

Diss. ETH No. 10804

**TRANSPORT OF ASCORBIC AND DEHYDROASCORBIC  
ACIDS ACROSS MEMBRANES OF BARLEY  
(*HORDEUM VULGARE* L., CV GERBEL) MESOPHYLL CELLS**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH  
for the degree of  
DOCTOR OF TECHNICAL SCIENCES

presented by

**ANDREAS A. F. RAUTENKRANZ**

Dipl. Ing. Agr. Universität Hohenheim, Germany

Master of Science, Univ. of Massachusetts, USA

born January 16, 1963

citizen of Kassel, Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. N. Amrhein, examiner

Prof. Dr. E. Martinoia, co-examiner

Dr. F. Mächler, co-examiner

Partially accepted for publication in Plant Physiology

Zürich, 1994

**ABSTRACT:**

Protoplasts, vacuoles and chloroplasts were isolated from leaves of 8-day old barley (*Hordeum vulgare* L., cv Gerbel) seedlings. Transport of ascorbate and dehydroascorbate into protoplasts and vacuoles was investigated. Contents of ascorbic acid, glutathione,  $\alpha$ -tocopherol, ascorbate peroxidase activity and glutathione reductase activity were analyzed in protoplasts, vacuoles and chloroplasts. Ascorbic acid release from stripped leaves was determined, and apoplastic ascorbate concentration was calculated.

Uptake of ascorbate and dehydroascorbate by protoplasts exhibited saturation kinetics ( $K_m$ : 90  $\mu$ M, AA; 20  $\mu$ M, DHA;  $V_{max}$ : 1.29  $\text{nmol} \cdot 10^{-7} \text{ Ppl} \cdot \text{min}^{-1}$ , AA; 2.07  $\text{nmol} \cdot 10^{-7} \text{ Ppl} \cdot \text{min}^{-1}$ , DHA). Effects of various membrane transport inhibitors suggested that transport was carrier mediated and driven by a proton electrochemical gradient. Translocation of ascorbate and dehydroascorbate into vacuoles did not exhibit saturation kinetics. It was influenced neither by modifying agents nor by ATP but only by  $\text{Mg}^{2+}$ , suggesting that translocation did not occur by carrier. Ascorbic acid was predominantly localized in the cytosol. Contents in the chloroplasts and vacuoles were low. The results are consistent with the view that ascorbate is synthesized in the cytosol and released to chloroplasts, apoplast and vacuole following a concentration gradient.

Translocation from the apoplast into the cytosol is against a steep gradient and appears to control the concentration of ascorbic acid in the apoplast. In its function as an antioxidant, ascorbate in the apoplast may be oxidized to dehydroascorbate which can be efficiently transported back into the cytosol for regeneration to ascorbate. The release of ascorbate from the leaf cells into the apoplast was estimated to be 0.1  $\text{nmol mg Chl}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Equilibrium between uptake and release of ascorbic acid was calculated to occur at a concentration of 8.3  $\mu$ M in the apoplast. However, this figure might be underestimated due to delayed diffusion through the cell wall as well as to refixation.

## ZUSAMMENFASSUNG

Protoplasten, Vakuolen und Chloroplasten wurden aus den Blättern von 8-Tage-alten Gerstensämlingen (*Hordeum vulgare* L., cv Gerbel) isoliert. Der Transport von Ascorbin- und Dehydroascorbinsäure in Protoplasten und Vakuolen wurde untersucht. Die Gehalte von Ascorbinsäure, Glutathion und  $\alpha$ -Tocopherol, sowie die Höhe der Aktivitäten von Ascorbatperoxidase und Glutathionreduktase wurden in Protoplasten, Vakuolen und Chloroplasten analysiert. Die Ascorbinsäureabgabe aus gestrippten Blättern wurde ermittelt und die apoplastische Ascorbinsäurekonzentration berechnet.

Für die Aufnahme von Ascorbat und Dehydroascorbat durch die Protoplasten wurde Sättigungskinetik festgestellt ( $K_m$ : 90  $\mu$ M, AA; 20  $\mu$ M, DHA;  $V_{max}$ : 1.29 nmol  $\cdot 10^{-7}$  Ppl  $\cdot \text{min}^{-1}$ , AA; 2.07 nmol  $\cdot 10^{-7}$  Ppl  $\cdot \text{min}^{-1}$ , DHA). Die Effekte verschiedener Membrantransportinhibitoren auf die Aufnahme deuteten auf die Beteiligung von Translokatoren hin, deren Aktivität an einen Protonengradienten gekoppelt war. Bei der Verschiebung von Ascorbin- und Dehydroascorbinsäure in die Vakuolen zeigte sich keine Sättigungskinetik. Mit Ausnahme von  $\text{Mg}^{2+}$  zeigten weder transportmodifizierende Agentien noch ATP einen Einfluss auf den Transport, was die Beteiligung eines Translokators unwahrscheinlich erscheinen lässt. Ascorbinsäure konnte vorwiegend im Cytosol lokalisiert werden, während die Gehalte in den Chloroplasten und Vakuolen gering waren. Diese Ergebnisse bestätigen die Vorstellung, dass Ascorbinsäure im Cytosol synthetisiert wird und von dort entlang eines Konzentrationsgradienten in die Chloroplasten, Vakuolen und den Apoplasten gelangt.

Der Transport vom Apoplasten ins Cytosol erfolgt gegen einen steilen Gradienten und scheint die apoplastische Ascorbinsäurekonzentration zu regulieren. Als Antioxidans kann Ascorbinsäure im Apoplasten zu Dehydroascorbinsäure oxidiert werden. Diese wird mit hoher Rate ins Cytosol zurück transportiert, wo sie wieder zu Ascorbinsäure regeneriert werden kann. Für die Abgabe von Ascorbinsäure aus Blattzellen in den Apoplasten ermittelten wir eine Rate von 0.1 nmol  $\cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Die Konzentration, bei der ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme- und Abgaberate herrscht, wurde auf 8.3  $\mu$ M kalkuliert. Allerdings wurden die Abgabe aus den Blattzellen und die Gleichgewichtskonzentration wahrscheinlich unterschätzt, da die Abgabe durch die Zellwand verzögert wird und zu einer nicht genau erfassbaren Reflexion führt.