

Vom Reagenzglas zum subzellulären Kompartiment Moderne Methoden zur Untersuchung der Regulation des Mineralstoffwechsels

Andreas J. MEYER

Die übergeordnete Bedeutung des Mineralstoffwechsels für Wachstum und Entwicklung von Pflanzen ist seit langem gut untersucht und verstanden. Dennoch bleiben eine Vielzahl offener Fragen zur Regulation des Mineralstoffwechsel und zur Kompartimentierung auf der Ebene der Organe und auch innerhalb einzelner Zellen. Am Beispiel des Calciums und des Schwefels wird aufgezeigt, in welcher Form neue Methoden den direkten Zugang zu einzelnen Zellen und letztlich auch zu subzellulären Kompartimenten ermöglichen. Insbesondere sind dabei neue fluoreszenzbasierte mikroskopische Verfahren geeignet, die Regulation des Mineralstoffwechsels auf dieser Mikroebene zu studieren.

MEYER A. J., 2008: From the test-tube to the subcellular compartment: modern methods for examining the regulation of mineral metabolism.

The general importance of mineral metabolism for the to growth and development of plants has been intensively investigated for a long time and is well known. However, many questions concerning the regulation of mineral metabolism and ion compartmentation on the organ as well on the cellular level remain open. Calcium and sulphur are used as examples to show how new methods allow direct access to single cells or even to subcellular compartments. Fluorescence-based staining methods are especially appropriate for studying micro-scale phenomena of mineral metabolism.

Keywords: Calcium, sulphur, glutathione, regulation, subcellular compartmentation, fluorescence marking.

Vorbemerkungen

Es ist eine große Ehre in einem Symposium zum Gedächtnis an Prof. Helmut KINZEL vorzutragen zu dürfen. Dies gilt insbesondere deshalb, weil ich erst sehr spät und dann auch nur indirekt über KINZELS Schülerin Marianne POPP in den weiten Kreis der wissenschaftlichen KINZEL-Familie gestoßen bin und zudem nie die Gelegenheit hatte, Helmut KINZEL persönlich kennen zu lernen. Nichtsdestotrotz waren für mich Ideen KINZELS und erste experimentelle Untersuchungen von Wolfgang BURESCH in dessen Labor der entscheidende Einstieg in den Mineralstoffwechsel der Pflanzen und in eine weitere wissenschaftliche Arbeit. Dafür sei an dieser Stelle Helmut KINZEL und Marianne POPP, die mich mit den wissenschaftlichen Arbeiten KINZELS zum Mineralstoffwechsel insgesamt und zur ökophysiologischen Relevanz des Calciums im speziellen bekannt gemacht hat, herzlich gedankt.

Einleitung

Mineralstoffe sind essenziell für das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen. Die Aufnahme der Mineralstoffe in die Pflanze über die Wurzel bildet dabei die wichtige Schnittstelle zwischen Pflanzenphysiologie und Biochemie auf der einen und Bodenkunde auf der anderen Seite. Damit wird auch unmittelbar die Bedeutung des Mineralstoffwechsels und seiner molekularen Grundlagen für die Anpassung von Pflanzen an spezielle Standortbedingungen deutlich, und es wird zudem ersichtlich, wie bedeutend

dieses Wissenschaftsgebiet sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die angewandte Wissenschaft ist.

Abgesehen von CO_2 werden alle Mineralstoffe, die die Pflanze zum Wachstum benötigt, über die Wurzel aus der Bodenlösung aufgenommen und dann in der Pflanze verteilt. Die unlöslichen Bestandteile des Bodens wie Quarz und Tonminerale besitzen eine Speicherfunktion für anorganische Ionen, sind aber für das Wachstum der Pflanze nicht essenziell. Sowohl die in der Pflanze häufigen Makroelemente als auch die benötigten essenziellen Mikroelemente können aus einer Nährlösung direkt aufgenommen werden. Die damit verbundene Möglichkeit, Pflanzen in hydroponischen Kulturen zu halten, hat seit den Anfängen der Pflanzenernährungsforschung ein hervorragendes experimentelles System zur Untersuchung des Nährstoffbedarfs geboten. Die Funktion der verschiedenen Elemente im pflanzlichen Stoffwechsel und die Verteilung der Ionen zwischen den verschiedenen Organen ist in weiten Teilen gut verstanden. Es bleiben aber dennoch viele offene Fragen in Bezug auf die molekularen Grundlagen der Kompartimentierung innerhalb der Organe, die subzelluläre Kompartimentierung des Mineralstoffwechsels innerhalb der einzelnen Zellen und die Regulation der beteiligten Prozesse.

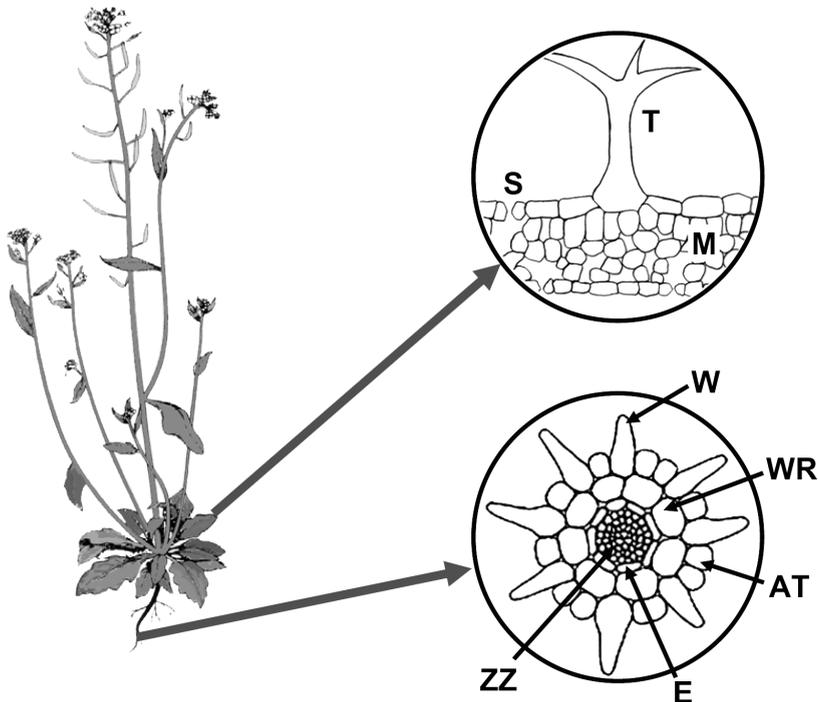


Abb. 1: Schematische Darstellung des zellulären Aufbaus von Wurzeln und Blättern in *Arabidopsis thaliana*. Der Pflanzenkörper ist in verschiedene Organe (Wurzel, Spross, Blüte) untergliedert, und alle Organe bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen mit sehr verschiedenen spezifischen Funktionen. M = Mesophyll, T = Trichom, S = Stomata, W = Wurzelhaare, AT = Atrichoblasten, WR = Wurzelrinde, E = Endodermis, ZZ = Zentralzylinder. – Fig. 1: Schematic presentation of the cellular structure of *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. The plant body is divided into different organs (root, shoot, flower), and every organ consists of a multitude of different cell types with distinct functions. M = mesophyll, T = trichome, S = stomata, W = root hairs, AT = atrichoblasts, WR = root cortex, E = endodermis, ZZ = central cylinder (stele).

