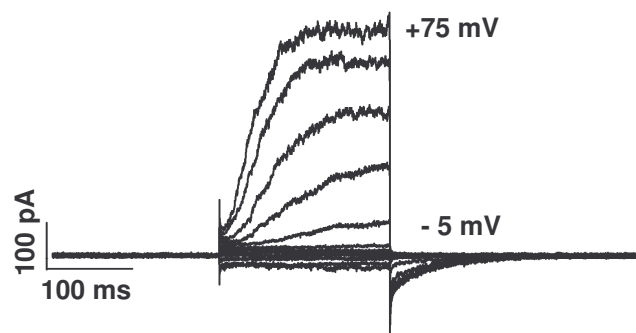


Abb. 3.29. Auswärtsströme von Wurzelprotoplasten

Stromantworten eines Protoplasten unter Standardbedingungen. Ausgehend von einer Haltespannung von -85 mV wurden Testpulsspannungen im Bereich von +75 mV bis -165 mV in 20 mV Schritten appliziert. Die bei den jeweiligen Spannungen gemessene Stromstärke (pA) ist gegen die Messdauer (ms) aufgetragen.

Um zu überprüfen ob es sich bei den gemessenen Ionenströmen um Kaliumströme handelt, wurde begonnen den Einfluss der externen Kaliumkonzentration auf die Stärke der Gleichgewichtsströme (I_{SS}) zu untersuchen. Dazu wurde die externe Standardlösung KG 3 mit 3 mM K^+ und pH 5,6 gegen die Externe Lösung KG 30 – pH 7,4 ausgetauscht. Die untersuchten Ionenströme zeigten bei gleicher Membranspannung mit zunehmender externer Kaliumkonzentration eine Abnahme der gemessenen Stromstärke (Abb. 3.30.). Diese beobachtete Änderung der Gleichgewichtsströme entsprach dem für Kaliumströme erwarteten Verhalten. Ungeklärt blieb jedoch welchen Einfluss die Änderung des externen pH-Wertes auf die Stärke der Gleichgewichtströme hatte. Möglicherweise übte der pH-Wert, wie bei der Untersuchung der Faserprotoplasten (siehe Kapitel 3.2.2) und der Knospenprotoplasten (siehe Kapitel 3.3.2) gezeigt wurde, keinen Einfluss auf die Stärke der Gleichgewichtsströme aus.

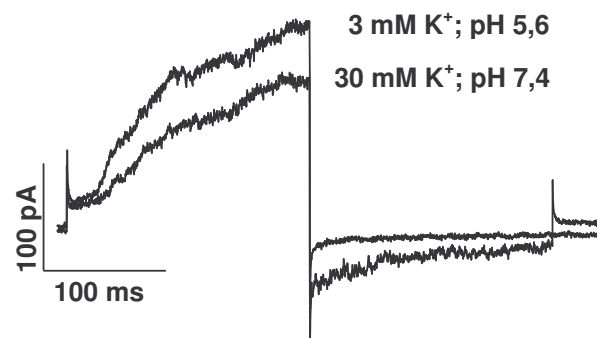


Abb. 3.30. Kaliumabhängiges Verhalten des auswärts-gerichtenden Ionenstroms eines Wurzelprotoplasten

Die Stromspuren bei 3 mM (KG 3) und 30 mM (KG 30 – pH 7.4) externem Kalium sind bei gleicher Membranspannung (75 mV) zum Vergleich übereinander gelegt. Bei Erhöhung des externen Kaliumgehaltes ist der auswärts-gerichtete Ionenstrom reduziert.

3.5 Untersuchungen an intakten Pflanzen

3.5.1 Membranpotentialmessungen an Strahlzellen von intakten Pflanzen

Mit Hilfe der Einstichttechnik wurde das Membranpotential von Strahlzellen aus Kambium und Xylem-Differenzierungs-Zone innerhalb eines Zweiges untersucht. Wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben, wurde der Apoplast mit KCl-Messlösungen unterschiedlicher Konzentration kontrolliert. Zu Messbeginn wurde Es I (1 mM KCl, siehe Kapitel 2.4.5) als Messlösung verwendet. Nach Einstechen der Mikropipette in eine intakte Zelle fiel das gemessene Potential sprunghaft von null auf Werte um -150 mV ab (*Abb. 3.31. A*). Das Mittel aus zehn Messungen an insgesamt fünf von der Wurzel abgetrennten Trieben ergab ein mittleres Membranpotential von -146,8 mV bei einer Standardabweichung von $\pm 10,51$ mV. Eine weitere Pflanze wurde nicht von der Wurzel getrennt und in der Nährlösung belassen. Sie zeigte bei drei Einstichmessungen Membranpotentiale zwischen -129 mV und -135 mV. Diese Werte lagen innerhalb der Potential-Schwankungsbreite von maximal -120 mV bis minimal -169 mV, die bei den abgeschnittenen Trieben gemessen wurde. Daher wurden für die statistische Auswertung des Lösungswechsels von Es I (1 mM KCl) auf Es II (10 mM KCl) die Daten der bewurzelten Pflanze mit einbezogen. Bei vier Messungen führte die zehnfache Erhöhung der Kaliumkonzentration von 1 mM K^+ auf 10 mM K^+ zu einer Erhöhung des Membranpotentials um 12 mV (*Abb. 3.31. B*). In einer Messung konnte die Kaliumkonzentration nochmals um den Faktor 10 auf 100 mM K^+ angehoben werden. Das gemessene Membranpotential verschob sich dabei um weitere 19 mV in positiver Richtung. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine Kaliumleitfähigkeit an den Membranpotential-Änderungen beteiligt war. Da sich das Potential aber nicht nach Nernst um 59 mV bei 10-facher Veränderung des K^+ -Gradienten verschob und sich demnach nicht wie eine K^+ -Elektrode verhielt, war anzunehmen, dass die Membran neben der Leitfähigkeit für Kalium weitere für andere Ionen besaß.

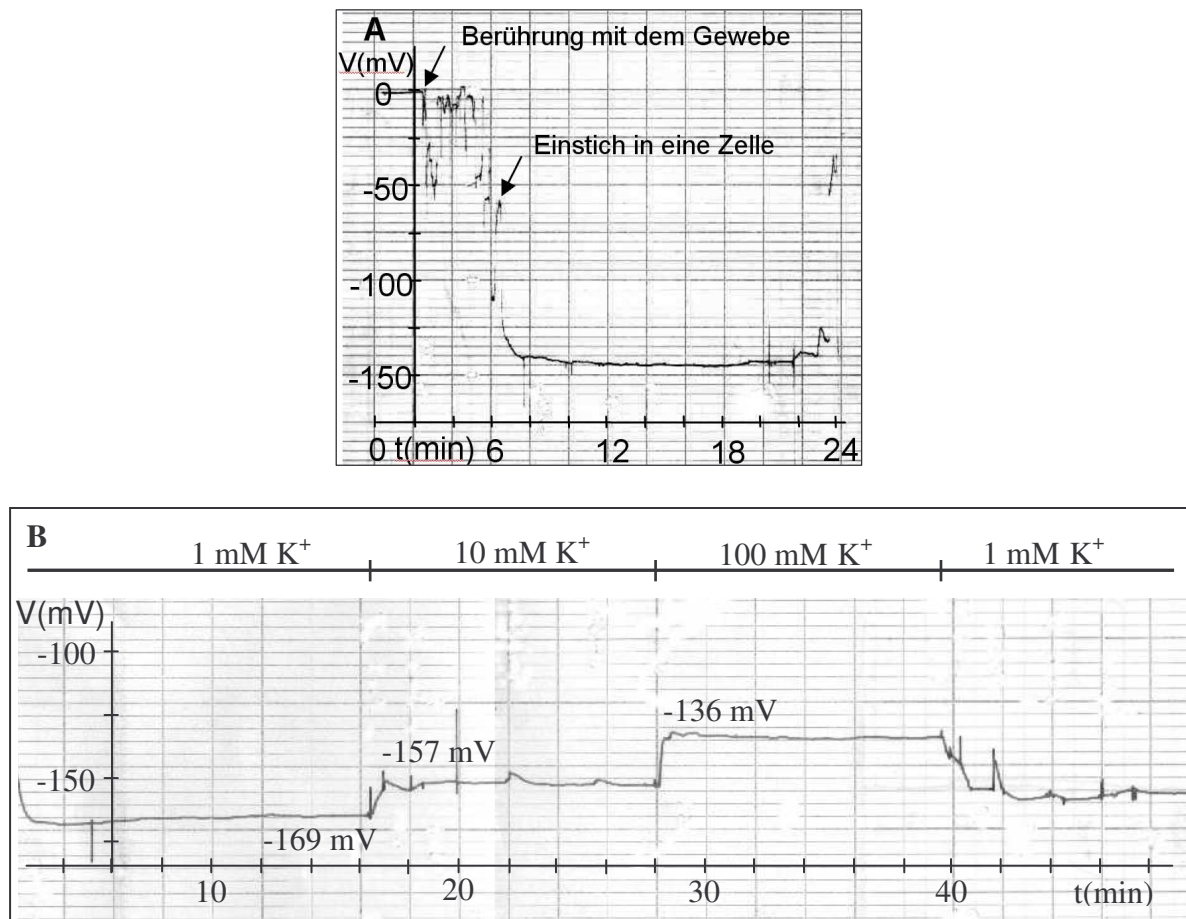


Abb. 3.31. Mit der Einstichteknik an Strahlzellen durchgeführte Membranpotentialmessungen.

Das Membranpotential in mV wurde während der Messung gegen die Zeit aufgetragen.

A: veranschaulicht den Einstichvorgang. Bei einem auf 0 mV abgeglichenen Offsetpotential wurde die Mikropipette zum Zeitpunkt $t = 2$ min auf eine Strahlzelle aufgelegt. Das führte zu einer Spannungsänderung. Das Durchstechen des Gewebes wurde von ständigen Spannungsänderungen begleitet ($t = 2$ min – 6 min). Charakteristisch für das Einstechen in eine intakte Zelle war hingegen ein sprunghafter Spannungsabfall auf einen negativen Wert (bei $t = 6$ min), bei dem das Membranpotential stabil blieb.

B: Membranpotential nach erfolgtem Einstich. Bei einer Änderung der extrazellulären Kaliumkonzentration wurde eine Änderung des Membranpotentials beobachtet. Oberhalb der Aufzeichnung wurden die im jeweiligen Zeitabschnitt verwendeten Kaliumkonzentrationen eingefügt.

3.5.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der für Membranpotentialmessungen verwendeten Triebe

Um das gemessene Membranpotential mit der Struktur des Kambiums vergleichen zu können, wurden von den eingebetteten Zweigproben (siehe Kapitel 2.5.1) im Bereich des für die

Einstichmessungen angebrachten Tangentialschnittes (siehe Kapitel 2.4.1., *Abb. 3.32. B*) und in Richtung Triebspitze außerhalb des Tangentialschnittes (*Abb. 3.32. A*), Querschnitte angefertigt. Das Kambium aller Schnitte von unbewurzelten Pflanzen war zwischen vier bis sieben Zellreihen stark (*Abb. .3.32 D*). Zum Vergleich wurden auch die Querschnitte der Pflanze untersucht, an der das Membranpotential in bewurzelttem Zustand gemessen wurde. Die kambiale Zone dieser Pflanze bestand aus drei bis fünf Zellreihen (*Abb. 3.32. C*). Demnach waren die unbewurzelten und die bewurzelten Triebe annähernd gleich gut ernährt, weshalb durch die Ernährung bedingte Unterschiede der Membranpotentiale ausgeschlossen wurden.

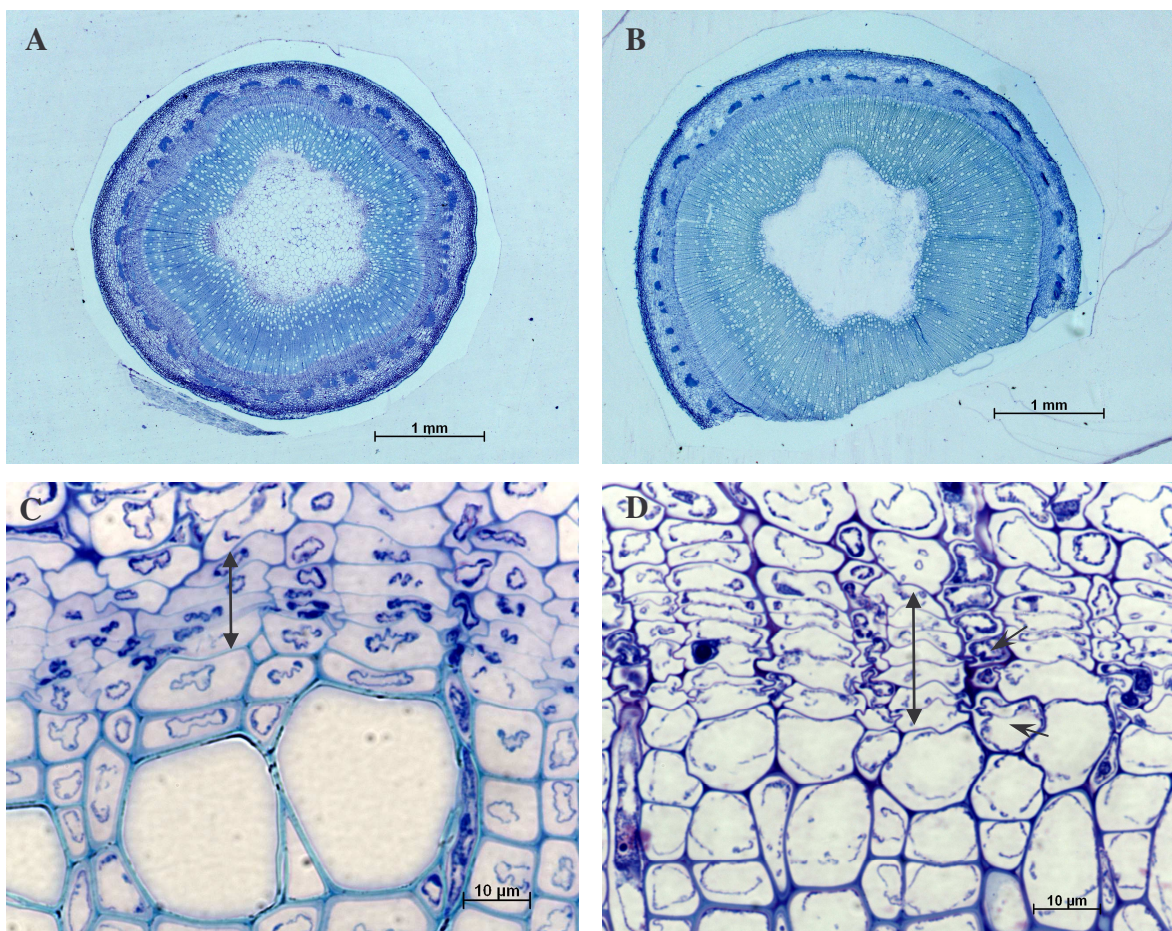


Abb. 3.32. Querschnitte aus dem Messbereich der Einstichuntersuchungen.

A: Querschnitt aus dem Bereich oberhalb der zum Einstechen präparierten Stelle. B: Zum Einstechen präparierte Stelle. C: Vergrößerung des Kambiums der bewurzelten Probe mit den angrenzenden Streckungszonen von Xylem (unten) und Phloem (oben). D: Vergrößerung des Kambiums einer unbewurzelten Probe. Schwarze Doppelpfeile geben die Weite der kambialen Zone an. Nach unten schließt sich das Xylem und nach oben das Phloem an. Pfeilspitzen kennzeichnen den zum Einstechen geeigneten Bereich des Xylemstrahls von oben und unten.

4. Diskussion

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Zelltypen des Modellbaumes *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx., die an Wachstum und Kaliumtransport beteiligt sind mit der Patch-Clamp-Technik (siehe Kapitel 2.3) bzw. der Einstichttechnik (siehe Kapitel 2.4) auf das Vorkommen von Kaliumkanälen in der Plasmamembran zu untersuchen. Mit den elektrophysiologischen Untersuchungen sollte der bereits in den Arbeiten von Wind C. (2003) und Langer K. (2003) ernährungsphysiologisch und molekularbiologisch behandelte Zusammenhang von Kaliumtransport und kaliumabhängigen Holzwachstum vertieft werden. Von besonderem Interesse war die Untersuchung von an der Holzbildung beteiligten Zelltypen wie kambialen Zellen, sich differenzierenden Fasern und Zellen sich differenzierender Xylemstrahlen. Darüber hinaus wurden auch Knospen während des Austriebes im Frühjahr und Wurzelzellen einbezogen. Neben den elektrophysiologischen Untersuchungen war die Entwicklung von Methoden zur Gewinnung der für die Patch-Clamp-Untersuchungen benötigten Protoplasten-Typen Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die Entwicklung der Isolations-Methoden war sowohl für junge sich differenzierende Fasern, als auch für Knospen- und Wurzelzellen erfolgreich. Kambiale Protoplasten konnten hingegen nicht auf diesem Weg erhalten werden. Stattdessen wurden Protoplasten von Suspensionskulturzellen verwendet, die genau wie kambiale Zellen ein meristematisches Gewebe bilden. Die Suspensionskultur war bereits als Modellsystem zur Untersuchung von Pappel-spezifischen Kaliumkanälen aus Sprossstücken etabliert worden (Langer, K. 2003). Als ebenfalls nicht protoplastierbar zeigten sich differenzierende Xylemstrahl-Zellen. Dieser Zelltyp wurde daher mit der Einstichttechnik in der intakten Pflanze untersucht. Bei der elektrophysiologischen Untersuchung der genannten Zelltypen galt den bereits klonierten Pappel-Kaliumkanälen (Langer, K., 2003; Langer et al., 2002; Langer et al., 2004) *PTORK* (*Populus tremula* Outward Rectifying K⁺ channel), *PTK2* (*Populus tremula* K⁺ channel 2) und *KPT1* (K⁺ channel *Populus tremula* 1) besonderes Augenmerk. So konnte bei den *in vivo* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung der gemessenen Ionenströme auf eine in *Xenopus laevis*-Oozyten durchgeführte *in vitro* Funktionsanalyse der Kaliumkanäle *PTORK* und *PTK2* zurückgegriffen werden (Langer, K., 2003; Langer et al., 2002). Außerdem waren die genannten Kaliumkanäle mittels Expressionsanalyse gewebespezifisch z.B. in jungen 'sink'-Blättern, älteren 'source'-Blättern, Petiolen, Xylem, Phloem, Wurzeln und Suspensionskultur lokalisiert worden (Langer, K., 2003). Dabei waren die Kaliumkanäle *PTORK* und *PTK2* (außer Wurzelprobe) in allen untersuchten Geweben mit unterschiedlich starker Expression nachgewiesen worden. *KPT1* hingegen war fast ausschließlich in

Schließzellen exprimiert (Langer, K., 2003). Zusätzlich gelang mit einem immunohistochemischen Nachweisverfahren die Kaliumkanal-Lokalisation auf zellulärer Ebene. So wurde PTORK in Siebröhren, in sich differenzierenden Faserzellen und in Kontaktzellen des Holzstrahlparenchyms sowie PTK2 in parenchymatischen Zellen des Phloems und im Strahlparenchym lokalisiert (Wind, C., 2003; Arend et al., 2005).

