

Funktionsanalyse pflanzlicher Aquaporine

vom Fachbereich Biologie der Technischen Hochschule Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

angenommene

Dissertation von

Norbert Uehlein

aus

Bad Kissingen

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 22.02.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2004

Darmstadt 2004

D17

Mein Dank gilt...

... Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die Überlassung des Themas, seine Anregungen und Ideen und die Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

... Prof. Dr. Gerhard Thiel für die Bereitschaft sich als Gutachter meiner Arbeit zur Verfügung zu stellen.

... Dr. Claudio Lovisolo und Dr. Martin Eckert für die Hilfe beim Umgang mit der Gaswechsellmessanlage.

... der gesamten AG Kaldenhoff für die Unterstützung im Labor, die Kneipengänge, unzählige Grillpartys und das Blattscheiben-Ausstanzen.

... Beate Otto, für die vielen Hilfen beim Nachdenken und dafür, dass sie meine Musik im Büro/Labor ausgehalten hat...meistens...

... Dr. Franka Siefritz, für ihre noch immer unerschütterliche gute Laune und die schönen Pflanzen.

... Prof. Dr. Titti Mariani, Prof. Dr. Jan W. M. Derksen, Huub Geurts und Marc Bots für die Hilfe bei den Gefrierbruch-Untersuchungen.

... meiner Mutter und meinem Vater, ohne die ich nie Biologie studiert hätte.

... meiner Frau Steffi, für die unendliche Geduld.

... allen Korrekturlesern dieser Arbeit.

1. EINLEITUNG	3
2. MATERIAL UND METHODEN	8
2.1. Verwendete Chemikalien und Enzyme	8
2.2. Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren	8
2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	8
2.2.1.1. Plasmid-Mini-Präparation	9
2.2.1.2. Plasmid-Midi-Präparation	9
2.2.2. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	10
2.2.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	11
2.2.4. Elution von DNA aus einem Agarosegel	11
2.2.5. Konzentrierung von DNA durch Fällung	12
2.2.5.1. Ethanol/Natriumacetat-Fällung	12
2.2.5.2. Isopropanol-Fällung	12
2.3. Verfahren mit Ribonukleinsäuren	13
2.3.1. Synthese von cRNA (<i>in vitro</i> -Transkription)	13
2.3.2. Elektrophoretische Größenfraktionierung von RNA-Molekülen	15
2.3.3. Northern Hybridisierung	15
2.4. Verfahren mit Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	16
2.4.1. Benötigte Lösungen	16
2.4.2. Entnahme der Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	17
2.4.3. Enzymatische Entfernung des Follikel epithels	17
2.4.4. Injektion von cRNA	18
2.4.5. Durchführung des Oozyten-Schwellungstests	18
2.4.6. Intrazelluläre pH-Messung	20
2.4.6.1. Das Messprinzip	20
2.4.6.2. Der Meßaufbau	20
2.4.6.3. Herstellung der pH-Mikroelektroden	21
2.4.6.4. Funktionsüberprüfung der pH-Mikroelektroden	22
2.4.6.5. Durchführung der CO ₂ -Aufnahmeexperimente	23
2.5. Verfahren mit pflanzlichen Organismen	23
2.5.1. Verwendetes Pflanzenmaterial	23
2.5.1.1. Tetracyclin-induzierbare Überexpression von NtAQP1	23
2.5.1.2. Reduzierte Expression von NtAQP1	24
2.5.2. Pflanzen-Anzucht	24
2.5.3. Messung der ¹⁴ CO ₂ -Aufnahme in Blattscheiben	24
2.5.4. Bestimmung der stomatären Leitfähigkeit und Nettophotosynthese mittels Gaswechsellanalyse	25
2.6. Gefrierbruch-Transmissions-Elektronenmikroskopie	26
2.6.1. Fixierung der Oozyten	26
2.6.2. Herstellung der Gefrierbrüche	26
3. ERGEBNISSE	27
3.1. Analyse der CO₂-Permeabilität von NtAQP1	27
3.1.1. Strukturelle Grundlagen	27
3.1.2. Heterologes Expressionssystem: <i>Xenopus</i> Oozyten	29
3.1.2.1. Messung der CO ₂ -Aufnahme	29
3.1.2.2. Theoretische Berechnungen zur CO ₂ -Aufnahme in Oozyten	31
3.1.3. Vereinfachtes homologes Expressionssystem: Blattscheiben	32
3.1.4. Homologes Expressionssystem: Gaswechsellanalyse an intakten Pflanzen	35

3.1.4.1. Auswirkung veränderter Expression von NtAQP1 auf die Stomatabewegung von <i>Nicotiana tabacum</i>	35
3.1.4.2. Auswirkung veränderter Expression von NtAQP1 auf die Photosynthese von <i>Nicotiana tabacum</i>	37
3.2. Weitere Analysen zur Funktion pflanzlicher Aquaporine	38
3.2.1. Quantifizierung von AQP-Proteinen in Oozytenmembranen	38
3.2.2. Auswirkungen von Ammonium-, bzw. Nitrat-Versorgung auf die Expression pflanzlicher Aquaporine in <i>Phaseolus vulgaris</i>	41
4. DISKUSSION	43
4.1. Zur Analyse der CO₂-Permeabilitätseigenschaften von NtAQP1	43
4.1.1. Strukturelle Grundlagen	43
4.1.2. CO ₂ -Aufnahme im heterologen Expressionssystem	44
4.1.3. CO ₂ -Aufnahme im homologen Expressionssystem	44
4.1.3.1. CO ₂ -Aufnahme in Blattscheiben von <i>Nicotiana tabacum</i>	44
4.1.3.2. NtAQP1 und die Schließzell-Bewegung	45
4.1.3.3. NtAQP1 und die Photosynthese	47
4.1.4. Ansätze zur Weiterführung des Projektes	48
4.1.4.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als mögliche Alternative zum Oozytensystem	48
4.1.4.2. Analyse der Photosyntheseleistung durch Messung der Chlorophyllfluoreszenz	49
4.2. Weitere Untersuchungen zur Funktion pflanzlicher Aquaporine	51
4.2.1. Permeabilitätsunterschiede zwischen PIP1- und PIP2-Aquaporinen am Beispiel von SsAQP1 und SsAQP2	51
4.2.2. Einfluss der Art der Stickstoffversorgung auf die Aquaporinexpression in <i>Phaseolus vulgaris</i>	53
5. ZUSAMMENFASSUNG	56
6. LITERATURVERZEICHNIS	57
7. ANHANG	61
7.1. Abkürzungsverzeichnis	61
7.2. Ein-, bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren	62
7.3. Makro zur Bestimmung des Flächeninhaltes von Oozyten-Querschnitten	62

1. Einleitung

Aquaporine zählen zur Superfamilie der MIP-homologen Proteine („major intrinsic proteins“). Als membranständige, porenbildende Proteine erleichtern sie Wasserflüsse über biologische Membranen. Aquaporine transportieren Wasser nicht gegen den osmotischen Gradienten, sondern ermöglichen die Bewegung von Wassermolekülen zwischen zwei Kompartimenten, einem osmotischen Gradienten folgend. Ihre Existenz wurde schon vor 70 Jahren vermutet, als extrem unterschiedliche Wasserflüsse über verschiedene Membrantypen gemessen wurden. So war der transepitheliale Wasserfluss über eine Amphibienhaut nach Anlegen eines osmotischen Gradienten circa drei- bis fünfmal höher, als für reine Diffusion über die Lipid-Doppelmembran berechnet (Hevesy *et al.*, 1935). Am Beispiel menschlicher Erythrozyten konnte eine Wasserpermeabilität der Zellmembran gezeigt werden, die die aller bis dahin getesteten Membrantypen um mindestens das 30-fache überstieg (Paganelli und Solomon, 1957). Im Gegensatz dazu weist die Plasmamembran von Forelleneiern keine Wasserpermeabilität auf (Cooper *et al.*, 2002) und auch bei Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* fällt auf, dass die Plasmamembran nur sehr geringe Wasserflüsse zulässt.

Vertreter der Aquaporin-Familie wurden mittlerweile in fast allen untersuchten Organismen aus dem Bereich der Prokaryoten, Pilze, Pflanzen und Tiere entdeckt. Im mittlerweile vollständig sequenzierten Genom von *Arabidopsis thaliana* zum Beispiel wurden 35 Aquaporingene gefunden, beim Menschen hingegen sind es bis jetzt nur elf. Viele dieser Gene wurden hinsichtlich der Funktion ihrer kodierten Proteine weiter untersucht.

Zur grundlegenden funktionellen Charakterisierung von Aquaporinen wird häufig zunächst das heterologe *Xenopus*-Oozytenexpressionssystem herangezogen. Hierzu wird die für ein Aquaporin codierende cDNA in einen speziell konzipierten Oozytenexpressionsvektor zwischen die flankierenden, nicht codierenden Sequenzen eines bestimmten *Xenopus*-Gens eingefügt. Dies dient als Matrize für die Synthese einer cRNA, die dann in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert wird. Die cRNA wird durch das Vorhandensein der flankierenden Sequenzen effektiv in das entsprechende Protein übersetzt, das dann im Idealfall in die Plasmamembran der Oozyte eingebaut wird. Solche Oozyten werden nach Anlegen eines osmotischen Gradienten Wasser aufnehmen oder abgeben. Dies führt zu einer Änderung des Zellvolumens, das gemessen und zur Berechnung der Wasserpermeabilität der

1 - Einleitung

Oozytenmembran herangezogen wird. Auf diesem Weg konnten zum einen Aquaporine identifiziert werden, die in diesem Expressionssystem hohe transmembrane Wasserflüsse ermöglichen, zum anderen wurden Aquaporine gefunden, die die Wasserpermeabilität der Oozytenmembran nur in sehr geringem Maße erhöhten.

Nicht alle Vertreter der auch MIP genannten Proteine sind ausschließlich für Wasser permeabel. Es wurde in einigen Fällen auch eine erhöhte Membrandurchlässigkeit für kleine lösliche Substanzen entdeckt. So konnte zum Beispiel für die menschlichen Aquaporine AQP3 (Ishibashi *et al.*, 1994) und AQP7 (Ishibashi *et al.*, 1997), sowie für drei pflanzliche Aquaporine (NtAQP1, Biela *et al.*, 1999; SsAQP1, Moshelion *et al.*, 2002; NOD 26, Rivers *et al.*, 1997) eine Permeabilität für Glycerin bzw. Harnstoff nachgewiesen werden. Die Klärung der physiologischen Relevanz dieser Permeabilität in Pflanzen steht allerdings noch aus.

Am Beispiel einiger Säuger-Aquaporine wird eine Permeabilität für Ionen untersucht. Es gibt Studien in denen für AQP6 eine pH- bzw. quecksilberinduzierte Ionenpermeabilität (Yasui *et al.*, 1999; Hazama *et al.*, 2002) nachgewiesen werden konnte. Ob Ionenpermeation durch die Einzelporen oder eine hypothetische Zentralpore des Aquaporin-Tetramers erfolgt, konnte jedoch nicht endgültig geklärt werden. Darüber hinaus wurde für AQP6 eine zusätzliche Permeabilität für Nitrat dokumentiert (Ikeda *et al.*, 2002).

Im Fall des menschlichen Aquaporin 1 (HsAQP1) konnte ebenfalls eine Ionenpermeabilität gezeigt werden, die allerdings bereits widerlegt wurde. Es wurde zunächst behauptet, dass HsAQP1 eine durch zyklische Nukleotide aktivierbare Ionenpermeabilität besäße. Die Aktivierung durch cAMP (Yool *et al.*, 1996) konnte jedoch experimentell von anderen Arbeitsgruppen nicht wiederholt werden. Eigene hier nicht weiter erwähnte Untersuchungen führten ebenfalls zu negativem Ergebnis. Im Unterschied dazu konnte eine Aktivierung durch cGMP (Anthony *et al.*, 2000) nur nach Einbau des gereinigten Proteins in planare Lipid-Doppelmembranen bestätigt werden. Allerdings wurden bei der Wiederholung der Experimente von Saparov *et al.* (2001) Leitfähigkeitswerte und Öffnungswahrscheinlichkeiten gemessen, die weit unter den von Anthony *et al.* veröffentlichten Werten lagen. Patch-Clamp-Untersuchungen an menschlichen HEK-Zellen (engl.: *human embryonic kidney cells*) ergaben keine signifikante Aktivierung der Ionenkanal-Aktivität von HsAQP1 nach cGMP- oder cAMP- Zugabe (Tsunoda *et al.*, 2003).

HsAQP1 ist in Erythrozyten und im Endothel der Lungenalveolen hoch exprimiert, also an Orten, an denen *in vivo* ein hoher Kohlendioxidaustausch stattfindet. Bei der funktionellen Charakterisierung im *Xenopus*-Oozyten-System konnte eine gesteigerte Permeabilität der Oozytenmembran für CO₂ gemessen werden (Nakhoul *et al.*, 1998). Sowohl Wasser- als auch CO₂-Permeabilität von HsAQP1 konnten durch Quecksilberreagenzien wie PCMBs (p-Chloromercuribenzolsulphonat) inhibiert werden (Cooper und Boron, 1998). Die Inhibitorstudien wurden auch an Oozyten durchgeführt, die ein mutiertes HsAQP1-Protein eingebaut hatten, das zwar dieselbe Wasser- und CO₂-Permeabilität zeigt wie das unveränderte Protein, aber nicht mehr quecksilbersensitiv ist. In diesem Fall konnte weder die Permeation von Wasser, noch die von CO₂ über die Plasmamembran durch PCMBs inhibiert werden (Cooper und Boron, 1998). Diese Studien zeigten weiterhin, dass die Permeation von CO₂ durch HsAQP1 auf demselben Weg stattfindet wie die des Wassers.

Die Analyse der CO₂-Permeabilität von HsAQP1 *in vivo* lieferte kontroverse Ergebnisse. An genetisch manipulierten Mäusen, bei denen das entsprechende AQP1-Gen ausgeschaltet wurde, konnte kein veränderter CO₂-Austausch über das Alveolarendothel gegenüber Kontrollmäusen mit normaler AQP1-Expression beobachtet werden (Yang *et al.*, 2000). Yang *et al.* ventilierten Mäuselungen *in vivo* zunächst mit 5% CO₂ in Luft und schalteten anschließend auf CO₂-freie Luft um. Den CO₂-Gehalt des Blutes bestimmten sie an Proben, die sie aus einer Körperarterie entnahmen. Es konnten keine signifikant unterschiedlichen CO₂-Gehalte der Blutproben ermittelt werden. In einem anderen Ansatz (Fang *et al.*, 2002) wurden frisch isolierte Mäuselungen mit einer pH-Indikatorlösung befüllt und von der arteriellen Seite mit einem CO₂-angereicherten Puffer perfundiert. Auch hier konnte keine signifikant unterschiedliche CO₂-Permeabilität des Alveolarendothels bei Mäusen ohne AQP1-Expression, bzw. bei Kontrollmäusen gemessen werden. Die *in oo* gemessene CO₂-Permeabilität von HsAQP1 schien demnach *in vivo* keine Bedeutung zu haben und wurde daher als biochemische Kuriosität bezeichnet.

Weil die angesprochenen Versuche zur CO₂-Permeabilität an Mäuselungen aufgrund technischer Einwände gegen das experimentelle Vorgehen in Frage gestellt wurden (Cooper *et al.*, 2002), ist die Diskussion über die physiologische Bedeutung der CO₂-Permeation durch AQP1 damit jedoch noch nicht beendet. Fang *et al.* (2002) benutzten zur Perfusion der Pulmonar-Arterien nicht Blut, sondern eine CO₂-äquilibrierte Salzlösung und die CO₂-Konzentration in den Kapillargefäßen kann somit sehr schnell auf das Niveau der Alveolen absinken. In diesem Fall ist die Diffusion von CO₂ über die Plasmamembranen des

1 - Einleitung

Alveolarendothels durch die Geschwindigkeit der Perfusion begrenzt und nicht durch den Diffusionswiderstand der Membran.

Yang *et al.* (2000) beobachteten nach Umschalten von 5% CO₂ enthaltende auf CO₂-freie Luft eine Änderung des Blut-CO₂-Gehaltes mit einer Halbwertszeit von 2 min. Die Kritik an den Untersuchungen geht dahin, dass der gezeigte zeitliche Verlauf der Änderung des CO₂-Gehaltes nur anzeigt, wie CO₂ durch Ventilation mit CO₂-freier Luft aus der Lunge ausgewaschen wird. Aussagen über CO₂-Flüsse über die Membran des Alveolarendothels sind unter diesen Bedingungen nicht möglich, da der komplette Austausch der Luft in der Lunge zu lange dauert und zu keiner Zeit ein definierter CO₂-Gehalt in der Lunge vorliegt.

Darüber hinaus meinten Cooper *et al.* (2002), dass Organismen bestrebt seien, das Fehlen eines Gens auf irgend eine Weise zu kompensieren. Daher seien die Ergebnisse aus Untersuchungen an *knock-out*-Mäusen mit Vorsicht zu betrachten.

Der CO₂ Gaswechsel spielt nicht nur bei Säugern eine große Rolle, wo CO₂ über die Plasmamembran von Erythrozyten und Kapillarendothelien der Alveolen diffundieren muss, sondern auch bei Pflanzen. CO₂ ist hier auch und in erster Linie das Substrat für die photosynthetische Kohlenstoff-Fixierung. Der in der Säugerylunge vorliegende Kohlendioxid-Gradient beträgt durchschnittlich 36 mbar. Im Weizenblatt allerdings konnte nur ein CO₂-Gradient von 90 µbar zwischen dem substomatären Hohlraum und dem Ort der CO₂-Fixierung nachgewiesen werden (Evans und von Caemmerer, 1996). Der Gradient zwischen Atmosphäre und Pflanze ist somit ungefähr 400-mal niedriger als der zwischen Atmosphäre und tierischer Lunge. Hinzu kommt, dass das von der Pflanze benötigte CO₂-reduzierende Schlüsselenzym *Rubisco* eine vergleichsweise niedrige Affinität zu seinem Substrat hat. Trotzdem sind die CO₂-Austauschraten in Säugetierlungen und Pflanzen ähnlich (Evans und von Caemmerer, 1996). In der Pflanze muss demnach ein geringerer Diffusionswiderstand für CO₂ vorliegen, um ähnliche Austauschraten zu erhalten wie im tierischen System. Eine Veränderung dieses Widerstandes und somit eine Veränderung des Membrantransports von CO₂ sollte sich direkt auf nachgeschaltete Prozesse auswirken. Die Verfügbarkeit von CO₂ begrenzt bzw. steuert Vorgänge wie zum Beispiel die Photosynthese oder das Öffnen und Schließen des Spaltöffnungsapparates. Die Aufklärung des zellulären CO₂-Transports ist somit von großer Bedeutung für das Verständnis grundlegender Prozesse in der Pflanze.

1 - Einleitung

Da Aquaporine aus unterschiedlichen Organismen hoch konservierte Sequenzhomologien aufweisen ist es denkbar, dass auch Pflanzen über ein oder mehrere Aquaporine verfügen, die eine dem menschlichen AQP1 ähnliche CO₂-Permeabilität besitzen. Deren Funktion, die eine Erleichterung des CO₂-Membrantransportes zur Folge hätte, könnte den Widerspruch zwischen dem niedrigen CO₂-Gradienten und den hohen gemessenen Austauschraten erklären und eine effektive Photosynthese erleichtern.

In der Tat ist das bereits ausführlich untersuchte pflanzliche Aquaporin NtAQP1 (*Nicotiana tabacum* aquaporin 1; Biela *et al.*, 1999; Otto und Kaldenhoff, 2000; Siefritz *et al.*, 2001; Siefritz *et al.*, 2002) dem menschlichen AQP1 auf Ebene der Aminosäuresequenz, besonders im Bereich der Pore, sehr ähnlich. Im Rahmen der hier beschriebenen Arbeit konnte ich zeigen, dass das pflanzliche Aquaporin NtAQP1 im heterologen *Xenopus* Oozyten-Expressionssystem eine dem HsAQP1 ähnliche CO₂-Permeabilität aufweist, die tatsächlich Auswirkungen auf die Physiologie der Pflanze hat.

Ziel der vorliegenden Arbeit war festzustellen, welche Permeabilitätseigenschaften NtAQP1 insbesondere im Vergleich zu verwandten Aquaporinen besitzt. Es sollte geklärt werden inwiefern das Protein eine erhöhte Permeabilität von Membranen für CO₂ bedingt und welche physiologischen Konsequenzen sich daraus für die Pflanze ergeben.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien in p.a.-Qualität von Sigma, Aldrich, Fluka (alle Deisenhofen) und ICN (Eschwege) bezogen.

