

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades Master of Science (M.Sc.)

Isolation von Vakuolen und sequentielle Proteinextraktion
aus *Papaver nudicaule* Blüten

vorgelegt von Alisa Knoll



FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT

Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät

Studienfach Chemische Biologie

Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie

Angefertigt in der Abteilung NMR/ Biosynthese

Jena, den 31.07.2017

Gutachter:

Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

PD Dr. Bernd Schneider

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 <i>Papaver nudicaule</i>	3
2.2 Besonderheiten des gelben <i>P. nudicaule</i> -Kultivars	4
2.3 Nudicauline	6
2.4 Verteilung von Indol, Pelargonidin und Nudicaulin während der Blütenblattentwicklung	8
2.5 Bedingungen und Vorstufen der Nudicaulinbiosynthese	9
2.6 Die pflanzliche Zelle	11
2.7 Vakuolen	12
2.8 Ansätze zur Isolation von Vakuolen	13
2.8.1 Isolation der Protoplasten	15
2.8.2 Osmotischer Schock	15
2.8.3 Lyse durch das Detergens CHAPS	16
2.8.4 Polybaseinduzierte Lyse	19
3 Ergebnisse und Diskussion	22
3.1 Methodensuche und erste Optimierung	22
3.1.1 Isolation der Protoplasten	23
3.1.2 Isolation der Vakuolen	26
3.2 Optimierung des Protokolls nach Boudet (1981)	35
3.3 Extraktion der Proteine	39
4 Experimentalteil	41
4.1 Pflege der <i>P. nudicaule</i> -Kultivare	41
4.2 Isolation der Protoplasten	41
4.3 Osmotischer Schock	42
4.4 Lyse durch das Detergens CHAPS	42

4.5	Polybaseinduzierte Lyse	42
4.5.1	Direkte Zugabe nach Schmidt und Poole (1980)	43
4.5.2	Dichtegradientenzentrifugation nach Aerts und Schram (1985)	43
4.5.3	Finales Protokoll, verändert nach Boudet (1981)	44
4.6	Extraktion der Proteine	45
4.6.1	Probenvorbereitung	46
4.6.2	Fällung der Proteine des Vakuolenzellsaftes mit Trichloressigsäure	46
4.6.3	SDS-Page-Gel	47
4.6.4	In-Gel-Verdau der Proteine mit Trypsin	47
5	Zusammenfassung	49
I	Abbildungsverzeichnis	I
II	Literaturverzeichnis	IV
III	Anhang	VIII
III.1	Chemikalien und Geräte	VIII
III.1.1	Chemikalien	VIII
III.1.2	Allgemeine Geräte	IX
III.1.3	Zentrifugen	X
III.1.4	Spezielle Geräte	X
III.1.5	Gelelektrophorese	X
III.2	Protokoll zur Isolation von Vakuolen aus <i>P. nudicaule</i> Blüten	XI
IV	Danksagung	XV
V	Selbstständigkeitserklärung	XVI

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Ambic	Ammoniumbicarbonat
BSW	Biosyntheseweg
CAS	Chemical Abstracts Service
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CV	zentrale Vakuole
DEAE-D	Diethylaminoethyl-Dextran
dH ₂ O	destilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
H ⁺ -ATPase	H ⁺ -Adenosintri-phosphatase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
Kat.nr.	Katalognummer
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
P-ATPase	Pyrophosphatase
SDS	Natriumlaurylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
UV/ Vis	ultraviolette/ sichtbares Licht
VM	vakuoläre Membranproteine

VZ	vakuoläre Zellsaftproteine
WP	Waschpuffer

1 Einleitung

Seit Jahrtausenden werden Naturstoffe aus Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen vom Menschen auf vielfältige Art genutzt. Beispielsweise beschreiben die ältesten medizinischen Aufzeichnungen auf Tontafeln aus dem Jahre 2600 v. Chr. die heilsame Wirkung von 1 000 Pflanzen und pflanzlichen Substanzen (Ji et al., 2009). Im alten Ägypten wurden ganze Städte zur Parfumproduktion aus aromatischen Pflanzen, Ölen und Fetten beauftragt (Byl, 2012). Der Farbstoff Purpur aus der Purpurschnecke, dessen Färbewirkung die Phöniziern in der Antike entdeckten, war ebenfalls sehr kostbar (Zentgraf et al., 2000). Heutzutage kommen Naturstoffe nicht nur als Medikament, Parfum oder Färbemittel, sondern auch als Faser- und Aromastoffe, Kleber, Öle, sowie Wachse zum Einsatz (Croteau et al., 2000).

Im 19. Jahrhundert begann die Aufklärung von Identität und Struktur der Substanzen aus den natürlichen Materialien mithilfe der modernen Chemie. Gezielte Isolation, Reinigung, strukturelle Analyse und Untersuchung der biologischen Eigenschaften der Naturstoffe bilden die Grundlage für viele Anwendungsmöglichkeiten, wobei besonderer Fokus auf dem Einsatz als Medikament, Antibiotikum, Insektizid und Herbizid liegt (Croteau et al., 2000).

Grund für die unterschiedlichsten Nutzungsmöglichkeiten dieser Substanzen ist die Diversität der chemischen Strukturen und damit einhergehend die Vielfalt an biologischen Eigenschaften. Naturstoffe werden über verschiedene Biosynthesewege von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen erzeugt. Wichtige Substanzklassen und deren Biosyntheseweg (BSW) sind (Chintoj et al., 2015):

- Fettsäuren und Polyketide (Acetat-BSW)
- Terpene und Steroide (Mevalonat-BSW)
- Aromatische Aminosäuren und Phenylpropanoide (Shikimat-BSW)
- Alkaloide (Aminosäure-BSW)
- Polysaccharide (Gluconeogenese, Photosynthese)

Zur Studie der Biosynthesewege stellen Pflanzen ein interessantes Objekt dar. Als sessile Organismen haben sie ein besonders reiches Repertoire an metabolischen Netzwerken evolviert, um komplexe Naturprodukte zu generieren, die ihnen Vorteile im Überleben in einer ökologischen Nische verschaffen (Weng, 2014). Historisch bekannt ist v.a. die Familie der Mohngewächse (*Papaveraceae*). So wird aus dem Milchsaft der Samenkapseln des Schlafmohns (*Papaver somniferum* L.) Opium gewonnen, dessen schmerzstillende, schlaffördernde und berauschende Wirkung von einer Reihe von Alkaloiden herrührt. 1805 gelang Sertürner erstmals die Isolation des Morphins, das später als erstes Medikament

(Analgetikum) rein natürlichen Ursprungs kommerzialisiert wurde (Ji et al. 2009). Es nimmt auch heute noch in der Schmerztherapie eine bedeutende Rolle ein.

Neben dem Schlafmohn produzieren auch andere Arten der *Papaveraceae* Alkaloide. Gegenstand dieser Masterarbeit ist der gelbe Kultivar des Islandmohns (*Papaver nudicaule*, *P. nudicaule*). Dessen Blütenblattfarbe ist auf Nudicauline zurückzuführen, die eine besondere Substanzklasse der Indolalkaloide darstellen. Ihre Struktur besteht aus einem pentazyklischen Aglykon, das aus einem Indolmolekül und einer polyphenolischen Einheit aufgebaut und mit drei teilweise malonylierten β -Glukose-Einheiten dekoriert ist (Tatsis et al. 2013). Bisherige Forschungen zur Biosynthese in *P. nudicaule* identifizierten den Indol-, sowie den Flavonoidweg als Ursprung der Nudicauline. Im Zuge einer *de novo* Biosynthese erfolgt über genannte Wege die Synthese von Indol und Pelargonidin, welche *in situ* in den Vakuolen der Blüten zu Nudicaulin fusioniert werden (Tatsis et al., 2014; Warskulat, 2016). Da unbekannt ist, wie Indol in die Vakuole gelangt, oder ob ein Enzym den letzten Schritt der Farbstoffbildung katalysiert, soll eine Proteomanalyse der Vakuolenmembran und des Vakuolenzellsaftes mögliche Transporterproteine oder Enzyme identifizieren. Um diese Analysen durchzuführen, bedarf es jedoch eines geeigneten Protokolls zur Isolation von Vakuolen aus Blütenblättern des *P. nudicaules* und zur sequentiellen Proteinextraktion. Ziel dieser Arbeit ist, durch Testung verschiedener Methoden aus der Literatur ein geeignetes Protokoll zur Vakuolenisolation zu erstellen und an das vorliegende Blütengewebe anzupassen. Anschließend steht die Extraktion der vakuolären Proteine im Vordergrund.

Im Folgenden werden zunächst die theoretische Grundlagen und das experimentelle Vorgehen erläutert. Daran schließt sich die Vorstellung und Diskussion der Ergebnisse an. Im letzten Kapitel werden die Resultate mit Ausblick auf offene Fragestellungen zusammengefasst.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 *Papaver nudicaule*

Papaver nudicaule (*P. nudicaule*) ist eine Pflanze aus der Familie der Mohngewächse (*Papaveraceae*). Innerhalb dieser gehört die, auch als Islandmohn bezeichnete, Staude zur Unterfamilie *Papaveroideae*, Gattung *Papaver* L., Abteilung *Meconella* (Carolan et al., 2006). Ungleich ihres Namens erstreckt sich das Verbreitungsgebiet des Wildtyps dabei nicht über Island, sondern beschränkt sich auf Gebirgsregionen und Flussufer in Nordostasien bis hin zum Arktischen Ozean (Hanelt, 1970; Elven et al., 2009). Die irreführende Namensgebung rührt von Verwechslungen mit *Papaver radicum* (Arktischer Mohn) her, welcher in Gestalt und Lebensraum Gemeinsamkeiten mit *P. nudicaule* aufweist.

Vegetative Merkmale der zweijährigen, aufrechten Staude sind langblättrige, graugrüne, fiedrig-geteilte, behaarte Blätter. Von Juni bis August wachsen an ca. 30 cm hohen, behaarten, blattlosen Schäften die weißen bzw. gelben Blüten. Sie besitzen eine sitzende, sechs- bis achtstrahlige Narbe und viele Staubblätter. Die Pflanze bildet eine behaarte Kapsel aus (Abb. 1; Hanelt, 1970).



Abb. 1: Illustration des gelben *P. nudicaule*-Wildtyps (Sims, 1814). Es werden Blatt, geschlossene Knospe, sowie offene Blüte dargestellt. Das Blatt ist graugrün und fiedrig-geteilt. Zudem zeigt es, ebenso wie die Knospe, eine deutliche Behaarung. Die Blüte wächst an einem blattlosen Schaft. Sie weist eine Vielzahl an Staubblättern, eine sitzende, strahlige Narbe, sowie gelbe Blütenblätter auf.

Im 18. Jahrhundert kam es zur Einfuhr von Samen nach Europa und China, wo *P. nudicaule* auch heute noch als beliebte Zierpflanze kultiviert wird. Aufgrund von Züchtungen erweiterte sich das Farbspektrum des Gewächses (Hanelt, 1970). Neben weiß und gelb blühenden Kultivaren sind ebenfalls orangefarbene sowie rote im Handel erhältlich. Während der Durchführung des Masterprojekts standen die in Abb. 2 gezeigten Kultivare zur Verfügung. Der Fokus lag auf dem gelben *P. nudicaule*-Kultivar mit seinen einzigartigen Blütenfarbstoffen, den Nudicaulinen. Die Besonderheiten dieser Pflanzen und der Farbstoffe werden im nächsten Abschnitt vorgestellt.



Abb. 2: Blüten der handelsüblichen *P. nudicaule* Kultivare (zur Verfügung gestellt von Dudek, B.).

2.2 Besonderheiten des gelben *P. nudicaule*-Kultivars

Der gelbe *P. nudicaule*-Kultivar weist in Farbentwicklung und Duftkomposition Besonderheiten auf. So entspricht das Farbspektrum der Blüten der gelben und weißen *P. nudicaule*-Kultivare dem des Wildtyps. Im Vergleich der beiden Kultivare in Bezug auf ihre Duftkomposition lässt sich jedoch nur bei gelben *P. nudicaule* ein intensiver Duft nach Indol feststellen. Dieser Befund wurde durch eine Studie zum Duftprofil von vier unterschiedlich farbigen Kultivaren bestätigt (Martinez-Harms/ Warskulat et al., *in Vorbereitung*). Untersuchungen zur Entwicklung der jungen Blütenblätter des gelben Kultivars ergaben, dass ein Farbwechsel durchlaufen wird (Warskulat et al., 2016). Dieser führt von anfangs farblos über rot zu orangefarben und schließlich gelb (Abb. 3).



Abb. 3: Farbwechsel der Blütenblätter des gelben *P. nudicaule*-Kultivars während ihrer Entwicklung (zur Verfügung gestellt von Dudek, B.).

Mithilfe von HPLC- (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) und UV/ Vis-Analysen (ultraviolettes/ sichtbares Licht) von Blütenblattextrakten konnte die Blütenentwicklung in den Knospen in fünf Entwicklungsstadien eingeteilt und die jeweils vorliegenden Farbstoffe untersucht werden (Dudek/

Warskulat et al., *in Vorbereitung*). Die rötlichen Töne verursacht die Anwesenheit von Anthocyanen, genauer von Pelargonidinglukosiden (Abb. 4; Warskulat et al., 2016). Die Anthocyane sind Teil der weit verbreiteten Flavonoide, einer Pflanzenfarbstoffklasse, die sich aus Aglykon und Zuckersubstituenten zusammensetzt (Tanaka et al., 2008). Zu dieser Naturstoffklasse gehören weiterhin auch die Flavonole, wie beispielsweise Kaempferol oder Gossypetin (Abb. 4). Erstere treten, bezogen auf das Blütenblatt, im apikalen Teil auf, während Gossypetin in der Blütenblattbasis nachgewiesen wurde (Abb. 5; basaler Teil; Dudek et al., 2016). Die orange Farbe entsteht durch die Anwesenheit der Pelargonidinglukoside und der gelben Nudicauline. Im Folgenden wird zunächst die außergewöhnliche Struktur der Nudicauline und die Geschichte dieser Farbstoffe näher vorgestellt.

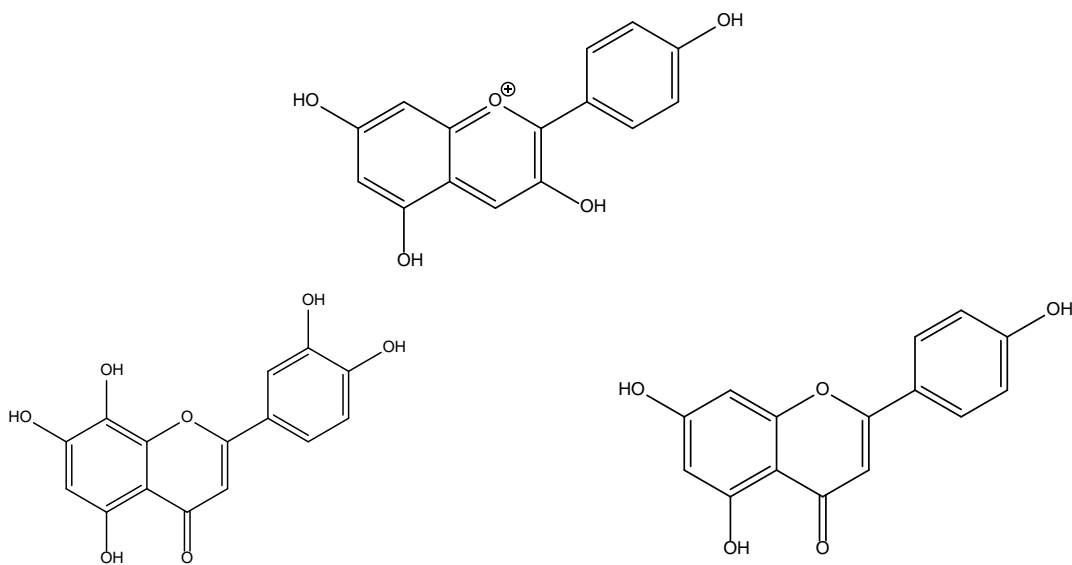


Abb. 4: Aglykonstrukturen von Pelargonidin (**oben**), Gossypetin (**links**) und Kaempferol (**rechts**).

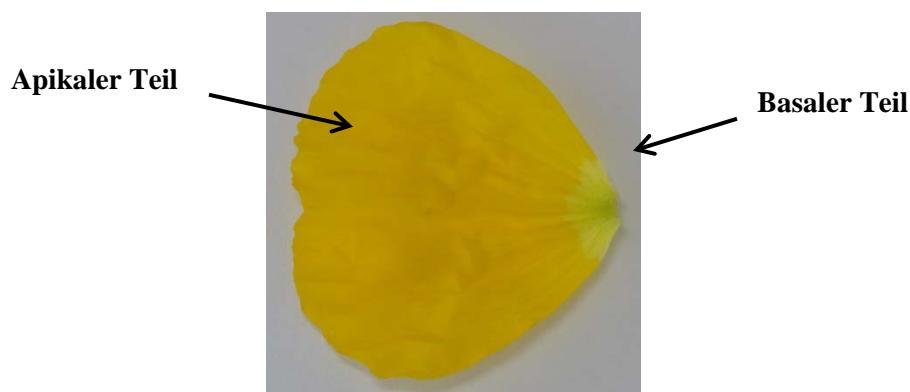


Abb. 5: Apikaler und basaler Teil des Blütenblatts.

2.3 Nudicauline

Die Nudicauline stellen eine einzigartige Klasse von Blütenfarbstoffen dar, deren Strukturaufklärung fast 70 Jahre in Anspruch genommen hat. Im Jahre 1939 wurde erstmals ein wasserlöslicher, gelber Farbstoff aus *P. nudicaule* isoliert (Price, 1939). Die nachfolgenden Strukturuntersuchungen ließen auf ein stickstoffhaltiges Diglucosid mit einer 4-Hydroxyphenyl-Einheit schließen, welches einer anthocyan-ähnlichen Stoffklasse zugeordnet und Nudicaulin genannt wurde. Eine Widerlegung dieser Zuordnung erfolgte durch J. Harbourne im Jahre 1965. Nach sauren sowie enzymatischen Hydrolysen, bei denen auch die spektralen Eigenschaften beobachtet wurden, erfolgte die Konklusion, dass es sich um ein Triglucosid handelte, das nicht zu der Gruppe der Flavonoide, Karotenoide oder Betaxanthine gehörte (Harbourne, 1965). 2006 führten schließlich HPLC–Isolation und anschließende Analysen mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Massenspektrometrie (MS) zu einem ersten Strukturvorschlag und zur Erkenntnis, dass insgesamt acht Nudicauline in gelben und orangefarbenen *P. nudicaule* vorliegen (Schliemann et al., 2006). Als Grundstruktur und Aglykon wurde ein pentazyklisches Indolalkaloid (19-(4-Hydroxyphenyl)-10H-1,10-ethenochromeno[2,3-b]indol-8,8,18-triol) vorgeschlagen, das mit drei malonylierten Glukose-Einheiten dekoriert ist (Abb. 6).

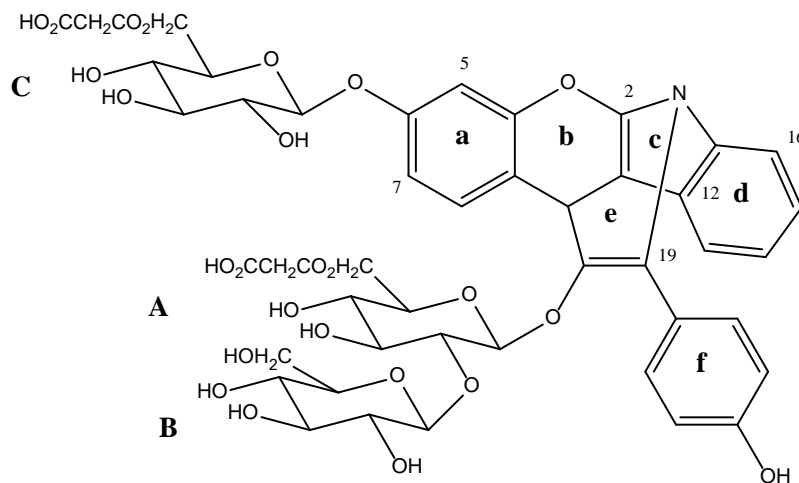


Abb. 6: Nudicaulin-Strukturvorschlag von Schliemann et al. (2006). Das pentazyklische Grundgerüst, bestehend aus Ringen a – e, ist im Ring a an Position C-6 mit Glukose und an Position C-18 mit Sophorose *O*-glukolisiert. Ring c und d zeigen ein indolähnliches Gerüst. Zudem befindet sich im Ring e an Position C-19 ein Phenol-Substituent. Aufgrund des Auftretens von Diastereomeren mit unterschiedlichen Malonylierungspositionen und -graden an den Glukoseeinheiten A bis C lassen sich 8 unterschiedliche Nudicauline feststellen.

Aufgrund von Unstimmigkeiten im UV-Spektrum bei 460 nm sowie einer starken Verzerrung des stickstoffhaltigen Sechsrings e kamen jedoch Zweifel über den Strukturvorschlag nach Schliemann et al. (2006) auf. 2012 wurde von Tatsis et al. eine Strukturrevision durchgeführt (Abb. 7; Tatsis et al., 2013).

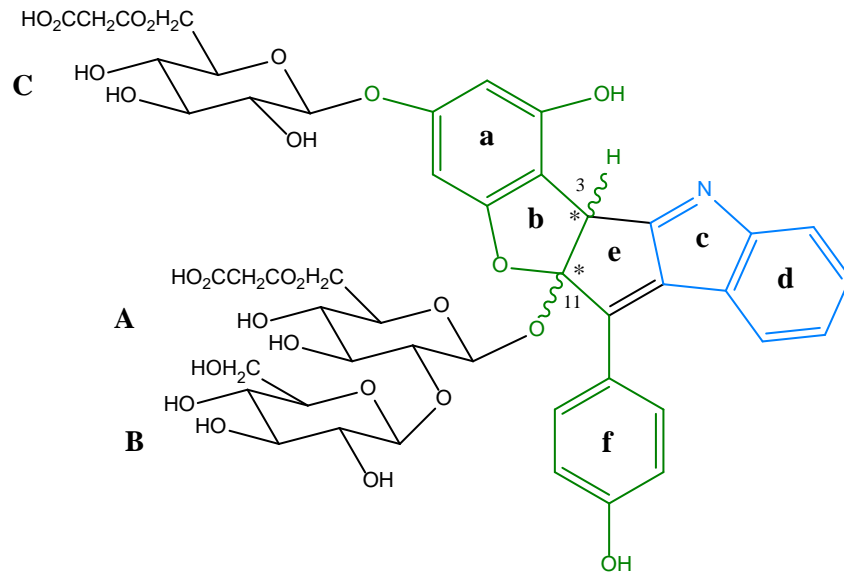


Abb. 7: Enantiomere Struktur von Nudicaulin I und II – Revision nach Tatsis et al. (2013). – Polyphenol- bzw. -Indolteilstruktur.

Die in Abb. 7 dargestellte Struktur für die Farbstoffe Nudicaulin I und II sind heute anerkannt. Der zuvor stark verzerrte Sechsring **e** sowie der Sechsring **b** wurden als Fünfringe identifiziert. An den Positionen C-3 und C-11 befinden sich chirale Zentren, weswegen Nudicaulin I und Nudicaulin II als (3S, 11R)- und (3R, 11S)-Diastereomere auftreten. Das Grundgerüst des Aglykons ist hexazyklisch und weist eine Polyphenol- und eine Indolteilstruktur auf. Damit handelt es sich bei den Nudicaulinen um Indolalkaloide. Nach heutigem Stand sind in der Literatur nur zwei weitere Beispiele für Indolalkaloide mit polyphenolischen Einheiten bekannt. Die in Südamerika beheimatete *Mimosa tenuiflora* bildet in ihrer Rinde Yuremamin und die südostasiatische *Trigonostemon reidioides* in den Wurzeln Lotthanongine (Abb. 8; Kanchanapoom et al., 2002; Calvert und Sperry, 2015).

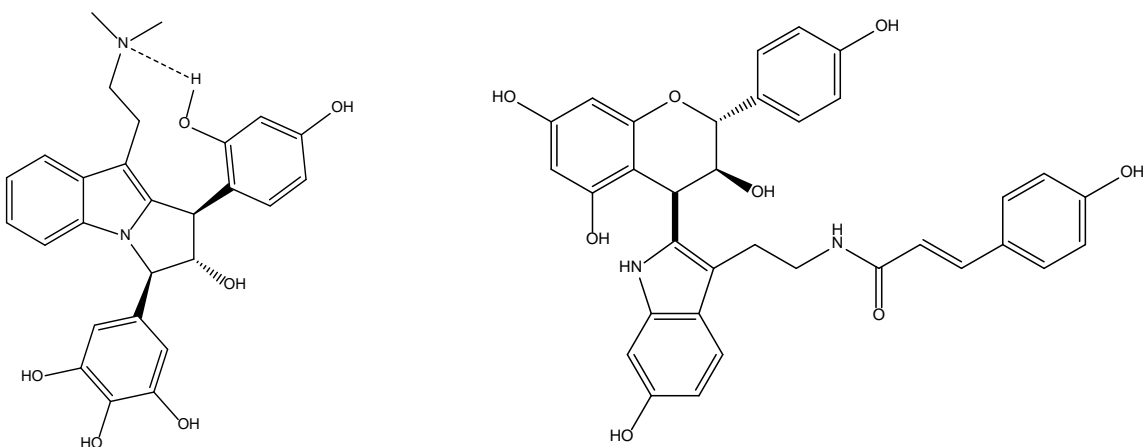


Abb. 8: Strukturen des Yuremamins (**links**) und Lotthanongins (**rechts**).