4.1 Faserprotoplasten

Die Faserzellen durchlaufen wie alle vom Kambium neu gebildeten Zellen mehrere Entwicklungsschritte bis zum Zelltod. Ausgehend von der durch Teilung neu gebildeten Zelle erfolgt zunächst die Streckung durch Ionen- und anschließende Wasseraufnahme. Danach erfolgt mit Bildung der sekundären Zellwand die vollständige Ausdifferenzierung der Zelle. Die Faserzellen besitzen zunächst eine große Zentralvakuole, die von einem schmalen Cytoplasmasaum umgeben ist. Während der Zelldifferenzierung schrumpfen die Vakuolen, sie zerfallen in mehrere Teilvakuolen und lösen sich schließlich vollständig auf (Arend, M., 2001). An Zweigquerschnitten durchgeführte immunohistochemische Untersuchungen lokalisierten den Kaliumabgabekanal PTORK in der Plasmamembran von jungen sich differenzierenden Faserzellen mit großer Zentralvakuole (Wind, C., 2003; Arend et al., 2005). Eine immunohistochemische Untersuchung an ruhendem Gewebe im Winter zeigte hingegen keine Markierung der Plasmamembran durch den spezifischen Antikörper (Wind, C., 2003; Arend et al., 2005). Die gleichzeitig mit der Lokalisation von PTORK beobachtete Abnahme der Kaliumkonzentration in diesem Zelltyp weist auf eine Regulation des Kaliumhaushalts sich differenzierender Fasern durch PTORK und auf eine funktionelle Einbindung dieses Kaliumkanals in die Größen- und Formentwicklung dieser Zellen hin (Wind, C., 2003). Die PTORK exprimierenden Faserzellen befinden sich am Anfang der Differenzierungszone im Bereich der bereits ausdifferenzierten Gefäße (Arend et al., 2005). Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik sollten Protoplasten aus Fasern, die genauso weit entwickelt waren wie die PTORK exprimierenden Fasern, auf das Auftreten von auswärts-gerichteten Ionenströmen untersucht werden, die durch den Kaliumkanal PTORK vermittelt sind. Da das Fasergewebe für enzymatische Isolationsverfahren nicht zugänglich war, wurde zur Protoplasten-Isolation eine aus mechanischen und osmotischen Isolations-Schritten bestehende Isolations-Methode entwickelt (siehe Kapitel 2.2.1). Zentrales Element dieser Methode ist es, die Protoplasten von Zweigstücken zunächst durch osmotischen Wasserentzug zu schrumpfen, anschließend die Rinde vom Holz zu trennen und die Protoplasten wieder osmotisch schwellen zu lassen (siehe Kapitel 2.2). Die geschwellenen Protoplasten treten schließlich aus den, durch das

Abtrennen der Rinde verletzten Faserzellen aus. Mit lichtmikroskopischen Untersuchungen konnten die isolierten Protoplasten mit großer Vakuole und schmalen Cytoplasmasaum eindeutig als Protoplasten der Differenzierungszone identifiziert werden (siehe Kapitel 3.1.1; Arend et al., 2005). Eine Herkunft der Protoplasten aus Gefäßen und Kambiumzellen, welche ebenfalls eine große Zentralvakuole und einen schmalen Cytoplasmasaum besitzen (Arend und Fromm, 2003), konnte ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 3.1.1; Arend et al., 2005). Da für den Erfolg der Isolations-Methode jedoch Zweigstücke benötigt werden, bei denen sich die Rinde gut vom Holz trennen lässt, ist sie bei im Freiland wachsenden Pflanzen nur zeitlich begrenzt anwendbar. Je nach Witterung ist der Einsatz der Methode ungefähr ab Mai/Juni möglich, wenn die Bildung von Frühholz begonnen hat und sich die Rinde sehr leicht vom Holz trennen lässt. Mit Einsetzen der Spätholzbildung, bei der dickere Zellwände gebildet werden, lässt sich die Rinde zunehmend schwerer abziehen. Im Vergleich zum Frühholz besitzt das Spätholz außerdem verlängerte Fasern. Ernährungsphysiologische Untersuchungen zur Anatomie der Modellbaumart *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx. zeigten darüber hinaus mit abnehmender Kaliumversorgung eine Zunahme der Faserlänge im Frühholz (Wind, C., 2003). Diese anatomische Ähnlichkeit der Fasern aus wenig mit Kalium versorgten Pappeln mit derjenigen von Spätholz-Fasern aus gut mit Kalium versorgten Pappeln lässt darauf schließen, dass sich die Rinde der wenig mit Kalium versorgten Pappeln ebenso schlecht vom Holz trennen lässt wie während der Spätholzbildung bei gut versorgten Pappeln. Somit dürfte mit der entwickelten Methode die Isolation von jungen sich differenzierenden Faserprotoplasten aus wenig mit Kalium versorgten Pappeln und deren anschließende Untersuchung der Ionenströme auf ernährungsspezifische Unterschiede nicht möglich sein. Für die Entwicklung der Isolations-Methode und zur anschließenden Protoplasten-Isolation wurden daher nur Zweige einer normal versorgten im Freiland wachsenden Pappel verwendet (siehe Kapitel 2.2.1). Weiterhin ist es nicht möglich mit dieser auf ein Zeitfenster von Mai/Juni bis Anfang August begrenzten Isolationsmethode die auftretenden Ionenströme auf jahreszeitliche Veränderungen zu untersuchen. Insbesondere potentielle Ionenstromänderungen während der Aktivierung im Frühjahr und bei beginnender Dormanz im Herbst können nicht auf diese Weise untersucht werden.

Expressionsanalysen aller bis 2001 von *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx. klonierten Kaliumkanäle und Transporter, die an Zweigstücken mittels quantitativer Echtzeit PCR durchgeführt wurden, zeigten saisonal bedingte Änderungen in der Kanal-Expression (Langer, K., 2003). Die stärkste Expression von PTORK dieser an Zweigstücken durchgeführten Untersuchung war im Juni und August zur Zeit der stärksten Holzbildung

(Langer, K., 2003). Da PTORK außerdem mittels immunohistochemischer Lokalisation nur in aktiven Pflanzen nachgewiesen werden konnte, wurden die Patch-Clamp-Untersuchungen an Faserprotoplasten nur während der Vegetationsperiode im Zeitraum vom 29.04.2002 bis 08.08.2002 durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1). Da sich Rinde und Holz in diesem Zeitraum gut voneinander trennen ließen war die zur Protoplasten-Isolation entwickelte Methode außerdem uneingeschränkt einsetzbar. Die an den isolierten Faserprotoplasten in der Whole-cell-Konfiguration (siehe Kapitel 2.3.2) durchgeführten Patch-Clamp-Messungen zeigten - wie für PTORK exprimierende Faserprotoplasten zu erwarten war - bei depolarisierenden Membranspannungen auswärts-gerichtete Ionenströme mit sigmoider Aktivierungskinetik (siehe Kapitel 3.1.2, *Abb. 3.4.*). Bei dem Vergleich von *in vivo* gemessenen Auswärtsströmen mit *in vitro* an *Xenopus laevis*-Oozyten untersuchten PTORK-Strömen (Langer et al., 2002) fällt eine große Ähnlichkeit der beiden Auswärtsströme in Bezug auf ihre langsame Aktivierungskinetik auf. Dies lässt bereits vermuten, dass es sich bei den in Faserprotoplasten aufgezeichneten Auswärtsströmen um von PTORK-Kanälen vermittelte Kaliumströme handeln könnte. Außerdem wurden die in Faserprotoplasten gemessenen Auswärtsströme genau wie PTORK und die der orthologen Kanäle aus *Arabidopsis thaliana* SKOR und GORK von dem Kaliumkanal-Blocker BaCl₂ gehemmt. So wurden die Ionenströme in Faserprotoplasten bei einer externen Zugabe von 5 mM BaCl₂ um ca. 50% inhibiert. (siehe Kapitel 3.1.2, *Abb. 3.6.*). Vergleichbare Untersuchungen an PTORK-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten zeigten eine ca. 30%ige Reduktion des Ionenstroms (Geiger, D., persönliche Mitteilung). Bei den zu PTORK-homologen Kanälen SKOR und GORK wurde ein ca. 50%iger Bariumblock (5 mM Ba²⁺) beobachtet, (Gaymard et al., 1998; siehe auch Kapitel 1.4, *Abb. 1.4. C*; Ache et al., 2000). Den Kaliumkanal GORK exprimierende Wurzelhaarprotoplasten zeigten bei einer doppelt so hohen BaCl₂-Konzentration (10 mM) sogar eine vollständige Inhibition des Kaliumstroms (Ivashikina et al., 2001). Die ähnliche Ba²⁺-Sensitivität der Ionenströme in Faserprotoplasten spricht dafür, dass es sich um einen K⁺-permeablen Kanaltyp handelt und bestärkt die Vermutung, dass PTORK-Kanäle den Strom vermitteln. Darüber hinaus führte die Absenkung des externen Kaliumgehaltes von 30 auf 3 mM K⁺ zu einer für kaliumsensitive Kanäle zu erwartenden Verschiebung des Umkehrpotentials (U_{rev}) zu negativeren Potentialen (siehe Kapitel 3.1.2). Allerdings verschob sich das Umkehrpotential nur um -30,7 mV (siehe Kapitel 3.1.2) und nicht um -59 mV, wie es gemäß dem Nernst'schen Potential für Kalium (E_K) bei einer Veränderung des Kaliumgradienten um den Faktor 10 zu erwarten wäre. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der funktionellen Charakterisierung von PTORK in *Xenopus*-Oozyten erzielt (Geiger, D.,

persönliche Mitteilung). Eine mögliche Ursache für die beobachtete Abweichung könnte eine Permeabilität des Kaliumkanals für weitere in der Messlösung befindliche Ionen sein deren Nernstpotential positiv von E_K liegt. Unter Standardbedingungen (KG 150 intern und KG 30 extern, siehe Kapitel 2.3.10) trifft dies für die Nernstpotentiale von Calcium⁵⁷ (E_{Ca}) und Chlor (E_{Cl}) zu. Das Nernstpotential für Magnesium (E_{Mg}) liegt hingegen negativ von E_K . Da der Kanal selektiv für Kationen permeabel ist und es sich bei Chlor um ein Anion handelt könnte die verminderte Verschiebung des Umkehrpotentials daher am ehesten auf eine Permeation von Ca^{2+} deuten. Analog zu den Faserprotoplasten zeigen auch Untersuchungen der auswärtsgerichteten Ionenströme von Mais-Nebenzellen eine Abweichung des Umkehrpotentials vom Nernstpotential für Kalium. Der Potentialunterschied bei einer 10fachen Absenkung der externen K^+ -Konzentration beträgt in diesem Fall -49 mV anstelle der für E_K erwarteten -59 mV (Majore et al., 2002). Als Ursache für den geringeren Potentialunterschied wird auch hier eine Permeabilität des verantwortlichen Kaliumkanals für weitere in den Messlösungen enthaltene Ionen wie z.B. Cl^- oder Ca^{2+} diskutiert, deren Nernstpotentiale (E_{Ca} , E_{Cl}) positiv von E_K liegen (Majore et al., 2002). Für eine durch Ca^{2+} -Ionen verursachte Verschiebung des Umkehrpotentials bei Faserprotoplasten sowie für eine Vermittlung des Ionenstroms durch PTORK sprechen Untersuchungen des zu PTORK homologen Kaliumkanals SKOR. Im Gegensatz zu PTORK und den an Faserprotoplasten untersuchten auswärtsgerichteten Ionenströmen weicht SKOR mit -56 mV bei 1 mM externem Ca^{2+} und einer 10fachen Erniedrigung des externen K^+ -Gehaltes kaum von einer Verschiebung bei E_K um -59 mV ab (Gaymard et al., 1998). Unter dem Einfluss einer ansteigenden externen Ca^{2+} -Konzentration und konstant bleibenden externem K^+ -Gehalt konnte jedoch eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu positiveren Membranspannungen beobachtet werden, die mit einem Calciumeinstrom durch SKOR in Einklang steht (Gaymard et al., 1998). Eine Bedeutung könnte ein solcher Ca^{2+} -Einstrom durch SKOR, der in Xylemparenchymzellen von *Arabidopsis thaliana* Wurzeln lokalisiert ist, bei der Wiederaufnahme von Calcium aus dem Transpirationsstrom oder bei der Weiterleitung von Signalen haben (Gaymard et al., 1998). Funktionelle Gemeinsamkeiten mit SKOR weist der *in vivo* an Xylemparenchymzellen von Gerstenwurzeln untersuchte KORC-Kanal auf. Auch dieser auswärts-gleichrichtende

⁵⁷ E_{Ca} : Bei Verwendung der Standardmesslösungen mit 1 mM externem und 0 mM internem Ca^{2+} (internes Calcium ist EGTA gepuffert) ist das Nernstpotential für Calcium (E_{Ca}) mathematisch nicht ermittelbar. Unter der Annahme dass der interne Calciumgehalt auf 1 mM Ca^{2+} erhöht ist beträgt $E_{Ca} = 0$ mV. Wird E_{Ca} bei einer auf 1 nM Ca^{2+} reduzierten internen Calciumkonzentration die sich 0 mM internem Ca^{2+} annähert ermittelt, beträgt $E_{Ca} = +174,49$ mV. E_{Ca} wird also mit abnehmendem internem Ca^{2+} -Gehalt immer positiver.

Kaliumkanal ist für Ca^{2+} -Ionen permeabel und zeigt eine Abweichung des Umkehrpotentials vom Nernstpotential für Kalium E_K (Wegner and De Boer, 1997). Diese Daten bestärken die Annahme, dass die an Faserprotoplasten untersuchten auswärts-gerichteten Kaliumströme tatsächlich durch den in diesem Zelltyp lokalisierten Kaliumkanal PTORK vermittelt werden können. Bemerkenswerterweise zeigte ein Teil der untersuchten Faserprotoplasten bei einer Verlängerung des Messpulses von 1 s auf 10 s eine zeit- und spannungsabhängige Inaktivierung des auswärts-gerichteten Ionenstroms (siehe Kapitel 3.1.2, Abb. 3.5.). Eine derartige Inaktivierung der auswärts-gerichteten Kaliumströme mit A-förmigem Kurvenverlauf ist von tierischen Shaker-Kanälen (Hille, B., 2001) sowie von den an Schließzellen aus *Nicotiana benthaminiana* und aus *Arabidopsis thaliana* untersuchten Kaliumströmen bekannt (Armstrong et al., 1995; Pei et al., 1998). Ein gleiches Verhalten zeigten auch die auswärts-gerichteten Kaliumströme von Wurzelhaarprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana* die den zu PTORK homologen Kaliumkanal GORK exprimierten (Ivashikina et al., 2001). Bei den Faserprotoplasten wurde die Inaktivierung des Kaliumstroms durch eine Absenkung des externen K^+ -Gehalts verstärkt (siehe Kapitel 3.1.2). Der Kaliumausstrom von *Arabidopsis thaliana* Schließzellprotoplasten zeigte hingegen nur bei 0 mM externem Kalium eine deutliche Reduktion des Ionenstroms (Pei et al., 1998). Zudem hatten unterschiedliche externe Kaliumkonzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das Aktivierungspotential des Ionenstroms (Pei et al., 1998). Somit dürfte die Inaktivierung des Auswärtsstroms von Faserprotoplasten und *Arabidopsis thaliana* Schließzellprotoplasten auf verschiedene Weise hervorgerufen werden. Anders als die Schließzellprotoplasten zeigten die auswärts-gerichteten Ionenströme der Wurzelhaarprotoplasten (Ivashikina et al., 2001) bei steigendem externem K^+ -Gehalt eine Verschiebung des Aktivierungspotentials zu positiveren Membranspannungen. Darüber hinaus verstärkte genau wie bei den Faserprotoplasten ein sinkender externer K^+ -Gehalt die Inaktivierung des Ionenstroms. Der höchstwahrscheinlich für die auswärts-gerichteten Kaliumströme der Wurzelhaarprotoplasten verantwortliche Kaliumkanal GORK zeigte jedoch bei Expression in Oozyten keine zeit- und spannungsabhängige Inaktivierung des Ionenstroms (Ache et al., 2000; Ivashikina et al., 2001). Als Ursache hierfür wird das Fehlen von pflanzlichen Faktoren angenommen die an der Inaktivierung beteiligt sind (Ivashikina et al., 2001). Dies könnte ebenfalls die Ursache für das Fehlen der Inaktivierung bei PTORK in *Xenopus*-Oozyten sein (Langer et al., 2002). Da PTORK immunologisch in den jungen sich differenzierenden Fasern nachgewiesen wurde deuten die Ergebnisse in Analogie zu der *in vivo* Inaktivierung von GORK darauf hin, dass die bei den Faserprotoplasten beobachtete

Inaktivierung durch PTORK hervorgerufen wird. Zusätzlich zu den für die Untersuchung des auswärts-gerichteten Ionenstroms applizierten depolarisierenden Membranspannungen wurden auch hyperpolarisierende Membranspannungen appliziert. In Anwesenheit von 20 mM externem Ca^{2+} zeigten die Faserprotoplasten teilweise einwärts orientierte Ionenströme mit unregelmäßiger Kinetik die mit zunehmender Hyperpolarisation verstärkt wurden. Ansatzweise erinnerten diese einwärts orientierten Ionenströme an die von Sonja Stölzle (2003) untersuchten Calciumströme. Diese Ionenströme wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher untersucht.