Restriktionsendonucleasen wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Biotherm Taq DNA-Polymerase wurde von Diagonal (Münster) bezogen.

2.2. Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren

2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* standen zwei Versuchsvorschriften zur Verfügung. Eine schnelle Methode, bei der die Reinheit der isolierten DNA für die meisten Anwendungen wie Restriktion, Ligation, PCR etc. genügte und ein Säulenverfahren für hochreine DNA-Präparationen für Anwendungen wie Sequenzierung und *in vitro* Transkription. Beide Methoden beruhten auf einer alkalischen Lyse der *E. coli* Zellen und der selektiven Sedimentierung der bakteriellen, genomischen DNA, die an der Zellmembran anhaftet. Die Plasmid-DNA verblieb dabei im Überstand. Ausgangsmaterial waren 3 ml einer Über-Nacht-Bakterienkultur in LB-Nährmedium für die Mini-, bzw. bis zu 50 ml für die Midi-Präparation.

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der DNA erfolgte photometrisch bei 260 nm (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) unter Verwendung einer geeigneten Verdünnung der zu messenden DNA-Probe (i.d.R. 1:40 od. 1:80). Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$Konz_{DNA} \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{E_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} \quad [\text{Gleichung 2-1}]$$

Die DNA-Lösung wurde bei 4 °C gelagert, bzw. bei -20 °C dauerhaft aufbewahrt oder sofort für weitere Arbeitsschritte eingesetzt.

2.2.1.1. Plasmid-Mini-Präparation

Hierzu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 sec in einer Tischzentrifuge (Hermle Z160M) sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte bei Raumtemperatur durch Zugabe von 300 µl Puffer P2. Nach einer maximalen Inkubation von 5 min wurden die bakteriellen Zelltrümmer und die genomische DNA durch Zugabe von 300 µl P3 und 10-minütige Inkubation auf Eis gefällt. In einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt in einer Tischzentrifuge wurde das Präzipitat bei 14.000 Upm sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 600 µl Isopropanol versetzt und gut durchmischt. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der verbleibende Überstand verworfen und das erhaltene DNA-Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde die DNA in einem geeigneten Volumen *Aqua bidest.* oder TE-Puffer aufgenommen.

Puffer P1 (Resuspensionspuffer; Lagerung bei 4 °C):

100 µg/ml RNase A (Zugabe nach Autoklavieren)
50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA

Puffer P2 (Lysispuffer; Lagerung bei RT):

200 mM NaOH
1% SDS

Puffer P3 (Neutralisationspuffer; Lagerung bei 4°C) :

3,0 M Kalium-Acetat, pH 5,5

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

2.2.1.2. Plasmid-Midi-Präparation

Für diese Methode wurde zusätzlich ein Säulensystem der Firma QIAGEN verwendet. Je nach Größe der Kultur wurden QIAGEN-tip20 für maximal 5 ml Kultur, bzw. QIAGEN tip100 für bis zu 50 ml Kultur verwendet. Die Lyse der Bakterien und anschließende Gewinnung des plasmidhaltigen Überstandes wurde wie unter 2.2.1.1. durchgeführt. Die verwendeten Mengen an Puffer wurden nach den Angaben des Herstellers an die jeweils eingesetzte Kulturgröße angepasst. Die verwendeten Säulen wurden zunächst mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert und anschließend mit dem plasmidhaltigen Lysis-Überstand beladen. Die an

die Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA wurde anschließend zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen und danach mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Isopropanol-Fällung (siehe 2.2.4.2.) konzentriert und in einem geeigneten Volumen *Aqua bidest.* oder TE-Puffer aufgenommen.

Puffer QBT (Äquilibriumspuffer; Lagerung bei RT):

750 mM NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Isopropanol
0,15 % Triton X-100

Puffer QC (Waschpuffer; Lagerung bei RT):

1 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Isopropanol

Puffer QF (Elutionspuffer; Lagerung bei RT):

1,25 M NaCl
50 mM Tris-Cl, pH 8,5
15 % Isopropanol

2.2.2. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von DNA, bzw. zu ihrem gezielten Abbau dienten spezifisch spaltende Restriktionsenzyme. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den diesbezüglichen Vorschriften der Herstellerfirmen (MBI Fermentas, Gibco BRL).

Für einen vollständigen Abbau der Plasmid-DNA wurde mindestens eine Einheit (U) des entsprechenden Enzyms pro μg DNA eingesetzt und der Reaktionsansatz mindestens 1 h bei optimaler Reaktionstemperatur des Enzyms (meist 37°C) in einem Heizblock inkubiert. Bei kritischen Reaktionen, bzw. bei kleinen Reaktionsvolumina war es notwendig eine Kondensation durch inhomogene Temperaturverteilung im Reaktionsgefäß auszuschließen. Hierzu wurde der Ansatz in einem geschlossenen Brutschrank inkubiert und so konstante Bedingungen gewährleistet. Das Reaktionsvolumen wurde entsprechend der eingesetzten Menge an DNA und Enzym variiert, betrug aber mindestens $20\ \mu\text{l}$ für Überprüfungs-Restriktionen. In der Regel wurde ein $50\ \mu\text{l}$ -Reaktionsansatz gewählt, um eine ausreichende Verdünnung des Enzym-Lagerungspuffers zu erreichen. Nach Beendigung der Reaktion wurde bei den meisten Restriktionsenzymen eine Inaktivierung durch Inkubation des Reaktionsansatzes für 10 min bei 60°C erreicht. Das denaturierte Enzym konnte durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (siehe 2.3.1.) aus dem Reaktionsansatz

entfernt werden. Anschließend wurde die DNA durch Isopropanol- oder Ethanol/Natriumacetat-Fällung (siehe 2.2.4.) konzentriert.

Zur qualitativen Beurteilung der Restriktion wurde zu einem geeignet verdünnten Aliquot des Restriktionsansatzes 1/6 Vol. Stopp-Puffer zugegeben und dies in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür war eine Hitzeinaktivierung der verwendeten Restriktionsendonuklease(n), bzw. eine Phenol/Chloroformextraktion mit anschließender Fällung nicht zwingend notwendig.

6x Stopp-Puffer:
50 % Glycerin
7,5 mM EDTA
0,4 % Xylenxyanol
0,4% Bromphenolblau

2.2.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größen erfolgte durch Elektrophorese im Agarosegel. Die Konzentration der Agarose (ICN) richtete sich dabei prinzipiell nach der zu erwartenden Fragmentgröße, lag jedoch zumeist bei 1%. Als Puffer diente 1xTAE-Puffer. Zur Markierung der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde der in der Hitze gelösten Agarose 0,05 µg/ml Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH + Co.) zugesetzt. Die zuvor mit 1/6 Vol. Stopp-Puffer versehene DNA-Lösung wurde auf das Gel aufgetragen. Um eine optimale Auftrennung zu erreichen, wurde eine Spannung zwischen 80 und 100 Volt gewählt. Als Größenstandard dienten DNA-Fragmente definierter Länge (z.B. 1 kb DNA-Leiter, Gibco BRL). Die Sichtung und Dokumentation der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech).

50xTAE-Puffer (pro Liter):
242 g Tris, pH 8,0
57,1 ml Essigsäure (99 %)
100 ml 0,5 M EDTA

2.2.4. Elution von DNA aus einem Agarosegel

Eine mit Ethidiumbromid angefärbte DNA-Bande wurde nach Auftrennung im Agarosegel unter UV-Licht (Transilluminator, 302 nm) gesichtet und zusammen mit der umgebenen Agarose ausgeschnitten. Der Agaroseblock wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und

gewogen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem QIAquick-System (QIAGEN, Hilden) unter Verwendung der mitgelieferten Pufferlösungen anhand des Herstellerprotokolls. Der isolierte Agaroseblock wurde durch eine 10minütige Inkubation bei 50°C in einem Heizblock in einem 3fachen Gel-Volumen Puffer QX1 gelöst. Der entstandenen DNA / Agarose-Lösung wurde ein Gel-Volumen Isopropanol zugesetzt und der Ansatz wurde auf die QIAquick-Säulchen aufgebracht. In Gegenwart der hohen Salzkonzentration des Puffers QX1 wurde die DNA an das Säulenmaterial gebunden. Es folgten mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte, beginnend mit 500 µl Puffer QX1, dann 500 µl Puffer PE, wobei die Salzkonzentration in den Pufferlösungen kontinuierlich verringert wurde. Abschließend wurde die Säule durch Zentrifugation getrocknet und die DNA durch Zugabe eines geeigneten Volumens TE-Puffer oder Wasser von dem Säulenmaterial eluiert. Die Ausbeute konnte dabei durch eine Inkubation für 2 min bei RT erhöht werden. Durch eine abschließende Zentrifugation der Säule in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß in der Tischzentrifuge wurde die DNA-haltige Lösung geerntet. Zur Kontrolle wurde eine Aliquot erneut im TAE-Agarosegel aufgetrennt.

2.2.5. Konzentrierung von DNA durch Fällung

2.2.5.1. Ethanol/Natriumacetat-Fällung

Zum Konzentrieren der DNA wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 1 Vol. DNA-Lösung mit 2,5 Vol. eiskaltem 98% Ethanol und 1/10 Vol. Natrium-Acetat-Lösung (3M NaAc, pH 4,5) supplementiert und 30 min. bei -20°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 20 min. bei 14.000xg und 4°C wurde das Sediment mit 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, um die DNA von Salzen zu reinigen. Nach Trocknung bei RT wurde das DNA-Pellet in einem geeigneten Volumen *Aqua bidest.* oder TE-Puffer (pH 7,5; siehe 2.2.1.1.) aufgenommen. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung erfolgte wie unter 2.2.1. beschrieben.

2.2.5.2. Isopropanol-Fällung

Die zu konzentrierende DNA-Lösung wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und die DNA durch 15-minütige Zentrifugation bei RT und maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge (Hermle Z160M) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol (kalt) gewaschen. Nach Trocknung bei RT wurde das

DNA-Pellet in einem geeigneten Volumen *Aqua bidest.* oder TE-Puffer (pH 7,5; siehe 2.2.1.1.) aufgenommen. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung erfolgte wie unter 2.2.1. beschrieben.

2.3. Verfahren mit Ribonukleinsäuren

2.3.1. Synthese von cRNA (*in vitro*-Transkription)

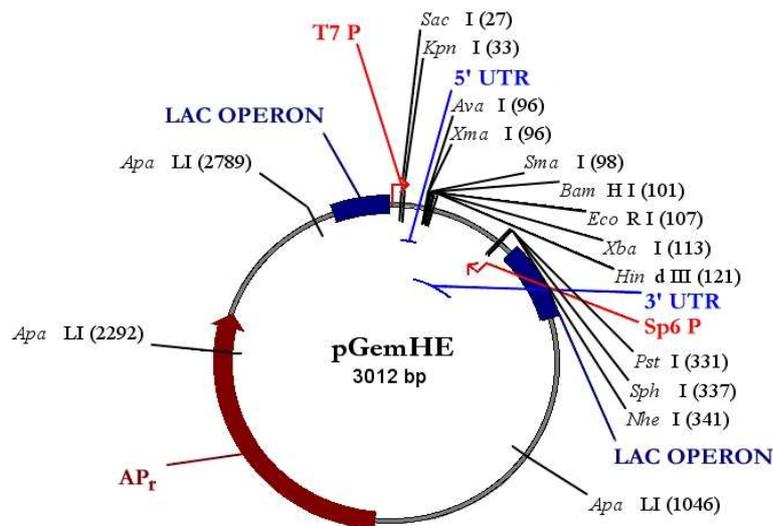


Abbildung 2-1: Physikalische Karte des Vektors pGemHE. Vermerkt ist das Gen für die Ampicillin-Resistenz (AP_r) und das Lactose-Operon (LAC OPERON). Die Polylinker-Region mit den zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen befindet sich stromaufwärts vom Startpunkt für die *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase (T7 P) und wird von den untranslatierten Bereichen (5'-UTR und 3'-UTR) des *Xenopus* β -Globin-Gens flankiert.

Für die heterologe Expression in Oozyten von *Xenopus laevis* wurden die zu untersuchenden cDNA-Klone zunächst in den speziell konstruierten Vektor pGemHE (Liman *et al.*, 1992), der in Abbildung 2-1 dargestellt ist, in definierter Orientierung einkloniert. Dafür konnten 7 verschiedene Restriktionsstellen im Vektor genutzt werden, welche von den untranslatierten Bereichen (5'-UTR und 3'-UTR; siehe Abbildung 2.3.1-1) des *Xenopus* β -Globin-Gens flankiert sind. Dieses soll eine Diskriminierung der fremden Gene durch den Translationsapparat der Oozyten verhindern und so die Translationseffizienz erhöhen. Um in der Reaktion cRNA-Moleküle mit einer definierten maximalen Länge zu erhalten („run-off Synthese“), wurden zunächst 5 μ g hochreine Plasmid-DNA durch die Restriktionsendonuklease NheI (MBI Fermentas) linearisiert. Alternativ konnten PstI bzw. SphI verwendet werden. Eine mögliche Kontamination mit RNasen wurde durch eine

anschließende Inkubation des Ansatzes in Gegenwart von Proteinase K (200 µg/ml; Sigma) und SDS (0,5%) bei 50 °C für 1 h entfernt. Die DNA wurde daraufhin durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) aufgereinigt. Spuren von Phenol wurden durch erneute Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Die DNA wurde durch Isopropanol-Fällung (siehe 2.2.4.2.) sedimentiert, von Salzen befreit und in einem geeigneten Volumen RNase-freien Wassers gelöst. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und ein Aliquot der DNA-Lösung im Agarosegel aufgetrennt. Für die *in vitro*-Transkription wurde das MEGAscript™ T7 System (Ambion) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Pro Transkriptionsreaktion wurde 1 µg der zuvor aufgearbeiteten Plasmid-DNA eingesetzt. Um eine höhere Translationseffizienz im Oozytensystem zu erreichen, bzw. um den Abbau der RNA durch oozyteneigene RNasen zu vermindern wurde die synthetisierte RNA am 5'-Ende mit einer Cap-Struktur (7-Methyl-Guanosin-Rest) versehen. Cap-Analog (m7G(5')ppp(5')G; Ambion) und GTP wurden, wie im Protokoll der Herstellerfirma (Ambion) vorgeschlagen, in einem Verhältnis von 4:1 eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde entsprechend den Herstellerangaben hergestellt.

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die erhaltene cRNA wurde durch Lithium-Chlorid-Fällung konzentriert und gereinigt. Hierzu wurde der Reaktionsansatz mit RNase-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt und mit 25 µl *Lithiumchloride Precipitation Solution* (7,5 M LiCl₂, 50 mM EDTA; Ambion) vermischt. Der Ansatz wurde für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltenen Pellet wurde einmal mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation mit anschließender Trocknung bei RT in einem geeigneten Volumen RNase-freiem Wasser gelöst. Ausbeute und Reinheit der cRNA wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.2.1.). Die Konzentration errechnete sich nach folgender Formel:

$$Konz_{RNA} \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{E_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} \quad (\text{Gleichung 2-2})$$

Ein Aliquot der cRNA-Lösung wurde auf eine gewünschte Konzentration (in der Regel 1,0 oder 0,5 µg/µl) verdünnt. Zur Kontrolle wurde 1 µg der cRNA in einem denaturierenden MEN-Agarosegel (siehe 2.3.2.) aufgetrennt. Die RNA-Lösung konnte bei -80°C dauerhaft gelagert werden.

2.3.2. Elektrophoretische Größenfraktionierung von RNA-Molekülen

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA ermöglicht die qualitative Beurteilung der RNA hinsichtlich einer möglichen Degradation. Nach der am Photometer bestimmten Konzentration wurde je Probe 1µg cRNA ad 5µl mit H₂O-DEPC verdünnt und mit einem identischen Volumen RNA-Ladungspuffer versetzt. Die so behandelten Proben wurden bei 65°C für 10 Minuten denaturiert, 2 Minuten auf Eis inkubiert und sofort auf ein Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im denaturierenden 1%-MEN-Agarosegel mit 1xMEN-Puffer. Die RNA-Proben wurden bei einer konstanten Spannung von 70 V aufgetrennt. Als Größenstandard dienten RNA-Fragmente definierter Länge (RNA-Marker 0,5 - 9,0 kb; New England Biolabs). Das Trennungsmuster wurde unter UV-Licht durch die Fluoreszenz des gebundenen Ethidiumbromids sichtbar gemacht und auf Polaroid-Film dokumentiert (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech).

RNA-Ladungspuffer:

0,72 ml Formamid
0,16 ml 10xMEN
0,26 ml 37 % Formaldehyd
0,18 ml *Aqua* bidest.
0,10 ml 80 % Glycerin
0,08 ml 2 % Bromphenolblau
3 µl 1 % Ethidiumbromid

RNase-freies Wasser:

0,05% DEPC (Diethyl-pyrocyanat) in *Aqua*
bidest.
über Nacht rühren
1h autoklavieren

MEN-Agarosegel:

0,5 g Agarose (ICN)
5 ml 10xMEN
42,5 ml *Aqua* bidest.
in der Mikrowelle lösen
2,7 ml 37 % Formaldehyd

10xMEN-Puffer:

0,2 M MOPS (3-(N-Morpholino)-
propansulfonsäure)
0,01 M EDTA (Ethylendiamin-
tetraessigsäure)
0,05 M Natriumacetat

2.3.3. Northern Hybridisierung

Elektrophoretisch größenfraktionierte Gesamt-RNA wurde mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran (HybondN, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg i. Br.) übertragen. Die RNA wurden mittels UV-Licht auf der Membran fixiert (120 mJoule, UVStratalinker 2400, Stratagene) und anschließend mindestens eine Stunde in Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Ein Waschschriff von 30 Minuten bei 50°C in 2xSSC/0,5%SDS unmittelbar nach der Fixierung erhöhte die Spezifität der nachfolgenden Hybridisierung (Prof. Kaldenhoff, persönliche Mitteilung). Der Hybridisierungspuffer wurde gewechselt und die denaturierte Sonde zugegeben (500.000 counts/ml). Die verwendete Sonde wurde mit einem kommerziell erhältlichen System hergestellt (*Ready-to-go labelling-*

2 - Material und Methoden

beads, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg i. Br.) und mittels Chromatographie aufgereinigt (MobiSpin G-50, MoBiTec GmbH, Göttingen). Das verwendete radioaktiv markierte Nukleotid α -³²P-dCTP wurde von der Firma ICN Radiochemicals (Eschwege) bezogen. Nach Hybridisierung über Nacht bei 42°C folgten mehrere Waschschriffe in mindestens 100 ml 2xSSC (RT), bzw. 2xSSC / 1%SDS (60°C). Beim Waschen wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert, ob noch Radioaktivität auf der Membran vorhanden war. Anschließend wurde die Membran kurz mit 2xSSC gespült, in Frischhaltefolie eingeschlagen und über Nacht bei -82°C auf einen Röntgenfilm (Kodak XomatAR) aufgelegt.

Hybridisierungslösung:

50% Formamid
5xDenhardt
5xSSC
1% SDS
100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA

50xDenhardt:

5g BSA
5g Ficoll 400
5g Polyvinylpyrrolidone
ad 500 ml *Aqua bidest.*

10xSSC-Puffer:

1,5 M NaCl
0,15 M Natriumcitrat (pH 7,0)

2.4. Verfahren mit Oozyten von *Xenopus laevis*

2.4.1. Benötigte Lösungen

Es wurden zunächst 10fach konzentrierte Stocklösungen von ND96 und ND96-Ca²⁺-frei angesetzt und diese bei Bedarf mit *Aqua bidest.* auf 1fache Arbeitskonzentration verdünnt. ND96 wurde mit 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (Stocklsg 10.000 U/ml; Sigma) supplementiert (ND96_{pen/strep}). Um Isotonie zum Oozyten-Cytoplasma zu erhalten, mußte die 1fach konzentrierte Arbeits-Lösung mit Sorbitol (Carl Roth GmbH + Co.) auf ca. 220 mosmol eingestellt werden. Die Osmolalität wurde mit einem Dampfdruck-Osmometer (Wescor) überprüft. Die 10fach konzentrierten Stocklösungen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

1xND96:

96 mM NaCl
2 mM KCl
1 mM CaCl₂ x 2 H₂O
1 mM MgCl₂ x 6 H₂O
5 mM Hepes, pH 7,4 (NaOH)

1xND96-Ca²⁺-frei:

96 mM NaCl
2 mM KCl
1 mM MgCl₂ x 6 H₂O
5 mM Hepes, pH 7,4 (NaOH)

2.4.2. Entnahme der Oozyten aus *Xenopus laevis*

Weibliche südafrikanische Krallenfrösche der Gattung *Xenopus* (Nasco, Fort Atkison Texas, USA) wurden paarweise in Aquarien bei 20–22°C Wassertemperatur gehalten. Zur Entnahme der Oozyten wurde der Frosch unter Eiskühlung in Tricaine-Lösung (3-Aminobenzoessäure-ethylester, Sigma; 0,75 g/l) für ca. 0,5 h narkotisiert. Daraufhin wurde der Frosch dorsal auf ein Operationsbett aus Eis und mit Triacaine-Lösung getränkten Tüchern gelegt und die ventrale Seite, ausgenommen das Operationsfeld, ebenfalls mit solchen Tüchern bedeckt, um ein Austrocknen der Haut zu verhindern und den Frosch dauerhaft unter Narkose zu halten.