2.4 Verteilung von Indol, Pelargonidin und Nudicaulin während der Blütenblattentwicklung

Im Gegensatz zu den Pelargonidinglukosiden treten die gelben Nudicauline erst im vorletzten Entwicklungsstadium auf. Durch ^{13}C -Markierungsexperimente und *in vitro*-Versuche konnte gezeigt werden, dass zwischen Pelargonidinglukosiden, Indol und Nudicaulinen eine Edukt-Produkt-Beziehung besteht (Abb. 9; Warskulat et al., 2016; Dudek/ Warskulat, *in Vorbereitung*). Weiterhin ergab das Studium der Zeitabhängigkeit des Farbstoff- und Indolauftretens für den gelben Kultivar, dass die Indolkonzentration während der Blütenentwicklung stetig steigt und erst nach der Blüte fällt. Daraus resultierte die Hypothese, dass nach vollständigem Verbrauch der Pelargonidinglukoside zugunsten der Nudicauline Indol im Stadium der offenen Blüte als Überschuss aus der Farbstoffbiosynthese emittiert wird. Das wäre ein Beispiel für die Forschungsthese, dass zwischen Duft- und Blütenfarbproduktion ein direkter Zusammenhang bestehen kann.

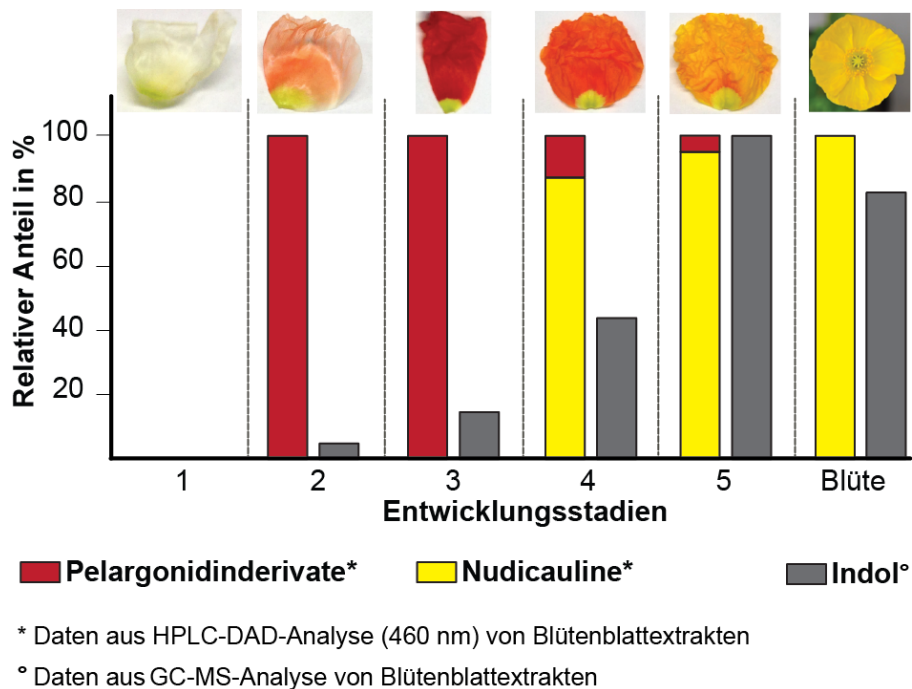


Abb. 9: Relatives Auftreten der Farbstoffe und des Indols in den Entwicklungsstadien des gelben *P. nudicaule* Kultivars (Dudek/ Warskulat, *in Vorbereitung*; Grafik modifiziert nach Warskulat et al., 2016). Die Entwicklungsstadien 2 und 3 weisen eine Rotfärbung auf, die durch Pelargonidinglukoside aus der Gruppe der Flavonoide entsteht. Ab Stadium 4 überwiegt der Anteil der Nudicauline in den Blütenblättern. Die Pelargonidinglukoside nehmen ab diesem Stadium kontinuierlich ab, bis sie im finalen Blütenstadium nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu beginnt die Indolproduktion ab Stadium 2 und nimmt bis Stadium 5 stetig zu. In der offenen Blüte ist die relative Abundanz jedoch wieder etwas niedriger.

2.5 Bedingungen und Vorstufen der Nudicaulinbiosynthese

Im Zuge der Biosyntheseaufklärung durch retrobiosynthetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die beiden Molekülteile der Nudicauline aus der Indol- bzw. Flavonoidbiosyntheseroute stammen (Abb. 10; Tatsis et al., 2014; Warskulat et al., 2016).

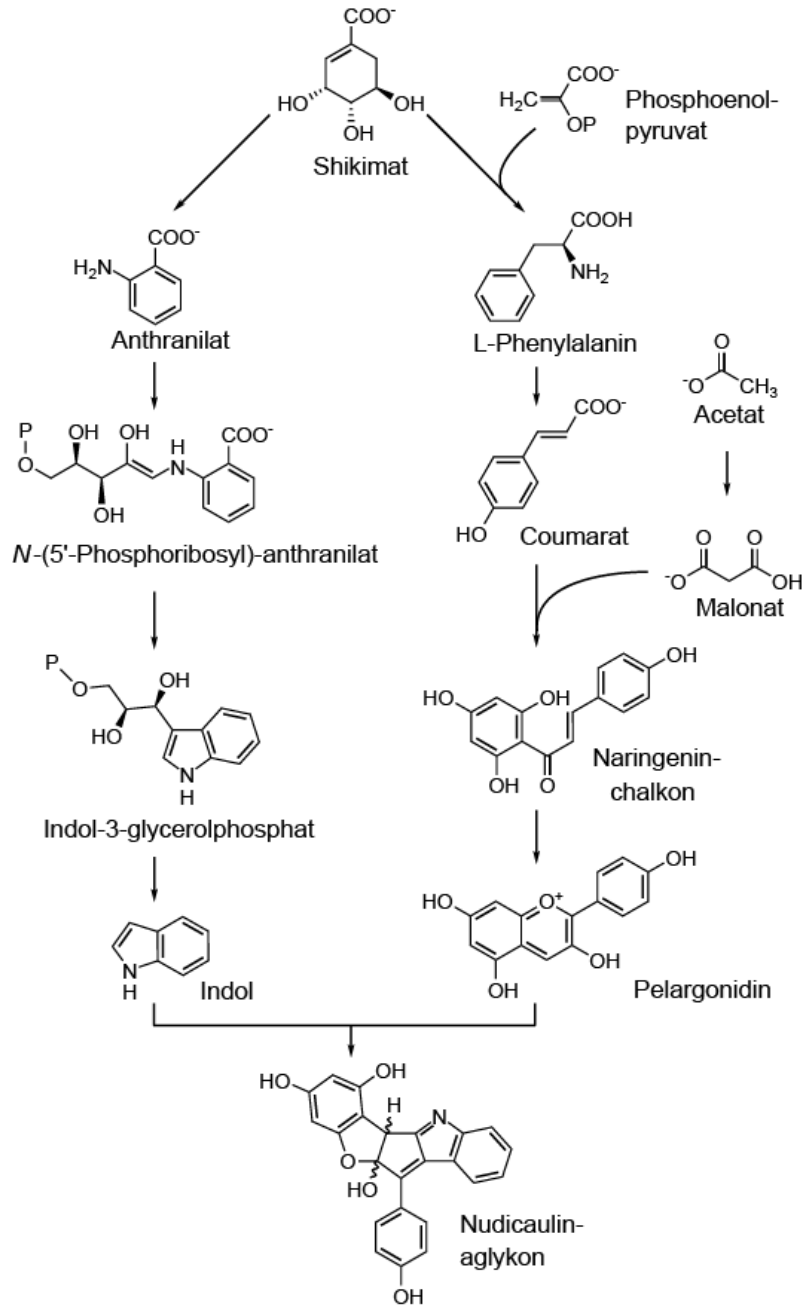


Abb. 10: Biosyntheseweg des Nudicaulinaglykons. Ausgehend von Shikimat wird über die Indolbiosyntheseroute Indol und über den Flavonoidweg Pelargonidin gebildet. Die beiden Vorstufen werden anschließend zu dem Nudicaulinaglykon fusioniert (Grafik modifiziert nach Warskulat, 2015).

Dabei wird zunächst über den Shikimisäureweg Shikimat gebildet. Aus diesem erfolgt anschließend die Synthese der Pelargonidinglukoside und des Indols. Hierbei ist bekannt, dass erstere im Cytosol gebildet und anschließend in die Vakuole transportiert werden. Die Vakuole der Blütenblätter ist *in vivo* der Ort der Biosynthese der Nudicauline. Dort werden die beiden Vorläufermoleküle bei einem sehr niedrigen pH-Wert von unter drei zum Nudicaulinaglykon fusioniert (Dudek/ Warskulat, *in Vorbereitung*). *In vivo*-Versuche, bei denen indolhaltige Lösungen auf orangefarbene Blütenblätter aufgetragen wurden, zeigten beispielsweise nach Inkubation an den entsprechenden Stellen eine Gelbfärbung (Abb. 11). Dies deutete auf eine Nudicaulinbildung aus den roten Pelargonidinglukosiden und dem Indol hin, was anschließend auch bestätigt wurde. Unbekannt blieb jedoch bislang der Ursprung des Indols. Es könnte entweder innerhalb oder außerhalb der Vakuole synthetisiert werden. Auch bei der Fusion der beiden Moleküle zu Nudicaulinen sind noch Fragen offen, insbesondere, ob die Reaktion spontan abläuft oder durch ein Enzym katalysiert wird. Ersteres ist *in vitro*-Versuchen zufolge möglich, hier gelang der Nachweis, dass Indol mit Pelargonidinglukosiden im sauren, wässrigen Milieu (pH-Wert < 3) spontan zu Nudicaulin reagieren kann (Dudek/ Warskulat, *in Vorbereitung*).

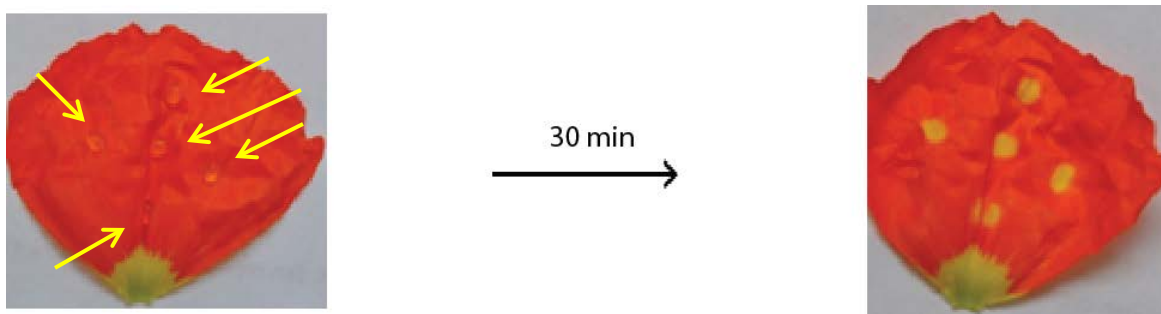


Abb. 11: Zugabe von Indol auf orangefarbene Blütenblätter von *P. nudicaule* (Zur Verfügung gestellt von Warskulat, A.C.).

Da bei den offenen Fragen zur Nudicaulinbiosynthese spezifische Transporter sowie Proteine in den Vakuolen bzw. dem Tonoplasten im Mittelpunkt stehen, könnte eine Analyse des Proteoms (Gesamtheit aller Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt) der Vakuolen zur Klärung herangezogen werden. Nach eigener Recherche geschah eine solche Proteomanalyse bislang jedoch nur an *Arabidopsis thaliana* (Blattrosette; Whiteman et al., 2008; Carter et al. 2004), *Brassica oleracea* (meristematisches Gewebe junger Knospen; Schmidt et al., 2007), *Hordeum vulgare* (Mesophyll; Endler et al., 2006) und *Oryza sativa* (Spross und Wurzel; Whiteman et al., 2008). In Bezug auf *P. nudicaule* wurde in der Arbeitsgruppe NMR/ Biosynthese des Instituts bereits eine Proteomanalyse für die fünf Entwicklungsstadien der Blütenblätter des gelben Kultivars durchgeführt. Allerdings erfolgte diese nicht speziell an Vakuolen, sondern umfasste das komplette Blütenblatt. Ein Nachweis der Lokalisation der Proteine in Vakuolen,

Tonoplast oder Zytosol konnte damit nicht erreicht werden. Ein optimiertes Protokoll zur Gewinnung von sauberen Vakuolen, welche zur Extraktion und Analyse der Proteine herangezogen werden kann, fehlte bislang. Ziel dieser Masterarbeit ist deshalb, zunächst die Testung und gegebenenfalls Optimierung verschiedener bekannter Arbeitsvorschriften und Ansätze zur Isolation von Vakuolen. Im Anschluss daran steht die Erarbeitung eines Protokolls zur Trennung von Vakuolenzellsaft und Tonoplast im Mittelpunkt, damit die Proteine aus den einzelnen Kompartimenten isoliert, getrennt und analysiert werden können.

2.6 Die pflanzliche Zelle

Als kleinste lebende Einheit des Organismus Pflanze ist die Zelle ein eigenständiges System, welches strukturell abgegrenzt und zur Selbsterhaltung fähig ist. Sie gehört zur Gruppe der Eucyten, einem im Vergleich zu den prokaryontischen Bakterien und Archeen wesentlich differenzierteren Zelltyp. In Abb. 12 wird die Organisation einer pflanzlichen Zelle dargestellt. Die Veröffentlichungen von Gunning und Steer (1996) sowie Khan (2017) sind Grundlage folgender Erläuterungen sowie der eigens erstellten Abbildung 12.

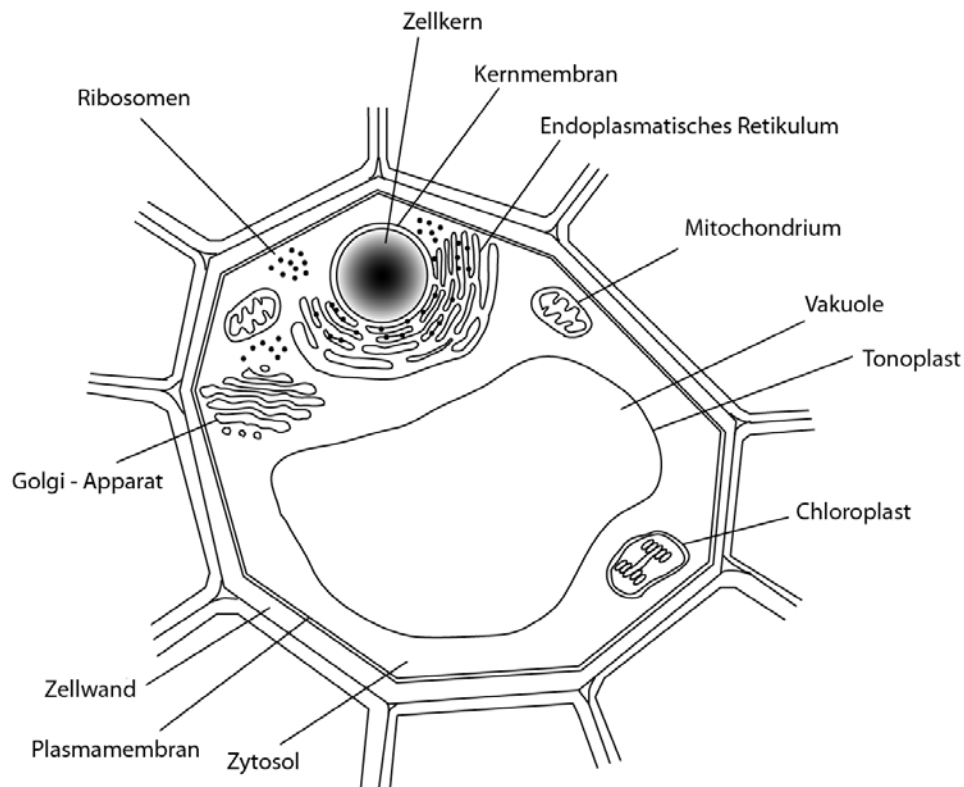


Abb. 12: Organisation einer pflanzlichen Zelle (Abb. in Anlehnung an Gunning und Steer (1996) sowie Khan (2017)).

Als wichtigstes Strukturelement besitzt die pflanzliche Zelle eine formgebende und stabilisierende Zellwand. Diese besteht aus einem Gerüst aus Cellulosefibrillen, in welches Pektine, Proteine und Hemicellulose eingelagert sind. An dieses Saccoderm grenzt der eigentliche Zytoplasmabereich (Protoplast) an, der von der Plasmamembran umgeben ist und eine Reihe verschiedener Organellen beinhaltet. Hauptmerkmal zur Abgrenzung von prokaryontischen Zellen ist der Zellkern. Dieses meist rundlich geformte Organell beinhaltet die genetische Information in Form von Chromatin. Der Zellkern ist umgeben von einer inneren und einer äußeren Kernmembran. Letztere ist mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) verbunden. Dieses verzweigte Netzwerk aus flachen Hohlräumen lässt sich in einen glatten und rauen Bereich einteilen. Seinen Namen hat das raue ER daher, dass auf seiner Membranoberfläche Ribosomen sitzen. Das sind makromolekulare Komplexe aus Proteinen und Ribonukleinsäuren, die zusätzlich frei im Zytoplasma vorliegen. Zusammen mit dem Golgi-Apparat, einem membranumschlossenen Hohlraum, bilden Zellkern, ER und Ribosomen die Maschinerie, die vor allem zur Synthese neuer Proteine und deren Transport dient. Für die Bereitstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP), die für alle Prozesse in der Zelle benötigt wird, sind die Mitochondrien zuständig. Diese pleomorphen Organellen bestehen aus einer plasmatischen Phase (Matrix) und sind von einer doppelten Hülle umgeben, an der über die Atmungskette in einer oxidative Phosphorylierung ATP generiert wird. Zudem besitzen Mitochondrien ein eigenes, ringförmiges Genom. Eine weitere Gruppe an Organellen mit eigenem Genom bilden die Plastiden. Zu deren bekanntesten Vertretern gehören die Chloroplasten, die zur Photosynthese befähigt sind. In ihrem Inneren (Stroma) befinden sich die Thylakoide, umgeben von einer doppelten Membran. Die Chlorophyllfarbstoffe sind in der Thylakoidmembran eingelagert und für Photosyntheseaktivität in den Chloroplasten verantwortlich. Einen weiteren Teil der pflanzlichen Zelle mit wichtiger Funktion stellen die Vakuolen dar. Da sie für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung sind, schließen sich im Folgenden genauere Erklärungen an (Gunning und Steer, 1996; Khan, 2017).

2.7 Vakuolen

Pflanzliche Vakuolen sind wichtige, membranbegrenzte Organellen der Zelle mit vielen Funktionen. Sie stellen in Bezug auf Inhalt, Größe und Form eine sehr diverse Gruppe dar. Am häufigsten ist die zentrale Vakuole (CV) vertreten, wobei auch der Begriff Lytische Vakuole Verwendung findet (Pereira et al., 2014). Die CV ist in fast allen Geweben der vegetativen Organe der Pflanze präsent und mit bis zu 90 % des Gesamtvolumens der Zelle die größte erkennbare Struktur. Die Abgrenzung vom Cytosol ermöglicht eine Membran, der sogenannte Tonoplast (Abb. 12). Zu den Funktionen der zentralen Vakuolen gehören neben der Aufrechterhaltung des Turgors die Speicherung von Sekundärmetaboliten

und Giftstoffen, die Initiation des Zellwachstums, die Degradation von Proteinen sowie die Einlagerung von Farbstoffen. Insbesondere für den Katabolismus von Proteinen ist bekannt, dass der Zellsaft der Vakuolen mit spezifischen Enzymen/ Proteinen (Hydrolasen) ausgestattet sein kann. Die Abbauprozesse werden durch einen mild-sauren pH-Wert von etwa 6 unterstützt. Mithilfe von den Membranproteinen H^+ -Adenosintri-phosphatase (H^+ -ATPase) und Pyrophosphatase (P-ATPase) erfolgt der Transport von H^+ -Ionen in das Innere der Vakuole, wodurch der pH-Wert generiert und aufrechterhalten werden kann (Marty, 1999). Zudem entsteht, ausgelöst durch den Protonengradienten, ein elektrochemischer Gradient, wodurch polare Moleküle und Ionen durch die Membran transportiert werden können. Infolgedessen ermöglicht beispielsweise der Antiporter NHX1 den Austausch von Na^+ -Ionen aus dem Cytosol mit H^+ -Ionen aus dem Zellsaft der Vakuole in Blütenblättern von *Ipomoea tricolor*. Hierbei verschiebt sich der pH-Wert von leicht sauer (um etwa 6,6) zu schwach basisch (7,7), wodurch sich die Konformation der in den Vakuolen gelagerten Anthocyane ändert und ein Wechsel der Blütenfarbe von rot zu blau auslöst wird (Yoshida et al., 2005). Im Gegensatz dazu erfolgt durch die heteromere P-ATPase eine Hyperazidifizierung der Petalvakuolen in *Petunia* aufgrund von vermehrtem Protonentransport aus dem Cytosol in das Vakuoleninnere (Faraco et al., 2014). Dabei stellt sich im Vakuolenlumen ein pH-Wert von ca. 5 ein, was wiederum mit einer Farbänderung der Blüten von blau zu violett und rot einhergeht. Außerdem finden sich ABC-Transporter im Tonoplasten der Vakuolen (Khan, 2017). Sie weisen eine ATP-bindende Kasette auf und können spezifische Substrate, wie glukosylierte oder glukuronierte Verbindungen, aktiv über die Membran transportieren. Nach Rea et al. (1998) sollen diese insbesondere in Vakuolen präsent sein, die auf die Einlagerung von Farbstoffen spezialisiert sind. Ein Beispiel hierfür ist der Transport des Anthocyans Cyanidin-3-glukosid in *Zea mays*. Durch die ABC-Transporterklasse Glutathion S-X-Pumpen gelangt der glutathionylierte Farbstoff aktiv in die Vakuole, wo er die bronzene Färbung des Mais verursacht (Rea et al., 1998). Eine weitere Klasse an intrinsischen Membranproteinen der Vakuole sind die Aquaporine. Spezifisch für den Tonoplasten der CV sind die γ -Aquaporine, die den Wassertransport ermöglichen. Andere vakuoläre Proteine sind unter anderem an Stressantwort und Fusionierung von Vesikeln mit dem Tonoplasten beteiligt sowie Bestandteil des Zytoskeletts (Endler et al., 2006; Whiteman et al., 2008; Whiteman et al., 2008; Carter et al., 2004; Schmidt et al., 2007).

2.8 Ansätze zur Isolation von Vakuolen

Die erste erfolgreiche Isolation von Vakuolen beschrieb Cocking im Jahre 1960 (Cocking, 1960). Im Anschluss daran begann eine Ära, in der vermehrt Vakuolen aus höheren Pflanzen isoliert und biochemisch charakterisiert wurden. Trotz Verbesserungen der damals innovierten Techniken, sind die Grundzüge der ursprünglichen Methoden gleichgeblieben. Zudem fanden sie bei einer Vielzahl von

Pflanzenarten Anwendung. Dennoch steht zu beachten, dass kein allgemein gültiges bzw. auf alle Spezies übertragbares Protokoll zur Vakuolenisolation existiert. Es muss vielmehr für die jeweilige Aufgabenstellung, die jeweilige Pflanzenart und das jeweilige Gewebe eine eigene Vorschrift etabliert werden. Eine Übersicht über die verfügbaren Methoden liefern die Veröffentlichungen von Marezki und Thom (1989) sowie Wagner (1985, 1987). Sie zeigen auf, dass eine kontrollierte Lyse von Protoplasten zu den bewährtesten Techniken gehört, wobei die Vakuolen intakt bleiben. Die kontrollierte Lyse kann beispielsweise durch die drei am häufigsten verwendeten Methoden erfolgen:

- Osmotischer Schock
- Polybaseinduzierte Lyse
- Mechanisches Zerreißen der Plasmamembran

Basierend auf einer Veröffentlichung von Aerts und Schram (1985), die die verschiedenen Techniken auf die Blütenblätter von *Petunia Hybrida* anwendeten und miteinander verglichen, wurden die Methoden „Osmotischer Schock“ (im Folgenden osmotischer Schock genannt) und „polybaseinduzierte Lyse“ (im Folgenden polybaseinduzierte Lyse genannt) als geeignet für einen Versuch mit *P. nudicaule* eingestuft. Eine aktuellere Veröffentlichung von Robert et al. (2007) unterstützte diese Auswahl. Hierbei war der osmotische Schock für Blätter von *Arabidopsis thaliana* optimiert worden. Weiterhin kam in der vorliegenden Arbeit ein Protokoll zum Einsatz, welches eine relativ neue Methode anwendet. Dabei soll ein Detergens eine Permeabilisierung der Plasmamembran und somit eine Lyse des Protoplasten auslösen (Methode „CHAPS“). Diese Methode wurde von Ma (2005) erfolgreich auf *Thlaspi caerulescens* angewendet.

Neben der Frage nach der geeigneten Isolationstechnik führen Marezki und Thom (1989) die Frage nach einer Methode zur Reinigung der Vakuolen auf. Ihnen zufolge muss an die Lyse der Plasmamembran immer ein Säuberungsschritt angeschlossen werden, um Fragmente des Zytoplasmas und Komponenten der Plasmamembran zu entfernen. Hierbei hat sich die Verwendung eines Dichtegradienten bewährt, wobei verschiedene Chemikalien zur Auswahl stehen, wie beispielsweise Sucrose, Urografin, Nycodenz, Percoll und Ficoll. Eine elegante Kombination aus Isolation und Reinigung der Vakuolen in einem einzigen Schritt wurde erstmals von Boudet (1981) eingeführt. Bei diesem erfolgt die Aufreinigung gemäß der Sedimentation der Vakuolen durch einen Dichtegradienten aus Ficoll während einer Zentrifugation. Dabei sinken die Vakuolen aufgrund der Zentrifugalkraft in Richtung Boden, bis sie eine Schicht erreicht haben, die ihre eigene Dichte übersteigt. Unerwünschte Zellbestandteile durchwandern eben diese und bilden ein Pellet am Boden. Die zweite Möglichkeit der Aufreinigung mittels eines Dichtegradienten beruht auf dem Prinzip der Flotation (Petrides, 1988). Dabei werden die Vakuolen einem Medium ausgesetzt, dessen

Dichte die der Vakuolen übersteigt. Während einer Zentrifugation bewegen sie sich nicht Richtung Boden, sondern zum Meniskus. Eine solche Technik wurde z.B. von Aerts und Schram (1985) verwendet.