Mit Hilfe der an jungen, sich differenzierenden Faserprotoplasten durchgeführten Patch-Clamp-Untersuchungen konnte sowohl bei depolarisierenden Membranspannungen ein zeit- und spannungsabhängig aktivierter auswärts-gerichteter Ionenstrom als auch bei hyperpolarisierenden Membranspannungen ein einwärts orientierter Ionenstrom festgestellt werden. Im Gegensatz zu dem Einwärtsstrom mit unregelmäßiger Kinetik der nicht näher untersucht wurde, konnte der Auswärtsstrom als Kaliumausstrom identifiziert werden der höchst wahrscheinlich durch den Kaliumkanal PTORK vermittelt wird. Somit wird die beobachtete Kaliumabnahme der Faserprotoplasten (Langer et al., 2002; Wind, C., 2003), die in Zusammenhang mit der Größen- und Formentwicklung dieses Zelltyps diskutiert wird, sehr wahrscheinlich durch PTORK reguliert (Wind, C., 2003; Arend et al., 2005). Eine die Kaliumabgabe regulierende Funktion dürfte dabei der gelegentlich beobachteten Inaktivierung des an Faserprotoplasten untersuchten Kaliumausstroms zukommen. Neben der eigentlichen Kaliumabgabe an den Apoplasten dürfte auch der vermutete Calciumeinstrom eine die Kaliumabgabe der Zellen regulierende Funktion haben. Da Kalium vornehmlich in der Vakuole gespeichert wird (Walker et al., 1996) und erst in das Cytoplasma gelangen muss bevor es schließlich an den Apoplasten abgegeben werden kann, könnte z.B. ein cytoplasmatischer Calciumanstieg die Kaliumabgabe an das Cytoplasma kontrollieren. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine Kaliumabgabe von der Vakuole an das Cytoplasma durch einen zum VK-Kanal (engl.: *vacuolar K⁺-channel*) homologen Kaliumkanal der Vakuole. So wird der im Tonoplasten von *Vicia faba* Schließzellen und *Beta vulgaris* Wurzelzellen lokalisierte spannungsunabhängig öffnende kaliumselektive VK-Kanal von cytosolischem Calcium aktiviert (100 – 600 nM Ca^{2+} , Allen and Sanders, 1996; Pottosin et al., 2003). Bei gegenüber dem Cytoplasma anzunehmenden höheren Kaliumkonzentrationen der Vakuole vermittelt der VK-Kanal vornehmlich eine Kaliumabgabe an das Cytoplasma (Allen and Sanders, 1996). So könnte der bei jungen, sich differenzierenden Faserzellen vermutete Ca^{2+} -Einstrom durch den auswärts-gerichteten

Kaliumkanal der Plasmamembran zu einer Aktivierung von Kaliumabgabekanälen der Vakuole führen. Der VK-Kanal zeigt außerdem die stärkste Aktivierung bei einem cytosolischem pH-Wert von 6,5. Bei alkalischeren und saureren pH-Werten wird der Ionenstrom des VK-Kanals hingegen schwächer (Ward and Schroeder, 1994). Dies steht in Einklang mit dem Befund, dass auch der PTORK-Kanal, der sehr wahrscheinlich den Kaliumausstrom über die Plasmamembran der Faserprotoplasten reguliert, bei cytosolischer Ansäuerung inaktiviert (Geiger, D., persönliche Mitteilung). So konnte bei gleichzeitiger Aktivität des PTORK-Kanals und eines potentiellen VK-Kanals an das Cytoplasma abgegebenes Kalium weiter in den Apoplasten gelangen. Die durchgeführten Patch-Clamp-Untersuchungen deuten außerdem eine Calcium gesteuerte Regulation der Kaliumabgabe der Vakuole an das Cytoplasma durch den Kaliumabgabekanal der Plasmamembran an. Dies bestärkt die Annahme, dass der in jungen, sich differenzierenden Faserprotoplasten exprimierte PTORK-Kanal zu den gegenüber dem Kambium und den sich früher differenzierenden Gefäßen die PTORK nicht exprimieren geringeren Kaliumgehalten und den relativ engen Lumina der Fasern führt. Diese Hypothese der Ca^{2+} regulierten Kaliumabgabe wird möglicherweise von Versuchen zum Einfluss der Calciumversorgung für die Holzdifferenzierung der Pappel gestützt (Lautner, S., 2005). So konnte bei einer Calciummangelversorgung von *Populus tremula* x *Populus tremuloides* eine deutliche Reduktion der Gefäßweiten beobachtet werden (Lautner, S., 2005). Da die Kaliumkonzentration einer Zelle für deren Zellstreckung von besonderer Bedeutung ist, deutet eine Reduktion der Gefäßweiten auf eine verminderte Kaliumversorgung der Gefäße hin. Unter der Prämisse eines „Kaliumrecyclings“ bei dem, von differenzierten Zellen an den Apoplasten abgegebenes Kalium zur Versorgung kambialer Zellen genutzt wird (Wind, C., 2003), lässt die Reduktion der Gefäßweiten indirekt auf eine durch Ca^{2+} -Mangel verminderte Kaliumabgabe von Fasern an den Apoplasten schließen.

4.2 Protoplasten aus Suspensionskultur

Bei der Untersuchung von Wachstum und Kaliumtransport der Pappel galt der Untersuchung der kambialen Zellen besonderes Interesse. Die von den meristematischen Kambiumzellen neu gebildeten fussiformen Zellen differenzieren auf der Xylemseite des Kambiums zu Fasern und Gefäßen (Lachaud et al., 1999). Die Versorgung der neu gebildeten Zellen mit Nährstoffen ist für die weitere Entwicklung der Zellen von besonderer Bedeutung. So ist für die sich an die Zellteilung anschließende Zellstreckung die Versorgung der Zellen mit Kalium entscheidend. Kalium reguliert als wichtigstes pflanzliches Osmotikum die Wasseraufnahme der Zellen und somit auch die Zellgröße (Walker et al., 1996; Rodriguez-Navaro, A., 2000). Die Versorgung der Pflanze mit Kalium übt daher einen deutlichen Einfluss auf die Zellentwicklung aus. Bei verbesserter Kaliumversorgung der Pflanze besaßen Gefäße von *Populus trichocarpa* größere Querschnittsflächen (Arend, M., 2001). Bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Modellbaumart *Populus tremula x Populus tremuloides* nahm die Querschnittsfläche der einzelnen Gefäße bei Besserversorgung mit Kalium ab. Dennoch wurde die gesamte Querschnittsfläche aller Gefäße durch eine Zunahme der Anzahl neu gebildeter Gefäße erhöht (Wind, C., 2003). Die Querschnittsfläche der Faserzellen wurde hingegen nicht von der Kaliumernährung der Pflanze beeinflusst (Arend, M., 2001; Wind, C., 2003; Langer et al., 2002), was auf die oben diskutierte, gezielte Kaliumabgabe der Faserzellen während der Differenzierung zurückzuführen ist. In Bezug auf die Größenentwicklung der neu gebildeten Zellen war die Untersuchung kambialer Zellen auf Kaliumströme und deren Abhängigkeit von der Kaliumversorgung der Pflanze von besonderem Interesse. Da jedoch die Kambiumzellen, die eine zentrale Vakuole, wenig Cytoplasma und einen deutlich sichtbaren Zellkern besitzen (Arend, M., 2001), nicht isoliert werden konnten, wurden alternativ Protoplasten aus Suspensionskultur isoliert und untersucht. Die aus Sprossstücken von *Populus tremula x Populus tremuloides* etablierte Suspensionskultur ist genau wie das Kambium ein meristematisches Gewebe und daher ein, für erste Untersuchungen kambialer Vorgänge, geeignetes Modellsystem. Außerdem bietet die Suspensionskultur eine bessere Möglichkeit, die Kaliumversorgung über das Kulturmedium gezielt zu steuern. Mittels Expressionsanalyse konnten die Expression der Kanal-Gene von PTORK sowie von PTK2 nachgewiesen werden (Langer, K., 2003). Wie bereits oben erwähnt, wurde bei zunehmend besserer Kaliumversorgung von Pappeln gleichzeitig eine Abnahme der Gefäßweiten und eine Zunahme der neu gebildeten Gefäße beobachtet (Wind, C., 2003). Um einen möglichen Einfluss der Kaliumernährung von Kambiumzellen auf die beobachteten Unterschiede an neu gebildeten Xylemzellen zu

untersuchen, wurde die *PTORK* und *PTK2* exprimierende Suspensionskultur mit 20, 1,05 oder 0,15 mM K^+ versorgt (siehe Kapitel 2.1.2). In Analogie zum SKOR-Kanal (Gaymard et al., 1998) könnte sich diese unterschiedliche Kaliumversorgung in der Expression von *PTORK* niederschlagen. Bei einer optimalen Kaliumversorgung würde dies möglicherweise zu einer erhöhten Kanaldichte von *PTORK* und in Folge dessen zu einem verstärkten Kaliumausstrom führen. Eine Expressionsanalyse der unterschiedlich mit Kalium versorgten Suspensionskulturen zeigte jedoch kaum Unterschiede in der Expression von *PTORK* und *PTK2*. *PTORK* war in allen Kulturen nach wie vor stärker exprimiert als *PTK2* und wurde bei der schlechter mit Kalium versorgten SuK II Variante nur geringfügig schwächer exprimiert (Langer, K., 2003). Eine gute Kaliumversorgung (SuK I) der Suspensionskultur dürfte demnach kaum zu einer vermehrten Bildung von Kanalproteinen des *PTORK*-Kanals und einem damit verbundenen verstärkten Kaliumausstrom führen. Lichtmikroskopische Untersuchungen von gut und schlecht mit Kalium versorgter Suspensionskultur zeigten hingegen einen deutlichen Einfluss der Kaliumernährung auf die Größe der gebildeten Zellen (siehe Kapitel 3.2.3). Die gut mit Kalium versorgte SuK I-Kultur bestand aus gleichmäßig rundlichen bis ovalen Zellen, während die schlecht mit Kalium versorgte SuK III-Kultur aus deutlich größeren lang gestreckten oder rundlichen Zellen bestand (siehe Kapitel 3.2.3, *Abb. 3.17.*). Diese Beobachtungen stehen mit der bei Gefäßen beobachteten Abnahme der Querschnittsfläche einzelner Gefäße bei zunehmender Kaliumversorgung in Einklang. Bei besser mit Kalium versorgten Zweigen wurde jedoch eine Zunahme der Gefäßzahl beobachtet (Wind, C., 2003). Für die Suspensionskultur wurde, da sie sowohl aus Zellhaufen als auch aus Einzelzellen bestand, keine Auszählung der Zelldichte vorgenommen. Die gut mit Kalium versorgte SuK I-Kultur erschien jedoch gegenüber den schlecht mit Kalium versorgten SuK II- und SuK III-Kulturen wüchsiger, was auch für die Suspensionskultur auf eine verstärkte Zellbildung bei besserer Kaliumversorgung schließen lässt. Die Untersuchung der relativen Kaliumgehalte von Suspensionskultur-Zellen mittels EDX-Analyse zeigen außerdem genau wie kambiale Zellen (Wind, C. 2003) eine Zunahme des relativen Kaliumgehaltes mit zunehmender Kaliumversorgung (siehe Kapitel 3.2.4, *Abb. 3.18.*). Die für Patch-Clamp-Untersuchungen aus der Suspensionskultur isolierten Protoplasten waren transparent, besaßen eine große zentrale Vakuole und wenig Cytoplasma (siehe Kapitel 3.2.1, *Abb. 3.7.*). Genau wie bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen beobachtet, nahm auch die mit Hilfe der Patch-Clamp-Messungen ermittelte Größe der isolierten Protoplasten mit zunehmender Kaliumversorgung ab (siehe Kapitel 3.2.1). Die mit der Kaliumbesserversorgung einhergehende Größenabnahme der Suspensionskultur-Zellen steht

außerdem mit der steigenden Osmolalität des Gewebes in Einklang. Bei der enzymatischen Isolation der Protoplasten wurde die Osmolalität der jeweiligen Suspensionskultur berücksichtigt, wodurch eine, durch die Präparation bedingte, Änderung der Protoplastengröße ausgeschlossen werden konnte.

Mit der Patch-Clamp-Technik wurden die aus den verschiedenen Suspensionskulturen isolierten Protoplasten außerdem auf das Auftreten von Kaliumkanälen vermittelten Ionenströmen untersucht (siehe Kapitel 3.2.2). Besonderes Augenmerk galt dabei auch hier den in der Suspensionskultur exprimierten Kaliumkanälen PTORK und PTK2 sowie möglichen durch die Kaliumversorgung der Kultur verursachten Veränderungen der Ionenströme. Genau wie bei den Faserprotoplasten (siehe Kapitel 3.1 und 4.1) lässt die Expression des auswärts-gleichrichtenden Kaliumkanals PTORK in der Suspensionskultur bei depolarisierenden Membranspannungen zeit- und spannungsabhängig aktivierte auswärtsgerichtete Kaliumströme erwarten, die durch PTORK-Kanäle vermittelt werden (Langer et al., 2002). Die Expression des nicht gleichrichtenden Kaliumkanals PTK2 der AKT2/3-Unterfamilie lässt hingegen schwach spannungsabhängige Kaliumströme erwarten, die von einer instantanen und einer zeitabhängigen Stromkomponente geprägt sind (Langer et al., 2002; Marten et al., 1999; Lacombe et al., 2000 B). Bei einer Depolarisation der Membran ist der von PTK2 vermittelte Kaliumstrom auswärts, und bei einer Hyperpolarisation der Membran einwärts orientiert. Charakteristisch für den zu AKT2/3 homologen PTK2-Kanal ist außerdem eine durch externes Ca^{2+} verursachte spannungsabhängige Blockierung des einwärts orientierten Ionenstroms (*Abb. 4.1.*; Langer et al., 2002; Marten et al., 1999). Darüber hinaus werden von PTK2-Kanälen vermittelte Ionenströme extrazellulär durch Protonen geblockt und im Gegensatz zu den durch die homologen AKT2/3-Kanäle vermittelten Ionenströme durch intrazelluläre Ansäuerung verstärkt (Langer et al., 2002; Geiger, D., persönliche Mitteilung; Marten et al., 1999).

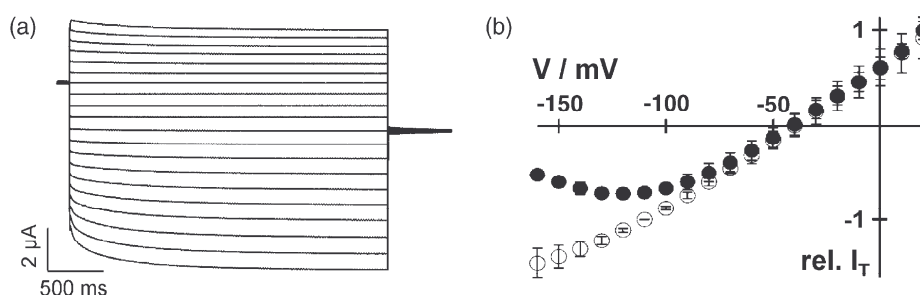


Abb. 4.1. Stromspuren und relative Stromspannungskennlinien von *Xenopus*-Oozyten, die den schwach spannungsabhängigen PTK2-Kanal exprimierten (aus Langer et al., 2002).

A: zeigt PTK2 vermittelte makroskopische Ionenströme von Spannungspulsen bei +30 mV bis -160 mV unter Standardbedingungen mit 30 mM K-Gluconat, 1 mM CaCl_2 , 1,5 mM MgCl_2 und 10 mM Tris-Mes (pH 7,4) in der externen Messlösung

B: zeigt den spannungsabhängigen Block von PTK2 durch extracelluläres Ca^{2+} . Zu sehen sind jeweils auf den Strom bei -110 mV normierte relative Stromantworten von Doppelspannungspulsexperimenten zum Zeitpunkt t_0 bei 30 mM MgCl_2 (○) bzw. 30 mM CaCl_2 (●) in der externen Messlösung die außerdem 20 mM KCl, und 10 mM Tris-MES (pH 7,2) enthält.