Ein grundsätzliches Problem bei der Untersuchung des pflanzlichen Mineralstoffwechsels ist die zelluläre Heterogenität der Gewebe (Abb. 1). Es ist kein Problem, die Gesamtaufnahme von Ionen in die Pflanze zu messen oder den Gehalt an wasserlöslichen oder auch gebundenen Ionen in den verschiedenen Organen wie Wurzeln, Blättern oder auch Blüten zu bestimmen. Bei genauerem Hinsehen fällt aber unmittelbar auf, dass all diese Organe aus unterschiedlichen Geweben mit einer Vielzahl verschiedener Zelltypen bestehen. So finden sich in der Rhizodermis bereits Zellen, die zu Wurzelhaaren auswachsen (Trichoblasten), neben Zellen, die keine entsprechende Differenzierung durchlaufen (Atrichoblasten). Beide Zelltypen unterscheiden sich wiederum von den Zellen der Wurzelrinde und der Endodermis. Auch der von der Endodermis umschlossene Zentralzylinder enthält mit den Zellen des Xylems und des Phloems sowie Parenchymzellen eine große Zahl verschiedener Zelltypen (Abb. 1). In gleicher Weise finden sich auch im Blatt verschiedene Gewebe mit einer wechselnden Zahl an unterschiedlichen Zelltypen. Das von der Epidermis eingeschlossene Mesophyll gliedert sich in einem typischen Laubblatt in Schwammparenchym und Palisadenparenchym, deren Zellen sich morphologisch und physiologisch unterscheiden. In anderen Ausprägungen, etwa den C4-Pflanzen, treten mit normalen Mesophyllzellen und speziellen Bündelscheidenzellen ebenfalls deutliche Unterschiede zutage. In wieder anderen Fällen, wie bei vielen sukkulenten Arten, finden sich im Mesophyll ausgeprägte Wasserspeichergewebe mit charakteristischen Zelltypen, die nicht oder nur marginal zur Photosynthese beitragen. Die das Blatt nach außen begrenzende Epidermis besitzt mit den Stomata und in vielen Fällen mit verschiedensten Formen von Trichomen und Emergenzen hoch spezialisierte Zelltypen, die sich in Physiologie und Morphologie erneut von allen anderen Zelltypen unterscheiden (Abb. 1). Dass solche spezialisierten Zelltypen eine wichtige Funktion im Mineralstoffwechsel innehaben, wird am Beispiel der Salzdrüsen vieler Halophyten, wie zum Beispiel *Limonium vulgare* oder der Mangrovenart *Avicennia marina* deutlich. Ohne diese Salzausscheidungsmechanismen wären diese Pflanzen nicht lange in der Lage, den hohen Salzgehalten im Meerwasser zu widerstehen. Während es kein Problem ist, die gesamte Pflanze oder auch einzelne Organe hinsichtlich ihres Mineralstoffwechsels zu untersuchen, bereitet die Unterscheidung der vielen spezialisierten Zelltypen größere Probleme. Diese Zellen, die häufig als Einzelzellen oder nur in kleinen Gruppen auftreten, können nicht einfach isoliert und separat betrachtet werden. Moderne hoch auflösende Methoden wie EDX-Mikroanalyse (energy dispersive X-ray spectroscopy), micro-PIXE (particle induced X-ray emission; KRÄMER et al. 1997) und Lasermikrodissektion mit anschließender Einzelzellanalytik (OUTLAW & ZHANG 2001) erlauben zwar inzwischen Bestimmungen des Gehalts an verschiedenen Ionen in einzelnen Zellen, doch diese Methoden haben alle den Nachteil, dass das Gewebe jeweils fixiert und eingebettet werden muss und somit letztlich tote Zellen untersucht werden. Ein weiterer Ansatz über die Entnahme von Zellsaft aus einzelnen Zellen mittels Mikrokapillaren (TOMOS & LEIGH 1999) arbeitet bereits mit lebenden Zellen, allerdings werden auch hier die Zellen im Verlauf der Messung unweigerlich zerstört. Diese Vorgehensweisen machen es somit sehr schwer, Rückschlüsse auf dynamische Vorgänge in den jeweiligen Zellen und auch Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen zu ziehen. Ein umfassendes Verständnis dynamischer Prozesse in einzelnen Zellen und deren Integration in das umgebende Gewebe und die gesamte Pflanze kann nur durch Untersuchungen an lebenden Zellen erlangt werden. Hierzu bieten sich zurzeit im wesentlichen zwei experimentelle Ansätze an: zum einen die Verwendung ionenselektiver Elektroden und zum anderen fluoreszenzmikroskopische Methoden. Die Verwendung von ionenselektiven Elektroden erlaubt die Untersuchung sowohl intra-

zellulärer Ionenpools als auch des Membrantransports von Ionen in einzelnen Zellen (MILLER et al. 2001, FELLE 1993). Mit ionenselektiven Elektroden können allerdings in der Regel nur sehr kleinräumige Aussagen über einzelne Zellen getroffen werden. Fluoreszenzmikroskopische Ansätze basieren in der Regel auf der Verwendung ionenspezifischer Fluoreszenzfarbstoffe, die in sehr verschiedener Weise in die Zellen geladen werden können (FRICKER et al. 2001). Diese Methode bietet gegenüber elektrophysiologischen Ansätzen den großen Vorteil, dass in der Regel viele verschiedene Zellen gleichzeitig im lebenden Zustand untersucht werden können (FRICKER & MEYER 2001). Die Entwicklung von neuen transgenen Indikatoren auf der Basis fluoreszierender Proteine (TSIEN 1998) versprechen zudem die Möglichkeit, auch die Vorgänge in einzelnen subzellulären Kompartimenten aufzulösen, da sich die Indikatoren nach Transformation der zu untersuchenden Pflanzen gezielt in ganz bestimmte Kompartimente transportieren lassen. Wenn die mikroskopischen Untersuchungen zusätzlich mit Ansätzen der Modellierung kombiniert werden, ergibt sich damit ein sehr großer ‚Wirkungsbereich‘ der Mikroskopie (Abb. 2).

Naturgemäß kann ein kurzes Manuskript bzw. ein kurzer Vortrag niemals das Gesamtgebiet des Mineralstoffwechsels abdecken. Dafür sei an dieser Stelle auf die Standardwerke zum Mineralstoffwechsel der Pflanzen von KINZEL (1982), MARSCHNER (1995) und EPSTEIN & BLOOM (2005) verwiesen. Hier soll vielmehr der Versuch unternommen werden, an zwei Beispielen das Problem der Kompartimentierung in pflanzlichen Organen und insbesondere auch auf der subzellulären Ebene innerhalb der pflanzlichen Zellen exemplarisch darzustellen und neue Ansätze zur Untersuchung dieser Kompartimentierung aufzuzeigen. Die dazu gewählten Beispiele sind das Calcium, das den unmittelbaren Anknüpfungspunkt an KINZELS Arbeiten darstellt, und das Sulfat als Beispiel für die Anionen.

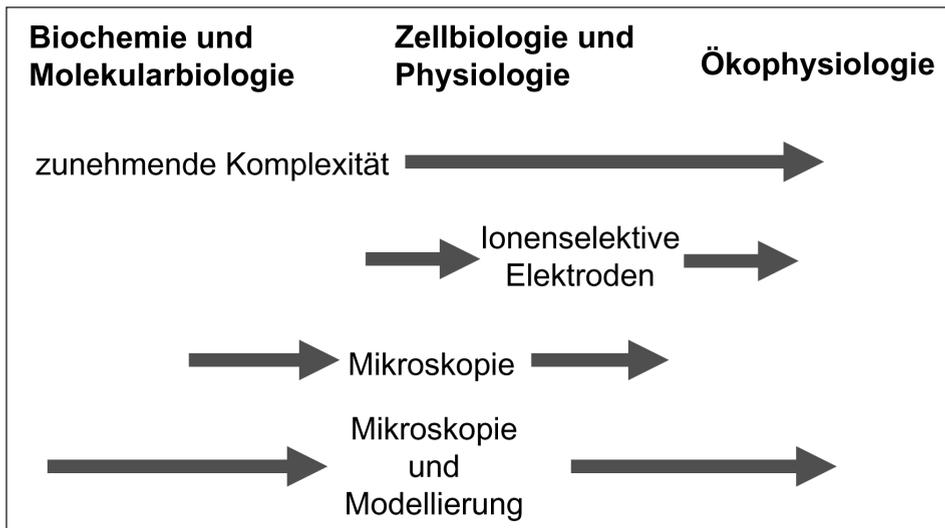


Abb. 2: Schematische Darstellung der technischen Einsatzmöglichkeiten ionenselektiver Elektroden und mikroskopischer Ansätze zur Analyse unterschiedlich komplexer biologischer Systeme.
– Fig. 2: Schematic presentation of the possibilities to use ion-sensitive electrodes and microscope techniques to analyse biological systems of varying complexity.

1. Kompartimentierung

Ein Großteil unseres Wissens über den pflanzlichen Mineralstoffwechsel basiert auf der Untersuchung von Extrakten ganzer Pflanzen oder zumindest ganzer Organe. Obwohl sehr hilfreich für das Gesamtverständnis des Mineralstoffwechsels, gelingt es mit den dabei angewendeten Methoden aber nicht, detaillierte Informationen zu gewinnen, die die zelluläre Heterogenität der verschiedenen Organe und auch die subzelluläre Kompartimentierung berücksichtigen. Im Zusammenhang mit dem Mineralstoffwechsel sind dabei auf der zellulären Ebene insbesondere die Plastiden als entscheidende Organellen für die Assimilation anorganischer Anionen wie Nitrat und Sulfat sowie die Vakuole als Ort der Ionenspeicherung zu sehen. Mit der Ionenspeicherung in der Vakuole hat KINZEL sich insbesondere in Zusammenhang mit seinen langjährigen Arbeiten zum Calcium und der physiologischen und ökologischen Bedeutung von verschiedenen Formen der Calciumablagerung befasst.

2. Calcium – Aufnahme und Kompartimentierung

Der Begriff ‚calcitroph‘ wurde zuerst von IJIN für Pflanzen vorgeschlagen, deren Zellsäfte große Mengen wasserlöslichen Calciums enthalten (vgl. KINZEL 1982). Nach HORAK & KINZEL (1971) ist der calcitrophe Physiotypus definiert durch ein molares Verhältnis des K^+ zum wasserlöslichen Ca^{2+} von kleiner als 1. Zu diesem Physiotypus zählen unter anderem die Crassulaceen, viele Vertreter der Fabaceen und Brassicaceen, sowie die Gattungen *Aloe*, *Plectranthus* und *Clusia* (HORAK & KINZEL, 1971, VON WILLERT et al. 1992, HERPPICH 1989, BALL et al. 1991, KINZEL 1989). In besonders deutlicher Form tritt die Ausprägung des calcitrophen Physiotypus in einigen Vertretern südafrikanischer Crassulaceen und Liliaceen hervor, die allesamt den Crassulaceen Säurestoffwechsel (CAM) zur CO_2 -Fixierung verwenden (Tab. 1).

