

# **Untersuchungen zur Interaktion und Lokalisation von Aquaporinen aus *Nicotiana tabacum***

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Hochschule Darmstadt  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
eines Doctor rerum naturalium  
genehmigte  
Dissertation von

**Dipl. Biol. Sven Sdorra**  
aus  
**Zweibrücken**

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Markus Engstler

Tag der Einreichung: 22.07.2009  
Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2009

**Darmstadt 2009**



---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>I Einleitung</b>	<b>5</b>
1 Aquaporine	5
2 Struktur der Aquaporine	6
3 Systematik der Aquaporine	8
4 Mögliche Mechanismen der Aquaporin-Regulation	11
4.1 Promotoraktivität	11
4.2 Gating	11
4.3 Vesikeltransport	13
4.4 Tetramerisierung	14
5 Ziele der Arbeit	15
<b>II Ergebnisse</b>	<b>17</b>
1 Mikroskopische Untersuchungen zur Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1	17
1.1 Interaktionsanalyse von NtAQP1 und NtPIP2;1 in <i>S. cerevisiae</i>	17
1.2 Der Farbstoff FM4-64 im Hefesystem	20
1.3 Lokalisationsanalyse von NtAQP1 und NtPIP2;1 in <i>S. cerevisiae</i>	23
5.1 Quantifizierung der relativen Proteinmenge in der Plasmamembran	25
2 Proteinbiochemische Untersuchungen zur Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1	29
3 Funktionelle Untersuchungen zur Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1	33
3.1 Einfluss der Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1 auf die Wasserleitfähigkeit	33
3.2 Einfluss der Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1 auf die CO <sub>2</sub> -Leitfähigkeit	36
<b>III Diskussion</b>	<b>39</b>
1 Lokalisation von NtAQP1 und NtPIP2;1 in der Plasmamembran	39
2 PIP1-PIP2-Wechselwirkung	39
3 Lokalisation der Homo- und Heteromere	40
4 Anwendbarkeit und Aussagekraft der Kolokalisationsanalyse	42
5 Funktion der untersuchten Aquaporine	42
6 Regulation der Funktion durch Protein-Protein-Interaktion	43
7 Ausblick	45

7.1	Weitere Lokalisationsanalysen	45
7.2	Weitere Untersuchungen zur Heterotetramerisierung	46
7.3	Rasterkraftmikroskopie	47
7.4	Aufklärung weiterer Wechselwirkungen zwischen Aquaporinen und anderen Membranproteinen	48
<b>IV</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>51</b>
1	<i>Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNS)</i>	51
1.1	Methoden zur Bearbeitung von DNS	51
1.1.1	Hydrolyse von DNS mittels Restriktionsendonukleasen	51
1.1.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNS in einem Agarosegel	51
1.1.3	Elution von DNS aus einem Agarosegel	52
1.1.4	Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR)	52
1.2	Klonierung von DNS	53
1.2.1	T/A-Klonierung von PCR Produkten	53
1.2.2	Ligation von cDNS Fragmenten in binäre Vektoren	53
1.2.3	Sequenzieren von DNS Fragmenten	54
2	<i>Verfahren mit Escherichia coli (E. coli)</i>	55
2.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	55
2.2	Transformation von <i>E. coli</i> nach der CaCl <sub>2</sub> /Hitzeschock-Methode	55
2.3	Kultivierung von <i>E. coli</i>	55
2.4	Erstellen von Dauerkulturen von <i>E. coli</i>	56
2.5	Isolierung von Plasmid DNS aus <i>E. coli</i>	56
2.6	Medien zur Anzucht und Transformation von <i>Escherichia coli</i>	57
3	<i>Verfahren mit Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae)</i>	57
3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	57
3.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	58
3.3	Erstellen einer Dauerkultur von <i>S. cerevisiae</i>	58
3.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> nach der LiAc/ Hitzeschockmethode	58
3.5	Biolistische Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
3.6	Medien zur Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
4	<i>Mikroskopie</i>	61
4.1	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation	61
4.2	Das konfokale Mikroskop	62
4.3	Bildanalyse	64
5	<i>Permeabilitätsbestimmungen</i>	65
5.1	„Stopped Flow“-Spektrometrie	65
5.2	Bestimmung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten (P <sub>f</sub> )	67
5.2.1	Medien zur Protoplastierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
5.2.2	Medien zur Aufnahme der Schwellungskinetiken von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protoplasten	67

5.2.3	Protoplastierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
5.2.4	Aufnahme von Schwellungskinetiken der <i>S. cerevisiae</i> -Protoplasten	68
5.2.5	Berechnung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten ( $P_f$ )	69
5.3	Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten für $\text{CO}_2$ ( $P_{\text{CO}_2}$ )	69
5.3.1	Färben ganzer Zellen mit Fluoreszeinbisacetat (FBA*)	69
5.3.2	Prinzip der $\text{CO}_2$ -Permeabilitätsmessungen	70
5.3.3	Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten für $\text{CO}_2$ ( $P_{\text{CO}_2}$ )	71
5.3.4	Fluoreszeinbisacetat	72
6	<i>Verfahren mit Proteinen</i>	72
6.1	Proteinisolation aus Hefe	72
6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	74
6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	74
6.4	Western Bolt Analyse von Proteinen	75
6.4.1	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran	75
6.4.2	Kolloidale Silberfärbung von Proteinen auf einer Nitrozellulose-Membran	76
6.4.3	Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz	76
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>VII</b>	<b>Anhang</b>	<b>93</b>
1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	93
2	<i>Ein- bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren</i>	94
3	<i>Verwendete Vektoren</i>	94
3.1	Vektoren zur Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	94
3.2	Klonierungsvektor	95
4	<i>Zur Klonierung verwendete synthetische Oligonukleotide (Primer)</i>	95
5	<i>Vektorkarten</i>	96
5.1	pEGFP-N3 (Vektor zur Fusion eines Gens mit eGFP und Expression in <i>E. coli</i> )	96
5.2	pYES-DEST52 (Destination Vektor für Gateway-Klonierung zur Protein-Expression in Hefe, Invitrogen)	96
5.3	pGREG505_2 $\mu$ ORI_CA (Hefeexpressionsvektor mit cDNA der Carboanhydrase aus Tabak und dem 2 Micron-Replikationsursprung)	97
5.4	YEplac112 (Hefeexpressionsvektor mit lac-Promotor, lacZ und 2 Micron-Replikationsursprung)	97
6	<i>Sequenzen</i>	98
6.1	Nukleotidsequenz YC	98
6.2	Nukleotidsequenz YN	98

6.3	Aminosäuresequenz NtPIP2;1	98
6.4	Aminosäuresequenz NtAQP1	98
7	<i>Ermittlung der Größe eines Vesikels durch Anpassung mit einer doppelten Gaußverteilung</i>	99
	<i>Danksagung</i>	101

# I Einleitung

---

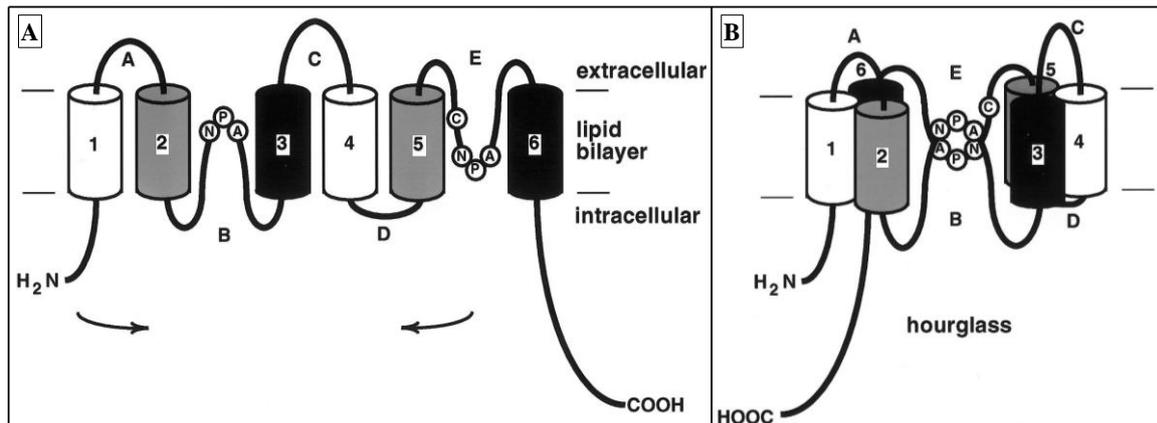
## 1 Aquaporine

Bereits in den 1920er Jahren, als entdeckt wurde, dass die Plasmamembran aus einer Phospholipiddoppelschicht besteht, wurde vermutet, dass Wasser allein durch Diffusion über diese Membran in die Zelle gelangen könnte (Langmuir, 1917; Gorter and Grendel, 1925). Es stellte sich heraus, dass die Permeabilität biologischer Membranen für Wasser zwar relativ hoch ist (verglichen mit deren Durchlässigkeit für Ionen), aber dass die energetische Barriere für die Diffusion von Wasser durch eine Lipiddoppelschicht dennoch deutlich höher ist, als man erwartet hatte. Später konnten Pioniere der Aquaporinforschung wie Arthur K. Solomon, Alan Finkelstein, Robert Macey oder Gheorghe Benga durch biophysikalische Methoden belegen, dass es in bestimmten Zellen mit hoher Wasserleitfähigkeit, etwa denen im Sammelrohr der Niere, in Speicheldrüsen oder in roten Blutkörperchen, Kanäle für den Wassertransport geben muss, da die Wasserdurchlässigkeit der Membranen in diesen Zellen so hoch ist, als wäre zwischen Zellinnerem und Zelläußerem keine Membran (Finkelstein, 1987). Während Diffusion durch die Phospholipiddoppelschicht allein nur zu einem langsamen Konzentrationsausgleich zwischen den Zellen und einer hyper-/hypotonischen Lösung führt, kann man bei diesen Zellen eine ungleich schnellere Anpassung an die Osmolarität ihrer Umgebung finden. Weiterhin wurde beobachtet, dass diese Permeabilität selektiv ist, also dass nur Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) fast ohne Widerstand durch die Membran diffundieren konnte, während Hydroniumionen ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) nicht in die Zellen oder aus ihnen heraus gelangen können. Dabei sind die wasserleitenden Moleküle nur selektive Poren, sie haben weder die Aufgabe einer Pumpe noch die eines Sym- oder Antiporters. Dass es sich hierbei tatsächlich um durch Kanäle erleichterte Diffusion des Wassers handelt, kann veranschaulicht werden, indem man die Poren mit Quecksilberionen blockiert. Dies führt zur Verlangsamung des Wassereinstroms über die Membran. Durch Zugabe von Reduktionsmitteln kann die Wasserleitfähigkeit wieder hergestellt werden (Macey and Farmer, 1970). Da Quecksilber den Wasserfluss durch diese Moleküle hemmt, konnte vorhergesagt werden, dass die Kanal-moleküle Sulfhydryl-Gruppen enthalten und dass es sich bei den Wasserkanälen wahrscheinlich um Proteine handelt. (Agre *et al.*, 1993). Für diese Moleküle wurde der Name Aquaporine vorgeschlagen.

Peter Agre gelang es 1987 als erstem, ein solches Kanalprotein zu identifizieren, zu isolieren und zu charakterisieren (Agre, 2004). Dieses Protein wurde Aquaporin 1 genannt (AQP1).

## 2 Struktur der Aquaporine

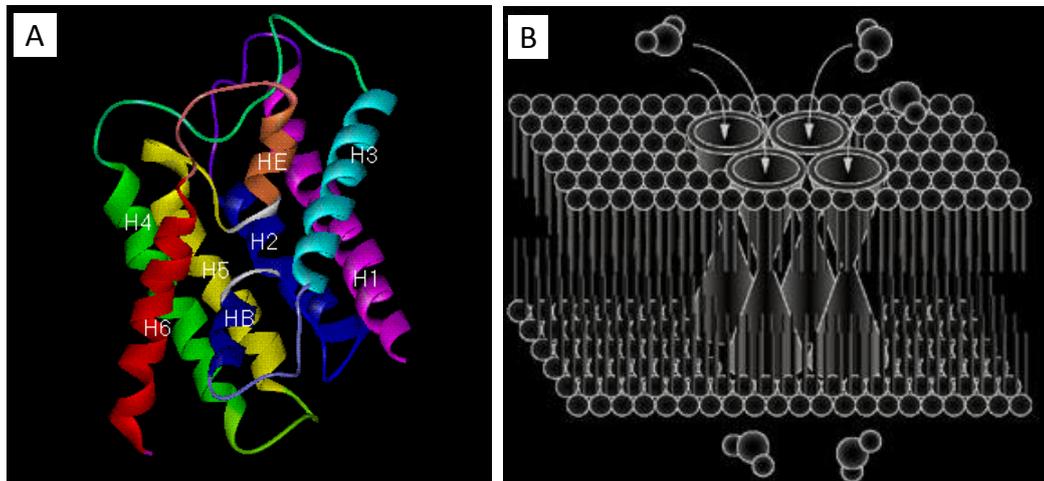
Durch Hydropathieanalysen der Proteine zeigte sich, dass alle bisher untersuchten Aquaporine den gleichen Aufbau haben. Sie bestehen aus sechs die komplette Membran durchspannenden Helices, die durch Schleifen miteinander verbunden werden (Schleife A bis E). In Abbildung I 2.1 ist der Aufbau eines Aquaporins schematisch dargestellt.



**Abbildung I 2.1:** Schematischer Aufbau eines Aquaporin-Monomers. **A:** Darstellung der sechs transmembranen Helices und den beiden "Halbhelices", die in die Membran eintauchen. **B:** Organisation des Aquaporin-Monomers in der Membran. Hervorgehoben ist das Cystein in Schleife E, das für die Entdeckung des NPA-Motivs eine entscheidende Rolle spielte (Jung, J. S. et al. 1994).

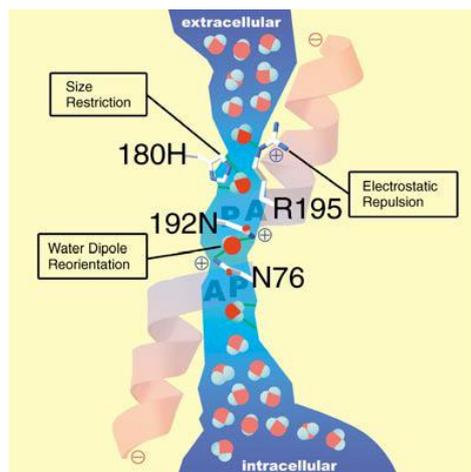
Da Quecksilber den Wassertransport hemmt, wurde gefolgert, dass die SH-Gruppen bzw. Cysteine, die mit Quecksilber interagieren, selbst an der Wasserleitung beteiligt sind oder unmittelbar in der Nähe des für die Wasserleitung wichtigen Motivs liegen. Deshalb wurde nach den Bindungsstellen für Quecksilberionen gesucht. Es zeigte sich, dass nur eine Wechselwirkung des Cysteins in Schleife E mit Quecksilber den Wassertransport beeinflusst. Durch Aminosäureaustausch konnte man belegen, dass es in den Schleifen B und E ein hochkonserviertes Motiv gibt, bei dessen Austausch die Wasserleitfähigkeit verloren geht (Wistow *et al.*, 1991). Dieses Motiv besteht aus einer für Aquaporine typischen, hoch konservierten Aminosäuresequenz aus Asparagin (N), Prolin (P) und Alanin (A), und wird deshalb als NPA-Motiv bezeichnet. (Borgnia *et al.*, 1999). Tatsächlich bilden diese beiden Schleifen durch Eintauchen ihrer hydrophoben Bereiche in die Membran die Pore des Wasserkanals, durch die zwar Wasser, nicht aber Hydroniumionen gelangen können. Schleife B taucht von der zytoplasmatischen, Schleife E von der extrazytosolischen Seite ein. Die postulierte und später durch Röntgenstrukturanalyse bestätigte Struktur von Aquaporinen lässt sich am besten mit einer Sanduhr beschreiben. Zum einen, weil durch die beiden Schleifen eine Engstelle geschaffen wird, ähnlich wie bei einer Sanduhr, zum andern kann Wasser in beide Richtungen fließen, wie der Sand in einer Sanduhr (Jung *et al.*, 1994). In Abbildung I 2.2

A ist schematisch dargestellt, wie die beiden Halbhelices und die sechs transmembranen Helices eine funktionale Pore bilden.



**Abbildung I 2.2:** Bildung der für Wasser selektiven Filterregion der Aquaporine. **A:** Bildung der Engstelle zwischen den beiden Schleifen (Halbhelices) HB und HE (de Groot and Grubmuller, 2001). **B:** schematische Skizzierung des Sanduhr-Modells und der Tetramerisierung der Aquaporine (Maeda, N. et al. 2008).

Aquaporine können sich zu Tetrameren zusammenlagern (Walz *et al.*, 1994), wobei jedes Monomer eine Wasserpore enthält. Über Röntgenstrukturanalyse konnte auch der Mechanismus des Transports von Wasser unter Ausschluss von  $\text{H}_3\text{O}^+$  aufgeklärt werden (de Groot *et al.*, 2001; Sui *et al.*, 2001; de Groot *et al.*, 2003). In Abbildung I 2.3 ist der Aufbau einer HsAQP1-Monomerpore dargestellt. Die Bereiche, die Barrieren für zu große und (positiv) elektrisch geladene Teilchen darstellen (aromatische/Arginin-Region (ar/R) bzw. NPA-Motiv) sind hervorgehoben. Über molekulardynamische Simulationen konnte eine weitere für den Wassertransport wichtige Region im bovinen AQP1 identifiziert werden. Diese Region besteht aus H76 und V155 und wurde wegen ihrer Funktion Ventil (*engl.*: valve) genannt. Damit wurde ein Nachweis geführt, dass die Dynamik und die Flexibilität der Seitenketten ebenfalls für die Wasserleitung durch Aquaporine notwendig ist (Smolin *et al.*, 2008).



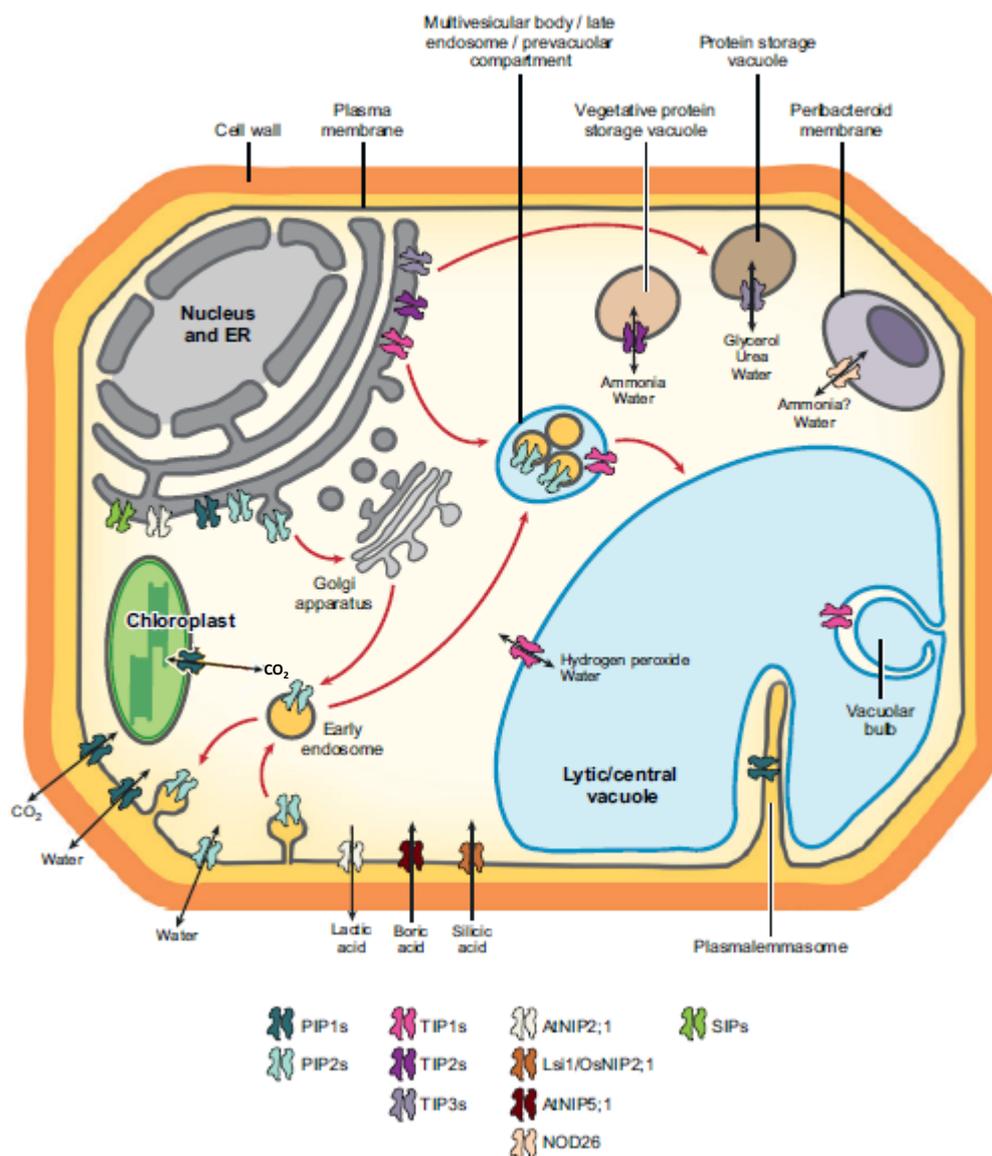
**Abbildung I 2.3:** Selektivitätsfilter für den Wassertransport in einem AQP1-Monomer. Größenausschluss und elektrostatische Abstoßung in der ar/R-Region, Umorientierung der Wasserdipole und damit Hydroniumionenausschluss durch Abbrechen der durchgehenden Wassersäule im NPA-Motiv (N192, N72) (Kozono, D. et al. 2002).

In den letzten zehn Jahren wurden neben Wasser viele weitere, in ihren Eigenschaften sehr unterschiedliche Stoffe entdeckt, für deren Transport über Membranen Aquaporine die Aktivierungsenergie dramatisch herabsetzen (und damit oft einen Transport über Membranen überhaupt erst möglich machen). So wird eine Gruppe innerhalb der Aquaporine nach ihrer Fähigkeit, neben oder statt Wasser auch Glycerin durch die Membran zu leiten, Aquaglyceroporine genannt (Baker and Saier, 1990). Weiterhin wurde berichtet, dass manche Aquaporine den Fluss von Harnstoff (Ishibashi *et al.*, 1994), Ammoniak (Nakhoul *et al.*, 2001), Chloridionen (Liu *et al.*, 2005), Silicationen (Ma *et al.*, 2006), Borat (Dordas and Brown, 2001), Äpfelsäure (Epimashko *et al.*, 2006), Formamid (Liu *et al.*, 2006), Milchsäure (Choi and Roberts, 2007), Nitrat (Ikeda *et al.*, 2002) und CO<sub>2</sub> (Uehlein *et al.*, 2003; Uehlein *et al.*, 2008; Musa-Aziz *et al.*, 2009) und vieler weiterer Stoffe durch die Membran erleichtern.