Im folgenden Abschnitt wird der theoretische Hintergrund der ausgewählten Methoden erläutert.

2.8.1 Isolation der Protoplasten

Da, wie in Abschnitt 2.8 erläutert, eine kontrollierte Lyse der Plasmamembran zu den bewährtesten Techniken zur Isolation von Vakuolen gehört, ist als erster Schritt eine Isolation der Protoplasten aus dem pflanzlichen Gewebe nötig. Dafür existieren bereits verschiedene, gut etablierte Protokolle. Für die vorliegende Arbeit wurde eine Vorschrift von Robert et al. (2007) verwendet. Dabei zersetzen das Enzym Cellulase und eine Enzymmischung genannt Macerocym, die aus den Enzymen Pectinase, Hemicellulase und Cellulase zusammengesetzt ist, die Teile der pflanzlichen Zellwand, wodurch eine Freisetzung des Protoplasten erfolgt. Da Protoplasten und Vakuolen fragile Organellen sind, benötigen beide zur Stabilisation ein geeignetes Medium. Dieses muss sowohl einen passenden pH-Wert, als auch ein Osmotikum sowie ein geeignetes Puffersystem enthalten.

2.8.2 Osmotischer Schock

Die Methode osmotischer Schock wird am häufigsten zur erfolgreichen Isolation von Vakuolen eingesetzt. Erstmals beschrieben von Wagner und Siegelmann (1975), wurde sie seither auf eine Vielzahl von Geweben und Pflanzenarten angewandt (Wagner, 1987). Im Zentrum steht hier die Veränderung des osmotischen Zustands der Protoplasten durch schnelle Zugabe eines Mediums mit niedrigerer osmotischer Konzentration. Durch diesen hypotonen Zustand kommt es zu einem Wassereinstrom in das Cytosol der Protoplasten und Vakuolen. Eine korrekt eingestellte Konzentration im Medium soll dabei zum Einreißen der Plasmamembran führen, aber gleichzeitig den Erhalt der Tonoplasten gewährleisten.

Der physikalische Hintergrund zu dieser Methode ist die Osmose (Lodish et al., 2000). Damit ist die passiv gerichtete Diffusion von Molekülen eines Lösungsmittels durch eine selektive oder semipermeable Trennschicht gemeint. Grundlage dafür ist das Bestreben der Teilchen, einen Konzentrationsausgleich zwischen den beiden Kompartimenten zu erreichen. Bei Zugabe einer Lösung, die weniger Osmolyten (=osmotisch aktive Teilchen) enthält, kommt es zu einem Wasserstrom in das höher osmotisch konzentrierte Kompartiment, um den Konzentrationsunterschied auszugleichen. Angewandt auf eine Zelle, bei welcher die Membran als semipermeable Trennschicht fungiert, löst der Wassereinstrom im

Inneren eine Volumenzunahme aus. Die Zelle schwillt an, bis die maximale Kapazität der Membran erreicht ist und diese schließlich platzt (Abb. 13, Lodish et al., 2000).

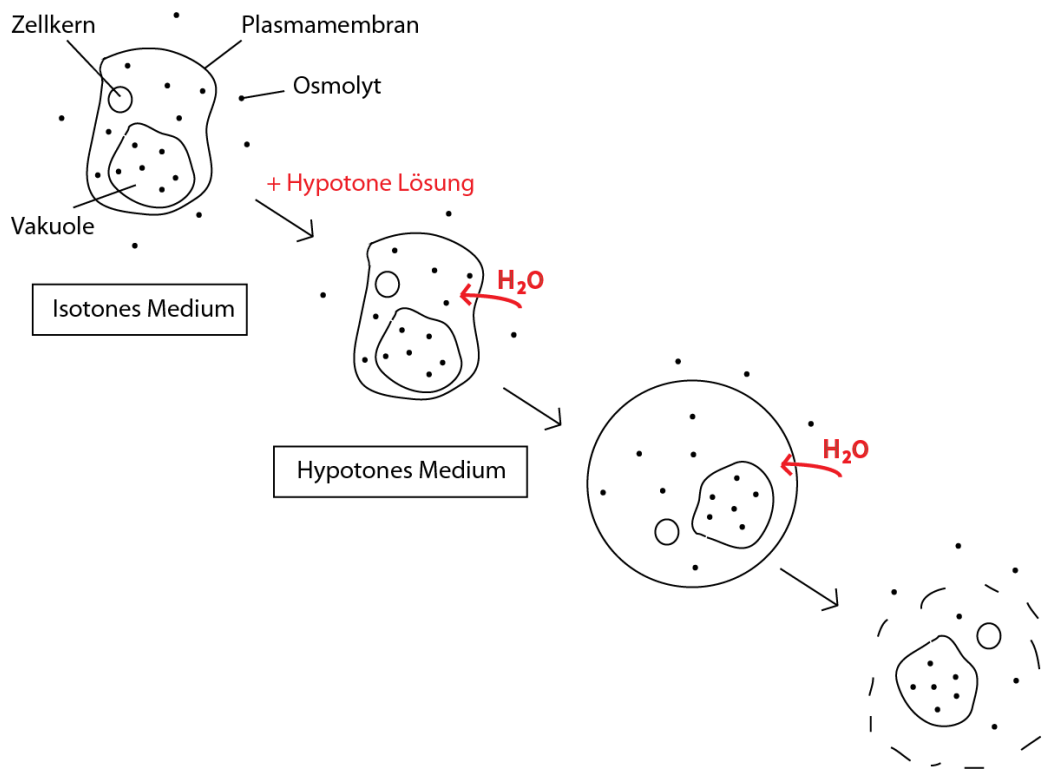


Abb. 13: Schematischer Ablauf des osmotischen Schocks. In einer isotonen Lösung ist die Konzentration an Osmolyten im Medium und im Zytosol des Protoplasten gleich. Nach Zugabe einer Lösung mit weniger Osmolyten wird das Medium hypoton. Aufgrund der höheren Konzentration an osmotisch wirksamen Teilchen im Zytosol kommt es zu einem Wassereinstrom. Die Zelle schwillt an, bis die maximale Kapazität der Membran erreicht ist und diese schließlich platzt (Abb. in Anlehnung an Lodish et al., 2000).

2.8.3 Lyse durch das Detergens CHAPS

Die relativ neue Methode „CHAPS“ wurde erfolgreich auf, aus Blättern gewonnenen, Protoplasten (Mesophyll) von *Sedum alfredii* (Gao et al., 2016) und *Thlaspi caerulescens* (Ma et al., 2005) angewendet.

Dabei kommt das milde, amphotere Tensid 3-[(3-**Ch**olamidoproyl)dimethyl-**am**monio]-1-**p**ropansulfonat (Abb. 14; CHAPS) in niedriger Konzentration zum Einsatz. In der Protoplastenlösung soll es eine Solubilisierung der Plasmamembran auslösen.

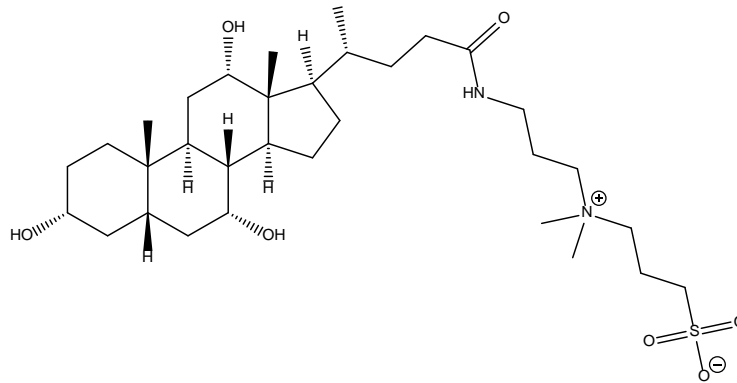


Abb. 14: Struktur des amphoteren Tensids CHAPS.

Hintergrund dieser Wirkung ist, dass sich Membranbestandteile und Detergen in ihrem Aufbau ähneln. Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht mit eingebetteten Proteinen und Cholesterin (Heimburg, 2007). Als Lipidkomponente können amphiphile Substanzen, wie Phospholipide oder Sphingolipide auftreten. Deren lipophile Teile ermöglichen über hydrophobe Interaktionen die Ausbildung einer Doppelschicht. Die Membran ist nicht starr, sondern weist abhängig von Temperatur und Zusammensetzung eine Fluidität auf. Detergenzien wie das zwitterionische CHAPS weisen ebenfalls eine amphiphile Struktur auf. In einem Dispersionsmedium bilden sie aufgrund des hydrophoben Effekts und ab einer bestimmten Massenkonzentration Mizellen-Assoziationskolloide. Aufgrund dieser Eigenschaften interagieren sie mit Membranen und schieben sich zwischen deren Lipidmoleküle. Eine allmähliche Herauslösung der Phospholipide, einhergehend mit der Bildung von Lipid-Detergen-Mizellen ist die Folge. Schlussendlich kommt es zu einer Lyse der Membran (Abb. 15, Heimburg, 2007; Schuck et al., 2003).

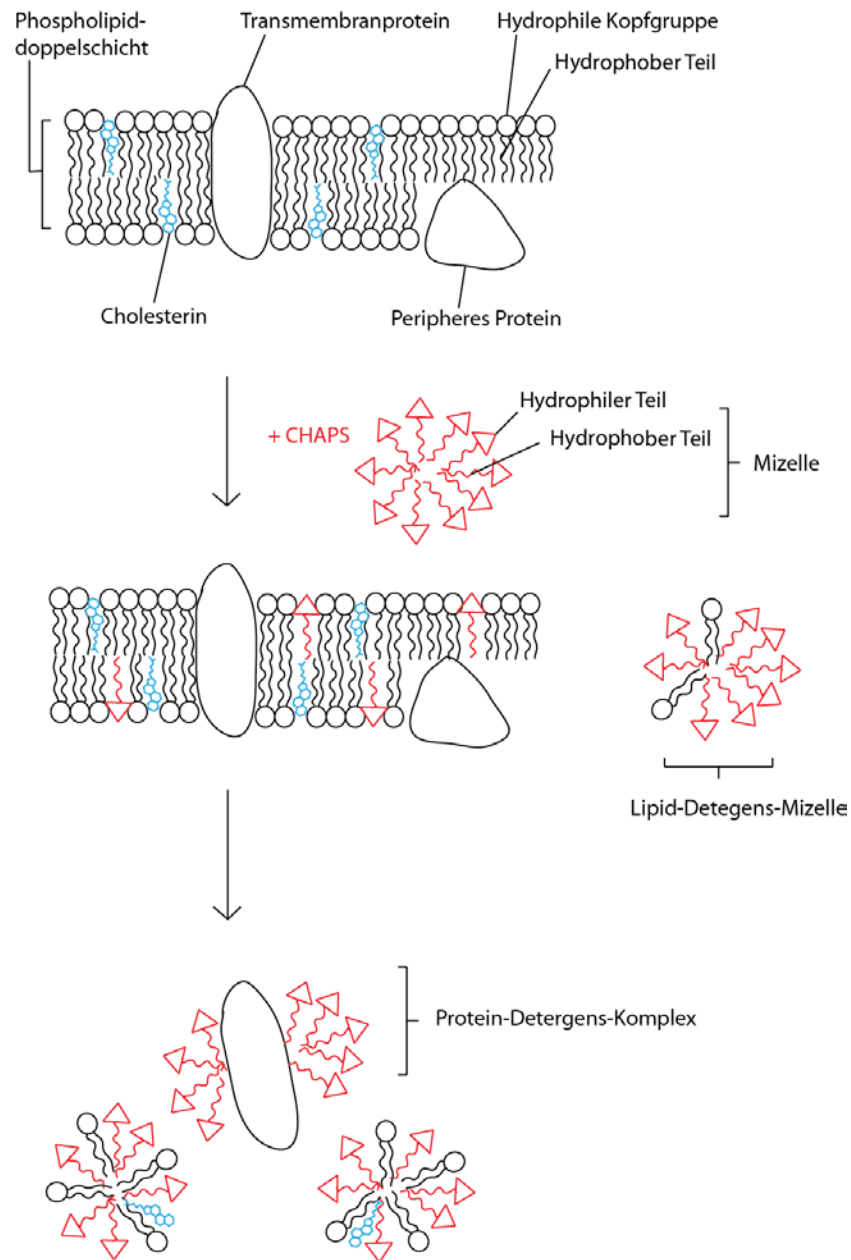


Abb. 15: Schematischer Aufbau einer Membran und ihrer Interaktion mit einem Detergens. Durch die Zugabe von CHAPS kommt es allmählich zu einer Solubilisierung der Membran. Dabei werden Lipid-Detergens-Mizellen gebildet (Abb. in Anlehnung an Heimburg (2007) und Schuck et al. (2003)).

Im Fall der Vakuolenisolation ist davon auszugehen, dass Plasmamembran und Tonoplast sich in ihrem Aufbau und Zustand unterscheiden. Nach Schuck et al. (2003) führt ein hoher Anteil an Sphingolipiden mit gesättigten Fettsäuren und Cholesterin zu einer dichteren Anordnung der Moleküle im Tonoplasten, wodurch sich ein hoher geordneter Zustand einstellt. Dadurch sind diese Membranbestandteile in der Lage eine Resistenz gegenüber milden Detergenzien zu zeigen. Deshalb gilt die Plasmamembran in der

Theorie als suszeptibel, der Tonoplast jedoch als resistent gegenüber der Solubilisierung durch CHAPS. Des Weiteren kann argumentiert werden, dass durch den Einsatz einer niedrigen CHAPS-Konzentration dieses nach Solubilisierung der Plasmamembran aufgebraucht ist, sodass im Folgenden kein Einfluss auf den Tonoplasten erfolgt. Jedoch existieren weiterhin einige Veröffentlichungen, die CHAPS zur Solubilisierung von Proteinen aus dem Tonoplasten verwenden (Britten, 1992), was dafür spricht, dass auch für diese Methode und das jeweilige Gewebe der zu untersuchenden Spezies eine Optimierung notwendig ist.

2.8.4 Polybaseinduzierte Lyse

Die polybaseinduzierte Lyse von Protoplasten ist eine Technik, die von Buser und Matile (1977) entwickelt wurde. Dabei erfolgt die Zugabe des polykationischen Makromoleküls **Diethylaminoethyl-dextran** (DEAE-Dextran, Abb. 16) zu den Protoplasten, wodurch es zu einer raschen Adsorption der Polybase an die Plasmamembran kommt. Die so entstehende Veränderung der Oberflächenladung führt zur Lyse der Membran. Um den Tonoplasten vor diesem Effekt zu schützen, schließt sich die Zugabe von Polysäure Dextransulfat an. Sie dient dazu, die Polybase zu neutralisieren.

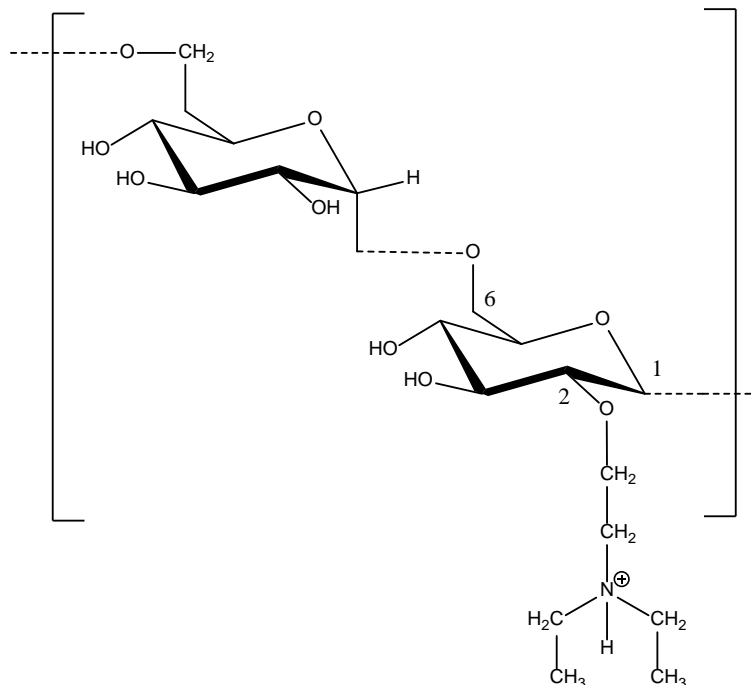


Abb. 16: Struktur des DEAE-Dextrans. Dextran ist ein Biopolysaccharid, das aus α -1,4- und α -1,6-verknüpften Celluloseeinheiten besteht. Die Position 2 der Celluloseeinheit ist mit Diethylaminoethyl-dextran verethert.

Hintergrund dieser Methode ist das Membranpotential. Aufgrund einer ungleichen Verteilung von geladenen Ionen zwischen Zellinnerem und Zelläußeren kommt es an der Membran zu einer elektrischen Spannung. Polybasen, wie das DEAE-Dextran, sind positiv geladen und werden von der negativ geladenen Oberfläche der Membran angezogen und adsorbiert. Dabei wird die natürliche Ladung der Membran aufgehoben, wodurch eine Lyse eintritt (Abb. 17; Maretzki und Thom, 1989).

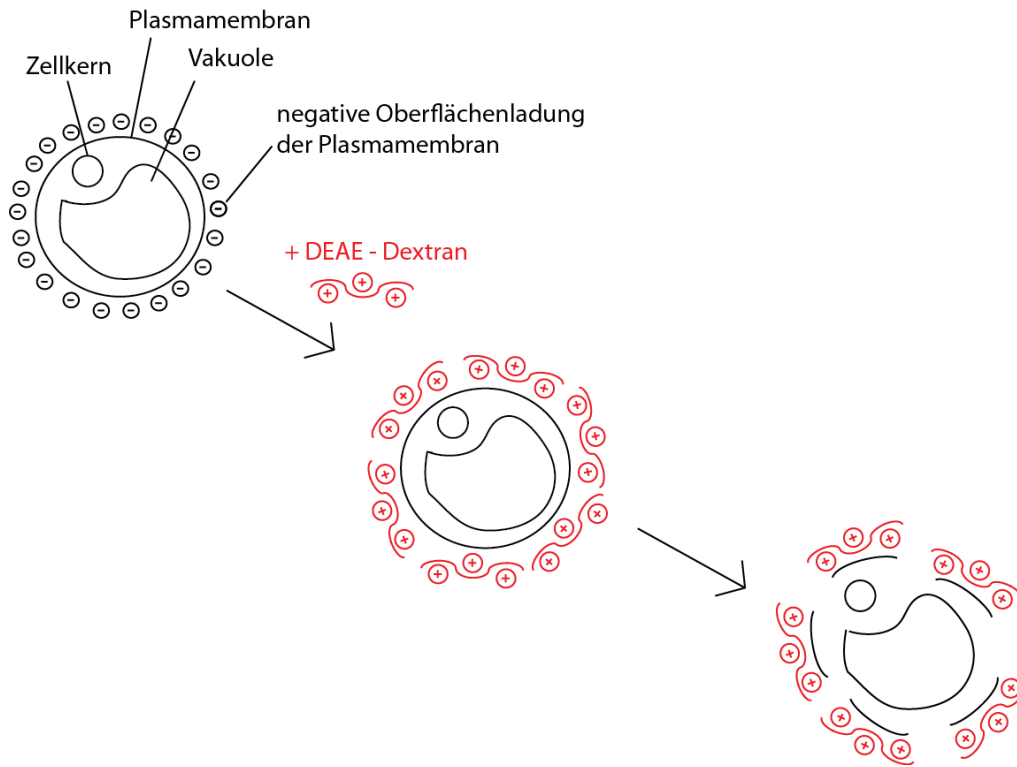


Abb. 17: Schematischer Ablauf der polybaseinduzierten Lyse. Nach Zugabe der positiv geladenen Polybase DEAE-Dextran kommt es zu einer Adsorption an die negativ geladene Oberfläche der Plasmamembran. Durch die Veränderung der Oberflächenladung wird die Lyse der Plasmamembran ausgelöst (Abb. in Anlehnung an Maretzki und Thom, 1989).

Die Weiterentwicklung der Methode polybaseinduzierte Lyse erfolgte durch Boudet (1981). Während einer Dichtegradientenzentrifugation durchwandern die Protoplasten hierbei mehrere Schichten, bestehend aus unterschiedlich konzentrierten Ficollösungen und dem jeweiligen Reagens. Dabei werden sie lysiert und die resultierenden Vakuolen gleichzeitig aufgereinigt. Als stark verzweigtes Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin besitzt Ficoll eine hohe Dichte (Abb. 18). Es lässt sich leicht in Wasser lösen, ist neutral und hat die gewünschten osmotischen Eigenschaften. Daher eignet es sich besonders für eine Dichtegradientenzentrifugation mit Protoplasten.

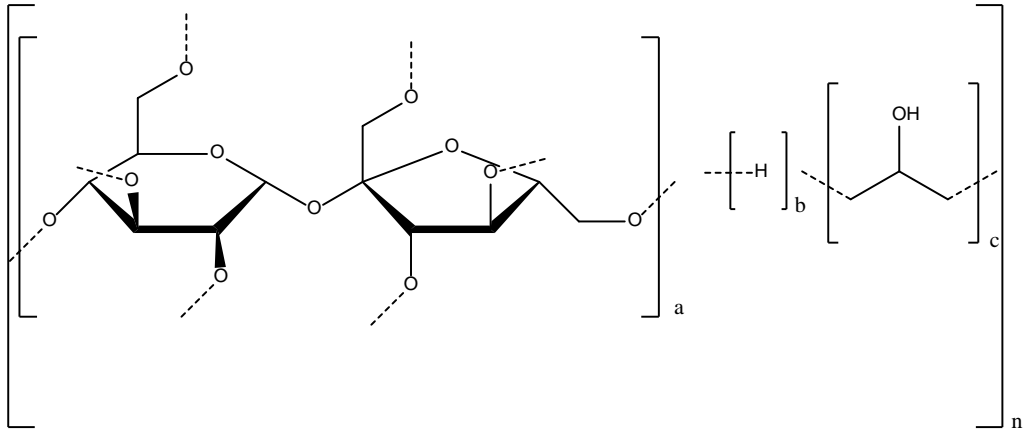


Abb. 18: Struktur des Ficolls.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Methodensuche und erste Optimierung

In Abb. 19 ist dargestellt, welche Methoden zur Vakuolenisolation aus gelben Blütenblättern von *P. nudicaule* im Rahmen dieser Arbeit getestet (quadratisch umrahmt) und optimiert (oval umrahmt) wurden. Alle mit einem roten Kreuz gekennzeichneten Pfade stellten sich als wenig effektiv heraus.

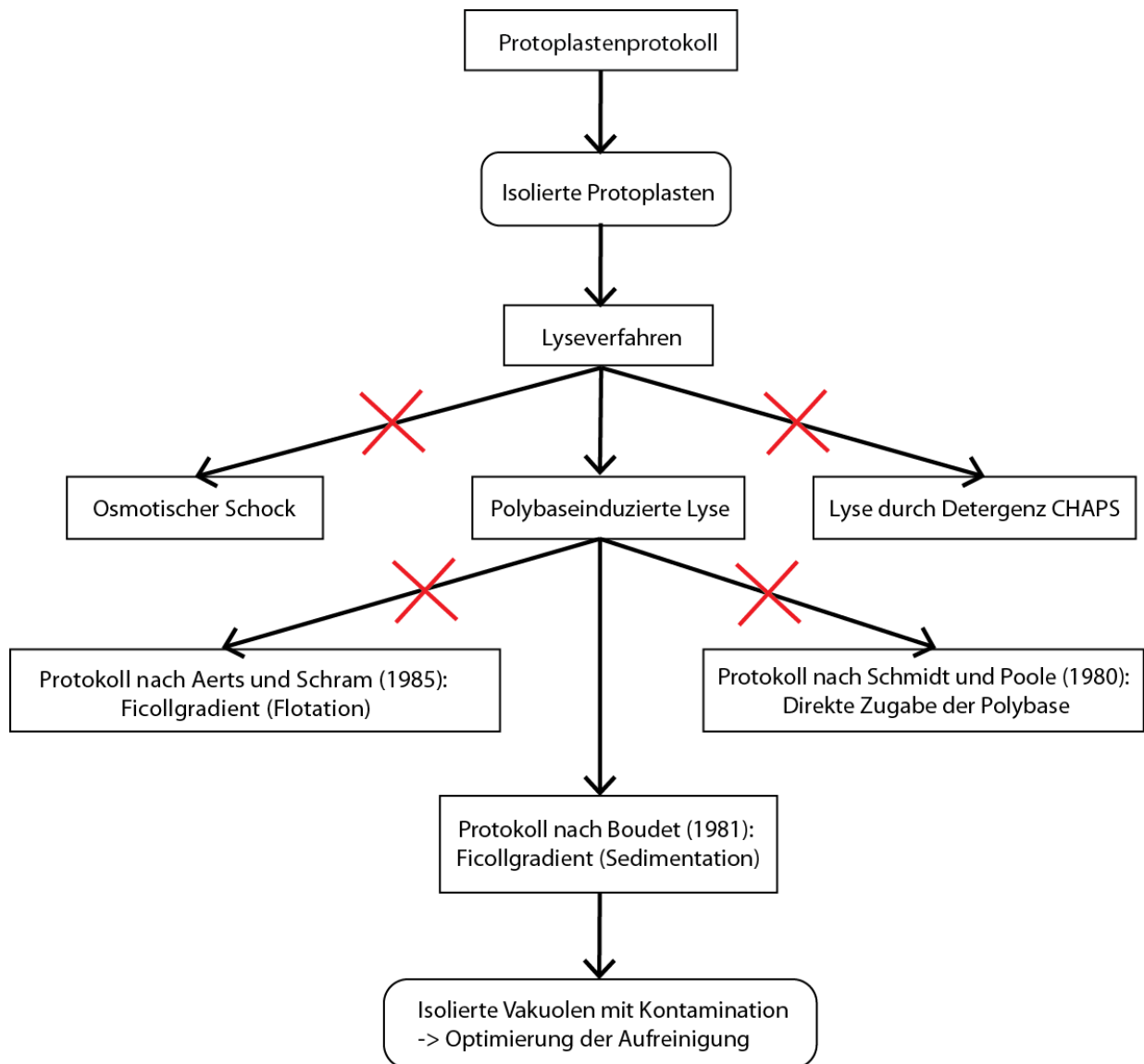


Abb. 19: Testung (Kästen) und Optimierung (Ovale) verschiedener Methoden zur Isolation von Vakuolen.