Die Ca^{2+} -Konzentration im Zellsaft dieser Pflanzen kann dabei die K^+ -Konzentration bis auf mehr als das 15fache übersteigen, und die Zellsäfte können bis weit über 100 mol m^{-3} an wasserlöslichem Ca^{2+} enthalten. Diese hohen Konzentrationen an im Zellsaft gelöstem Ca^{2+} stehen submikromolaren Konzentrationen an freiem Ca^{2+} gegenüber, die im Cytoplasma mit ionenselektiven Elektroden (FELLE 1988, 1989) oder Ca^{2+} -spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen (GILROY 1997) gefunden wurden. Diese sehr niedrigen Konzentrationen im Cytoplasma sind erforderlich, damit das Ca^{2+} im Cytoplasma eine Vielzahl regulatorischer Funktionen ausüben kann. Der größte Teil des aufgenommenen Ca^{2+} befindet sich im Bereich der Zellwand und damit außerhalb der lebenden Zelle (BUSH & McCOLL 1987, CLELAND et al. 1990, KINZEL 1989) sowie in der Vakuole (CLARKSON & HANSON 1980, GILROY et al. 1993) (Abb. 3). Die Vakuole stellt damit das wichtigste intrazelluläre Speicherkompartiment für wasserlösliches Ca^{2+} in calcitrophen Pflanzen dar (KINZEL 1989).

Tab. 1: Gehalte an im Zellsaft gelöstem Ca^{2+} und K^+ (in mol m^{-3}) in verschiedenen Liliaceen und Crassulaceen an einem natürlichen Standort in der südlichen Namibwüste (n=3). – Table 1: Concentrations of soluble Ca^{2+} und K^+ (in mol m^{-3}) in various Liliaceae and Crassulaceae at their natural habitats in the southern Namib desert (n=3).

	Ca^{2+}	K^+
<i>Aloe ramosissima</i>	175.1 ± 13.6	60.9 ± 7.9
<i>Aloe pillansii</i>	143.5 ± 10.1	9.1 ± 1.2
<i>Crassula sp.</i>	25.2 ± 1.9	10.6 ± 0.6
<i>Crassula expansa</i>	130.8 ± 7.9	43.1 ± 4.0

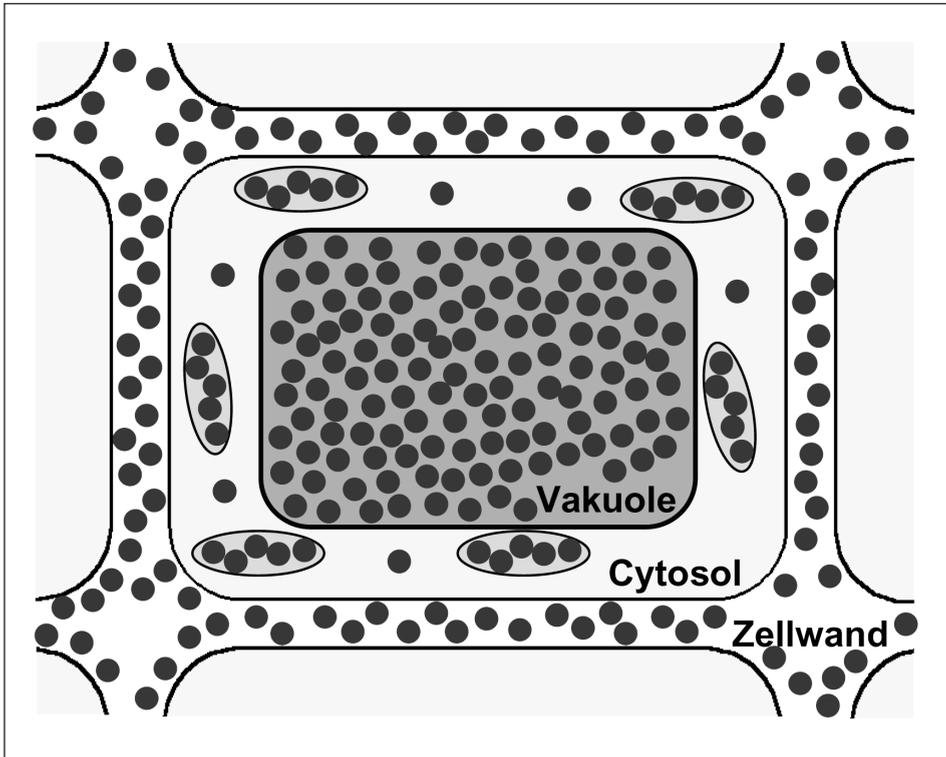


Abb. 3: Schematische Repräsentation einer pflanzlichen Zelle mit der typischen Verteilung von Ca^{2+} (schwarze Punkte) (verändert nach KINZEL, 1989). – Fig. 3: Schematic presentation of a plant cell showing the typical distribution of Ca^{2+} (black dots) (modified after KINZEL, 1989).

Die Balance zwischen Kationen und Anionen in der Vakuole wird dabei häufig durch die Synthese größerer Mengen von Malat, Citrat und anderer organischer Säuren ausgeglichen, die im Gegensatz zum wasserunlöslichen Ca^{2+} -Oxalat mit Ca^{2+} wasserlösliche Komplexe bilden (KINZEL 1989). BURESCH konnte zeigen, dass sowohl Malat als auch Citrat effektive Ca^{2+} -Chelatoren sind und dass von der gesamten wasserlöslichen Fraktion des Ca^{2+} im Zellsaft von *Kalanchoë daigremontiana* (100 mmol l^{-1}) tatsächlich nur etwa 20 % in freier Form vorliegen (KINZEL 1989). Da in einigen anderen calciotropen CAM-Spezies ebenfalls große Mengen an Isocitrat (z. B. in *Aloe* sp.) oder auch Malonat (z. B. in *Plectranthus marruboides*) gefunden wurden, war es für das Verständnis der Akkumulation dieser Säureanionen erforderlich, ihre Fähigkeit zur Komplexbildung von Ca^{2+} zu untersuchen. Insbesondere für das Isocitrat war die Funktion als Ca^{2+} -Chelator nahe liegend, da zuvor bereits eine signifikante Korrelation zwischen Ca^{2+} -Gehalt und Isocitrat für verschiedene Crassulaceen (RÖSSNER & POPP 1986, VON WILLERT et al. 1992) sowie für Vertreter der Gattung *Aloe* (Liliaceae) nachgewiesen werden konnte (VON WILBERT et al. 1992).

Durch Messung mit Ca^{2+} -selektiven Elektroden konnte gezeigt werden, dass in vitro 50 mmol l^{-1} Citrat bei pH 4,8 95 % des in der Lösung vorhandenen Ca^{2+} komplexierten, so dass von ursprünglichen 10 mmol l^{-1} nur noch $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ als freie Ca^{2+} -Ionen vorlagen. Im Vergleich dazu verblieben bei Zugabe von 50 mmol l^{-1} Isocitrat noch etwa $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$

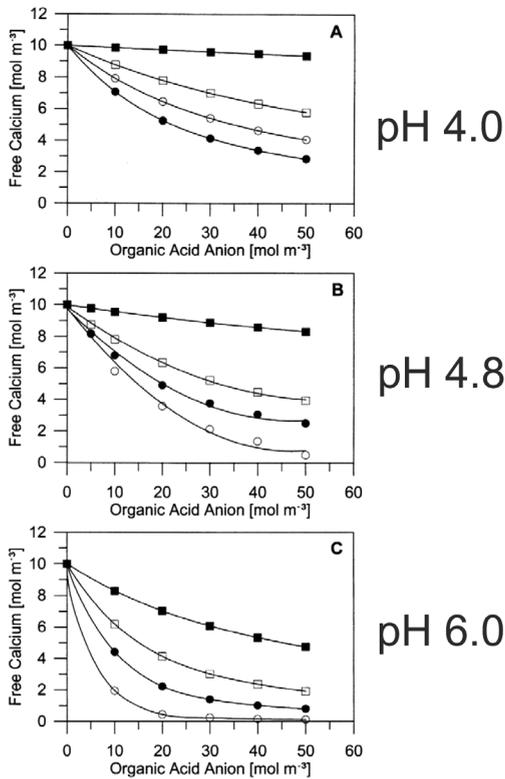


Abb. 4: Komplexierung von Ca²⁺ durch verschiedene organische Di- und Tricarbonsäureanionen bei einem pH von 4,8. Die Konzentration freier Ca²⁺-Ionen wurde mit Hilfe einer Ca²⁺-selektiven Elektrode gemessen (n = 5). (○) Citrat, (●) Isocitrat, (□) Malat, (■) Malonat (verändert nach MEYER & POPP 1997). - Fig. 4: Complexation of Ca²⁺-ions by various di- and tricarbonsic acids at pH 4.8. The concentration of free Ca²⁺-ions was measured by means of a Ca²⁺-selective electrode (n=5). (○) citrate, (●) isocitrate, (□) malate, (■) malonate (modified after MEYER & POPP 1997).