Tatsächlich zeigten die an Suspensionskultur-Protoplasten durchgeführten Whole-Cell-Experimente bei depolarisierenden Membranspannungen zeit- und spannungsabhängig aktivierte, auswärts-gerichtete Ionenströme (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 3.8. und 3.13.). Bei hyperpolarisierenden Membranspannungen wurden hingegen, anders als aufgrund der PTK2-Expression erwartet, zeit- und spannungsabhängig aktivierte einwärts-gerichtete Ionenströme beobachtet (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 3.8 und 3.10). Die meisten der untersuchten Protoplasten zeigten dabei sowohl die auswärts-gerichteten, als auch die einwärts-gerichteten Ionenströme. Bei einem Vergleich der getrennt nach der Kaliumernährung der Suspensionskultur durchgeführten Untersuchungen konnte eine Abhängigkeit der gemessenen Ionenströme von der Kaliumernährung der Suspensionskultur festgestellt werden (siehe Kapitel 3.2.2, Tab. 3.1). So dominierte der auswärts-gerichtete Ionenstrom bei gut mit Kalium versorgten Protoplasten gegenüber dem einwärts-gerichteten Ionenstrom. Bei schlecht mit Kalium versorgten Protoplasten dominierte hingegen der einwärts-gerichtete Ionenstrom gegenüber dem auswärts-gerichteten Ionenstrom (siehe Kapitel 3.2.2, Tab. 3.1). Handelt es sich bei den gemessenen Ionenströmen um Kaliumströme, so könnte dieses Ergebnis die von der Kaliumernährung abhängige Größenentwicklung der Suspensionskulturzellen erklären. In

Analogie zu dem für Fasern diskutierten Zusammenhang zwischen ausgebildeter Zellgröße und dem wahrscheinlich von PTORK regulierten Kaliumgehalt der Fasern (siehe Kapitel 4.1) könnte der beobachtete auswärts-gerichtete Ionenstrom für die bei Besserversorgung der Suspensionskultur reduzierte Zellgröße verantwortlich sein. Wie die Expressionsanalysen von *PTORK* und *PTK2* zeigen (Langer, K., 2003, siehe Kapitel 4.2 oben), dürften diese bei unterschiedlicher Kaliumernährung beobachteten Strom- und Zellgrößenunterschiede jedoch nicht in einer kaliumabhängigen Gen-Regulation von *PTORK* und *PTK2* begründet sein. Da der auswärts-gerichtete Ionenstrom insbesondere bei den besser mit Kalium versorgten SuK I-Protoplasten auftrat (siehe Kapitel 3.2.2, *Tab. 3.1.*), wurden diese zur eingehenden Untersuchung dieses Ionenstroms verwendet. Beim Vergleich der *in vivo* gemessenen Auswärtsströme mit den *in vitro*-Strömen von PTORK fällt genau wie bei den Faserprotoplasten (siehe Kapitel 3.1.2, *Abb. 3.4.* und Kapitel 4.1) eine Übereinstimmung in Hinblick auf die langsame sigmoide Aktivierungskinetik der beiden Ionenströme auf (siehe Kapitel 3.2.2, *Abb. 3.13.*; Langer et al., 2002). In Verbindung mit der nachgewiesenen Expression von PTORK (Langer, K., 2003) lässt diese Übereinstimmung vermuten, dass der auswärts-gerichtete Ionenstrom der Suspensionskultur-Protoplasten durch PTORK-Kanäle vermittelt wird. Des Weiteren führte die Anhebung der externen Kaliumkonzentration von 3 mM auf 30 mM und 90 mM K^+ ebenfalls zu einer für kaliumsensitive Kanäle zu erwartenden Verschiebung des Umkehrpotentials (U_{rev}) zu positiveren Membranspannungen (siehe Kapitel 3.2.2, *Abb. 3.14.*). Der bei depolarisierenden Membranspannungen auftretende auswärts-gerichtete Ionenstrom konnte somit als Kaliumstrom identifiziert werden. Doch genau wie bei den Faserprotoplasten beobachtet, wichen die bei den verschiedenen externen Kaliumkonzentrationen ermittelten Umkehrpotentiale von dem Nernstpotential für Kalium (E_K) ab (siehe Kapitel 3.2.2, *Tab. 3.3.*). Bei der 10fachen Erhöhung der Kaliumkonzentration von 3 mM auf 30 mM K^+ verschob sich das U_{rev} lediglich um 27 mV anstelle der erwarteten 59 mV bei einer Verschiebung gemäß E_K . Diese kaliumabhängige Verschiebung des U_{rev} des auswärts-gerichteten Ionenstroms der Suspensionskultur-Protoplasten stimmt annähernd mit der bei den Faserprotoplasten beobachteten Verschiebung um 30,7 mV überein (siehe Kapitel 3.1.2 und 4.1). Da auch PTORK exprimierende *Xenopus*-Oozyten ähnliche Ergebnisse zeigen (Langer et al., 2002) bestärkt dies die Annahme, dass die auswärts-gerichteten Ionenströme Kaliumströme darstellen die durch den PTORK-Kanal vermittelt werden. Außerdem deutet die beobachtete Abweichung der Umkehrpotentiale vom Nernstpotential für Kalium (E_K) eine Permeabilität des Kanals für ein weiteres in der Badlösung befindliches Kation an, dessen Nernstpotential positiv von E_K liegt (siehe Kapitel 4.1; Majore et al., 2002). Unter den

gegebenen Lösungsbedingungen kommt dafür genau wie für die Faserprotoplasten und PTORK diskutiert eine zusätzliche Permeabilität für Calcium in Frage (siehe Kapitel 4.1). Dass PTORK die an SuK I-Protoplasten untersuchten Auswärtsströme vermittelt erscheint also sehr wahrscheinlich. Darüber hinaus zeigte die Bestimmung des halbmaximalen Aktivierungspotentials ($U_{1/2}$) bei 3 und 30 mM externer K^+ -Konzentration ebenfalls eine kaliumabhängige Verschiebung zu positiveren Membranspannungen (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 3.15.). Das Auftreten dieses für auswärts-gerichtete Kaliumkanäle charakteristischen Merkmals einer kaliumsensitiven Aktivierung lässt ebenfalls auf PTORK als Ursache für die Auswärtsströme schließen. Ein ähnliches Aktivierungsverhalten zeigt auch der zu PTORK homologe SKOR. Dieses konnte zudem dem in der sechsten transmembranen Domäne der SKOR- α -Untereinheit lokalisierten K^+ -Sensor zugeordnet werden (Johansson et al., 2006). Da eine derartige kaliumabhängige Verschiebung von $U_{1/2}$ außerdem bei der Funktionsanalyse von PTORK in *Xenopus*-Oozyten zu beobachten war (Langer et al., 2002), spricht auch dies für einen durch PTORK-Kanäle vermittelten Kaliumstrom. Diese Annahme wird jedoch durch Untersuchungen zur pH-Sensitivität des auswärts-gerichteten Kaliumstromes in Frage gestellt. Im Gegensatz zu den *in vitro* Messungen von PTORK, die eine Zunahme des makroskopischen Kaliumstroms bei steigendem externem pH-Wert zeigen (Geiger, D., persönliche Mitteilung), konnte bei den *in vivo* Messungen nämlich kein Einfluss des externen pH-Wertes auf den Kaliumstrom festgestellt werden (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 3.16.). Allerdings zeigen die *in vitro* Daten trotz Abhängigkeit des makroskopischen Ionenstroms vom pH-Wert keine Veränderung der relativen Offenwahrscheinlichkeit (P_o) (Geiger, D., persönliche Mitteilung) was eine Regulation des Kaliumausstroms durch ein pH-Sensitives Aktivierungsverhalten des PTORK-Kanals ausschließt. Ein gleiches pH-Wert abhängiges Verhalten zeigt auch SKOR bei Expression in *Xenopus*-Oozyten (Lacombe et al., 2000 A). Als Ursache für den pH-Sensitiven makroskopischen Kaliumstrom wird hier eine Regulation über die Anzahl der geöffneten SKOR-Kanäle vermutet (Lacombe et al., 2000 A). Da sich der SKOR-Kanal bei externer und interner Ansäuerung gleich verhält wird darüber hinaus die Existenz einer beweglichen Protonenbindestelle diskutiert die manchmal in den Apoplasten und manchmal in das Cytoplasma reicht und durch Anlagerung von Protonen den Kaliumausstrom reduziert (Lacombe et al., 2000 A). PTORK zeigt sowohl bei externer als auch bei interner Ansäuerung eine ebensolche Reduktion des Kaliumausstroms (Geiger, D., persönliche Mitteilung) was möglicherweise ebenfalls auf die für SKOR diskutierte bewegliche Protonenbindestelle zurückzuführen sein könnte. Die fehlende pH-Sensitivität des Kaliumausstroms der Suspensionskultur-Protoplasten (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 3.16.) könnte

dann von einer cytoplasmatischen Orientierung oder einer Modifikation dieser Bindestelle verursacht werden. Da dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, bleibt aber ein Beweis dafür, dass PTORK für die gemessenen Ströme verantwortlich ist, aus.

Um neben dem auswärts-gerichteten Kaliumstrom außerdem die bei Hyperpolarisation auftretenden einwärts-gerichteten Ionenströme eingehender zu untersuchen wurden vornehmlich SuK II- und SuK III-Protoplasten verwendet. Wie bereits oben erwähnt zeigte der Vergleich der *in vivo* Daten mit *in vitro* Daten (Langer et al., 2002) des in der Suspensionskultur nachgewiesenen Kaliumkanals PTK2 (Langer, K., 2003) keine Übereinstimmung. So wurden bei einer Hyperpolarisation der Membran anstelle der von PTK2 vermittelten schwach spannungsabhängigen Kaliumströme, die von einer instantanen und einer zeitabhängigen Stromkomponente geprägt sind (Langer et al., 2002), langsam aktivierte zeit- und spannungsabhängige Ionenströme gemessen (siehe Kapitel 3.2.2, *Abb. 3.8. A* und *3.10. A*). Anhand von Untersuchungen mit dem Kaliumkanal-Blocker Cs^+ , die eine vollständige Blockierung des Ioneneinstroms ergaben (siehe Kapitel 3.2.2, *Abb. 3.10 B*), konnte der Ionenstrom als ein Kaliumkanal vermittelter Strom identifiziert werden. Darüber hinaus bestätigte eine bei Reduktion des externen Kaliumgehaltes von 30 auf 3 mM K^+ verzeichnete Abnahme des Ionenstroms (siehe Kapitel 3.2.2, *Abb. 3.11.*), dass es sich bei dem einwärts-gerichteten Ionenstrom um einen Kaliumstrom handelt. Da insbesondere die stark spannungsabhängige Aktivierungskinetik gegen einen PTK2 vermittelten Kaliumstrom spricht liegt zumindest die Beteiligung eines weiteren stark spannungsabhängigen Kaliumkanals nahe. So könnte der beobachtete Einwärtsstrom möglicherweise von einem Vertreter der stark spannungsabhängig Kaliumstrom vermittelnden KAT1- oder AKT1-Unterfamilie vermittelt werden. Beide Kanaltypen zeigen sowohl die beobachtete Cs^+ -Sensitivität als auch den mit abnehmender externer Kaliumkonzentration verminderten Kaliumstrom (Hedrich et al., 1995; Very et al., 1995; Brüggemann et al., 1999; Gaymard et al., 1996; Hirsch et al., 1998). Weil der zu KAT1 homologe Pappelkanal KPT1 vornehmlich in Schließzellen exprimiert ist und in der Suspensionskultur nicht nachgewiesen werden konnte (Langer et al., 2004; Langer, K., 2003) erscheint jedoch die Beteiligung eines AKT1 homologen Kaliumkanals am Kaliumstrom nahe liegender. Für die Beteiligung eines weiteren Kaliumstrom vermittelnden Ionenkanals spricht außerdem die pH-Sensitivität von PTK2, der wie oben erwähnt, *in vitro* extrazellulär durch Protonen geblockt und durch intrazelluläre Ansäuerung aktiviert wird (Langer et al., 2002; Geiger, D., persönliche Mitteilung). Da Suspensionskultur-Protoplasten bei einem externen pH-Wert von 5,6 und einem internen pH-Wert von 7,4 also unter PTK2 deaktivierenden Bedingungen

untersucht wurden, können allein durch PTK2 vermittelte Ströme praktisch ausgeschlossen werden. Allerdings deutet das Auftreten einer für Kanäle des AKT2/3 Typs charakteristischen Sensitivität gegenüber extrazellulärem Ca^{2+} auf eine Beteiligung des in der Suspensionskultur exprimierten PTK2 am gemessenen Einstrom hin (Langer et al., 2002; Langer, K., 2003). So wurde bei den Suspensionskultur-Protoplasten mit Zunahme der externen Ca^{2+} -Konzentration ein spannungsabhängiger Calcium-Block beobachtet (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 3.12.). Mit dieser Calciumsensitivität und der langsamen Aktivierungskinetik (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 3.10.) die nicht mit der für die AKT2/3-Unterfamilie und der *in vitro* für PTK2 charakteristischen Aktivierungskinetik (Lacombe et al., 2002, siehe Kapitel 1.4, Abb. 1.6.; Langer et al., 2002, siehe Kapitel 4.2, Abb. 4.1.) übereinstimmte, zeigten die Einwärtsströme also Merkmale zwei verschiedener Kanal-Unterfamilien. Als mögliche Ursache für das gleichzeitige Auftreten dieser Merkmale wäre ein aus α -Untereinheiten zweier Kanaltypen bestehender Kaliumkanal denkbar, bei dem die Ca^{2+} -Sensitivität der PTK2-Untereinheit den von der stark spannungsabhängigen Untereinheit dominierten makroskopischen Strom modifiziert. Für eine derartige Hetero-Tetramer-Bildung aus α -Untereinheiten verschiedener Kanal-Gene sprechen Funktionsanalysen an *Xenopus*-Oozyten die gleichzeitig zwei Kanal-Gene exprimieren (Dreyer et al., 1997). So dominieren bei Co-Expression von dem zu dem KPT1-Kanal homologen KAT1 mit dem zu dem PTK2-Kanal homologen AKT3 in *Xenopus*-Oozyten die vom Einwärtsgleichrichter KAT1 vermittelten stark spannungsabhängigen Stromkomponenten (Baizabal-Aguirre et al., 1999). Ein gleiches Verhalten zeigt die Mutation der Porenregion von AKT3 mit dem zu KAT1 homologen KST1-Kanal (AKT3/(p)KST1; Hoth et al., 2001). Darüber hinaus belegen Untersuchungen mit *akt2/3-1* Mutanten von *Arabidopsis thaliana* denen das AKT2/3-Gen fehlt, dass die Calciumsensitivität des stark spannungsabhängigen KaliumEinstroms in Schließzellprotoplasten von AKT2/3 vermittelt wird (Ivashikina et al., 2005). Vor diesem Hintergrund erscheint eine Beteiligung von PTK2 am stark spannungsabhängigen KaliumEinstrom der Suspensionskultur-Protoplasten sehr wahrscheinlich. Des Weiteren fiel bei einem Vergleich der unterschiedlich mit Kalium versorgten Suspensionskultur eine Verstärkung der Calciumsensitivität bei den mit Kalium besser versorgten SuK I-Protoplasten auf (siehe Kapitel 3.2.2, Tab 3.2.) Diese wurde außerdem von einer schnelleren Aktivierungskinetik der Ionenströme begleitet (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 3.12. und 3.10.), wodurch die Ionenströme der SuK I-Protoplasten den PTK2 vermittelten Ionenströmen in *Xenopus*-Oozyten ähnlicher waren als die Ionenströme der schlecht mit Kalium versorgten SuK II-Protoplasten. Da den bei besserer Kaliumversorgung auftretenden Einstromen mit schnellerer Aktivierungskinetik dennoch die für PTK2

charakteristische instantane Stromkomponente fehlte, kann zudem eine alleinige Regulation der Aktivierungskinetik durch PTK2 entsprechend der an AKT2/3 untersuchten Veränderungen der Aktivierungskinetik durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Kanals (Michard et al., 2005 A und B), ausgeschlossen werden. Beide Beobachtungen lassen deshalb ebenfalls nur eine Beteiligung des PTK2-Kanals am Kaliumstrom vermuten. Wie die Expressionsanalysen belegen (Langer, K., 2003) ist das bei verbesserter Kaliumernährung veränderte Verhalten des einwärts-gerichteten Ionenstroms außerdem nicht auf Expressionsunterschiede des PTK2-Kanals zurückzuführen. Unter der oben getroffenen Annahme, dass eine zweite langsam aktivierende die Einwärtsströme bestimmende Kanalkomponente mit PTK2 Hetero-Tetramere ausbildet ist eine von der Kaliumernährung abhängige Regulation der potentiell zweiten Kanalkomponente wahrscheinlicher. So sprechen Expressionsstudien mit PTK2 in *Xenopus*-Oozyten für eine solche Regulation. Bei Co-Expression von PTK2 und KPT1 zeigen diese eine Reduktion der von PTK2 vermittelten makroskopischen Kaliumströme (Langer et al., 2004). Demnach könnte der bei guter Kaliumversorgung beobachtete Kaliumstrom mit schnellerer Aktivierungskinetik und verstärkter Calciumsensitivität bei abnehmender Kaliumversorgung der Suspensionskultur durch eine verstärkte Expression des zweiten Kaliumkanal-Gens reduziert werden. Analog zu PTK2 wird auch der PTORK vermittelte Ionenstrom bei einer Co-Expression mit KPT1 in *Xenopus*-Oozyten reduziert (Langer et al., 2004). Die bei den *in vivo* Untersuchungen mit abnehmender Kaliumernährung einhergehende Reduktion des Kaliumausstroms (siehe Kapitel 3.2.2, Tab. 3.1.), ließe sich also auch durch eine bisher unbekannt zweite Kanalkomponente die in Abhängigkeit von der Kaliumernährung der Suspensionskultur reguliert wird erklären. Aufgrund von weiterführenden Untersuchungen mit KAT1 und KPT1 wird für die Hemmung von PTK2 und PTORK durch KPT1 eine Interaktion der verschiedenen α -Untereinheiten im Bereich einer Ankyrin-Einheit im C-Terminus vermutet (Langer et al., 2004).