### 3 Systematik der Aquaporine

Pflanzen besitzen oft über dreimal mehr Aquaporingene als Tiere oder Mikroorganismen. So haben Wirbeltiere typischerweise 11 bis 13 verschiedene Aquaporingene (Agre *et al.*, 2002). In der Ackerschmalwand findet man dagegen 35 (Johanson *et al.*, 2001), in Mais 36 (Chaumont *et al.*, 2001) und in Reis 33 (Sakurai *et al.*, 2005). In Blütenpflanzen entwickelten sich vier Gruppen, die in ihren Eigenschaften, physiologischen Funktionen und in ihrer Verteilung in der Zelle erheblich variieren. So unterscheidet man zwischen den plasmamembranintrinsic Proteinen (PIP), die in zwei Unterfamilien, PIP1 und PIP2, gegliedert werden, den tonoplastintrinsic Proteinen (TIP), den Nodulin26-ähnlichen-intrinsic Proteinen (NIP) und den kleinen und basischen intrinsic Proteinen (SIP, Small and basic intrinsic proteins) (Johanson *et al.*, 2001; Chaumont *et al.*, 2001; Johanson and Gustavsson, 2002).

Die Bezeichnungen PIP und TIP wurden ursprünglich auf Grund der Positionen, an denen man diese Proteine in pflanzlichen Zellen überwiegend gefunden hatte, eingeführt. Inzwischen konnten zahlreiche Untersuchungen aber nachweisen, dass die Mitglieder der beiden Proteinfamilien in nahezu allen intrazellulären Membranen zu finden sind (Otto and Kaldenhoff, 2000; Quigley *et al.*, 2002; Kaldenhoff and Fischer, 2006). Die Bezeichnung NIP ergab sich, da die Vertreter dieser Unterfamilie eine hohe Sequenzhomologie zu Nodulin26 aufweisen (Wallace *et al.*, 2006). Die SIP wurden nach ihrer Größe und ihrer Aminosäurezusammensetzung benannt, da man in deren Primärstruktur viele basische Aminosäuren findet. SIP sind, soweit heute bekannt ist, hauptsächlich im Endoplasmatischen Reticulum (ER) von Pflanzenzellen zu finden (Johanson *et al.*, 2002; Fujiyoshi *et al.*, 2002; Ishikawa *et al.*, 2005). Abbildung I 3.1 zeigt die vorwiegende Lokalisation verschiedener Aquaporine in einer pflanzlichen Zelle und die von den betreffenden Proteinen überwiegend durch die Membran geleiteten Substrate. NIP, PIP1 und PIP2 sind in der Plasmamembran zu finden, TIP in der Vakuole und in Vesikeln, NIP auch im ER, ebenso wie SIP. PIP1 sind auch in der inneren Chloroplastenmembran zu finden (Uehlein *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009).



**Abbildung 1.3.1:** vorwiegende Lokalisation und Funktion verschiedener Aquaporine in pflanzlichen Zellen (Gomes *et al.* 2009).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren die grundlegend unterschiedlichen Leitfähigkeitscharakteristiken der PIP-Untergruppen PIP1 und PIP2 von Bedeutung. PIP2-Aquaporine zeigen eine sehr hohe Wasserleitfähigkeit über Membranen (Biela *et al.*, 1999; Dean *et al.*, 1999; Gerbeau *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 2006), während PIP1-Proteine praktisch keine Wasserdurchlässigkeit aufweisen. Stattdessen sind sie leitfähig für kleine ungeladene Moleküle (Glycerin, Harnstoff) und weisen eine hohe Kohlenstoffdioxiddurchlässigkeit auf (Siefritz *et al.*, 2002; Uehlein *et al.*, 2003; Holm *et al.*, 2005; Loque *et al.*, 2005). Obwohl die molekularen Mechanismen der Änderung der Membranpermeabilitäten für Gase (CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>) durch Aquaporine schon seit langem untersucht werden, sind sie noch nicht vollständig verstanden. Ob Gase denselben Weg wie Wasser durch die Monomerpore über die

Membran nehmen oder ob sie auf andere Weise durch das Proteintetramer gelangen, wird derzeit kontrovers diskutiert (Hub and de Groot, 2006; Bertl and Kaldenhoff, 2007; Missner *et al.*, 2008c).

## 4 Mögliche Mechanismen der Aquaporin-Regulation

### 4.1 Promotoraktivität

Eine Pflanze muss als sessiler Organismus Stressfaktoren wie Trockenheit, Hitze oder Überflutung durch Änderung ihres inneren Milieus bewältigen. Zahlreiche Indizien deuten darauf hin, dass die Regulation des Wasserhaushalts auf systemischer Ebene durch unterschiedliche Aquaporin-Promotoraktivitäten oder durch verschiedene Expressionsniveaus der Aquaporine erfolgt. So wurden in stomatären Schließzellen und in Zellen, die an diese grenzen, während der Zellelongation eine hohe Aktivität der Promotoren pflanzlicher Aquaporingene zusammen mit einer verhältnismäßig hohen Konzentration an Aquaporin-mRNS und Aquaporin-Proteinen gefunden (Ludevid *et al.*, 1992; Kaldenhoff *et al.*, 1995; Kaldenhoff *et al.*, 1996; Sarda *et al.*, 1997). Ebenso fand man relativ hohe Promotoraktivitäten und Genproduktmengen in Leitgefäßen der Wurzeln, des Sprosses oder des Blattes (Ludevid *et al.*, 1992; Kaldenhoff *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1997a; Yamada *et al.*, 1997b; Grote *et al.*, 1998). Auch zeigte sich, dass die Expression eines einzelnen Aquaporingens auf ein bestimmtes Gewebe beschränkt sein kann (Bots *et al.*, 2005; Hachez *et al.*, 2006a; Hachez *et al.*, 2006b). Zusätzlich kann belegt werden, dass die Promotoraktivität wahrscheinlich durch einen Faktor reguliert wird, der mit dem Entwicklungsstadium der Pflanze verbunden ist (Maurel *et al.*, 2008). So exprimieren adulte Pflanzen die Gesamtheit ihrer Aquaporingene weder gleichzeitig noch in vollem Umfang. Regulation über unterschiedliche Promotoraktivitäten und an die Umweltbedingungen angepasste Aquaporinexpression scheinen die wichtigsten und wirkungsvollsten Regulationsmechanismen des Wasserhaushalts zu sein (Grote *et al.*, 1998; Eckert *et al.*, 1999). Neben dieser auf systemischer Ebene erfolgenden Kontrolle, die eine Antwort der Pflanze auf relativ langanhaltenden Stress darstellt, werden noch weitere, schnellere Wege der Kontrolle der Aquaporinaktivität auf molekularer Ebene diskutiert (Eckert *et al.*, 1999).

### 4.2 Gating

Als eine Möglichkeit pflanzlicher Zellen, die Wasserleitfähigkeit von Membranen schnell zu verändern, wurde ein „Gating“-Modell für Aquaporine vorgeschlagen (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006).

Es konnte belegt werden, dass einige, unter bestimmten Umweltbedingungen auch alle Aquaporine der PIP-, TIP- und NIP Gruppen *in planta* phosphoryliert vorliegen (Weaver

and Roberts, 1991;Johnson and Chrispeels, 1992;Johansson *et al.*, 1998;Guenther *et al.*, 2003;Santoni *et al.*, 2003;Van Wilder *et al.*, 2008) und möglicherweise auch durch Phosphorylierung reguliert werden (Maurel *et al.*, 1995;Johansson *et al.*, 1998;Guenther *et al.*, 2003;Prak *et al.*, 2008).

Weiterhin kann eine Steigerung der zytosolischen Kalzium-Konzentration, die bei Wasser- oder Hitzestress beobachtet wird (Xiong and Zhu, 2002), mit der Aktivität kalziumabhängiger Proteinkinasen in Verbindung gebracht werden. Diese Kinasen wiederum sind mit Wasserleitfähigkeitsänderung von Aquaporinen verknüpft (Johnson *et al.*, 1992;Johansson *et al.*, 1996;Sjovall-Larsen *et al.*, 2006). Ob die Modulation der Wasserleitfähigkeit vollständig auf der indirekten Regulation durch Kinasen beruht, oder ob auch die Interaktion von freiem Kalzium mit strukturellen Domänen eines Aquaporins einen regulativen Mechanismus darstellt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden (Gerbeau *et al.*, 2002).

Auch eine Reduktion der Wasserleitfähigkeit der Plasmamembran in Folge einer pH-Senkung konnte beobachtet werden (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Mutiert man Aminosäuren, die vom Zytosol aus protoniert werden können, verschwindet die pH-Abhängigkeit der Wasserleitfähigkeit eines PIP aus *Arabidopsis thaliana*.

Bei der Aufklärung der atomaren Struktur eines PIP aus Spinat (SoPIP2;1) wurde das Aquaporin in zwei Konformationen kristallisiert (Kukulski *et al.*, 2005;Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Dieser Befund wurde dahingehend interpretiert, dass diese beiden Zustände einer offenen und einer geschlossenen Konformation entsprechen. Auf Grund dieser Interpretation wurde ein Regulationsmechanismus postuliert, der auf posttranslationaler Phosphorylierung und Protonierung des Proteins basiert (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Nach diesem Modell ist eine Wasserleitung durch das Protein nach der Phosphorylierung zweier Serin- Aminosäuren in Schleife B und am C-Terminus möglich. Die Dephosphorylierung der beiden Aminosäuren vermittelt eine Verlagerung einer intrazellulären Schleife über den zytosolischen Ausgang des Kanals. In dieser Position bildet die Schleife eine Barriere für die Wasserleitung. Bei einem alternativen Mechanismus wird die Verlagerung der Schleife durch die Protonierung einer Histidin-Aminosäure induziert. Da die Schleife bei diesen Mechanismen wie ein Tor den Eingang des Kanals öffnet oder verschließt, spricht man hier in Analogie zu Ionenkanälen von einem „Gating“-Mechanismus. Auf Grund des hohen Anteils an stark konservierten Aminosäuren, die an diesem Mechanismus beteiligt sein könnten, wurde eine allgemeine Gültigkeit des „Gating“-Modells für alle pflanzlichen PIP postuliert. Allerdings konnte durch eine experimentelle Untersuchung dieses aus einer theoretischen Arbeit hervorgegangenen möglichen Regulationsmechanismus gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Serins in Schleife B von NtPIP2;1 keinen Einfluss auf dessen Wasserleitfähigkeit hat (Fischer, 2007). Damit wurde die Allgemeingültigkeit der postulierten Regulation durch Phosphorylierung widerlegt. Aber es konnte nachgewiesen werden, dass die Protonierung eines Histidins eine regulatorische Bedeutung hat.

### 4.3 Vesikeltransport

Die Wasserleitfähigkeit der Epithelzellen des Sammelrohrs der Niere ist von der hormonell regulierte Einbaurate (Vesikeltransport, Trafficking) aquaporinbeladener Vesikel in die apikale Plasmamembran abhängig. Dieser Einbau ist durch eine Reihe verschiedener Faktoren beeinflussbar. So regt die Bindung des antidiuretische Hormon Arginin-Vasopressin an Vasopressin-Typ2-Rezeptoren die Adenylatcyclase dazu an, cAMP zu produzieren, welches wiederum die Proteinkinase A aktiviert. (Kuwahara *et al.*, 1995; Nishimoto *et al.*, 1999). Diese phosphoryliert AQP2 (an Serin 256), und diese Phosphorylierung führt zur Inkorporation des Aquaporins in die Plasmamembran. Durch AQP2 kann Wasser dem osmotischen Gradienten folgend in die Epithelzellen fließen. In das Interstitium gelangt es durch die basolateral in der Epithelzelle lokalisierten AQP3 und AQP4. Wird der Botenstoff Arginin-Vasopressin entfernt, so werden die Aquaporine ubiquitiniert und über *clathrin-coated vesicles* internalisiert. Es konnte belegt werden, dass Stickstoffmonoxid (bzw. Natriumprussid, das in der Zelle NO freisetzt) und der atriale natriuretische Faktor bei Nierenzellen dieselben Effekte wie Vasopressin hervorrufen. Dabei ist die durch diese beiden Faktoren hervorgerufene Relokalisation von cGMP als intrazellulärem Botenstoff abhängig (Bouley *et al.*, 2000). Weiterhin konnte dargestellt werden, dass die vasopressinvermittelte Bewegung von aquaporinbeladenen Vesikeln in die Plasmamembran epithelialer Zellen der Sammelrohrs nicht auf eine Deploymerisation von Aktin, sondern auf eine Entspannung des Actomyosins zurückzuführen ist (Riethmuller *et al.*, 2008). In der Literatur findet man zahlreiche Berichte darüber, dass der Vesikeltransport durch Interaktion von AQP2 mit anderen Proteinen beeinflusst wird. So wurde gefunden, dass der Transport von AQP2 durch dessen Interaktion mit dem Hitzeschockprotein 70 reguliert ist (Lu *et al.*, 2007). Das Myelin- und Lymphocyten-assoziierte Protein (MAL), auch bekannt als Vesikel integrales Protein mit der Masse 17 kDa (VIP17), verstärkt durch Interaktion mit AQP2 dessen Einbau in die apikale Plasmamembran (Kamsteeg *et al.*, 2007). Dass es diese Regulation durch Interaktion auch bei pflanzlichen Aquaporinen gibt, konnte u. a. beim Eiskraut (*Mesembryanthemum crystallinum*) nachgewiesen werden (Vera-Estrella *et al.*, 2004). Hier führt osmotischer Stress zu einer Umverteilung eines TIP vom Tonoplast in endosomale Kompartimente. Dieser Prozess wird durch Hemmstoffe des Vesikeltransports blockiert und ist abhängig von der Glykosylierung des Aquaporins. Durch Expression von *Mimosa pudica* (Mp) MpPIP2;1, MpPIP1;1 und MpTIP1;1 in Oozyten konnte nachgewiesen werden, dass deren Wasserleitfähigkeit dann am höchsten ist, wenn PIP1 und PIP2 zusammen exprimiert werden (Temmei *et al.*, 2005). Über Ko-Immunopräzipitation konnte der Nachweis geführt werden, dass diese Leitfähigkeitsänderung aus einer direkten Interaktion von MpPIP1;1 mit MpPIP2;1 resultiert. Die Phosphorylierung von MpPIP1;1 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A spielt eine bedeutende Rolle bei der Wasserleitfähigkeit. Die Interaktion der Aquaporine miteinander ist dagegen phosphorylierungsunabhängig. Durch Fluoreszenzmarkierung konnte nachgewiesen werden, dass eine Koexpression von PIP1 und PIP2-Aquaporine aus Mais in *Xenopus laevis* Oozten zu einer größeren Einbauraten

beider Proteine in die Plasmamembran führte als die Expression eines der Aquaporine alleine (Fetter *et al.*, 2004). Dagegen wurde in Maisprotoplasten gefunden, dass Mais-PIP1-Aquaporine alleine (ohne PIP2-Aquaporine) im homologen System nicht aus dem ER in die Plasmamembran transportiert werden. Werden PIP1 und PIP2 dagegen zusammen exprimiert, befanden sich die jeweiligen Vertreter beider Unterfamilien in der Plasmamembran. Um dies festzustellen, wurden die betreffenden Aquaporine mit CFP bzw. YFP markiert. Über Fluoreszenz-Lebensdauer-Messungen im FRET-System CFP-YFP konnten die Abstände zwischen den Aquaporinen bestimmt werden. Diese Abstände entsprechen einem direkten Kontakt der beiden Proteine. Damit konnte demonstriert werden, dass die Relokalisierung von PIP1-Aquaporinen aus dem ER in die Plasmamembran durch eine direkte Wechselwirkung mit PIP2-Aquaporinen zu Stande kommt. Allerdings war diese Arbeit kein Beweis für die Bildung von Heterotetrameren als Grund für die Änderung der Verteilung. Weiterhin konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass PIP1 nicht auch in Abwesenheit von PIP2 in die Plasmamembran gelangen können, da zwar eine Färbung der Plasmamembran mit FM4-64, aber keine Kolokalisationsuntersuchungen durchgeführt wurde (Zelazny *et al.*, 2007). Im selben System wurde ein diacidisches Motiv identifiziert, das für den effektiven Transport von Aquaporinen in die Plasmamembran verantwortlich ist. Allerdings ist auch in dieser Arbeit keine Kolokalisationsanalyse mit FM4-64 vorgenommen worden, obwohl die Protoplasten mit diesem gefärbt wurden (Zelazny *et al.*, 2009)

#### 4.4 Tetramerisierung

Von Kaliumkanälen ist bereits lange bekannt, dass sie miteinander Heteromere bilden können (Dreyer *et al.*, 1997; Finn *et al.*, 1998; Lebaudy *et al.*, 2008). Die Frage, ob auch eine Heterotetramerisierung von PIP1- und PIP2-Aquaporinen einen Einfluss auf deren Funktion hat, wird in der Literatur bereits seit langem diskutiert. Insbesondere deuten viele Arbeiten darauf hin, dass der regulatorische Effekt einer eventuellen Tetramerisierung eng mit deren Verteilung in der Zelle verknüpft ist. Insofern ist aus den Literaturberichten schwierig zu entnehmen, welche Effekte aus einer Oligomerbildung und welche aus einer Umverteilung der Aquaporine resultieren. Vielfach wird argumentiert, dass die beobachteten Effekte auf eine Wechselwirkung der Aquaporine miteinander zurückzuführen ist, ohne dass quantifiziert wird, wie sehr sich durch die Koexpression von PIP1- und PIP2-Aquaporinen die Proteinmenge in der Plasmamembran ändert (Fetter *et al.*, 2004; Zelazny *et al.*, 2007; Zelazny *et al.*, 2009). Dasselbe gilt für fast alle Untersuchungen von Expressionsprofilen in verschiedenen Bereichen der Pflanze. In diesen Veröffentlichungen wird oft argumentiert, dass die unterschiedliche Expression in verschiedenen Pflanzenteilen ausschlaggebend für die Wasser- und Gasleitfähigkeit der jeweiligen Zellen ist. Meist werden aber nur phänomenologisch die Expressionsmuster in den Teilen der Pflanze beschrieben, ohne eine stichhaltige Begründung für die variierenden Mengen an Aquaporinen in diesen zu geben (Hachez *et al.*, 2006a; Hachez *et al.*, 2006b). Die Heterotetramerisierung tierischer Aquaporine wird bereits seit langem untersucht. Es konnte belegt werden, dass es zwei Varianten von AQP4 gibt, die sich in

der Länge ihrer N-Termini unterscheiden, trotzdem aber miteinander Heterotetramere bilden (Neely *et al.*, 1999). AQP2, AQP3 und AQP4 bilden keine Heterotetramere (van Balkom *et al.*, 2003). Zwar wird eine mögliche Heterotetramerisierung pflanzlicher Aquaporine intensiv in der Literatur diskutiert, da viel darauf hindeutet, dass die Heteromerisierung von PIP1- und PIP2-Aquaporinen einen regulatorischen Effekt auf die Wasserpermeabilität der Membran hat, aber es ist bisher noch nicht gelungen, einen Beweis für eine Heteromerisierung zu führen. Dies hat mehrere Ursachen, so zum Beispiel, dass bis jetzt nur ein einziges pflanzliches PIP-Aquaporin, SoPIP2;1, kristallisiert wurde oder dass es experimentell aufwendig ist, die Tetramere von den anderen Oligo- und Monomeren zu trennen. Mit der Dichtegradientenzentrifugation konnte vor kurzem eine schnelle und einfache Methode zur Trennung von Aquaporinoligomeren eingeführt werden (Buck *et al.*, 2007). Diese sollte zum Nachweis einer Heteromerisierung von NtAQP1 und NtPIP2;1 verwendet werden.

## 5 Ziele der Arbeit

In der hier vorliegenden Arbeit sollten die Tabak-Aquaporine NtPIP2;1 und NtAQP1 C-terminal mit dem C-terminalen bzw. N-terminalen Teil des Gelb-Fluoreszierenden Proteins (*engl.*: Yellow Fluorescent Protein, YFP) fusioniert und die Fusionsprodukte in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden. Interagieren die beiden verschiedenen Monomere miteinander, so kommt es zur Regeneration eines kompletten YFP (Kerppola, 2008). Über dessen Fluoreszenz kann die Verteilung der Proteine in den Zellen mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie beobachtet werden. Damit ist es auch möglich, den relativen Anteil der Aquaporine in der Plasmamembran über Kolokalisationsanalysen mit dem die Plasmamembran färbenden Farbstoff FM4-64 zu bestimmen. Die Funktionalität der Proteine sollte im Protoplast- Schwellungstest durch „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie und –fluorometrie untersucht werden (Laize *et al.*, 1999; Soveral *et al.*, 2006). Diese Methode hat den Vorteil, dass die gewonnenen Daten auf mehreren tausend klonalen *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen beruhen. In Experimenten mit *Xenopus laevis*-Oozyten wird dagegen pro Messung die Wasser- bzw. CO<sub>2</sub>-Durchlässigkeit einer einzelnen Zelle analysiert, was leicht zu statistisch wenig gesicherten Aussagen führt. Durch eine Korrelation der Funktionsuntersuchungen mit dem Anteil der Fluoreszenz in der Plasmamembran sollen die Wasser- und CO<sub>2</sub>-Durchlässigkeiten der Protoplastenplasmamembran auf die relative Proteinmenge bezogen werden. Dadurch kann der Einfluss der Tetramerisierung auf die Leitfähigkeiten der Aquaporine bestimmt werden. Die Aussage, dass PIP1-Aquaporine alleine niemals in die Plasmamembran gelangen (Zelazny *et al.*, 2009) sollte überprüft werden. Weiterhin sollte die Natur der Wechselwirkung zwischen NtAQP1 und NtPIP2;1 überprüft werden. Die Frage in diesem Zusammenhang war, ob PIP1 und PIP2 Aquaporine miteinander Heterotetramere bilden oder ob die YFP-Fluoreszenz durch ein Aggregieren von NtAQP1-/ NtPIP2;1-Homotetrameren generiert wird.



## II Ergebnisse

---

### 1 Mikroskopische Untersuchungen zur Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1

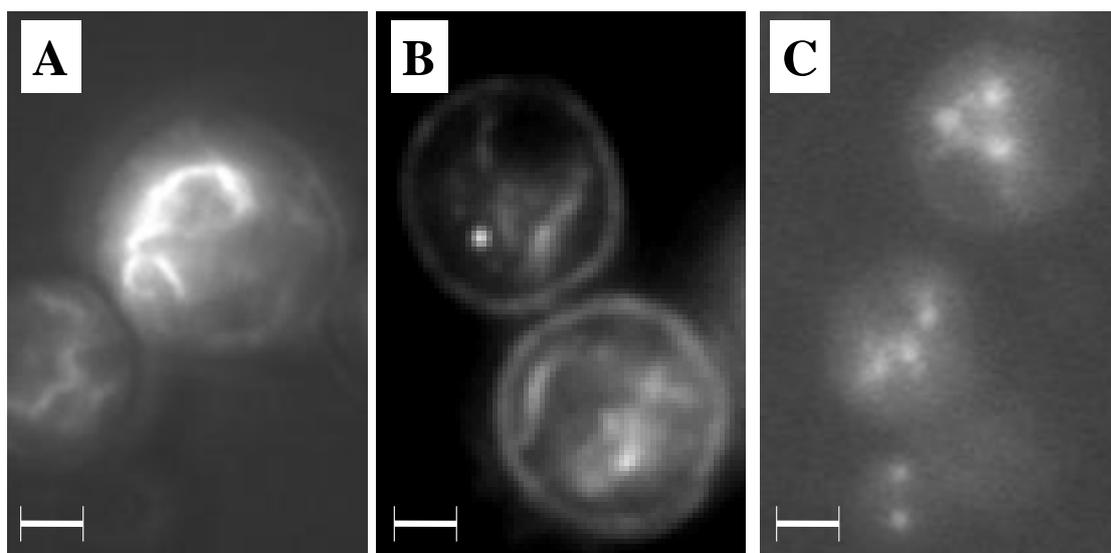
Mit dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob PIP1-Aquaporine mit PIP2-Aquaporinen interagieren und ob diese Wechselwirkung einen Einfluss auf die Verteilung dieser Proteine in der Zelle hat. Zur Untersuchung der Fragen wurde das BiFC-System verwendet (*engl.*: Bimolecular Fluorescence Complementation). Es hat die für die Interaktions- und Lokalisationsanalysen vorteilhafte Eigenschaft, dass bei einer Oligomerisierung der untersuchenden Membranproteine ein Gelb-Fluoreszierendes Protein (*engl.*: Yellow Fluorescent Protein, YFP) gebildet wird, das die Membranen, in denen die Proteine lokalisiert sind, markiert.