in der freien Form. Das Dicarbonsäureanion Malat war hinsichtlich der Ca²⁺-Komplexierung weniger effektiv, aber immer noch in der Lage, bei pH 4,8 mehr als 50 % des Ca²⁺ zu binden. Dagegen war Malonat bei pH 4,8 kaum noch in der Lage Ca²⁺ zu komplexieren (Abb. 4). Berechnungen basierend auf den Stabilitätskonstanten zeigten aber, dass bei abnehmendem Säuregrad die Fähigkeit des Malonats Ca²⁺ zu komplexieren zunimmt. So sind 50 mmol l⁻¹ Malonat bei pH 6,0 in der Lage 50 % des Ca²⁺ in einer 10 millimolaren Ca²⁺-Lösung zu komplexieren (MEYER & POPP 1997). Die verminderte Komplexbildung bei niedrigeren pH-Werten könnte zunächst einmal darauf hinweisen, dass in CAM-Pflanzen im Verlauf der nächtlichen Ansäuerung der Vakuole vermehrt Ca²⁺ aus den vorliegenden Komplexen freigesetzt wird. Umgekehrt steht aber mit zunehmender CO₂-Fixierung in Form organischer Säuren gleichzeitig auch eine größere Menge an Säureanionen für die Komplexbildung zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde die Ca²⁺-Komplexierung in ausgepressten Zellsäften südafrikanischer Sukkulente hinsichtlich Tag-Nacht-Unterschieden untersucht. Generell wurden dabei sehr hohe Komplexierungsgrade von 62 % bis 88 % gefunden (Abb. 5). Da insbesondere in sukkulenten Pflanzen die Vakuole weit mehr als 90% des gesamten Zellvolumens einnimmt, entsprechen die verwendeten Presssäfte hinsichtlich der Konzentrationen an Ca²⁺ und organischen Säuren weitestgehend den jeweiligen Vakuoleninhalten. Somit ist davon auszugehen, dass die in den Presssäften gemessenen Komplexierungsgrade annähernd der Ca²⁺-Komplexierung in der Vakuole entsprechen.

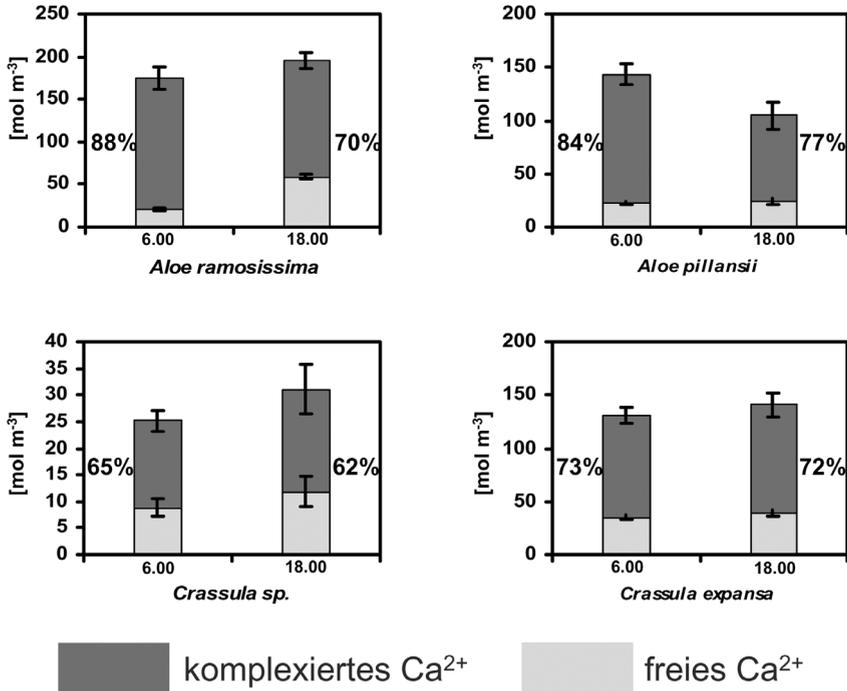


Abb. 5: Komplexierung von im Zellsaft gelöstem Ca²⁺ in vier verschiedenen CAM-Pflanzen an einem natürlichen Standort in der südlichen Namib-Wüste in Südafrika. Die Proben wurden jeweils um 6.00 Uhr am Morgen und um 18.00 Uhr am Abend genommen. Der Gesamtgehalt an wasserlöslichem Ca²⁺ wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie und das freie Ca²⁺ mithilfe einer Ca²⁺-selektiven Elektrode in den gewonnenen Zellsäften bestimmt. (verändert nach MEYER & POPP 1997). – Fig. 5: Complexation of dissolved Ca²⁺-ions within the cell saps in four different CAM-plants at their natural habitat in the southern Namib desert in South Africa. Samples were taken at 6:00 a.m. and 6:00 p.m., respectively. The total concentration of water-soluble Ca²⁺ within the cell sap was measured by atomic absorption spectroscopy, and the free Ca²⁺ was detected by means of a Ca²⁺-selective electrode (modified after MEYER & POPP 1997).

Im Zellsaft gelöstes Ca²⁺ ist weiterhin osmotisch aktiv und trägt somit zur Aufrechterhaltung eines hohen osmotischen Potentials bei. Das damit verbundene sehr negative Wasserpotential ist insbesondere bei Pflanzen an trockenen Standorten von erheblicher Bedeutung. Da der Boden in Wüstengebieten generell einen hohen Gehalt an Ca²⁺ aufweist (VON WILLERT et al. 1992) und Pflanzen bei starker Transpiration vermehrt Ca²⁺ passiv aus der Bodenlösung aufnehmen (DEMARTY et al. 1984), muss dieses vermehrt aufgenommene Ca²⁺ in geeigneter Form gespeichert werden. Während calciophobe Pflanzen dieses überschüssige Ca²⁺ in der Regel als Ca-Oxalat ausfällen, nutzen calciotrophe Pflanzen das überschüssige Ca²⁺ als Teil ihrer Strategie zur Erhöhung des osmotischen Potentials. Der lösliche Ca²⁺-Säureanion-Komplex wirkt dabei zwar nur als ein osmotisch wirksames Teilchen (MEYER & POPP 1997), dies ist aber immer noch ausreichend, um den entsprechenden Pflanzen an trockenen Standorten einen ökologischen Vorteil zu verschaffen.

3. Calcium als Signalmolekül

Neben der Funktion zur Absenkung des Wasserpotenzials hat das lösliche Ca^{2+} -Ion seit langer Zeit auch großes Interesse gefunden, weil es als Signation in der Zelle wirkt. Ca^{2+} übernimmt dabei als ‚second messenger‘ wichtige Funktionen bei der Signaltransduktion zwischen der Perzeption von Umwelteinflüssen durch die Pflanze und den daran anschließenden physiologischen und biochemischen Reaktionen, die letztlich zu einem veränderten Wachstum führen. Die Funktion von Ca^{2+} als Signation setzt dynamische Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration in einem oder mehreren subzellulären Kompartimenten voraus. Um solche dynamische Veränderungen zu messen, ist es zwingend erforderlich, die Untersuchungen direkt an lebenden Zellen durchzuführen. Dazu wurden in der Vergangenheit u.a. Ca^{2+} -selektive Mikroelektroden für intrazelluläre Messungen verwendet (FELLE 1993). Spätestens seit Beginn der 90er Jahre werden hierzu aber fast ausschließlich Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die sich durch Mikroinjektion oder direkte Aufnahme in die lebende Zelle einbringen lassen und die in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration ihre Fluoreszenz ändern (GILROY 1997). Die teilweise schwierige Beladung von Zellen mit Farbstoffen von außen lässt sich inzwischen durch den Einsatz transgener Sensoren umgehen. Für die Messung von Ca^{2+} -Signalen wurde dazu zunächst vor allem das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende Aequorin eingesetzt, das nach Ca^{2+} -Bindung ein Lumineszenzsignal aussendet. Mit dieser Methode lassen sich