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte somit eine weitgehende Übereinstimmung des auswärts-gerichteten Kaliumstroms mit durch PTORK vermittelten Kaliumströmen festgestellt werden. Allerdings konnte aufgrund unterschiedlicher pH-Sensitivität zwischen den Ionenströmen PTORK nicht eindeutig als der, den *in vivo* gemessenen Kaliumstrom, vermittelnde Kaliumkanal nachgewiesen werden. Für den einwärts-gerichteten Kaliumstrom hingegen konnte keine optische Übereinstimmung mit dem in der Suspensionskultur exprimierten Kaliumkanal PTK2 beobachtet werden. Vielmehr scheint ein weiterer Kaliumkanal der bisher noch nicht identifiziert werden konnte die

einwärts-gerichteten Kaliumströme zu vermitteln. Dennoch erscheint eine Beteiligung von PTK2 am einwärts-gerichteten Kaliumstrom aufgrund der nachgewiesenen Ca^{2+} -Sensitivität wahrscheinlich. Auch wenn die den Kaliumströmen zugrunde liegenden Kaliumkanäle nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten, haben die untersuchten Kaliumströme dennoch Einfluss auf die Anatomie der gebildeten Suspensionskulturzellen. So liefert die verstärkte Aktivität des auswärts-gerichteten Kaliumstroms bei der mit Kalium besser versorgten SuK I-Kultur eine Erklärung für die relativ kleinen regelmäßig geformten Zellen. Die Zunahme des einwärts-gerichteten Kaliumstroms bei der mit Kalium unterversorgten SuK III-Kultur gewährleistet hingegen die Versorgung der Zellen mit dem wichtigen Osmotikum Kalium. Diese gezielte Kaliumaufnahme führt zugleich zur Ausbildung relativ großer Zellen. Eine Übertragung der Ergebnisse auf Kambiumzellen könnte eine Erklärung für die von Wind (Wind, C., 2003) festgestellte Reduktion der Querschnittsfläche von Gefäßen bei den besser mit Kalium versorgten Versuchspflanzen liefern. Unter der Annahme, dass die vom Kambium neu gebildeten Zellen neben den für die Zellstreckung benötigten Kaliumaufnahmekanälen bereits Kaliumausströme vermittelnde Ionenkanäle besitzen, könnte die Größenregulation der Gefäße folgendermaßen aussehen. Bei schlechter bis normaler Kaliumversorgung wird der auswärts-gerichtete Kaliumkanal möglicherweise durch Interaktion mit dem den Kaliumeinstrom vermittelnden Ionenkanal teilweise gehemmt. Wodurch der Kaliumeinstrom das geschehen an der Plasmamembran dominiert. Der reduzierte Kaliumausstrom könnte in Verbindung mit einer potentiell durch den Kaliumabgabekanal erfolgenden Ca^{2+} -Aufnahme der Signalweiterleitung dienen. Wie zuvor für die Faserprotoplasten angenommen (siehe Kapitel 4.1) bewirkt die durch Aufnahme erhöhte Calciumkonzentration des Cytoplasmas möglicherweise ein Öffnen kaliumpermeabler Ionenkanäle des Tonoplasten. Wird außerdem angenommen, dass bei den im Wachstum befindlichen Zellen der Kaliumgehalt des Cytoplasmas eine höhere Konzentration als der Kaliumgehalt der Vakuole besitzt, wird vermutlich Kalium über die geöffneten Ionenkanäle in die Vakuole transportiert. Diese Kaliumaufnahme dürfte zu einem Nachstrom von Wasser in die Vakuole führen und die Zellstreckung fördern. Durch die verstärkte Kaliumaufnahme bei schlechter bis normaler Kaliumversorgung ließen sich somit die größeren Gefäßquerschnitte erklären. Bei besserer Kaliumversorgung könnte der nun nicht mehr gehemmte Auswärtskanal einen verstärkten Kaliumausstrom vermitteln und zu einer reduzierten Kaliumaufnahme in die Vakuole führen, was die von Wind (Wind, C., 2003) beobachteten kleineren Gefäßquerschnitte bewirken könnte. Diese Hypothese bedarf jedoch noch einer genaueren Überprüfung in kambialen Zellen. Insbesondere weil die an Zweigquerschnitten durchgeführte immunologische

Untersuchung kambialer Zellen keinen der beiden wahrscheinlich für die Kaliumströme der Suspensionskultur mit verantwortlichen Kaliumkanäle *PTORK* und *PTK2* nachweisen konnten (Wind, C., 2003). Somit liefert die aufgrund der an Suspensionskultur-Proto-plasten gewonnenen Ergebnisse aufgestellte Hypothese lediglich eine mögliche Erklärung für die bei unterschiedlicher Kaliumernährung beobachteten Größenunterschiede der Gefäße.

4.3 Knospenprotoplasten

Neben dem Interesse an der kambialen Differenzierung und dem damit verbundenen Kaliumtransport galt den Wachstumsvorgängen während des Knospenaustriebes im Frühjahr besonderes Interesse, durch den das Längenwachstum der Bäume nach der Winterruhe aktiviert wird. Daher wurden Knospenprotoplasten mit der Patch-Clamp-Technik auf das Auftreten von Kaliumkanal vermittelten Strömen untersucht. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei möglichen Änderungen beim Übergang der Knospen vom geschlossenen Zustand (Stadium 1) bis zum stark geschwollenen Zustand (Stadium 3) kurz vor dem Öffnen der Knospen gewidmet (Langer et al., 2004). Auffällig und für die Isolation von Protoplasten von Bedeutung war die mit voranschreitender Knospenentwicklung abnehmende Osmolalität des Knospengewebes (siehe Kapitel 3.3.1). Im Verlauf der Untersuchungen mussten daher die Osmolalitäten der zur Protoplastenisolation eingesetzten Lösungen angepasst werden. Diese mit der Knospenentwicklung einhergehende Änderung der Osmolalität des Gewebes spiegelte sich auch in Form und Größe der isolierten Protoplasten wieder (siehe Kapitel 3.3.1, *Abb. 3.21.*). So wurden zu Beginn der Untersuchungen (Knospenstadium 1) sehr kleine, mit ebenfalls kleinen Chloroplasten dicht gefüllte Protoplasten ohne sichtbare Vakuole isoliert (siehe Kapitel 3.3.1, *Abb. 3.19. A*). Mit voranschreitender Knospenentwicklung wurden zunehmend größere Protoplasten aus den Knospen gewonnen. Die größeren Protoplasten enthielten entweder eine deutlich sichtbare Vakuole oder waren transparent und enthielten Chloroplasten (siehe Kapitel 3.3.1, *Abb. 3.19 B und C*). In den Jahren 2002 und 2003 wurden an sich entwickelnden Knospen Expressionsanalysen der von der Pappel klonierten Kaliumkanal-Gene durchgeführt (Langer, K., 2003). Die Ergebnisse zeigten für den Untersuchungszeitraum März und April eine gleichmäßige Expression der Kaliumkanäle *PTORK* und *PTK2*, wobei mit Ausnahme der Ende April durchgeführten Messung die Expression von *PTORK* über der von *PTK2* lag. Der Schließzellkanal *KPT1* war zur Knospenöffnung im April deutlich höher exprimiert als während des übrigen Jahres. Trotzdem lag die *KPT1*-Expression deutlich unter den Werten von *PTORK* und *PTK2*. Eine bei künstlicher Knospenreife für die Entwicklungsstadien eins bis drei durchgeführte

Expressionsanalyse zeigte ebenfalls eine zunehmend stärkere Expression von *KPT1* mit fortschreitender Knospenentwicklung (Langer, K., 2003). Die Ergebnisse der durchgeführten Expressionsanalysen ließen aufgrund der relativ hohen Expression von PTORK für die Patch-Clamp-Untersuchungen ebenso wie bei Faser- und Suspensionskultur-Protoplasten (siehe Kapitel 4.1 und 4.2) auswärts-gerichtete Kaliumströme erwarten. Die Expression von *PTK2* und *KPT1* deutete außerdem auf das Auftreten einwärts-gerichteter Ionenströme hin. Insbesondere bei der Untersuchung der noch geschlossenen Knospen wurde aufgrund der für den Knospenaustrieb erforderlichen Zellstreckung und der osmotisch die Wasseraufnahme fördernden Wirkung von Kalium (Walker et al., 1996; Rodriguez-Navaro, A., 2000) eine Kaliumaufnahme erwartet. Die in der Whole-Cell-Konfiguration durchgeführten Patch-Clamp-Experimente zeigten jedoch für den gesamten Untersuchungszeitraum ausschließlich zeit- und spannungsabhängig aktivierte auswärts-gerichtete Ionenströme. Die Ionenströme der bei niedriger Osmolalität isolierten größeren Protoplasten waren dabei deutlich stärker als diejenigen der kleinen Protoplasten (siehe Kapitel 3.3.2, *Abb. 3.22.*). Auch hier wurden die auswärts-gerichteten Ionenströme mit den an *Xenopus*-Oozyten untersuchten Kaliumströmen von PTORK verglichen. Genau wie bei Faser- und Suspensionskultur-Protoplasten glichen sich die Ionenströme in Hinblick auf ihr langsam sigmoides Aktivierungsverhalten und ließen einen PTORK vermittelten Kaliumausstrom vermuten (siehe Kapitel 3.3.2, *Abb. 3.22.*; Langer et al., 2002). Darüber hinaus wurde zur Untersuchung des Ionenkanals die Reaktion des Ionenstroms auf den Kaliumkanal-Blocker Ba^{2+} getestet. Aufgrund der vor und nach dem 14.04.04 gleichermaßen durch $10\text{ mM }Ba^{2+}$ hervorgerufenen Reduktion der Ionenströme (siehe Kapitel 3.3.2, *Abb. 3.24.*) konnte der auswärts-gerichtete Ionenstrom als Kaliumstrom identifiziert werden. Auch SKOR und GORK reagieren ähnlich Ba^{2+} -sensitiv (siehe Kapitel 4.1; Geiger, D., persönliche Mitteilung; Gaymard et al., 1998; Ache et al., 2000). Des Weiteren zeigte eine Verlängerung der unter Standardbedingungen durchgeführten Testpulse von 1,5 s auf 10 s gelegentlich eine schwache zeitabhängige Inaktivierung des Kaliumstroms wie sie auch bei den Faserprotoplasten und GORK exprimierenden Wurzelhaarprotoplasten von *Arabidopsis thaliana* zu beobachten war (siehe Kapitel 3.3.2, *Abb. 3.23.* und Kapitel 4.1; Ivashikina et al., 2001). In der Summe deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der an Knospenprotoplasten gemessene Ionenstrom durch PTORK vermittelt wird.

Unter der Annahme, dass es sich bei den verschieden großen Protoplasten mit unterschiedlichem Aussehen um denselben Protoplasten-Typ in anderen Entwicklungsstadien handelt, wurden die Daten für weiterführende Auswertungen herangezogen. Da die Patch-Clamp-Untersuchungen mit Ausnahme der unterschiedlichen Entwicklungsstadien der

Protoplasten auch bei verschiedenen externen Kaliumkonzentrationen durchgeführt wurden (kleiner Protoplasten-Typ A 3 mM K⁺; großer Protoplasten-Typ C 30 mM K⁺; siehe Kapitel 3.3.2, *Tab. 3.4.*), liefern die Auswertungen lediglich Hinweise zur Kaliumsensitivität der Ionenkanäle. Im Zuge dieser Auswertungen wurde das Umkehrpotential (U_{rev}) der mit 3 mM externem Kalium untersuchten kleinen Protoplasten und das Umkehrpotential der mit 30 mM externem Kalium untersuchten Protoplasten bestimmt und verglichen. Wie für kaliumsensitive Kanäle zu erwarten, verschob sich U_{rev} mit zunehmendem externem Kaliumgehalt kaliumabhängig in positiver Richtung (siehe Kapitel 3.3.2, *Abb. 3.25.*; Gaymard et al., 1998). Außerdem zeigte der Vergleich mit dem Nernstpotential für Kalium (E_K) genau wie bei den Faserprotoplasten und den Suspensionskultur-Protoplasten beobachtet, eine Abweichung der beiden Werte. Bei einer 10fachen Erhöhung der externen Kaliumkonzentration beträgt die kaliumabhängige Verschiebung des Umkehrpotentials 48,5 mV (siehe Kapitel 3.3.2) anstelle der gemäß E_K erwarteten Verschiebung um 59 mV. Anders als bei Faserprotoplasten ($U_{rev} = 30,7$ mV; siehe Kapitel 3.1.2 und 4.1) und Suspensionskultur-Protoplasten ($U_{rev} = 27$ mV; siehe Kapitel 3.2.2, *Tab. 3.3.* und Kapitel 4.2) liegt die Verschiebung von U_{rev} bei den Knospenprotoplasten nahe an dem für PTORK ermittelten Wert von 45 mV (Langer et al., 2002). Da auch bei den Knospenprotoplasten das Umkehrpotential positiv von E_K liegt kann aufgrund der verwendeten Messlösungen auch hier eine Verschiebung durch eine zusätzliche Permeabilität des Kanals für Calcium vermutet werden (siehe Kapitel 4.1 und 4.2, Majore et al., 2002). Außerdem zeigte der Vergleich der für die kleinen (3 mM K⁺; vor dem 14.04.04) und großen Protoplasten (30 mM K⁺; nach dem 14.04.04) bestimmten Aktivierungsschwellen bei steigendem externem Kaliumgehalt eine Verschiebung zu positiveren Membranspannungen (siehe Kapitel 3.3.2, *Abb. 3.26.*). Dieses für kaliumsensitive Kanäle charakteristische Aktivierungsverhalten (siehe Kapitel 1.4, *Abb. 1.4 B*; Gaymard et al., 1998) konnte zusätzlich mit einer vor dem 14.04.04 an einem kleinen Protoplasten durchgeführten Messung bestätigt werden. Eine weitere an einem nach dem 14.04.04 isolierten großen Protoplasten durchgeführte Einzelmessung zur pH-Sensitivität des Kaliumstroms zeigte allerdings anders als für PTORK erwartet keine Änderung des Auswärtsstroms (siehe Kapitel 3.3.2, *Abb.3.28.*). Dieses Verhalten steht in Einklang mit Messungen der Suspensionskultur-Protoplasten (siehe Kapitel 3.2.2, *Abb.3.16.* und Kapitel 4.2). Da auch bei den Knospenprotoplasten die Ursache für das vom externen pH-Wert unabhängige Verhalten des Kaliumausstroms nicht untersucht wurde, ist auch hier eine Vermittlung des Kaliumstroms durch PTORK wahrscheinlich, konnte jedoch nicht eindeutig bewiesen werden.

Wenn auch PTORK nicht eindeutig als der den Kaliumausstrom vermittelnde Kaliumkanal identifiziert werden konnte, so konnte anhand der durchgeführten Patch-Clamp-Untersuchungen zumindest der wegen der hohen Expression von PTORK erwartete spannungsabhängig aktivierte Kaliumausstrom bestätigt werden. Der aufgrund der Expression von *PTK2* und *KPT1* erwartete Kaliumeinstrom konnte hingegen nicht festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte eine unterschiedliche Expression der einzelnen Kanäle in verschiedenen Zelltypen sein. So setzen sich die Knospen bereits aus vielen kleinen Blättern zusammen, die mit voranschreitendem Schwellen der Knospen bei einer Präparation immer deutlicher zu erkennen sind. Die mit zunehmendem Schwellen der Knospen beobachtete steigende Expression des für Schließzellen charakteristischen und eine Kaliumaufnahme vermittelnden *KPT1* ließe sich demnach mit einer voranschreitenden Ausdifferenzierung der Schließzellen erklären. Da jedoch nur die mit vielen Chloroplasten bestückten Mesophyllzellen untersucht wurden, konnte ein entsprechender Einwärtsstrom nicht entdeckt werden. Das Fehlen von *PTK2* artigen schwach spannungsabhängigen Ionenströmen lässt sich hingegen nicht durch zellspezifische oder Jahreszeitlich bedingte Expressionsunterschiede erklären. Insbesondere weil *PTK2* an Dünnschnitten von Pappelknospen in den Blattspreiten (Mesophyllzellen) der embryonalen Blätter nachgewiesen wurde (Langer, K., 2003). Die Ursache für das Fehlen von *PTK2* vermittelten Ionenströmen ist also anderweitig zu suchen und könnte möglicherweise in der pH-Sensitivität des *PTK2*-Kanals zu finden sein. So aktiviert der *in vitro* mit *Xenopus*-Oozyten untersuchte *PTK2* bei Erhöhung des externen pH-Wertes und im Gegensatz zu dem homologen *AKT2/3*-Kanal außerdem bei Ansäuerung des Cytoplasmas (Langer et al., 2002, Geiger, D., persönliche Mitteilung). Da die Untersuchungen jedoch bei einem internem pH-Wert von 7,4 und einem externem pH-Wert von 5,6 durchgeführt wurden, könnte der pH-Wert der verwendeten Messlösungen möglicherweise das Fehlen eines *PTK2* vermittelten Ionenstroms verursachen (siehe Kapitel 2.3.10). Unter der Annahme, dass *PTK2* in den Mesophyllzellen der Knospen exprimiert und sein Ionenstrom lediglich durch die pH-Werte der verwendeten Messlösungen nicht in Erscheinung tritt, könnte ein kaliumabhängiges Wachstum der Mesophyllzellen folgendermaßen ablaufen. Bei Ansäuerung des Cytoplasmas kommt es zu einer *PTK2* vermittelten Kaliumaufnahme in das Cytoplasma. Bei zunehmend alkalischer werdendem Cytoplasma könnte schließlich der bei den Patch-Clamp-Untersuchungen beobachtete auswärts-gerichtete Kaliumstrom aktivieren. Der durch den Kaliumabgabekanal vermutete Einstrom von Calcium in das Cytoplasma könnte analog zu der bei den Suspensionskultur-Protoplasten getroffenen Annahme Kaliumpermeable Ionenkanäle des Tonoplasten aktivieren

(siehe Kapitel 4.2). Aufgrund einer gegenüber der Vakuole angenommenen höheren Kaliumkonzentration des Cytoplasmas könnte dies schließlich zu einer Kaliumaufnahme in die Vakuole mit anschließender Wasseraufnahme und Zellstreckung führen.