#### 1.1 Interaktionsanalyse von NtAQP1 und NtPIP2;1 in *S. cerevisiae*

Um die Verteilung der pflanzlichen Aquaporine NtAQP1, einem Vertreter der PIP1-Aquaporine aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) und NtPIP2;1, einem PIP2-Aquaporin, zu untersuchen, wurden diese C-terminal mit dem N- bzw. C-terminalen Teil des Gelb-Fluoreszierenden Proteins (YFP) fusioniert (YN bzw. YC) und in *Saccharomyces cerevisiae* heterolog exprimiert. Die so produzierten Konstrukte NtAQP1-YC, NtAQP1-YN, NtPIP2;1-YC und NtPIP2;1-YN wurden in drei Kombinationen miteinander exprimiert: NtAQP1-YC + NtAQP1-YN, NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN und NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN. Bildeten die Konstrukte miteinander stabile Oligomere (Tetramere), so wurde durch Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation aus den beiden Hälften ein intaktes, fluoreszentes YFP generiert. Weitfeldbilder der Fluoreszenz der jeweiligen transformierten Hefen zeigen deutliche Unterschiede in der Verteilung der Fusionsproteine. Von den weit mehr als 300 Bildern, die pro Konstruktkombination aufgenommen wurden, ist hier je ein repräsentatives dargestellt (Abbildung II 1.1). Schon auf diesen Bildern (die im Vergleich zu Bildern, die mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen wurden, eine geringe Auflösung haben) ist zu erkennen, dass bei Koexpression von NtAQP1-YC und NtAQP1-YN eine Färbung der Plasmamembran durch das YFP (als Produkt der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation) erfolgt (Abbildung II 1.1 A). Diese Lokalisation der Fluoreszenz in der Zellmembran ist auch deutlich bei den beiden weiteren Kombinationen NtAQP1-YC zusammen mit NtPIP2;1-YN (Abbildung II 1.1 B) und NtPIP2;1-YC zusammen mit NtPIP2;1-YN (Abbildung II 1.1 C) zu sehen. Zusätzlich zu der Färbung der äußeren Membran bei Koexpression von NtPIP2;1-YC und NtPIP2;1-YN ist bei diesen Bildern zu erkennen, dass die YFP-Fluoreszenz zum größten Teil in Kompartimenten innerhalb der Zellen und in Vesikeln zu finden ist. Da sich die Vesikel, in denen die Aquaporine ins Zellinnere transportiert werden, von der Zellmembran abschnüren, liegt der Verdacht nahe, dass es sich dabei um

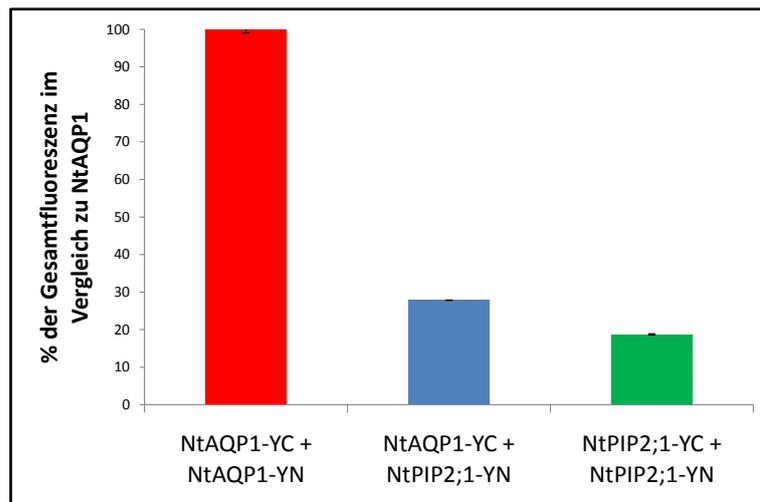
*clathrin-coated vesicles* handelt. Diese haben eine Größe von etwa 90 nm (Ockleford *et al.*, 1977), welche mit einem Lichtmikroskop nicht auflösbar ist.

Um zu überprüfen, ob man auf Grund der Größe ausschließen kann, dass es sich bei diesen Vesikeln um *clathrin-coated vesicles* handelt, wurden zur Ermittlung ihrer Größe 14 Vesikel mit einer zweidimensionalen Gaußverteilung angepasst. Der Durchmesser der Partikel wurde mit  $172 \pm 21$  nm bestimmt. Da dies etwa dem errechneten Durchmesser des Fokus des konfokalen Mikroskops entspricht, muss man folgern, dass der Durchmesser der Partikel kleiner oder gleich dem Durchmesser des Fokus ist und auf den Bildern nicht die Partikel, sondern die Intensitätsverteilung im Fokus auf den Bildern abgebildet ist.



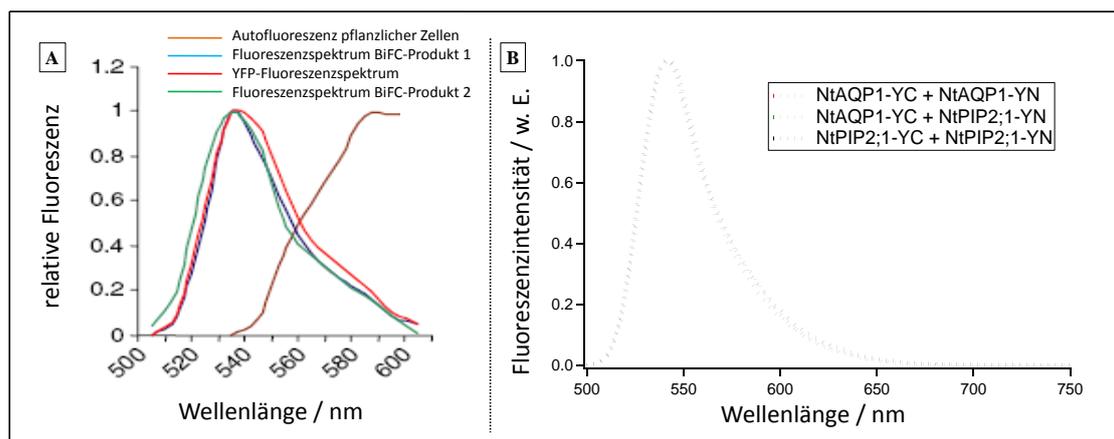
**Abbildung II 1.1:** YFP-Fluoreszenz in *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen des BiFC-Produkts. **A:** NtAQP1-YC + NtAQP1-YN. **B:** NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN; **C:** NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN. Die Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Zellen sind am größten bei Koexpression von NtAQP1-YC und NtAQP1-YN. Bei NtAQP1-YC und NtPIP2;1-YN sind sie deutlich geringer, ebenso wird bei NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN verhältnismäßig nur sehr wenig Fluoreszenz beobachtet. Größenbalken: 1µm.

Um zu ermitteln, in welchem Verhältnis die Fluoreszenzen bei den verschiedenen in Hefe exprimierten Konstruktkombinationen stehen, wurden die Fluoreszenzintensitäten vieler Bilder, die bei gleicher Anregungsleistung und gleicher Auflösung aufgenommen wurden, gemittelt. Um sie miteinander vergleichen zu können, wurde der jeweilige Hintergrund ebenfalls gemittelt und von den betreffenden Gesamthelligkeiten subtrahiert. Das Ergebnis dieser Mittelungen ist in Abbildung II 1.2 zu sehen. Aus der Graphik ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz in Hefen, die NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN (Abbildung II 1.1 B) exprimieren, nur 28% der Fluoreszenz in Hefen, die NtAQP1-YC + NtAQP1-YN (Abbildung II 1.1 A) exprimieren, ausmacht. Wird in der Hefe NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN (Abbildung II 1.1 C) exprimiert, so sind es nur 19%.



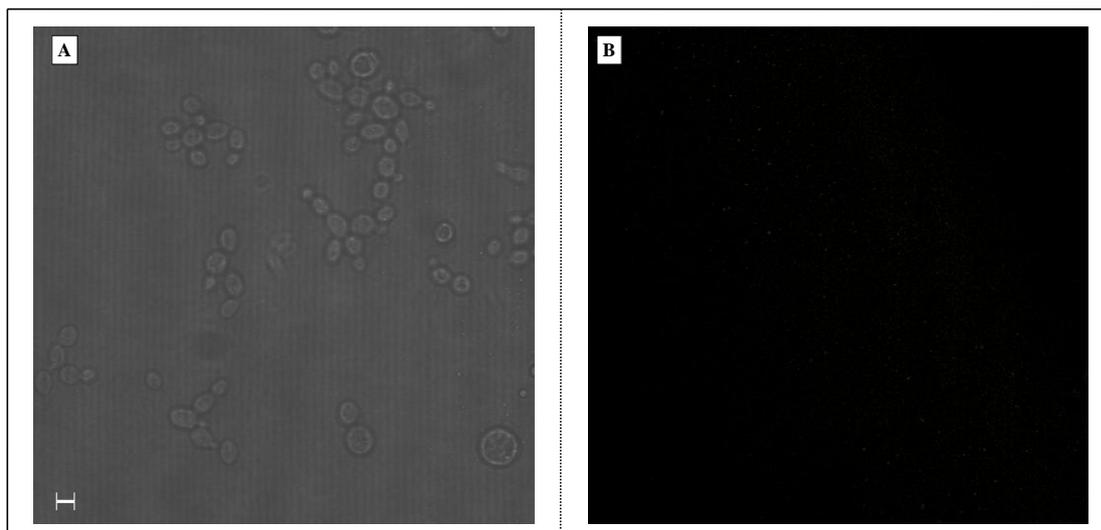
**Abbildung II 1.2:** Vergleich der relativen mittleren Helligkeiten der konfokalen Bilder. Rot: NtAQP1-YC + NtAQP1-YN, blau: NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN, grün: NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN.

Um auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten Fluoreszenz um Autofluoreszenz der Hefen oder um intrinsische Fluoreszenz handelt, die sich durch Interaktion des YC oder YN mit intrazellulären Proteinen bildet, wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen, die belegen sollten, dass es sich beim beobachteten Fluoreszenzsignal tatsächlich um YFP-Fluoreszenz handelt. Die aufgenommenen Spektren stimmen sehr gut mit BiFC-Produktspektren aus der Literatur überein, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich bei der Fluoreszenz tatsächlich um YFP-Fluoreszenz handelt (Abbildung II 1.3). Zur Kontrolle wurden unter den gleichen Bedingungen Fluoreszenzspektren mit nicht transformierten bzw. mit transformierten Hefen, bei denen die Expression der Fusionsproteine nicht induziert wurde, aufgenommen. Diese Zellen wiesen keine spezifische Fluoreszenz auf.



**Abbildung II 1.3:** Vergleich von aus der Literatur übernommenen (Bracha-Drori, K. et al. 2004) und mit transformierten Hefen selbst aufgenommenen Fluoreszenzspektren. **A:** braun: Autofluoreszenz pflanzlicher Zellen, blau: Fluoreszenzspektrum BiFC-Produkt 1, rot: YFP-Fluoreszenzspektrum, grün: Fluoreszenzspektrum BiFC-Produkt 2, **B:** rot Fluoreszenzspektrum NtAQP1-YC+NtAQP1-YN; grün: Fluoreszenzspektrum NtAQP1-YC+NtPIP2;1-YN, schwarz: Fluoreszenzspektrum NtPIP2;1-YC+NtPIP2;1-YN.

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde ein hefeeigener ABC-Transporter, MDL1p (Multidrug Transporter Like), mit YN C-terminal fusioniert und zusammen mit NtAQP1-YC in Hefe exprimiert. Nach der Induktionszeit, die die Entwicklung der BiFC-Fluoreszenz in den Hefen benötigt, damit eine Untersuchung der Aquaporin-Interaktion in der ganzen Zelle möglich ist (26 bis 32 h), wurden die Hefen mikroskopiert. Es kam nicht zur Entwicklung von YFP-Fluoreszenz durch unspezifische Interaktion von YC mit YN (Abbildung II 1.4).

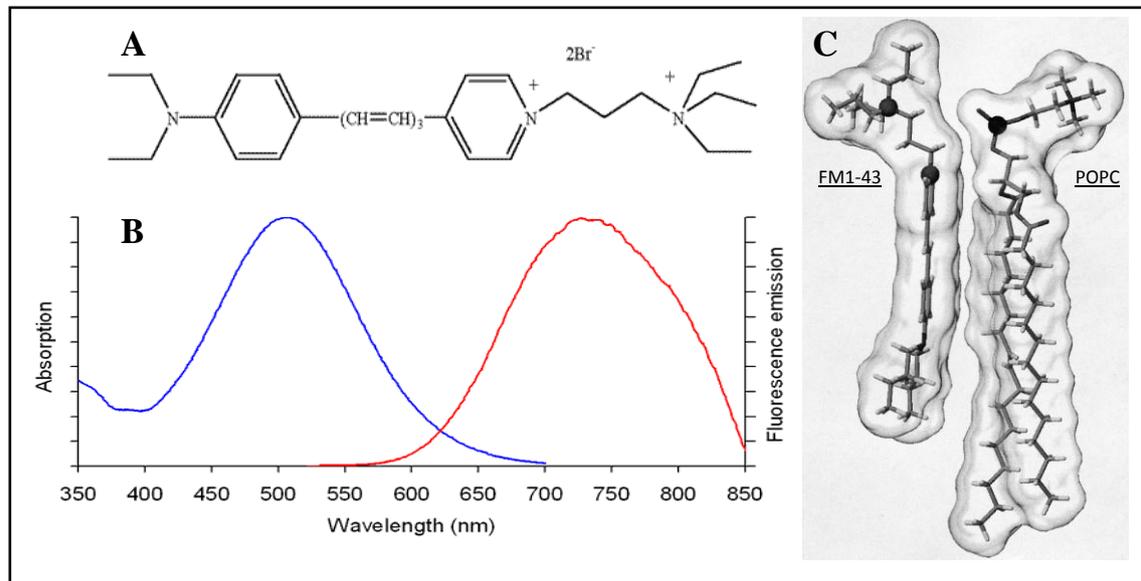


**Abbildung II 1.4:** Test der Zufälligkeit der Interaktion von YC und YN mit NtAQP1-YC und MDL1p-YN. **A:** Hellfeldaufnahme der NtAQP1-YC und MDL1p-YN exprimierenden Hefen. **B:** konfokalmikroskopisches Bild der in A präsentierten Hefen, aufgenommen unter den Bedingungen, die für die BiFC-Konstrukte verwendet wurden. Größenbalken: 3  $\mu\text{m}$ .

## 1.2 Der Farbstoff FM4-64 im Hefesystem

Der amphiphile Styryl-Farbstoff FM4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenyl-hexatrienyl)pyridiniumdibromid) kann genutzt werden, um Membranen spezifisch zu markieren. Durch Vergleich der Lokalisation von FM4-64 mit der Lokalisation der zu untersuchenden fluoreszent markierten Proteine (hier Aquaporine) können verlässliche Aussagen über deren Lokalisation, zum Beispiel im Plasmalemma, getroffen werden. Mit FM4-64 kann allerdings nicht nur nachgewiesen werden, dass die Proteine in die Zellmembran gelangen, sondern man kann auch ermitteln, in welchem Verhältnis die Aquaporine in der Plasmamembran zur Gesamtaquaporinmenge in der Zelle vorliegen. Aus der Strukturformel des Farbstoffs FM4-64 ist leicht zu erkennen, dass dieser wegen seiner lipophilen Bereiche in Membranen interkalieren kann (Abbildung II 1.5 A). Sein Absorptions- und sein Emissionsspektrum in CHAPS-Micellen zeigen, dass sein Fluoreszenzspektrum nicht mit dem des YFP überlappt, was eine vollständige Detektion des emittierten Lichts beider Fluorophore erlaubt (Abbildung II 1.5 B). Die für Versuche dieser Art entscheidende Eigenschaft des Farbstoffs ist, dass

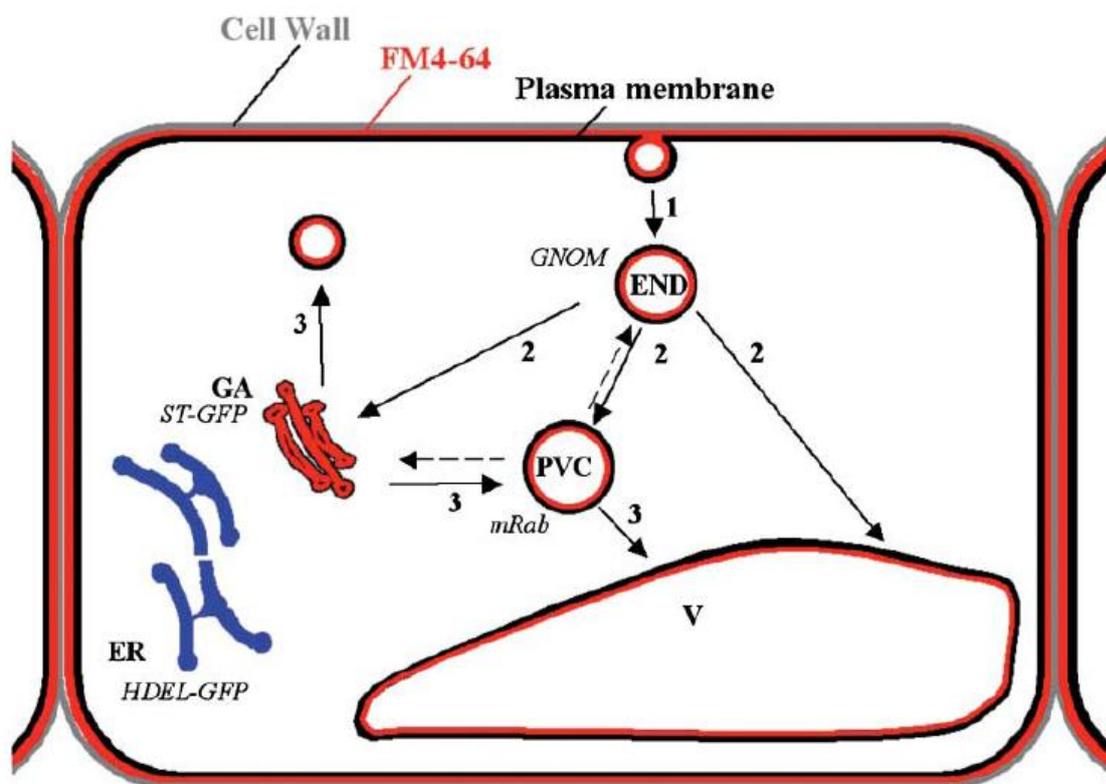
er in wässriger Lösung praktisch nicht fluoresziert. Erst nachdem er zwischen die Phospholipide einer biologischen Membran interkaliert ist, wird er fluoreszent. Abbildung II 1.5 C zeigt einen mit FM4-64 praktisch identischen Farbstoff, FM1-43, und dessen relative Lage zu 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), einem Phospholipid.



**Abbildung II 1.5:** Der Fluoreszenzfarbstoff FM 4-64. **A:** Strukturformel des Farbstoffs (Vida, T. A. and Emr, S. D. 1995), **B:** Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffs in CHAPS-Micellen (<http://probes.invitrogen.com/media/spectra>); **C:** FM1-43, ein mit FM4-64 fast identischen Farbstoff, und dessen relative Lage zum Phospholipid POPC (Schote, U. and Seelig, J. 1998)

Abbildung II 1.6, entnommen aus (Bolte *et al.*, 2004), zeigt den Weg des Farbstoffs in einer Pflanzenzelle vom Plasmalemma ins Innere der Zelle, wo er letztlich in die vakuoläre Membran gelangt. Der Farbstoff färbt das Plasmalemma sofort durch Insertion und Verankerung in der äußeren Schicht des Plasmamembranbilayers. Nach der Internalisierung durch Endozytose befindet sich der Farbstoff in der inneren Schicht der endozytotischen Vesikel und aller anderen Organellen, die FM4-64 danach färbt. Nach 30 Minuten Anfärben werden verschiedene Wege des FM4-64 beobachtet: Von der Plasmamembran in intrazelluläre Organellen (1), zwischen intrazellulären Organellen (2), oder vom Golgi Apparat (GA) zum Zelläußeren (Exozytose) oder zur Vakuole (3). FM4-64 färbt endozytisch-intermediäre Vesikel (END), prävakuolare Kompartimente (PVC), den Golgi Apparat (GA) und die Membran der Vakuole (V: Vakuole). Das Endoplasmatische Reticulum (ER) und die Hülle des Zellkerns werden nicht gefärbt. Die Färbung möglicher END führt zum direkten Transport endozytotischer Vesikel vom Plasmalemma zu den Organellen (1). Das Färben von PVC, GA oder vakuolärer Membranen kann auf Grund des direkten Transportweges zwischen END und diesen Kompartimenten erfolgen (2). Vesikel, die sich vom GA abschnüren, werden ebenfalls angefärbt und sind entweder exozytotisch (und für die Plasmamembran bestimmt) (3)

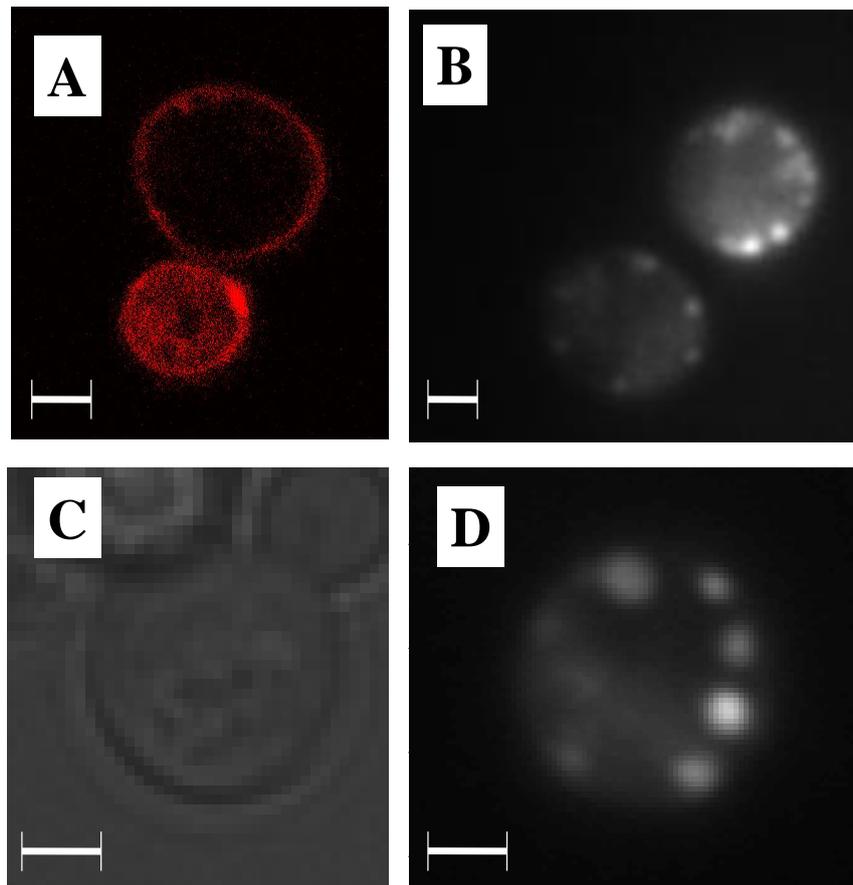
oder sie werden zur Vakuole transportiert, wobei sie die PVC auf ihrem Weg zur lytischen Vakuole (V) anfärben (3).