Die Bauchhaut wurde durch einen ca. 7 mm langen Schnitt mit einer Schere eröffnet, so dass Muskelhaut und Muskelgewebe zugänglich waren. Hier wurde ein ca. 5 mm langer Schnitt vorgenommen. Mit einer feinen Pinzette konnte nun ein Ovarlappen gegriffen und vorsichtig herausgezogen werden. Die Ovarlappen wurden mit einer Schere abgeschnitten und in 1xND96-Lösung überführt. Muskelgewebe und Muskelhaut wurden mit einem Stich vernäht, die Bauchhaut wurde mit 3 bis 5 Stichen verschlossen. Abschließend wurde der Frosch zum Aufwachen ca. 1 h auf einem Stapel Papiertücher in Wasser in einem Eimer gehalten.

2.4.3. Enzymatische Entfernung des Follikelepithels

Die Ovarlappen wurden in einem 50 ml Zentrifugenglas in 1xND96 (220 mOsm, pH 7,4) gesammelt und mit 1xND96-Ca²⁺-frei gewaschen. Nach Überführung in eine Glaspetrischale wurden die Ovarteile unter dem Binokular mit Uhrmacherpinzetten (Nr.5, INOX, Dumont & Fils) soweit zerteilt, dass nur noch Cluster von etwa 5 bis 10 Oozyten zusammenhingen. Die Oozyten wurden vorsichtig in das Zentrifugenglas zurückgegeben und zweimal mit jeweils 45 ml Ca²⁺-freier ND96-Lösung gewaschen. Die Waschlösung wurde jeweils vollständig dekantiert. Um das die Oozyten umgebende Follikelepithel möglichst quantitativ zu entfernen schloss sich eine Kollagenase-Behandlung an. Hierzu wurde in eine 50mm-Petrischale Kollagenase eingewogen (Endkonzentration: 480 U/ml) und in 1ml ND96-Ca²⁺-frei gelöst. Die gewaschenen Oozytenkluster wurden in einem Restvolumen von 4ml ND96-Ca²⁺-frei zugegeben, die Schale mit Parafilm verschlossen und 1,5 h auf einem Rundschtüttler mit ca. 120 Upm bei RT inkubiert.

Als der Hauptanteil des Follikelepithels entfernt war, wurden die Oozyten in das Zentrifugenglas zurückgegeben und kurz mit Ca²⁺-freier ND96-Lösung geschwenkt und der Überstand abgossen, um zunächst den größten Anteil an Kollagenase und abgebautes

Follikulargewebe zu entfernen. Nun schlossen sich 5 Waschschrirte mit 1xND96-Ca²⁺-frei an. Nach dem fünften Abgießen wurden die Oozyten einmal mit 1xND96_{pen/strep} gewaschen und in eine hitzesterilisierte 100mm Glaspetrischale in 1xND96_{pen/strep} überführt.

2.4.4. Injektion von cRNA

Die Injektion der cRNA wurde 18 – 24 h nach der Präparation der Oozyten durchgeführt. Dazu wurden zunächst Glaskapillaren (3 1/2“ Drummond #3-00203-g/X, Drummond Scientific Company) mit einem Laser-Ziehgerät (Sutter Instruments Co., Model p-2000) zu Mikropipetten ausgezogen. Die feine Spitze wurde unter dem Mikroskop abgebrochen und nach kurzem Kontakt mit einem glühenden Heizdraht (Mikroschmiede, Leitz) durch schnelles Abziehen mit einer kanülenartige Öffnung versehen. Der Durchmesser der so hergestellten Injektionskapillare betrug ca. 1-2 µm. Die auf 0,5 µg/µl eingestellte cRNA-Lösung wurde in solch eine Injektionskapillare aufgesogen und mittels eines kontrollierten Druckstoßes (General Valve, PicospritzerII, USA) etwa 30-50 ng der cRNA in die Oozyten injiziert. Die Expression der jeweiligen Membranproteine konnte nach einer Inkubation bei 16°C in einem Zeitraum von 3 bis 5 Tagen im Schwellungstest nachgewiesen werden.

2.4.5. Durchführung des Oozyten-Schwellungstests

Ein Stereomikroskop (SM22-140-F, Firma Hund, Wetzlar) mit integrierter Beleuchtungseinheit und montierter Digitalkamera (Pixera PVC100C, Pixera Corporation, USA) wurde zur Erfassung der Volumenzunahme von Oozyten verwendet. Die Beleuchtung erfolgte hierbei von unten und wurde so justiert, daß die Oozyten als runde, schwarze Scheiben auf hellem Hintergrund erschienen. Dies ermöglichte die automatische Auswertung durch das Bildanalyseprogramm Scion-Image für Windows95/98/NT, Release Beta4 (Scion Corporation, USA; <http://www.scioncorp.com>). Mittels einer Transfer-Pipette wurde 1 Oozyte in das hypoosmotische Medium (0,3xND96, 70 mosmol) überführt und ein Startbild aufgenommen. Die Verwendung der Steuerungssoftware „Pixera Visual Communication Suite“ gestattete die automatische Aufnahme weiterer Einzelbilder in einem definierten Intervall und Zeitrahmen. Die so erfassten Einzelbilder wurden in das Bildanalyseprogramm importiert und nach Definition von Schwellenwert und Kalibrierungsfaktor wurden die Querschnittsflächen durch ein unter Scion-Image lauffähiges und auf der Programmiersprache

2 - Material und Methoden

Turbo-Pascal (Borland) basierendes Makro (siehe Anhang) automatisch ermittelt. Die weitere Berechnung erfolgte mit der Software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). Die Umrechnung der ermittelten Flächeninhalte in ein entsprechendes Volumen erfolgte, unter der Annahme, die vermessenen Oozyten seien exakt sphärisch, durch die Formel:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \left(\frac{A}{\pi} \right)^{\frac{3}{2}} \cdot \pi \quad (\text{Gleichung 2-3})$$

Zur Berechnung des Wasserpermeabilitätskoeffizienten P_f als Maß für die Transportgeschwindigkeit von Wassermolekülen über die Membran wurde die Formel nach Zhang und Verkman (1991) angewendet:

$$P_f = \frac{V_0 \cdot \frac{d(V/V_0)}{dt}}{S_0 \cdot V_w \cdot (Osm_{in} - Osm_{out})} \quad (\text{Gleichung 2-4})$$

$$S_0 = 4r^2\pi = 4A_0 \quad (\text{Gleichung 2-5})$$

V_0	= Oozytenvolumen zum Zeitpunkt t=0 in [cm ³]
V/V_0	= relatives Oozytenvolumen
t	= Zeit in sec.
S_0	= Oozytenoberflächeninhalt zum Zeitpunkt t=0 in [cm ²]
A_0	= Oozytenquerschnittsflächeninhalt zum Zeitpunkt t=0 in [cm ²]
V_w	= molares Volumen von Wasser (= 18 cm ³ /mol)

Um einen direkten Vergleich der Einzeloozyten zu ermöglichen, wurden die ermittelten tatsächlichen Volumina umgerechnet. Das Oozytenvolumen zum Zeitpunkt t=0 wurde auf 1 relative Volumeneinheit festgelegt ($V_0/V_0 = 1$) und die Volumina zu den folgenden Zeitwerten t in Relation gesetzt ($V_t/V_0 = V_{rel.}(t)$). Die erhaltenen relativen Volumeneinheiten wurden als Funktion der Zeit graphisch dargestellt, um eine Schwellungskinetik zu erhalten.

2.4.6. Intrazelluläre pH-Messung

2.4.6.1. Das Messprinzip

Bei der intrazellulären pH-Messung bedient man sich zweier Mikroelektroden, die nacheinander in die Zelle eingestochen werden. Die eine Elektrode (Spannungselektrode) misst das Membranpotential der Zelle in Relation zum Potential der Badelektrode. Die zweite intrazelluläre Elektrode wird mit einer selektiv Protonen-permeablen Spitze versehen und registriert so das Protonenpotential relativ zum Potential der Badelektrode. Der intrazelluläre pH-Wert errechnet sich als Differenz von Protonenpotential und Membranpotential.

2.4.6.2. Der Meßaufbau

Der mechanooptische Teil der Messapparatur bestand aus einer Badkammer mit einem Volumen von ca. 100 μ l, einem Perfusionssystem, bestehend aus 60 ml Einwegspritzen mit Schraubgewinde und einer 5-fach Hahnbank (NeoLab, Heidelberg), zwei Mikromanipulatoren (Leitz, Wetzlar) und einem Stereomikroskop (SM22-140-F, Firma Hund, Wetzlar) inklusive einer Kaltlichtquelle (Schott, Zeiss, Jena). Zum Schutz vor Erschütterungen wurde der Aufbau auf einem Wägetisch aus Marmor montiert. Zusätzlich sorgte ein rundum geschlossener Faradaykäfig für eine Abschirmung gegenüber elektrischen Störungen der Umgebung. Als Abschirmung zum Experimentator wurde ein Vorhang aus Aluminiumgewebe (Alu-Fliegengitter, Maschenweite 1,5 mm, OBI) angebracht. In den Käfig wurde eine MDF-Platte (Mitteldichtefaserplatte) eingepasst und mit einem 1 mm starken Alublech verkleidet um für eine ausreichende Abschirmung nach unten zu sorgen. Hierauf wurde der Versuchsaufbau befestigt. Die leitenden Bestandteile des Aufbaus wurden an einem zentralen Punkt im Käfig geerdet.

Die verwendete Badkammer stellte sicher, dass die eingebrachte Oozyte gleichmäßig mit den jeweiligen Messlösungen umspült wurde. Die zur Perfusion verwendeten Einwegspritzen wurden auf eine Hahnbank aufgeschraubt und außen am Käfig befestigt. Mit Hilfe eines möglichst kurzen Teflonschlauchs wurden die Messlösungen in die Badkammer geleitet. Die Perfusionsrate betrug während der Messung ca. 2 ml/min.

Als Messverstärker diente ein hochohmiges Zwei-Kanal-Elektrometer der Firma WPI (FD-233 D, World Precision Instruments, Berlin). An die BNC-Ausgänge dieses Geräts wurde

zum einen ein analoger Flachbettschreiber angeschlossen, was das direkte Verfolgen und Protokollieren der Messung ermöglichte. Zum anderen wurde über eine 16-Bit A/D-Wandler-Karte (DAS-1201, Keithley Instruments Inc., Germering) ein Messrechner (Pentium I, IBM) zur Datenaufzeichnung angeschlossen. Der verwendete Messverstärker verfügte über je einen Ausgang pro Kanal und einen zusätzlichen Monitor-Ausgang auf dem direkt die Differenz der beiden Kanäle ausgegeben werden konnte. Um gleichzeitig Schreiber und Messrechner anschließen zu können wurden alle drei Ausgänge mit BNC-T-Kupplungen aufgespaltet.

Als Mess- und Referenzelektrode wurden Silber/Silberchlorid-Elektroden verwendet, die durch elektrolytische Chlorierung eines Silberdrahtes (World Precision Instruments, Berlin) in 3 M KCl hergestellt wurden. Die Elektroden wurden jeweils in eine 3 M KCl-Lösung eingetaucht. Eine Potentialänderung an der Referenzelektrode durch Messlösungen mit verschiedenen Chloridkonzentrationen wurde minimiert, indem auf die Referenzelektrode ein ebenfalls mit 3 M KCl gefüllter Schlauch gesteckt wurde. Der Schlauch wurde mit einem Agarstopfen verschlossen (2% Agar in 3 M KCl), um die Diffusion von K⁺ und Cl⁻ in die im Vergleich niedermolaren Messlösungen zu verhindern.

Die Einstichpipetten, die auf die so hergestellten Elektroden aufgebracht wurden, wurden mit Hilfe eines Laser-Ziehgerätes (Sutter Instruments Co., Model P-2000) aus Borosilikatglaskapillaren (KWIK-FIL™, World Precision Instruments Inc., USA) gezogen. Diese wurden mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und hatten einen Widerstand von 1-6 MΩ.

2.4.6.3. Herstellung der pH-Mikroelektroden

Die Einstichpipetten für die pH-Mikroelektroden wurden wie folgt hergestellt: Glas-Kapillaren (Borosilikat, KWIK-FIL™, World Precision Instruments Inc., USA) wurden mit Hilfe eines horizontalen Laserziehgerätes (Sutter Instruments Co., Model P-2000) zu Mikropipetten mit ca. 2 µm Öffnungsweite ausgezogen. Um erfolgreich den protonenpermeablen Membran-Cocktail (Protonen-Ionophor I Cocktail B, Sigma) in die Spitze einführen zu können war es nötig, der Innenwandung der Mikropipetten hydrophobe Eigenschaften zu verleihen. Hierzu wurden die ausgezogenen Kapillaren in einem Aluminium-Ständer fixiert und in einem möglichst kleinen Inkubator zwei Stunden bei 200°C im Abzug gebacken. 100 µl Dichlordimethylsilan (Sigma) wurden in den Inkubator gegeben

und die Kapillaren weitere 20 Minuten gebacken. Um überschüssiges Silan zu entfernen wurde der noch heiße Inkubator unter dem Abzug geöffnet und abgeschaltet.

Nach Auskühlen konnte der Membrancocktail in die Spitze der Mikropipetten eingeführt werden. Hierzu wurden die Kapillaren zunächst unter Zuhilfenahme fein ausgezogener Pipettenspitzen (Eppendorf Mikroloader, Eppendorf AG, Hamburg) mit Pufferlösung gefüllt (0,04 M KH_2PO_4 , 0,023M NaOH, 0,15 M NaCl, pH 7,0). Durch Anlegen eines Überdruckes mit einer Einwegspritze wurden die in der Spitze verbliebenen Luftblasen entfernt. Daraufhin wurden die komplett gefüllten Mikropipetten in einen Tropfen Membrancocktail eingeführt. Durch Anlegen eines Unterdruckes wurde eine ca. 1 mm lange Cocktail-Säule in die Spitze aufgesogen.

Die Sensitivität der so produzierten pH-Elektroden wurde durch Messen einer Reihe Puffer (100 mM KCl, 10 mM Hepes) mit verschiedenen pH-Werten überprüft. Die mittlere Sensitivität der verwendeten pH-Mikroelektroden lag bei $58,0 \pm 0,6$ mV/pH-Einheit (n=20).

2.4.6.4. Funktionsüberprüfung der pH-Mikroelektroden

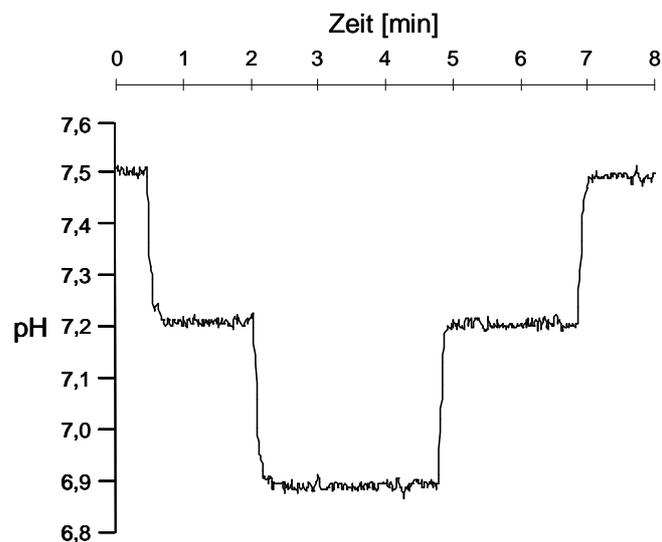


Abbildung 2-2: Funktionstest einer pH-Elektrode. Drei Testpuffer mit verschiedenen pH-Werten (7,5, 7,2, 6,8) wurden durch die Messkammer gespült und der pH-Verlauf kontinuierlich aufgezeichnet.

Abbildung 2-2 zeigt beispielhaft den Funktionstest einer der verwendeten pH-Elektroden. Hierzu wurden drei Testpuffer mit verschiedenen pH-Werten (7.5, 7.2, 6.8) in Folge durch die Messkammer gespült und der pH-Verlauf aufgezeichnet. Die pH-Werte wurden so gewählt, dass sie den Bereich der pH-Änderung abdeckten, der im Oozytensystem erwartet wurde. Funktionsprüfungen wurden unmittelbar vor und nach einzelnen Oozyten-Messungen durchgeführt.

Es zeigt sich, dass die Elektroden sehr schnell auf eine Änderung des pH-Wertes reagieren. Dies weist auch darauf hin, dass der Flüssigkeitsaustausch in der Kammer sehr schnell von statten geht. Zum anderen lässt sich aus dem Protonenpotential in mV bei bekannten pH-Werten die Sensitivität der verwendeten pH-Mikroelektrode berechnen. Der Literaturwert für die Sensitivität brauchbarer pH-Elektroden liegt bei 55-60 mV pro pH-Einheit (Deitmer und Schild, 2000; Ammann *et al.* 1981). Die im Folgenden verwendeten pH-Elektroden hatten eine Sensitivität von $58,0 \pm 0,58$ mV pro pH-Einheit.

2.4.6.5. Durchführung der CO₂-Aufnahmeexperimente

Die CO₂-Aufnahmeexperimente wurden wie bei Nakhoul *et al.* (1998) beschrieben durchgeführt. Eine Oozyte wurde in die Badkammer eingebracht und mit 1xND96 (pH 7,5) umspült. Nacheinander wurden die Spannungselektrode und die pH-Elektrode in die Oozyte eingestochen und der pH-Wert kontinuierlich verfolgt. Nach Aufzeichnen eines konstanten cytosolischen pH-Wertes wurde die Badlösung gewechselt und die Oozyte mit CO₂-angereicherter ND96-Lösung umspült. Zur Herstellung der CO₂-angereicherten ND96-Lösung wurden 10 mM NaCl durch 10 mM NaHCO₃ ersetzt und durch Begasen mit 5% CO₂ in Sauerstoff ein pH-Wert von 7,5 eingestellt.

2.5. Verfahren mit pflanzlichen Organismen

2.5.1. Verwendetes Pflanzenmaterial

2.5.1.1. Tetracyclin-induzierbare Überexpression von NtAQP1

Das für NtAQP1 codierende cDNA-Fragment wurde in den Vector pBinHyg-Tx (Gatz *et al.*, 1992) kloniert. Zur effektiven Expression des inserierten Gens enthält dieser Vektor einen

modifizierten 35S CaMV-Promoter, eine Bindestelle für einen Tetracyclin-sensitiven Repressor (TetR) und ein hptII-Gen. Kompetente Agrobakterien des Stammes LBA4404 wurden durch Hitzeschock transformiert. Blattscheiben von *Nicotiana tabacum*, Linie HÖ 20.20, wurden nach dem Protokoll von Gallois und Marinho (1995) transformiert. Vor der Durchführung der physiologischen Experimente wurden Pflanzen der T2-Generation mittels Northern-Hybridisierung auf Tetracyclin-induzierte Transkription des NtAQP1-Gens getestet.

Der pBinHyg-Tx-Vektor und die *N. tabacum* Pflanzen der Linie HÖ 20.20, die bereits das Gen für den Tetracyclinrepressor enthielten, wurde von Prof. C. Gatz zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der NtAQP1 überexprimierenden Linien wurde von Franka Siefritz im Rahmen ihrer Doktorarbeit (2002) durchgeführt.

2.5.1.2. Reduzierte Expression von NtAQP1

Eine reduzierte Expression von NtAQP1 wurde mit Hilfe der Antisense-Technik erreicht. Die NtAQP1-Antisense-Linien wurden von Franka Siefritz im Rahmen ihrer Doktorarbeit (2002) hergestellt und charakterisiert.