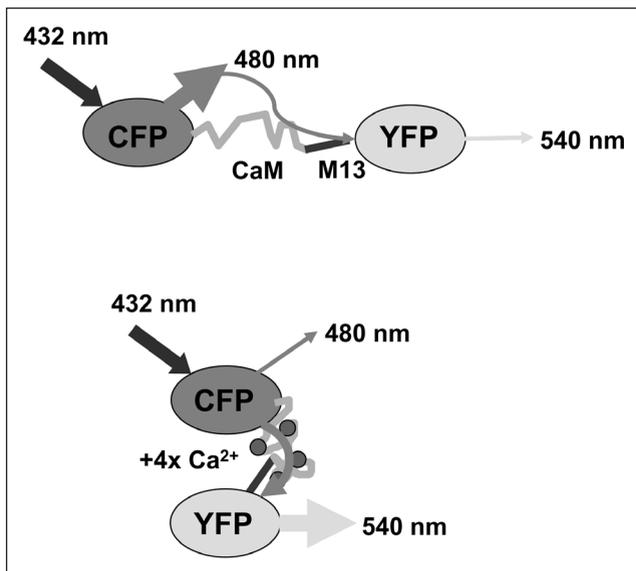


Abb. 6: Schematische Struktur des transgenen Ca^{2+} -Sensors ‚Chameleon‘. Das aus einem gelb-fluoreszierenden Protein (YFP) und einem cyan-fluoreszierenden Protein (CFP) zusammengesetzte Fusionsprotein ändert nach Bindung von 4 Ca^{2+} -Ionen an den Linker Calmodulin (CaM) seine Struktur und damit letztlich auch seine optischen Eigenschaften. Lichtenergie, die von CFP absorbiert wird, kann nach Ca^{2+} -Bindung strahlungslos auf das benachbarte YFP übertragen werden und wird von diesem dann als Fluoreszenzlicht mit längerer Wellenlänge emittiert. – Fig. 6: Schematic structure of the transgenic Ca^{2+} -sensor ‚Chameleon‘. This fused protein consisting of a yellow fluorescent protein (YFP) and a cyan fluorescent protein (CFP) changes its structure and optical performance when 4 Ca^{2+} -ions are bound to calmodulin (CaM), which links the two proteins. Light energy absorbed by CFP can be transferred to the adjacent YFP and is finally emitted as fluorescent light with longer wave-length.

nach kompartiment- bzw. zellspezifischer Expression des Photoproteins Ca^{2+} -Signale in verschiedenen subzellulären Kompartimenten (GILROY 1997) und auch in spezifischen Zelltypen wie z. B. der Endodermis erfassen (KIEGLE et al. 2000). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass es in der Wurzel zelltyp-spezifische Ca^{2+} -Signale auf Umweltreize wie Trockenheit, Salzstress und Kälte gibt (KIEGLE et al. 2000). Eine weitere elegante Möglichkeit Ca^{2+} mit transgenen Sonden zu messen, besteht in der Verwendung verschiedener GFP-Varianten und der Verknüpfung zu einem Fusionsprotein, das nach Ca^{2+} -Bindung seine Fluoreszenzeigenschaften ändert. Das aus CFP und YFP sowie dem Ca^{2+} -bindenden Protein Calmodulin bestehende Fusionsprotein wurde dementsprechend als ‚Chameleon‘ bezeichnet (Abb. 6; MIYAWAKI et al. 1997). Ähnliche vom GFP abgeleitete Sensoren gibt es inzwischen auch für den intrazellulären pH-Wert und verschiedene Anionen wie Cl^- und NO_3^- (LORENZEN et al. 2004).

4. Sulfat – Aufnahme und Kompartimentierung

Die Aufnahme (der Gehalt) von Kationen muss aus elektrostatischen Gründen entweder durch die Synthese organischer Anionen – wie oben für einen Teil des Ca^{2+} beschrieben – oder durch die gleichzeitige Aufnahme anorganischer Anionen ausgeglichen werden. Zu diesen anorganischen Anionen zählen vor allem Chlorid, Nitrat, Phosphat und Sulfat in wechselnden Mengen, die sich je nach Spezies und Standort der entsprechenden Pflanzen unterscheiden. Unter den Brassicaceen, von denen viele Spezies dem calciotrophen Phytotypus zugeordnet werden können, ist auf der Anionenseite in vielen Fällen eine bemerkenswerte Speicherung von Sulfat festzustellen (KINZEL 1982, 1989), was KINZEL auch zu der Charakterisierung der Brassicaceen als calciotroph-thiophoren Typus veranlasst hat (KINZEL 1982). In einigen Fällen kann die Speicherung von Sulfat die in der Vakuole gelöst vorliegenden Mengen an Ca^{2+} sogar übersteigen.

Anorganisches Sulfat wird aus dem Boden aufgenommen und über den Xylemstrom in der Pflanze auf die verschiedenen Organe verteilt. Der organspezifische Bedarf an Schwefel, der sich vor allem aus Wachstum und Entwicklung der Organe ergibt, bestimmt dabei den Netto-Fluss von Schwefel im Rahmen der gesamten Schwefelassimilation und des pflanzeninternen Schwefelkreislaufs. Der Transport von anorganischem Sulfat erfolgt dabei über eine Vielzahl verschiedener Sulfattransporter (HAWKESFORD 2003). Anhand von Efflux-Analysen mit radioaktiven Tracern konnten cytosolische Sulfat-Gehalte zwischen 83 und 147 mmol.kg^{-1} bestimmt werden (BELL et al. 1994). Andere ähnliche Experimente resultierten in einer cytosolischen Sulfat-Konzentration von 0,7 mM (CRAM 1983). Die ganze Komplexität des Schwefel-Stoffwechsels wird verdeutlicht anhand der Tatsache, dass auch in der Vakuole gespeichertes Sulfat wieder mobilisiert (KATAOKA et al. 2004) und dass Sulfat auch im Phloem von alten zu jungen Blättern effektiv rezykliert werden kann (YOSHIMOTO et al. 2003).

5. Sulfatassimilation

Neben der Funktion als Gegenion zum Ausgleich der in der Vakuole gespeicherten Kationen ist Sulfat auch die wichtigste Ausgangsverbindung für die Assimilation von Schwefel und den anschließenden Einbau in organische Verbindungen, insbesondere in Form der Aminosäuren Cystein und Methionin. Von diesen Aminosäuren leiten sich letztlich auch eine Vielzahl weiterer sekundärer Verbindungen ab, die eine wichtige Rolle im Verlauf von Stressreaktionen auf abiotische und biotische Faktoren spielen. Dabei ist primär das Glutathion als der wichtigste Bestandteil des zellulären Redoxpuffersystems zu nennen (MEYER et al. 2001), aber auch die vom Glutathion abgeleiteten Phytochelatine, die der Pflanze eine effiziente Entgiftung von Schwermetallen erlauben (COBBETT &

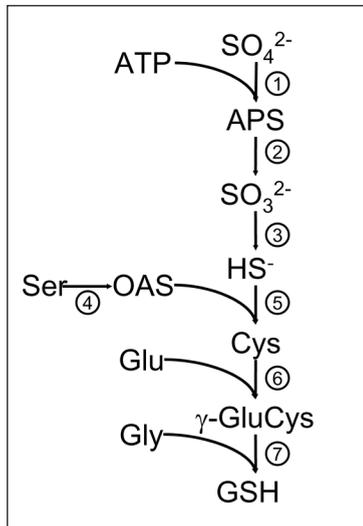


Abb. 7: Schematische Darstellung der Sulfatassimilation in Pflanzen. 1 = ATP-Sulfurylase, 2 = APS-Reduktase, 3 = Sulfit-Reduktase, 4 = Serinacetyltransferase, 5 = *O*-Acetylserin-(thiol)-Lyase, 6 = γ -Glutamylcystein-Synthetase, 7 = Glutathion-Synthetase. - Fig. 7: Schematic presentation of sulphate assimilation in plants. 1 = ATP-sulphurylase, 2 = APS-reductase, 3 = sulphite-reductase, 4 = serine-acetyltransferase, 5 = *O*-acetylserine-(thiol)-lyase, 6 = γ -glutamylcysteine-synthetase, 7 = glutathione-synthetase.

aus jeweils 4 Untereinheiten Serinacetyltransferase und *O*-Acetylserin-(thiol)-Lyase besteht (HELL 1997). Die klare Kompartimentierung der Sulfatassimilation erfordert einen Transport anorganischen Sulfats in die Plastiden und den Export einer oder mehrerer organischer Schwefelverbindungen aus den Plastiden ins Cytosol. Während für den Transport von Sulfat in die Plastiden bestimmte Sulfattransporter bekannt sind (HAWKESFORD 2003), wird der Export der organischen Schwefelverbindungen aus den Plastiden ins Cytosol bisher nicht verstanden.

6. Mikroskopische Erfassung von Glutathion

Leider gibt es für das Sulfat bisher keinen geeigneten Fluoreszenzfarbstoff, der die Konzentration von Sulfat sowie dynamische Änderungen der Sulfatkonzentration in der lebenden Zelle anzeigen könnte. Über die Fluoreszenzmarkierung von Glutathion bietet sich aber dennoch die Möglichkeit zumindest indirekt Informationen über den Sulfatstatus der Zelle und sogar den Flux durch den Sulfatassimilationsweg zu erhalten. Das Tripeptid Glutathion (L- γ -Glutamyl-L-Cysteinylglycin; GSH) enthält die schwefelhaltige Aminosäure Cystein und leitet sich somit unmittelbar aus dem Schwefelassimilationsweg

(GOLDSBROUGH 2002). Hinsichtlich biotischer Stressoren, wie Pflanzenpathogene und herbivoren Insekten, sind insbesondere die Glucosinolate und ihre flüchtigen Abbauprodukte, die Isothiocyanate, interessant (STÄDLER 2000). Im Gegensatz zu Nitrat, das in der Pflanze nur in der reduzierten Form biochemisch genutzt wird, ist Schwefel auch in seiner oxidierten Form ein essenzieller Bestandteil. So sind etwa 5% der Lipide der Thylakoidmembranen Sulfolipide, in denen Schwefel als Sulfonsäure über eine C-S-Bindung mit einem Kohlenhydrat des Lipids verbunden ist.