**Abbildung II 1.6:** Modell möglicher Wege der Membranfärbung durch FM4-64 in Pflanzenzellen. FM4-64 färbt die Plasmamembran sofort durch Insertion und Verankerung in den Plasmamembranbilayer. Nach Internalisierung durch Endozytose beobachtet man nach 30 Minuten verschiedene Wege des FM 4-64: In intrazelluläre Organellen (1), zwischen intrazellulären Organellen (2), vom Golgi Apparat (GA) zum Zelläußeren (Exozytose) oder zur Vakuole (3). FM4-64 färbt endocytisch- intermediäre Vesikel (END), prävakuolare Compartimente (PVC), den Golgi Apparat (GA) und die Membran der Vakuole (V: Vakuole). Das Endoplasmatische Reticulum (ER) und die Hülle des Zellkerns werden nicht gefärbt. (Bolte, S. et al. 2004)

Obwohl dieser Farbstoff schon vielfach zur Färbung von Plasmamembranen pflanzlicher und tierischer Zellen benutzt wurde, wurde er nur selten zur Untersuchung der Lokalisation von Membranproteinen in Hefen verwendet. Dennoch gibt es Literaturberichte, nach denen man den Farbstoff auch für Untersuchungen sowohl der Plasmamembran als auch der Vakuole von Hefezellen verwenden kann (Vida and Emr, 1995). Um zu verifizieren, dass sich der Farbstoff in Hefezellen wie in pflanzlichen Zellen verhält, wurden SY1- und W303-Hefezellen mit FM4-64 inkubiert und direkt danach mikroskopiert. Sowohl konfokalmikroskopische Aufnahmen einer mit FM4-64 behandelten Hefezelle direkt nach Beendigung der Inkubation (Abbildung II 1.7 A) als auch Weitfeldbilder (Abbildung II 1.7 B) zeigen, dass der Farbstoff auch im Hefesystem die Eigenschaft hat, sich erst in die Plasmamembran einzulagern. Danach wird er in Vesikeln ins Innere der Zelle transportiert (Abbildung II 1.7 B und D). Um zu kontrollieren, dass es sich bei den mikroskopierten Objekten um Hefezellen handelt, wurden gleichzeitig zu den Fluoreszenzbildern Hellfeldaufnahme der über ihre

Fluoreszenz dargestellten Hefen gemacht (Abbildung II 1.7 C ist eine Hellfeldaufnahme der in Abbildung II 1.7 D abgebildeten Hefezelle). Nicht gezeigt ist, dass man nach ungefähr einer Stunde die gesamte Farbstofffluoreszenz in Kompartimenten innerhalb der Hefezellen findet. Auf Grund der Tatsache, dass der Farbstoff sich letztlich in der vakuolären Membran der Hefe befindet, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den angefärbten Kompartimenten um die Vakuole handelt.



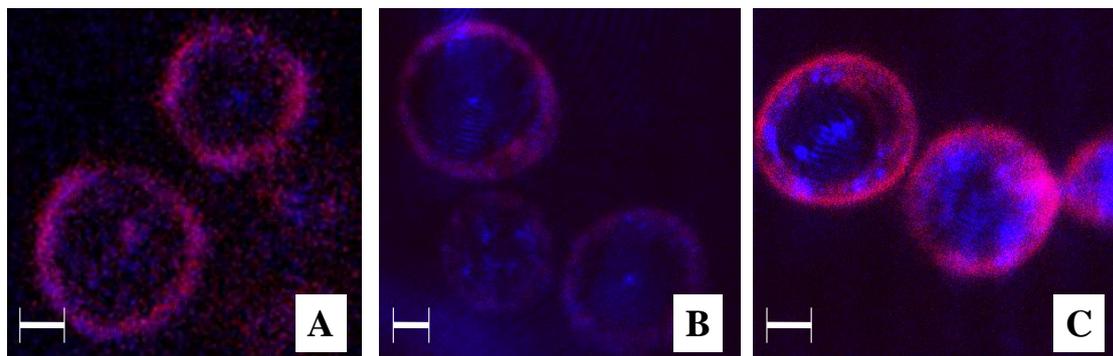
**Abbildung II 1.7:** *A:* konfokalmikroskopische Aufnahme der FM4.64-Fluoreszenz in der Hefepasmamembran. *B:* farbstoffgefärbte Vesikel, die sich von der Plasmamembran abschnüren. *C:* Hellfeldaufnahme der in *D* über die Fluoreszenz in ihren Membranen dargestellten Hefe. Größenbalken: 1 µm.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man folgern, dass der Farbstoff im Hefesystem die in der Literatur aufgeführten Eigenschaften aufweist (Vida *et al.*, 1995). Der nächste Schritt war, zu belegen, dass man diese Lokalisation des Farbstoffs nutzen kann, um zu prüfen, ob auch NtAQP1 alleine (ohne NtPIP2;1) mit FM4-64 in der Plasmamembran kolokalisiert

### 1.3 Lokalisationsanalyse von NtAQP1 und NtPIP2;1 in *S. cerevisiae*

Nachdem dargestellt wurde, dass die beiden Aquaporine NtAQP1 und NtPIP2;1 interagieren und stabile Heteromere bilden (Abbildung II 1.1 B), stellte sich die Frage, ob

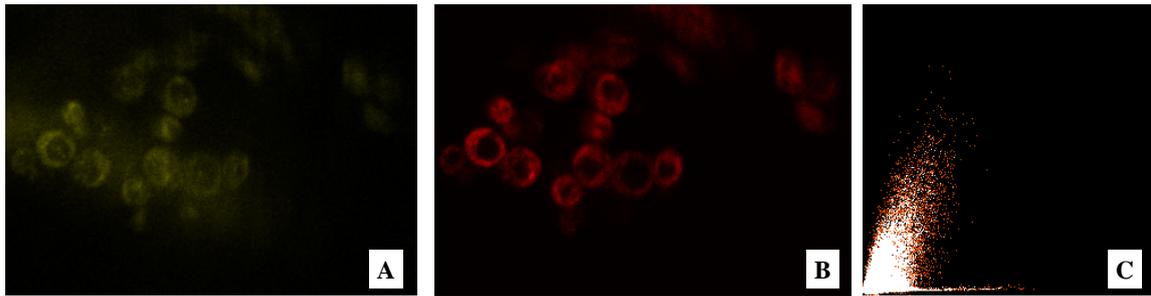
diese Interaktion zwischen NtAQP1 und NtPIP2;1 einen Einfluss auf die Verteilung der Aquaporine in der Zelle hat. Deshalb wurden Kolokalisationsanalysen der aus der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation entstandenen YFP-Fluoreszenz und der Fluoreszenz des Farbstoffs FM4-64 durchgeführt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und zuerst mit dem ImageJ-Plug-In „RGB Merge“ ausgewertet. Bei dieser Methode der Kolokalisationsanalyse werden die beiden zu untersuchenden Bilder unterschiedlich eingefärbt (blau: YFP; rot: FM 4-64) und der kolokalisierte Bereich erhält eine dritte Färbung (rosa). Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurden pro Konstruktkombination etwa 100 Bilder auf diese Weise bearbeitet. In Abbildung II 1.8 ist das Ergebnis einer solchen Analyse dargestellt.



**Abbildung II 1.8:** Kolokalisationsanalyse der Konstruktkombinationen mit FM 4-64 in Hefe durch Übereinanderlegen der Bilder und Farbkodierung der kolokalisierten Bereiche. **A:** NtAQP1-YC + NtAQP1-YN; **B:** NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN; **C:** NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN. Größenbalken: 1 µm

Aus diesen Bildern ist ersichtlich, dass die Farbstofffluoreszenz bei allen drei Kombinationen der Aquaporine in der Zellmembran mit der YFP-Fluoreszenz kolokalisiert, denn auf allen Bildern ist deutlich ein rosa Ring um die Zellen erkennbar. Deshalb kann man hier feststellen, dass sowohl NtAQP1-YC + NtAQP1-YN (Abbildung II 1.8 A) als auch NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN (Abbildung II 1.8 B) und NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN (Abbildung II 1.8 C) in der Plasmamembran lokalisiert sind.

Um die Kolokalisierung weiter zu verifizieren, wurden mit dem ImageJ Plugin „Colocalization Finder“ Korrelationskoeffizienten der Bilder nach Pearson ermittelt. Je größer bei dieser Methode der erhaltene Koeffizient ist, umso wahrscheinlicher ist eine Kolokalisation der Helligkeiten auf den betrachteten Bildern. Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen 1 und -1 annehmen, wobei ein Quotient von 1 eine völlige Kolokalisation, ein Quotient von 0 keine Kolokalisation bedeutet. Abbildung II 1.9 zeigt ein typisches Beispiel der Korrelation von NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN mit FM4-64.

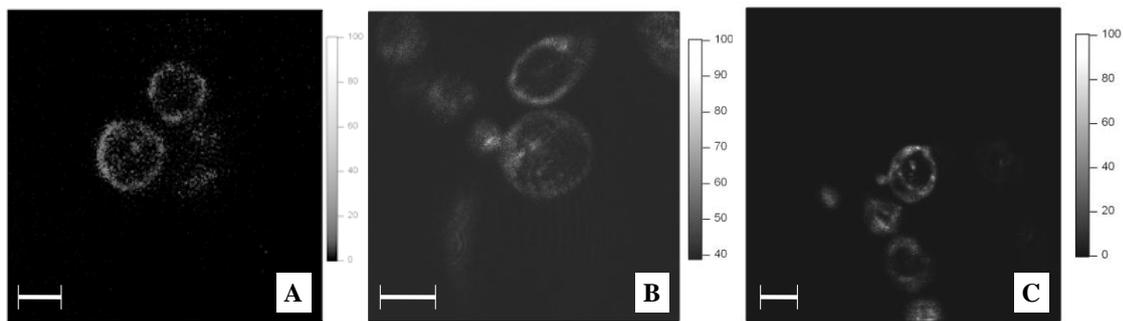


**Abbildung II 1.9:** Ermittlung von Pearsons Korrelationskoeffizient ( $R_r$ ). **A:** NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN; **B:** FM 4-64-Färbung derselben Zellen; **C:** Scatter Plot der Kolokalisationsanalyse der Bilder A und B. Aufgetragen ist die Intensität der Pixel auf Bild A gegen die Intensitäten auf Bild B.

Der Korrelationskoeffizient ( $R_r$ ) beträgt für die in Abbildung II 1.9 dargestellten Bilder 0,3. Dies ist ein typischer Wert für die Kombination NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN. Bei allen untersuchten Bildern ergab sich ( $n = 25$ ) ein  $R_r$  zwischen 0,25 und 0,3. Um zu testen, welche Aussagekraft dieser Wert (0,3) hat, wurde Bild B randomisiert und die zufällig zusammengesetzten Varianten von Bild B wieder mit Bild A kolokalisiert. Es ergab sich ein  $R_{\text{random}}$  von 0,05. Bei den beiden anderen Kombinationen (NtAQP1-YC + NtAQP1-YN und NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN) lag der  $R_r$  einheitlich zwischen 0,2 und 0,25.

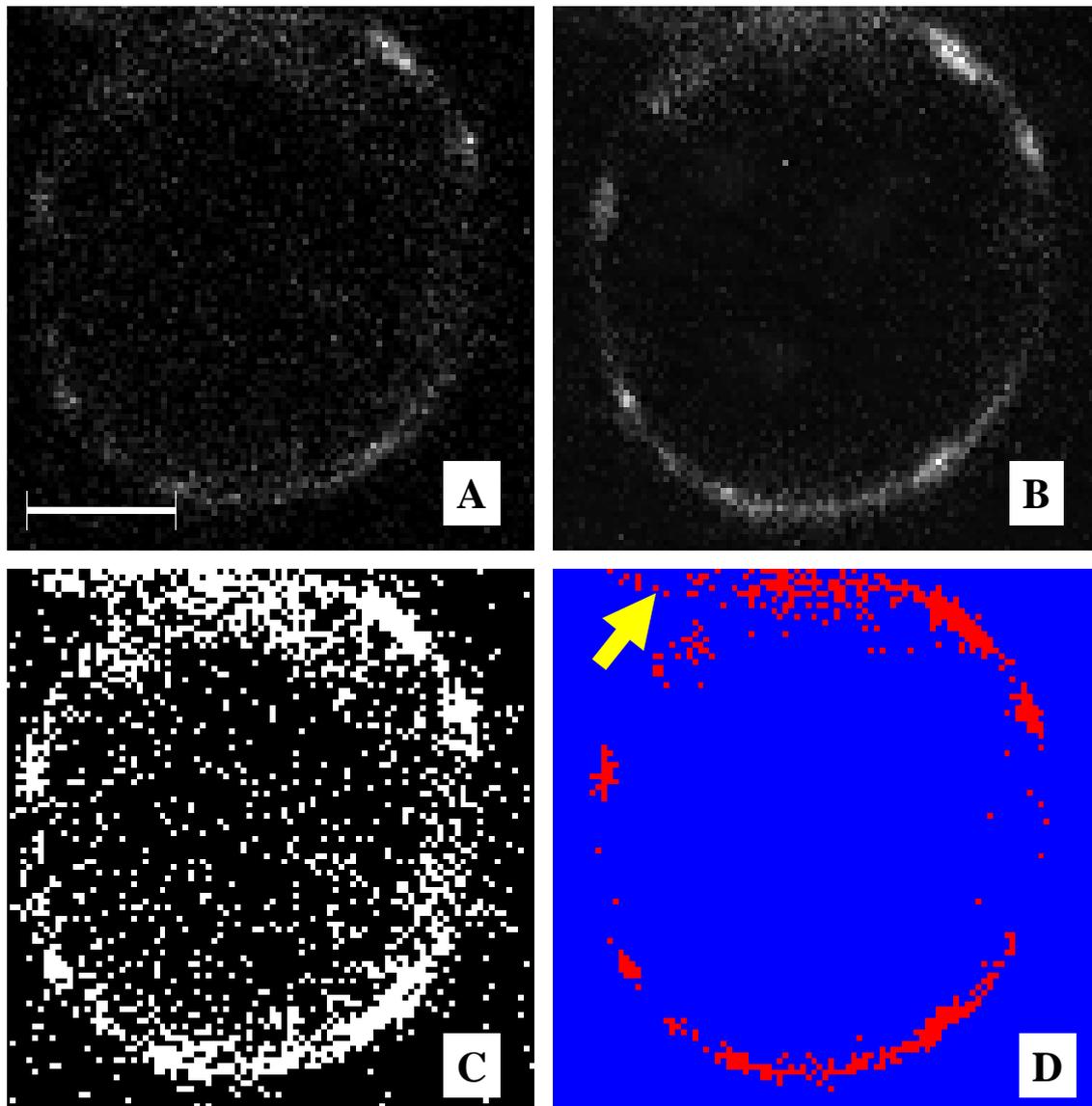
## 5.1 Quantifizierung der relativen Proteinmenge in der Plasmamembran

Nachdem über Pearsons Korrelationskoeffizient gezeigt werden konnte, dass die Fluoreszenzsignale auf beiden Bildern kolokalisiert sind, wurden die Analyse und vor allem die Quantifizierung der Fluoreszenz in der Membran intensiver verfolgt. Um zu bestimmen, wie viel Fluoreszenz in der Membran im Verhältnis zu der Gesamtfluoreszenz ausmacht, wurde als erstes eine Kolokalisationsmatrix aus den YFP- und den FM4-64-Bildern nach (Kirber *et al.*, 2007) erstellt. Abbildung II 1.10 stellt diese Kolokalisationsmatrizen für alle drei Kombinationen der Aquaporinkonstrukte in Hefen dar.



**Abbildung II 1.10:** Kolokalisationsmatrizen der Konstruktkombinationen mit FM 4-64 in Hefe. **A:** NtAQP1-YC + NtAQP1-YN; **B:** NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN ; **C:** NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN. Bei allen drei Kombinationen ist eine Kolokalisationen mit dem Farbstoff deutlich zu erkennen. Die Helligkeitsintensitätsbalken neben den Bildern sind ein Maß für die Zufälligkeit der Kolokalisation. Je geringer der Wert, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit. Größenbalken: 3 µm.

Auch diese Methode lässt eine Kolokalisation des YFP-Signals mit der FM4-64 – Fluoreszenz als wahrscheinlich erscheinen (Abbildung II 1.10). Wichtig war es für die weitere Analyse, die YFP-Fluoreszenz in der Membran gegen die in intrazellulären Kompartimenten abzugrenzen. Hierzu wurde ein Bild erzeugt, auf dem nur noch kolokalisierte Pixel enthalten waren. Allen diesen Pixeln wurde der Wert 1 zugeordnet. Dann wurde die Original-YFP-Aufnahme mit diesem 0-1-Bild multipliziert. Indem man dieses so erhaltene Bild wieder durch das Original-YFP teilt, erhält man den relativen Anteil der Fluoreszenz in der Membran. In Abbildung II 1.11 ist der Verlauf einer solchen Bildanalyse an Hand von vier Bildern dargestellt. Hier wird eine Aufnahme der YFP-Fluoreszenz einer NtAQP1-YC und NtPIP2;1-YN exprimierenden W303-Hefezelle (Abbildung II 1.11 A) mit einer der FM 4-64 – Fluoreszenz in der Membran derselben Zelle (Abbildung II 1.11 B) korreliert. Das Ergebnis dieser Analyse ist eine Kovarianzmatrix, in der der Hintergrund 0 und alle Pixel, die ein Fluoreszenzsignal darstellen, 1 gesetzt wurden (Abbildung II 1.11 C). Nach Multiplikation der 0-1-Kovarianzmatrix mit dem ursprünglichen YFP-Fluoreszenzsignalbild erhält man ein Bild, auf dem nur noch Pixel zu sehen sind, die auf den beiden ursprünglichen Bildern kolokalisiert sind (Abbildung II 1.11 D).

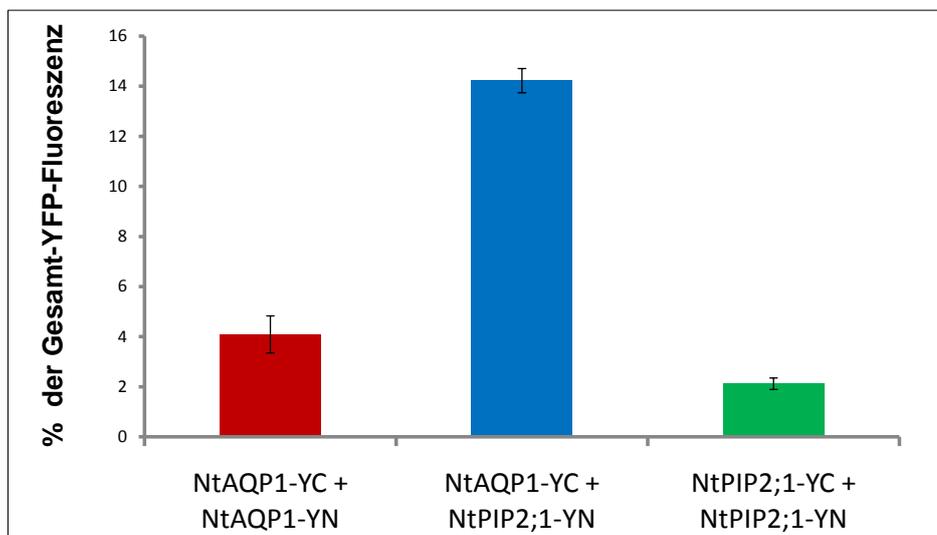


**Abbildung II 1.11:** schematisches Vorgehen der quantitativen Kollisionsanalyse: **A:** YFP-Fluoreszenz einer NtAQP1-YC und NtPIP2;1-YN exprimierenden Hefezelle; **B:** FM 4-64 – Fluoreszenz in der Membran derselben Zelle; **C:** Kovarianzmatrix, Hintergrund = 0, Pixel aus Fluoreszenzsignal = 1; **D:** Ergebnis der Multiplikation der 0\_1-Kovarianzmatrix mit dem YFP-Fluoreszenzsignal. Auf C ist nur noch zu sehen, was auf den beiden ursprünglichen kolokalisiert ist. Größenbalken: 1  $\mu$ m.

In Abbildung II 1.11 ist auch das größte Problem bei der Auswertung der bearbeiteten Bilder gut zu erkennen. Der Pfeil (Abbildung II 1.11 D) weist auf eine zweite Zelle, deren Fluoreszenzsignal in die Quantifizierung der relativen Fluoreszenz in der Zellmembran eingehen würde. Bilder der in Abbildung II 1.11 dargestellten Art scheiden deshalb für die Analyse aus.

Der letzte Schritt war es, zu quantifizieren, welcher Anteil der Gesamtfluoreszenz in der Plasmamembran gefunden werden kann. Denn dieser ist proportional zum Anteil der exprimierten Aquaporine, der in die Zellemembran transportiert wird. Dazu wird die Gesamtheitlichkeit des Bildes, das durch Multiplikation der 0-1-Kovarianzmatrix mit dem YFP-Fluoreszenzbild erhalten wurde, durch die Gesamtheitlichkeit des Original-YFP-

Fluoreszenzsignalbild dividiert. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung II 1.12 abgebildet.