2.5.2. Pflanzen-Anzucht

Die Pflanzen wurden unter normalen Gewächshausbedingungen angezchtet (20-25°C, 60-70% relative Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 8h Dunkel). Zur Induktion der Überexpression von NtAQP1 wurden ungefähr 8 Wochen alte Pflanzen einmal täglich mit wässriger Tetracyclin-Lösung (10 mg/l) gegossen. Die Experimente wurden nach viertägiger Behandlung mit Tetracyclin durchgeführt. Als Kontrollen wurden Tabakpflanzen der Linie HÖ 20.20 verwendet, die ebenfalls mit Tetracyclin behandelt wurden.

2.5.3. Messung der ¹⁴CO₂-Aufnahme in Blattscheiben

Mittels Uhrmacherpinzetten (Nr.5, INOX, Dumont & Fils) wurde die abaxiale Epidermis von frisch geernteten Tabak-Blättern abgezogen. 6 Blattscheiben mit einem Durchmesser von 6 mm wurden mit einem Korkbohrer ausgestochen und sofort in ein 10 ml Reagenzglas in 0,9 ml Puffer (50 mM HEPES pH 7.6, 1mM MgCl₂, 350 mM Sorbitol, 1mM DTT, 1% BSA)

überführt. Die Blattscheiben wurden vakuumfiltriert und die Röhren in einen kühlbaren Schüttelinkubator aus Plexiglas gestellt (22°C). Die Blattscheiben wurden unter dauerndem Schütteln vorbelichtet (Halogenstrahler, 500 W). Nach 5 Minuten wurden verschiedene Konzentrationen $^{14}\text{C-KHCO}_3$ (Spezifische Aktivität $1\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) zugegeben. Nach Belichtung für weitere 3 Minuten wurden die Reaktionen durch Zugabe von 0,5 ml Eisessig abgestoppt und die Blattscheiben mit einem Glasstab und Seesand homogenisiert. 0,5 ml des Überstandes wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und getrocknet. Das Präzipitat wurde erneut mit 0,5 ml Eisessig vermischt, nochmals getrocknet und in 0,5 ml Wasser (Nanopure) aufgenommen. Nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier-Safe™, Packard Bioscience B.V., Groningen, The Netherlands) wurde die in Photosyntheseprodukte eingebaute Radioaktivität durch Szintillations-Messung bestimmt (TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer 1900 CA, Packard Instruments, Illinois, USA). Die gezeigten Ergebnisse ergeben sich aus 6 Wiederholungen für jede dargestellte CO_2 -Konzentration.

2.5.4. Bestimmung der stomatären Leitfähigkeit und Nettophotosynthese mittels Gaswechselanalyse

Zur Bestimmung der Nettophotosyntheserate und der stomatären Leitfähigkeit wurden zwei HCM-1000 Photosynthese-Systeme in Kombination mit CO_2 -Dosierheiten verwendet (Walz, Effeltrich). In diesem System wurden die Wasserdampf- und CO_2 -Konzentrationen am Ein- und Ausgang der Messküvette mit Infrarot-Gas-Analysatoren (BINOS-100/4PS, Walz, Effeltrich) bestimmt. Die verwendeten Messküvetten (1010-M, Walz) waren klimatisiert und hatten einen Messöffnungsquerschnitt von $2,5\text{ cm}^2$. Die durchschnittliche Blatttemperatur betrug $25 \pm 0,9^\circ\text{C}$. Der Gasstrom durch die Küvetten wurde auf 600 ml/min eingestellt. Mit Hilfe des Beleuchtungsaufsatzes 1050-M wurde eine konstante Beleuchtungsstärke von $250\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ PPF (*photosynthetic photon flux density*) erreicht. Die Software DA-1000 (Walz) diente der Datenaufzeichnung. Die Analyse der Daten wurde mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) durchgeführt.

2.6. Gefrierbruch-Transmissions-Elektronenmikroskopie

2.6.1. Fixierung der Oozyten

Die Gefrierbruch-Untersuchungen wurden nach einer Methode von Zampighi *et al.* (1995) durchgeführt. Nach Messung der Wasserpermeabilität wurden einzelne Oozyten zwischen zwei Objektträgern mit 0,3 mm starken Abstandsleisten eingeklemmt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur vorfixiert. Durch diese Behandlung wurden die Oozyten soweit abgeflacht, dass bei der späteren Gefrierbruch-Behandlung große Plasmamembran-Bruchflächen entstanden. Nach Beendigung der Vorfixierung wurden die Objektträger entfernt und die Oozytenscheiben für eine weitere Stunde in Fixierungslösung (3,5% Glutaraldehyd in 0,2 M Na-Cacodylat pH 7,4) inkubiert.

2.6.2. Herstellung der Gefrierbrüche

Die fixierten Oozyten wurden mit 25 % Glycerin in 0,2 M Na-Cacodylat infiltriert und in vier bis sechs Stücke zerteilt. Die Stücke wurden auf Balzer Probenhalter aufgebracht (Bal-Tec, Balzer, Liechtenstein) und durch schnelles Eintauchen in ein mit Stickstoff gekühltes Flüssigpropan-Bad eingefroren. Die gefrorenen Oozytenfragmente wurden in eine Balzer 400K Freeze-Fracture-Etch Apparatur (Bal-Tec, Balzer, Liechtenstein) eingebracht und durch Öffnen des Probenhalters bei -135°C unter Hochvakuum gebrochen. Anschließend wurden die Bruchflächen eine Minute bei -120°C geätzt. Die Bruchflächen wurden mit Platin unter einem Winkel von 80° und Kohlenstoff unter einem Winkel von 90° beschichtet. Die auf diese Weise hergestellten Replika wurden durch Inkubation in 12% Na-Hypochlorit-Lösung über Nacht gereinigt und mit kleinen Schlaufen aus Platindraht auf Goldnetze übertragen. Nach Trocknung wurden die Präparate im Elektronenmikroskop inspiziert.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der CO₂-Permeabilität von NtAQP1

3.1.1. Strukturelle Grundlagen

Der Permeationsmechanismus von Wasser durch das menschliche Aquaporin AQP1 wurde im Jahr 2000 von Murata *et al.* aufgeklärt. 2001 veröffentlichten de Groot und Grubmüller eine Echtzeitsimulation des Wasserflusses und stellten ein Modell auf, in dem sie die wichtigen, für die Selektivität essentiellen, Aminosäuren in der Porenregion identifizierten. Der Porenkanal von HsAQP1 enthält, wie in Abbildung 3-1 dargestellt ist, zwei Filterbereiche.

Die so genannte ar/R-Region bildet die engste Stelle der Pore (siehe Abb. 3-1). Dieser Bereich wird durch den positiv geladenen Aminosäure-Rest Arginin¹⁹⁵ und die aromatischen Seitenketten von Phenylalanin⁵⁶ und Histidin¹⁸⁰ gebildet. Hier werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen am stärksten geschwächt und somit der Durchtritt einzelner Wassermoleküle durch die Pore des Aquaporins ermöglicht. Durch elektrostatische Abstoßung des positiv geladenen Aminosäure-Restes Arginin¹⁹⁵ wird die Permeation von Protonen und anderen positiv geladenen Ionen ausgeschlossen (de Groot und Grubmüller, 2001).

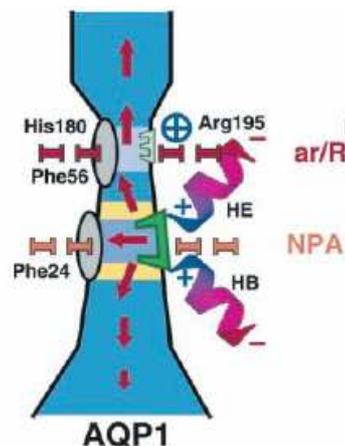


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der funktionellen Bereiche von HsAQP1 (de Groot & Grubmüller, 2001). Hervorgehoben sind die beiden Filterbereiche (ar/R & NPA). Die Positionen der für die Funktion wichtigen Aminosäurereste sind angegeben. Die roten Pfeile zeigen die Orientierung des Dipols der Wassermoleküle. Dieser wird während der Permeation durch das Aquaporin um 180°gedreht.

Der zweite Filterbereich in der Pore wird durch die beiden hochkonservierten NPA-Motive (Asparagin-Prolin-Alanin) gebildet. Hier sind die Asparaginseitenketten 75 und 192 an der Passage einzelner Wassermoleküle durch die Pore beteiligt (Murata *et al.*, 2000). de Groot

3 - Ergebnisse

und Grubmüller konnten zeigen, dass der Aminosäurerest Phenylalanin²⁴ durch seine hydrophobe Seitenkette die Interaktion zwischen den Wassermolekülen und den Asparaginresten der NPA-Motive verstärkt (de Groot und Grubmüller, 2001) und auf diese Weise den Durchtritt der Wassermoleküle erleichtert.

Abbildung 3-2 zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen von NtAQP1 und HsAQP1. Deutliche Unterschiede zwischen beiden Molekülen treten im Bereich der Termini auf. NtAQP1 besitzt, wie für einige pflanzliche Aquaporine typisch, einen langen N-terminalen Bereich (44 Aminosäurereste), während HsAQP1 über einen aus 37 Aminosäuren bestehenden C-Terminus verfügt. Die Identität der übrigen Bereiche beträgt 41 % (Ähnlichkeit: 59 %).

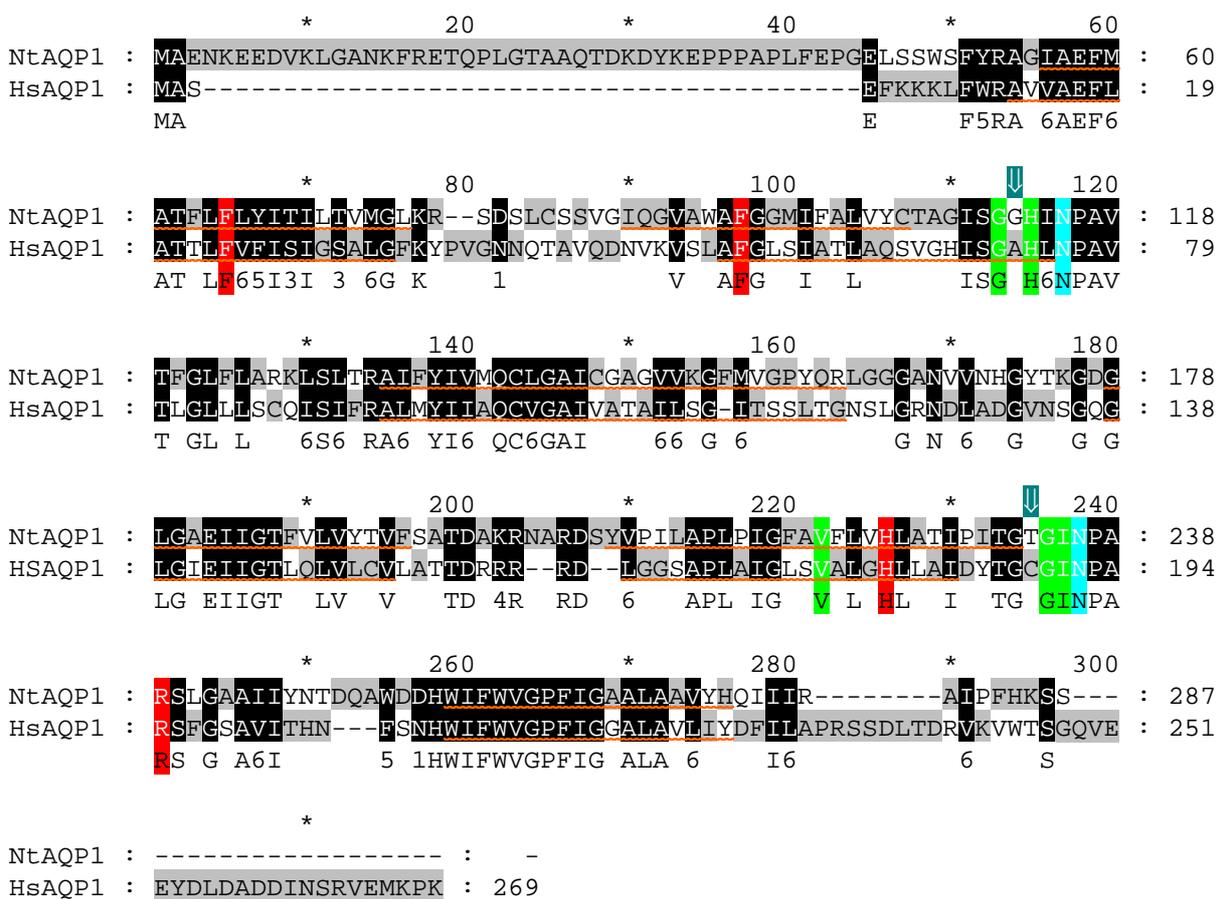


Abbildung 3-2: Vergleich der Aminosäuresequenzen von HsAQP1 und NtAQP1. Die für die Funktion wichtigen Aminosäurereste sind farbig hervorgehoben:

- xxx - funktionelle Aminosäurereste nach de Groot und Grubmüller (2001)
- xxx - weitere funktionelle Aminosäurereste nach de Groot und Grubmüller (2001)
- xxx - funktionelle Aminosäurereste nach Murata *et al.* (2000)
- ↓ - nicht übereinstimmende Aminosäurereste nach de Groot und Grubmüller (2001)
- - - - - Transmembrandomänen

Der Vergleich der Proteinsequenzen zeigt, dass die für die Funktion des menschlichen AQP1 wichtigen Aminosäurereste im Bereich der Pore (de Groot & Grubmüller, 2001; Murata *et al.*, 2000) auch bei NtAQP1 an den entsprechenden Positionen vorhanden sind. Die Pfeile kennzeichnen Aminosäurereste, die nicht mit denen an entsprechenden Positionen des HsAQP1 übereinstimmen. Diese befinden sich jedoch außerhalb der Pore.

3.1.2. Heterologes Expressionssystem: *Xenopus* Oozyten

Die CO₂-Permeabilität von NtAQP1 wurde im heterologen Oozyten-Expressionssystem untersucht. In NtAQP1 exprimierenden Oozyten wurden 50 ng Carboanhydrase (*bovine erythroid carbonic anhydrase*, Sigma) in wässriger Lösung injiziert, um die Hydrierung von CO₂ zu Kohlensäure zu beschleunigen. In die Zelle aufgenommenes CO₂ wird somit schnell in Kohlensäure überführt, welche wiederum durch autoprotolytischen Zerfall in Protonen und Hydrogencarbonationen ein Absinken des pH-Wertes bewirkt. Damit ist nicht die Konversion zur Säure geschwindigkeitsbestimmend sondern die Membran-Diffusionsgeschwindigkeit des CO₂. Das Absinken des cytosolischen pH-Wertes wurde mit Mikro-pH-Elektroden verfolgt.

3.1.2.1. Messung der CO₂-Aufnahme

Der mittlere cytosolische pH-Wert der verwendeten Oozyten betrug $7,32 \pm 0,06$ (n = 20). Im Verlauf der CO₂-Aufnahme sank der pH-Wert im Mittel auf $6,97 \pm 0,04$ (n = 20). Die Expression von NtAQP1 hatte keinen Einfluss auf diese Eckwerte.

Der Einstrom von CO₂ bewirkte, wie Abb. 3-3 zeigt, erwartungsgemäß ein Absinken des cytosolischen pH-Wertes in mit CA injizierten Kontroll-Oozyten, ebenso wie in Oozyten, die zusätzlich NtAQP1 exprimierten. Die gepunktete Linie zeigt den zeitlichen Verlauf des intrazellulären pH-Wertes einer Kontroll-Oozyte. Zunächst kann in der Oozyte, die mit ND96-Lösung (pH 7,5) umspült wird, ein konstanter pH-Wert von 7,35 gemessen werden. Zum Zeitpunkt 3 Minuten wird die Badlösung gewechselt und die Oozyte mit CO₂-äquilibrierter Pufferlösung umspült. Nach einer Latenzzeit von ca. 10 Sekunden beginnt das Absinken des zellulären pH-Wertes und zum Zeitpunkt 7,5 Minuten ist der Endwert von 6,9 erreicht. Auch in der NtAQP1 exprimierenden Oozyte herrscht zu Beginn ein pH-Wert um

3 - Ergebnisse

7,35 (durchgezogene Linie). Es fällt jedoch auf, dass die Ansäuerung im linearen Bereich schneller fortschreitet, als es im Kontrollexperiment der Fall ist.

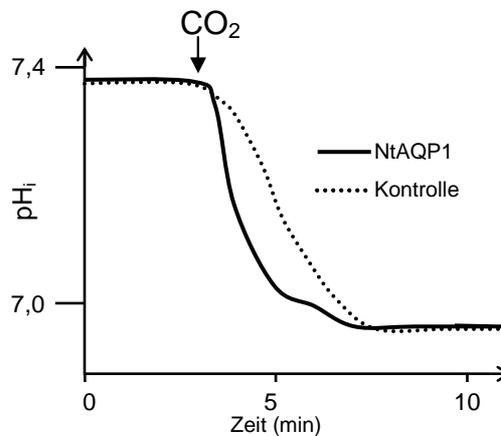


Abbildung 3-3: Repräsentativer Verlauf des cytosolischen pH-Werts einer NtAQP1-exprimierenden Oozyte (durchgezogene Linie) und einer Kontrolloozyte (gepunktete Linie) während CO₂-Aufnahme.

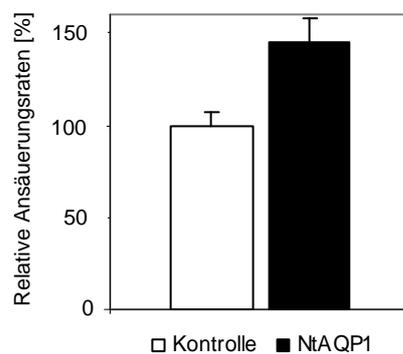


Abbildung 3-4: Mittlere Ansäuerungsrate im linearen Bereich der pH-Änderung von NtAQP1 exprimierenden und Kontrolloozyten während CO₂-Aufnahme in relativen Einheiten. Die dargestellten Ergebnisse ergeben sich aus Messungen an je 10 Oozyten.

Die Ansäuerungsrate für Kontroll-Oozyten wurden auf den Wert 100% festgelegt und die Messungen an NtAQP1 exprimierenden Oozyten dazu in Relation gesetzt. Wie Abbildung 3-4 zeigt verursacht die Expression von NtAQP1 eine Steigerung der frühen Ansäuerungsrate um 45 % (n=10).

3.1.2.2. Theoretische Berechnungen zur CO₂-Aufnahme in Oozyten

Die Menge aufgenommenen Kohlendioxids kann unter Berücksichtigung folgender Vereinfachungen näherungsweise berechnet werden:

- 1) Durch Anwesenheit der Carboanhydrase in der Oozyte wird die Umsetzung von CO₂ zur dissoziierten Form der Kohlensäure beschleunigt. Das Gleichgewicht wird auf die Seite des Hydrogencarbonats verschoben und im linearen Bereich der pH-Änderung gehen alle CO₂-Moleküle, die das Cytoplasma der Oozyte erreichen diese Reaktion ein. Folglich entspricht die Anzahl der in der Oozyte freigesetzten H⁺-, bzw. H₃O⁺-Ionen der Anzahl an CO₂-Molekülen, die die Oozytenmembran überschritten haben.
- 2) Nach einem von Zeuthen *et al.* publizierten Modell (2002) beträgt der Anteil des freien wässrigen Volumens (V_f) einer Oozyte, in dem die Carboanhydrase-katalysierte Reaktion stattfinden kann und in dem der pH-Wert gemessen wird circa 37% des gesamten Oozytenvolumens (V_t).