Sulfat wird aus der Bodenlösung über hochspezifische Sulfattransporter aufgenommen und über das Xylem zu den Blättern transportiert. Über weitere Sulfattransporter gelangt das Sulfat letztlich in die Chloroplasten, in denen die erforderlichen Reduktionsschritte ablaufen (Abb. 7). Für die Reduktion muss das Sulfat als chemisch sehr träges Oxoanion zunächst durch die Bindung an ATP in eine energiereiche Form überführt werden. Das dabei gebildete Adenosin-Phosphosulfat (APS) kann anschließend von der APS-Reduktase in einem ersten Schritt zum Sulfit reduziert werden (LEUSTEK et al. 2000). Es gibt Hinweise darauf, dass die dabei übertragenen zwei Elektronen von Glutathion als Elektronendonator geliefert werden (BICK et al. 1998). Sulfit kann dann in einem zweiten Reduktionsschritt durch die Übertragung weiterer sechs Elektronen zum Sulfid reduziert werden, das dann direkt in Cystein eingebaut wird. Die Bildung von Cystein aus der Vorstufe *O*-Acetylserin und Sulfid wird durch den Cystein-Synthase-Komplex katalysiert, der vermutlich

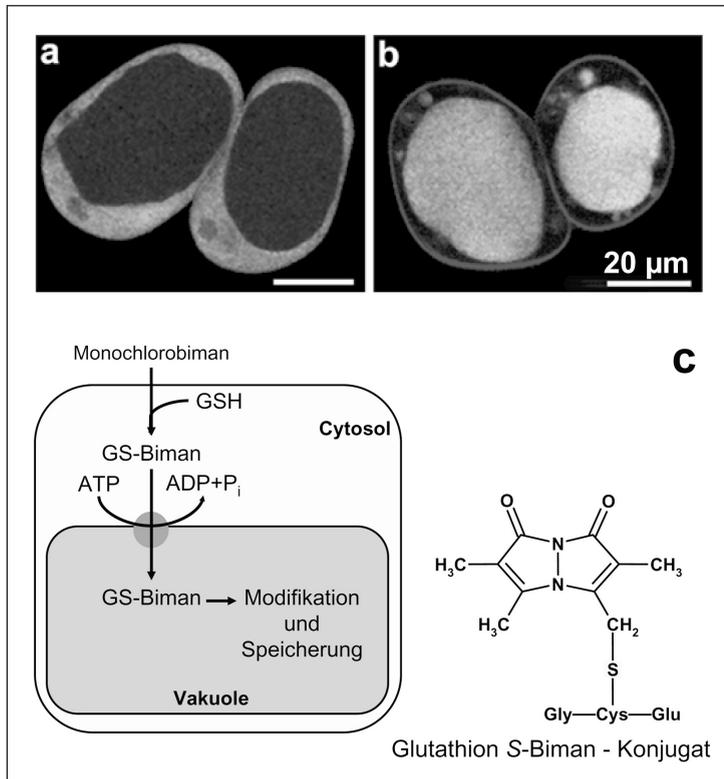


Abb. 8: Mikroskopischer Nachweis von Glutathion in lebenden Zellen unter Ausnutzung des Glutathion-abhängigen Entgiftungsweges. a) *Arabidopsis* Suspensionskulturzellen weisen unmittelbar nach der Inkubation mit 100 μ M Monochlorobiman (MCB) eine deutliche cytosolische Fluoreszenzmarkierung auf. b) *Arabidopsis*-Zellen 60 min nach der Fluoreszenzmarkierung mit MCB. Die spezifische Markierung der Vakuole zeigt den effizienten Transport der Glutathion-Biman-Konjugate in die Vakuole. Die zusätzliche Markierung der Zellwand mit 50 μ M Propidiumiodid zeigt die Intaktheit der Zellen. c) Schematische Darstellung der Fluoreszenzmarkierung von GSH mit MCB. – Fig. 8: Microscopic detection of glutathione in living cells by using the glutathione-dependent detoxification pathway. a) *Arabidopsis* suspension culture cells immediately after incubation with 100 μ M monochlorobimane (MCB) show a strong cytosolic fluorescence. b) *Arabidopsis* cells 60 min after fluorescence marking with MCB. Exclusive vacuolar fluorescence shows efficient sequestration of glutathione-bimane conjugates. Additional labelling of cell walls with 50 μ M propidium iodide indicates cell integrity. c) schematic presentation of fluorescence marking of GSH with MCB.

der Pflanze ab. In allen eukaryotischen und den meisten prokaryotischen Zellen besitzt Glutathion eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung des Redoxzustandes, der Regulation von Enzymaktivitäten und der Entgiftung. Während GSH bei der Entgiftung von Schwermetallen als Vorstufe für die Synthese der schwermetallbindenden Phytochelatine dient (COBBETT & GOLDSBROUGH 2002), werden elektrophile Xenobiotika, zu denen auch viele Herbizide zählen, über den Schwefelrest im Cystein direkt an GSH gebunden. Die dabei entstehenden Konjugate werden anschließend in die Vakuole transportiert (COLEMAN et al. 1997). Dieser Entgiftungsweg kann nun auch benutzt werden, um GSH so zu markieren, dass es im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann (Abb. 8).

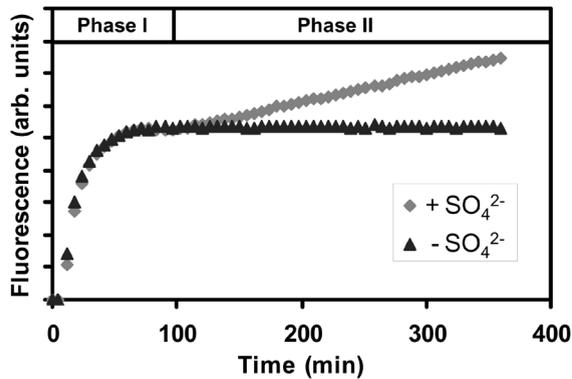


Abb. 9: Kinetik der Fluoreszenzmarkierung von Glutathion mit dem spezifischen Farbstoff Monochlorobimane in lebenden *Arabidopsis*-Suspensionskultur-Zellen. – Fig. 9: Kinetics of fluorescence marking of glutathione with the specific dye monochlorobimane in living *Arabidopsis* cells in suspension culture.

Monochlorobimane (MCB) ist in der freien Form nicht fluoreszierend und membranpermeabel, so dass es nach Zugabe zu intakten Zellen in diese eindringen kann. In der Zelle wird das Bimane mit GSH konjugiert, wodurch es fluoreszierend und auch membranimpermeabel wird. Das heißt, das Bimane kann nach der Konjugation nicht wieder aus der Zelle heraus diffundieren. Nach entsprechender Kalibrierung lässt sich diese Fluoreszenzmarkierung somit verwenden, um GSH in der Zelle quantitativ zu messen (MEYER et al. 2001). Die Untersuchung intakter Gewebe mit mikroskopischen Methoden erlaubt hier unmittelbar auch die gleichzeitige Untersuchung verschiedener Zelltypen in einem Gewebe oder einem Organ (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ et al. 1997, FRICKER et al. 2000, FRICKER & MEYER 2001, GUTIÉRREZ-ALCALÁ et al. 2000). Da bei diesem Markierungsverfahren GSH verbraucht wird, ist die Zelle gezwungen, GSH *de novo* aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin zu synthetisieren. Da aber der Cystein-Pool mit ca. 10–100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ im Vergleich zu den millimolaren Konzentrationen des GSH (MEYER et al. 2001) sehr klein ist, erfordert die Neusynthese von GSH sehr schnell auch die Neusynthese von Cystein und damit auch die Assimilation von Sulfat. Diese bedarfsabhängige Synthese von GSH hat eine zweigeteilte Markierungskinetik für das MCB zur Folge. Während einer ersten Phase wird das in der Zelle vorhandene GSH weitestgehend konjugiert und damit verbraucht. In der Fluoreszenzkinetik kommt dies durch das Erreichen eines Plateauwertes zum Ausdruck (Abb. 9). Mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung kommt es dann erneut zu einem Anstieg der Fluoreszenz, der auf der Neusynthese von GSH beruht (Abb. 9). Diese Neusynthese lässt sich durch verschiedene Inhibitoren, insbesondere aber auch durch die Entfernung von Sulfat aus dem Inkubationsmedium, blockieren (Abb. 9; MEYER & FRICKER 2002). Die Blockierung durch Entfernung von Sulfat zeigt somit, dass in der Fluoreszenzkinetik nicht nur die Synthese von GSH gemessen wurde, sondern vielmehr auch Information über den Flux durch den gesamten Sulfatassimilationsweg enthalten ist. Damit wird es erstmals möglich, die Sulfatassimilation in lebenden Zellen einer direkten experimentellen Untersuchung zugänglich zu machen. Da die Fluoreszenzmarkierung von GSH im Cytosol, die Assimilation von Sulfat aber in der Chloroplasten erfolgt, versprechen entsprechende Experimente für die Zukunft auch einen wesentlich detaillierteren Einblick in die subzelluläre Kompartimentierung der