4.4 Wurzelprotoplasten

Da für das Pflanzenwachstum die Kaliumaufnahme und der Kaliumtransport in der Wurzel essentiell sind, wurde außerdem begonnen, Protoplasten aus jungen Wurzeln von *Populus tremula x Populus tremuloides* elektrophysiologisch zu charakterisieren. Die enzymatisch aus jungen Wurzeln isolierten transparenten Protoplasten konnten keinem speziellen Zelltyp zugeordnet werden (siehe Kapitel 2.2.4 und 3.4.1). Da die Wurzeln außer an der Schnittstelle nicht verletzt wurden und ein enzymatischer Zellwandabbau nur von außen erfolgte, wurden die Protoplasten vermutlich aus Rhizodermiszellen gewonnen. Von bisherigen Patch-Clamp-Untersuchungen an Wurzelzellen von *Arabidopsis thaliana* ist bekannt, dass Protoplasten aus der Rhizodermis zu zuordnenden Wurzelhaaren bei Depolarisation langsam aktivierte durch GORK vermittelte Kaliumströme zeigen. Darüber hinaus treten bei einer Hyperpolarisation der Membran durch AKT1- und AtKC1 vermittelte stark spannungsabhängig aktivierte einwärts-gerichtete Kaliumströme auf (Ivashikina et al., 2001; Reintanz et al., 2002). Durch Untersuchungen von Zellen der im Inneren der Wurzel gelegenen Stele ist außerdem bekannt dass SKOR, der in diesem Zelltyp exprimiert, auswärts-gerichtete Kaliumströme vermittelt (Gaymard et al., 1998). Passend dazu zeigten Patch-Clamp-Untersuchungen an Protoplasten die aus der Stele von Gerstenwurzeln gewonnen wurden ausschließlich auswärts-gerichtete Kaliumströme (Wegner and De Boer, 1997). Das Wurzelgewebe von *Populus tremula x Populus tremuloides* zeigte nun eine im Vergleich zu anderen Geweben schwache Expression von *PTORK* wo hingegen eine Expression von *PTK2* nicht festgestellt werden konnte (Langer, K., 2003). Die ersten an Wurzelprotoplasten durchgeführten Patch-Clamp-Messungen zeigten, wie aufgrund der Expression von *PTORK* erwartet, bei depolarisierenden Membranspannungen auswärts-gerichtete Ionenströme (siehe Kapitel 3.4.2, Abb. 3.29. und 3.30.). Hyperpolarisierende Membranspannungen ließen hingegen keine Ionenströme erkennen. Das Fehlen dieser Einströme lässt daher vermuten, dass es sich bei den isolierten Protoplasten nicht wie zunächst angenommen um Isolate aus der Rhizodermis sondern um Protoplasten aus der Stele handelte. Ein Vergleich der makroskopischen Ionenströme mit den an *Xenopus*-Oozyten untersuchten Kaliumströmen von *PTORK* zeigten eine Übereinstimmung in Hinblick auf die langsame sigmoide Aktivierungskinetik (siehe Kapitel 3.4.2, Abb. 3.29. und 3.30; Langer et al., 2002). Diese Ähnlichkeit deutet wie bei den Faser-,

Suspensionskultur- und Knospenprotoplasten auf eine Vermittlung des auswärts-gerichteten Ionenstroms durch PTORK-Kanäle hin (siehe Kapitel 4.1, 4.2, und 4.3). Darüber hinaus führte die Erhöhung der externen Kaliumkonzentration von 3 auf 30 mM K^+ zu einer für auswärts-gleichrichtende Kaliumkanäle typischen Reduktion der Ionenströme (siehe Kapitel 3.4.2, *Abb. 3.30.*; Kapitel 1.4, *Abb. 1.4 A/B*; Gaymard et al., 1998). Allerdings wurde gleichzeitig mit der Erhöhung des Kalium-Gradienten auch der pH-Wert der verwendeten Messlösung erhöht (siehe Kapitel 3.4.2.). Unter der Annahme, dass Protonensensitive PTORK-Kanäle diese Ionenströme vermitteln, müsste die Erhöhung des pH-Wertes jedoch anstelle zu einer Abnahme (siehe Kapitel 3.4.2, *Abb. 3.30.*) zu einer Zunahme des Ionenstroms führen (Geiger, D., persönliche Mitteilung). Da aber der Ionenstrom abnimmt lässt das Ergebnis eine pH-Insensitivität des vermittelnden Kanals vermuten und bestärkt die oben angenommene Kaliumsensitivität des Kanals. Dies führt zu der Annahme, dass der in Wurzelprotoplasten beobachtete auswärts-gerichtete Kaliumstrom möglicherweise durch den selben pH-Insensitiven Kaliumkanal vermittelt wird, der auch für die auswärts-gerichteten Kaliumströme der Suspensionskultur- und Knospenprotoplasten verantwortlich ist (siehe Kapitel 4.2 und 4.3). Wird die Existenz einer in Kapitel 4.2 als Ursache für die pH-Insensitivität des Makroskopischen Kaliumausstroms diskutierten beweglichen Protonenbindestelle angenommen, könnte der an Wurzelprotoplasten beobachteten Kaliumausstrom möglicherweise dennoch durch in der Wurzel exprimierte PTORK-Kanäle vermittelt werden. Unter der Annahme, dass es sich bei dem untersuchten Protoplasten um Material aus der Stele handelt könnte der an den Wurzelprotoplasten beobachtete auswärts-gerichtete Ionenstrom analog zu SKOR der Beladung der Gefäße mit Kalium dienen (Gaymard et al., 1998). Um diese aufgrund von zwei Einzelmessungen aufgestellte Hypothese zu stützen sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

4.5 Strahlzellen

Für das sekundäre Dickenwachstum der Bäume ist ein weiterer Zelltyp von besonderer Bedeutung. Strahlzellen vermitteln den radialen Stofftransport und tragen so zur Versorgung der für die Zellteilung zuständigen Kambiumzellen mit benötigten Nährstoffen bei (Lachaud et al., 1999; Mellerowicz et al., 2001). Daher sollte auch dieser Zelltyp mit elektrophysiologischen Untersuchungs-Methoden auf das Vorkommen durch Kaliumkanäle vermittelter Kaliumströme untersucht werden. Besonderes Augenmerk galt dabei den Holzstrahlzellen. Da jedoch die für Patch-Clamp-Untersuchungen benötigten Protoplasten

nicht isoliert werden konnten, wurde begonnen kambiale Zellen mit der Einstichttechnik zu untersuchen um Informationen über in der Plasmamembran befindliche Kaliumkanäle zu erhalten. Durch Entfernen eines kleinen Rindenbereiches an jungen Pappelzweigen konnten kambiale Strahlzellen sowie mit der Zellstreckung beginnende Holzstrahlzellen für die Einstichttechnik zugänglich gemacht werden (siehe Kapitel 2.4.1, *Abb. 2.8.* und Kapitel 2.4.2, *Abb. 2.9.*). Die bereits etwas weiter entwickelten Holzstrahlzellen, für die Christa Wind (Wind, C., 2003) mittels Immunolokalisation der Nachweis des Kaliumkanal PTK2 gelang, konnten wegen der entwicklungsbedingten Zellwandstärke nicht untersucht werden. Gleiches gilt auch für die Kontaktzellen, für die durch Immunolokalisation PTORK nachgewiesen werden konnte (Wind, C., 2003). In den kambialen Strahlzellen, die für die Einstichttechnik benutzt wurden, konnte bislang jedoch keiner der klonierten Pappel-Kaliumkanäle auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden (Wind, C., 2003; Langer, K., 2003). Da sich diese Zellen im Wachstum befinden ist anzunehmen, dass für ihre Zellstreckung Kalium benötigt wird, welches sie vermutlich mit Hilfe einwärts-gerichtete Kaliumströme aufnehmen. Weil die Strahlzellen aber Symplasmatische Verbindungen ausbilden, konnten, anders als bei den Schließzellen (Langer et al., 2004), keine Strommessungen durchgeführt werden. Somit konnten mit der Einstichttechnik nur Membranpotentialmessungen durchgeführt werden und lediglich indirekt auf Kaliumkanäle in der Membran geschlossen werden. Dazu wurde mit ersten Einstichmessungen der Einfluss der über die tangentielle Schnittstelle kontrollierten apoplastischen Kaliumkonzentration auf das Membranpotential untersucht (siehe Kapitel 3.5.1, *Abb. 3.31.*). Die Untersuchungen zeigten mit einer zunehmenden apoplastischen Kaliumkonzentration eine Verschiebung der gemessenen Membranpotentiale in positiver Richtung (siehe Kapitel 3.5.1, *Abb. 3.31. B*). Die beobachtete Verschiebung des Membranpotentials um 12 mV respektive 19 mV in positiver Richtung bei 10facher Erhöhung der externen Kaliumkonzentration stimmt dabei annähernd mit Ergebnissen von *Vicia faba* Siebelementen überein (siehe Kapitel 3.5.1). So verschiebt sich das Membranpotential bei *Vicia faba* bei einer 10fachen Erhöhung des Kaliumgradienten um jeweils 19,5 mV (Ache et al., 2001). Diese kaliumabhängige Verschiebung des Membranpotentials deutet auf eine durch Ionenkanäle vermittelte Kaliumleitfähigkeit der Membran hin. Allerdings weicht die kaliumabhängige Verschiebung des Membranpotentials jedoch deutlich von der kaliumabhängigen Verschiebung des Nernstpotentials für Kalium (E_K) um 59 mV bei einer 10fachen Änderung des Kaliumgradienten ab. Eine Gegenüberstellung der gemessenen Membranpotentiale mit den bei den jeweiligen Kaliumkonzentrationen erwarteten Nernstpotentialen zeigt, dass die *in vivo* bei 10 mM und 100mM externem K^+ gemessenen

Membranpotentiale deutlich negativ von E_K liegen. In Analogie zu den für *Vicia faba* diskutierten kaliumabhängigen Vorgängen des Siebelement/Geleitzellen-Komplexes lässt diese Beobachtung eine Kaliumaufnahme in die untersuchten Strahlzellen vermuten (Ache et al., 2001). Um diese Vermutung jedoch bestätigen oder widerlegen zu können müssten weiterführende Untersuchungen mit spezifischen Kaliumkanal-Blockern wie z.B. Cäsium und Barium durchgeführt werden. So könnte anhand einer potentiellen Sensitivität des Membranpotentials gegenüber Cäsium indirekt auf eine mögliche Beteiligung von Ionenkanälen geschlossen werden die einwärts-gerichtete Kaliumströme vermitteln. Eine potentielle Sensitivität gegenüber Barium könnte im Umkehrschluss auf eine mögliche Beteiligung von Ionenkanälen schließen lassen die auswärts-gerichtete Kaliumströme vermitteln. Darüber hinaus lässt die beobachtete Abweichung des Membranpotentials vom Nernstpotential für Kalium neben der angenommenen Kaliumleitfähigkeit zusätzliche Leitfähigkeiten der Membran für weitere Ionen vermuten (Ache et al., 2001). Keinen erkennbaren Einfluss auf das Membranpotential hatte, ob die Pappelpflanzen ohne Wurzel oder mit Wurzel untersucht wurden (siehe Kapitel 3.5.1). Die anhand von Querschnitten der untersuchten Pflanzen ermittelten kambialen Zellreihen zeigen für die mit Wurzel untersuchte Pappel eine um ein bis zwei Zellreihen reduzierte Ausdehnung des Kambiums gegenüber den ohne Wurzeln untersuchten Pflanzen (siehe Kapitel 3.5.2, Abb. 3.32.). Anhand eines Vergleichs der Zahl kambialer Zellreihen mit den von Wind (Wind, C., 2003) durchgeführten Untersuchungen zur kaliumabhängigen Bildung kambialer Zellen können sowohl mit als auch ohne Wurzel untersuchte Pflanzen als schlecht bis normal mit Kalium versorgt eingestuft werden. Somit spiegelt das Ergebnis die Versorgung der Hydrokulturlpflanzen mit Kalium wieder, die mit $3,5 \text{ mM K}^+$ (siehe Kapitel 2.1.3) etwas unter den von Wind (Wind, C., 2003) für eine Normalversorgung verwendeten 5 mM K^+ lag. Die geringfügigen Unterschiede in der Zahl der Zellreihen der bewurzelten Pflanze und der ohne Wurzeln in Wasser gestellten Pflanzen liegen also in der durch die Kaliumversorgung der Pflanzen möglichen Schwankungsbreite. Im Gegensatz zu Einstichmessungen an Schließzellen (Langer et al., 2004) die aufgrund der exponierten Lage in der Epidermis von außen gut zugänglich sind, konnten die Untersuchungen an den Holzstrahlzellen jedoch nicht ohne eine Verletzung der Pflanze durchgeführt werden. Die Auswirkung dieser Verletzung auf das Membranpotential, ist jedoch ungeklärt. So reagieren z.B. kambiale Zellen auf eine Verletzung mit der Bildung von Wundkallus, der nach ca. zwei Tagen an vor Austrocknung geschützten Wundrändern beobachtet werden konnte.

5. Schlussfolgerung

Die enorme physiologische Bedeutung des transmembranen Kaliumtransportes bei Pflanzen wird von zahlreichen elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigt, die bislang vorwiegend an krautigen Pflanzen wie z.B. *Arabidopsis thaliana* durchgeführt wurden. So wird z.B. die für die Regulation des Gasaustausches verantwortliche Bewegung der Stomata durch Kaliumtransportvorgänge in den Schließzellen gesteuert (Schroeder et al., 2001). Auch für die Beladung des Phloems mit Assimilaten spielt der transmembrane Transport von Kalium eine entscheidende Rolle (Ache et al., 2001). Mit der vorliegenden Arbeit gelang es nun erstmals die elektrophysiologische Untersuchungsmethode „Patch-Clamp-Technik“ zur Klärung baumspezifischer Eigenschaften an dem Modellbaum Pappel einzusetzen (siehe Kapitel 1; Taylor 2002). Werden die an den verschiedenen Zelltypen von *Populus tremula* x *Populus tremuloides* gewonnenen Ergebnisse zunächst allgemein betrachtet, sieht man, dass auch die Physiologie der Bäume entscheidend vom transmembranen Kaliumtransport bestimmt wird. So zeigen die an jungen sich differenzierenden Faserprotoplasten, Suspensionskultur-Protoplasten, Knospenprotoplasten und Zellen kambialer Xylemstrahlen durchgeführten Ionenstrom- bzw. Membranpotential-Messungen, dass

- insbesondere das Wachstum und die Zellentwicklung vorwiegend durch den Kaliumtransport über die Plasmamembran gesteuert wird.
- die über den Kaliumtransport regulierten Wachstumsvorgänge deutlich von der Kaliumernährung beeinflusst werden können.
- neben Kalium möglicherweise auch Calcium bei der Feinregulation der Wachstumsvorgänge eine Rolle spielt.

Werden die Ergebnisse genauer betrachtet zeigte sich, dass der von Kaliumkanälen vermittelte Kaliumtransport über die Plasmamembran für die Regulation des sekundären Dickenwachstums der Bäume und der damit erfolgenden Holzbildung von besonderer Bedeutung ist. So werden während der Zelldifferenzierung insbesondere die Größenentwicklung der verschiedenen Zelltypen des Xylems und infolgedessen auch die Holzeigenschaft durch einen Zelltyp-spezifischen Kaliumtransport reguliert. Dabei ist anzunehmen, dass sich das Zusammenspiel von einwärts- und auswärts-gerichteten Kaliumströmen mit fortschreitender Entwicklung ändert.

Die Ergebnisse von

- Zellen kambialer Holzstrahlen lassen auf einwärts-gerichtete Kaliumströme schließen. Sie deuten an, dass bei kambialen Zellen zum Aufbau des für die Zellstreckung benötigten Turgors Kaliumaufnahme favorisiert ist.
- Protoplasten aus Suspensionskultur zeigen einwärts-gerichtete Kaliumströme. Diese Zellen dienen als Modell für das Kambium und lassen ebenfalls einwärts-gerichtete Kaliumströme zu Beginn der Zellstreckung vermuten.
- Suspensionskultur-Protoplasten deuten darüber hinaus darauf hin, dass bereits zu Beginn der Zellstreckung auch auswärts-gerichtete Kaliumströme eine Rolle spielen. Die Bedeutung könnte dabei einem potentiell über die Kaliumkanäle auftretenden Calciumeinströmen zukommen, der durch Aktivierung von im Tonoplasten befindlichen, kaliumpermeablen Kanälen, möglicherweise die zur Zellstreckung erforderliche Kaliumaufnahme in die Vakuole begünstigt.
- Suspensionskultur-Protoplasten liefern auch Hinweise auf eine mögliche Regulation der bei unterschiedlicher Kaliumernährung von Pappelpflanzen beobachteten Größenunterschiede der Gefäße (Wind, C., 2003). Sie lassen vermuten, dass bei besserer Kaliumversorgung ein verstärkter Kaliumausstrom für die unter diesen Bedingungen beobachteten kleineren Gefäßdurchmesser mit verantwortlich ist.
- Protoplasten aus jungen sich differenzierenden Fasern deuten schließlich darauf hin, dass zumindest gegen Ende der Zellstreckung dieses Zelltyps nur noch auswärts-gerichtete Kaliumströme auftreten. Diese Ergebnisse erklären auch den für Faserprotoplasten beobachteten Rückgang des zellulären Kaliumgehalts sowie die relativ engen Lumina dieses Zelltyps (Wind, C., 2003). Die von C. Wind getroffene Annahme zur Größenregulation der Fasern konnte somit unterstützt werden (Wind, C., 2003). Die Ergebnisse lassen darüber hinaus einen über den Kaliumkanal erfolgenden potentiellen Calciumeinstrom vermuten. In diesem Stadium der Zellentwicklung könnte so möglicherweise die Kaliumabgabe aus der Vakuole an das Cytoplasma und somit auch die weitere Abgabe an den Apoplasten gefördert werden.

- allen mit der Patch-Clamp-Technik untersuchten Protoplastentypen lassen außerdem vermuten, dass die auswärts-gerichteten Kaliumströme, auch wenn die Ionenströme teilweise in ihrer pH-Sensitivität von den *in vitro* Ergebnissen abweichen, wahrscheinlich dennoch durch PTORK-Kanäle vermittelt werden.