Folgende Größen müssen bekannt sein:

- CO₂-Konzentration in der Badlösung: $c[\text{CO}_2] = Q * P_{\text{CO}_2} = 0,39 \text{ mM}$
 - Q: Löslichkeitskoeffizient von CO₂ unter Standardbedingungen;
 $Q = 0,026 \text{ mM/hPa}$
 - P_{CO₂}: CO₂-Partialdruck; $P_{\text{CO}_2} = 15 \text{ hPa}$
- mittlerer Oozytendurchmesser: $d = 1,20 \text{ mm}$
 - ⇒ totales Oozytenvolumen: $V_t = 0,90 \text{ }\mu\text{l}$
 - ⇒ freies Oozytenvolumen: $V_f = 0,33 \text{ }\mu\text{l}$
- mittlerer cytosolischer pH-Wert der Oozyten in CO₂-freiem Badmedium: $\text{pH}_i = 7,32$
- pH-abhängige Protonenkonzentration: $c[\text{H}^+] = 10^{(-\text{pH})}$
 - ⇒ $\text{pH}_i 7,32$ entspricht einer Protonenkonzentration von $4,79 * 10^{-8} \text{ mol/l}$

*pH-Abfall einer Kontroll-Oozyte im linearen Bereich der pH-Änderung: $3,93 * 10^{-3} \text{ pH-Einheiten/sec}$*

⇒ cytosolische Protonenkonzentration zum Zeitpunkt t_0 : $4,79 * 10^{-8} \text{ mol/l}$

⇒ cytosolische Protonenkonzentration zum Zeitpunkt $t = 1 \text{ sec}$: $4,83 * 10^{-8} \text{ mol/l}$

⇒ Erhöhung der Protonenkonzentration innerhalb $\Delta t = 1 \text{ s}$: $3,75 * 10^{-10} \text{ mol/l}$

3 - Ergebnisse

Bezogen auf ein freies Oozytenvolumen V_f von 0,33 μl ergibt sich in der durchschnittlichen Kontroll-Oozyte im linearen Bereich der pH-Änderung ein Protonengewinn und entsprechend eine CO_2 -Aufnahme von **$1,24 \cdot 10^{-16} \text{ mol/sec}$**

pH-Abfall einer NtAQP1 exprimierenden Oozyte im linearen Bereich: $5,14 \cdot 10^{-3} \text{ pH-Einheiten/sec}$

⇒ cytosolische Protonenkonzentration zum Zeitpunkt t_0 : $4,79 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$

⇒ cytosolische Protonenkonzentration zum Zeitpunkt $t = 1 \text{ sec}$: $4,84 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$

⇒ Erhöhung der Protonenkonzentration innerhalb $\Delta t = 1 \text{ sec}$: $5,70 \cdot 10^{-10} \text{ mol/l}$

Bezogen auf ein freies Oozytenvolumen V_f von 0,33 μl ergibt sich in der durchschnittlichen NtAQP1-exprimierenden Oozyte im linearen Bereich der pH-Änderung ein Protonengewinn und entsprechend eine CO_2 -Aufnahme von: **$1,88 \cdot 10^{-16} \text{ mol/sec}$**

Die Expression von NtAQP1 ermöglichte somit in der Oozyte im gegebenen Fall eine zusätzliche CO_2 -Aufnahme von $6,4 \cdot 10^{-17} \text{ mol/s}$. Diese Berechnung an zwei durchschnittlichen Oozyten stellt jedoch nur eine grobe Näherung dar, da das Cytoplasma der Oozyten eine bestimmte Pufferkapazität (β) besitzt. Diese setzt sich aus der intrinsischen Pufferkapazität (β_i) und der $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -abhängigen Pufferkapazität (β_{CO_2}) zusammen. β_i kann experimentell durch Titration bestimmt werden, während β_{CO_2} eine im Verlauf des Experiments veränderliche Größe darstellt. Wenn CO_2 innerhalb und außerhalb der Zellmembran in ähnlicher Konzentration vorliegt ist β_{CO_2} direkt proportional der Bikarbonatkonzentration und kann vereinfacht als deren 2,3-facher Wert bestimmt werden. Dies ist allerdings erst der Fall, wenn sich der Gleichgewichtszustand am Ende der pH-Absenkung eingestellt hat. Somit ist eine Einschätzung der Pufferkapazität zu Beginn der CO_2 -Aufnahme sehr schwierig.

3.1.3. Vereinfachtes homologes Expressionssystem: Blattscheiben

Ergebnisse von Messungen in heterologen Systemen können nicht ohne weiteres auf homologe Systeme übertragen werden. Der Nachweis einer Beteiligung von NtAQP1 am Membrantransport von CO_2 im pflanzlichen System, *Nicotiana tabacum*, gestaltete sich zunächst schwierig, da Effekte des natürlichen NtAQP1-Protein in Betracht gezogen werden müssen. Anders als im Oozytensystem, wo die Expression intrinsischer Aquaporine gering ist, liegt in der Tabakpflanze bereits eine Expression von NtAQP1 vor. Um eine sinnvolle

3 - Ergebnisse

Versuchsstrategie zu entwickeln, musste der Expressionslevel von NtAQP1 also modifiziert werden. Dies war in zwei voneinander völlig verschiedenen Ansätzen mit transgenen Pflanzen realisiert worden: NtAQP1-Antisensepflanzen (Siefritz *et al.*, 2002) mit einer nachweislich deutlich reduzierten Expression von NtAQP1 bzw. mit Pflanzen, die einen NtAQP1-codierenden Bereich unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promoters enthielten (Gatz *et al.*, 1992). Es standen also Pflanzen zur Verfügung, die im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle eine dauerhaft reduzierte Expression oder eine induzierbare Überexpression von NtAQP1 zeigten. NtAQP1-Antisensepflanzen wurden mit dem untransformierten Wildtyp *Nicotiana tabacum* verglichen (Kontrolle 1). Als Kontrolle für die NtAQP1-überexprimierenden Pflanzen dienten Pflanzen der Linie Hö 20.20, die bereits transformiert waren und das Gen für den Tetracyclinrepressor enthielten (Kontrolle 2) und in gleicher Weise mit Tetracyclin behandelt wurden.

Die Expression von NtAQP1 wurde, wie in Abbildung 3-5 dargestellt, durch Northern-Blot-Analyse überprüft. Die Spezifität der jeweiligen Effekte wurde durch Analysen dritter (Siefritz, 2002, Dissertation) untersucht.

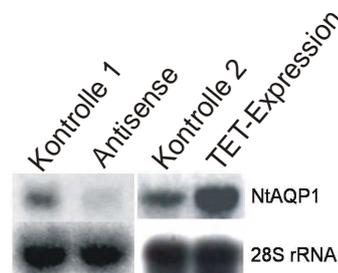


Abbildung 3-5: Überprüfung der NtAQP1-Expression in Antisense- und überexprimierenden Pflanzen mittels Northern-Hybridisierung. Aufgetragen wurde Gesamt-RNA von: Wildtyppflanzen (Kontrolle 1), NtAQP1-Antisensepflanzen, Pflanzen der Linie Hö 20.20 nach Tetracyclinbehandlung (Kontrolle 2), Pflanzen mit tetracyclininduzierter Expression von NtAQP1. Zur Kontrolle gleichmäßiger RNA-Beladung wurde mit einer 28S rRNA-Sonde hybridisiert

Die zelluläre Aufnahme von CO₂ wurde an Blattscheiben der entsprechenden Pflanzen untersucht. Gemessen wurde der Einbau von ¹⁴C-markiertem CO₂ in Photosyntheseprodukte belichteter Blattscheiben, denen die abaxiale Epidermis entfernt wurde. Durch Abziehen der abaxialen Epidermis konnte die Aufnahme von CO₂ in Mesophyllzellen untersucht werden, ohne dabei den stomatären Widerstand berücksichtigen zu müssen.

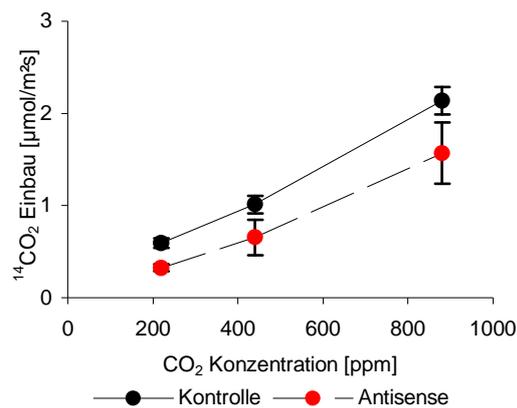


Abbildung 3-6A: Einbau von $^{14}\text{CO}_2$ in Photosyntheseprodukte in Blattscheiben von NtAQP1-Antisense- und Kontrollpflanzen unter steigenden CO_2 -Konzentrationen.

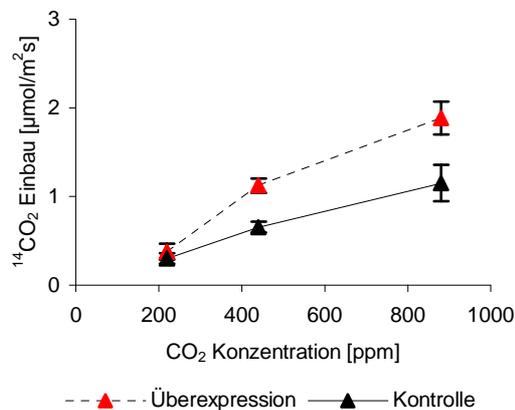


Abbildung 3-6B: Einbau von $^{14}\text{CO}_2$ in Photosyntheseprodukte in Blattscheiben von NtAQP1-überexprimierenden und Kontrollpflanzen unter steigenden CO_2 -Konzentrationen.

Die reduzierte Expression von NtAQP1 führte zu einer signifikant geringeren CO_2 -Aufnahme (Abb. 3-6A), während eine induzierte Überexpression eine stärkere Aufnahme von CO_2 im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen bewirkte (Abb. 3-6B). Es scheint somit ein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von NtAQP1 und der Fähigkeit zur Aufnahme von CO_2 zu bestehen.

3.1.4. Homologes Expressionssystem: Gaswechselanalyse an intakten Pflanzen

3.1.4.1. Auswirkung veränderter Expression von NtAQP1 auf die Stomatabewegung von *Nicotiana tabacum*

Nach der Erkenntnis, dass NtAQP1 im heterologen, sowie im vereinfachten homologen System offensichtlich zur Aufnahme von CO₂ beiträgt, sollte im Folgenden die Frage geklärt werden, ob und in welchem Maße CO₂-Permeabilitäts-Eigenschaften von NtAQP1 für die Physiologie der gesamten Pflanze relevant sind. Zwei wichtige Vorgänge in der Pflanze, die von der Verfügbarkeit von CO₂ abhängen, sind die Bewegung des Spaltöffnungsapparates und die photosynthetische Fixierung von CO₂ zum Aufbau pflanzlicher Biomasse. Beide Vorgänge wurden mit der Technik der Gaswechselanalyse an oben vorgestellten Pflanzentypen bei veränderlichem CO₂-Angebot untersucht.

Zuvor im Dunkeln gehaltene Pflanzen mit reduzierter Expression von NtAQP1 und entsprechende Kontrollpflanzen wurden bei ambienter CO₂ Konzentration von 380 ppm belichtet (250 μmol/m²s PPF). Das lichtinduzierte Öffnen der Stomata wurde anhand der stomatären Leitfähigkeit mit Bezug auf die Blattfläche gemessen. Es zeigte sich, dass sich in beiden Fällen die Stomata mit derselben Geschwindigkeit öffneten. Weiterhin fiel in beiden Fällen das für lichtinduzierte Stomataöffnung charakteristische Überschießen der Öffnungsweite auf. Im Folgenden zeigten die Kontrollpflanzen eine normale Stabilisierung der stomatären Öffnungsweite, während bei den Pflanzen mit reduzierter NtAQP1-Expression dauerhafte Oszillationen auftraten (Abbildung 3-7).

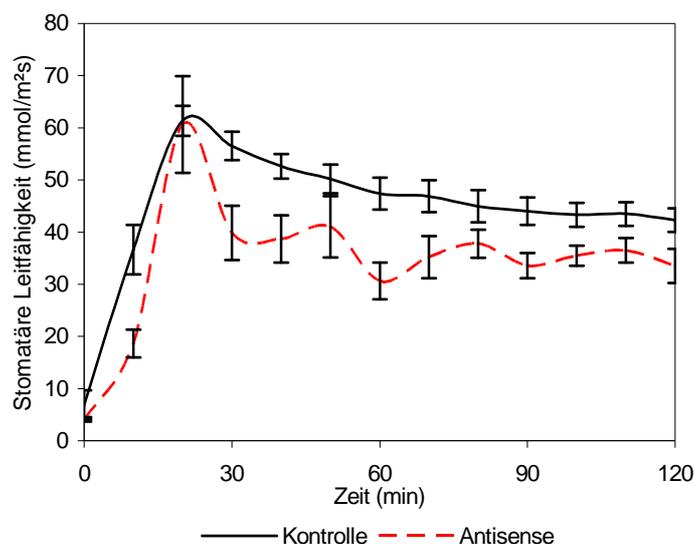


Abbildung 3-7: Stomatäre Leitfähigkeit von NtAQP1-Antisense- und Kontrollpflanzen. Zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde das Licht eingeschaltet.

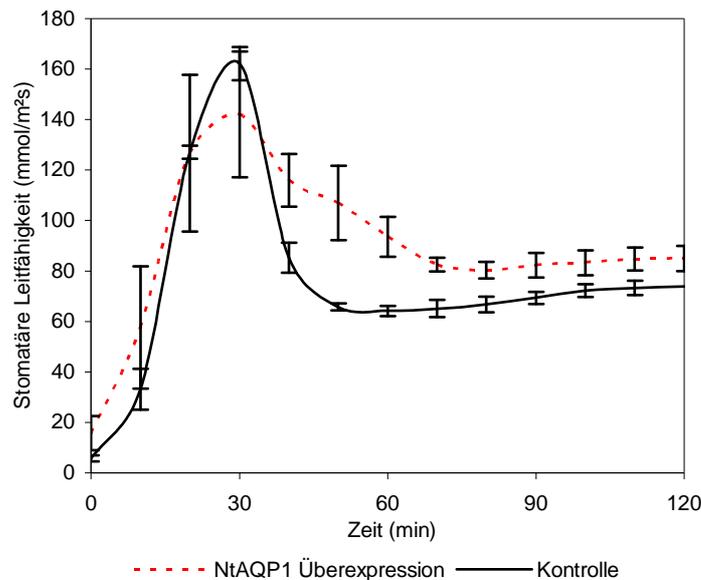


Abbildung 3-8: Stomatäre Leitfähigkeit von NtAQP1-überexprimierenden und Kontrollpflanzen. Zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde das Licht eingeschaltet.

Wurde die Expression von NtAQP1 erhöht fiel eine Verringerung der Überschussreaktion im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen auf (Abbildung 3-8). Die Oszillation der stomatären Öffnungsweite, die bei den Pflanzen mit reduzierter Expression von NtAQP1 beobachtet wurde, blieb aus.

Des Weiteren fiel eine veränderte absolute stomatäre Öffnungsweite im Gleichgewichtszustand auf, die von der Stärke der NtAQP1-Expression abhing. 90 Minuten nach Einschalten des Lichtes war die stomatäre Leitfähigkeit der Antisense-Pflanzen um 31 % gegenüber den Kontrollen reduziert (siehe auch Tabelle 3-1). Im Vergleich dazu konnte bei erhöhter Expression von NtAQP1 zum Zeitpunkt 90 Minuten eine um 16 % erhöhte stomatäre Leitfähigkeit als bei den entsprechenden Kontrollen gemessen werden (siehe auch Tabelle 3-1).

In einer 2002 durchgeführten Studie an NtAQP1-Antisense-Pflanzen konnte gezeigt werden, dass Pflanzen mit einer verringerten Expression von NtAQP1 eine reduzierte hydraulische Leitfähigkeit des Wurzelsystems aufwiesen und weniger resistent gegenüber Wasserstress waren (Siefritz *et al.*, 2002). Eine Auswirkung der reduzierten hydraulischen Leitfähigkeit der Wurzel auf die Bewegung des Spaltöffnungsapparates konnte nicht ausgeschlossen werden, da möglicher Weise in der Wurzel Wasserstress-Signale entstehen, die zu einer verringerten Stomataöffnung führen würden. Um eine Beteiligung dieses Effektes an der beobachteten veränderten Stomatabewegung auszuschließen wurden die Experimente, wie in

3 - Ergebnisse

Abbildung 3-9 dargestellt ist, an abgeschnittenen Blättern von NtAQP1-Antisense-Pflanzen und den entsprechenden Kontrollen wiederholt.

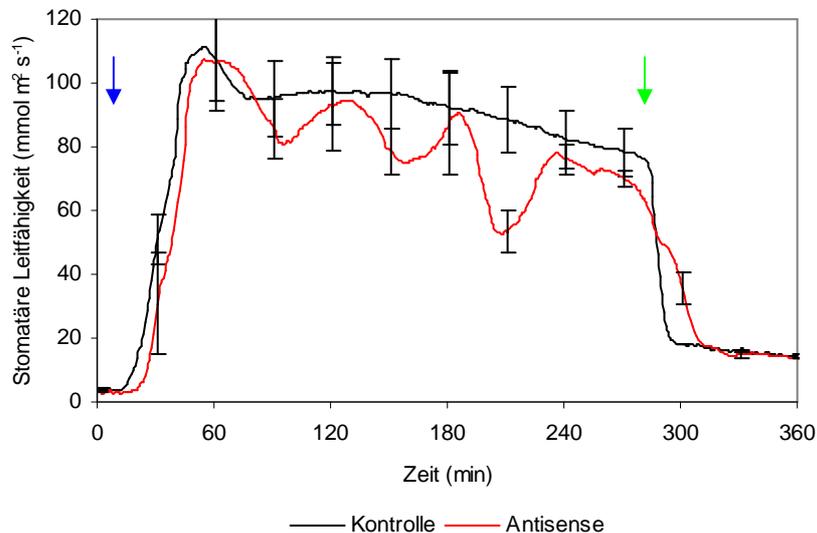


Abbildung 3-9: Stomatäre Leitfähigkeit abgeschnittener Blätter von NtAQP1-Antisense- und Kontrollpflanzen. Zum Zeitpunkt 10 Minuten (blauer Pfeil) wurde das Licht eingeschaltet. Zum Zeitpunkt 280 Minuten (grüner Pfeil) wurden 100 μ M Abscisinsäure gegeben.

Wie auch bei den Untersuchungen an intakten Pflanzen, zeigt sich hier ein gleichmäßig schnelles Öffnen der Stomata. Auch das für die lichtinduzierte Stomataöffnung charakteristische Überschießen der Öffnungsweite tritt auf. Im Folgenden zeigen die Blätter der Kontrollpflanzen eine normale Stabilisierung der stomatären Öffnungsweite, während bei den Blättern mit reduzierter NtAQP1-Expression Oszillationen auftreten. Zum Zeitpunkt 280 Minuten wurden 100 μ M Abscisinsäure gegeben. Abscisinsäure sorgt für ein Schließen des Spaltöffnungsapparates abseits des CO₂-Rückkopplungsweges. Es zeigt sich, dass sich in beiden Fällen die Stomata sofort und einheitlich schließen.

3.1.4.2. Auswirkung veränderter Expression von NtAQP1 auf die Photosynthese von *Nicotiana tabacum*

Bei der Untersuchung der Photosyntheseleistung bot sich folgendes Bild (siehe auch Tabelle 3-1): Die Nettphotosynthese war in den Pflanzen mit verringerter Expression von NtAQP1 gegenüber den entsprechenden Kontrollen reduziert (57%), während bei induzierter Überexpression von NtAQP1 eine erhöhte Nettphotosynthese (136%) gemessen wurde. Die aus den gemessenen Werten errechnete interzelluläre CO₂-Konzentration (C_i), also die Konzentration in der substomatären Kavität, war in allen Fällen ähnlich. Wurde die

3 - Ergebnisse

umgebende CO₂-Konzentration von 380 ppm auf 820 ppm erhöht, erreichten die NtAQP1-Antisense-Pflanzen eine den Kontrollen vergleichbare Photosyntheseleistung. Die Untersuchungen an den NtAQP1-überexprimierenden Pflanzen zeigten jedoch, dass hier auch unter artifiziell erhöhten CO₂-Konzentrationen die Nettophotosynthese im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war (181%).

	380 ppm CO ₂			820 ppm CO ₂		
	C _i [ppm]	Netto- Photosynthese [μmol/m ² s]	Stomatäre Leitfähigkeit nach 90 min Licht [mmol/m ² s]	C _i [ppm]	Netto- Photosynthese [μmol/m ² s]	Stomatäre Leitfähigkeit nach 90 min Licht [mmol/m ² s]
Kontrolle 1	248 ± 18	3.35 ± 0.8	44.1 ± 2.6	579 ± 91	2.43 ± 1.4	17.2 ± 1.3
Antisense	253 ± 47	1.93 ± 0.4	33.6 ± 2.4	536 ± 97	2.42 ± 0.6	14.7 ± 1.4
Kontrolle 2	251 ± 18	5.17 ± 0.7	69.4 ± 2.4	508 ± 52	4.67 ± 1.0	26.0 ± 1.2
Über- expression	248 ± 13	7.04 ± 0.7	82.3 ± 4.8	459 ± 92	8.48 ± 1.2	35.4 ± 3.2

Tabelle 3-1: Auswirkung erhöhten CO₂-Angebots auf interzelluläre CO₂-Konzentration (C_i), Nettophotosyntheserate und stomatäre Leitfähigkeit von Antisense-Pflanzen, Überexprimierern und den entsprechenden Kontrollpflanzen.