3.1.1 Isolation der Protoplasten

Da eine kontrollierte Lyse der Plasmamembran des Protoplasten in der Literatur als häufigste Methode zur Gewinnung von Vakuolen angegeben wird, erfolgte zunächst die Isolation von Protoplasten aus den Blütenblättern des gelben Kultivars von *P. nudicaule*. Mithilfe eines bereits etablierten Protokolls nach Robert et al. (2007) gelang es, eine Vielzahl an Protoplasten zu gewinnen (Abb. 20, Abb. 21, Abb. 22). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass unter den in Kapitel **Error! Reference source not found.** vorgestellten Bedingungen die Inkubation zum vollständigen Ablösen der Zellwand für mindestens vier Stunden erfolgen muss. Eine Verringerung der Zeit führte zu kettenförmig verbundenen Protoplasten (Abb. 23). Außerdem beinhaltete die Lösung bei kürzerer Inkubation noch andere Zellorganellen, wie zum Beispiel Leitbündelbestandteile oder Membranreste der zerstörten Protoplasten (Abb. 21, Abb. 24). Währenddessen führte eine Verlängerung der Inkubationszeit über Nacht teilweise zur Lyse der Protoplasten.

Alle im Folgenden abgebildeten Lichtmikroskop-Fotografien wurden mit dem Mikroskop Leica DM6000 B und der Kamera Leica LMD CC 7000 Scan CC aufgenommen. Die Zahlen in Klammern in der jeweiligen Bildunterschrift geben die verwendete Vergrößerung an.

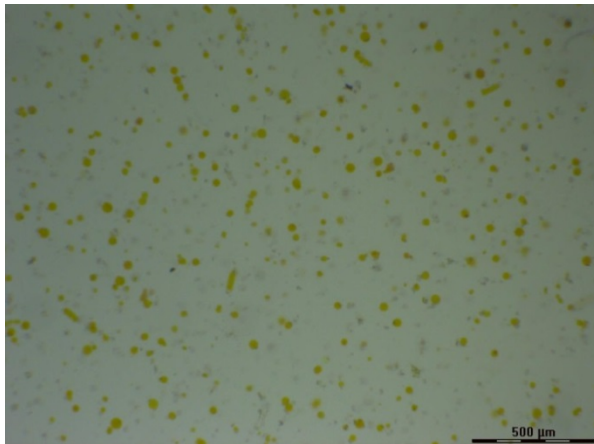


Abb. 20: Verdünnte Lösung der Protoplasten (1: 1, WP I, 4 x). Es liegt eine Vielzahl von Protoplasten vor.

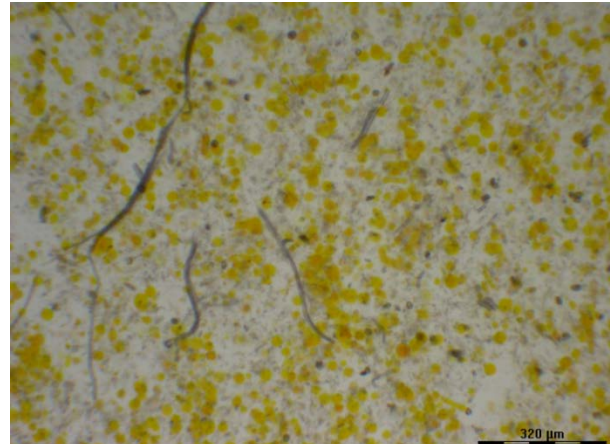


Abb. 21: Unverdünnte Lösung der Protoplasten (6,3 x) mit anderen Zellbestandteile und Leitbündeln.

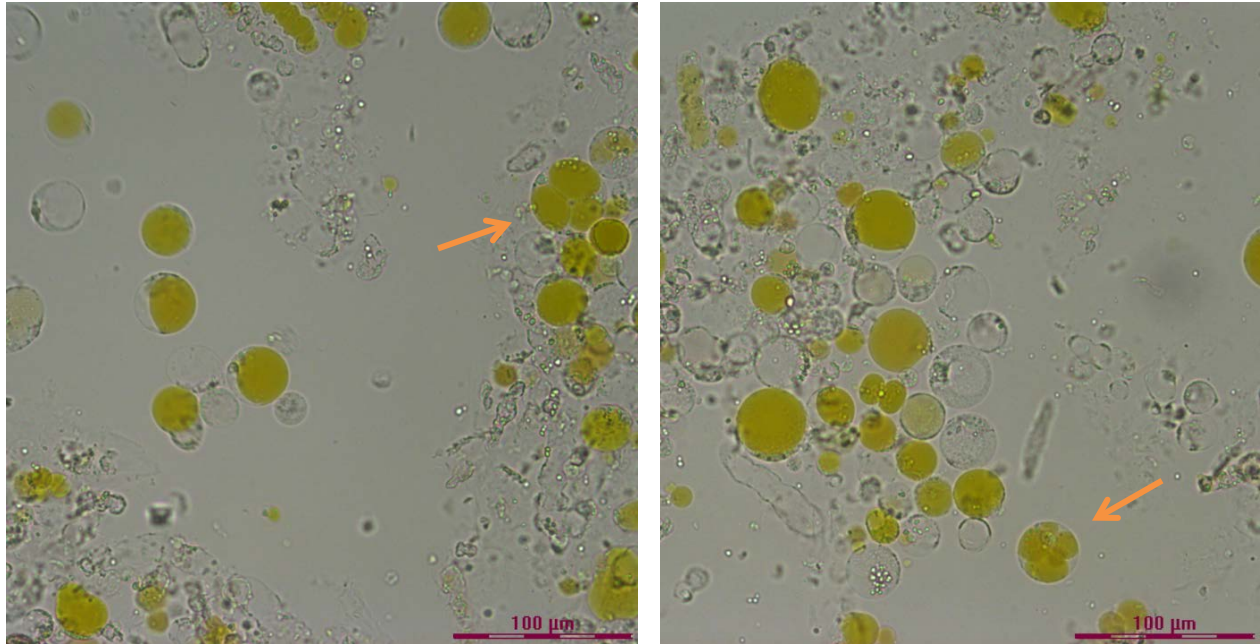


Abb. 22: Lösung der Protoplasten (20 x). Die einzelnen Bestandteile der Protoplasten sind erkennbar, vereinzelt treten mehrere Vakuolen anstelle einer Zentralvakuole auf.

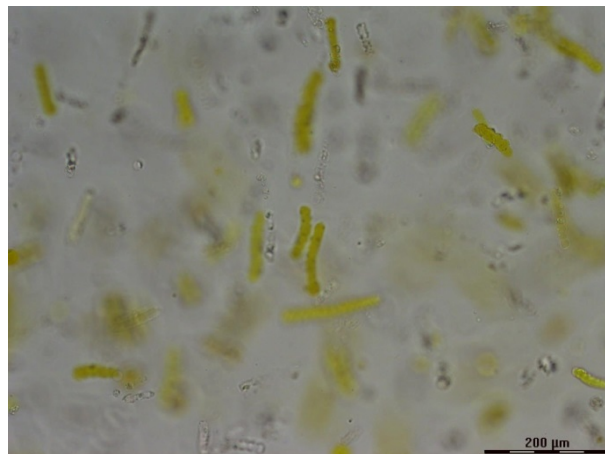


Abb. 23: Unvollständig isolierte Protoplasten (10 x). Die Protoplasten sind kettenförmig verbunden.



Abb. 24: Detailaufnahme Leitbündel (10 x).

Das Lichtmikroskop ermöglicht es, die einzelnen Bestandteile des Protoplasten zu erkennen (Abb. 25). Aufgrund der Speicherung der Farbstoffe (Nudicauline) in den Vakuolen erscheinen diese gelb. Zudem zeigt sich häufig, dass eine Vakuole den größten Volumenanteil der Zelle einnimmt. Nur in wenigen

Fällen wurden mehrere Vakuolen beobachtet (Abb. 22, Abb. 25). Der Durchmesser der Protoplasten lag bei 10–40 μm , wobei er in Abhängigkeit der osmotischen Konzentration des Mediums (hier: 0,4 M Mannitol) stark variiert (Abb. 26). Neben der Vakuole finden sich noch weitere Zellorganellen im Zytosol der Protoplasten. Dazu gehören besonders abundante, runde, grünlich gefärbte Organellen mit einem Durchmesser von ca. 5 μm , bei denen es sich wahrscheinlich um Plastiden handelt (Abb. 25).

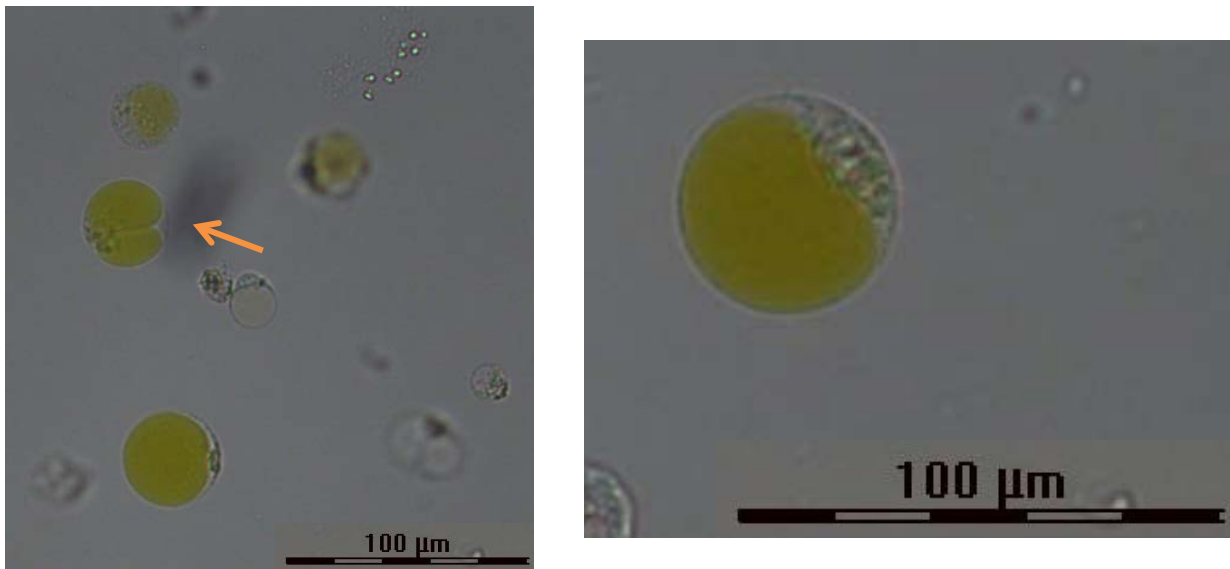


Abb. 25: Verdünnte Lösung der Protoplasten (1:1 mit WP I, 20 x): **Links:** Protoplast mit zwei Vakuolen. **Rechts:** Detailaufnahme eines Protoplasten. Es sind Plasmamembran, Vakuole und weitere Organellen des Zytosols zu erkennen.

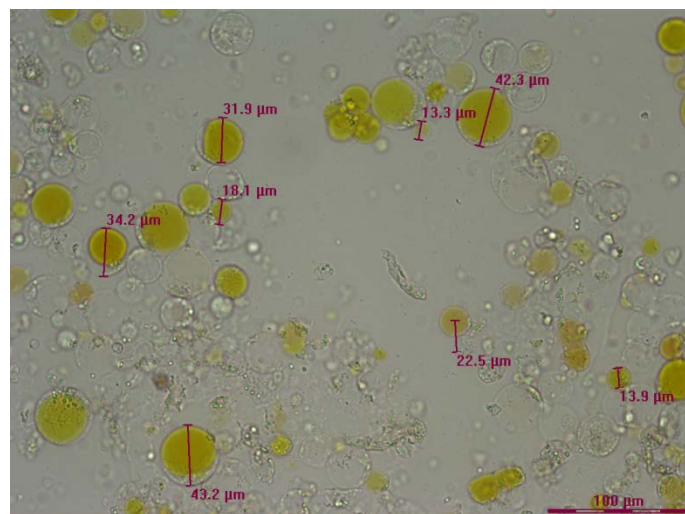


Abb. 26: Detailaufnahmen zur Bestimmung des Protoplastendurchmessers (20 x).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei getesteten Methoden zur kontrollierten Lyse der Protoplasten und damit der Isolation von Vakuolen vorgestellt. Dabei handelt es sich um den osmotischen Schock sowie Lyse durch Polybase und durch das Detergens CHAPS.

3.1.2 Isolation der Vakuolen

Zwei der drei getesteten Methoden zur Vakuolenisolation verliefen unter den angegebenen Bedingungen wenig erfolgreich. Beispielsweise konnten beim osmotischen Schock zwar Vakuolen isoliert werden, jedoch nur in geringen Ausbeuten (Abb. 27, Abb. 28, Abb. 29, Abb. 30). Damit ist diese Methode für die angestrebte Proteinextraktion ungeeignet, sodass aufgrund des zeitlichen Aufwands auf weitere Optimierung verzichtet wurde. In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise, die in einem solchen Fall zur Steigerung der Ausbeute führen können. Hierzu zählen Anpassung der Natriumphosphatkonzentration und des pH-Werts, Verwendung von EDTA und Re-Adjustierung der Mediumskonzentration nach der Lyse. In der Literatur sind für den osmotischen Schock Ausbeuten von 1–5 % (Aerts, 1985) und 10–20 % (Wagner, 1987) zu finden.

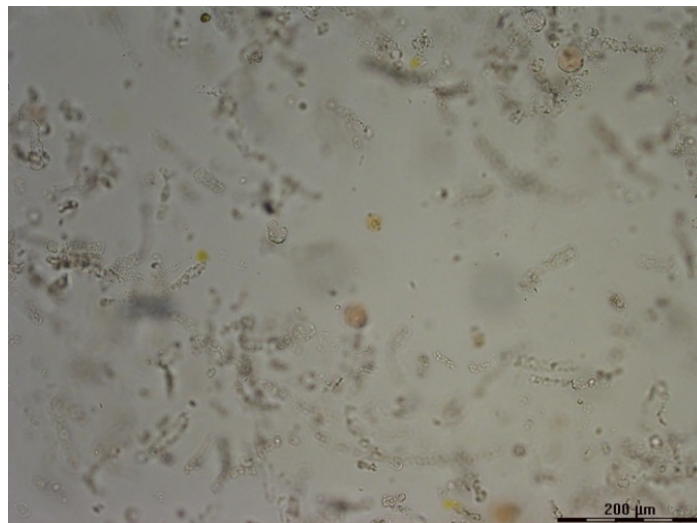


Abb. 27: Aufnahme nach der direkten Zugabe eines Tropfens des Lysepuffers zur Protoplastenlösung (10 x). Fast alle Protoplasten wurden lysiert, sodass nur noch Reste der Protoplasten in der Lösung vorliegen.

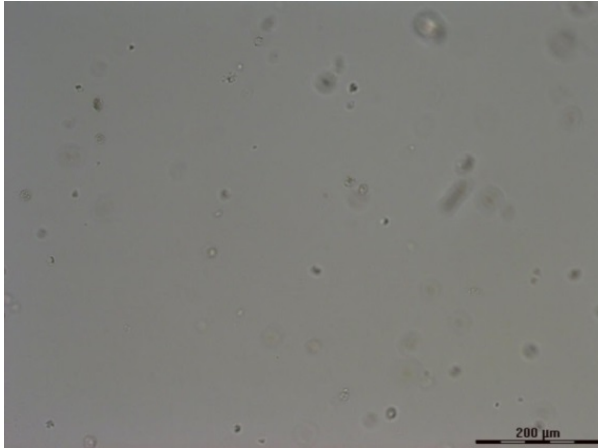


Abb. 28: 0–5 % Ficollschicht nach Dichtegradientenzentrifugation (10 x). Die Lösung ist weitestgehend frei von Zellbestandteilen, außerdem treten keine Vakuolen auf.

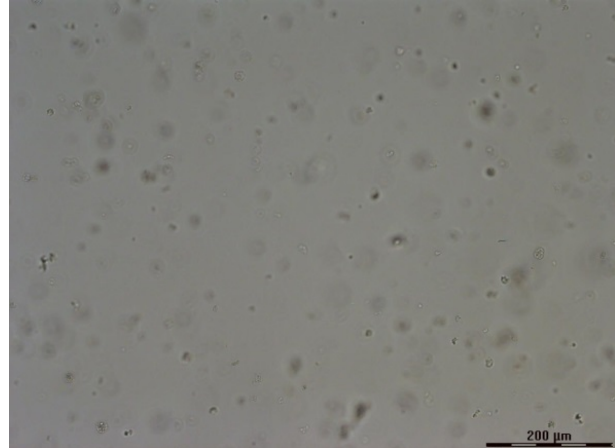


Abb. 29: 5–10 % Ficollschicht nach Dichtegradientenzentrifugation (10 x). Hier liegen keine Vakuolen und noch mehr Zellbestandteile vor als in der 0–5 % Ficollschicht.

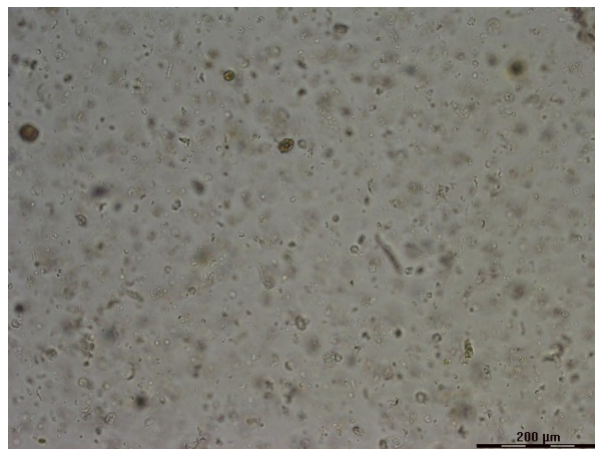


Abb. 30: 10–20 % Ficollschicht nach Dichtegradientenzentrifugation (10 x). In dieser Schicht trat die höchste Dichte an Zellbestandteilen auf, jedoch wurden hier keine Vakuolen beobachtet.

Auch bei der Lyse durch das Detergens CHAPS traten unter den angegebenen Bedingungen Probleme auf, da nach Zugabe des CHAPS-haltigen Vakuolenisolutionsmediums eine Entfärbung der Lösung mit dem bloßen Auge beobachtet wurde. Lichtmikroskopie bestätigte die vermutete Lyse von Protoplasten und Vakuolen (Abb. 31, Abb. 32). Aus diesem Befund ist zu schlussfolgern, dass der Tonoplast gegenüber CHAPS keine Resistenz aufweist. Verglichen mit den in der ursprünglichen Methode verwendeten Blättern von *Sedum alfredii* (*Crassulaceae*) und *Thlaspi caerulescens* (*Brassicaceae*), stammt *P. nudicaule* aus einer anderen Pflanzenfamilie (*Papaveraceae*) und besitzt feinere Blütenblätter. Es ist anzunehmen, dass für dieses Gewebe eine mildere Lysemethode ausreicht.

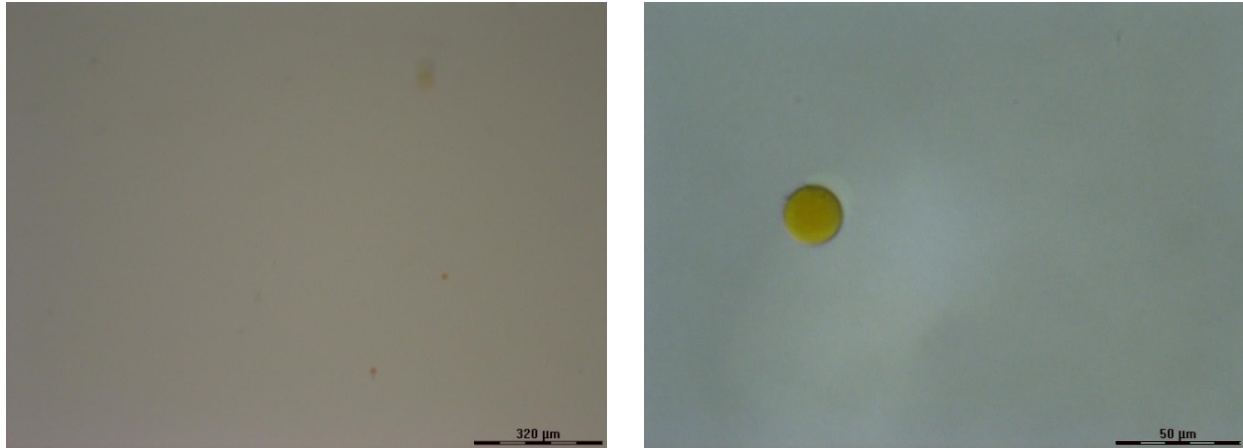


Abb. 31: Aufnahme der Protoplastenlösung nach Zugabe und Inkubation (5 min) des Vakuolenisolutionsmediums. Die hoch verdünnte Lösung weist vereinzelte Vakuolen auf. **Links:** 6,3 x Vergrößerung. **Rechts:** 40 x Vergrößerung.

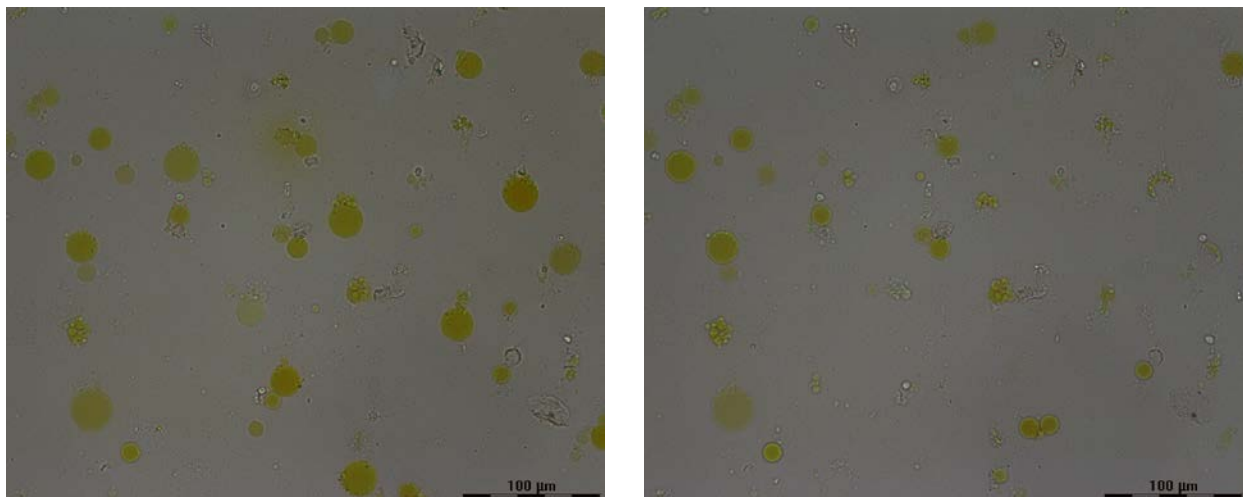


Abb. 32: Aufnahme nach einer direkten Aufgabe des Vakuolenisolutionsmediums auf eine Lösung aus Protoplasten (20 x). Das Zerplatzen vieler Vakuolen durch CHAPS erfolgte innerhalb weniger Sekunden. Zwischen den Aufnahmen links und rechts liegen nur 10 Sekunden.

Von den drei untersuchten Methoden eignete sich die polybaseinduzierte Lyse am besten, um aus den gelben Blütenblättern von *P. nudicaule* Vakuolen in guten Ausbeuten zu isolieren. Zur Erarbeitung einer Arbeitsanweisung wurden insgesamt drei Protokolle herangezogen (Schmidt und Poole, 1980; Aerts und Schram, 1985; Boudet, 1981), wobei für jedes einzelne zunächst Testläufe erfolgten. Die erfolgreichste der drei Arbeitsvorschriften wurde anschließend für das neue Protokoll optimiert. In der Literatur finden sich Ausbeuten von 3–50 % (Wagner, 1987) bzw. 20–30 % (Aerts und Schram, 1985). Damit stellt die polybaseinduzierte Lyse eine ergiebigerere Methode als der osmotische Schock dar.

Im ersten Experiment nach dem Protokoll von Schmidt und Poole (1980), bei dem die direkte Zugabe der Polybase DEAE-Dextran erfolgt, wurde das langsame Ablösen der Plasmamembran mithilfe des Lichtmikroskops verfolgt. Dabei fiel auf, dass zwar die Tonoplasten intakt waren, sich die Plasmamembran jedoch nicht vollständig ablöste, sondern vielmehr zusammen mit Organellen des Zytosols haften blieb (Abb. 33). Die so isolierten Vakuolen wiesen eine hohe Kontamination mit unerwünschten Zellorganellen auf. Dazu zählten beispielsweise Reste des Leitbündels und der Plasmamembran (Abb. 34). Da die genannten Verunreinigungen ebenfalls Proteine enthalten, würden sie das Ergebnis der angestrebten Proteomanalyse für Tonoplast und vakuolischen Zellsaft verfälschen. Damit stand fest, dass zunächst ein Schritt zur Aufarbeitung erfolgen müsste.