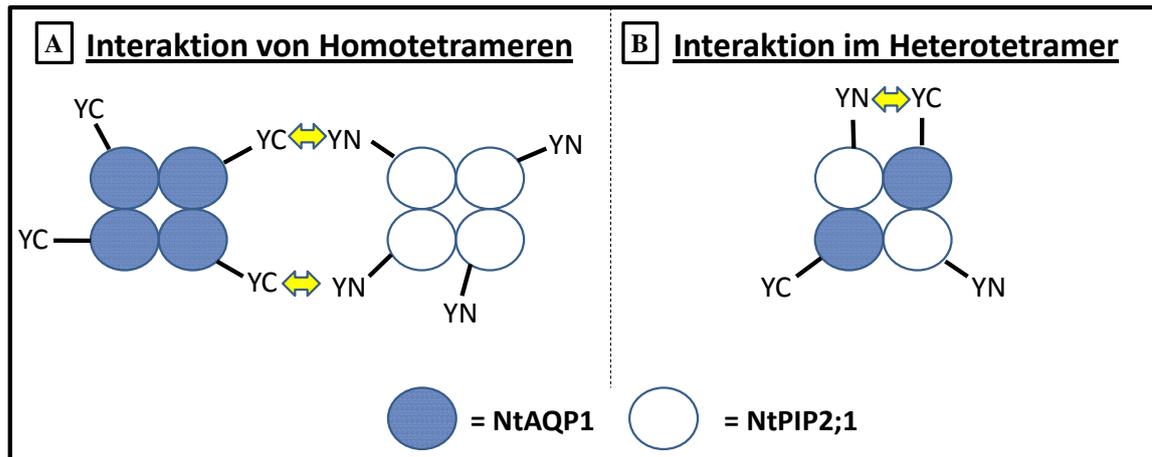


**Abbildung II 1.12:** Anteil der Fluoreszenz in der Plasmamembran an der Gesamtfluoreszenz der Zellen. Rot: NtAQP1-YC + NtAQP1-YN, blau: NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN, grün: NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN.

Der Anteil an Aquaporinen, der in die Plasmamembran transportiert wird, ist bei einer Koexpression von NtAQP1-YC und NtPIP2;1-YN mit 14% am Größten. Werden NtAQP1-YC und NtAQP1-YN exprimiert, so landen nur 4% der Gesamtproteinmenge in der Membran, bei einer Koexpression von NtPIP2;1-YC und NtPIP2;1-YN sind es nur 2%.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NtAQP1 und NtPIP2;1 im heterologen Hefesystem miteinander interagieren und dass diese Wechselwirkung gravierende Auswirkungen auf die Verteilung der Proteine in der Zelle hat.

Damit ist aber nicht die Frage nach der Natur dieser Interaktion beantwortet. Es kann sich hierbei um eine dauerhafte Annäherung von NtAQP1- und NtPIP2;1-Homotetrameren handeln, bei der sich die beiden Homotetramere so lange nahe genug kommen, dass sich aus den YC, die von einem Homotetramer exponiert werden, und den YN, die an die Aquaporine im anderen Homotetramer fusioniert wurden, zusammen ein intaktes YFP bilden kann. Genauso möglich ist aber auch die Bildung von Heterotetrameren aus NtAQP1 und NtPIP2;1, also die Entstehung von Tetrameren, in denen sowohl NtAQP1 als auch NtPIP2;1 zu finden sind (Abbildung II 1.13). Letztere Möglichkeit ist durchaus denkbar, denn die beiden Proteine zeigen eine Sequenzähnlichkeit von 68%, wobei die Interaktionsflächen der Proteine praktisch gleich sind. Die wesentlichen Unterschiede in den Aminosäuresequenzen findet man an den C- bzw. N-Termini.



**Abbildung II 1.13:** Mögliche Arten der Wechselwirkung zwischen den Aquaporinen NtAQP1-YC und NtPIP2;1-YN, bei denen durch Interaktion von YC und YN ein intaktes YFP gebildet werden könnte. **A:** Interaktion von Homotetrameren. **B:** Bildung von Heterotetrameren.

## 2 Proteinbiochemische Untersuchungen zur Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1

Um zu untersuchen, wie NtAQP1 und NtPIP2;1 miteinander wechselwirken, wurden die folgenden Konstrukte bzw. Konstruktkombinationen in Hefen exprimiert:

- NtAQP1-YC
- NtAQP1-YC + NtPIP2;1
- NtPIP2;1
- 4xNtPIP2;1

Aus den Hefen wurden die Membranen (Gesamtmembranen) isoliert, aus welchen die Membranproteine solubilisiert wurden. Das Solubilisat wurde einer Saccharosedichtegradientenzentrifugation (2% bis 12% Saccharose) unterzogen. Der Gradient wurde danach fraktioniert, die Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dieses Gel wurde mit einer Western-Blot Analyse auf den Aquaporin Gehalt in den jeweiligen Fraktionen untersucht.

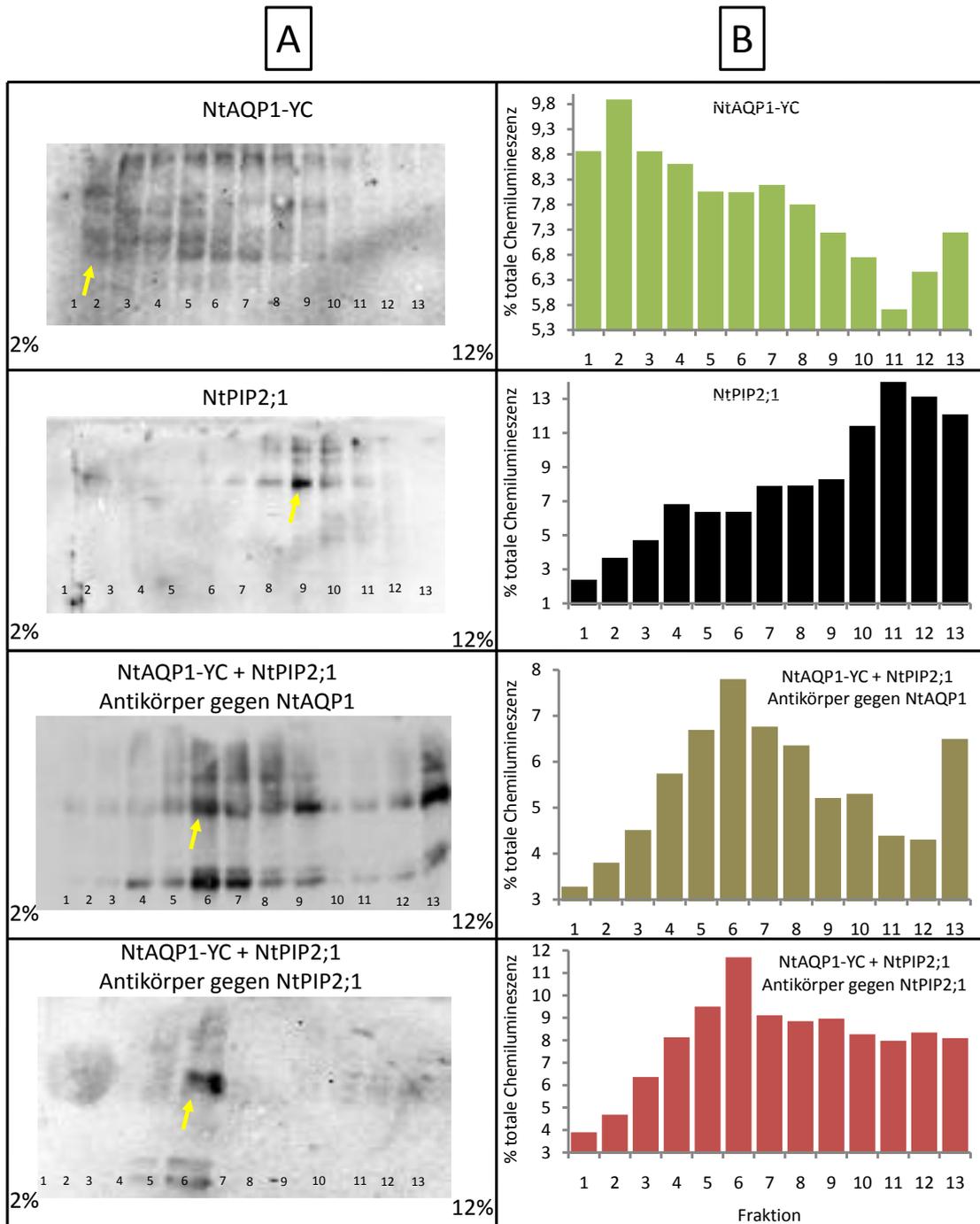
4xNtPIP2;1 ist ein künstliches NtPIP2;1-Homotetramer, das aus vier durch eine kurze Verbindungsregion getrennten, auf dem selben Plasmid liegenden NtPIP2;1-cDNS-Sequenzen besteht. Dieses Konstrukt wurde, ebenso wie mit 1% SDS denaturiertes NtPIP2;1, als Kontrolle für die Verteilung der Tetramere bzw. Monomere im Gradienten benutzt.

Die unterschiedlichen Fraktionen wurden abgenommen und die Anwesenheit von Aquaporinen in diesen über eine SDS-PAGE und darauf folgendes Western Blotting detektiert. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Gradient auf 14 Fraktionen verteilt, wobei die erste Fraktion immer der geringsten Dichte (~2% Saccharose), die 14. der größten Dichte (~12% Saccharose) entspricht. Die 14. Fraktion wurde für die Auswertung

verworfen, da in dieser die dichtereren Monomere sedimentierten. Bei einer Einbeziehung dieser Fraktion in die Quantifizierung der relativen Proteinmenge pro Fraktion wäre diese damit verfälscht worden.

In Abbildung II 2.1 sind die Chemilumineszenzsignale dargestellt, die aus der Bindung des gegen das jeweilige Aquaporin spezifischen Antikörpers resultieren. Für die Auswertung der Verteilungen der Chemilumineszenzsignale auf die verschiedenen Fraktionen, die auf der rechten Seite der Abbildung II 2.1 zu sehen sind (Abbildung II 2.1 B), wurden immer je zwei Fraktionierungen gemittelt. Deutlich ist zu erkennen, dass die NtAQP1-YC- Homotetramere ihre höchste Aufenthaltswahrscheinlichkeit in den ersten sechs Fraktionen, vor allem aber in der ersten, zweiten oder dritten Fraktion, das heißt bei einer geringen Dichte, haben (Abbildung II 2.1 A und B, erste Reihe). Die NtPIP2;1- Homotetramere dagegen findet man in Fraktionen, die einer größeren Dichte entsprechen, vor allem in den Fraktionen 11, 12, und 13 (Abbildung II 2.1 A und B, zweite Reihe). Würde es ausschließlich zur Bildung von Homotetrameren kommen, so müsste man diese auch bei einer Koexpression von NtAQP1-YC und NtPIP2;1 in der Verteilung antreffen, das heißt es müsste zwei Maxima oder eine gleichmäßige Verteilung der Aquaporine über alle Fraktionen geben. Dies ist aber nicht der Fall, denn egal mit welchem Antikörper (gegen NtAQP1 oder gegen NtPIP2;1) man das Signal der Proteinverteilung detektiert, in beiden Fällen ist das Maximum der Proteine in der sechsten Fraktion zu finden (Abbildung II 2.1 A und B, dritte und vierte Reihe). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich beim der Interaktion der Proteine nicht Homotetramere zusammenlagern, sondern dass es zur Bildung von Heterotetrameren kommt.

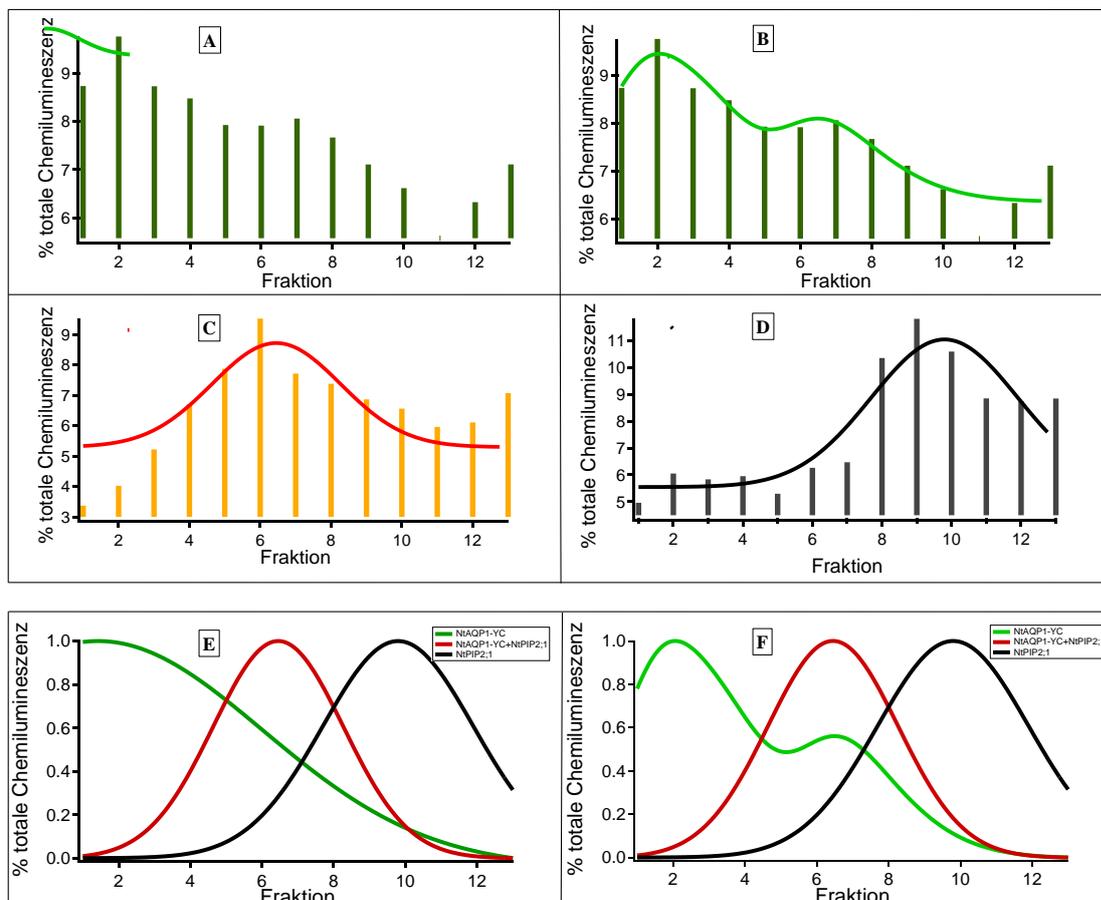
Die Verteilung des 4xNtPIP2;1-Konstrukt wird hier nicht explizit gezeigt. Sie verhielt sich prinzipiell gleich wie die dargestellte Verteilung des NtPIP2;1 (Abbildung II 2.1 B, zweite Reihe), allerdings hatte sie sehr viel deutlicher den Großteil der Proteine im Gradienten in Fraktion 11, und in den Fraktionen 1-7 war fast kein 4xNtPIP2;1 nachzuweisen. Das denaturierte NtPIP2;1, dessen Verteilung ebenfalls nicht dargestellt ist, war vor allem in den Fraktionen 2 und 3 zu finden, es muss unter dem Einfluss des SDS zu der Bildung leichterer Oligomere gekommen sein.



**Abbildung II 2.1:** A: Chemilumineszenzsignal aus Bindung des spezifischen Antikörpers gegen die jeweiligen Konstrukte, die heterolog in der Hefe exprimiert wurden. Zu sehen ist die relative Verteilung der Aquaporine im Dichtegradienten. Die linke Seite (Fraktion 1) der Nitrocellulosemembranen entspricht dabei 2% Saccharose, die rechte Seite (Fraktion 14) 12%. B: über je zwei Gele gemittelte Verteilung der Chemilumineszenzintensitäten in den Fraktionen des Dichtegradienten.

Um die Signifikanz der Verteilungen zu testen, wurden sie mit einer einfachen bzw. doppelten Gaußverteilung angepasst. In Abbildung II 2.2 A ist eine einfache, in Abbildung II 2.2 B eine doppelte Gaußanpassung der in Abbildung II 2.2 gezeigten Verteilung von NtAQP1-YC angegeben. Bei der Konstruktkombination NtAQP1-YC +

NtPIP2;1 wurden die vier Verteilungen (zwei mal Antikörper gegen NtPIP2;1 und zwei mal Antikörper gegen NtAQP1) gemittelt.



**Abbildung II 2.2:** A: einfache Gaußanpassung der Verteilung von NtAQP1-YC im Dichtegradienten. B: doppelte Gaußanpassung der NtAQP1-YC Verteilung im Dichtegradienten. C: einfache Gaußanpassung der NtAQP1-YC + NtPIP2;1 Verteilungen im Dichtegradienten. D: einfache Gaußanpassung der NtPIP2;1 Verteilungen im Dichtegradienten. E: Vergleich der einfachen und F: der doppelten Gaußanpassung (NtAQP1-YC) mit den einfachen Anpassungen (NtAQP1-YC + NtPIP2;1, NtPIP2;1) der in **Abbildung II 2.1** gezeigten Verteilungen der Aquaporine im Dichtegradienten.

Der Mittelwert der Gaußverteilung war für:

NtAQP1-YC:	$1,4 \pm 2,5$	(einfache Gaußverteilung)
	$2,6 \pm 1,8$ und $6,4 \pm 0,8$	(doppelte Gaußverteilung)
NtAQP1-YC + NtPIP2;1:	$6,5 \pm 0,5$	
NtPIP2;1:	$9,8 \pm 0,3$	

Für NtAQP1-YC + NtPIP2;1 (Abbildung II 2.2 C) und NtPIP2;1 (Abbildung II 2.2 D) unterschied sich das Hauptmaximum einer doppelten Gaußanpassung nicht signifikant vom Mittelwert einer Anpassung der Verteilungen mit einer einfachen Gaußanpassung, wobei das zweite Maximum dicht neben dem ersten lag und nur einen Bruchteil (maximal 20%) der Amplitude des Hauptmaximums aufwies. Auffällig ist, dass bei einer doppelten Gaußanpassung der NtAQP1-YC-Verteilung der Abstand zwischen dem Mittelwert der

zweiten Anpassung und dem Mittelwert der Verteilung des NtAQP1-YC + NtPIP2;1 überlappt, die beiden Maxima statistisch also nicht getrennt ist. Dennoch macht dieses zweite Maximum nur etwa ein Drittel des ersten aus. Diese Verteilungen im Gradienten sind ein Indiz dafür, dass es sich bei der Art der Interaktion der PIP-Aquaporine um die Bildung von Heteromtetrameren handelt.

Um zu zeigen, dass (a) es sich bei den BiFC- Produkten tatsächlich noch um funktionale Aquaporine handelt, und (b) wie die Heterotetramerbildung die Funktion der Proteine beeinflusst, wurden die oben angeführten Konstruktkombinationen in *S. cerevisiae*-Zellen exprimiert und in Stopped Flow Experimenten funktionell charakterisiert. Die hierfür durchgeführten Messungen sind im folgenden Abschnitt aufgeführt.

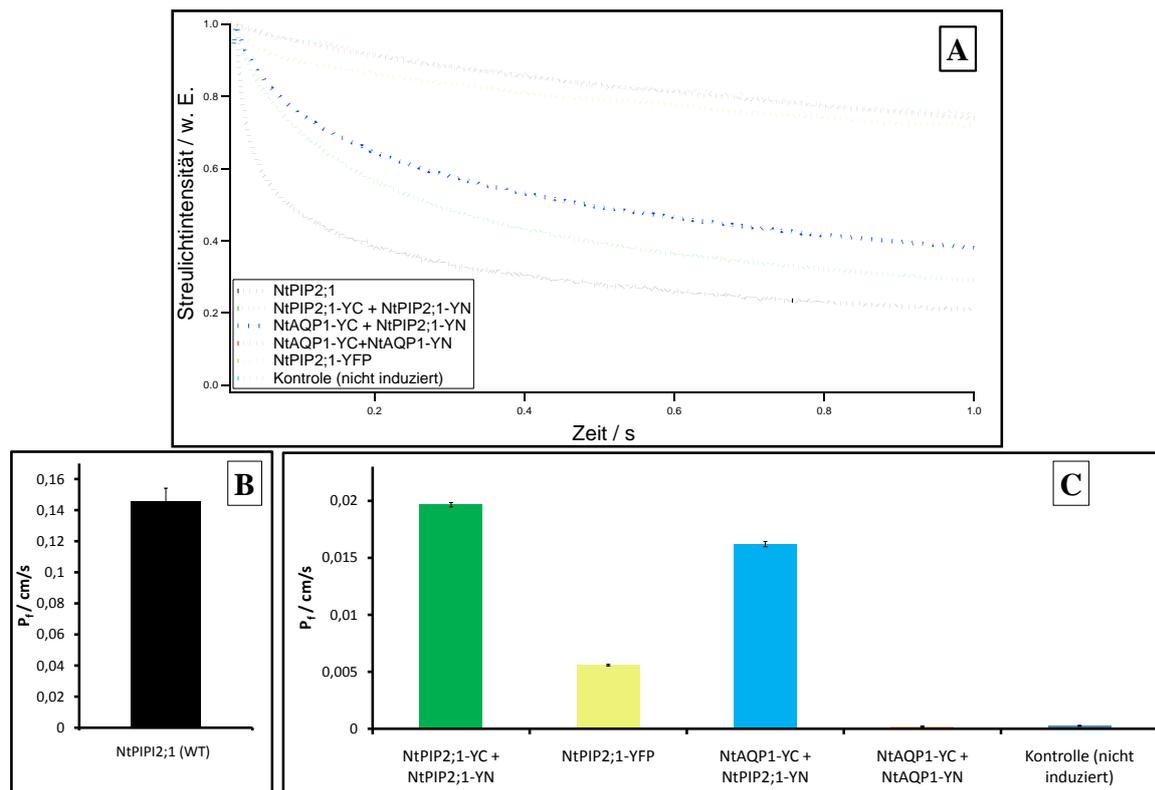
### 3 Funktionelle Untersuchungen zur Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1

Mittels Stopped-Flow Spektrophotometrie bzw. Spektrofluorometrie wurde die Funktionalität der Aquaporin-YFP Fusionsproteine überprüft. In diesem Abschnitt sind Durchschnittskurven der Wasser- bzw. Kohlendioxid- Leitfähigkeitsmessungen zusammen mit den aus diesen Kurven gewonnen osmotischen Permeabilitätskoeffizienten ( $P_f$ )- bzw. Permeabilitätskoeffizienten für  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CO}_2}$ )-Werten dargestellt.

#### 3.1 Einfluss der Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1 auf die Wasserleitfähigkeit

Die Ergebnisse der Stopped-Flow-Wasserleitfähigkeitsmessungen sind in Abbildung II 3.1 zusammen mit den  $P_f$ -Werten aller untersuchten Konstrukte angegeben. Die Hefen wurden vor den Messungen 28 bzw. 32 (NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN) Stunden in Induktionsmedium inkubiert. Diese Inkubation wurde gewählt, da sich erst nach dieser Zeit soviel BiFC-Produkt gebildet hatte, dass eine mikroskopische Beobachtung der Verteilung der Fluoreszenz in den ganzen Hefezellen möglich war. Die Messungen dienten nicht nur zum Beleg, dass die Aquaporine noch funktionell waren, sondern damit sollte auch der Einfluss des angehängten YFP auf die entsprechenden Leitfähigkeiten charakterisiert werden.