3.2. Weitere Analysen zur Funktion pflanzlicher Aquaporine

3.2.1. Quantifizierung von AQP-Proteinen in Oozytenmembranen

Plasmamembran intrinsische Aquaporine (PIP-Aquaporine) bilden die größte Gruppe der pflanzlichen Aquaporine. PIPs lassen sich in zwei Gruppen aufteilen, die nicht nur strukturell, sondern auch hinsichtlich ihrer Funktion unterschiedlich sind. PIP1-Aquaporine zeigen im Oozytenexpressionssystem in der Regel eine geringe Wasserpermeabilität und unter Umständen eine zusätzliche Permeabilität für Glycerin oder Harnstoff. Im Gegensatz dazu kann für PIP2-Aquaporine in der Regel eine hohe Wasserpermeabilität gezeigt werden. Unter den bisher charakterisierten PIP-Aquaporinen gibt es nur wenige Vertreter, die aus diesem Rahmen herausfallen.

Gründe für *in oo* gemessene Wasserpermeabilitätsunterschiede zwischen PIP1- und PIP2-Aquaporinen konnten bis heute nicht gefunden werden. Unter der Annahme, dass in die Oozyten jeweils identische Mengen cRNA injiziert wurden, ist die Wasserpermeabilität der Zellmembran entweder auf eine spezielle Eigenschaft der eingebauten Proteine zurückzuführen oder auf die Anzahl der in die Membran eingebauten Moleküle.

3 - Ergebnisse

Zur Quantifizierung der in die Membran eingebauten Aquaporinkomplexe wurde eine Gefrierbruchtechnik in Kombination mit elektronenmikroskopischen Arbeiten verwendet. Von Aquaporin-exprimierenden Oozyten und Kontroll-Oozyten wurden Gefrierbruchflächen hergestellt. Nach Anfertigung von Platin-Kohlenstoff-Abdrücken wurden diese im Elektronenmikroskop nach Plasmamembran-Bereichen durchsucht. Die hier dargestellten Studien wurden an SsAQP1-, bzw. SsAQP2-exprimierenden Oozyten durchgeführt. Die beiden Aquaporine aus *Samanea saman* wurden in einer Publikation von Moshelion *et al.* (2002) als PIP1, bzw. PIP2 Aquaporine klassifiziert.

Abbildung 3-10 zeigt einen Plasmamembran-Abdruck einer wasserinjizierten Kontroll-Oozyte (Wasserpermeabilitätskoeffizient $P_f = 17,3 \mu\text{m/s}$; siehe auch Kapitel 2.4.4.). Rechts unten im Bild ist ein Stück der Vitellinmembran zu erkennen, die *in vivo* die gesamte Oozyte umgibt und direkt auf der Plasmamembran aufliegt. Der Plasmamembran-Bereich enthält einige große Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm. Der Durchmesser eines Aquaporin-Tetramers beträgt ungefähr 10 nm. Partikel dieser Größe sind ebenfalls zu erkennen. Es konnte eine Partikeldichte von 159 ± 78 Partikel/ μm^2 ; $n = 5$) ermittelt werden.



Abbildung 3-10: Repräsentativer Ausschnitt aus einem Plasmamembranbereich eines Gefrierbruchs einer Kontrolloozyte. (—) 200 nm

Im Vergleich hierzu finden sich auf dem Plasmamembran-Abdruck (Abb. 3-11) einer SsAQP1 exprimierenden Oozyte ($P_f = 34,8 \mu\text{m/s}$) ebenfalls Partikel mit einem Durchmesser

3 - Ergebnisse

von ca. 50 nm mit ähnlicher Verteilung. Partikel mit einem Durchmesser um 10 nm finden sich jedoch in einer viel höheren Anzahl (1791 ± 239 Partikel/ μm^2 ; $n = 5$).

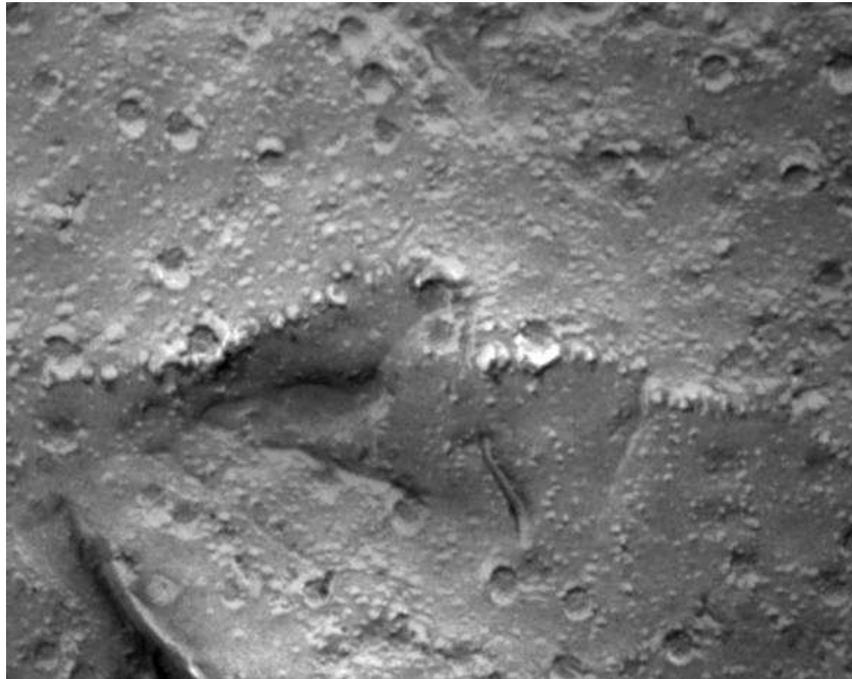


Abbildung 3-11: Repräsentativer Ausschnitt aus einem Plasmamembranbereich eines Gefrierbruchs einer SsAQP1 exprimierenden Oozyte. (—) 200 nm

Abbildung 3-12 zeigt den Abdruck einer SsAQP2 ($P_f = 229,2 \mu\text{m/s}$) exprimierenden Oozyte. Es finden sich wiederum Partikel mit einer Größe von 50 nm und 10 nm (2576 ± 306 Partikel/ μm^2 ; $n = 5$).

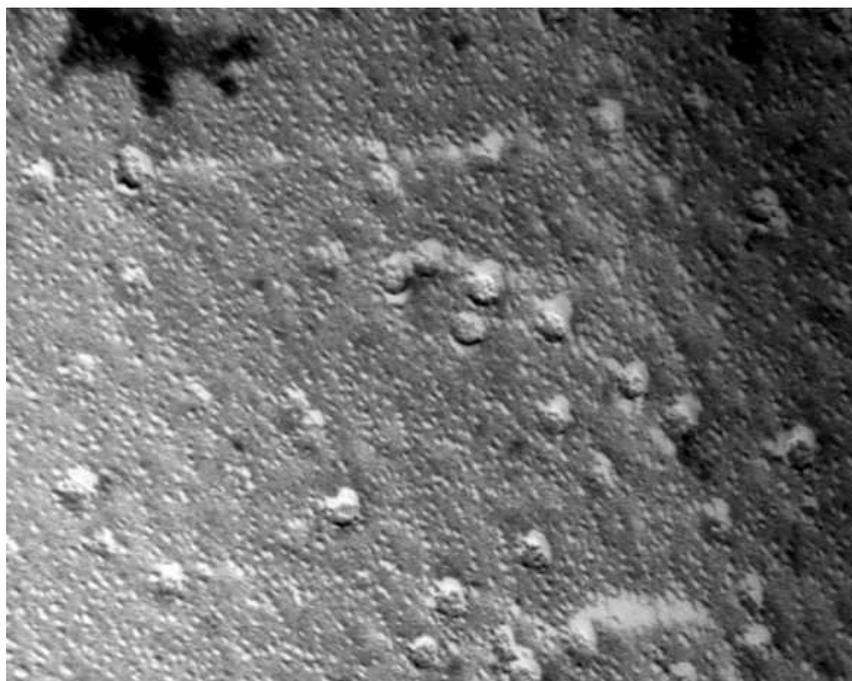


Abbildung 3-12: Repräsentativer Ausschnitt aus einem Plasmamembranbereich eines Gefrierbruchs einer SsAQP2 exprimierenden Oozyte. (—) 200 nm

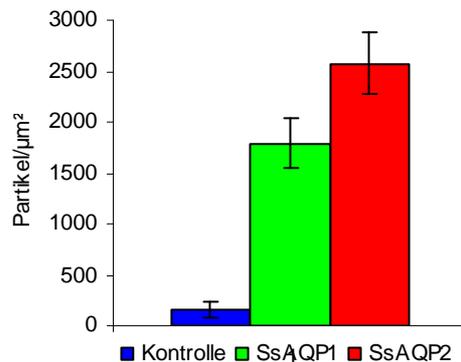


Abbildung 3-13: Mittlere Partikeldichte in Bruchflächen von Plasmamembranen SsAQP1-, bzw. SsAQP2-exprimierender Oozyten, sowie wasserinjizierter Kontrollloozyten.

Es konnte also gezeigt werden, dass cRNA injizierte Oozyten eine wesentlich höhere Anzahl von Partikeln in der Plasmamembran enthalten, als Kontrollloozyten. Die Expression von SsAQP1 erhöhte im dargestellten Fall die Partikeldichte in der Oozytenmembran um den Faktor 11,3, während sich bei Expression von SsAQP2 eine Erhöhung um den Faktor von 16,2 ergab. Eine Erhöhung der durchschnittlichen Wasserpermeabilität in Oozyten mit SsAQP2 im Vergleich zu solchen mit SsAQP1 um den Faktor 8 kann also nicht ausschließlich durch die Anzahl an Aquaporin-Proteinen in der Membran erklärt werden.

3.2.2. Auswirkungen von Ammonium-, bzw. Nitrat-Versorgung auf die Expression pflanzlicher Aquaporine in *Phaseolus vulgaris*

Phaseolus vulgaris Pflanzen wurden unter so genannten *split root* Bedingungen angezogen. Dazu wurde von gleichaltrigen Pflanzen, die auf Flüssigmedium (2 mM CaSO₄) angezogen wurden, die Hauptwurzel gekappt und das verbleibende Wurzelsystem in zwei Hälften geteilt. Die beiden Hälften wurden in so genannten *split root* Gefäßen mit Nährlösung behandelt, die entweder Nitrat (10 mM) oder Ammonium (10 mM) als Stickstoff-Komponente enthielt. In der Kieler Arbeitsgruppe von Prof. Sattelmacher konnte gezeigt werden, dass die Wasseraufnahme über die Ammonium-behandelte Wurzelhälfte signifikant geringer war, als über die Nitrat-behandelte Wurzelhälfte (Guo *et al.*, Manuskript in Bearbeitung).

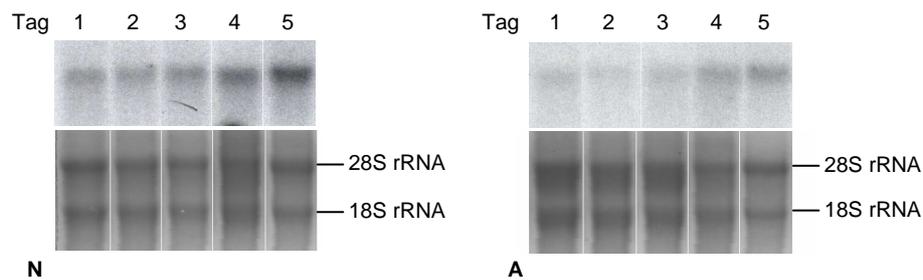


Abbildung 3-14: Northern-Blot-Analyse der Expression von PIP1-Aquaporinen in Wurzeln von *Phaseolus vulgaris* nach Nitrat-(N) bzw. Ammoniumbehandlung (A). Oben: Autoradiographie; Unten: Ausschnitt aus Ethidiumbromid gefärbtem RNA-Gel zur Kontrolle der aufgetragenen RNA-Menge.

Um zu untersuchen, ob sich die gezeigte reduzierte Wasseraufnahme auf eine reduzierte Aquaporinexpression im Ammonium-behandelten Wurzelbereich zurückführen ließe, wurden Northern-Hybridisierungen durchgeführt. Die Aquaporin-Expression wurde bis zum fünften Tag nach Beginn der Behandlung verfolgt. Abbildung 3-14 zeigt, dass bereits einen Tag nach Beginn der Behandlung eine höhere Aquaporinexpression unter Nitratversorgung zu erkennen ist.

4. Diskussion

4.1. Zur Analyse der CO₂-Permeabilitätseigenschaften von NtAQP1

Die Möglichkeit der Permeation von CO₂ durch Aquaporine wird am Beispiel des menschlichen AQP1 bereits seit langem diskutiert. Hier wurde erstmals der Beweis geführt, dass CO₂ neben der einfachen Diffusion durch den Lipidbilayer auch auf einem Aquaporin-vermittelten Weg biologische Membranen passieren kann (Nakhoul *et al.*, 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte für das bereits grundlegend charakterisierte pflanzliche Aquaporin NtAQP1 (Biela *et al.*, 1999; Siefritz *et al.*, 2001; Siefritz *et al.*, 2002) eine zusätzliche Permeabilität für CO₂ gezeigt und eine physiologische Bedeutung *in planta* nachgewiesen werden.

4.1.1. Strukturelle Grundlagen

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von HsAQP1 und NtAQP1 hat gezeigt, dass beide Aquaporine Sequenzübereinstimmungen besitzen und dass außerdem die für den Funktionsmechanismus des menschlichen AQP1 wichtigen Aminosäuren im NtAQP1-Molekül an homologen Positionen vorhanden sind. Die Frage, ob deshalb die Porenregionen von HsAQP1 und NtAQP1 im funktionell in der Membran inserierten Molekül gleich aufgebaut sind, kann durch bloßen Sequenzvergleich nicht abschließend geklärt werden. Sequenzhomologien führen allerdings zur Vermutung, dass NtAQP1 ähnliche Permeabilitätseigenschaften aufweist und als Membranpore für CO₂ dienen könnte. Sie erklären aber nicht wie der Mechanismus der CO₂-Permeation durch das Aquaporin, der für HsAQP1 auch noch nicht untersucht wurde, aussehen könnte. Eine Antwort können Strukturuntersuchungen an 2-D-Kristallen von gereinigtem NtAQP1-Protein liefern. Für HsAQP1 wurden solche Kristallstrukturanalysen bereits durchgeführt. Es ist zu erwarten, dass ein Filterbereich von NtAQP1 zumindest geringfügig anders aufgebaut ist als bei HsAQP1, zumal NtAQP1 noch eine zusätzliche Permeabilität für Glycerin aufweist (Biela *et al.*, 1999). Eine Glycerinpermeabilität konnte für HsAQP1 nicht gezeigt werden.

4.1.2. CO₂-Aufnahme im heterologen Expressionssystem

Im heterologen System konnte gezeigt werden, dass die Expression von NtAQP1 in Oozyten die zelluläre Aufnahme von CO₂ erleichtert. Eine wichtige Voraussetzung ist die Injektion von Carboanhydrase, da die Oozyte natürlicherweise keine Carboanhydraseaktivität besitzt (Nakhoul *et al.*, 1996). Die Carboanhydrase katalysiert die Umsetzung von Kohlendioxid zu Hydrogencarbonat- und H⁺-, bzw. H₃O⁺-Ionen, wodurch die gemessene intrazelluläre pH-Änderung proportional zur Aufnahmerate von CO₂ ist. NtAQP1 besitzt nach den Ergebnissen aus Kapitel 3.2. im heterologen *Xenopus*-Oozyten Expressionssystem neben seiner Permeabilität für Wasser und Glycerin (Biela *et al.*, 1999) eine zusätzliche Permeabilität für CO₂.

Die in NtAQP1 exprimierenden Oozyten gemessene Erhöhung der CO₂-Aufnahmerate um 45% gegenüber den entsprechenden Kontroll-Oozyten ist vergleichbar mit der in der Literatur dargestellten CO₂-Aufnahme durch das menschliche Aquaporin AQP1 (Nakhoul *et al.*, 1998). Diese im heterologen System gezeigte Funktionseigenschaft von NtAQP1 kann jedoch nicht direkt auf die Pflanze übertragen werden und muss deshalb auf ihre Gültigkeit im homologen System überprüft werden.

4.1.3. CO₂-Aufnahme im homologen Expressionssystem

4.1.3.1. CO₂-Aufnahme in Blattscheiben von *Nicotiana tabacum*

In den verwendeten Tabak-Linien konnte bei steigenden ¹⁴CO₂-Konzentrationen eine unterschiedliche Aufnahme und Fixierung radioaktiv markierten Kohlendioxids in Abhängigkeit von der NtAQP1-Expression gemessen werden. Dabei fielen Unterschiede in der CO₂-Aufnahme der Kontrollen auf (siehe Abbildung 3-6). Diese Unterschiede ergeben sich aus unterschiedlichen Photosyntheseleistungen der verwendeten Tabak-Linien: zur Herstellung der Antisense-Linien wurde die Varietät Samsun (K.W. Mundry, Stuttgart, Deutschland) verwendet und bei der Herstellung der NtAQP1-Überexprimierer kam die Linie Hö20.20 (Gatz *et al.*, 1992) zum Einsatz, die bereits die für den Tetracyclin-Repressor codierende Sequenz unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters (CaMV 35S) enthielt.

Die dargestellten ¹⁴CO₂-Aufnahmeexperimente legen den Schluss nahe, dass NtAQP1 auch im vereinfachten homologen System als CO₂-Pore fungiert. Dass die beobachteten

Unterschiede in der zellulären Akkumulation an Radioaktivität auf eine Aufnahme von Hydrogencarbonat zurückgehen, kann anhand der durchgeführten Aufnahme-Experimente mit Blattscheiben allerdings nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Zur Klärung kann ein Kontrollversuch beitragen, bei dem zum Inkubationsmedium der Blattscheiben Carboanhydrase zugegeben wird. In wässriger Lösung stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Kohlendioxid und der dissoziierten Form der Kohlensäure $H^+ + HCO_3^-$ ein. Durch Zugabe von Carboanhydrase zum Außenmedium wird das Gleichgewicht auf die Seite des Hydrogencarbonats verschoben und somit physikalisch gelöstes CO_2 weitgehend aus der Lösung entfernt. Unter diesen Bedingungen wird ohne Berücksichtigung einer CO_2 -Permeabilität die zelluläre Aufnahme von radioaktiv markiertem Hydrogencarbonat gemessen.

4.1.3.2. NtAQP1 und die Schließzell-Bewegung

Die Annahme, dass die CO_2 -Permeabilitäts-Eigenschaft und nicht die Wasserpermeabilität von NtAQP1 eine Rolle bei der Stomatabewegung spielen würde, bestätigte sich. Wie gezeigt werden konnte, geschieht das lichtinduzierte Öffnen der Stomata bei den Pflanzen mit reduzierter Expression sowie bei den entsprechenden Kontrollpflanzen mit der gleichen Geschwindigkeit. Demzufolge wirkt sich die reduzierte Expression von NtAQP1 nicht auf die bei Schließzellbewegung stattfindenden transmembranen Wasserflüsse aus.

Die Öffnungskinetiken der Stomata beider Pflanzenlinien zeigten das charakteristische Überschießen der Öffnungsweite. In der Literatur wurde dies von Raschke (1975) als verzögerte negative Regulation erklärt. Das positive Signal Licht bewirkt normalerweise das Öffnen des Spaltöffnungsapparates, während erhöhtes CO_2 -Angebot als negatives Signal Stomataschluss auslöst. Die Stomata sind in der Lage auf das Licht-Signal schneller zu reagieren, als auf das CO_2 -Signal und so stellt die anfängliche extreme Öffnung der Stomata nach Lichtgabe ein normales Verhalten dar.