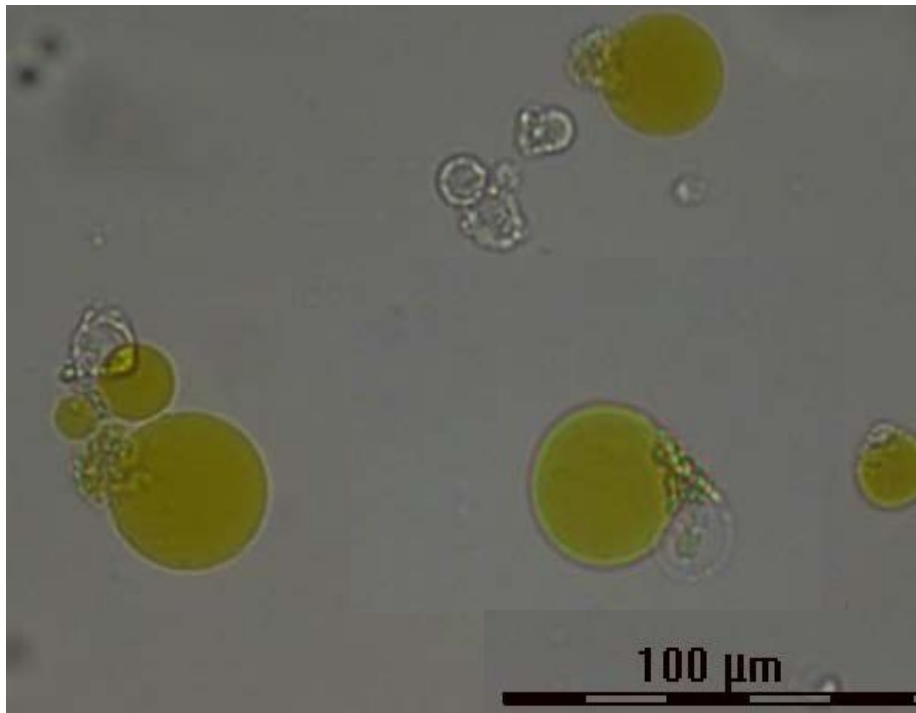


Abb. 33: Vakuolen mit teilweise abgelöster Plasmamembran und angehafteten Organellen des Zytosols (20 x).

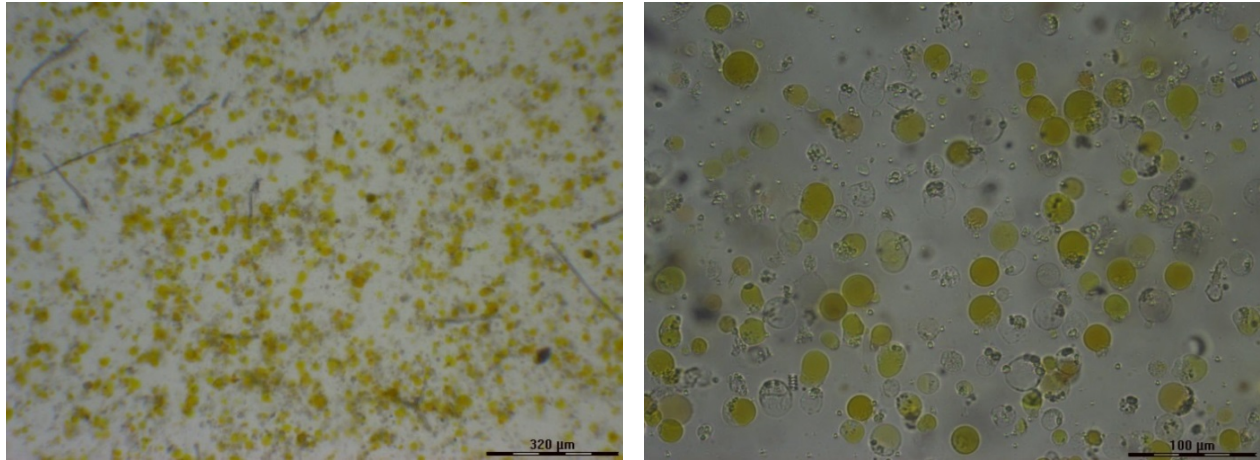


Abb. 34: Vakuolenlösung nach direkter Zugabe der Polybase. Es ist eine deutliche Kontamination mit Leitbündeln und anderen Zellbestandteilen zu erkennen. **Links:** 6,3 x Vergrößerung **Rechts:** 20 x Vergrößerung.

Aerts und Schram entwickelten bereits 1985 eine Vorschrift mit einer Kombination aus Lyse und Reinigung. Dieses Protokoll beruht auf dem Prinzip der Flotation, bei welchem die Protoplasten zunächst in einem Lösungsmittel vorliegen, das ihre eigene Dichte übersteigt. Wenn sie nun einem Schwerfeld ausgesetzt werden, so sedimentieren sie nicht, sondern steigen Richtung Meniskus auf. Bei dem Protokoll nach Aerts und Schram (1985) wandern die Protoplasten von unten nach oben durch Schichten eines Ficollgradienten (unten: 20 % Ficoll, mittig: 15 %, 10 %, 6 % Ficoll, oben: 0 % Ficoll), die DEAE-Dextran und Dextransulfat enthalten, wobei währenddessen die Plasmamembran lysiert wird. Die unerwünschten Zellbestandteile sollen durch die Zentrifugation in die unteren Schichten gelangen, woraus oben eine saubere Vakuolensuspension resultiert. Im Gegensatz zu diesem erwünschten Ergebnis zeigte sich in den durchgeführten Experimenten, dass ein Großteil der Protoplasten in der unteren 20 % Ficollschicht verblieb (Abb. 37). Nur wenige stiegen in die oberen Schichten auf und wurden unterdessen durch die Polybase lysiert (Abb. 35, Abb. 36). Die so gewonnenen Vakuolen wiesen kaum Kontamination mehr auf, verklumpten jedoch. So gab es nur einige Fälle, bei denen eine komplette Ablösung der Plasmamembran beobachtet wurde. Außerdem zeigten manche Schichten der Lösung eine Gelbfärbung, die auf vollständige Lyse hindeutet.



Abb. 35: 0–6 % Ficollschicht (10 x). Die Lösung ist frei von jeglichen Zellbestandteilen.

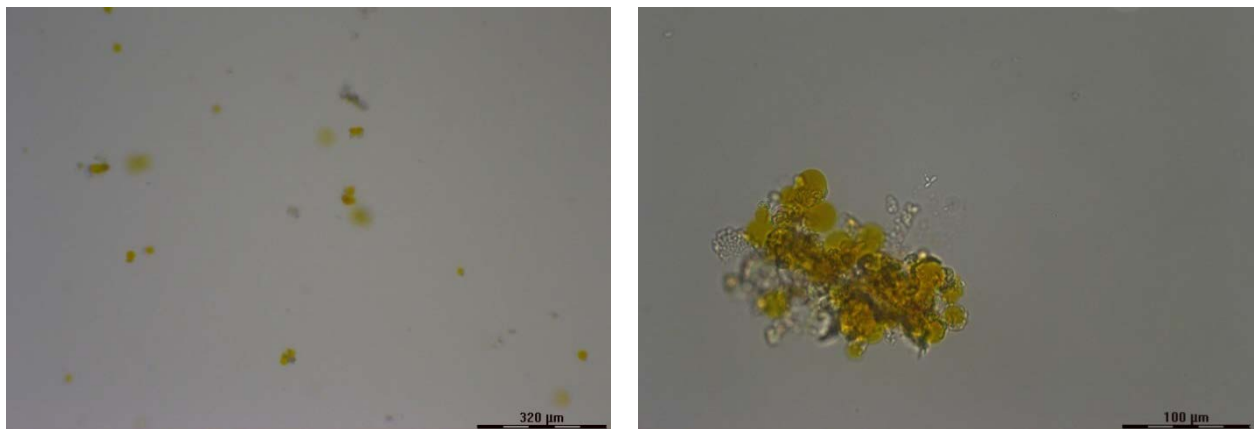


Abb. 36: Pellet der 15–20 % Ficollschicht. **Links:** 6,3 x Vergrößerung. **Rechts:** 20 x Vergrößerung. Die Vakuolen liegen sowohl einzeln als auch als Verklumpung vor, wobei die Lösung keine weiteren Verunreinigungen enthält.

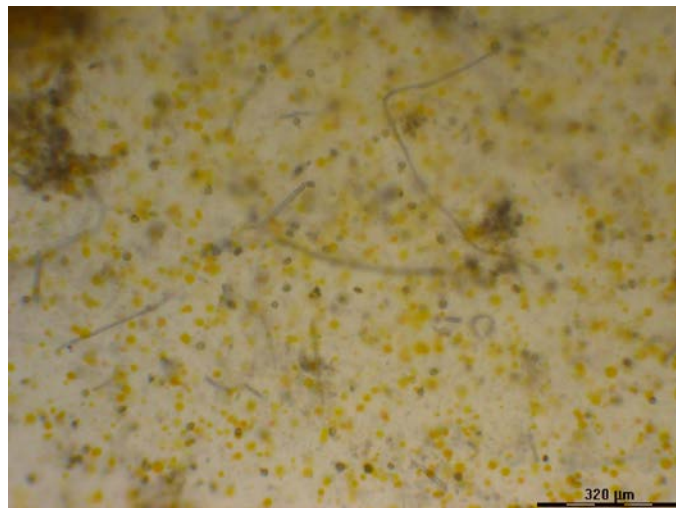


Abb. 37: 20 % Ficollschicht (6.3 x). Der Großteil der Vakuolen befindet sich nach dem Experiment in dieser Schicht; daneben treten auch Leitbündel auf.

Die beobachtete Verklumpung könnte auf Anziehung der Oberflächenladungen zwischen Tonoplasten und Plasmamembranresten, an denen DEAE-Dextran angelagert ist, zurückzuführen sein. Das Austreten von geladenen Proteinen aus dem Zytosol und eine mögliche Oberflächenspannung der Plastiden kommen ebenfalls in Betracht. Weiterhin werden die Organellen durch die bei der Zentrifugation entstehenden Kräfte zusammengedrückt. Die zum Teil vollständige Ablösung der Plasmamembran könnte durch Reibung unterstützt worden sein, die während der Wanderung durch den Dichtegradienten entstand. Jedoch spricht die Gelbfärbung der jeweiligen Schichten für die ungewollte Lyse der Vakuolen. Grund für das nur teilweise Aufsteigen der Protoplasten/ Vakuolen könnte die hohe Dichte der 20 % Ficollschicht gewesen sein. Eine Optimierung der Ficollkonzentration wurde aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt. Obwohl mit diesem Protokoll erstmals eine saubere Lösung an Vakuolen mit teils vollständig abgelöster Plasmamembran vorlag, war die Ausbeute nicht zufriedenstellend.

Als nächstes erfolgte der Test einer abgewandelten Vorschrift nach Boudet (1981), bei der die Protoplasten diesmal oben auf einen Ficollgradienten (unten: 20 % Ficoll, mittig: 5 %–2 % Ficoll, oben: 0 % Ficoll) aufgetragen wurden und während der Zentrifugation durch die Schichten mit DEAE-Dextran und Dextransulfat nach unten gelangten. Die Wanderungsrichtung ist demnach entgegengesetzt zu der aus dem zuvor vorgestellten Protokoll nach Aerts und Schram (1985) und beruht auf dem Prinzip der Sedimentation. Unter den in Kapitel 4.5.3 angegebenen Bedingungen konnten mit dem Protokoll nach Boudet (1981) erfolgreich Vakuolen isoliert werden. Durch Zentrifugation bildete sich sowohl an der 20 %–5 % Ficollgrenzschicht als auch am Boden des Zentrifugenröhrchens ein gelbes Pellet (Abb. 38). Aufgrund von zerplatzten Vakuolen waren die 5 % Ficollschicht und die 2 % Ficollschicht manchmal gelb gefärbt. Lichtmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass die oberste Schicht kaum Vakuolen und wenige andere Zellbestandteile enthielt (Abb. 39). Das gelbe Pellet an der 20–5 % Ficollgrenzschicht bestand aus z. T. verklumpten Vakuolen, Plasmamembran, Zytosolbestandteilen und Leitbündeln (Abb. 40, Abb. 41). Insbesondere grünlich gefärbte Organellen aus dem Zytosol traten zahlreich auf (Abb. 41). Das Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens setzte sich zum Großteil aus Leitbündeln, aber auch aus Vakuolen zusammen (Abb. 42). Letztere wiesen einen Durchmesser von 10–30 µm auf (Abb. 43). Neben den gelben traten vereinzelt auch Vakuolen mit rot gefärbtem Inhalt auf (Abb. 44). Dieser Farbton ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Pelargonidinglukoside zurückzuführen.

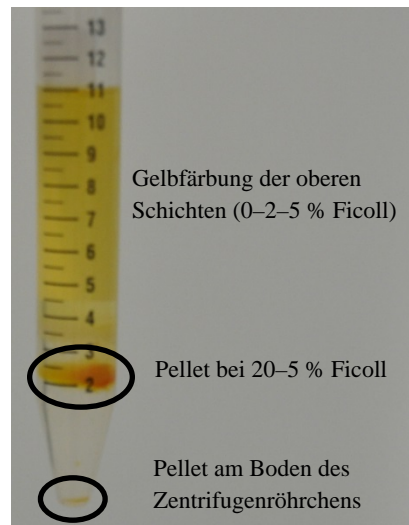


Abb. 38: Ergebnis nach der Dichtegradientenzentrifugation. In den oberen Schichten trat durch Lyse der Vakuolen eine Gelbfärbung auf. An der 20–5 % Ficollgrenzschicht und am Boden des Zentrifugenröhrchens lagerten sich gelbe Pellets ab.

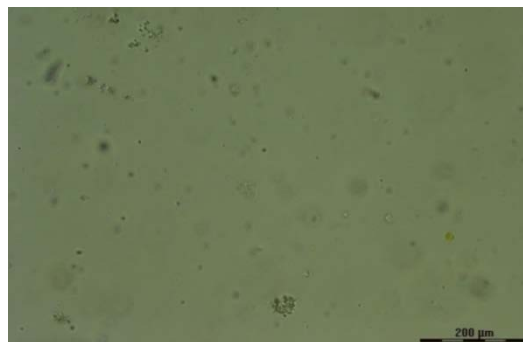


Abb. 39: Ausschnitt aus der obersten Schicht (10 x). Die Lösung weist kaum Vakuolen und wenige andere Zellbestandteile auf.

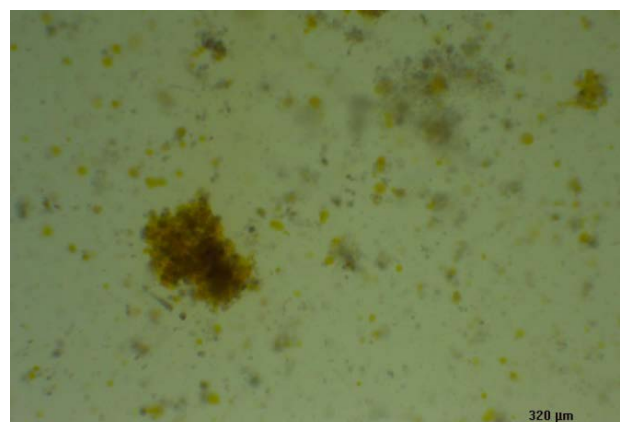


Abb. 40: Pellet der 20–5 % Ficollgrenzschicht (6,3 x). **Links:** Es tritt eine Vielzahl an Vakuolen, Leitbündeln und weiteren Zellorganellen auf. **Rechts:** Vakuolen bilden eine Verklumpung.

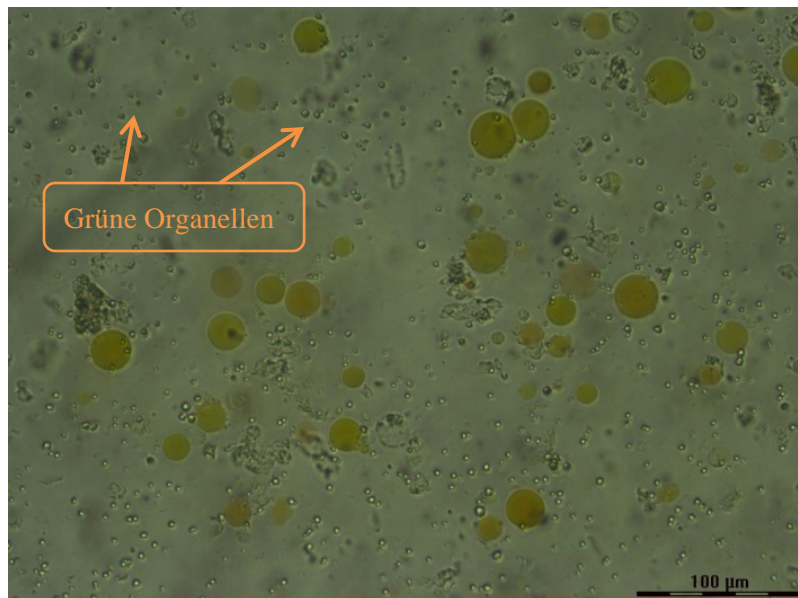


Abb. 41: Pellet der 20–5 % Ficollgrenzschicht nach der Dichtegradientenzentrifugation (20 x, 1:1 Verdünnung mit WP II). Die gewonnenen Vakuolen sind frei von angehafter Plasmamembran, jedoch tritt eine deutliche Verunreinigung der Lösung mit Zytosolbestandteilen (besonders grünen Organellen) auf.

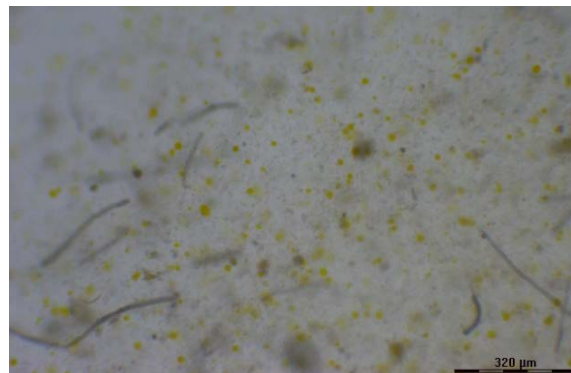


Abb. 42: Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens nach der Dichtegradientenzentrifugation (6,3 x). Es sind Vakuolen und Leitbündel und weitere Verunreinigungen zu erkennen.

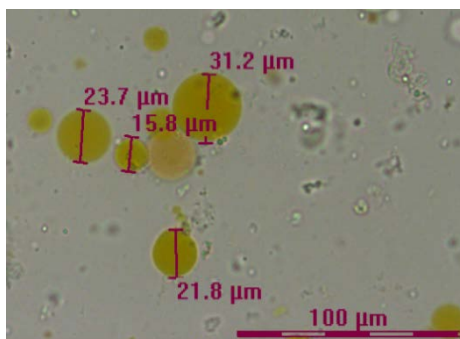


Abb. 43: Detailaufnahmen zur Bestimmung des Vakuolendurchmessers (20x).



Abb. 44: Rote Vakuole (20 x).

Durch die Kombination von polybaseinduzierter Lyse und Dichtegradientenzentrifugation kommt es zur kompletten Ablösung der Plasmamembran und aller Zellorganellen des Zytosols. Weiterhin durchwandern die Protoplasten die beiden Ebenen mit niedriger Ficollkonzentration (2 % und 5 % Ficoll), bis sie größtenteils von der untersten Schicht (20 % Ficoll) zurückgehalten werden. Demnach weisen die Vakuolen eine geringere Dichte als die hoch konzentrierte Ficolllösung auf. Da im Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens Leitbündel gefunden wurden, ermöglicht dieser Reinigungsschritt ihre Entfernung aus der Lösung.

3.2 Optimierung des Protokolls nach Boudet (1981)

Von allen drei getesteten Protokollen eignete sich die Vorschrift nach Boudet (1981) am besten für eine weiterführende Optimierung. Die daran beteiligten Schritte zur Verbesserung der Ausbeute und zur Beseitigung der Verunreinigungen sind zur Veranschaulichung in Abb. 45 dargestellt.

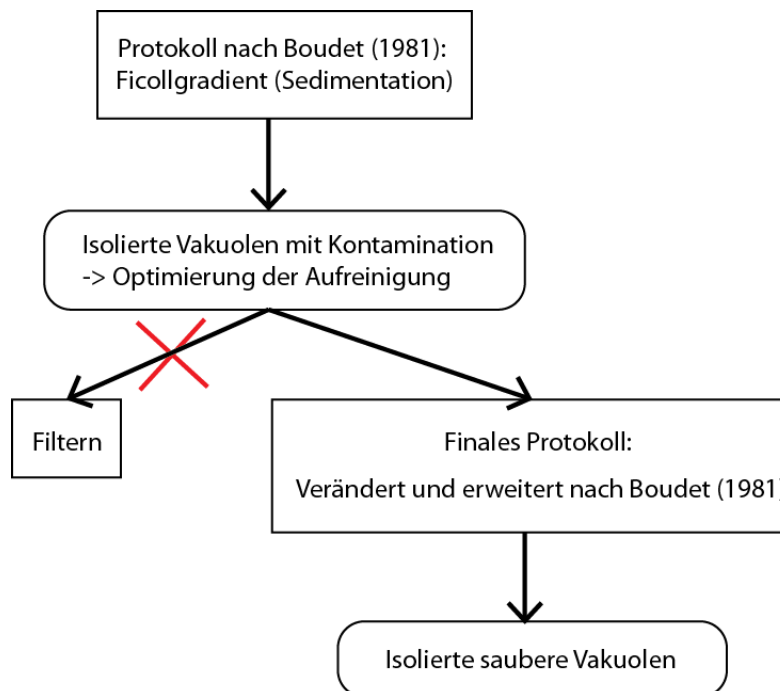


Abb. 45: Optimierung des Protokolls nach Boudet (1981).

Bei der Optimierung des Protokolls nach Boudet (1981) für *P. nudicaule* stand im Vordergrund, die Verunreinigung mit Zytosolbestandteilen und die Verklumpung der Vakuolen zu minimieren. Dadurch sollte die Kontamination der im Anschluss zu untersuchenden vakuolären Proteine mit denen anderer Zellkompartimente vermieden werden. Insbesondere die Entfernung der grün gefärbten Organellen, die wahrscheinlich zu den Plastiden zählen, stand im Vordergrund.

Aufgrund der Größenunterschiede zwischen Vakuolen (10–30 μm) und Plastiden (5 μm) kam eine Trennung der beiden Zellorganellen mittels Filtration in Betracht. Durch eine Porengröße von 10 μm sollten die größeren Vakuolen auf dem Filter zurückgehalten und die kleineren Plastiden durchgelassen werden. Jedoch trat auch nach mehreren Filtrationsversuchen nicht das gewünschte Ergebnis ein. Die Untersuchung des Filtrats und des Filterkuchens unter dem Mikroskop ergab, dass ein Großteil der Vakuolen während des Experiments zerstört wurde. Die Lyse könnte durch den Einfluss der Oberflächenladung des Filters auf die Permeabilität des Tonoplasten begünstigt worden sein. Zudem erfolgte keine ausreichende Trennung der Vakuolen von den Organellen des Zytoplasmas, beispielsweise hielt der Filter auch Leitbündel zurück (Abb. 46). Weiterhin lagen im Filtrat ebenfalls Vakuolen vor, die im Durchmesser z.T. grösser als 10 μm waren und aufgrund der Variabilität ihrer Form den Filter passiert haben (Abb. 47).

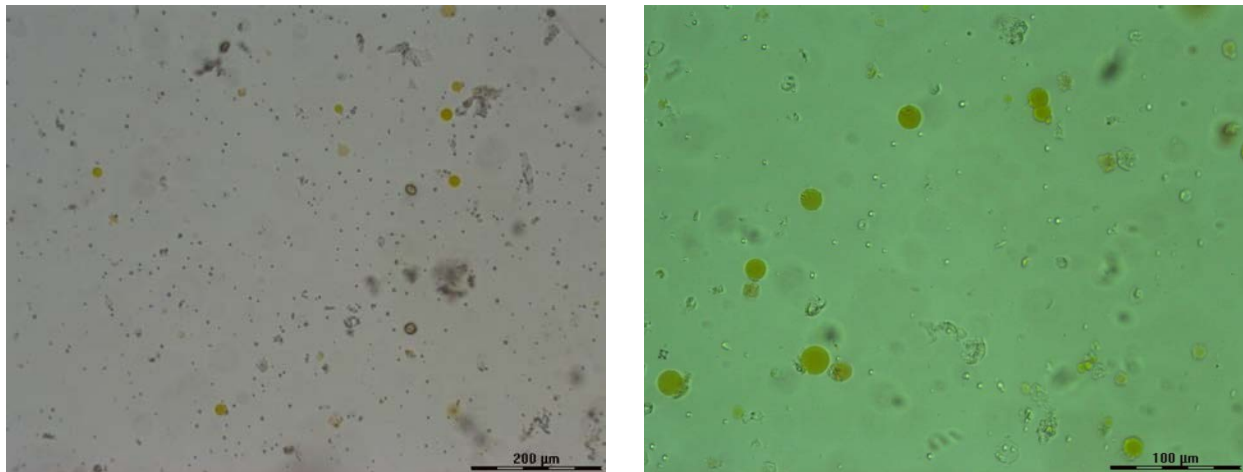


Abb. 46: Aufnahmen des Filtrats. **Links:** 10 x Vergrößerung. **Rechts:** 20 x Vergrößerung. Im Filtrat treten neben Vakuolen auch weitere Zellbestandteile auf.