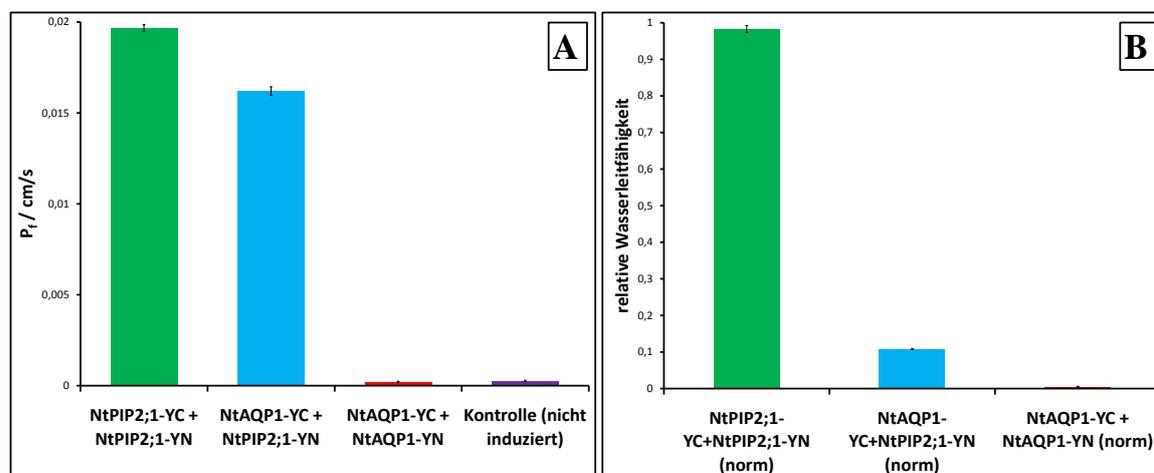
Die Wasserleitfähigkeit des Wildtyp-NtPIP2;1 ist größer als die aller anderen Konstrukte, was darauf schließen lässt, dass die Leitfähigkeit durch die Bildung des YFP in erheblichem Umfang eingeschränkt wird. Sie beträgt bei Koexpression von NtPIP2;1-YC und NtPIP2;1-YN zusammen nur etwa ein Zehntel der Leitfähigkeit des Wildtyps. (NtPIP2;1:  $0,145 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$ ; NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN:  $0,02 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$ ; NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN:  $0,016 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$ ; NtAQP1-YC + NtAQP1-YN:  $0,0002 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$ ).



**Abbildung II 3.1:** Messung der Wasserleitfähigkeit der verwendeten Konstrukte nachdem sich das BiFC-Produkt gebildet hat. **A:** Vergleich der über die Änderung der Streulichtintensität aufgenommenen Kinetiken. **B:** P<sub>f</sub>-Wert für NtPIP2;1. **C:** Vergleich der P<sub>f</sub>-Werte der verwendeten Konstrukte.

Insgesamt zeigten sich alle Konstrukte in ihrer Leitfähigkeit im Vergleich zu den nativen Proteinen reduziert. So resultierte die Koexpression von NtAQP1-YC und NtAQP1-YN in praktisch keiner Leitfähigkeit für Wasser, die Geschwindigkeit des Wassertransportes über die Plasmamembran ist gleich der der uninduzierten Kontrolle (ohne Aquaporine). Dagegen wurde bei der Koexpression von NtAQP1-YC und NtPIP2;1-YN eine verhältnismäßig hohe Wasserleitfähigkeit beobachtet, die man nicht erklären kann, wenn man annimmt, dass bei gleichbleibender Proteinmenge in der Plasmamembran NtAQP1 im Heterotetramer für Wasser durchlässig wird. Die Ergebnisse aus Abschnitt II.1.3 und II.1.4 zeigen, dass diese beiden Annahmen nicht korrekt sind, sondern dass sich bei Koexpression von NtAQP1 und NtPIP2;1 die relative Proteinmenge in der Plasmamembran dramatisch ändert. Zur Charakterisierung der tatsächlichen Membranpermeabilität wurden die relativen Wasserleitfähigkeiten ermittelt. Hierzu wurden die P<sub>f</sub>-Werte mit den Proteinmengen in der Plasmamembran korreliert. Es zeigte sich, dass NtAQP1 durch die Interaktion mit NtPIP2;1 nicht seine Funktion ändert und für Wasser permeabel wird. Die relativen Permeabilitäten sind deshalb für eine korrekte Interpretation der Leitfähigkeitsänderungen von großer Bedeutung, da man aus den Permeabilitätskoeffizienten alleine nicht auf eine tatsächliche Änderung der Funktion der PIP1-Aquaporine schließen kann (Abbildung II 3.2 A und B). Aus der Verknüpfung der relativen Fluoreszenzintensitäten in der Membran und den Ergebnissen der Stopped Flow-Messungen kann man folgern, dass die gesamte Leitfähigkeit bei Koexpression von

NtAQP1 und NtPIP2;1 nicht durch eine gesteigerte Wasserpermeabilität von NtAQP1 zu Stande kommen kann, sondern viel wahrscheinlicher durch eine erhöhte Einbaurrate von NtPIP2;1 in die Plasmamembran.



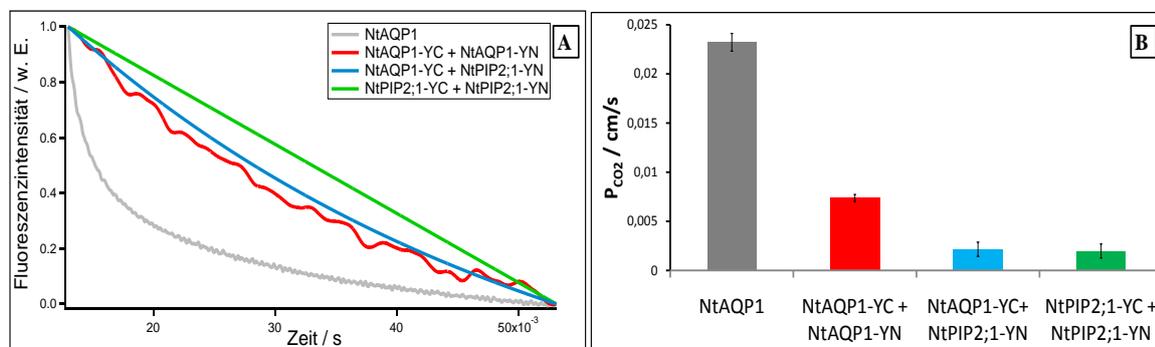
**Abbildung II 3.2:** Vergleich der ermittelten absoluten Permeabilitätskoeffizienten für Wasser der in Hefen exprimierten Aquaporine / Fusionsproteine (A) und der durch Normierung der Permeabilitäten auf die Proteinmenge in der Plasmamembran erhaltenen relativen Koeffizienten (B).

In diesem Zusammenhang wurde untersucht, wie sehr die Bildung des YFP zwischen den Monomeren im Tetramer die Wasserleitfähigkeit beeinflusst. Induktionsreihen über einen Zeitraum von 12 bis 36 Stunden nach Beginn der Induktion bekunden, dass die Wasserleitfähigkeit der NtPIP2;1 alleine exprimierenden Hefen sich in diesem Zeitraum praktisch nicht änderte ( $P_f$ -Werte von  $0,7 \pm 0,05$ ), die der NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN exprimieren dagegen nach 24 Stunden dramatisch einbricht (von  $P_f = 0,6$  (12 bis 24 h) auf  $P_f = 0,15 \pm 0,05$ ). Dasselbe gilt für die NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN exprimierenden Hefen ( $P_f = 0,5$  auf  $P_f = 0,02 \pm 0,06$ ). Dies ist sehr gut mit der Bildung der BiFC-Produkte in Einklang zu bringen, denn nach 28 Stunden wurde in NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN –exprimierenden Hefen Fluoreszenz in der gesamten Zelle beobachtet, bei NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN nach 32 Stunden. NtAQP1-YC + NtAQP1-YN wurde ebenfalls exprimiert und untersucht, führt aber zu keiner Steigerung der Wasserpermeabilität der Hefepasmamembran. Hier sind die Plasmamembranen der Hefen genauso durchlässig wie die der nicht induzierten Negativkontrolle. Die Ergebnisse der Messung der Wasserleitfähigkeit über die Induktionszeit legen nahe, dass es bereits nach 24 Stunden zur Bildung größerer Mengen an BiFC-Produkten kommt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erwartungen, denn durch die Bildung des YFP wird die Dynamik der Aquaporine, die für eine Wasserleitung unerlässlich ist, eingeschränkt. Dies ist ein wichtiges Indiz dafür, dass diese Dynamik von großer Bedeutung für die Wasserleitfähigkeit von Aquaporinen ist. Zusätzlich befindet sich mit dem YFP ein Hindernis vor den Monomerporen, das die Wasserleitfähigkeit der Aquaporine beeinträchtigen könnte. Inwieweit die tatsächliche Blockade des Kanals allerdings einen Einfluss auf die Wasserpermeabilität hat, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Im Hinblick auf das viel diskutierte „Gating“-Modell kann an dieser Stelle gesagt

werden, dass die Pore durch die Anwesenheit des YFP nicht vollständig blockiert wird. Zwar konnte eine Einschränkung der Geschwindigkeit des Wasserflusses, aber kein vollständiger Abbruch des Wasserstroms durch die Aquaporine beobachtet werden.

### 3.2 Einfluss der Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1 auf die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit

Die Ergebnisse der Stopped-Flow-CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeitsmessungen sind in Abbildung II 3.3 zusammen mit den  $P_{CO_2}$ -Werten der untersuchten Konstrukte angegeben. Die Zellen wurden 28 bzw. 32 (NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN) Stunden vor Beginn der Messung in Induktionsmedium inkubiert. Analog zu den Wasserpermeabilitätsmessungen ist die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit des Wildtyp-NtAQP1 größer als die aller anderen Konstrukte und auch die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit wird offensichtlich durch die Bildung des YFP in erheblichem Umfang eingeschränkt. So beträgt sie bei Koexpression von NtAQP1-YC und NtAQP1-YN nur etwa ein Fünftel der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit des unfusionierten NtAQP1. (NtAQP1: 0,023  $\frac{cm}{s}$ ; NtAQP1-YC und NtAQP1-YN: 0,007  $\frac{cm}{s}$ ). Dieser Befund ist ein sehr starkes Indiz, dass es sich bei der über die Änderung der Fluoreszenzintensität beobachteten CO<sub>2</sub>-Einfluss tatsächlich um durch Proteine erleichterte Diffusion handelt. Der drastische Einbruch der CO<sub>2</sub>-Permeabilität muss durch das YFP bedingt sein, das an die Aquaporine fusioniert wurde, da dessen Gegenwart die einzige Veränderung gegenüber den Messungen mit NtAQP1 alleine darstellt.

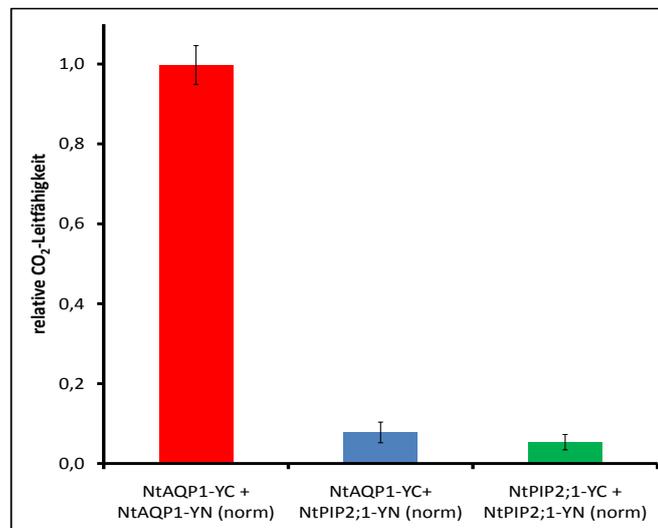


**Abbildung II 3.3:** CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeitsänderungen der Plasmamembranen durch den Einbau der verwendeten Konstrukte (28/ 32 Stunden Inkubationszeit). **A:** Vergleich der Kinetiken der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeitsmessungen der verwendeten Konstrukte. **B:** Vergleich der absoluten CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeitskoeffizienten der Aquaporine.

Die relativen CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeiten (Abbildung II 3.4) verhalten sich den Wasserleitfähigkeiten entsprechend, nur sind die Verhältnisse gerade umgekehrt. Für Hefen, die NtPIP2;1-YN und NtAQP1-YC koexprimieren, wurde genauso wie für die, die NtPIP2;1-YC zusammen mit NtPIP2;1-YN exprimieren, nur ein Zwanzigstel der CO<sub>2</sub>-Permeabilität der Plasmamembran der Hefen, die NtAQP1-YC zusammen mit NtAQP1-YN exprimieren, gefunden (NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN: 0,002  $\frac{cm}{s}$ ; NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN: 0,002  $\frac{cm}{s}$ ). Bei den relativen Kohlendioxidleitfähigkeiten fällt auf, dass die tatsächliche Permeabilität von NtAQP1 für CO<sub>2</sub> erheblich höher zu sein scheint, als es aus

dem Verlauf der mit der Stopped Flow aufgenommenen Kinetiken bzw. den aus diesen Verläufen ermittelten  $P_{CO_2}$ -Werten den ersten Anschein hat.

Auch bei diesen Messungen muss man berücksichtigen, dass sie nach 28 Stunden Inkubationszeit durchgeführt wurden. Dies ist wahrscheinlich nicht die für Stopped Flow-Messungen der Aquaporinaktivitäten optimale Zeit, denn vorhergegangene Ergebnisse belegen, dass die Einbauraten von Aquaporinen nach kürzeren Zeiten deutlich größer sind (Fischer, 2007;Pede, 2008). Die Ermittlung der Einbauraten über kürzere Induktionszeiträume ist leicht möglich, z. B. über Fusionierung kompletter GFP an die Aquaporine. Deren Korrelation mit der dann ermittelten Leitfähigkeit dürfte noch höhere Werte ergeben.



**Abbildung II 3.4:** Vergleich der durch Normierung der absoluten Permeabilitätskoeffizienten auf die Proteinmenge in der Plasmamembran erhaltenen relativen Permeabilitäten der untersuchten Aquaporinkonstrukte für  $CO_2$ .

Bei der Aufnahme von Induktionsreihen zeigte sich, dass Membranen, in die NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN und NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN inkorporiert waren, über den gesamten Beobachtungszeitraum (24 bis 34 Stunden) nur eine geringe  $CO_2$ -Permeabilität aufwiesen. Auch NtAQP1 veränderte seine Leitfähigkeitscharakteristika praktisch nicht. NtAQP1-YC + NtAQP1-YN exprimierende Hefen dagegen änderten ihre  $CO_2$ -Permeabilität. Allerdings fiel diese nur um 30% ab, von einem  $P_{CO_2}$  von 0,9 auf 0,65. Damit war diese Abnahme der Permeabilität für  $CO_2$  nach Bildung des BiFC-Produkts deutlich geringer als die Änderung der Wasserleitfähigkeit von Hefen, die NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN exprimieren (verglichen mit den unfusionierten Wildtypaquaporinen).



### III Diskussion

---

#### 1 Lokalisation von NtAQP1 und NtPIP2;1 in der Plasmamembran

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass NtPIP2;1 (ein Vertreter der PIP2-Aquaporine) und NtAQP1 (ein PIP1-Aquaporin) miteinander *in vivo* Heterotetramere bilden. Die Verteilungen der Aquaporine in den jeweiligen Fraktionen nach der Dichtegradientenzentrifugation sind ein Indiz, dass es sich bei der Art der Interaktion tatsächlich um Heteromerisierung handelt.

Zusätzlich wurde gezeigt dass diese Interaktion eine Veränderung der Verteilung dieser beiden Membranproteine innerhalb der Zelle mit sich bringt. Die in Teil II dargestellten Lokalisationsuntersuchungen stehen dabei im Widerspruch zu einigen kürzlich erschienenen Veröffentlichungen (Zelazny *et al.*, 2007; Zelazny *et al.*, 2009), in denen die These aufgestellt haben, dass pflanzliche PIP1-Aquaporine in Abwesenheit von PIP2-Aquaporinen nicht aus dem ER heraus in die Plasmamembran gelangen. Diese These wird durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kollokalisationsanalysen für das heterologe System *S. cerevisiae* widerlegt.

#### 2 PIP1-PIP2-Wechselwirkung

Die verwendete Methode zur Lokalisierung der Proteine nutzt die Kollokalisierung fluoreszenter Proteine mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 in der Plasmamembran, um den Anteil der Fluoreszenz dieser Proteine in der Plasmamembran an der Gesamtfluoreszenz aller markierten Proteine zu ermitteln. In früheren publizierten Experimenten wurden Fluoreszenzlebensdauer-messungen in einem FRET-System ausgeführt, bei denen die zu untersuchenden Aquaporine jeweils mit CFP oder YFP markiert wurden (Zelazny *et al.*, 2007). Diese Methode hat mehrere Nachteile: (1) Sie ist nicht quantitativ, (2) die Lebensdauer eines angeregten Fluorophors kann in einer Zelle von vielen Faktoren beeinflusst werden und (3) mit dieser Vorgehensweise lässt sich nicht beweisen, dass die verkürzten Fluoreszenzlebensdauern des YFP aus der Bildung eines Heterotetramers resultieren. Zwar wird diskutiert, dass sich CFP und YFP in diesem Heterotetramer so nahe kommen, dass YFP die CFP-Fluoreszenz löschen kann, aber ebenso wahrscheinlich ist, dass sich hierbei Homotetramere so nahe kommen, dass man die beschriebene Fluoreszenzlöschung beobachten kann.

In dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz zur Aufklärung der Natur der PIP1-PIP2-Interaktion verfolgt. Die Bildung eines BiFC-Produktes ist in der Literatur oft schon allgemein als Nachweis einer Heterooligomerbildung akzeptiert (Tao and Maruyama, 2008; Shyu *et al.*, 2008a; Shyu *et al.*, 2008b), da die Reaktionspartner sehr lange (bei den in dieser Arbeit verwendeten Konstruktkombinationen 28 Stunden bzw. 32 Stunden) einen stabilen Komplex bilden müssen, bis es zur Bildung eines intakten YFP kommt.

Die zusätzlich durchgeführten Dichtegradientenzentrifugationen lieferten starke Hinweise, dass es sich bei der Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1 um die Bildung von Heterotetrameren handelt.

In der Literatur wird vielfach berichtet, dass die Lokalisation von PIP im Zytosol oder in der Plasmamembran vom Phosphorylierungsgrad des PIP1 abhängt. So wurde berichtet, dass die Menge an AQP2-Tetrameren in der Plasmamembran vom Phosphorylierungsgrad der Monomere abhängig ist (Kamsteeg *et al.*, 2000). Ebenso ist die Abhängigkeit der Wasserleitfähigkeiten von Oozyten oder Protoplasten von der Phosphorylierung mehrfach dokumentiert (Harvengt *et al.*, 2000). In der Sojabohne erhöht die Phosphorylierung von Nodulin 26 die Wasserdurchlässigkeit. Diese Veränderung der Wasserpermeabilität hängt vom Entwicklungsstadium und vom osmotischen Stress der Pflanze ab (Guenther *et al.*, 2003). Durch den Austausch von Serin 277 gegen Alanin wurde eine Dephosphorylierung dieses C-terminalen Serins von NtPIP2;1 simuliert. Dies führte zur Steigerung der Wasserdurchlässigkeit von NtPIP2;1 um etwa 50% (Fischer, 2007). In Mais und in Arabidopsis ist der Großteil der exprimierten Aquaporine immer phosphoryliert, nur die Menge an ein- oder mehrfach phosphorylierten Aquaporinen scheint einen regulatorischen Effekt, z. B. auf die Einbauraten in die Plasmamembran, zu haben (Maurel, 2007;Maurel *et al.*, 2008).

Auf Grund der in Kapitel II herausgearbeiteten Ergebnisse müsste mit weiteren Experimenten untersucht werden, ob im Heterotetramer die Phosphorylierung von NtAQP1 die Komponente ist, die zur Umverteilung der Aquaporinkomplexe in der Zelle führt. Sollte dies der Fall sein, wäre weiterhin interessant, welchen Effekt ein phosphoryliertes NtAQP1 gegenüber einem nicht-phosphorylierten auf die Verteilung der Heteromere hat. Experimente dieser Art könnte man leicht durch Mutation der möglichen Phosphorylierungsstellen in NtAQP1 durchführen. So kann man die Aminosäure Serin durch Alanin austauschen und damit eine permanente Nicht-Phosphorylierung simulieren. Ebenso kann man das Serin durch Glutamat ersetzen und so, durch die negative Ladung des sauren Glutamats, eine dauerhafte Phosphorylierung simulieren. Mögliche Positionen für solch einen Aminosäureaustausch sind die Serine an Position 129 und die beiden letzten Aminosäuren der NtAQP1-Sequenz, bei denen es sich ebenfalls um Serine handelt. Gerade diese letzten beiden Aminosäuren könnten von großer Bedeutung sein, denn es konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung des Serin 235 von AQP0 ein regulatorischer Effekt auf die Verteilung der Tetramere in der Zelle hat (Golestaneh *et al.*, 2008)

### 3 Lokalisation der Homo- und Heteromere

Neben der vielfach postulierten Heterotetramerisierung, für die die in dieser Arbeit gewonnenen Indizien sprechen, spielen andere Faktoren für die Lokalisation der Aquaporine eine Rolle. So wird diskutiert (Zelazny *et al.*, 2009), dass für den Transport von Aquaporinen in die Plasmamembran ein diacidisches Motiv unbedingt notwendig ist. Dieses Motiv wurde erstmals für den Transport viraler Kaliumkanäle in Pflanzenzellen

beschrieben und ist seitdem in vielen verschiedenen Organismen identifiziert worden (Mikosch *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008b). In den Aquaporinen, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, wurde dieses Motiv an den Positionen vier und sechs nach der Startaminosäure identifiziert (Zelazny *et al.*, 2009). Dieses Motiv ist in ZmPIP2;1, dem homologen Protein zu NtPIP2;1, nicht vorhanden, woraus geschlossen wurde, dass ZmPIP2;1 nicht in die Plasmamembran transportiert wird. In Abbildung III 3.1 sind die ersten 14 Aminosäuren der Aquaporine NtPIP2;1 und NtAQP1 im direkten Vergleich zu ZmPIP2;5 aufgeführt. Die Gegenüberstellung zeigt, dass das identifizierte Motiv in den beiden hier untersuchten Aquaporinen nicht vorkommt. Deshalb sollte keines der beiden Tabakaquaporine in der Plasmamembran zu finden sein.

ZmPIP2;5:	M	A	K	D	I	E	A	A	A	A	H	E	G	K
NtPIP2;1:	M	S	K	D	V	I	E	E	G	Q	V	H	Q	Q
NtAQP1:	M	A	E	N	K	E	E	D	V	K	L	G	A	N
Position:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

**Abbildung III 3.1:** Vergleich der ersten 14 Aminosäuren der Aquaporine ZmPIP2;5, NtPIP2;1 und NtAQP1.

Allerdings fällt auf, dass NtPIP2;1 an der Position 4 ein Aspartat aufweist, und dass zwar nicht an Position 6, dafür aber sowohl an den Positionen 7 und 8 ein Glutamat zu finden ist. Bei NtAQP1 verhält es sich genauso. Auch hier ist kein diacidisches Motiv zu finden. Wenn die gefundene Signalsequenz tatsächlich der allein entscheidende Faktor für die zelluläre Lokalisation der Aquaporine wäre, sollten die beiden Aquaporine nicht in der Plasmamembran vorkommen. Aber in der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass auch die beiden hier untersuchten Aquaporine im heterologen System *S. cerevisiae* in der Plasmamembran anzutreffen sind.