In Hinblick auf eine Anlage von Pappelplantagen mit kurzen Umtriebszeiten die immer häufiger zur Deckung des weltweit stark steigenden Holzbedarf diskutiert wird, könnten die mit der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse genutzt werden um die Schnellwüchsigkeit der Pappel mit speziellen Ansprüchen an die Holzqualität zu verbinden. Ansatzmöglichkeiten hierfür liegen in der gezielten Nutzung gentechnisch veränderter Pappeln. So ist aufgrund der oben aufgeführten Erkenntnisse denkbar, dass z.B. eine Überexpression des PTORK-Kanals der sehr wahrscheinlich die auswärts-gerichteten Kaliumströme vermittelt zu einer Änderung von Größe und Anzahl der gebildeten Zellen führt.

Unter der Annahme, einer Überexpression von PTORK

- dürfte sich der Kaliumausstrom der kambialen Zellen zu Beginn der Zellstreckung verstärken. Wie die Ergebnisse von gut mit Kalium versorgten Suspensionskultur-Protoplasten vermuten lassen führt der durch die Überexpression von PTORK verstärkte Kaliumausstrom wahrscheinlich zur Ausbildung deutlich kleinerer Zellen. Ein durch die Ausbildung kleinerer Zellen entstandener Zuwachsverlust wird dabei vermutlich durch eine gesteigerte Zellteilung kompensiert werden. Es ist daher anzunehmen, dass das von Pappeln mit PTORK Überexpression gebildete Holz aufgrund der kleineren und zahlreichen Zellen im Vergleich zu dem herkömmlicher Pappeln deutlich feinporiger ist.
- dürfte sich auch der gegen Ende der Zellstreckung auftretende Kaliumausstrom junger sich differenzierender Fasern verstärken. Es ist anzunehmen, dass die Fasern unter diesen Bedingungen zur Ausbildung dickerer Zellwände angeregt werden und engere Lumina besitzen. Im Vergleich mit dem Holz herkömmlicher Pappeln, dürfte das unter verstärkter PTORK Expression neu gebildete Holz somit deutlich härter und fester sein.

Wie die an Suspensionskultur-Protoplasten gewonnenen Erkenntnisse zur Regulation der, die Kaliumströme vermittelnden Ionenkanäle zeigen, scheint die gebildete Holzqualität auch maßgeblich von der Versorgung der Pappeln mit Kalium beeinflusst zu werden. Unabhängig davon ob für die Anlage von Pappelplantagen nun herkömmliche oder gentechnisch veränderte Pappeln verwendet werden, verdeutlichen die Ergebnisse, dass die gezielte Kaliumdüngung eine nicht zu vernachlässigende Möglichkeit bietet Einfluss auf die Holzqualität zu nehmen. Insbesondere in Hinblick auf einen bei kurzen Umtriebszeiten auftretenden verstärkten Nährstoffaustrag, lassen die gewonnenen Erkenntnisse außerdem kontinuierliche Düngemaßnahmen zur Qualitätssicherung für notwendig erscheinen, bei denen jedoch auch auf eine Ausgewogene Versorgung mit Stickstoff (N), Phosphor (P) und Calcium (Ca) zu achten ist.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Elektrophysiologie des Kaliumtransports über die Plasmamembran an Protoplasten ausgewählter Zelltypen der Modellbaumart *Populus tremula x Populus tremuloides*. Erstmals wurde dabei die Patch-Clamp-Technik an Pappelzellen eingesetzt. Darüber hinaus wurde auch die zur Untersuchung von Membranpotentialen in der intakten Pflanze etablierte Einstichtchnik angewendet. Im Zentrum der Untersuchungen, die insbesondere in Hinblick auf bekannte Kaliumkanäle wie PTORK und PTK2 durchgeführt wurden, standen im Wachstum befindliche Zelltypen aus Kambium, Xylemdifferenzierungszone und Suspensionskultur, sowie Zellen aus Knospe und Wurzel. Für die einzelnen Zelltypen wurden außerdem Methoden zur Protoplastenisolation entwickelt.

In der Whole-cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik untersucht wurden:

- junge sich differenzierende Xylemfasern für die der Kaliumkanal PTORK bereits auf subzellulärer Ebene nachgewiesen worden war (Wind, C., 2003). Die mit einer osmotisch und mechanisch wirkenden Methode isolierten Faserprotoplasten zeigten bei einer Depolarisation der Plasmamembran auswärts-gerichtete Ionenströme mit sigmoider Aktivierungskinetik, die als Kaliumströme identifiziert werden konnten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen annehmen, dass die auswärts-gerichteten Kaliumströme sehr wahrscheinlich durch im Zelltyp exprimierte PTORK-Kanäle vermittelt werden. Eine während der Differenzierung von Faserzellen beobachtete Abnahme der Kaliumkonzentration (Langer et al., 2002; Wind, C., 2003) und die damit in Verbindung stehende Größen- und Formentwicklung der Fasern (Wind, C., 2003; Arend et al., 2005) wird somit sehr wahrscheinlich durch PTORK-Kanäle reguliert. Die Ergebnisse lassen darüber hinaus vermuten, dass die Abnahme des zellulären Kaliumgehaltes (Wind, C., 2003) möglicherweise von einem potentiellen Calciumeinstrom gefördert wird, der die Kaliumabgabe aus der Vakuole an das Cytoplasma durch ein Aktivieren kaliumpermeabler Ionenkanäle des Tonoplasten begünstigt.
- Protoplasten aus Suspensionskultur für die eine Expression der Kaliumkanäle PTORK und PTK2 nachgewiesen worden war (Langer, K., 2003). Während die Expression der beiden Kanalene nicht von der Kaliumernährung der

Suspensionskultur beeinflusst wurde (Langer, K., 2003), hing Größe und Form der neu gebildeten Suspensionskulturzellen sowie die Amplitude der untersuchten Ionenströme deutlich von der Kaliumernährung ab. So konnte bei verbesserter Kaliumversorgung eine Verstärkung der bei depolarisierenden Membranspannungen auftretenden zeit- und spannungsabhängig aktivierten auswärts-gerichteten Kaliumströme mit sigmoider Aktivierungskinetik beobachtet werden. Bei Hyperpolarisation auftretende zeit- und spannungsabhängig aktivierte einwärts-gerichtete Kaliumströme wurden hingegen geschwächt. Während die Ergebnisse trotz Insensitivität der auswärts-gerichteten Kaliumströme gegenüber extrazellulärer Ansäuerung eine Vermittlung durch PTORK-Kanäle vermuten lassen, konnte der einwärts-gerichtete Kaliumstrom keinem konkreten Kanaltyp zugeordnet werden. Das Auftreten einer langsamen Aktivierungskinetik in Verbindung mit einer für PTK2-Kanäle charakteristischen Calciumsensitivität lassen jedoch vermuten, dass der Kaliumstrom von Heterotetrameren zwischen PTK2 und α -Untereinheiten eines möglicherweise zu AKT1 homologen Kaliumkanals vermittelt wird. Eine kaliumabhängige Regulation dieser α -Untereinheit könnte demnach als Ursache für die beobachteten Unterschiede in Zellgröße und Ionenstromstärke verantwortlich sein. So kann die bei guter Kaliumversorgung beobachtete Verstärkung des Kaliumausstroms und die damit in Verbindung stehende Bildung kleinerer Zellen möglicherweise auf eine Reduktion der unbekanntenen α -Untereinheit zurück geführt werden. Darüber hinaus deutet eine Verschiebung des Umkehrpotentials der auswärts-gerichteten Kaliumströme zu positiv vom Nernstpotential für Kalium gelegenen Membranpotentialen auf einen Calciumstrom durch den die auswärts-gerichteten Kaliumströme vermittelnden Kanaltyp hin. Im Falle der Suspensionskulturzellen ist im Gegensatz zu den Fasern jedoch anzunehmen, dass der potentielle Calciumstrom durch Aktivieren kaliumpermeabler Ionenkanäle des Tonoplasten eine Kaliumaufnahme in die Vakuole begünstigt. Werden diese mit der meristematischen Suspensionskultur gewonnenen Erkenntnisse außerdem zur Klärung kambialer Vorgänge herangezogen, kann angenommen werden, dass auch die bei einer verbesserten Kaliumversorgung von Pappeln beobachtete Abnahme der Gefäßquerschnitte (Wind, C., 2003) durch einen verstärkten Kaliumausstrom hervorgerufen wird.

- Protoplasten von im Winter/Frühjahr 2004 austreibenden Knospen für die außerdem eine Expression der Kaliumkanal-Gene *PTORK*, *PTK2* und *KPT1* nachgewiesen wurde (Langer, K., 2003). Mit der voranschreitenden Knospenentwicklung konnte darüber hinaus eine Abnahme der Gewebe-Osmolalität festgestellt werden, was ab dem zweiten Knospenstadium (nach dem 14.04.04) zur Isolation deutlich größerer Protoplasten führte. Bei einer Depolarisation der Membran zeigten die aus den Knospen enzymatisch isolierten Mesophyllprotoplasten zeit- und spannungsabhängig aktivierte auswärts-gerichtete Kaliumströme mit sigmoider Aktivierungskinetik. Gleichzeitig mit der abnehmenden Osmolalität nahm die Stärke dieser Kaliumströme sichtbar zu. Aufgrund des Erscheinungsbildes der Kaliumströme sowie einer gemeinsamen Auswertung von vor dem 14.04.04 isolierten kleinen Protoplasten mit nach dem 14.04.04 isolierten größeren Protoplasten wird trotz einer beobachteten pH-Insensitivität eine Vermittlung dieser Kaliumströme durch *PTORK*-Kanäle vermutet. Darüber hinaus lässt auch bei den Knospenprotoplasten eine positive Abweichung der ermittelten Umkehrpotentiale vom Nernstpotential für Kalium einen möglicherweise durch den die Ausströme vermittelnden Kaliumkanal auftretenden Calciueinstrom vermuten. Dieser könnte in Verbindung mit einem einwärts-gerichteten Kaliumstrom wie bereits für die Suspensionskultur angenommen möglicherweise die Kaliumpermeabilität des Tonoplasten erhöhen und eine Kaliumaufnahme in die Vakuole begünstigen. Allerdings konnten bei hyperpolarisierenden Membranspannungen anders als aufgrund der Expression von *PTK2* und *KPT1* erwartet wurde, keine einwärts-gerichteten Kaliumströme gemessen werden. Für die Kaliumaufnahme benötigte und potentiell durch *PTK2*-Kanäle vermittelte Kaliumeinströme könnten möglicherweise jedoch aufgrund von deaktivierend wirkenden pH-Werten der Messlösungen nicht zu sehen gewesen sein.
- Protoplasten aus jungen Wurzeln für die eine Expression von *PTORK* nachgewiesen worden war (Langer, K., 2003). Erste Messungen der enzymatisch isolierten Protoplasten zeigten bei depolarisierenden Membranspannungen auswärts-gerichtete Ionenströme mit langsam sigmoider Aktivierungskinetik. Anhand der bislang vorliegenden Einzelmessungen kann jedoch lediglich vermutet werden, dass es sich um auswärts-gerichtete Kaliumströme handelt die möglicherweise von *PTORK*-Kanälen vermittelt werden. Ungeklärt bleibt bislang auch die genaue Herkunft der Protoplasten. Aufgrund fehlender Kaliumeinströme kann dennoch vermutet werden,

dass es sich um Protoplasten aus der Stele handelt, die nur auswärts-gerichtete Kaliumströme aufweisen und der Beladung des Xylems mit Kalium dienen.

Die Einstichttechnik wurde zur Untersuchung der nicht für eine Protoplastenisolation zugänglichen

- Parenchymatischen Holzstrahlzellen aus Kambium und zu beginnender Zellstreckung eingesetzt. Für die Untersuchungen wurden unbewurzelte oder bewurzelte intakte Triebe verwendet die entsprechend der verwendeten Nährlösung schlecht bis normal mit Kalium versorgt waren. Durch Entfernen eines kleinen Rindenbereichs zugänglich gemachte Zellen zeigten mit Erhöhung der externen Kaliumkonzentration eine positive Verschiebung des Membranpotentials. Da die ermittelten Membranpotentiale jedoch negativ vom Nernstpotential für Kalium liegen, lassen die Ergebnisse annehmen, dass die Potentialverschiebung möglicherweise durch einen Kaliumeinstrom hervorgerufen wird. Darüber hinaus deutet ein Abweichen der bei der Änderung der externen Kaliumkonzentration auftretenden Membranpotentialdifferenzen von den für das Nernstpotential für Kalium ermittelten Werten eine Beteiligung weiterer Ionen an der aufgetretenen Potentialverschiebung an.

Abschließend kann somit festgestellt werden, dass alle mit der Patch-Clamp-Technik untersuchten Protoplastentypen zeit- und spannungsabhängig aktivierte auswärts-gerichtete Kaliumströme mit langsam sigmoider Aktivierungskinetik zeigten. Es kann außerdem angenommen werden, dass diese Kaliumströme trotz der teilweise beobachteten pH-Insensitivität durch PTORK-Kanäle vermittelt werden die in der Plasmamembran lokalisiert sind. Wachstumsaktive Zellen wie z.B. Suspensionskultur-Protoplasten und möglicherweise auch Knospen- und kambiale Strahlzellprotoplasten zeigen zusätzlich einwärts-gerichtete Kaliumströme.

7. Literatur

Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., Hedrich, R. (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Letters* 486: 93-98.

Ache, P., Becker, D., Deeken, R., Dreyer, I., Weber, H., Fromm, J. and Hedrich, R. (2001) VFK1, a *Vicia faba* K⁺ channel involved in phloem unloading. *The Plant Journal* 27 (6): 571-580.

Allen, G. J. and Sanders, D. (1996) Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *The Plant Journal* 10 (6): 1055-1069.

Arend, M.(2001) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum kaliumabhängigen Holzwachstum bei *Populus trichocarpa* TORR. ET GRAY. Dissertation. Studienfakultät Forstwissenschaft und Ressourcenmanagement der Technischen Universität München. Shaker Verlag, Aachen. 101 S. ISBN 3-8265-9461-4.

Arend, M. and Fromm, J., (2003) Ultrastructural changes in cambial cell derivatives during xylem differentiation in Poplar. *Plant Physiol* 129:1651-1663.

Arend, M., Stinzinger, A., Wind, C., Langer, K., Latz, A., Ache, P., Fromm, J., Hedrich, R., (2005) Polar-localised poplar K⁺ channel capable of controlling electrical properties of wood-forming cells. *Planta* 223 (1): 140-148.

Armstrong, F., Leung, J., Grabov, A., Brearley, J., Giraudat, J. and Blatt, M. R. (1995) Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K⁺ channels is suppressed by *abi1-1*, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase. *PNAS* 92: 9520-9524.

Baizabal-Aguirre, V. M., Clemens, S., Uozumi, N. and Schroeder, J. I. (1999) Suppression of inward-rectifying K⁺ channels KAT1 and AKT2 by dominant negative point mutations in the KAT1 alpha-subunit. *J. Membr. Biol.* 167: 119-125.

Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K., and Hedrich, R. (2004) AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. PNAS 101 (44): 15621-15626

Becker, D., Dreyer, I., Hoth, I., Reid, J. D., Busch, H., Lehnen, M., Palme, K. and Hedrich R. (1996) Changes in voltage activation, Cs⁺ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K⁺ channel KAT1. PNAS 93: 8123-8128.

Bei, Q. and Luan, S. (1998) Functional expression and Characterization of a plant K⁺ channel gene in a plant cell model. The Plant Journal 13 (6): 857-865.

Brüggemann, L., Dietrich, P., Dreyer, I., Hedrich, R. (1999) Pronounced differences between the native K⁺ channels and KAT1 and KST1 α -subunit homomers of guard cells. Planta 207: 370-376.

Chaffey, N (1999a) Cambium: old challenges – new opportunities. Trees 13:138-151.

Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Müller-Röber, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B. and Hedrich, R. (1997) Plant K⁺ Channel α -Subunits Assemble Indiscriminately. Biophysical Journal 72: 2134-2150.

Dünisch, O., Bauch, J., Müller, M. and Greis, O. (1998) Subcellular Quantitative Determination of K and Ca in Phloem, Cambium, and Xylem Cells of Spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) During earlywood and Latewood Formation. Holzforschung 52: 582-588.

Gaymard, F., Cerutti, M., Horeau, C., Lemaillet, G., Urbach, S., Ravallec, M., Devauchelle G., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B. (1996) The Baculovirus/Insect Cell System as an Alternative to *Xenopus* Oocytes. First Characterization of the AKT1 K⁺ Channel from *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry 271 (37): 22863-22870.

Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Micheau-Ferriere, N., Thibaud, J.-B., Sentenac, H. (1998) Identification and Disruption of a Plant Shaker-like Outward Channel Involved in K⁺ Release into the Xylem Sap. Cell 94: 647-655.

Geiger, D., persönliche Mitteilung. Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Julius-von-Sachs-Institut der Julius-Maximilians-Universität Würzburg; Julius-von-Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981) Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100. *Reprint: Sakmann, B. Neher, E. (1983) Appendix. Single-Channel Recording. First edition, Plenum Press, New York 481-496.*

Hedrich, R., Moran, O., Conti, F., Busch, H., Becker, D., Gambale, F., Dreyer, I., Küch, A., Neuwinger, K., Palme, K, (1995) Inward rectifier Potassium Channels in plants differ from their animal counterparts in response to voltage and channel modulators. *European Biophysics Journal* 24: 107-115.

Hedrich, R. and Roelfsema, M.-R. G. (1999) Plant ion transport. In *Encyclopedia of life Sciences*. Available: <http://www.els.net>: Macmillan Reference Ltd

Heß, D., (1999) *Pflanzenphysiologie*. 10. Auflage. Ulmer Verlag Stuttgart 608 S., ISBN 3-8001-2729-6.

Hille, B., (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes, Third Edition*. Sinauer Associates, Inc. USA 814 S., ISBN 0-87893-321-2.

Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P., Sussmann, M. R. (1998) A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition. *Science* 280: 918-921.

Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Bull.* 347: 1-32.

Hosy, E., Duby, G., Very, A.-A., Costa, A., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B. (2005) A procedure for localisation and electrophysiological characterisation of ion channels heterologously expressed in a plant context. *Plant Methods* 1(14): 1-14.