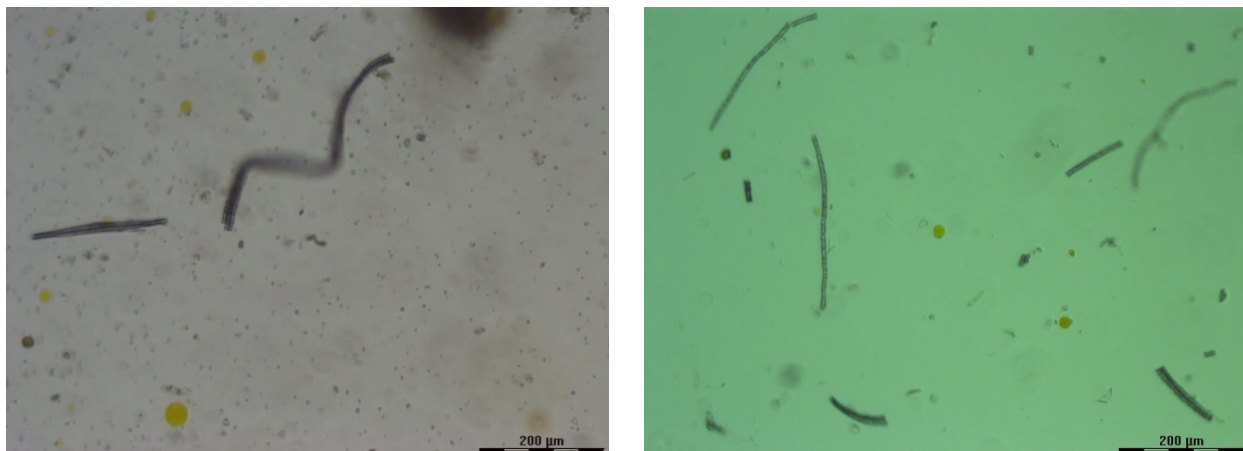


Abb. 47: Aufnahmen des Filterkuchens (10 x). Es sind Leitbündel, Vakuolen und weitere Zellbestandteile sichtbar.

Da die Filtration als Reinigungsschritt wenig Erfolg zeigte, kam eine Trennung von Vakuolen und Plastiden mittels erneuter Dichtegradientenzentrifugation nach dem Protokoll von Aerts und Schram (1985) in Betracht. Dabei sollten alle unerwünschten Zellbestandteile in einer 20 % Ficollschicht festgehalten werden, während nur die Vakuolen in die höheren Schichten gelangen. Um diesen Reinigungsschritt mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Aerts und Schram (1985) durchzuführen, wurde ein vorausgehender Waschschrift integriert, bei dem das zu Verklumpung neigende Pellet der 20–5 % Ficollgrenzschicht wieder suspendiert und überschüssiges DEAE-Dextran und Dextransulfat aus der Lösung entfernt wurden. Letzteres war wichtig, um negative Auswirkungen der zwei Substanzen auf die Vakuolen auszuschließen. Die Resuspension durch vorsichtiges Invertieren eignete sich besonders, um das Pellet der 20–5 % Ficollgrenzschicht wieder in Lösung zu bringen, da hierbei die fragilen Vakuolen nicht zerplatzten. Eine sanfte Zentrifugation bei niedriger Zentrifugalbeschleunigung (500 g) über einen kurzen Zeitraum (5 min), bei der die Vakuolen sedimentierten, machte eine anschließende Abnahme des Überstands möglich und schloss den Waschschrift ab. Eine erneute Aufnahme in WP II und Einstellung der Lösung auf 20 % Ficoll für den folgenden den Reinigungsschritt mittels Dichtegradientenzentrifugation nach von Aerts und Schram (1985) wurden ebenfalls durch den Waschschrift erleichtert.

Testläufe der Kombination von erster Dichtegradientenzentrifugation und Lyse nach Boudet (1981) mit dem Reinigungsschritt mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Aerts und Schram (1985) ergaben, dass in Bezug auf Dauer und Geschwindigkeit der einzelnen Zentrifugationen Optimierungen notwendig waren. Dabei stellte sich eine kürzere Zentrifugation bei höherer Zentrifugalbeschleunigung (15 min, 2 500 g) für den ersten Schritt sowie eine kürzere Zentrifugation bei niedrigerer Zentrifugalbeschleunigung (10 min, 500 g) für den zweiten Schritt als optimale Bedingungen heraus. Des Weiteren erwies sich die Verwendung einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor als vorteilhaft. Dabei wandern die Vakuolen entlang der Gefäßachse, so dass sie horizontale, gleichmäßig dicke Pellets bilden. Durch die Kombination von Lyse und Reinigung konnte nach Optimierung des Protokolls (Boudet, 1981) eine saubere Lösung aus Vakuolen und einigen Tonoplasten (leeren Vakuolen) hergestellt werden (Abb. 48). Hierbei trat außerdem keine Verklumpung der Vakuolen auf.

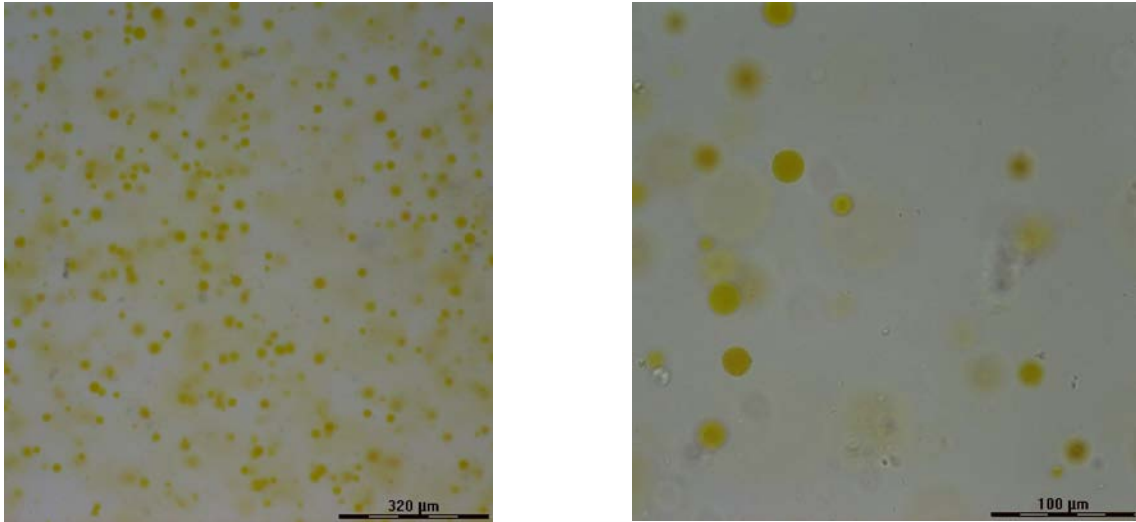


Abb. 48: 10 % Ficollschicht. Die Lösung enthält eine Vielzahl an Vakuolen und ist frei von anderen Zellorganellen.
Links: 6,3 x Vergrößerung. **Rechts:** 20 x Vergrößerung.

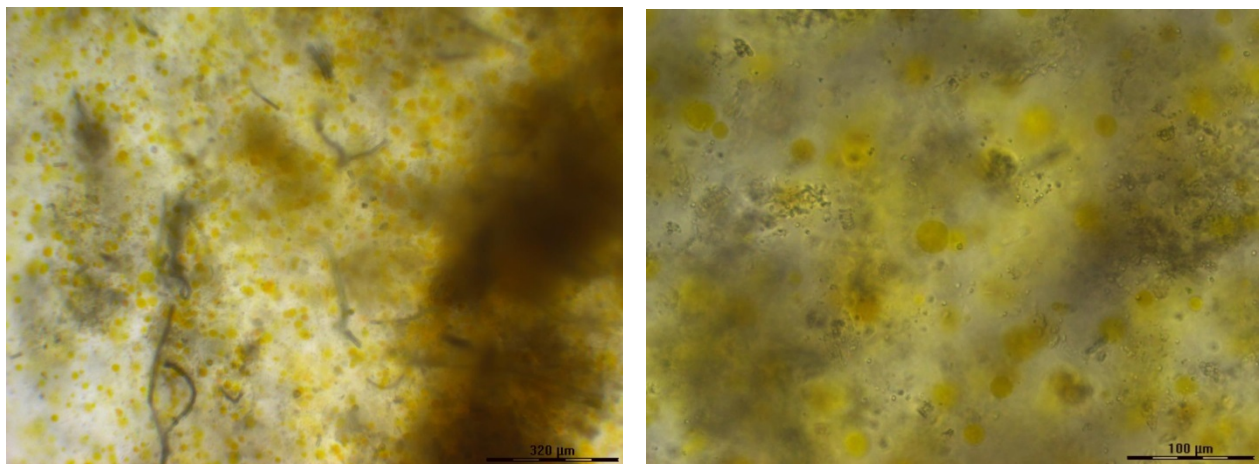


Abb. 49: 20 % Ficollschicht. Ein Großteil der Vakuolen liegt in dieser Schicht zusammen mit Leitbündeln und anderen Zellorganellen vor. **Links:** 6,3 x Vergrößerung **Rechts:** 20 x Vergrößerung.

Wie in Abb. 48 zu erkennen, weist die Lösung der Vakuolen eine niedrige Kontamination auf. Damit kann sie zur Extraktion der Proteine des Tonoplasten und des Zellsaftes herangezogen werden. Ein großer Nachteil dieser Vorgehensweise der Reinigung ist der immense Verlust an Vakuolen, die in der untersten Ficollschicht zurückgehalten werden (Abb. 49). Aus zeitlichen Gründen erfolgte keine zusätzliche Optimierungen zur besseren Ausbeute.

Um eine anschließende Extraktion der Proteine durchzuführen wurde ein zweiter Waschschrift in das finale Protokoll integriert. Dabei stellte sich eine sanfte Zentrifugation bei 500 g für 5 min als optimal heraus. Der Waschschrift gewährleistet eine Verringerung der Ficollkonzentration, welche sonst für den

darauffolgenden Schritt der Isolation von Proteinen des Tonoplasten und Zellsaftes hinderlich gewesen wäre.

3.3 Extraktion der Proteine

Die mit dem optimierten Protokoll nach Boudet (1981) isolierten Vakuolen konnten aufgrund der Reinheit der Lösung für eine Extraktion der Proteine des vakuolären Zellsaftes und des Tonoplasten herangezogen werden. Dazu mussten in einem ersten Schritt mit Hilfe eines Protokolls zur Extraktion der Proteine die Vakuolen lysiert und die Proteine des Tonoplasten, sowie des Zellsaftes voneinander getrennt werden. Mit Hilfe einer anschließenden SDS-PAGE-Trennung (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) und MS-Analyse sollten Proteine des Tonoplasten charakterisiert und im sehr sauren Zellsaft der Vakuolen (pH-Wert <3) nachgewiesen und gegebenenfalls identifiziert werden (Abb. 50).

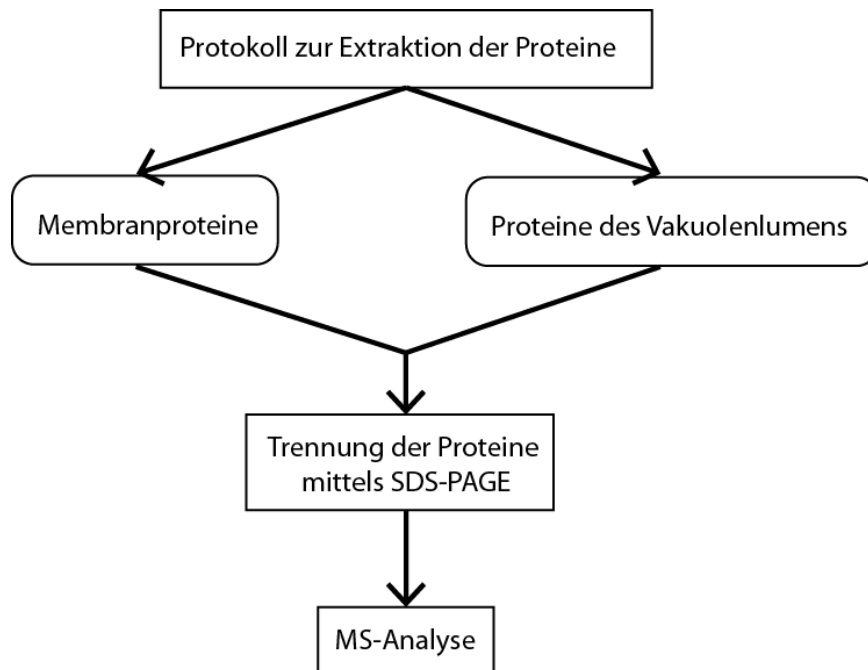


Abb. 50: Extraktion der Proteine und SDS-PAGE-Analyse.

Während der Probenvorbereitung für die Trennung mittels SDS-PAGE erfolgten zunächst die Lyse der Vakuolen im Ultraschallbad sowie anschließend die Trennung in Tonoplasten und Zellsaft mittels Ultrazentrifugation. Nach Zentrifugation der Lösung aus lysierten Vakuolen befanden sich die Tonoplasten im Pellet am Boden des Probengefäßes. Eine anschließende Fällung der Proteine des

Zellsaftes mittels Trichloressigsäure (TCA) zur Aufkonzentrierung der Probe verlief ebenfalls erfolgreich, da ein Pellet bestehend aus Proteinen am Boden des Probengefäßes erhalten wurde. Durch der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test wurde eine Gesamtproteinkonzentration von $c=1,58 \text{ mg/mL}$ ermittelt. Vorversuche ergaben, dass die Menge an Protein aus drei Ansätzen zur Isolation von Vakuolen mit je 2–2,5 g Blütenmaterial ausreichend für eine Trennung mittels SDS-PAGE ist. Unter den in Abschnitt 4.6.3 angegebenen Bedingungen konnten die Proteine der zwei Proben (Proteine der vakuolären Membran (VM) des vakuolären Zellsaftes (VZ)) erfolgreich aufgetrennt werden. Abb. 51 zeigt die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Trennung nach Färbung mit kolloidalem Coomassie.

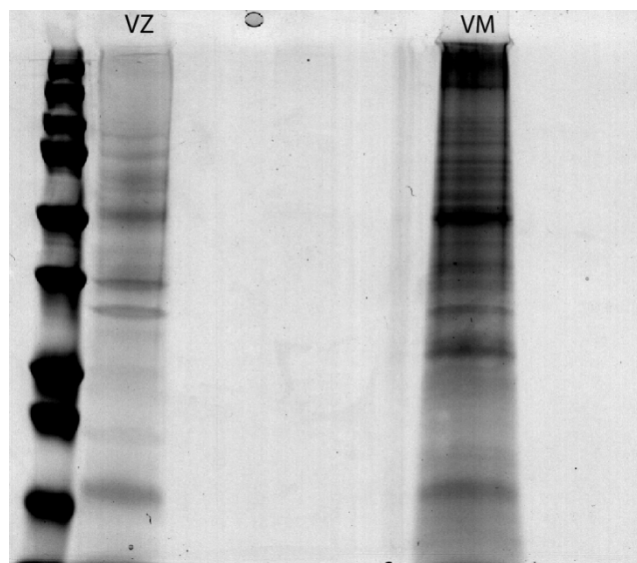


Abb. 51: 1D-SDS-PAGE-Gel der Proteinproben aus vakuolärem Zellsaft (VZ) und vakuolärer Membran (VM).

Die Trennung der Proteine mittels Gelelektrophorese ergab die Bildung mehrerer Banden. Damit konnten Proteine im Tonoplasten und im sehr sauren Zellinneren der Vakuole ($\text{pH-Wert} < 3$) nachgewiesen werden. Das Bandenmuster der beiden Proben weist sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede auf. Auffällig ist die stärkere Färbung der Membranproteinprobe, die auf einen höheren Proteingehalt hindeutet. Allerdings sind Verluste an Proteinen durch die Fällung mit TCA nicht auszuschließen. Die Banden erscheinen nicht scharf, sondern eher verschmiert. Grund für diese Beobachtung könnten Reste von Mannitol aus dem Isolationsmedium und von Ficoll aus der Dichtegradientenzentrifugation sein. Ein Waschschritt zur Entfernung des Zuckers stellte aufgrund der niedrigen Proteinmengen keine Option dar.

In der anschließenden Probenvorbereitung für eine Analyse mittels HPLC-MS wurden die einzelnen Banden der VZ- (30) und VM-Proben (37) ausgeschnitten und bei -80°C konserviert und gelagert. Sie stehen nun für eine Messung bereit.

4 Experimentalteil

Alle Chemikalien- und Gerätedetails sind im Anhang IIIIII.1 aufgelistet. Die Konzentration des Ficolls ist jeweils in Masseprozent angegeben.

4.1 Pflege der *P. nudicaule*-Kultivare

Die Samen des gelben *P. nudicaule* Kultivars (*summer breeze yellow*) wurden von der Jelitto Staudensamen GmbH (Schwarmstedt, Deutschland) bezogen (Warskulat, 2015).

Aussaat und Wachstum erfolgten in den Gewächshäusern des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie (Jena, Deutschland). Vom Zeitpunkt der Aussaat bis zur Knospenbildung vergingen acht bis zehn Wochen. Danach standen für ein bis drei Monate Blüten zur Verfügung. Die Blütezeit einzelner Individuen dauerte bis zu drei Tage. Danach begann die Ausbildung der Samenkapseln, wobei die Blütenblätter ausfielen.

In der Gewächshauskabine betrug die Tagestemperatur zwischen 21 und 23 °C und die Nachttemperatur zwischen 19 und 21 °C. Die Luftfeuchtigkeit lag ganztägig bei 50 bis 60 %. Die tägliche Bewässerung erfolgte automatisch für etwa zehn Minuten. Bewegliche Lampen (Phillips Sun-T Agro 400 Na lights) sorgten bei unzureichenden äußeren Lichtverhältnissen von 7.00 bis 21.00 Uhr für eine gleichmäßige Beleuchtung.

4.2 Isolation der Protoplasten

Die Protoplasten aus Blütenblättern des gelben Kultivars von *P. nudicaule* wurden in Anlehnung an Robert et al. 2007 isoliert.

Dazu erfolgte die Ernte von 2 bis 2,5 g gelber Blüten, die erst maximal einen Tag blühten. Im nächsten Schritt wurden die Petalen entnommen und der grünliche basale Teil mit einem Skalpell abgetrennt. Daran schloss sich das Zerkleinern des Materials in dünne Streifen (ca. 3 mm Breite), welches im Folgenden in 60 mL Protoplastenenzymlyösung (bestehend aus 0,4 M Mannitol; 0,01 M MES/ pH-Wert 5,6; 10 % (w/v) Cellulase; 0,1 % Maceroenzym) für mindestens vier Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert wurde.

Nach Inkubation erfolgte die Reinigung der Protoplastenlösung mittels Filtration (Nylon-Filter; Porengröße 150 µm) und zweimaligem Waschen mit Waschpuffer I (WP I; 0,4 M Mannitol; 0,01 M MES/ pH-Wert 5,6). Dieser Schritt bestand aus der Zentrifugation des Filtrats für 5 min bei 18 °C und

500 g im Ausschwingrotor (Zentrifuge 4), der Abnahme und das Verwerfen des Überstands sowie dem anschließenden Waschen des Pellets mit WP I, einhergehend mit einer abermaligen Zentrifugation. Im Anschluss an die zweimalige Durchführung dieses Waschschrittes konnte das Pellet in WP I resuspendiert und gelagert bzw. direkt weiterverwendet werden.

4.3 Osmotischer Schock

Bei der Methode osmotischer Schock nach Robert et al. (2007) wurden die isolierten Protoplasten aus 0,5 g Blüten in 5 mL warmem Lysepuffer (0,2 M Mannitol; 0,01 M EDTA/ pH-Wert 8,0; 0,005 M Natriumphosphat; 10 % Ficoll) bei 37 °C resuspendiert. Nach zweiminütiger Inkubation erfolgten Überführung der Lösung in ein Zentrifugenröhrchen und Überschichten mit einem Ficolldichtegradienten, bestehend aus 2 mL 4 % Ficoll (0,35 M Mannitol; 0,007 M EDTA/ pH-Wert 8,0; 0,02 M Natriumphosphat) und 2 mL 0 % Ficoll (0,45 M Mannitol; 0,005 M EDTA/ pH-Wert 8,0; 0,002 M Natriumphosphat). Anschließend wurde die Probe für 60 min bei 10 °C und langsamer Be-, sowie Entschleunigung des Rotors in einer Ultrazentrifuge mit 71 000 g (Zentrifuge 3) zentrifugiert.

4.4 Lyse durch das Detergens CHAPS

Die Anwendung der Methode „CHAPS“ erfolgte nach Ma et al. (2005).

Dabei wurde zu 0,5 mL einer konzentrierten Lösung von Protoplasten 7,5 mL des Vakuolenisolationsmediums (0,5 M Mannitol; 0,5 mM CHAPS; 1 mM EDTA/ pH-Wert 8,0; 20 mM MES-Tris/ pH-Wert 8,0) gegeben. Nach dreiminütigem Schwenken per Hand schloss sich eine Zentrifugation für 3 min bei 900 g an (Zentrifuge 1). Das entstandene Pellet aus Vakuolen wurde in WP III (0,5 M Mannitol; 20 mM MES-Tris/ pH-Wert 8,0) resuspendiert und abermals zentrifugiert (3 min, 900 g). Zur abschließenden Reinigung erfolgten eine Resuspension der Vakuolen in 5 mL einer 10 % Ficoll-Lösung (0,5 M Mannitol; 20 mM MES/ pH-Wert 8,0) und eine Überschichtung mit 5 mL WP III, bevor für 5 min bei 900 g (Zentrifuge 1) zentrifugiert wurde.

4.5 Polybaseinduzierte Lyse

Die Methode „polybaseinduzierte Lyse“ wurde anhand dreier Protokolle getestet.

4.5.1 Direkte Zugabe nach Schmidt und Poole (1980)

In einer ersten Testung der polybaseinduzierte Lyse in Anlehnung an Schmidt und Poole (1980) wurde eine Lösung mit DEAE-Dextran (0,1 mL; 0,6 M Mannitol; 25 mM Hepes-Tris/ pH-Wert 6,5; 100 µg/ mL DEAE-Dextran) direkt auf die Protoplasten (0,1 mL) gegeben und für eine Minute inkubiert. Daran schloss sich die Zugabe einer Lösung mit Dextransulfat (0,1 mL; 0,6 M Mannitol; 25 mM Hepes-Tris/ pH-Wert 6,5; 200 µg/ mL Dextransulfat). Der Vorgang der Lyse wurde unter dem Lichtmikroskop (Leica DM 6000 B) verfolgt.

4.5.2 Dichtegradientenzentrifugation nach Aerts und Schram (1985)

In der zweiten Testung wurde ein Protokoll nach Aerts und Schram (1985) verwendet, welches den Vorgang der Lyse mit einer Reinigung durch einen Dichtegradienten kombiniert. Dabei erfolgte zunächst die Resuspension der Protoplasten in einer 20 %igen Ficolllösung (2 mL; 0,6 M Mannitol; 25 mM Hepes-Tris/ pH-Wert 6,5). Diese wurde im Anschluss mit vier Schichten unterschiedlicher Dichte, bestehend aus je 2 mL einer Ficolllösung (0,6 M Mannitol; 25 mM Hepes-Tris/ pH-Wert 6,5), überschichtet. Der schematische Aufbau der Methode ist in Abb. 52 dargestellt. Beginnend von unten betrug die jeweilige Konzentration der Schichten an Ficoll 15, 10, 6, und 0 %. Erstere enthielt zudem 7 mg/ mL DEAE-Dextran, die beiden mittleren (10 und 6 % Ficoll) 4 mg/ mL Dextransulfat. Der Ansatz wurde für 45 min bei 1 600 g und bei 18 °C (Zentrifuge 1) zentrifugiert.

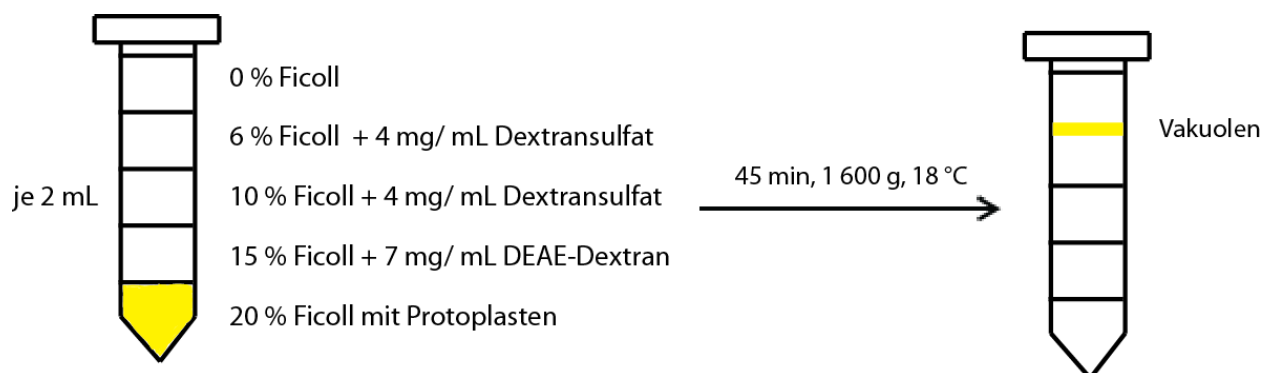


Abb. 52: Schematischer Aufbau des Ansatzes zur polybaseinduzierten Lyse der Protoplasten mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten nach Aerts und Schram (1985).