Als weiterer möglicher Faktor wurde oben (Kapitel I 4.2) bereits der Einfluss der Phosphorylierung auf die Verteilung der Aquaporine in der Zelle diskutiert. Es wäre auch denkbar, dass das Motiv, das man in den hier betrachteten Aquaporinen findet, eine veränderte und dadurch weniger effektiv von den entsprechenden Transportproteinen erkannte Variante des diacidischen Motivs ist. Inwiefern diese nicht im diacidischen Motiv liegenden Aminosäuren einen Einfluss auf die Verteilung der Aquaporine in der Zelle haben, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Hier bietet es sich an, durch Aminosäureaustausch veränderte Aquaporine (NtPIP2;1\_I6D bzw NtAQP1\_N4D) zu generieren und die Verteilung dieser Mutanten über Fluoreszenzmarkierung in der Zelle zu untersuchen. Wenn die von Zelazny *et al* aufgestellte These richtig ist, sollte man NtPIP2;1\_I6D ausschließlich in der Plasmamembran und nicht mehr in zytoplasmatischen Kompartimenten antreffen.

## 4 Anwendbarkeit und Aussagekraft der Kollokalisationsanalyse

Einige Probleme, die sich bei der Kollokalisationsanalyse ergeben, sind bereits im Ergebnissteil angedeutet, so zum Beispiel die Tatsache, dass noch keine Maske installiert wurde, die Zellen automatisch an ihrer Form erkennt. Deshalb ist nach jeder Auswertung der Aufnahmen eine nachträgliche Sichtung der Kollokalisationsbilder notwendig. Nur so kann ausgeschlossen werden, dass eventuell Zellen, die nur zu einem Teil abgebildet sind, in die Auswertung von Zellen, die komplett aufgenommen wurden, einfließen. Dieses Problem ließe sich durch Einfügen eines Formfilters umgehen. Das Filtern könnte zum Beispiel durch eine automatisierte Vorselektion der abgebildeten Hefen nach ihrer Größe erfolgen. Nach dieser Auswahl wird ein Bild generiert, auf dem nur eine einzelne Zelle abgebildet ist. Dieses Bild kann dann geglättet werden, damit das so entstandene Bild besser auf die Lokalisation der fluoreszenten Proteine untersucht werden könnte.

Für die Aussagekraft der Ergebnisse muss weiterhin bedacht werden, dass sich der ermittelte prozentuale Anteil der Fluoreszenz in der Plasmamembran an der Gesamtfluoreszenz nur auf einen zweidimensionalen Querschnitt der Zelle bezieht, nicht auf den gesamten Rauminhalt der Zelle. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die Einbautraten sogar noch geringer sind als im Ergebnisteil angegeben.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, welche Vesikel die Aquaporine aus der Membran ins Zellinnere transportiert. Wie im Ergebnisteil bereits gesagt, kann hier nicht eindeutig festgestellt werden, ob die Vesikel zur Gruppe der *clathrin coated vesicles* gehören, da die Ermittlung der Größe der Partikel der Fokusgröße entsprach. Damit kann nur festgestellt werden, dass die Partikel nicht zu Vesikeln gehören können, die größer als etwa 200 nm sind. Diese Frage könnte man aber unter Verwendung verschiedener clathrin-defizienter Mutanten weiter analysieren. Die so gewonnenen Ergebnisse wären von Bedeutung, da so ein weiterer Weg der Regulation der Wasserdurchlässigkeit pflanzlicher Membran weiter erforscht werden könnte. So ist schon lange bekannt, dass die Veränderung der Menge an AQP2 in der apikalen Plasmamembran ein wesentlicher Regulationsmechanismus der Wasserpermeabilität von Epithelzellen der Niere ist (Takata *et al.*, 2008). Man könnte in diesem Zusammenhang weiter klären, ob und wie schnell eventuell die gleichen Mechanismen in Pflanzen von Relevanz sind. Weiterhin wäre es möglich, die Partikelgröße über elektronenmikroskopische Methoden zu ermitteln.

## 5 Funktion der untersuchten Aquaporine

Die mittels der Stopped-Flow-Technik durchgeführten Funktionsmessungen bestätigten bisher gewonnene Befunde zu den jeweiligen Proteinen. So wurde die hohe Wasserleitfähigkeit von NtPIP2;1 bestätigt (Fischer and Kaldenhoff, 2008), NtAQP1 erhöhte die Membranpermeabilität für CO<sub>2</sub> (Uehlein *et al.*, 2003). In früheren, thematisch verwandten Veröffentlichungen wurde dargelegt, dass es sich bei NtPIP2;1 um einen sehr effektiven Wasserkanal handelt, der nicht über Phosphorylierung in Schleife B, wohl aber über den pH-Wert reguliert werden kann (Fischer, 2007; Fischer *et al.*, 2008). Die

Eigenschaft von NtAQP1, den CO<sub>2</sub>-Fluss zu erleichtern, wurde in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt. In jüngster Zeit konnte auch nachgewiesen werden, dass NtAQP1 *in vivo* in der Plasmamembran und in der inneren Chloroplastenmembran zu finden ist. Diese Lokalisation in Chloroplasten untermauert die These, dass es sich bei diesem Protein tatsächlich um einen CO<sub>2</sub>-Kanal handelt (Uehlein *et al.*, 2008). Die Rolle von Aquaporinen als CO<sub>2</sub>-Poren wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Die Kritiker dieses Konzeptes werfen ein, dass Phospholipid-doppelschichten *in vitro* eine sehr hohe CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit aufweisen (Fang *et al.*, 2002; Missner *et al.*, 2008a; Missner *et al.*, 2008b; Missner *et al.*, 2008c). Darüber hinaus kann die Präsenz von *unstirred layer* Wasserschichten an einer biologischen Membran der limitierende Faktor für den CO<sub>2</sub>-Transport über die Membran sein, nicht die An- oder Abwesenheit von Aquaporinen (Antonenko *et al.*, 1993), (Pohl *et al.*, 1998). Die hier präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einer biologischen Membran dagegen die CO<sub>2</sub>-Durchlässigkeit gegenüber einer solchen artifiziellen reinen Phospholipiddoppelschicht deutlich reduziert ist. Denn die Zellen, die NtAQP1 bzw. NtAQP1-YC + NtAQP1-YN exprimierten, haben gegenüber den Hefen, die die beiden anderen Konstruktkombinationen (NtAQP1-YC und NtPIP2;1-YN bzw. NtPIP2;1-YC und NtPIP2;1-YN) exprimieren, eine deutlich höhere Leitfähigkeit. Dies ist umso interessanter, da die Zellen schon jeweils mindestens 28 Stunden in Induktionsmedium inkubiert waren, wobei die größten Einbauraten für NtPIP2;1 und NtAQP1 nach etwa 14 Stunden zu erwarten sind (Fischer, 2007; Pede, 2008). In einer Inkubationsreihe konnte der Nachweis geführt werden, dass diese Steigerung der Durchlässigkeit der Plasmamembran für CO<sub>2</sub> sowohl bei Expression des mit YC bzw. YN markierten NtAQP1 als auch bei der des NtAQP1 alleine über 34 Stunden hinweg eine Eigenschaft der transformierten Hefen bleibt. Beginnend bei zwölf Stunden, über 28 Stunden (der Zeitpunkt, an dem sich genügend BiFC-Produkt gebildet hatte, um die Lokalisation der Fluoreszenz in der ganzen Zelle beobachten zu können) bis hin zu 36 Stunden nach Beginn der Induktion der Proteinexpression blieb die Membranpermeabilität höher als bei den Konstruktkombinationen NtAQP1-YC + NtPIP2;1-YN und NtPIP2;1-YC + NtPIP2;1-YN.

Der Einbau eines zusätzlichen Kanals für CO<sub>2</sub> in die Membran könnte vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse eine physiologische Relevanz haben. Die verringerte CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der Plasmamembran in Hefen, die die beiden anderen Konstruktkombinationen exprimieren, könnte dadurch hervorgerufen werden, dass die Membran mit integralen und peripheren Proteinen besetzt ist, die die freie, CO<sub>2</sub>-durchlässige Phospholipidfläche verringern.

## 6 Regulation der Funktion durch Protein-Protein-Interaktion

Die Koexpression von PIP1- und PIP2-Aquaporinen führt in *Xenopus laevis*-Oocyten zu einer Steigerung der Wasserpermeabilität (Fetter *et al.*, 2004). Es wird deshalb diskutiert, dass eine Koexpression von pflanzlichen PIP1- und PIP2-Aquaporinen die Wasserleitfähigkeit der PIP1-Aquaporine erhöht. In Hefe verhält es sich anders als in

Oozyten. NtPIP2;1 zeigt hier, wie in allen Systemen, in denen es exprimiert wird, eine hohe Wasserleitfähigkeit, und eine Expression von NtAQP1, einem PIP1-Aquaporin, ohne PIP2-Aquaporine resultierte in praktisch keiner Steigerung der Wasserleitfähigkeit gegenüber der uninduzierten Negativkontrolle (Fischer *et al.*, 2008). Aber die Expression von NtAQP1 in Anwesenheit von NtPIP2;1 schränkt nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Wasserdurchlässigkeit von NtPIP2;1 dramatisch ein. Diese gesteigerte Wasserdurchlässigkeit der Membran wird oft mit einer Veränderung der Funktion der PIP1-Aquaporine erklärt, die durch Interaktion mit PIP2-Aquaporinen ihre Funktion ändern und wasserleitend werden (Chaumont *et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen dagegen nahe, dass NtAQP1 im hier untersuchten System seine Funktion nicht ändert, sondern ausschließlich einen gesteigerten Einbau von NtPIP2;1 in die Membran bewirkt. Im Gegensatz zu den oben angeführten Veröffentlichungen deuten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse darauf hin, dass die Wasserleitfähigkeit von NtPIP2;1 durch Interaktion mit NtAQP1 herunter reguliert wird. Denn bei Koexpression von NtAQP1-YC und NtPIP2;1-YN kann über siebenmal mehr Fluoreszenz (bei gleicher Anregungsleistung) in der Plasmamembran beobachtet werden als bei der Expression von NtPIP2;1 alleine. Die so ermittelten relativen Proteinnengen in der Hefepiasmamembran stimmen qualitativ mit in vorhergegangenen, themengleichen Veröffentlichungen überein (Fetter *et al.*, 2004). In Oozytenexperimenten wurde eine zwanzigfache Steigerung der Fluoreszenz des Konstrukts GFP-ZmPIP2;4 in der Plasmamembran beobachtet (verglichen mit der Proteinmenge in der Membran bei Expression von GFP-ZmPIP2;4 alleine), wenn dieses mit ZmPIP1;2 koexprimiert wurde. Unter der Annahme, dass diese Komplexe, deretwegen die Fluoreszenz entsteht, im Mittel zu gleichen Teilen aus den beiden Tabak-Aquaporinen bestehen, bedeutet dies, dass bei der Koexpression mengenmäßig etwa dreimal mehr NtPIP2;1 als bei Expression von NtPIP2;1 alleine in die Plasmamembran gelangt. Dennoch ist die Gesamtwasserleitfähigkeit der Membranen von Hefen, die die beiden Tabak-Aquaporine zusammen exprimieren, nicht einmal so hoch wie die der Membranen von Hefen, die NtPIP2;1 alleine exprimieren. Zusätzlich kann aber auch noch berücksichtigt werden, dass ein Drittel weniger Gesamtaquaporine bei den Konstruktkombinationen NtPIP2;1-YC und NtPIP2;1-YN als bei NtAQP1-YC und NtPIP2;1-YN exprimiert werden. Beachtet man all dies, errechnet sich eine über 40-fache Steigerung der relativen Wasserdurchlässigkeit der Plasmamembran bei Expression von NtPIP2;1 alleine gegenüber den Hefen, die beide Aquaporine exprimieren.

Man kann davon ausgehen, dass die pflanzlichen Aquaporine in Hefen (wobei diese mindestens 28 Stunden alt sind) nicht die identischen Eigenschaften aufweisen wie *in planta*. Da Pflanzen und Hefen viele ähnlich Eigenschaften haben, spricht vieles dafür, dass die im heterologen System gewonnenen Ergebnisse die Verhältnisse *in planta* widerspiegeln. Beide sind Eukaryoten und besitzen als solche ähnliche, sehr oft sogar identische Wege der Genexpression und der posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Wichtige physiologische Prozesse wie Atmung, Ionentransport über Membranen, die Kompartimentierung der Zellen (speziell das Anlegen einer zentralen Vakuole) und die Mechanismen der Sekretion stimmen in beiden Systemen weitgehend überein. Die Zusammensetzung der Membranen von Pflanzen und Hefen, in die die

Aquaporine inseriert werden, ist nahezu identisch. Vor diesem Hintergrund kann man die Ergebnisse so interpretieren, dass NtAQP1 durch seine Interaktion mit NtPIP2;1 nicht wasserleitfähig wird. Im Gegenteil sinkt die Wasserleitfähigkeit von NtPIP2;1 bei Koexpression mit NtAQP1 dramatisch.

## 7 Ausblick

### 7.1 Weitere Lokalisationsanalysen

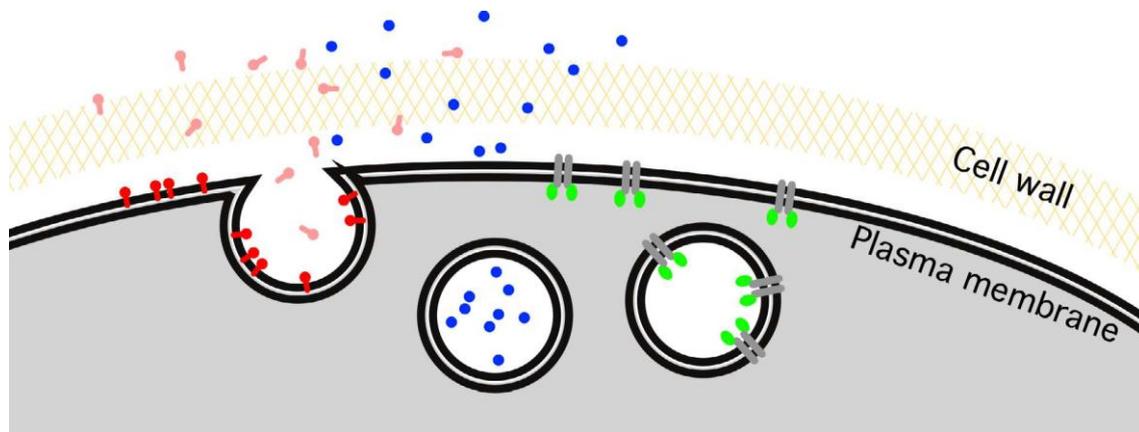
Viele der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse werfen neue Fragen auf. So ist es schwierig nachzuweisen, ob der Farbstoff FM4-64 am Ende der Internalisierung in der vakuolären Membran landet. Hierfür wäre es notwendig, den Tonoplasten oder die Vakuole spezifisch anzufärben. Für diese Untersuchungen ließen sich die W303-Zellen sehr gut verwenden, da diese *ade2* sind, also den Stoffwechselweg, auf dem Adenin hergestellt wird, nicht komplett durchführen können. Ihr Wachstum ist deshalb von der Anwesenheit von Adenin im sie umgebenden Medium abhängig. Diesem Hefestamm fehlt das Gen ADE2, weshalb es bei Anzucht der Hefen in Adeninmangelmedium nicht zur Umwandlung von p-Ribosylaminoimidazol in p-Ribosylaminoimidazolcarboxylat, eine Vorstufe von Adenin, kommt. Da diese durch das Enzym Ade2 katalysierte Carboxylierung nicht stattfinden kann, akkumuliert p-Ribosylaminoimidazolcarboxylat, und stellt somit einen endogenen Fluorophor dar. Dieser Farbstoff sammelt sich dann in der Vakuole an (Siddiqi, 1971; Myers *et al.*, 1985), weshalb diese bei einem Wachstum unter Adeninmangel rot gefärbt ist. Über Kolokalisationsuntersuchungen wäre dann eine eindeutige Aussage über den finalen Aufenthaltsort des Farbstoffs FM4-64 in der Zelle möglich.

Ebenso wäre es interessant, zu überprüfen, ob auch in der Hefe die Aquaporine, die das Transportsignal in die Plasmamembran nicht besitzen (Zelazny *et al.*, 2009), im ER verbleiben bzw. dort zurückgehalten werden. Hierfür könnte man das vier Aminosäuren lange Motiv HDEL vor ein fluoreszentes Protein klonieren und die Kolokalisation dieses Fluoreszenzsignals mit den fluoreszent markierten Aquaporinen überprüfen. Denn Proteine, die an dieses Motiv fusioniert sind, sind ausschließlich im ER lokalisiert. Alternativ kann ein Protein, von dem bekannt ist, dass es das ER nicht verlässt, fluoreszent markiert werden.

Auch wäre es interessant zu überprüfen, ob die Endozytose von FM4-64 und der Aquaporine aus der Plasmamembran unabhängig voneinander ist. Mit FM4-64 ist dies nicht möglich, da dieses immer aus der Plasmamembran heraus internalisiert wird. Aber es ist möglich, die plasmamembranständige ATPase fluoreszent zu markieren und die Kolokalisation der Fluoreszenzsignale zu analysieren. Abbildung III 7.1 stellt verschiedene Wege dar, endozytotische Vesikel und damit letztlich auch die Vakuole bzw. die vakuoläre Membran fluoreszent zu markieren. Entweder kann dies über Zugabe hydrophiler Farbstoffe in die extrazelluläre Flüssigkeit geschehen, über die Zugabe

lipophiler Farbstoffe oder über die Expression fluoreszenter Fusionsproteine (Meckel, 2004).

Für die Bildauswertung kann man die hier dargestellte Methode zur Analyse der Lokalisation von Membranproteinen verwenden. Die Methode ist nicht nur für den Einsatz in heterologen Systemen anwendbar, man könnte damit auch Kolokalisationsanalysen zum Beispiel in Protoplasten aus Pflanzenzellen durchführen.



**Abbildung III 7.1:** Endozytische Vesikel können auf drei verschiedenen Wegen fluoreszent markiert werden. 1. Durch Markierung der extrazellulären Flüssigkeit mit hydrophilen Farbstoffen (blau). 2. Durch Markierung der extrazellulären Schicht der Plasmamembran mit lipophilen Farbstoffen (rot). 3. Durch Expression fluoreszenter Fusionsproteine eines Membranproteins und einer GFP-Variante (grün). (Meckel, Tobias 2004).

Für weitere Untersuchungen der Verteilung von Aquaporinen mit der hier präsentierten Kolokalisationsmethode ist es ratsam, diese mit einem kompletten fluoreszenten Protein (z. B. GFP, YFP, CFP) zu markieren. Denn auch in pflanzlichen Zellen sind Wartezeiten von 30 Stunden vom Beginn der Induktion der Proteinexpression bis zur Entwicklung der BiFC-Produktfluoreszenz in der Literatur dokumentiert (Hu *et al.*, 2002; Kerppola, 2008). Weiterhin ist bei weiteren Experimenten *in vivo* eine Markierung mit kompletten GFP-Derivaten die vielversprechendere Variante, denn die Fluoreszenz entsteht bei GFP/YFP/CFP etwa 4 Stunden nach Induktionsbeginn (Kremers *et al.*, 2006), weshalb diese besser für die Beobachtung der tatsächlichen Verteilungen im homologen System und deren Korrelation mit den bestimmten Permeabilitäten geeignet sind. Das frühere Einsetzen der Fluoreszenz erlaubt es auch, den Vesikeltransport innerhalb der Zelle zu untersuchen.

## 7.2 Weitere Untersuchungen zur Heterotetramerisierung

Die Untersuchung einer Heterotetramerisierung könnte ein neues Licht auf eine eventuell vorhandene kooperative Regulation der Wasserleitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine werfen. Kooperativität beschreibt das Phänomen, dass die Bindungsstärke einer Untereinheit für einen Liganden davon abhängt, wie viele der anderen Untereinheiten bereits Liganden gebunden haben. Für Aquaporine könnte dies bedeuten, dass die Wasserpermeabilität eines Monomers von der Permeabilität der anderen Monomere im

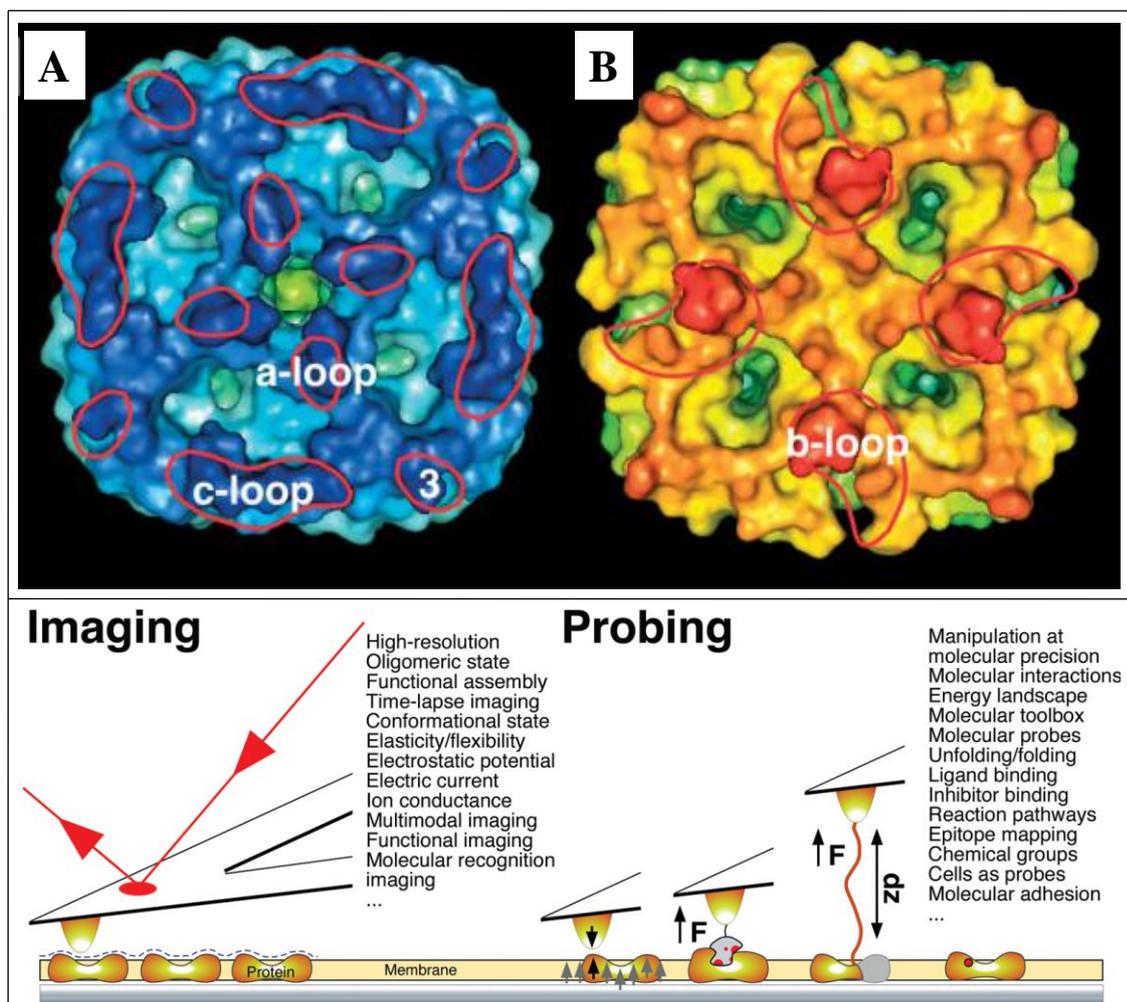
Tetramer abhängt. Einen Anhaltspunkt für diese kooperative Regulation liefert der Effekt von Zink und anderer Übergangsmetalle auf die Wasserpermeabilität von HsAQP0 in *Xenopus laevis* Oozyten. Die Zugabe von 1 mM Zink verdoppelt die Wasserleitfähigkeit von AQP0. Eine Anpassung der Konzentrationsabhängigkeit des Zink-Effekts mit der Hill-Gleichung ergab einen Koeffizienten größer als 3. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von mehr als einem Zink notwendig ist, um die Wasserdurchlässigkeit signifikant zu erhöhen. Mit diesen Ergebnissen scheint ein Modell wahrscheinlich zu sein, in dem eine positive Kooperativität zwischen den Monomeren im Tetramer angenommen wird, was bedeuten würde, dass das Tetramer für den Wassertransport die funktionelle Einheit ist (Nemeth-Cahalan *et al.*, 2007). Die Heteromerisierung könnte ebenfalls einen kooperativen Effekt auf die Wasserleitfähigkeit haben.