Die nachfolgende Oszillation der stomatären Öffnungsweite deutet auf ein Missverhältnis in der Verrechnung des positiven und des negativen Signals hin. Ganz offensichtlich ist bei Tabakpflanzen mit reduzierter Expression von NtAQP1 im Mechanismus für die Regulation der Stomatabewegung zumindest ein Teil der negativen Rückkopplungsschleife dauerhaft gestört. Wie die entsprechenden Untersuchungen an Pflanzen mit induzierter Überexpression von NtAQP1 zeigen, konnte das lichtinduzierte Überschießen der Öffnungsbewegung der

Stomata deutlich geglättet werden. Die Expression von NtAQP1 scheint demnach eine wichtige Komponente in der Erkennung des CO₂-Signals zu sein.

Die Schließzellen selbst oder Zellen in direkter Umgebung scheinen ein CO₂-Konzentrations-Signal wahrnehmen zu können, auf das sie mit einer entsprechenden Änderung der stomatären Öffnungsweite reagieren. Einen Ansatz, den Mechanismus des Stomataschlusses bei steigendem CO₂-Angebot zu erklären, liefert die Malat-Hypothese von Hedrich und Marten (1993). In C₄-Pflanzen steigt der Malatgehalt der Mesophyllzellen durch die Aktivität der PEP-Carboxylase direkt proportional mit der Verfügbarkeit von CO₂. Aus Mesophyllzellen wird Malat freigesetzt und wirkt auf sensitive Anionen-Effluxkanäle der Schließzellen (z.B.: *gca1*; guard cell anion channel 1), was zur Freisetzung von Ionen führt. Durch den daraus resultierenden Ausstrom von Wasser sinkt der Turgor in den Schließzellen und die Spaltöffnung schließt sich. Malat tritt auch in C₃-Pflanzen durch die Aktivität der PEP-Carboxylase in Schließzellen auf. Das NtAQP1-Protein wurde durch *in situ*-Immunlokalisation besonders deutlich in Mesophyllzellen, die die substomatäre Cavität bilden und darüber hinaus in Schließzellen, nachgewiesen (Otto und Kaldenhoff, 2000).

Siefritz *et al.* (2002) konnten nachweisen, dass die hydraulische Leitfähigkeit der Wurzeln von Tabakpflanzen mit reduzierter Expression von NtAQP1 deutlich geringer ist, als bei entsprechenden Kontrollpflanzen. Als Folge daraus zeigte sich, dass die Pflanzen weniger resistent gegen Trockenstress sind. Die Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, konnten belegen, dass sich die veränderte Leitfähigkeit des Wurzelsystems, die durch die reduzierte Expression von NtAQP1 hervorgerufen wurde, nicht über eine mögliche Wasserunterversorgung auf die Stomatabewegung auswirkt. Den ersten Hinweis lieferte die lichtinduzierte Stomataöffnung bei intakten Antisense- und Wildtyp-Pflanzen, da beide Typen von Pflanzen dieselbe Stomataöffnungskinetik zeigen. Allerdings treten bei Pflanzen mit reduzierter Expression von NtAQP1 im Folgenden Oszillationen der stomatären Öffnungsweite auf, die die Kontrollpflanzen nicht zeigen. Zur Kontrolle wurden Versuche an abgeschnittenen Blättern von Antisense- und Kontrollpflanzen durchgeführt. Da auch hier die angesprochenen Oszillationen auftreten sind die Ursachen hierfür nicht auf die reduzierte hydraulische Leitfähigkeit des Wurzelsystems zurückzuführen.

Das Öffnen und Schließen des Spaltöffnungsapparates erfordert letztendlich immer Wasserflüsse über die Plasmamembranen der Schließzellen. Je schneller sich die

Stomatabewegung vollzieht, umso schneller müssen auch diese Wasserflüsse sein. Wie bereits angesprochen, findet sich in *Nicotiana tabacum* eine hohe Expression von NtAQP1 unter anderem in Mesophyll- und in Schließzellen (Otto und Kaldenhoff, 2000). Es ist zu erwarten, dass durch den Antisense-Effekt auch hier die Expression von NtAQP1 reduziert ist. Somit könnten Oszillationen der stomatären Öffnungsweite prinzipiell auch auf eine verringerte Wasserpermeabilität der Plasmamembranen der Stomata zurückgehen. Allerdings haben die durchgeführten Experimente gezeigt, dass die Öffnungskinetiken des Spaltöffnungsapparates nach Lichtinduktion in Antisense- und Kontrollpflanzen, bzw. abgeschnittenen Blättern nicht signifikant unterschiedlich sind. Es konnte auch gezeigt werden, dass bei Zugabe von Abscisinsäure die Stomata in abgeschnittenen Blättern sofort und gleichmäßig schließen. Die zelluläre Wasserpermeabilität scheint demnach in den Schließzellen der Antisense-Pflanzen nicht beeinträchtigt zu sein.

4.1.3.3. NtAQP1 und die Photosynthese

Betrachtet man die gemessenen Nettphotosynthese-Werte, so fällt auf, dass sie, verglichen mit Werten, die für andere Pflanzenarten gemessen und publiziert wurden, relativ niedrig ausgefallen sind. Um die Grenzen des „Transports“ von CO₂ über die Plasmamembran der Mesophyllzellen untersuchen zu können musste das experimentelle Vorgehen so konzipiert werden, dass nicht eine geringe Öffnungsweite der Stomata oder eine hohe Photosyntheserate limitierend wirkten. So wurde eine Beleuchtungsstärke gewählt, die eine gut messbare Stomataöffnung und eine moderate Photosynthese gewährleistete.

Bei der Untersuchung der Photosyntheseleistung fällt auf, dass die Nettphotosynthese bei gleicher interzellulärer CO₂-Konzentration in den Pflanzen mit reduzierter Expression von NtAQP1 geringer war als in den entsprechenden Kontrollen. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass die verringerte Verfügbarkeit von Kohlendioxid in den Mesophyllzellen der NtAQP1-Antisense-Pflanzen der begrenzende Faktor der Photosynthese ist. Die Beobachtung der Photosyntheseleistung bei erhöhter Expression von NtAQP1 zeigt, dass eine Verringerung des Diffusionswiderstandes der Zellmembranen und somit eine erhöhte Verfügbarkeit von CO₂ in den Mesophyllzellen eine höhere Nettphotosynthese ermöglicht.

Verstärkt man den Gradienten zwischen Atmosphäre und Zellumen durch exogene Zugabe von CO₂, erreichen die Antisense-Pflanzen dieselbe Photosyntheseleistung wie die Kontrollen. Unter diesen Bedingungen ist eine Veränderung des Diffusionswiderstands für CO₂ offensichtlich nicht von Bedeutung. Nicht so jedoch im Fall der Überexpression von NtAQP1. Die Nettphotosynthese ist hier im Vergleich zu den Kontrollen auch unter hoher CO₂-Konzentration deutlich erhöht. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch die Verringerung des Diffusionswiderstandes die Verfügbarkeit von CO₂ in der Zelle erhöht und somit eine Förderung der Photosynthese erreicht wird.

4.1.4. Ansätze zur Weiterführung des Projektes

4.1.4.1. *Chlamydomonas reinhardtii* als mögliche Alternative zum Oozytensystem

Xenopus Oozyten stellen ein sehr leistungsfähiges System für die heterologe Expression und Analyse vieler Arten von Membranproteinen dar. Die Tauglichkeit des Systems stößt jedoch an seine Grenzen, wenn es gilt aus den erarbeiteten Ergebnissen Aussagen über die Funktion im homologen System abzuleiten. Mit Hilfe der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas* könnte ein geschicktes System entwickelt werden, die CO₂-Permeabilität pflanzlicher Aquaporine zu untersuchen.

Algen und Cyanobakterien haben ein System entwickelt, das es ihnen erlaubt bei atmosphärischer CO₂-Versorgung CO₂, bzw. HCO₃⁻ in den Zellen anzureichern. Zieht man diese Zellen in einer CO₂ angereicherten Umgebung an (5 % CO₂) kommt es nicht zur Expression dieses CO₂-Pumpensystems. Überführt man nun Zellen, die unter hohen CO₂-Konzentrationen angezogen wurden in ein Medium mit niedrigem CO₂-Gehalt, treten zunächst Symptome auf, die auf Photorespiration hinweisen. Setzt man die Zellen weiterhin geringen CO₂-Konzentrationen aus, wird nach kurzer Zeit die Expression des benötigten Pumpensystems induziert (Amoroso *et al.*, 1998).

Die *Chlamydomonas*-Mutante *cia5* ist zellwandlos und kann kein funktionelles CO₂-Pumpensystem ausbilden (Xiang *et al.*, 2001). Das Fehlen der Zellwand ermöglicht die relativ einfache Transformation der Zellen mittels Elektroporation (Shimogawara *et al.*, 1998) oder Polyethylenglycol-Behandlung (Kindle, 1990). Man könnte *Chlamydomonas cia5*-Zellen als

Expressionssystem für pflanzliche Aquaporine, d.h. im konkreten Fall für NtAQP1 nutzen. Zellen mit funktioneller Expression von NtAQP1, die bei hoher CO₂-Konzentration angezogen wurden, sollten unter niedrigen CO₂-Konzentrationen zumindest eine geringere Photorespiration zeigen als die entsprechenden Kontrollen. Möglicherweise kann durch die NtAQP1 vermittelte Verringerung des Membrandiffusionswiderstandes die Verfügbarkeit von CO₂ soweit erhöht werden, dass die Photorespiration gänzlich maskiert wird. Mit Untersuchungen in einem Expressionssystem in *Chlamydomonas* wäre man dem einzelligen, homologen System einen Schritt näher.

4.1.4.2. Analyse der Photosyntheseleistung durch Messung der Chlorophyllfluoreszenz

Ein weiterer Ansatz, die Veränderung des CO₂-Diffusionswiderstandes bei veränderter Expression von NtAQP1 und deren Auswirkung auf die pflanzliche Physiologie zu untersuchen, ist die Betrachtung der Energieumsetzung des Photosyntheseapparates über die Fluoreszenz des Chlorophylls. Mit dieser Methode ist über die Beobachtung der Lichtreaktion die Beurteilung der Photosyntheseaktivität bis annähernd auf Ebene einzelner Zellen möglich. So lassen sich auch Blattbereiche mit unterschiedlicher photosynthetischer Aktivität deutlich voneinander unterscheiden. Mit Hilfe der Gaswechselanalyse, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, wird die Photosyntheseleistung auf anderem Weg, nämlich über die Betrachtung der Kohlenstoffreaktion beurteilt. Allerdings ist die Auflösung des Systems deutlich geringer, da die Messdaten je nach Design der Messapparatur ein Integral über einen größeren Blattbereich darstellen.

Das Chlorophyllmolekül besitzt zwei mögliche Anregungszustände (siehe Abbildung 4-1 A). Der höhere Anregungszustand kann durch Absorption von Blaulicht aufgrund dessen hohen Energiegehalts infolge geringer Wellenlänge (Abb. 4-1 B) erreicht werden, ist jedoch sehr instabil. Ein Teil der aufgenommenen Energie wird in Form von Wärme wieder abgegeben und das Chlorophyll-Molekül erreicht den niedrigeren Anregungszustand. Dieser Anregungszustand kann auch vom Grundzustand durch Absorption energieärmeren roten Lichts, mit entsprechend größerer Wellenlänge als Blaulicht (Abb. 4-1 B), erreicht werden. Der im niedrigen Anregungszustand gespeicherte Energiebetrag kann zur Verrichtung photochemischer Arbeit verwendet werden oder, wenn dieser Weg versperrt ist, in Form von

4 - Diskussion

Fluoreszenz wieder abgegeben werden. Wird aufgenommene Energie wieder als Fluoreszenz abgegeben, wird entsprechend weniger Energie in photochemische Arbeit investiert. In der Arbeitsgruppe von Prof. Lüttge wurde ein Kamerasystem entwickelt, mit dem die Chlorophyllfluoreszenz mit räumlicher und zeitlicher Auflösung am ganzen Blatt bestimmt werden kann.

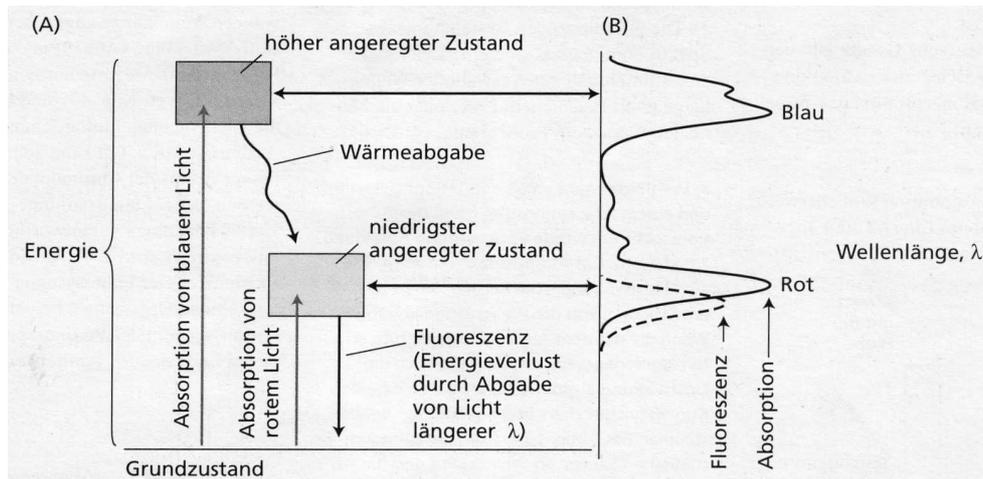


Abbildung 4-1: Lichtabsorption und -emission von Chlorophyll a. (A) Energiezustandsdiagramm (B) Absorptions- und Fluoreszenzspektrum (aus: Taiz und Zeiger, Physiologie der Pflanzen, 2000)

Bestreicht man Tabakblätter teilweise mit Vaseline, kann man die CO_2 -Versorgung des Mesophylls über Spaltöffnungen lokal weitgehend unterbinden. Führt man an so behandelten Blättern Chlorophyllfluoreszenz-Messungen durch, dann sollte in beschichteten Blattbereichen eine deutlich erhöhte Fluoreszenz, d.h. eine niedrigere Photosynthese beobachtet werden, als in unbeschichteten Blattbereichen. Versorgt man die Blätter mit Kohlendioxid wird das Kohlendioxid unbeschichtete Spaltöffnungen passieren, sich durch laterale Diffusion in den Interzellularräumen des Mesophylls ausbreiten und eine messbar höhere Photosynthese ermöglichen. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Photosyntheseaktivität ist somit ein Maß für die Ausbreitungsgeschwindigkeit von CO_2 .

Die Geschwindigkeit, mit der sich das CO_2 im Blatt ausbreitet hängt von (mindestens) zwei Faktoren ab: von dem Diffusionswiderstand in den Interzellularräumen des Mesophylls und von dem Membrandiffusionswiderstand an den Plasmamembranen der Mesophyllzellen. Da die Blattmorphologie der verwendeten transgenen Pflanzenlinien und der entsprechenden Kontrollen keine Unterschiede zeigt ist anzunehmen, dass der Diffusionswiderstand der Interzellularen in allen zu untersuchenden Pflanzen-Linien gleich ist. Da aber der CO_2 -Diffusionswiderstand der Plasmamembranen der Mesophyllzellen von dem Einbau von CO_2 -

Poren abhängt, ist unter Berücksichtigung der dargestellten Ergebnisse zu erwarten, dass die Geschwindigkeit der Ausbreitung der Photosynthese in mit Vaseline beschichteten Blattbereichen mit der Stärke der NtAQP1-Expression steigt. Diese Untersuchungen sollen im Rahmen eine Kooperation mit Prof. Lüttge durchgeführt werden.

4.2. Weitere Untersuchungen zur Funktion pflanzlicher Aquaporine

4.2.1. Permeabilitätsunterschiede zwischen PIP1- und PIP2-Aquaporinen am Beispiel von SsAQP1 und SsAQP2

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bereits in mehreren Ansätzen versucht, die molekulare Grundlage der in Oozyten auftretenden Permeabilitätsunterschiede zwischen PIP1- und PIP2-Aquaporinen zu klären. Die Expression von GFP-Aquaporin-Fusionen (Alexander Biela, 2000, Dissertation) und immun-biochemischer Nachweis epitopmarkierter Aquaporine im Western-Blot-Verfahren (Norbert Uehlein, 2000, Diplomarbeit) oder an Oozytenschnitten (Patrick Schmitt, 2002, Zulassungsarbeit) lieferte kein eindeutiges Ergebnis. Deshalb wurde die Methode der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie angewandt, mit deren Hilfe in der Membran inserierte Proteinkomplexe indirekt betrachtet werden konnten. Die Partikeldichte der Oozytenmembranen von Aquaporin-exprimierenden und von Kontrolloozyten wurde wie in Kapitel 3.5. beschrieben untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Dichte der entsprechenden Partikel mit einer Expression eines Aquaporins stark zunahm.

Im elektronenmikroskopischen Bild können Membranproteine zwar als Partikel erkannt, aber nicht eindeutig identifiziert werden. Es kann also nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass alle gezählten Partikel heterolog exprimierte Aquaporinmoleküle sind, zumal Oozyten auch intrinsische Membranproteine wie zum Beispiel Aquaporine und Ionenkanäle besitzen. Außerdem kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die Expression einer injizierten cRNA oder das Injektionsereignis an sich, die Synthese oozyteneigener Membranproteine auslöst.

Wie die Abbildungen 3-11 bis 3-12 zeigen wurden zwei Größenklassen von Partikeln entdeckt. Die untersuchten Oozyten enthalten Partikel mit einer Größe von ca. 50 nm und solche mit einem Durchmesser von ca. 10 nm. Als mögliche Aquaporine können die 50-nm-

Partikel ausgeschlossen werden. Ein Aquaporin-Monomer hat einen Durchmesser von ca. 6 nm, für ein Tetramer ist eine Größe von ungefähr 10 nm zu erwarten.

Die zusätzliche Anzahl an 10 nm Partikeln ist trotz der oben geschilderten Einwände mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Expression des jeweiligen Aquaporins zurückzuführen, da an allen Oozyten dieselben Manipulationen vorgenommen wurden. Wasserpermeabilitätsuntersuchungen haben gezeigt, dass bei Expression von SsAQP2 der Wasserfluss über die Oozytenmembran ungefähr achtmal so hoch ist, wie bei Expression von SsAQP1. Dem gegenüber steht die Partikeldichte in den Plasmamembranen exprimierender Oozyten, die in SsAQP2 exprimierenden Oozyten nur ca. 40% gegenüber SsAQP1-Oozyten erhöht ist. Es ist also kein linearer Zusammenhang zwischen Partikeldichte und Wasserpermeabilität erkennbar. Der Wasserpermeabilitätsunterschied sollte also auf eine Eigenschaft der Proteine zurückgehen. D.h. es ist zu erwarten, dass die molekularen Wasserpermeabilitäten von SsAQP1 und SsAQP2 unterschiedlich sind.

Die strukturelle Ursache der unterschiedlichen Wasserpermeabilitäten von PIP1- und PIP2-Aquaporinen konnte noch nicht aufgeklärt werden. Es konnte nur gezeigt werden, dass dieser Unterschied bei PIP-Aquaporinen aller bisher untersuchten Pflanzenarten auftritt. Ohne Kristallisierungsdaten, die die Orientierung der einzelnen Aminosäuren im Aquaporin-Molekül beschreiben, kann nur ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von PIP-Aquaporinen verschiedener Pflanzenspezies Hinweise auf mögliche Sequenzabschnitte liefern, die die charakteristische Wasserpermeabilität von PIP1- und PIP2-Aquaporinen bestimmen. Durch gezielte Veränderung dieser Sequenzen kann die Bedeutung der entsprechenden Struktur für die Funktion des Aquaporins untersucht werden. Gelänge es auf diese Weise ein PIP1-Aquaporin in ein PIP2-Aquaporin zu verwandeln, also eine Permeabilitäts-bestimmende Struktur zu identifizieren wäre ein zusätzlicher Mechanismus der Wasserpermeabilität geklärt.

4.2.2. Einfluss der Art der Stickstoffversorgung auf die Aquaporinexpression in *Phaseolus vulgaris*

Wie in der Arbeitsgruppe von Prof. Sattelmacher nachgewiesen werden konnte ist die Wasseraufnahme über Wurzeln, die mit Ammonium behandelt wurden, signifikant niedriger als über Wurzeln, denen Nitrat zugefügt wurde. Mittels Northern-Hybridisierung konnte ich zeigen, dass die Stickstoff-Versorgung von Bohnenpflanzen in Form von Ammonium im untersuchten Zeitraum zu einer reduzierten Expression von PIP1-Aquaporinen in der Wurzel führt. Der Zusammenhang zwischen hydraulischer Leitfähigkeit der Wurzel, Wasseraufnahme und Art der Stickstoffversorgung ist allerdings noch nicht geklärt.