Da die Ausbeute nicht zufriedenstellend war, wurde eine Methode nach Boudet (1981) getestet und anschließend weiter optimiert. Das finale Protokoll zur Vakuolenisolation, was die spätere Extraktion der enthaltenen Proteine ermöglicht, wird im Folgenden vorgestellt.

4.5.3 Finales Protokoll, verändert nach Boudet (1981)

Frisch isolierte Protoplasten wurden in WP II (2 mL; 0,6 M Mannitol; 25 mM Hepes-Tris/ pH-Wert 6,5) resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen auf einen dreischichtigen Ficoll-Dichtegradienten gegeben. Die unterste Schicht bestand aus einer Lösung mit 20 % Ficoll in WP II (2 mL). Die darüber liegende enthielt 5 % Ficoll mit Dextransulfat (4 mg/mL) in WP II (2 mL), während sich die oberste Schicht aus 2 % Ficoll mit DEAE-Dextran (4 mg/mL) in WP II (5 mL) zusammensetzte. Der Ansatz wurde anschließend für 15 min bei 18 °C und 2 500 g in einem Ausschwingrotor (Zentrifuge 4) zentrifugiert. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 53 dargestellt.

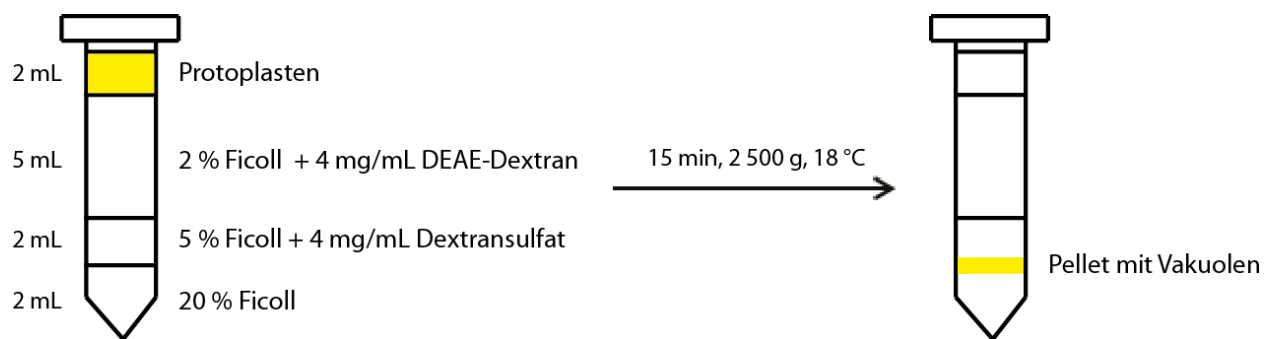


Abb. 53: Schematischer Aufbau des Ansatzes zur polybaseinduzierten Lyse der Protoplasten mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten nach Boudet (1981).

Das an der 20–5 % Ficoll-Grenzschicht entstandene Pellet wurde abgenommen und gewaschen. Dieser Waschschritt umfasste die Zugabe der zweifachen Menge WP II, vorsichtige Resuspension und anschließende Zentrifugation für 5 min bei 500 g in einem Ausschwingrotor (Zentrifuge 4). An die Abnahme und das Verwerfen des Überstands schloss sich eine abermalige Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 54). Dabei wurde das Pellet aus dem Waschschritt durch Zugabe von WP II und 50 % Ficoll-Lösung auf eine Konzentration von 20 % Ficoll eingestellt. Nach vorsichtigem Schwenken der Lösung und Überführung in ein neues Zentrifugenröhrchen erfolgte die Überschichtung mit einem Ficoll-Dichtegradienten, bestehend aus zwei Schichten (15 % bzw. 10 % Ficoll in WP II). Anschließend wurde der Ansatz bei 500 g für 10 min und 18 °C in einem Ausschwingrotor zentrifugiert (Zentrifuge 4). Abbildung Abb. 54 zeigt die Vorgehensweise der Reinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation.

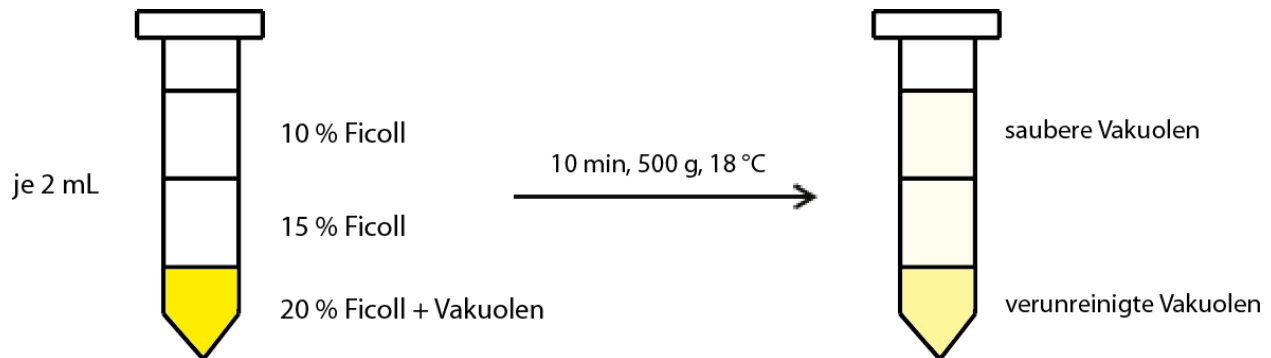


Abb. 54: Schematischer Aufbau des Ansatzes zur Reinigung der Vakuolen mittels Dichtegradientenzentrifugation.

Die 10 % Schicht wurde komplett abgenommen, da sie saubere Vakuolen und Tonoplasten enthält. Die 15 % Schicht konnte Verunreinigungen enthalten. Sie wurde abhängig der Kontamination ebenfalls abgenommen. Daran schloss sich ein Waschschritt, welcher die Zugabe der im Verhältnis zur Lösung an Vakuolen zweifachen Menge WP II und eine Zentrifugation (5 min, 500 g, 18 °C, Zentrifuge 4) umfasste. Die Vakuolen befanden sich nun am Boden des Zentrifugenröhrchens. Nach Abnahme und Verwerfen des Überstands, erfolgte die Resuspension der Vakuolen in einer geringen Menge an WP II, die nun für die Extraktion der Proteine zur Verfügung standen.

4.6 Extraktion der Proteine

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie/ Proteomics des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie erfolgte die Extraktion und Analyse der Proteine aus den isolierten Vakuolen. Die verwendeten Protokolle wurden nach Shevchenko et al. (2006) durchgeführt. In Abb. 55 ist der schematische Ablauf dargestellt. Durch Vorversuche hat sich die Menge an Vakuolen aus drei Isolationsansätzen (2–2,5 g Blütenmaterial) als ausreichend erwiesen, weshalb die Isolation und Probenvorbereitung in drei Etappen durchgeführt wird. Für die Gelelektrophorese erfolgt dann eine Vereinigung der Proben.

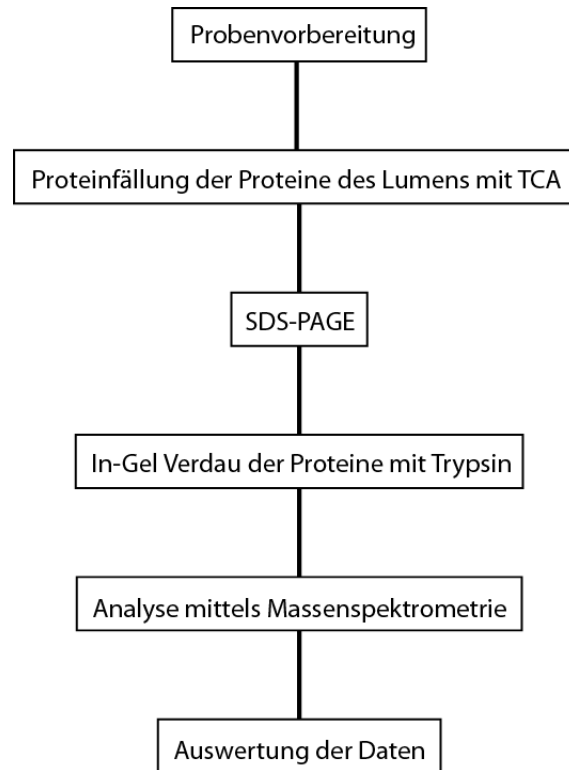


Abb. 55: Schematischer Ablauf der Extraktion und Analyse der Vakuolenproteine.

4.6.1 Probenvorbereitung

Zunächst wurde zu den frisch isolierten Vakuolen Proteaseinhibitor (1 Tablette auf 10 mL) gegeben, um einen enzymatischen Abbau der Proteine zu vermeiden. Daran schloss sich die Lyse der Vakuolen in einem Ultraschallbad für 5 min an. Durch eine Ultrazentrifugation (1 h, 100 000 g, 4 °C; Zentrifuge 5) wurden die Zellmembranen vom Inhalt des Zellsaftes getrennt. Im Anschluss erfolgte die Abnahme des Überstands sowie Überführung in ein nicht-proteinbindendes eppendorf-Tube[®] überführt, in dem anschließend die Proteinfällung stattfand. Nach diesem Schritt konnten die Proben durch Einfrieren bei -80 °C konserviert und gelagert werden.

4.6.2 Fällung der Proteine des Vakuolenzellsaftes mit Trichloressigsäure

Zuerst erfolgte die Zugabe von 100 % Trichloressigsäure (TCA) zu der Lösung aus Proteinen des Zellsaftes, sodass eine Endkonzentration von 10 % Säure in der Lösung erreicht wurde. Nach Invertieren des Ansatzes, schloss sich die Inkubation für mindestens 1 h auf Eis an. Durch Zentrifugation (10 min, 20 000 g, 4 °C; Zentrifuge 2) kam es zur Bildung eines weißen Pellets, bestehend aus denaturierten Proteinen. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstands, erfolgte die Zugabe von gekühltem Aceton

(1 mL; 90 %). An eine erneute Zentrifugation (10 min, 14 000 rpm, 4 °C; Zentrifuge 2) schloss sich die Wiederholung des Waschschriffs an. Zuletzt wurde überschüssiges Aceton unter dem Abzug verdampft.

4.6.3 SDS-Page-Gel

Für eine Trennung der Proteine der Membran (VM) und des Zellsaftes (VZ) mittels SDS-Page-Gel wurden die vorbereiteten Proben aus drei Isolationsansätzen (2–2,5 g Blütenmaterial) in jeweils zwei eppendorf-Tubes[®] vereinigt. Im Anschluss daran erfolgte die Probenvorbereitung von VZ und VM für das SDS-Page-Gel. Dabei ermöglichte die Zugabe von SDS-Puffer (30 µL; 1 m %) das Lösen der Proteine. Im Anschluss daran wurde Ladepuffer (8 µL; 4x Leammli) zu den beiden Proben gegeben und diese für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock inkubiert. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der Gelkammer sowie das Befüllen mit Laufpuffer (ELFO: Tris 25 mM; Glycin 192 mM; SDS 0,2 %; dH₂O). Nach kurzem Zentrifugieren und Abkühlen der Proben erfolgte die Aufgabe des Zentrifugats in die Taschen (38 µL) eines Polyacrylamid-Gels. Dabei kam als Standard ein Gemisch aus Proteinen bekannter Größe (10 µL) zum Einsatz. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V, 50 mA, 10 W für ca. 40 min. Anschließend wurde das Gel für über eine Stunde in Fixierlösung (100 mL; 40 % Ethanol mit 10 % Essigsäure in destilliertem Wasser (dH₂O)) inkubiert. Danach erfolgte die Färbung mit kolloidalem Coomassie (60 mL dH₂O, 20 mL MeOH, 20 mL Roti[®]-Blue) über Nacht. Anschließend wurde das Gel entfärbt (75 mL dH₂O, 25 mL MeOH), gescannt und ausgewertet.

4.6.4 In-Gel-Verdau der Proteine mit Trypsin

Bevor ein In-Gel-Verdau der Membran- sowie der Zellsaftproteine durchgeführt werden konnte, erfolgten drei Vorbereitungsschritte. Im ersten wurden die einzelnen Gelbanden mit Hilfe eines Skalpell vom unteren Ende beginnend in einem maximalen Abstand von 3 mm ausgeschnitten und dann weiter in drei bis fünf Stückchen zerkleinert. Anschließend erfolgte die Überführung in ein Well (Vertiefung) einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Der zweite Schritt umfasste die Zugabe von je 100 µL einer Lösung aus Ammoniumhydrogencarbonat (100 mM; Ambic) und Acetonitril (50 %; ACN) und Inkubation der Proben für zehn bis sechzig Minuten unter leichtem Schütteln (50 rpm), um die Gelstückchen zu entfärben. Nach vollständiger Abnahme und Verdampfung des Überstandes erfolgte der dritte Schritt der Vorbereitung, die Reduzierung und Alkylierung der Proteine. Dabei wurden zuerst 50 µL einer Lösung aus Dithiothreitol (10 mM) und Ambic (25 mM) in die Wells gegeben, die Mikrotiterplatte mit Folie abgedichtete und anschließend bei 56 °C für eine Stunde im Trockenschrank inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 100 µL ACN (100 %) mit anschließender Inkubation von zehn bis zwanzig Minuten, bei der die Gelstückchen schrumpften und sich weiß färbten. Nach Abnahme des Acetons und Verdampfen

der Lösungsmittelreste unter dem Abzug wurden jeweils 50 μL Iodacetamid (55 mM) in 25 mM Ambic hinzugefügt und die Proben für 45 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten die abermalige Zugabe von 100 μL ACN (100 %) und Inkubation für 20 min. Der Überstand wurde wieder abgenommen und die restliche Lösung mit Hilfe der Vakuumzentrifuge (Zentrifuge 5) verdampft.

Nun konnte der Verdau der Proteinproben mit Trypsin erfolgen. Dabei wurden 5 μL einer Trypsin-Lösung (100 ng/ μL Trypsin in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat) zu den Proben pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Trockenschrank. Am nächsten Tag wurde der Überstand jedes Wells einzeln in eine neue Platte übertragen, um die gelösten Proteine von möglichen Gelresten zu trennen. Daran schloss sich die Verdampfung von Lösungsmittel mit Hilfe der Vakuumzentrifuge (Zentrifuge 5) an. Anschließend konnten die Proben bei -80°C konserviert und gelagert werden. Sie stehen nun für die Messung mittels HPLC-MS zur Verfügung.

5 Zusammenfassung

Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Testung verschiedener Methoden zur Isolation von Vakuolen des gelben *P. nudicaule* Kultivars sowie die Optimierung des vielversprechendsten Protokolls und die anschließende sequentielle Extraktion der vakuolären Membran- und Zellsaftproteine.

Pflanzliche Vakuolen sind fragile Zellorganellen, weshalb sich eine Isolation als herausfordernd erweist. Ein allgemein gültiges Protokoll existiert nicht, es ist vielmehr notwendig, für die jeweilige Aufgabenstellung, die Pflanzenart und das vorliegende Gewebe eine eigene Vorschrift zu etablieren. Von den in der Literatur beschriebenen Methoden wurde die kontrollierte Lyse von Protoplasten mittels eines osmotischen Schocks, durch das Detergens CHAPS und durch Polybasen als anwendbar auf Blütenblätter des gelben Kultivars von *P. nudicaule* eingestuft. In einem ersten, allen drei Techniken gemeinsamen, Schritt erfolgte die Isolation von Protoplasten aus den Blütenblättern. Die anschließende Lyse der Protoplastenmembran führte bei der Methode des osmotischen Schocks und des Detergens CHAPS zu sehr geringen Ausbeuten. Als vielversprechender Ansatz erwies sich im Gegensatz dazu die polybase-induzierte Lyse. Sie wurde anhand von drei Protokollen erfolgreich getestet. Eine direkte Zugabe der Polybase zu den Protoplasten (Schmidt und Poole 1980) erzielte zwar Vakuolen, die jedoch mit Zellbestandteilen des Zytosols kontaminiert waren. Die Frage nach einer Aufreinigung der Lösung führte zur Testung des Protokolls nach Aerts und Schram (1985), welcher die Lyse der Protoplasten mit einem Waschschrift mittels Dichtegradientenzentrifugation kombinierte. Dieser beruht auf dem Prinzip der Flotation, bei welchem die Protoplasten einem Medium ausgesetzt werden, das im Gegensatz zu ihnen eine höhere Dichte aufweist, wodurch sie während einer Zentrifugation nach oben wandern. Da im Experiment nur ein geringer Teil der Vakuolen in die oberen Schichten gelang und diese eine starke Verklumpung sowie angehaftete Zytosolbestandteile aufwiesen, erfolgte die Testung eines Protokolls nach Boudet (1981). Dieser kombinierte ebenfalls die Lyse mit einer Reinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation, jedoch sedimentierten und lysierten dabei die Protoplasten von oben nach unten durch den eingesetzten Dichtegradienten. Mithilfe dieser Vorschrift konnten höhere Ausbeuten an Vakuolen erreicht werden, die keine angehafteten Zytosolbestandteile mehr aufwiesen. Da es hierbei zu einer Kontamination der Lösung mit letzteren, insbesondere grünlichen, rundlichen Organellen mit einem Durchmesser von 5 μm , kam, wurde eine Filtration zur Reinigung der Lösung getestet. Dabei kam es jedoch zur Zerstörung der Vakuolen. Der zweite Versuch der Reinigung beinhaltete eine abermalige Dichtegradientenzentrifugation in Anlehnung an Aerts und Schram (1985). Nach Optimierung der Zentrifugationsbedingungen und der Integration zweier Waschschriffe konnte eine saubere Lösung mit einer guten Vakuolenausbeute gewonnen werden.

Im Anschluss an die Etablierung des Protokolls zur Isolation von Vakuolen des gelben *P. nudicaule*-Kultivars sollte die entwickelte Arbeitsvorschrift für eine Extraktion der vakuolären Proteine genutzt werden. Dabei erfolgte zunächst eine Trennung des Tonoplasten und Zellsaftes mittels Lyse der Vakuolen im Ultraschallbad und Ultrazentrifugation. Anschließend wurde aus den beiden Proben die Proteine isoliert und mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. In der darauf folgenden Probenvorbereitung mittels In-Gel-Verdau erfolgte die Gewinnung von 30 Proben aus Proteinen des Zellsaftes und 37 Proben aus Proteinen des Tonoplasten. Diese sind z.Zt. bei -80 °C konserviert und warten auf eine Analyse mittels HPLC-MS.

Die Gelelektrophorese erbrachte den Nachweis, dass Proteine nicht nur im Tonoplasten, sondern auch im ungewöhnlich sauren Zellsaft (pH-Wert <3) der Vakuole der *P. nudicaule*-Blütenblättern existieren, von denen einige an der Nudicaulinbiosynthese beteiligt sein könnten. Die erhaltenen Daten aus der MS-Analyse stellen eine entscheidende Ergänzung zu den bereits vorhandenen Transkriptom- und Proteomdaten der Blütenstadien dar und ermöglichen es, in Zukunft die an der Nudicaulinbiosynthese und -speicherung beteiligten Transporter und Enzymen zu erforschen. Dabei wird vor allem der Transport der Pelargonidinglukoside und die Synthese des Indols im Vordergrund stehen.

Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll zur Isolation von Vakuolen des gelben *P. nudicaule*-Kultivars kann zukünftig dazu dienen, eine Analyse der organischen Säuren im Inneren der Vakuole durchzuführen. Mit dem Ziel die Entstehung und Aufrechterhaltung des pH-Werts während der Blütenentwicklung zu verstehen. Weiterhin könnten vergleichende Proteomanalysen mit den drei anderen *P. nudicaule*-Kultivaren aufklären, warum die Nudicaulinproduktion nur in gelben Blüten so erfolgreich ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der vorliegenden Arbeit mit der polybaseinduzierten Lyse eine zuverlässige und erfolgreiche Methode zur Isolation von Vakuolen aus Protoplasten des gelben *P. nudicaule*-Kultivars optimiert und etabliert wurde. Sie bildet nun einen neuen Ausgangspunkt für weitere Forschung zur außergewöhnlichen Biosynthese der Nudicauline.

I Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Illustration des gelben <i>P. nudicaule</i> -Wildtyps (Sims, 1814).....	3
Abb. 2: Blüten der handelsüblichen <i>P. nudicaule</i> Kultivare (zur Verfügung gestellt von Dudek, B.).	4
Abb. 3: Farbwechsel der Blütenblätter des gelben <i>P. nudicaule</i> -Kultivars während ihrer Entwicklung (zur Verfügung gestellt von Dudek, B.).....	4
Abb. 4: Aglykonstrukturen von Pelargonidin (oben), Gossypetin (links) und Kaempferol (rechts).....	5
Abb. 5: Apikaler und basaler Teil des Blütenblatts.....	5
Abb. 6: Nudicaulin-Strukturvorschlag von Schliemann et al. (2006).	6
Abb. 7: Enantiomere Struktur von Nudicaulin I und II – Revision nach Tatsis et al. (2013)..	7
Abb. 8: Strukturen des Yuremamins (links) und Lotthanongins (rechts).	7
Abb. 9: Relatives Auftreten der Farbstoffe und des Indols in den Entwicklungsstadien des gelben <i>P. nudicaule</i> Kultivars (Dudek/ Warskulat, <i>in Vorbereitung</i> ; Grafik modifiziert nach Warskulat et al., 2016)8	
Abb. 10: Biosyntheseweg des Nudicaulinaglykons (Grafik modifiziert nach Warskulat, 2015).....	9
Abb. 11: Zugabe von Indol auf orangefarbene Blütenblätter von <i>P. nudicaule</i> (Zur Verfügung gestellt von Warskulat, A.C.).	10
Abb. 12: Organisation einer pflanzlichen Zelle (Abb. in Anlehnung an Gunning und Steer (1996) sowie Khan (2017)).....	11
Abb. 13: Schematischer Ablauf des osmotischen Schocks (Abb. in Anlehnung an Lodish et al., 2000). .	16
Abb. 14: Struktur des amphoteren Tensids CHAPS.	17
Abb. 15: Schematischer Aufbau einer Membran und ihrer Interaktion mit einem Detergens (Abb. in Anlehnung an Heimburg (2007) und Schuck et al. (2003).	18
Abb. 16: Struktur des DEAE-Dextrans.	19
Abb. 17: Schematischer Ablauf der polybaseinduzierten Lyse (Abb. in Anlehnung an Marezki und Thom, 1989).	20
Abb. 18: Struktur des Ficolls.....	21
Abb. 19: Testung (Kästen) und Optimierung (Ovale) verschiedener Methoden zur Isolation von Vakuolen.	22
Abb. 20: Verdünnte Lösung der Protoplasten (1: 1, WP I, 4 x).	23
Abb. 21: Unverdünnte Lösung der Protoplasten (6,3 x) mit anderen Zellbestandteile und Leitbündeln... 23	
Abb. 22: Lösung der Protoplasten (20 x)..	24
Abb. 23: Unvollständig isolierte Protoplasten (10 x).	24
Abb. 24: Detailaufnahme Leitbündel (10 x).	24

Abb. 25: Verdünnte Lösung der Protoplasten (1:1 mit WP I, 20 x): Links: Protoplast mit zwei Vakuolen. Rechts: Detailaufnahme eines Protoplasten.	25
Abb. 26: Detailaufnahmen zur Bestimmung des Protoplastendurchmessers (20 x).	25
Abb. 27: Aufnahme nach der direkten Zugabe eines Tropfens des Lysepuffers zur Protoplastenlösung (10 x).....	26
Abb. 28: 0–5 % Ficollschicht nach Dichtegradientenzentrifugation (10 x).....	27
Abb. 29: 5–10 % Ficollschicht nach Dichtegradientenzentrifugation (10 x).....	27
Abb. 30: 10–20 % Ficollschicht nach Dichtegradientenzentrifugation (10 x).....	27
Abb. 31: Aufnahme der Protoplastenlösung nach Zugabe und Inkubation (5 min) des Vakuolenisoliationsmediums. Links: 6,3 x Vergrößerung. Rechts: 40 x Vergrößerung.	28
Abb. 32: Aufnahme nach einer direkten Aufgabe des Vakuolenisoliationsmediums auf eine Lösung aus Protoplasten (20 x).....	28
Abb. 33: Vakuolen mit teilweise abgelöster Plasmamembran und angehafteten Organellen des Zytosols (20 x).....	29
Abb. 34: Vakuolenlösung nach direkter Zugabe der Polybase. Links: 6,3 x Vergrößerung Rechts: 20 x Vergrößerung.	30
Abb. 35: 0–6 % Ficollschicht (10 x)..	31
Abb. 36: Pellet der 15–20 % Ficollschicht. Links: 6,3 x Vergrößerung. Rechts: 20 x Vergrößerung.	31
Abb. 37: 20 % Ficollschicht (6.3 x).....	31
Abb. 38: Ergebnis nach der Dichtegradientenzentrifugation.	33
Abb. 39: Ausschnitt aus der obersten Schicht (10 x).	33
Abb. 40: Pellet der 20–5 % Ficollgrenzschicht (6,3 x). Links: Es tritt eine Vielzahl an Vakuolen, Leitbündeln und weiteren Zellorganellen auf. Rechts: Vakuolen bilden eine Verklumpung.	33
Abb. 41: Pellet der 20–5 % Ficollgrenzschicht nach der Dichtegradientenzentrifugation (20 x, 1:1 Verdünnung mit WP II)..	34
Abb. 42: Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens nach der Dichtegradientenzentrifugation (6,3 x)....	34
Abb. 43: Detailaufnahmen zur Bestimmung des Vakuolendurchmessers (20x).....	34
Abb. 44: Rote Vakuole (20 x).	34
Abb. 45: Optimierung des Protokolls nach Boudet (1981).	35
Abb. 46: Aufnahmen des Filtrats. Links: 10 x Vergrößerung. Rechts: 20 x Vergrößerung.	36
Abb. 47: Aufnahmen des Filterkuchens (10 x). Es sind Leitbündel, Vakuolen und weitere Zellbestandteile sichtbar.	36
Abb. 48: 10 % Ficollschicht. Links: 6,3 x Vergrößerung. Rechts: 20 x Vergrößerung.	38
Abb. 49: 20 % Ficollschicht. Links: 6,3 x Vergrößerung Rechts: 20 x Vergrößerung.....	38