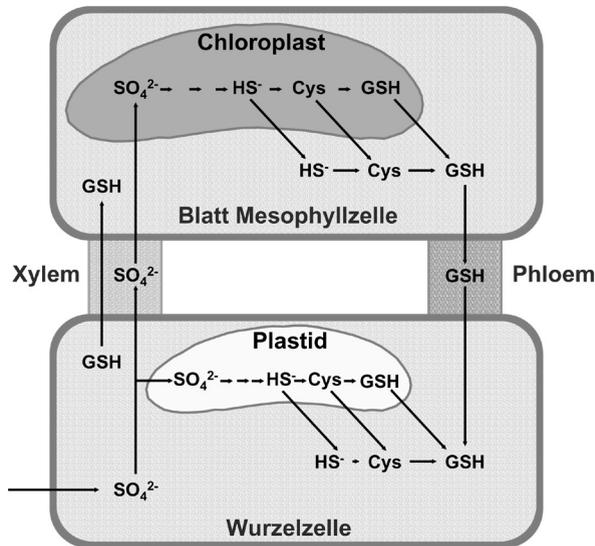


Abb. 10: Schematische Darstellung des Schwefel-Kreislaufs in der Pflanze. – Fig. 10: Schematic presentation of the sulphur cycle within the plant.

Schwefelassimilation und in den Transport schwefelhaltiger Metabolite über die Chloroplastenmembran zu liefern.

Glutathion erfüllt im pflanzlichen Organismus neben seinen grundlegenden Funktionen als wichtigster zellulärer Redox-Puffer und seiner Funktion in der Entgiftung von Schwermetallen und Xenobiotika auch noch eine weitere Funktion als Transportmetabolit für reduzierten Schwefel zwischen den Organen der Pflanze. Der Hauptteil des aus dem Boden aufgenommenen Sulfats wird in den Chloroplasten der Blätter assimiliert. Anschließend kann ein Teil des assimilierten Schwefels in Form von Glutathion wieder zurück in die Wurzel transportiert werden (Abb. 10) (HERSCHBACH & RENNENBERG 2001). Diesem Transport von Glutathion kommt dabei möglicherweise eine Signalfunktion zu (LAPPARTIENT & TOURRAINE, 1996; LAPPARTIENT et al. 1999). Nach diesem Modell kann die Wurzel wahrnehmen, ob die vom Spross angelieferte Menge an Glutathion abnimmt und dann mit einer entsprechend verstärkten Expression von Sulfattransportern und schließlich einer verstärkten Aufnahme von Sulfat dem drohenden Versorgungsengpass entgegenwirkt. Die Grundlagen eines solchen Regulationsmechanismus sind aber bis heute nicht verstanden, und es gibt Befunde, dass der Schwefelkreislauf und die damit verbundenen Regulationsmechanismen in krautigen Pflanzen anders verlaufen als in Bäumen (HERSCHBACH et al. 2000). Neben GSH gibt es aber auch Hinweise auf andere schwefelhaltige Verbindungen, wie etwa S-Methylmethionin als Transportform für reduzierten Schwefel im Phloem (BOURGIS et al. 2000). Die molekularen Grundlagen der Schwefelassimilation und der Regulation des Schwefelkreislaufs in der Pflanze zu erarbeiten, bleibt eines der wichtigen Ziele für weitere Arbeiten. Neue Methoden zum optischen Nachweis von Stoffflüssen in möglichst intakten, lebenden Pflanzen werden dabei eine zunehmende Bedeutung erlangen und im wahrsten Sinne des Wortes neue Einsichten verschaffen.

Schlussfolgerungen

Die übergeordnete Bedeutung des Mineralstoffwechsels für Wachstum und Entwicklung von Pflanzen ist seit langem gut untersucht und verstanden. Dennoch bleiben eine Vielzahl offener Fragen zur Regulation des Mineralstoffwechsel und zur Kompartimentierung auf der Ebene der Organe und auch innerhalb einzelner Zellen. Am Beispiel des Calciums und des Schwefels wird exemplarisch aufgezeigt, in welcher Form neue Methoden den direkten Zugang zu einzelnen Zellen und letztlich auch zu subzellulären Kompartimenten ermöglichen. Insbesondere sind dabei neue fluoreszenzbasierte mikroskopische Verfahren geeignet, die Regulation des Mineralstoffwechsels auf dieser Mikroebene zu studieren.

Die Entdeckung der Ca^{2+} -abhängigen Lumineszenz von Aequorin und des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* haben inzwischen eine breite Anwendung in der Untersuchung Ca^{2+} -abhängiger Signaltransduktionswege gefunden. Mit Anwendung dieser Proteine bzw. im Labor ‚designten‘ Abkömmlingen davon lässt sich so zum Beispiel die Reaktion ganz bestimmter Gewebe in der Wurzel (v.a der Endodermis) auf einen plötzlichen Salzstress als exogenen Reiz untersuchen. Über das Ca^{2+} hinaus lässt sich die GFP-basierte Technologie inzwischen auch auf andere Ionen anwenden.

Die direkte Messung von Sulfat in intakten Zellen und Geweben ist auch weiterhin noch nicht möglich. Dennoch bieten auch hier mikroskopische Ansätze neue Möglichkeiten zur Untersuchung des Schwefelhaushalts der Pflanzen. Die Messung von Glutathion, einem Tripeptid mit der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein als zentralem Baustein, eröffnet einen indirekten Zugang zur Sulfatassimilation. Dabei wird der zelluläre Glutathion-Pool mit einem Fluoreszenzfarbstoff hoch spezifisch markiert und beobachtet. Die durch die Fluoreszenzmarkierung erfolgende Verarmung an freiem Glutathion führt dann unmittelbar zu einer neuen Synthese, die von Sulfat im externen Medium abhängig ist. Damit bietet sich die Chance, die Assimilation von Sulfat direkt zu verfolgen und in Kombination mit molekularen Methoden die Funktion spezifischer Proteine im Assimilationsweg sowie deren Regulation in intakten Pflanzen zu untersuchen.

Nachwort

Da es sich bei dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Vortrag um einen Vortrag zu Ehren und zum Gedenken an Herrn Professor Helmut KINZEL handelt, soll zum Schluss nicht versäumt werden, noch einmal auf dessen Weitsicht hinzuweisen. Bereits 1954 beschäftigte sich KINZEL intensiv mit der Färbung botanischer Präparate und schrieb dazu in der Einleitung in einer 1954 erschienen Arbeit: „*Die Verwendung von Farbstoffen in der biologischen Forschung ist heute eine Selbstverständlichkeit geworden. Weniger selbstverständlich ist noch die Interpretation der bei den Färbungsversuchen erhaltenen Ergebnisse. Zur Zeit der Hochblüte der Mikrotechnik begnügte man sich noch mit einer rein empirischen Feststellung von Färbeergebnissen. Sehr bald aber wurde klar, dass der wissenschaftliche Wert der Färbungsreaktionen an toten und an lebenden Objekten davon abhängt, ob sie sich kausal interpretieren lassen.*“ (KINZEL 1954). Dem ist auch aus heutiger Sicht – also mehr als ein halbes Jahrhundert später – nichts hinzuzufügen.