Hoth, S., Geiger, D., Becker, D. and Hedrich, R. (2001) The Pore of Plant K⁺ Channels Is Involved in Voltage and pH Sensing: Domain-Swapping between Different K⁺ Channel α -Subunits. *The Plant Cell* 13: 943-952.

Informationsdienst Holz (September 2001) Holz Rohstoff der Zukunft nachhaltig verfügbar und umweltgerecht, Deutsche Gesellschaft für Holzforschung e.V. München und Holzabsatzfonds Bonn, 32 S.

Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H. H., Hedrich, R. (2001) K⁺ channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Letters* 508: 463-469.

Ivashikina, N., Deeken, R., Fischer, S., Ache, P. and Hedrich, R. (2005) AKT2/3 Subunits Render Guard Cell K⁺ Channels Ca²⁺ Sensitive. *J. Gen. Physiol.* 125: 483-492.

Johansson, I., Wulfetange, K., Porée, F., Michard, E., Gajdanowicz, P., Lacombe, B., Sentenac, H., Thibaud, J.-B., Mueller-Roeber, B., Blatt, M. R. and Dreyer, I. (2006) External K⁺ modulates the activity of the *Arabidopsis* potassium channel SKOR via an unusual mechanism. *The Plant Journal* 46: 269-281.

Kim, E. J., Kwak, J. M., Uozumi, N., and Schroeder, J. I. (1998) AtKUP1: an *Arabidopsis* gene encoding High-Affinity Potassium Transport Activity. *The Plant Cell* 10: 51-62.

Lachaud, S., Catesson, A.-M. And Bonnemain, J.-L. (1999) Structure and functions of the vascular cambium. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences – Series III, Life Science.* 322 : 633-650.

Lacombe, B., Pilot, G., Gaymard, F., Sentenac, H., Thibaud, J.-B. (2000 A) pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. *FEBS Letters* 466: 351-354.

Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H., and Thibaud, J.-B. (2000 B) A Shaker-like K⁺ Channel with Weak Rectification Is Expressed in Both Source and Sink Phloem Tissues of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12: 837-851.

Langer, K., Ache, P., Geiger, D., Stinzinger, A., Arend, M., Wind, C., Regan, S., Fromm, J., and Hedrich, R. (2002) Poplar potassium transporters capable of controlling K^+ homeostasis and K^+ -dependent xylogenesis. *The Plant Journal* 32: 997-1009.

Langer, K. (2003) K^+ -Homöostase und kaliumabhängige Xylogenese in *Populus tremula* x *Populus tremuloides* Michx.. Dissertation Universität Würzburg, 163 S.

Langer, K., Levchenko, V., Fromm, J., Geiger, D., Steinmeyer, R., Lautner, S., Ache, P., and Hedrich, R. (2004) The poplar K^+ channel KPT1 is associated with K^+ uptake during stomatal opening and bud development. *The plant Journal* 37: 828-838.

Latorre, R., Munoz, F., González, C. and Cosmelli D. (2003) Structure and function of potassium channels in plants: some inferences about the molecular origin of inward rectification in KAT1 channels (Review). *Molecular Membrane Biology* 20: 19-25.

Lautner, S. (2005) Bedeutung der Calcium-Versorgung für die Holzdifferenzierung sowie die elektrische Signalleitung in der Pappel. Dissertation Technische Universität München, 136 S.

MacKinnon, R., (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350: 232-235.

Majore, I., Wilhelm, B., Marten I. (2002) Identification of K^+ channels in the plasmamembrane of maize subsidiary cells. *Plant and Cell Physiology* 43 (8): 844-852.

Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I. N., Amtmann, A., Maathius, F. J. M., Sanders, D., Harper, J. F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M. W., Salt, D. E., Kim, S. A. And Guerinot, M. L. (2001) Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis. *Plant Physiology* 126: 1646-1667.

Mäser, P., Gierth, M. & Schroeder J. I. (2002) Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant and soil* 247: 43-54.

Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K. A., Hoshi, T. And Hedrich, R. (1999) AKT3, a phloem-localized K^+ channel, is blocked by protons. PNAS 96: 7581-7586.

Mellerowicz E. J., Baucher, M., Sundberg, B. and Boerjan, W. (2001) Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. Plant Molecular Biology 47: 239-274.

Michard, E., Dreyer, I., Lacombe, B., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B. (2005 A) Inward rectification of the AKT2 channel abolished by voltage-dependent phosphorylation. The Plant Journal 44: 783-797.

Michard, E., Lacombe, B., Porée, F., Mueller-Roeber, B., Sentenac, H., Thibaud, J.-B. and Dreyer, I. (2005 B) A Unique Voltage Sensor Sensitizes the Potassium Channel AKT2 to Phosphoregulation. J. Gen. Physiol. 126 (6): 605-617.

Neher, E. (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. Methods Enzymol 207: 123-131.

Pei, Z.-M., Baizabal-Aguirre, V. M., Allen, G. J. and Schroeder J. I. (1998) A transient outward-rectifying K^+ channel current down-regulated by cytosolic Ca^{2+} in *Arabidopsis thaliana* guard cells. PNAS 95: 6548-6553.

Penner, R.(1995) A practical giude to patch clamping. In: Single channel Recording, 2. Ausgabe, Sakmann, B., & Neher, E. Herausgeber: Plenum Press, New York.

Pottosin, I. I., Martínez-Estévez, M., Dobrovinskaya, O. R. and Muniz, J. (2003). Potassium-selective channel in the red beet vacuolar membrane. Journal of Experimental Botany 54 (383): 663-667.

Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K. and Hedrich, R. (2002) AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel α -subunit modulates root hair K^+ influx. PNAS 99 (6): 4079-4084.

Rodriguez-Navaro, A., (2000) Potassium transport in fungi and plants. Biochimica et Biophysica Acta 1469: 1-30

Roelfsema, M. R., Levchenko, V., Hedrich, R. (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant Journal* 37: 578-588.

Savidge, R.A. (1996) Xylogenesis, genetic and environmental regulation. *IAWA Journal* 17 (3): 269-310.

Schröder, J. I. and Hagiwara, S. (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasmamembrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 338: 427-430.

Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., Waner, D. (2001) Guard Cell Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 627-658.

Schütt, P., Koch, W., (1978) *Allgemeine Botanik für Forstwirte, ein Leitfaden für Studium und Praxis*, Pareys Studentexte Nr. 17, 165 S, ISBN 3-490-08316-4

Shabala, S. (2003) Regulation of Potassium Transport in Leaves: from Molecular to Tissue Level. *Annals of Botany* 92: 627-634.

Siefritz, F., (2002) Expression and Function of the *Nicotiana tabacum* Aquaporin *NtAQP1*. Dissertation Universität Würzburg, 146 S.

URL: <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus/volltexte/2002/305/>

Sigworth, F. J. (1995) Electronic design of the patch clamp. In: *Single Channel Recording*, 2. Ausgabe, Sakmann, B., & Neher, E. Herausgeber: Plenum Press, New York., 95-127.

Sterky, F., Regan, S., Karlsson, J., Hertzberg, M., Rhode, A., Holmberg, A., Amini, B., Bhalerao, R., Larsson, M., Villarroel, R., Van Montagu, M., Sandberg, G., Olsson, O., Teeri, T. T., Boerian, W., Gustafsson, P., Uhlen, M., Sundberg, B. and Lundberg, J. (1998) Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: Analysis of 5,692 expressed sequence tags. *PNAS* 95: 13330-13335.

Stölzle, S. (2003) Licht- und Redoxregulation von Calcium-permeablen Kanälen in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen. Dissertation Universität Würzburg, 127 S.

URL: <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus/volltexte/2003/697/>

Taylor (2002) Populus: Arabidopsis for Forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany* 90: 681-689.

Very, A-A., Gaymard, F., Bosseaux, C., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B. (1995) Expression of a cloned plant K⁺ channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents. *The Plant Journal* 7 (2): 321-332.

Tuominen, H., Östin, A., Sandberg, G., and Sundberg, B. (1994) A Novel Metabolic Pathway for Indole-3-Acetic Acid in Apical Shoots of *Populus tremula* (L.) x *Populus tremuloides* (Michx.). *Plant Physiol.* 106: 1511-1520

Very A-A. and Sentenac H. (2002) Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane *Trends in Plant Science* 7: 168-175.

Walker, D. J., Leigh, R. A. And Miller, A. J. (1996) Potassium homeostasis in vacuolated plant cells. *PNAS Plant Biology* 93: 10510-10514.

Ward, J. M. and 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. *The Plant Cell* 6: 669-683.

Wegner, L. H. and De Boer, A. H. (1997) Properties of Two Outward-Rectifying Channels in Root Xylem Parenchyma Cells Suggest a Role in K⁺ Homeostasis and Long-Distance Signaling. *Plant Physiol.* 115: 1707-1719.

Wind, C., (2003) Die Funktion des Kaliums bei der Holzbildung - Eine anatomisch – physiologische Analyse anhand der Modellbaumart *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.. Dissertation Technische Universität München, 120 S.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.	Tangentiale Aufsicht auf das Kambium eines Pappelhybrids (aus Mellerowicz et al., 2001).....	3
Abb. 1.2.	Familien pflanzlicher Kaliumkanäle (aus Véry and Sentenac, 2002).....	10
Abb. 1.3.	Phylogenetischer Baum pflanzlicher K ⁺ -Kanäle des Shaker-Typs mit hervorgehobenen Pappel-Kanälen und den fünf Unterfamilien (kursiv) aus (Langer, K., 2003).	11
Abb. 1.4.	Stromspuren und Stromspannungskennlinien von <i>Xenopus</i> Oozyten, die den auswärtsgerichteten Kaliumkanal SKOR exprimierten (aus Gaymard et al., 1998)... ..	15
Abb. 1.5.	Stromspuren und Stromspannungskennlinie von KAT1 exprimierenden <i>Xenopus</i> Oozyten (aus Latorre et al., 2003).....	16
Abb. 1.6.	Stromspuren und Stromspannungskennlinie von AKT2/3 exprimierenden <i>Xenopus</i> Oozyten (aus Lacombe et al., 2000).....	17
Abb. 2.1.	Präparation eines Internodiums von <i>Populus tremula</i> L. x <i>Populus tremuloides</i> Michx. zur Isolation von Faserprotoplasten.....	25
Abb. 2.2.	Die vier gebräuchlichsten Patch-Clamp-Konfigurationen (in Anlehnung an Hamill et al. 1981).....	31
Abb. 2.3.	Schaltkreis eines Patch-Clamp-Vorverstärkers (nach Sigworth, 1995).....	32
Abb. 2.4.	Ersatzschaltbild der Plasmamembran in der Ganzzelleableitung	32
Abb. 2.5.	Reversible Vorgänge an Mess- und Referenzelektrode	34
Abb. 2.6.	Einfachspannungspulsprotokoll.	39
Abb. 2.7.	Doppelspannungspulsprotokoll.....	40
Abb. 2.8.	Präparation einer Hydrokulturpflanze für Membranpotentialmessungen.....	47
Abb. 2.9.	Einstich in eine Strahlzelle der Expansionszone (Schemazeichnung)	48
Abb. 2.10.	EDXA-Spektrum.....	52
Abb. 3.1.	Isolation von Protoplasten aus jungem Xylem.....	54
Abb. 3.2.	Mittlerer Durchmesser von Faserprotoplasten in Abhängigkeit von der Osmolalität.	55
Abb. 3.3.	Lichtmikroskopisch untersuchte Tangentialschnitte.....	56
Abb. 3.4.	Depolarisationsaktivierte, auswärts-gerichtete Ganzzellströme eines Faserprotoplasten.	59
Abb. 3.5.	Zeit- und spannungsabhängige Inaktivierung des auswärts-gerichteten Ionenstroms von Faserprotoplasten.....	60
Abb. 3.6.	Einfluss von Barium auf die Gleichgewichtsströme von Faserprotoplasten.....	61
Abb. 3.7.	Repräsentativer Protoplast aus SuK II versorgter Suspensionskultur	62
Abb. 3.8.	Stromspuren von Suspensionskulturprotoplasten	64

Abb. 3.9.	Suspensionskultur: Abhängigkeit der Stromamplitude von der Kaliumversorgung.....	66
Abb. 3.10.	Cäsium-Block der einwärts-gerichteten Ionenströme.....	67
Abb. 3.11.	Einfluss des externen Kaliumgehaltes auf den Ioneneinstrom.....	67
Abb. 3.12.	Spannungsabhängiger Ca^{2+} -Block der einwärts-gerichteten Ionenströme.....	68
Abb. 3.13.	Aktivierungskinetik auswärts-gerichteter Ionenströme	70
Abb. 3.14.	Bestimmung des Umkehrpotentials der Auswärtsströme bei verschiedenen externen Kaliumkonzentrationen	71
Abb. 3.15.	Spannungsabhängigkeit der auswärts-gerichteten Ionenströme von SuK I-Protoplasten.....	72
Abb. 3.16.	Auswirkung des externen pH-Wertes auf die auswärts-gerichteten Ionenströme von SuK II-Protoplasten.....	73
Abb. 3.17.	Einfluss der Kaliumernährung auf die Morphologie der Suspensionskulturzellen	74
Abb. 3.18.	Einfluss der Kaliumversorgung auf den relativen Kaliumgehalt des Kallusgewebes.....	75
Abb. 3.19.	Isolierung verschiedener Knospenprotoplasten im Versuchsverlauf.....	77
Abb. 3.20.	Knospenprotoplasten Isolation vom 28.03.2004.....	78
Abb. 3.21.	Mittlerer Durchmesser von Knospenprotoplasten vor und nach dem 14.04.2004.....	79
Abb. 3.22.	Knospenprotoplasten zeigen auswärts-gerichtete Ionenströme.	81
Abb. 3.23.	Inaktivierung des auswärts-gerichteten Ionenstroms bei verlängerten Testpulsen.....	82
Abb. 3.24.	Bariumblock.....	83
Abb. 3.25.	Umkehrpotentiale und Nernstpotentiale bei verschiedenen externen Kaliumgehalten	84
Abb. 3.26.	Kaliumabhängigkeit des Aktivierungspotentials.	85
Abb. 3.27.	Spannungsabhängige relative Offenwahrscheinlichkeit (rel. P_o).....	86
Abb. 3.28.	Auswirkung des externen pH-Wertes auf die Auswärtsströme von Knospenprotoplasten.....	87
Abb. 3.29.	Auswärtsströme von Wurzelprotoplasten	88
Abb. 3.30.	Kaliumabhängiges Verhalten des auswärts-gleichrichtenden Ionenstroms eines Wurzelprotoplasten	89
Abb. 3.31.	Mit der Einstichttechnik an Strahlzellen durchgeführte Membranpotentialmessungen.	91
Abb. 3.32.	Querschnitte aus dem Messbereich der Einstichuntersuchungen.	92
Abb. 4.1.	Stromspuren und relative Stromspannungskennlinien von <i>Xenopus</i> -Oozyten, die den schwach spannungsabhängigen PTK2-Kanal exprimierten (aus Langer et al., 2002).	

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1.	Auflistung der Protoplastenspezifischen Isolationsbedingungen.....	28
Tab. 2.2.	Auflistung aller untersuchten Protoplastentypen und der dafür verwendeten Patch-Clamp-Lösungen.....	45
Tab. 3.1.	Stromrichtung der untersuchten Suspensionskultur-Protoplasten in Abhängigkeit von der Kaliumversorgung.....	65
Tab. 3.2.	Ca ²⁺ -Block, in Abhängigkeit von der Kaliumversorgung der Suspensionskultur. ...	69
Tab. 3.3.	Umkehrspannungen (U_{rev}) und Nernstpotentiale für Kalium (E_K) des Auswärtsstromes von SuK I-Protoplasten in Abhängigkeit von der externen K ⁺ -Konzentration.....	71
Tab. 3.4.	Lösungsbedingungen, unter denen die Ganzzelleableitungen an Knospenprotoplasten durchgeführt wurden.	80

8.3 Veröffentlichungen

Langer, K., Ache, P., Geiger, D., Stinzinger, A., Arend, M., Wind, C., Regan, S., Fromm, J., Hedrich, R. (2002) Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺ dependent xylogenesis. *The Plant Journal*, 32, 997-1009.

Arend, M., Stinzinger, A., Wind, C., Langer, K., Latz, A., Ache, P., Fromm, J., Hedrich, R., (2005) Polar-localised poplar K⁺ channel capable of controlling electrical properties of wood-forming cells. *Planta* 223 (1): 140-148.

Stinzinger A., Geiger D., Ache P., Fromm J. und Hedrich R., (2002) Potassium dependent wood formation - Functional characterization of potassium channels in poplar : Botanikertagung – Freiburg im Breisgau 07 -53 (Poster)

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Andrea Stinzing
 Geburtsdatum 26.05.1974
 Geburtsort Würzburg
 Familienstand verheiratet
 Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung:

1980-1989 Besuch der Klassen 1-9 in der freien Waldorfschule Würzburg
 1989-1993 Besuch der Klassen 10-13 im St. Ursula Gymnasium Würzburg
 09.07.1993 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung:

1993-1995 Ausbildung zur Gärtnerin Fachrichtung Garten- und Landschaftsbau (GaLaBau)
 01.08.1995 Abschluss der Ausbildung als Gärtnergesellin Fachrichtung GaLaBau

Hochschulbildung:

1995-2000 Studium der Forstwissenschaft an der LMU- und an der TU-München
 28.09.2000 Abschluss des Studiums als Diplom Forstwirt Univ.

Berufstätigkeit:

01.11.2000 – 28.02.2001 tätig als Landschaftsgärtnerin im väterlichen Betrieb in Würzburg
 01.03.2001 – 14.08.2004 Wissenschaftliche Angestellte an der Technischen Universität München, Fachgebiet Angewandte Holzbiologie und am Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg
 01.03.2001 Beginn der Dissertation an der Technischen Universität München, Fachgebiet Angewandte Holzbiologie
 01.09.2005 tätig als Landschaftsgärtnerin im väterlichen Betrieb in Würzburg

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre weiterhin, dass ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, November 2006

(Andrea Stinzing)