Abb. 50: Extraktion der Proteine und SDS-PAGE-Analyse.	39
Abb. 51: 1D-SDS-PAGE-Gel der Proteinproben aus vakuolärem Zellsaft (VZ) und vakuolärer Membran (VM).	40
Abb. 52: Schematischer Aufbau des Ansatzes zur polybaseinduzierten Lyse der Protoplasten mit Hilfe eines Ficolllichtgradienten nach Aerts und Schram (1985).	43
Abb. 53: Schematischer Aufbau des Ansatzes zur polybaseinduzierten Lyse der Protoplasten mit Hilfe eines Ficolllichtgradienten nach Boudet (1981).	44
Abb. 54: Schematischer Aufbau des Ansatzes zur Reinigung der Vakuolen mittels Dichtegradientenzentrifugation.	45
Abb. 55: Schematischer Ablauf der Extraktion und Analyse der Vakuolenproteine.	46

II Literaturverzeichnis

- [1] **Aerts, J.M.F.G. und Schram, A.W.:** Isolation of vacuoles from the upper epidermis of *Petunia Hybrida* petals II. Vacuolar localization of some hydrolases. *Zeitung für Naturforschung* (1985), 40 c, 196-200.
- [2] **Britten, C.J.; Zhen, R.-G.; Kim, E.J. und Rea, P.A.:** Reconstitution of transport function of vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), 30, 21850-21855.
- [3] **Boudet, A.M.; Canut, H. und Alibert, G.:** Isolation and characterization of vacuoles from *Melilotus alba* mesophyll. *Plant Physiology* (1981), 68, 1354-1358.
- [4] **Buser, Ch. und Matile, Ph.:** Malic acid in vacuoles isolated from *Bryophyllum* leaf cells. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 82 (1977), 5, 462-466.
- [5] **Byl, S.-A.:** The essence and use of perfume in ancient Egypt. Dissertation (2012), University of South Africa, Pretoria.
- [6] **Calvert M.B. und Sperry, J.:** Bioinspired total synthesis and structural revision of yuremamine, an alkaloid from the entheogenic plant *Mimosa tenuiflora*. *Chemical Communications* (2015), 51, 6202-6205.
- [7] **Carolan, J.C.; Hook, I.L.I.;** Chase, M.W.; Kadereit, J.W. und Hodkinson, T.R.: Phylogenetics of *Papaver* and related genera based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid *trnL* intron and *trnL-F* intergenic spacers. *Annals of Botany* 98 (2006), 141-155.
- [8] **Carter, C.; Pan, S.; Zouhar, J.; Avila, E.L.; Girke, T. und Raikhel, N.V.:** The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell* (2004), 16, 3285-3303.
- [9] **Chintoju, N.; Konduru, P.; Kathula, R. L. und Remella, R.:** Importance of natural products in the modern history. *Research and Reviews: Journal of Hospital and Clinical Pharmacy* 1 (2015), 1, 5-10.
- [10] **Cocking, E.C.:** A method for the isolation of vacuoles. *Nature* 4741 (1960), 187, 962-963.
- [11] **Croteau, R.; Kutchan, T.M. und Lewis, N.G.:** Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (2000), John Wiley & Sons, 1250-1318.
- [12] **Dudek, B./ Warskulat, A.-C. et al. in Vorbereitung.**
- [13] **Dudek, B.; Warskulat, A.-C. und Schneider, B.:** The occurrence of flavonoids and related compounds in flower sections of *Papaver nudicaule*. *Plants* 5 (2016).
- [14] **Elven, R.; Petrovsky, V.V. und Solstad, H.:** Typification of names in *Papaver* sect. *Meconella* spach (*Papaveraceae*). *Taxon* 58 (2009), 3, 985-990.

- [15] **Endler, A.; Meyer, S.; Schelbert, S.; Schneider, T.; Weschke, W.; Peters, S.W.; Keller, F.; Baginsky, S.; Martinoia, E. und Schmidt, U.G.:** Identification of a vacuolar sucrose transporter in Barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* (2006), 141, 196-207.
- [16] **Faraco, M.; Spelt, C.; Blik, M.; Verweij, W.; Hoshino, A.; Espen, L.; Prinsi, B.; Jaarsma, R.; Tarhan, E.; de Boer, A.H.; Di Sansebastiano, G.-P.; Koes, R. und Quattrocchio, F.M.:** Hyperacidification of vacuoles by the combined action of two different P-ATPases in the tonoplast determines flower color. *Cell Reports* (2014), 6, 32-43.
- [17] **Gao, X; Liao, X.-C.; Wu, R.-I.; Liu, T.; Wang, H.-X. und Lu, L.:** The purified isolation of vacuoles from *Sedum alfredii* leaf-derived protoplasts. *Journal of Zhejiang University - SCIENCE B* (2016), 1-5.
- [18] **Gunning, B.E.S. und Steer, M.W.:** *Plant Cell Biology. Structure and Function.* Jones and Bartlett Publishers (1996).
- [19] **Hanelt, P.:** Die Typisierung von *Papaver nudicaule* L. und die Einordnung von *P. nudicaule hort. non L.* *Die Kulturpflanze* (1970), 18, 73-88.
- [20] **Harbourne, J.B.:** Plant polyphenols-XV: Flavonols as yellow flower pigments. *Phytochemistry* 4 (1965), 5, 647-657.
- [21] **Heimburg, T.:** Membranes-An introduction. *Thermal Biophysics of Membranes.* John Wiley & Sons Ltd (2007), 1-12.
- [22] **Ji, H.-F.; Li, X.-J. und Zhang, H.-Y.:** Natural products and drug discovery. *EMBO reports* 10 (2009), 3, 194-200.
- [23] **Kanchanapoom, T.; Kasai,R.; Chumsri, P.; Kraisintud, K. und Yamasakia, K.:** Lotthanongine, an unprecedented flavonoidal indole alkaloid from the roots of Thai medicinal plant, *Trigonostemon reidioides*. *Tetrahedron Letters* 43 (2002) 2941-2943.
- [24] **Khan, A.S.:** Plant Cell: Revisions and few updates. *Flowering Plants. Structure and industrial products.* John Wiley & Sons Ltd (2017), 5- 23.
- [25] **Khan, A.S.:** Channels and transporters within floral cells. *Flowering Plants. Structure and industrial products.* John Wiley & Sons Ltd (2017), 98-100.
- [26] **Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. und Darnell, J.:** Osmosis, water channels, and the regulation of cell volume. *Molecular Cell Biology* 4, W. H. Freeman (2000).
- [27] **Ma, J.-F.; Ueno, D.; Zhao, F.-J. und McGrath, S.P.:** Subcellular localization of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta* (2005), 220, 731-736.

- [28] **Maretzki, A. und Thom, M.:** Vacuoles: Isolation, purification, and uses. *Plant Protoplasts and Genetic Engineering II* (1989), 459-479.
- [29] **Martinez-Harms/ Warskulat, A.-C.** et al., in Vorbereitung.
- [30] **Marty, F.:** Plant vacuoles. *The Plant Cell* (1999), 11, 587-599.
- [31] **Pereira, C.; Pereira, S. und Pissarra, J.:** Delivering of proteins to the plant vacuole—An update. *International Journal of Molecular Science* (2014), 15, 7611-7623.
- [32] **Petrides, P.E.:** Aminosäuren und Polyaminosäuren (Proteine). *Physiologische Chemie*. Springer 4 (1988), 87-138.
- [33] **Price, J.R.; Robinson, R. und Scott-Moncrieff, R.:** 311. The yellow pigment of *Papaver nudicaule* Part I. *Journal of the Chemical Society* (1939), 1465-1468.
- [34] **Rea, P.A.; Li, Z.-S.; Lu, Y.-P. und Drozdowicz, Y.M.:** From vacuoles GS-X pumps to multispecific ABC-transporters. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. (1998), 49, 727-760.
- [35] **Robert, S.; Zouhar, J.; Carter, C. und Raikhel, N.:** Isolation of intact vacuoles from *Arabidopsis* rosette leaf-derived protoplasts. *Nature Protocols* (2007), 2, 259-262.
- [36] **Schliemann, W.; Schneider, B.; Wray, V.; Schmidt, J.; Nimtz, M.; Porzel, A. und Böhm, H.:** Flavonols and an indole alkaloid skeleton bearing identical acylated glycosidic groups from yellow petals of *Papaver nudicaule*. *Phytochemistry* 67 (2006), 2, 191-201.
- [37] **Schmidt, R. und Poole, R.J.:** Isolation of protoplasts and vacuoles from storage tissue of red beet. *Plant Physiology* (1980), 60, 25-28.
- [38] **Schmidt, U.G.; Endler, A.; Schelbert, S.; Brunner, A.; Schnell, M.; Neuhaus, H.E.; Marty-Mazars, D.; Marty, F.; Baginsky, S. und Martinoia, E.:** Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds. *Plant Physiology* (2007), 1, 216-29.
- [39] **Schuck, S.; Honsho, M.; Ekroos, K.; Shevchenko, A. und Simons, K.:** Resistance of cell membranes to different detergents. *PNAS* 100 (2003), 10, 5795-5800.
- [40] **Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J. v. und Mann, M.:** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 1 (2006), 6, 2856-2860.
- [41] **Sims, J.:** *Papaver nudicaule*. Yellow flowered, naked-stalked Poppy. *Curtis's Botanical Magazine* XXXIX (1814), [1633].
- [42] **Tanaka, Y.; Sasaki, N. und Ohmiya, A.:** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54 (2008), 733-749.

- [43] **Tatsis, E.C.; Schaumloeffel, A.; Warskulat, A.-C.; Massiot, G.; Schneider, B. und Bringmann, G.:** Nudicaulins, yellow flower pigments of *Papaver nudicaule*: Revised constitution and assignment of absolute configuration. *Organic Letters* 15 (2013), 1, 156-159.
- [44] **Tatsis, E.C.; Eylert, E.; Maddula, E.K.; Ostrozhenkova, E.; Svatos, A.; Eisenreich, W. und Schneider, B.:** Biosynthesis of Nudicaulins: A $^{13}\text{CO}_2$ -pulse/ chase labeling study with *Papaver nudicaule*. *ChemBioChem* (2014), 15, 1645-1650.
- [45] **Wagner, G. und Siegelman, H.W.:** Large-scale isolation of intact vacuoles and isolation of chloroplasts from protoplasts of mature plant tissues. *Science* 190 (1975), 4221, 1298-1299.
- [46] **Wagner, G.:** Vacuoles. *Cell Components. Molecular Methods of Plant Analysis* 1 (1985), Springer, 105-133.
- [47] **Wagner, G.:** Methodological and other aspects of intact mature higher plant vacuoles. *Plant vacuoles: Their importance in solute compartmentation in cells and their applications in plant biotechnology*. Springer (1987), 7-19.
- [48] **Warskulat, A.-C.:** Analytische Charakterisierung von Struktur und Biosynthese der Nudicauline aus gelben *Papaver nudicaule* L. Blüten. Dissertation (2015).
- [49] **Warskulat, A.-C.; Tatsis, E.C.; Dudek, B.; Kai, M.; Lorenz, S. und Schneider, B.:** Unprecedented utilization of pelargonidin and indole for the biosynthesis of plant indole alkaloids. *ChemBiochem* 17 (2016), 4, 318-327.
- [50] **Weng, J.-K.:** The evolutionary paths towards complexity: A metabolic perspective. *New Phytologist* (2014), 201, 1141-1149.
- [51] **Whiteman, S.-A.; Nühse, T.S.; Ashford, D.A.; Sanders, D. und Maathuis, F.J.M.:** A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oryza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane. *The Plant Journal* (2008) 56, 146-156.
- [52] **Whiteman, S.-A.; Serazetdinova, L.; Jones, A.M.E.; Sanders, D.; Rathjen, J.; Peck, S.C. und Maathuis, F.J.M.:** Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* (2008), 8, 3536-3547.
- [53] **Yoshida, K.; Kawachi, M.; Mori, M.; Maeshima, M.; Kondo, M.; Nishimura M. und Kondo, T.:** The involvement of tonoplast proton pumps and $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ exchangers in the change of petal color during flower opening of morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Plant Cell Physiology* 46 (2005), 3, 407-415.
- [54] **Zentgraf, M.; Imming, P. und Imhof, I.:** Purpur, die Farbe der Kaiser. *Pharmazeutische Zeitung* 16 (2000), GOVI-Verlag.

III Anhang

III.1 Chemikalien und Geräte

III.1.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller	CAS-Nummer	Hersteller - Nummer
Aceton	Roth	67-64-1	CP40.2
Acetonitril	Roth	75-05-8	HN40.2
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth	1066-33-7	T871.1
CHAPS	Sigma	331717-45-4	C5070
Cellulase	SERVA	9012-54-8	16419
DEAE-Dextran	Roth	9013-34-7	4198.1
Dextransulfat	BioChemica	9011-18-1	A2250,0050
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth	7558-79-4	N350.1
Dithiothreitol	SERVA	3483-12-3	20710.03
EDTA	Roth	60-00-4	131077
Glycin	Roth	56-40-6	3 790.1
Essigsäure	Roth	64-19-7	G755.2
Ethanol	Roth	64-17-5	P075.1
Ficoll	GE Healthcare	26873-85-8	17-0300-10
HEPES	Roth	7365-45-9	9105.2
Iodacetamid	GE Healthcare	144-48-9	RPN6320V.2
Kolloidales Coomassie	Roth	6104-58-1	A152
4x Laemmli-Puffer	Bio-Rad		1610747

Macerozym	SERVA	9032-75-1	28302.03
Mannitol	Alfa Aesar	69-65-8	A14030
MES	Sigma	4432-31-9	M3671.509
Methanol	Roth	67-56-1	KK44.1
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth	151-21-3	2326.2
Proteaseinhibitor (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail)	Roche	30827-99-7	4693159001
Proteinstandard (Precision Plus Protein™)	Biorad		1610374
Trichloressigsäure	Sigma	76-03-9	T0699
Tris	Sigma	77-86-1	252859
Trypsin	Promega	9002-07-7	V5111

III.1.2 Allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Kern PCB 2500-2
Feinwaage	Scaltec SBC22
Heizblock	Eppendorf Thermomixer comfort
Lampen	Phillips Sun-T Agro 400 Na lights
Mischgerät	Heidolph Duomax 1030
pH-Meter	HANNA instruments HI2211
Schüttler	Infors R-150
Trockenschrank	Binder
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK100

III.1.3 Zentrifugen

Nummerierung	Zentrifuge	Hersteller und Rotor
Zentrifuge 1	Tischzentrifuge I	Eppendorf 5804 R mit F34-6-38 Rotor
Zentrifuge 2	Tischzentrifuge II	Eppendorf 5417 R
Zentrifuge 3	Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter Optima Max-E mit MLA 150/ TLA 120.2 Rotor
Zentrifuge 4	Zentrifuge mit Ausschwingrotor	Sigma 3-18 K; 547 Rotor; 13104 Becher
Zentrifuge 5	Vakuumzentrifuge	Eppendorf 5301 concentrator

III.1.4 Spezielle Geräte

Mikroskop mit Objektiven	Leica DM 6000 B mit Kamera CC 7000 4x/ 0,10 CPLAN 6,3 x UVI Microdissection 10 x/ 0,3 HCX PL Fluotar 20 x/ 0,4 HCX PL Fluotar
Massenspektrometer	Waters; M-Class HPLC system Synapt G28 isystem

III.1.5 Gelelektrophorese

Gelkammer	Biorad Criterion Cell
Polyacrylamid-Gel	AnykD™ Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel, 12+2 well, #5671123
Stromversorgung	Amersham Biosciences Electrophoresis Power Supply ESP601
Scanner	Biorad GS-900 Calibrated Densitometer

III.2 Protokoll zur Isolation von Vakuolen aus *P. nudicaule* Blüten

Das vorliegende Protokoll wurde optimiert nach Boudet (1981).

Chemikalien

- DEAE-Dextran (Roth, Katalognummer (Kat.nr.) 4198.1)
- Dextransulfat (BioChemica, Kat.nr. A2250,0050)
- Ficoll (GE Healthcare, Kat.nr. 17-0300-10)
- Mannitol (Alfa Aesar, Kat.nr. A14030)
- HEPES (Roth, Kat.nr.9105.2)
- Tris (Sigma, Kat.nr. 252859)
- dH₂O

Materialien:

- 5 mL Pipette (Eppendorf® Research plus)
- 1 mL Pipette (Eppendorf Research plus)
- Laborgewindeflaschen (Duran): 1 x 500 mL, 2 x 100 mL, 2 x 50 mL, 2 x 25 mL, 2 x 10 mL
- Zentrifugenröhrchen: 9 x 25 mL

Geräte

- Feinwaage (Scaltec SBC22)
- pH-Meter (HANNA instruments HI2211)
- Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Sigma 3-18 K; Rotor 547; Becher 13104)

Stammlösungen

- **1 M Mannitol** (V=400 mL; M=182,17 g/mol): 72.87 g Mannitol wird in 400 mL dH₂O gelöst.
- **50 mM MES/ pH-Wert 5.6** (V=100 mL; M= 195,2 g/mol): 1.07 g MES wird in 80 mL dH₂O gelöst, mit 1 M NaOH auf pH-Wert 5,6 eingestellt und auf 100 mL mit dH₂O aufgefüllt.
- **100 mM Hepes-Tris/ pH-Wert 6.5** (V=100 mL; M (Hepes)= 238,31 g/mol; M (Tris)= 121,14 g/mol): 2.38 g HEPES wird in 80 mL dH₂O gelöst, mit 1 M Tris (6,057 g Tris in 50 mL) auf pH-Wert 6,5 eingestellt und auf 100 mL aufgefüllt.
- **50 % (w/v) Ficoll** (V=20 mL): 10 g Ficoll wird in 20 mL WP II gelöst.

Reagenzien

- **Waschpuffer I** (WP I; V=150 mL; 0,4 M Mannitol, 0,01 M MES/ pH-Wert 5,6): Zu 60 mL der 1 M Mannitol-Stammlösung wird 30 mL der 50 mM MES/ pH-Wert 5,6-Lösung gegeben und mit 60 mL dH₂O bis 150 mL aufgefüllt.
- **Waschpuffer II** (WP II; V=150 mL; 0,6 M Mannitol; 25 mM Hepes-Tris /pH-Wert 6,5): Zu 90 mL der 1 M Mannitol-Stammlösung wird 37,5 mL der 100 mM Hepes-Tris/ pH-Wert 6,5-Lösung gegeben und mit 22,5 mL dH₂O bis 150 mL aufgefüllt.
- **Ficollgradient mit DEAE-Dextran und Dextransulfat:**
 - 2 % Ficoll (V=25 mL): Zu 1 mL der 50 % Ficolllösung wird 24 mL WP II gegeben und 100 mg DEAE-Dextran unter Rühren darin gelöst.
 - 5 % Ficoll (V=10 mL): Zu 1 mL der 50 % Ficolllösung wird 9 mL WP II gegeben und 50 mg Dextransulfat unter Rühren darin gelöst.
 - 20 % Ficoll (V=10 mL) Zu 4 mL der 50 % Ficolllösung wird 6 mL WP II gegeben und beide Lösungen unter Rühren vermischt.
- **Ficollgradient zur Reinigung**
 - 10 % Ficoll (V=5 mL): Zu 1 mL der 50 % Ficolllösung wird 4 mL WP II gegeben und beide Lösungen unter Rühren vermischt.
 - 15 % Ficoll (V=5 mL): Zu 1,5 mL der 50 % Ficolllösung wird 3,5 mL WP II gegeben und beide Lösungen unter Rühren vermischt.

Vorgehensweise:

- Zuerst werden die Protoplasten vorsichtig in WP II auf ein Lösungsvolumen von 8 mL resuspendiert.
- Daraufhin wird der Dichtegradienten aus Ficoll in 4 Zentrifugenröhrchen (25 mL) vorbereitet:
 - Zuerst werden je 2 mL der 20 % Ficolllösung vorgelegt.
 - Anschließend werden je 2 mL der 5 % Ficolllösung mit Dextransulfat durch schräges Halten des Röhrchens mit gleichmäßigem, sanftem Fluss der Lösung aufgegeben.
 - Daraufhin werden je 5 mL 2 % Ficolllösung mit DEAE-Deaxtran durch schräges Halten des Röhrchens mit gleichmäßigem, sanftem Fluss der Lösung aufgegeben.
- Zum Schluss werden je 2 mL der Lösung aus Protoplasten durch schräges Halten des Röhrchens mit gleichmäßigem, sanftem Fluss der Lösung auf den Dichtegradienten gegeben.
- Alle 4 Ansätze werden vorsichtig in die Zentrifuge mit Ausschwingrotor gestellt und bei 2 500 g für 15 min und 18 °C zentrifugiert.
- Die obersten Schichten werden mit der 5 mL Pipette abgenommen und verworfen. (Damit kann das Pellet der 20-5 % Ficollgrenzschicht besser abpipettiert werden.)

- Das Pellet der 20-5 % Ficollgrenzschicht wird mit der 1 mL Pipette abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei werden je 2 Pellets in einem Zentrifugenröhrchen vereint.
- Daraufhin erfolgt das Waschen der Pellets mit dem doppeltem Volumen an WP II:
 - Dabei werden die Pellets zuerst durch sanftes Invertieren resuspendiert.
 - Im Anschluss erfolgt die Zentrifugation der Ansätze bei 500 g für 5 min und 18 °C.
 - Daran schließt sich die Abnahme und das Verwerfen des Überstands.
- Restliche Vakuolenlösung wird mit dem WP II und der 50 % Ficolllösung auf 20 % Ficoll (V= 2 mL) eingestellt. Dies erfolgt durch sanftes Invertieren des Zentrifugenröhrchens.
- Die Lösung aus Vakuolen und 20 % Ficoll in WP II wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit einem Dichtegradienten überschichtet:
 - Je 2 mL der 15 % Ficolllösung werden durch schräges Halten des Röhrchens mit gleichmäßigem, sanftem Fluss der Lösung aufgegeben.
 - Anschließend werden je 2 mL der 10 % Ficolllösung durch schräges Halten des Röhrchens mit gleichmäßigem, sanftem Fluss der Lösung aufgeben.
- Beide Ansätze werden vorsichtig in die Zentrifuge mit Ausschwingrotor gestellt und bei 500 g für 10 min und 18 °C zentrifugiert.
- Die oberste Schicht der beiden Ansätze wird abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei werden sie in einem einzigen Zentrifugenröhrchen vereint.
- Die Lösung der Vakuolen wird mit dem doppelten Volumen an WP II gewaschen. Dazu werden die Vakuolen zuerst sanft invertiert. Dann wird der Ansatz bei 500 g für 5 min und bei 18 °C zentrifugiert.
- Die oberste Schicht wird abgenommen und verworfen. Das Pellet aus sauberen Vakuolen wird in etwas WP II resuspendiert und weiterverwendet.

Hinweise:

- Löslichkeit des Ficolls:
 - Ficoll neigt zur Verklumpung und lässt sich schlecht in WP II lösen → Die Lösung am besten 1 Tag vorher herstellen oder Ficoll unter Rühren dazugeben und für ein bis vier Stunden weiterrühren lassen.
- Ausbeute:

Die Ausbeute variiert stark. Insbesondere nach der Reinigung der Vakuolen (zweite Dichtegradientenzentrifugation) treten große Verluste auf.

- **Dichtegradient:**
Ein sehr vorsichtiges Auftragen der einzelnen Schichten ist zwingend notwendig. Das Schräghalten des Zentrifugenröhrchens, bei dem die Ficolllösung langsam, mit gleichbleibendem, sanftem Druck aufgetragen wird, hat sich als beste Methode erwiesen. Der Dichtegradient sollte keinen ruckartigen Bewegungen ausgesetzt und vorsichtig gehandhabt werden.

Quellen:

- **Boudet, A.M.; Canut, H. und Alibert, G.:** Isolation and characterization of vacuoles from *Melilotus alba* mesophyll. *Plant Physiology* (1981), 68, 1354-1358.

IV Danksagung

„Es ist ein lobenswerter Brauch:

Wer was Gutes bekommt, der bedankt sich auch.“

Wilhelm Busch

Und Gutes habe ich während der Anfertigung meiner Masterarbeit am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie reichlich bekommen. Demnach möchte ich mich an dieser Stelle auch ausgiebig bedanken.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dirk Hoffmeister für die Erstellung des Erstgutachtens. Weiteren Dank spreche ich an Herrn PD Dr. Bernd Schneider, für die Ausstellung des Gutachtens und die Möglichkeit meine Masterarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, aus.

Ich danke außerdem dem Gewächshausteam des Max-Planck-Institutes für chemische Ökologie für die ständige Pflege der *Papaver nudicaule*-Pflanzen, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Bei Yvonne Hupfer und Dr. Natalie Wielsch aus der Massenspektrometrie/ Proteomics-Gruppe bedanke ich mich für die Hilfe und tolle Zusammenarbeit während der Arbeit an der Extraktion und Analyse der Proteine.

Darüber hinaus möchte ich mich selbstverständlich bei den Poppy/ Nudicaulin-Mädels Dr. Anne-Christin Warskulat und M.Sc. Bettina Dudek bedanken, die mit ihren hilfreichen Anregungen und ihrer konstruktiven Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit sehr geholfen haben. Ein herzliches Dankeschön geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe NMR/ Biosynthese für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Einen letzten Dank spreche ich dann natürlich auch noch an die Menschen aus, die mir ganz besonders am Herzen liegen: meiner Familie

Meinem Freund,

Meinen Schwestern,

Und meinen Eltern, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke euch vielmals.

V Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Jena, den 31.07.2017