Im Jahr 2001 konnten Nakhoul und Mitarbeiter durch intrazelluläre pH-Messung zeigen, dass das menschliche Aquaporin 1 im Oozytenexpressionssystem neben seinen Permeabilitäten für Wasser und Kohlendioxid auch die Passage von Ammoniak ermöglicht. Da HsAQP1 in der Niere hoch exprimiert ist, ist eine Beteiligung an der Ammoniak-Entgiftung nicht ausgeschlossen. Es wurden bisher jedoch noch keine dahingehenden physiologischen Untersuchungen bei denen die Expression des entsprechenden Aquaporin-Homologs verändert wurde durchgeführt.

Auch im pflanzlichen System gibt es Orte und Situationen, bei denen eine erhöhte Permeabilität von Membranen für Ammoniak, bzw. Ammonium von physiologischer Bedeutung sein kann. Transmembrane $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Flüsse treten zum Beispiel in Wurzelknöllchen nach der Fixierung von Luft-Stickstoff durch Rhizobien auf. In der Symbiosomenmembran konnte das Aquaporin Nodulin 26 nachgewiesen werden. NH_3 muss diese Membran überschreiten, um in den pflanzlichen Stoffwechsel einfließen zu können. Durch Inhibitor-Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die Wasser-, als auch die NH_3 -Permeabilität der Peribakteroidmembran durch Behandlung mit Quecksilber-Reagenzien reversibel gehemmt werden kann (Niemietz und Tyerman, 1999). Diese Ergebnisse deuten auf einen gemeinsamen Transportweg von Wasser und Ammonium hin.

Die Symbiose zwischen Pflanze und Pilz (Mycorrhiza) dient dem Austausch von Nährstoffen und Wasser gegen Photosyntheseprodukte. Dabei muss die periarbruskuläre Membran passiert werden. Im Laufe der Mycorrhizierung konnte die induzierte Expression von Aquaporinen gezeigt werden, darunter Aquaporine, die Nodulin-26 ähneln (NIP). Eine Beteiligung dieser NIPs an der Ammonium-Aufnahme kann nicht ausgeschlossen werden.

Durch Komplementations-Versuche mit Hefe-Mutanten konnte für ein NIP-Aquaporin bereits eine Beteiligung an der Ammonium-Aufnahme nachgewiesen werden (Patrik Bienert, persönliche Mitteilung)

Auch in physiologischen Vorgängen, die nicht mit einer Symbiose im Zusammenhang stehen ist Ammonium von großer Bedeutung. Der pflanzliche C2-Zyklus, also die Oxidation von Ribulose-1,5-bisphosphat durch die Oxygenasefunktion der *RubisCO* bei zu geringer Verfügbarkeit von CO_2 führt letztendlich in den Mitochondrien zur Produktion von Ammoniak. Das Einschleusen von Nitrat in den pflanzlichen Stickstoffwechsel liefert nach zwei Reduktionsschritten $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ zur Aminierung von 2-Oxoglutarat zu Glutamat. Diese Reaktionen finden in den Chloroplasten statt. Weitere Vorgänge, die zur Freisetzung von NH_3 führen sind Desaminierungsreaktionen im Rahmen der Dissimilation, also der Bereitstellung von Energie z.B. in der Wurzel.

Der pflanzliche Ammonium-Transport wird intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Ammonium-Transportsystem in der Pflanze aus zwei Komponenten bestehen muss (Wang *et al.*, 1993). Es gibt eine Komponente mit hoher Affinität zum Substrat (HATS; *high affinity transport system*). Diese System ermöglicht den Transport von Ammonium bei niedrigen Konzentrationen zwischen 0 mM und 1 mM. Der von diesem System vermittelte Ammonium-Transport folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik und ist bereits ab ca. 0.6 mM Ammonium gesättigt. Bekannte Vertreter des Hochaffinitäts-Systems sind die Ammoniumtransporter der AMT/MEP/Rh-Familie von Membranproteinen (Ludewig *et al.*, 2002, Ludewig *et al.*, 2003)

Die zweite Komponente des Transportsystems tritt bei höherer Ammonium-Konzentration von 1 mM bis 40 mM auf und besitzt eine dementsprechend niedrige Affinität zu seinem Substrat (LATS, *low affinity transport system*). Der durch diese Komponente vermittelte transmembrane Ammonium-Fluss folgt einer linearen Kinetik. Diese Linearität ist charakteristisch für Diffusion, die durch ein Porensystem erleichtert wird, könnte also durch Aquaporine vermittelt werden.

Es gibt also *in planta* nachweisbar Situationen, in denen erhöhte Flüsse von Ammonium über Membranen stattfinden und es gibt Hinweise, dass dies zumindest teilweise auf einem Aquaporin-vermittelten Weg geschieht.

Neben dem oben angesprochenen HsAQP1 gibt es noch weitere Aquaporine für die zumindest im Oozytenexpressionssystem eine Permeabilität für $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ gezeigt werden konnte. Unter Anwendung einer zur Untersuchung der Ammoniumaufnahme geeigneteren Technik als der intrazellulären pH-Messung (Nakhoul *et al.*, 2001) konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. Zeuthen (Universität Kopenhagen) die Ammonium-Permeabilität der Säuger-Aquaporine 3, 8 und 9 nachgewiesen werden (Prof. Zeuthen, persönliche Mitteilung). Im Rahmen einer Kooperation sollen diese Untersuchungen an pflanzlichen Aquaporinen durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Aquaporine zählen zur Superfamilie der MIP-homologen Proteine („major intrinsic proteins“). Sie bilden membranständige Poren, die die Passage von Wasser bzw. gelöster Stoffe wie zum Beispiel Glycerin und Harnstoff erleichtern. Der aquaporinvermittelte Stofftransport über Biomembranen ist nicht aktiver Natur, sondern folgt einem osmotischen Gradienten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Aspekte der Aquaporin-Funktion untersucht.

Zunächst wurde die CO₂-Permeabilität des Aquaporins NtAQP1 aus *Nicotiana tabacum* untersucht. Die aquaporinvermittelte zelluläre Aufnahme von CO₂ konnte zunächst im heterologen *Xenopus*-Oozytenexpressionssystem nachgewiesen werden. Im Folgenden schlossen sich Untersuchungen im homologen pflanzlichen System an. Auch hier konnte eine veränderte zelluläre Aufnahme von CO₂ in Abhängigkeit von der NtAQP1-Expression nachgewiesen werden. An intakten Pflanzen konnten darüber hinaus Effekte auf CO₂-abhängige physiologische Vorgänge gezeigt werden. Die veränderte Expression von NtAQP1 beeinflusst den Mechanismus der Stomatabewegung und wirkt sich auf die Photosyntheseleistung der Pflanze aus. Aus den erhaltenen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass NtAQP1 im heterologen wie im homologen System unter anderem die Funktion einer CO₂-Pore hat.

Ein weiterer Abschnitt der Arbeit beschäftigte sich mit der unterschiedlichen Wasserpermeabilität von PIP1- und PIP2-Aquaporinen am Beispiel zweier Vertreter aus *Samanea saman*. PIP1-Aquaporine induzieren in *Xenopus*-Oozyten in der Regel eine niedrige Wasserpermeabilität der Plasmamembran, während PIP2-Aquaporine deutlich höhere transmembrane Wasserflüsse ermöglichen. Mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie wurde die Dichte von Protein-Komplexen in den Plasmamembranen der Oozyten untersucht. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die angesprochenen unterschiedlichen Wasserpermeabilitäten auf eine molekulare Eigenschaft des entsprechenden Proteins zurückgehen können und nicht auf einen unterschiedlichen Einbau der Proteine in die Plasmamembran beruhen.

Als drittes Projekt wurde untersucht, inwiefern sich die Stickstoff-Versorgung von *Phaseolus vulgaris* in Form von Ammonium, bzw. Nitrat, auf die Aquaporinexpression in der Wurzel auswirkt. Kooperationspartner konnten nachweisen, dass die Versorgung von Wurzeln mit Ammonium als Stickstoffform eine verringerte Rate der Wasseraufnahme zur Folge hat. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Ammonium zu einer reduzierten Expression von PIP1-Aquaporinen in der Wurzel führt.

6. Literaturverzeichnis

- Ammann D, Lanter F, Steiner RA, Schulthess P, Shijo Y, Simon W.** (1981). Neutral carrier based hydrogen ion selective microelectrode for extra- and intracellular studies. *Anal Chem* 53(14):2267-2269.
- Amoroso G, Sültemeyer D, Thyssen C, Fock HP.** (1998). Uptake of HCO_3^- and CO_2 in Cells and Chloroplasts from the Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol* 116:193-201
- Anthony TL, Brooks HL, Boassa D, Leonov S, Yanochko GM, Regan JW, Yool AJ.** (2000). Cloned human aquaporin-1 is a cyclic GMP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* 57(3):576-588.
- Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R, Kaldenhoff R.** (1999). The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J* 18(5):565-570.
- Cooper GJ, Zhou Y, Bouyer P, Grichtchenko II, Boron WF.** (2002). Transport of volatile solutes through AQP1. *J Physiol* 542(Pt 1):17-29.
- Deitmer JW, Schild D.** (2000). Ca^{2+} und pH – Ionenmessung in Zellen und Geweben. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2000.
- Evans JR, Von Caemmerer S.** (1996). Carbon Dioxide Diffusion inside Leaves. *Plant Physiol* 110(2):339-346.
- Fang X, Yang B, Matthay MA, Verkman AS.** (2002). Evidence against aquaporin-1-dependent CO_2 permeability in lung and kidney. *J Physiol* 542(Pt 1):63-69.
- Gatz C, Froberg C, Wendenburg R.** (1992). Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *Plant J* 2(3):397-404.
- de Groot BL, Grubmuller H.** (2001). Water permeation across biological membranes: Mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* 294:2353-2357
- Guo S, Kaldenhoff R, Uehlein N, Sattelmacher B, Brück H.** Relationship between Water and Nitrogen Uptake in Nitrate- and Ammonium-supplied *Phaseolus vulgaris* L. *Plants*. Manuskript in Bearbeitung
- Hazama A, Kozono D, Guggino WB, Agre P, Yasui M.** (2002). Ion permeation of AQP6 water channel protein. Single channel recordings after Hg^{2+} activation. *J Biol Chem* 277(32):29224-29230.
- Hedrich R, Marten I.** (1993). Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO_2 sensor to guard cells. *EMBO J* 12(3):897-901.
- Hevesy G, Hofer E, Krogh A.** (1935). The permeability of the skin of frogs to water as determined by D_2O and H_2O . *Skandinavisches Archiv fuer Physiologie* 72:199-214.

- Ikeda M, Beitz E, Kozono D, Guggino WB, Agre P, Yasui M.** (2002). Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63. *J Biol Chem* 277(42):39873-39879.
- Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, et al.** (1994). Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(14):6269-6273.
- Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F, Sasaki S.** (1997). Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J Biol Chem.* 272(33):20782-20786.
- Kindle KL.** (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(3):1228-1232.
- Liman ER, Tytgat J, Hess P.** (1992). Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9(5):861-871.
- Mayfield SP, Kindle KL.** (1990). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(6):2087-2091.
- Moshelion M, Becker D, Biela A, Uehlein N, Hedrich R, Otto B, Levi H, Moran N, Kaldenhoff R.** (2002). Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *Plant Cell* 14(3):727-739.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y.** (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407:599-605.
- Nakhoul NL, Davis BA, Romero MF, Boron WF.** (1998). Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 274(2 Pt 1):C543-548.
- Nakhoul NL, Hering-Smith KS, Abdunour-Nakhoul SM, Hamm LL.** (2001). Transport of NH₃/NH₄⁺ in oocytes expressing aquaporin-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 281(2):F255-263.
- Otto B, Kaldenhoff R.** (2000). Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta* 211(2):167-172.
- Paganelli CV, Solomon AK.** (1957). The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *J Gen Physiol* 41(2):259-277.
- Preston GM, Agre P.** (1991). Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(24):11110-11114.

- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P.** (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256:385-387.
- Rivers RL, Dean RM, Chandy G, Hall JE, Roberts DM, Zeidel ML.** (1997). Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. *J Biol Chem* 272(26):16256-16261.
- Saparov SM, Kozono D, Rothe U, Agre P, Pohl P.** (2001). Water and ion permeation of aquaporin-1 in planar lipid bilayers. Major differences in structural determinants and stoichiometry. *J Biol Chem* 276(34):31515-31520.
- Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, Usuda H.** (1998). High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics* 148(4):1821-1828.
- Siefritz F.** (2002). Expression and function of the *Nicotiana tabacum* aquaporin NtAQP1. Dissertation.
- Siefritz F, Biela A, Eckert M, Otto B, Uehlein N, Kaldenhoff R.** (2001). The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1. *J Exp Bot* 52(363):1953-1957.
- Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A, Kaldenhoff R.** (2002). PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* 14(4):869-876.
- Siefritz F, Otto B, Bienert GP, Van Der Krol A, Kaldenhoff R.** (2004). The plasma membrane aquaporin NtAQP1 is a key component of the leaf unfolding mechanism in tobacco. *Plant J* 37(2):147-155.
- Taiz L, Zeiger E.** (2000). *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Tsunoda SP, Wiesner B, Lorenz D, Rosenthal W, Pohl P.** (2003). Aquaporin-1: It's nothing but a water channel. *J Biol Chem*. 2003 Dec 30 [Epub ahead of print]
- Verkman AS.** (2002). Does aquaporin-1 pass gas? An opposing view. *J Physiol* 542(Pt 1):31.
- Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Glass A.** (1993). Ammonium Uptake by Rice Roots (II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ Influx across the Plasmalemma). *Plant Physiol* 103(4):1259-1267.
- Werner M, Uehlein N, Proksch P, Kaldenhoff R.** (2001). Characterization of two tomato aquaporins and expression during the incompatible interaction of tomato with the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Planta* 213(4):550-555.
- Xiang Y, Zhang J, Weeks DP.** (2001). The *Cia5* gene controls formation of the carbon concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(9):5341-5346.
- Yang B, Fukuda N, van Hoek A, Matthay MA, Ma T, Verkman AS.** (2000). Carbon dioxide permeability of aquaporin-1 measured in erythrocytes and lung of aquaporin-1 null mice and in reconstituted proteoliposomes. *J Biol Chem* 275(4):2686-2692.

Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB, Agre P. (1999). Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402:184-187.

Yool AJ, Stamer WD, Regan JW. (1996). Forskolin stimulation of water and cation permeability in aquaporin 1 water channels. *Science* 273:1216-1218.

Zampighi GA, Kreman M, Boorer KJ, Loo DD, Bezanilla F, Chandy G, Hall JE, Wright EM. (1995). A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol* 148(1):65-78.

Zeuthen T, Zeuthen E, Klaerke DA. (2002). Mobility of ions, sugar, and water in the cytoplasm of *Xenopus* oocytes expressing Na(+)-coupled sugar transporters (SGLT1). *J Physiol* 542(Pt 1):71-87.

Zhang RB, Verkman AS. (1991). Water and urea permeability properties of *Xenopus* oocytes: expression of mRNA from toad urinary bladder. *Am J Physiol* 260(Pt 1):C26-34.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

-*g	-mal Erdbeschleunigung
μ	Mikro
AQP	Aquaporin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cDNA	copy DNA
cRNA	copy RNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
GFP	englisch: <i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEK-Zellen	engl.: <i>human embryonic kidney cells</i>
HsAQP1	<i>Homo sapiens</i> Aquaporin 1
l	Liter
m	Meter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minuten
MIP	englisch: <i>major intrinsic protein</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mosm	Milliosmolar
mRNA	englisch: messenger RNA
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NtAQP1	<i>Nicotiana tabacum</i> Aquaporin 1
PCMBs	p-Chloromercuribenzolsulphonat
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
P _f	osmotischer Wasserpermeabilitätskoeffizient
PIP	englisch: Plasmalemma Intrinsic Protein
pmol	Picomol = 10 ⁻¹² Mol
PPFD	engl.: <i>photosynthetic photon flux density</i>
ppm	engl.: <i>parts per million</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
SDS	englisch: Sodium Dodecylsulfate
sec	Sekunde
SsAQP1	<i>Samanea saman</i> Aquaporin 1
SsAQP2	<i>Samanea saman</i> Aquaporin 2
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	englisch: Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol.	Volumen

7.2. Ein-, bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

7.3. Makro zur Bestimmung des Flächeninhaltes von Oozyten-Querschnitten

Die Software ScionImage 0.94b3 der Firma Scion Corporation (<http://www.scioncorp.com>) basiert auf der vom „National Institute of Health“ veröffentlichten Software NIH Image 1.61 (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) und bietet die Möglichkeit der automatischen Abarbeitung von sich wiederholenden Arbeitsschritten (Makro). Zur automatischen Berechnung des Oozytenflächeninhaltes wurde folgendes Makro definiert:

```
macro 'Oozyten vermessen [0]';

var                                     {Definition der verwendeten Variablen}
  i           :   integer;
  d           :   integer;
  a           :   integer;
  min         :   integer;
  max         :   integer;
  t           :   integer;

begin

  min         := 1500;                  {minimale Partikelgröße}
  max         := 999999;                {maximale Partikelgröße}
  d           := 5;                    {Anzahl Dezimalstellen}
  n           := 30;                   {Anzahl der geöffneten Bilder}
  t           := 185;                  {Schwellenwert der Pixelerkennung}

  ResetCounter;
  CascadeWindows;
  SetOptions('Area');
  SetParticleSize(min,max);
  SetPrecision(d);

  for i:=1 to n do begin               {Schleife für die Abarbeitung von n Bildern}
    SetScale(98.4, 'mm', 1);
    EnhanceContrast;
    SetThreshold(t);
    AnalyzeParticles('label', 'outline', 'ignore', 'include');
    NextWindow;
  end;

  ShowResults;
  CopyResults;
  DisposeAll;
end;
```

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Norbert Uehlein
Geburtsdatum	05.01.1974
Geburtsort	Bad Kissingen
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung:

1980-1984	Volksschule Bad Kissingen
1984-1994	Gymnasium Bad Kissingen
Juli 1994	Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

1994-1995	StFmRgt4 Regensburg, bzw. Dillingen a.d. Donau
-----------	--

Hochschulstudium:

1995-2000	Studium der Biologie mit Hauptfach Pflanzenphysiologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
1999-2000	Diplomarbeit mit dem Thema „Funktionelle Charakterisierung pflanzlicher Aquaporine“ am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff, Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg.
2000	Abschluss als Diplom-Biologe

Promotion:

2000-2003	Promotionsstudium bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg. Anstellung als Wissenschaftlicher Mitarbeiter.
September 2003	Wechsel an die Technische Universität Darmstadt. Weiterführung des Promotionsstudiums im Institut für Botanik bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff.

Publikationsliste

Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kaldenhoff R. (2003). The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*. 2003 Oct 16;425(6959):734-7.

Moshelion M, Becker D, Biela A, Uehlein N, Hedrich R, Otto B, Levi H, Moran N, Kaldenhoff R. (2002). Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *Plant Cell*. 2002 Mar;14(3):727-39.

Siefritz F, Biela A, Eckert M, Otto B, Uehlein N, Kaldenhoff R. (2001). The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1. *J Exp Bot*. 2001 Oct;52(363):1953-7. Review.

Werner M, Uehlein N, Proksch P, Kaldenhoff R. (2001). Characterization of two tomato aquaporins and expression during the incompatible interaction of tomato with the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Planta*. 2001 Aug;213(4):550-5.

Marjanovic Z, Uehlein N, Kaldenhoff R, Weiß M, Hampp R, Nehls U. Impact of ectomycorrhiza formation on the expression of water channel proteins (aquaporins) in fine roots of Norway spruce. Eingereicht bei *Plant Cell & Environment*.

Bots M, Feron R, Uehlein N, Weterings K, Kaldenhoff R, Mariani C. PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. Eingereicht bei *Plant Molecular Biology*.

Präsentationen

Rhein-Main-Kolloquium der Botanischen Institute, Darmstadt 2000. Funktionelle Charakterisierung pflanzlicher Aquaporine.

Rhein-Main-Kolloquium der Botanischen Institute, Heidelberg 2002. Are PIP1 plant aquaporins CO₂ pores?

Posterpräsentationen

Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft 2002, Freiburg i. Br. Are PIP1 plant aquaporins CO₂ pores?

Gordon Conference on Cellular Osmoregulation 2003, Roger Williams University, Bristol, Rhode Island, USA. Are PIP1 aquaporins CO₂ pores?

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

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

Darmstadt, Februar 2004

.....