Literatur

- BALL E., HAMM J., KLUGE M., LEE H.S. J., LÜTTGE U., ORTHEN B., POPP M., SCHMITT A. & TING I. P., 1991: Ecophysiological compartment of the tropical CAM-tree *Clusia* in the field. II. Modes of photosynthesis in trees and seedlings. *New Phytologist* 117, 483–491.
- BELL C. I., CRAM W. J. & CLARKSON D. T., 1994: Compartmental analysis of $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ exchange kinetics in roots and leaves of a tropical legume *Macroptilium atropurpureum*, cv. Siratro. *Journal of Experimental Botany* 45, 879–886.
- BICK J. A., ASLUND F., CHEN Y. & LEUSTEK T., 1998: Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase. *PNAS* 95, 8404–8409.
- BOURGIS F., ROJE S., NUCCIO M. L., FISHER D. B., TARCZYNSKI M. C., LI C., HERSCHBACH C., RENNENBERG H., PIMENTA M. J., SHEN T. L., GAGE D. A., HANSON A. D., 1999: S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell* 11, 1485–1498.
- BUSH D. S. & MCCOLL J. D., 1987: Mass-action expressions of ion exchange applied to Ca^{2+} , H^+ , K^+ and Mg^{2+} sorption on isolated cell walls of leaves from *Brassica oleracea*. *Plant Physiology* 85, 247–260.
- CLARKSON D. T. & HANSON J. B., 1980: The mineral nutrition of plants. *Annual Review of Plant Physiology* 31, 239–298.
- CLELAND R. E., VIRK S. S., TAYLOR D. & BJÖRKMANN T., 1990: Calcium, cell walls and growth. In: LEONARD R. T., HEPLER P. K. (eds.) *Calcium in plant growth and development. Current Topics in Plant Physiology. An American Society of Plant Physiologists Series, Vol. 4*, 9–16.
- COBBETT C. & GOLDSBROUGH P., 2002: Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53, 159–182.
- COLEMAN J. O. D., BLAKE-KALFF M. M. A. & DAVIES T. G. E., 1997: Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and compartmentation. *Trends in Plant Sciences* 2, 144–151.
- CRAM W. J., 1983: Characteristics of sulphate transport across the plasmalemma and tonoplast of carrot root cells. *Plant Physiology* 72, 204–211.
- DEMARTY M., MORVAN C. & THELLER M., 1984: Calcium and the cell wall. *Plant, Cell and Environment* 7, 441–448.
- EPSTEIN E. & BLOOM, A. J., 2005: *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. – Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- FELLE H. H., 1988: Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: an interaction of Ca^{2+} and pH? *Planta* 176, 248–255
- FELLE H.H., 1989: Ca^{2+} -selective microelectrodes and their application to plant cells and tissues. *Plant Physiology* 91, 1239–1242.
- FELLE H.H., 1993: Ion-selective microelectrodes: their use and importance in modern plant cell biology. *Botanica Acta* 106, 5–12.
- FRICKER M. D., MAY M., MEYER A. J., SHEARD N. & WHITE N. S., 2000: Measurement of glutathione levels in intact roots of *Arabidopsis*. *Journal of Microscopy* 198, 162–173.
- FRICKER M. D. & MEYER A. J., 2001: Confocal imaging of metabolism in vivo: pitfalls and possibilities. *Journal of Experimental Botany* 52, 631–640
- FRICKER M., PARSONS A., TLALKA M., BLANCAFLOR E., GILROY S., MEYER A. & PLIETH C., 2001: Fluorescent probes for living plant cells. In: HAWES C. & SATIAT-JEUNEMAITRE B. (eds.) *Plant Cell Biology. A Practical Approach*. (2nd ed.). Practical Approach Series, Oxford University Press, Oxford, 250, 35–84.

- GILROY S., 1997: Fluorescence Microscopy of living plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 165–190.
- GILROY S., BETHKE P. C. & JONES R. L., 1993: Calcium homeostasis in plants. *Journal of Cell Science* 106, 453–462.
- GUTIÉRREZ-ALCALÁ G., GOTOR C., MEYER A. J., FRICKER M., VEGA J. M. & ROMERO L. C., 2000: Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells. *PNAS* 97, 11108–11113.
- HAWKESFORD M., 2003: Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family – redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum* 117, 155–163.
- HELL R., 1997: Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta* 202, 138–148.
- HERPPICH W., 1989: CAM-Ausprägung in *Plectranthus marruboides* Benth. (Lamiaceae). Einfluss der Faktoren Licht, Blatttemperatur, Luftfeuchtigkeit, Bodenwasserverfügbarkeit und Blattwasserzustand. Dissertation, Universität Münster.
- HERSCHBACH C., VAN DER ZALM E., SCHNEIDER A., JOUANIN L., DE KOK L. J. & RENNINGER H., 2000: Regulation of sulfur nutrition in wild-type and transgenic poplar over-expressing γ -glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H_2S . *Plant Physiology* 124, 461–473.
- HERSCHBACH C. & RENNINGER H., 2001: Significance of phloem-translocated organic sulfur compounds for the regulation of sulfur nutrition. *Progress in Botany* 62, 177–193.
- HORAK O. & KINZEL H., 1971: Typen des Mineralstoffwechsels bei den höheren Pflanzen. *Österreichische botanische Zeitschrift* 119, 475–495.
- KATAOKA T., WATANABE-TAKAHASHI A., HAYASHI N., OHNISHI M., MIMURA T., BUCHNER P., HAWKESFORD M. J., YAMAYA T. & TAKAHASHI H., 2004: Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2693–2704.
- KIEGLE E., MOORE C. A., HASELOFF J., TESTER, M. & KNIGHT M. R., 2000: Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* 23, 267–278.
- KINZEL H., 1954: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung in leeren Zellsäften. *Protoplasma* 44, 52–72.
- KINZEL H., 1982: Pflanzenökologie und Mineralstoffwechsel. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- KINZEL H., 1989: Calcium in the vacuoles and the cell walls of plant tissue. Forms of deposition and their physiological and ecological significance. *Flora* 182, 99–125.
- KRÄMER U., GRIME G. W., SMITH J. A. C., HAWES C. R. & BAKER A. J. M., 1997: Micro-PIXE as a technique for studying nickel localization in leaves of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *Nuclear Instrumentation and Methods B* 130, 346–350.
- LAPPARTIENT A. G. & TOURRAINE B., 1996: Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola. The role of phloem-translocated glutathione. *Plant Physiology* 111, 147–157.
- LAPPARTIENT A. G., VIDMAR J. J., LEUSTEK T., GLASS A. D. M. & TOURRAINE B., 1999: Inter-organ signalling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *Plant Journal* 18, 89–95.
- LEUSTEK T., MARTIN M. N., BICK J.-A. & DAVIES J. P., 2000: Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 141–165.
- LORENZEN I., ABERLE T. & PLIETH C., 2004: Salt stress-induced chloride flux: a study using transgenic *Arabidopsis* expressing a fluorescent anion probes. *Plant Journal* 38, 539–544.
- MARSCHNER H., 1995: Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed., Academic Press, London.

- MEYER A. J. & POPP M., 1997: Free Ca^{2+} in tissue saps of calcitrophic CAM plants as determined with Ca^{2+} -selective electrodes. *Journal of Experimental Botany* 48, 337–344.
- MEYER A. J., MAY M. J. & FRICKER M., 2001: Quantitative in vivo measurement of glutathione in *Arabidopsis* cells. *Plant Journal* 27, 67–78.
- Meyer A. J. & Fricker M. D., 2002: Control of demand-driven biosynthesis of glutathione in green *Arabidopsis* suspension culture cells. *Plant Physiology* 130, 1927–1937.
- MILLER A. J., COOKSON S. J., SMITH S. J. & WELLS D. M., 2001: The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 541–549.
- MIYAWAKI A., LLOPIS J., HEIM R., MCCAFFERY J. M., ADAMS J. A., IKURA M. & TSIEN R. Y., 1997: Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882–887.
- OUTLAW JR. W. H. & ZHANG S., 2001: Single-cell dissection and microdroplet chemistry. *Journal of Experimental Botany* 52, 605–614.
- RÖSSNER H. & POPP M., 1986: Ion patterns in some Crassulaceae from Austrian habitats. *Flora* 178, 1–10.
- SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ R., FRICKER M., CORBEN L. B., WHITE N. S., SHEARD N., LEAVER C. J., VAN MONTAGU M., INZÉ D. & MAY M. J., 1997: Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *PNAS* 94, 2745–2750.
- STÄDLER E., 2000: Secondary sulfur metabolites influencing herbivorous insects. In: BRUNOLD C., RENNENBERG H., DE KOK L. J. STULEN I. & DAVIDIAN J. C. (eds.): Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. Paul Haupt Publishers, Berne, 187–202.
- TOMOS A. D. & LEIGH R. A., 1999: The pressure probe: a versatile tool in plant cell physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 447–472.
- TSIEN R. Y., 1998: The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* 67, 509–544.
- VON WILLERT D. J., ELLER B. M., WERGER M. J. A., BRINKMANN E. & IHLENFELD H. D., 1992: Life strategies of succulents in deserts. With special reference to the Namib desert. Cambridge University Press, Cambridge.
- YOSHIMOTO N., INOUE E., SAITO K., YAMAYA T. & TAKAHASHI H., 2003: Phloem-localizing sulphate transporter, Sultr1;3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131, 1511–1517.

Anschrift:

Dr. Andreas J. MEYER, Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 360, D-69120 Heidelberg. E-Mail: ameyer@hip.uni-hd.de.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Schriften des Vereins zur Verbreitung naturwissenschaftlicher Kenntnisse Wien](#)

Jahr/Year: 2008

Band/Volume: [142_146](#)

Autor(en)/Author(s): Meyer Andreas J.

Artikel/Article: [Vom Reagenzglas zum subzellulären Kompartiment Moderne Methoden zur Untersuchung der Regulation des Mineralstoffwechsels. \(In memoriam Univ.-Prof.Dr. Helmut Kinzel. Symposium, 18. Juni 2003\). 249-266](#)