### 7.3 Rasterkraftmikroskopie

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass NtAQP1 und NtPIP2;1 miteinander stabile Heterotetramere bilden und dass diese Heterotetramerisierung einen Einfluss auf die Funktion der Aquaporine hat. Diese Heteromere können nach Kristallisierung über Rasterkraftmikroskopie strukturell eingehender untersucht werden. Hierfür ist die Rekonstitution der Aquaporine NtAQP1 und NtPIP2;1 in einer Lipiddoppelschicht notwendig. Für Aquaporine ist es bereits mehrfach gelungen, über solche Rekonstitutionen sogenannte zweidimensionale Kristalle zu erzeugen. Das bedeutet, dass die Proteine in dieser Membran so dicht gepackt sind, dass sie kristalline Strukturen ausbilden (Scheuring *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 1999; Scheuring *et al.*, 2002; Stahlberg *et al.*, 2002; Moller *et al.*, 2003; Schenk *et al.*, 2005). Über Rasterkraftmikroskopie (*engl.*: Atomic Force Microscopy, AFM) sollte es möglich sein, die beiden Proteine über die Länge ihrer C- bzw. N-Termini zu unterscheiden (zum Beispiel, wenn ein YC bzw. ein YN an den C-Terminus der Aquaporine fusioniert ist). In Abbildung III 7.2 ist ein Beispiel gezeigt, mit welcher Qualität Aquaporine über Rasterkraftmikroskopie abgebildet werden können. Hierbei wurde eine Auflösung von 5,5 Å erreicht, was mit der Auflösung eines Elektronenmikroskops vergleichbar ist. Nachdem die Abbildung der Heteromere gelungen ist, könnte man ein Kraftprofil der Entfaltung der einzelnen Aquaporine erzeugen, welches für jedes Protein charakteristisch ist. Im Heterotetramer sollte sich dieses vom Profil des freien Monomers oder des Monomers im Homotetramer unterscheiden. Zur eingehenden Charakterisierung der Interaktion könnte so versucht werden, bei Heteromeren aus NtAQP1 und NtPIP2;1 die Kraft zu messen, mit der die beiden Proteine an ihren Grenzflächen miteinander wechselwirken.

*In vivo* wurde die Flexibilität der Membranen, in die die Aquaporine eingebaut sind bzw. werden, über Rasterkraftmikroskopie gemessen. Dies ist nicht nur in artifiziellen Membranen nach Rekonstitution der Proteine gelungen, sondern solche Untersuchungen konnten auch an lebenden Zellen durchgeführt werden (Riethmuller *et al.*, 2008). Die Kräfte, die an Grenzflächen zwischen Proteinen in Oligomeren wirken, können mit Hilfe der thermodynamischen Eigenschaften solcher Interaktionsflächen errechnet werden

(Schelhorn *et al.*, 2008). Das AFM ist das ideale Werkzeug, um die Richtigkeit dieser theoretischen Rechnungen zu überprüfen. Sollten diese Berechnungen sich für die Wechselwirkung von NtAQP1 und NtPIP2;1 als richtig erweisen, könnte man diese Methode zur Analyse der Art der Interaktion für weitere Proteine, für die eine Wechselwirkung mit Aquaporinen in der Zelle gezeigt werden kann, verwenden.



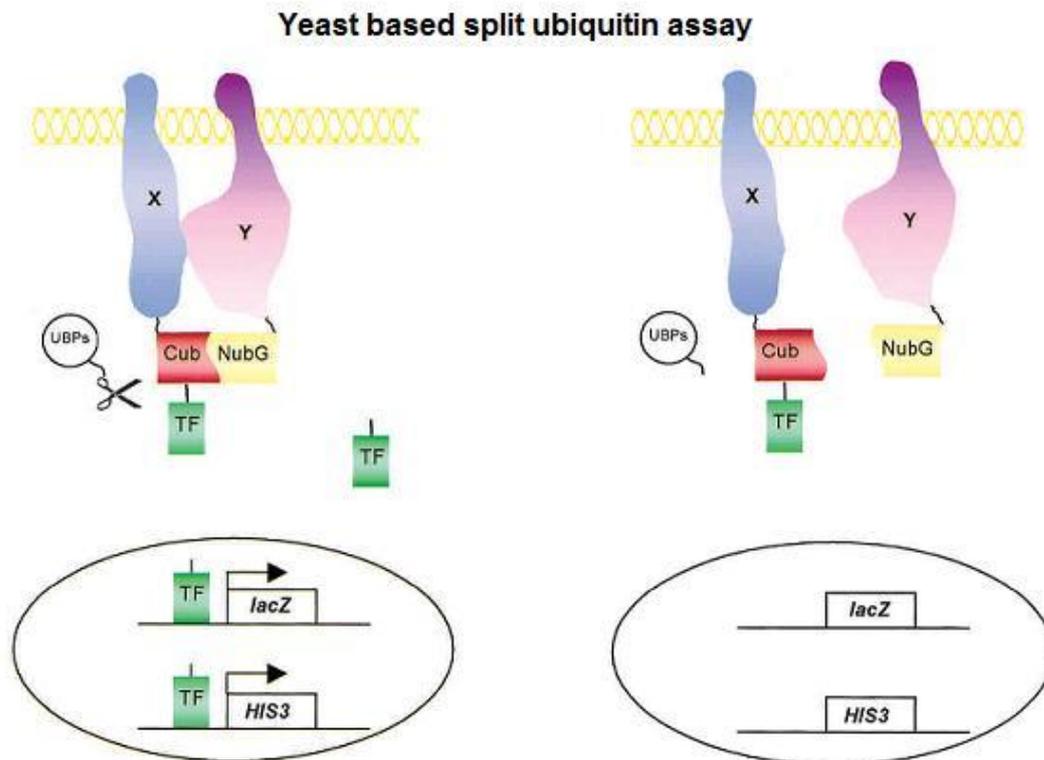
**Abbildung III 7.2:** Möglichkeiten der Abbildung und Analyse von Aquaporinen und Interaktionen mit dem Rasterkraftmikroskop. **A:** extrazelluläre Seite von AqpZ (*E. coli*) . **B:** zytoplasmatische Seite von AqpZ (*E. coli*) (Goncalves, R. P. and Scheuring, S. 2006). **C:** Möglichkeiten des AFM als bildgebendes Verfahren oder als Werkzeug zur Analyse der Eigenschaften von Proteinen. (Muller, D. J. 2008).

#### 7.4 Aufklärung weiterer Wechselwirkungen zwischen Aquaporinen und anderen Membranproteinen

Um zu ermitteln, welche weiteren Proteine mit Aquaporinen wechselwirken, bieten sich mehrere Methoden zur effektiven Analyse komplexer Verhältnisse in Zellen an. Eine Methode wäre die Fluoreszenz Korrelationspektroskopie (*engl.*: Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS). Hierzu muss man die für die jeweilige Betrachtung relevanten Proteine (hier Aquaporine), von denen man eine Wechselwirkung annimmt, fluoreszent markieren (z. B. mit GFP-Varianten). Über diese Analysemethode kann nach

Rekonstitution der markierten Proteine in Membranen nicht nur die Diffusionskonstante der Proteine ermitteln, sondern auch der Oligomerisierungsgrad und die damit verbundene Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit, die Bindungskonstanten und die Art der Wechselwirkung zwischen den Proteinen. Auch die Bewegung der Vesikel, die über die in ihrer Membran inkorporierten Aquaporine fluoreszent markiert sind, kann *in vivo* mit dieser sehr empfindlichen Methode untersucht werden (Bacia and Schwille, 2007; Kim *et al.*, 2007; Petrasek *et al.*, 2008; Ries *et al.*, 2009).

Weitere Interaktionsanalysen können mit dem split-Ubiquitin-System durchgeführt werden. Ubiquitin ist ein kleines Protein (76 AS, 8.5 kDa), das in allen eukaryotischen Zellen gefunden wird. Es verändert durch Bindung reversibel die Eigenschaften anderer Proteine, wobei die Art der Bindung und die Anzahl der gebundenen Ubiquitinmoleküle die Funktion des markierten Proteins und seine Verteilung in der Zelle bestimmt. Diese Markierung hat einen regulatorischen Einfluss auf die Proteindegradation, die Signaltransduktion, die Kontrolle des Zellzyklus oder die posttranslationale Modifikation. Die auf Oligomerisierung untersuchten Proteine werden hierbei, ähnlich wie bei der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation, mit der C-terminalen bzw. N-terminalen Hälfte des Ubiquitins fusioniert. Bilden die Proteine miteinander einen Komplex, so entsteht aus den beiden Hälften wieder ein komplettes, intaktes Ubiquitin. In N-terminalen Teil des Ubiquitins (Nub) wurde die Mutation I13G durchgeführt, so dass NubG erzeugt wurde. Dadurch wird eine spontane Aggregation der beiden Hälften vermieden. An den C-terminalen Teil wird ein Transkriptionsfaktor fusioniert. Eine spezifische Nuklease (UBS) erkennt dieses Ubiquitin und spaltet hydrolytisch die Bindung des Transkriptionsfaktors zum Ubiquitin. Nur ein intaktes Ubiquitin wird von UBS erkannt und geschnitten. Mit dieser Methode ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit das komplette Interaktom spezifischer Aquaporine im Hefesystem zu analysieren. Diese Zusammenhänge werden in Abbildung III 7.3 illustriert. An der Expression des Genproduktes, das durch Bindung des freigesetzten Transkriptionsfaktors an die DNS möglich wird, erkennt man eine Heteromerisierung der betrachteten Proteine (Johnsson and Varshavsky, 1994; Stagljar *et al.*, 1998; Sanderson, 2008; Lee *et al.*, 2008a).



**Abbildung III 7.3:** Das "split-Ubiquitin"-System in Hefe. Es soll getestet werden, ob die Proteine X und Y miteinander ein Heteromer bilden. **Cub:** C-terminaler Teil des Ubiquitin, **Nub:** N-terminaler Teil des Ubiquitin, TF: Transkriptionsfaktor, UBP: Protease (<http://parts.mit.edu/igem07/index.php/Ljubljana/splitubiquitinassay>).

Auch andere Methoden zur Analyse der Interaktion von Membranproteinen miteinander können zur Aufklärung der Wechselwirkung von Aquaporinen mit anderen Molekülen in Membranen verwendet werden. So zum Beispiel die Analyse von „Lipopartikeln“, das heißt von virusähnlichen Partikeln, die Membranproteine exprimieren und an ihrer Oberfläche tragen (Willis *et al.*, 2008), oder die Methode des „message passing“, bei der eine Kovarianzanalyse mit einer globalen Interferenzanalyse, wie sie in der statistischen Physik verwendet wird, kombiniert wird (Weigt *et al.*, 2009) oder die Markierungsübertragungsschemie (Liu *et al.*, 2007). Diese Methoden sind allerdings alle mit einem erheblichen biophysikalischen oder proteinbiochemischen Aufwand verbunden. Deshalb würde sich bei den schon geleisteten Vorarbeiten die Methode des split-Ubiquitin zur Erstellung des Interaktoms der Aquaporine anbieten.

# IV Material und Methoden

---

## 1 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNS)

### 1.1 Methoden zur Bearbeitung von DNS

#### 1.1.1 Hydrolyse von DNS mittels Restriktionsendonukleasen

Zur Veränderung der DNS (z.B. durch den Einbau verschiedener Gene in Plasmide) wurde sie mit Restriktionsenzymen gespalten. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Empfehlungen der Hersteller (Gibco BRL, MBI Fermentas) gewählt. In einem Reaktionsansatz wurde pro  $\mu\text{g}$  DNS eine Einheit (*engl.*: unit, U) Enzym eingesetzt, um einen vollständigen Abbau der DNS zu gewährleisten. Die Reaktion wurde für mindestens 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Das Ergebnis des Abbaus wurde durch Elektrophorese überprüft.

#### 1.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNS in einem Agarosegel

Die Auftrennung der DNS-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte in Agarosegelen (Hersteller: ICN) unterschiedlicher Konzentration. Bei Standardgelen wurde eine Konzentration von 0,8% verwendet. Der Agarose wurde vor dem Gießen der Gele Ethidiumbromid ( $0,05\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugesetzt. Als Puffersystem fungierte 1x TAE. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 5-10V/cm durchgeführt. Die DNS wurde vor dem Lauf mit 1x Ladepuffer versetzt. Zum Vergleich der Molekülgrößen wurde parallel ein Standard mit Fragmenten definierter Größe (200 bp-10.000 bp; HYPERLADDER I<sup>TM</sup>, Bionline) aufgetrennt. Über die Fluoreszenz des im Gel enthaltenen Ethidiumbromids unter UV-Licht (302 nm) wurde die DNS nachgewiesen. Die Bilder der Gele wurden in einer speziellen Aufnahmekammer hergestellt (ImageMaster, Pharmacia Biotech). In Lösung zeigt Ethidiumbromid praktisch keine Fluoreszenz, es interkaliert aber spontan zwischen die Basen der DNS und wird dort fluoreszent.

---

50x TAE	242g	Tris, pH 8
	0,5M	EDTA pH8
	57,1ml	Essigsäure
5x DNS - Ladepuffer:	2%	Ficoll 400
	0,5%	SDS
	50 mM	EDTA
	0,2%	Orange G
	10%	Glycerin

---

### 1.1.3 Elution von DNS aus einem Agarosegel

Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid kann die DNS im UV-Licht (302 nm) lokalisiert werden. Die Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Reinigung der DNS wurde das „Gel Extraktion System“ (QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Effizienz der Elution wurde durch Auftrennung eines Anteils der eluierten DNS in einem Agarosegel überprüft.

### 1.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR)

Durch den Einsatz sequenzspezifischer kurzer Oligonukleotide (Primer) lassen sich DNS-Fragmente mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (*engl.*: polymerase chain reaction, PCR) vermehren. Die PCR-Reaktion wurde auf Eis zusammen pipettiert.

---

Standardansatz (25 µl)	1-10 ng	DNS-Matrize
	2,5 µl	10x Reaktionspuffer (Biotherm)
	2 mM	dNTP-Mix (10 mM)
	0,4 pmol	Sense-Primer (10 pmol/µl)
	0,4 pmol	Antisense-Primer (10 pmol/µl)
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,25 U	Taq-Polymerase (Biotherm, 5u/µl)
	x µl	bidest. H <sub>2</sub> O (autoklaviert)

---

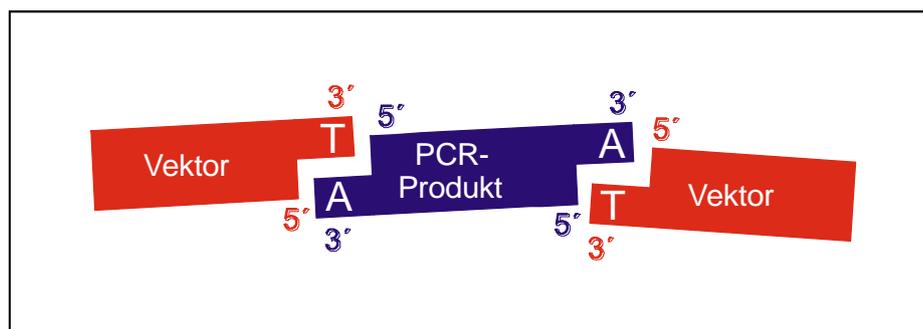
Standard PCR Prozedur:	Startdenaturierung:	95 °C	5 min
	25 Zyklen:		
	Denaturierung:	95 °C	30 s
	Primer Anlagerung:	$T_m - 4$ °C	30 s
	Elongation:	72 °C	1 min/kbps
	Endsynthese:	72 °C	5 min

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Biotherm) durchgeführt. Die optimalen Temperaturen, bei denen sich die Primer an die einzelsträngige DNS anlagern (engl. *anneal*) wurden über Gradienten-PCR bestimmt.

## 1.2 Klonierung von DNS

### 1.2.1 T/A-Klonierung von PCR Produkten

Der Vektor pDrive (Qiagen) wurde verwendet, um PCR-Produkte, die mit der Taq-DNS-Polymerase (Taq aus *Thermus aquaticus*) vervielfältigt wurden, zu klonieren. Diese Polymerase besitzt eine matrisenunabhängige terminale Transferaseaktivität mit einer hohen Präferenz für dATP. Dadurch weisen die 3'-Enden der PCR-Produkte ein überhängendes Adenin auf. Der linearisierte vorliegende Vektor pDrive/pCR2.1 weist ein überhängendes dTTP auf, womit die Effizienz der Ligation von PCR-Produkten deutlich erhöht (Abbildung IV 1.1). Zur Klonierung von PCR Produkten in den pDrive-Vektor wurde wie im beiliegenden Protokoll zum „PCR Cloning Kit“ (pDrive/Qiagen) verfahren.



**Abbildung IV 1.1:** Schematische Darstellung der T/A-Klonierung. Das PCR-Produkt mit dATP-Überhängen wird in die Polylinker-Region mit dTTP-Überhängen ligiert.

### 1.2.2 Ligation von cDNS Fragmenten in binäre Vektoren

Das molare Verhältnis zwischen linearisiertem Vektor und Restriktions-Fragment beeinflusst die Effizienz einer Ligrationsreaktion. Für eine optimale Ligation wurde ein

Verhältnis von 5:1 von Fragment- zu Vektor-DNS empfohlen. Die Stoffmenge (pmol) eines beliebigen DNS-Moleküls kann, wenn seine Masse bekannt ist, mit folgender Formel berechnet werden:

$$pmol\ DNS = \frac{2 \cdot 10^6 \cdot \mu g\ DNS}{Basenpaare\ DNS \cdot 660 \frac{pg}{pmol}} \quad 1.1$$

---

Ligationsreaktion (20µl)	100 ng	linearisierte Vektor DNS
	x ng	DNS-Fragment
	2 µl	10x T4 Ligase Puffer
	1 U	T4 DNS Ligase
	x µl	bidest. H <sub>2</sub> O (autoklaviert)

---

Das Reaktionsgemisch wurde gemischt und für 5 s zentrifugiert. Der Ansatz wurde dann für 1 h bei 22°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurden 5µl des Ansatzes für die Transformation von *E. coli* weiterverwendet.

### 1.2.3 Sequenzieren von DNS Fragmenten

Mit der Sequenzierung von DNS Fragmenten wurde die Firma Seqlab beauftragt. Im Anschluss an eine Plasmid-DNS Präparation aus *E. coli* (siehe unten) wurde die Reinheit der DNS durch elektrophoretische Auftrennung überprüft und die Konzentration der DNS photometrisch bestimmt. Die Ansätze zur Sequenzierung wurden wie nach den Vorgaben zum Produkt „extended Hot Shot Sequenzierung“ beschrieben zusammen gefügt und an die Firma Seqlab gesendet.

## 2 Verfahren mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

### 2.1 *Escherichia coli*-Stämme

In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme:

---

<u><i>E. coli</i>:</u>	<u>Genotyp:</u>	<u>Herkunft:</u>
XL1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Protagen
DH5α	F' endAI hsdRJ7 (r-, mit) supE44 thi-1 λ <sup>-</sup> recA1 gyrA96 relAI deoR A(lacZYA-argF)- U169 Φ80dlacZΔM15	Invitrogen

---

### 2.2 Transformation von *E. coli* nach der CaCl<sub>2</sub>/Hitzeschock-Methode

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode von (Bignell and Evans, 1996). Zur Transformation wurden 10 ng Plasmid-DNS mit 50 μl kompetenten *E. coli*-Zellen gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und der anschließende Hitzeschock für 45 s in einem Wasserbad mit 42°C durchgeführt. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden 0,25 ml SOC-Medium hinzugegeben. Zur Expression der für die Antibiotikums-Resistenz erforderlichen Proteine erfolgte eine 1 h Inkubation bei 37°C und 200 rpm. Nach Abzentrifugieren und Resuspendieren in 100 μl SOC-Medium wurde der gesamte Ansatz auf LB-Agarmedium mit Antibiotikum ausplattiert und für 12 h bei 37°C inkubiert.

### 2.3 Kultivierung von *E. coli*

Eine Bakterien-Kolonie mit rekombinanten Plasmiden wurde in 3 ml LB-Medium, das mit Antibiotikum versetzt wurde, überführt und über Nacht bei 37°C und 300 rpm in einem Schüttelinkubator angezogen. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich nach der Resistenz des rekombinanten Plasmids. Die Anzucht erfolgte in hitzesterilisierten Reagenzgläsern.

## 2.4 Erstellen von Dauerkulturen von *E. coli*

Für eine Dauerkultur von *E. coli* wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß, 700 µl einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* mit 350 µl einer 87% Glycerinlösung versetzt. Nach kurzem Mischen wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

## 2.5 Isolierung von Plasmid DNS aus *E. coli*

Dem verwendeten Verfahren zur Gewinnung von Plasmid-DNS liegt ein alkalischer Aufschluss der Bakterien zu Grunde. Aus dem Lysat lassen sich bakterielle Proteine und genomische DNS selektiv durch Erniedrigung des pH-Wertes fällen. Im Überstand verbleibt die Plasmid-DNS.

Von einer *E. coli* Übernacht-Kultur wurden 1,5 ml entnommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur 45 sec. zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Bakterien in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 und nach vorsichtigem Mischen, wurden die Zellen innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur (RT) lysiert. Nach Hinzufügen von 300 µl eiskaltem Puffer P3 erfolgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis. Durch Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, RT) wurden anschließend genomische DNS und Proteine pelletiert. Die Plasmid DNS wurde durch Zugabe von 800 µl Isopropanol zu 700 µl Überstand präzipitiert. Um Salze zu entfernen, wurde die gefällte Plasmid DNS mit 500 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in doppeltdestilliertem, autoklaviertem Wasser oder TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

---

P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris/HCl, pH8 EDTA RNase A
P2 (Lysepuffer)	200 mM 1%	NaOH SDS
P3 (Neutralisationspuffer)	3 M	Kaliumacetat (pH 5.5)

---

## 2.6 Medien zur Anzucht und Transformation von *Escherichia coli*

---

LB Medium	1% Trypton		
	0,5% Hefeextrakt		
	0,5% NaCl		
	Nach Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50°C entsprechendes Antibiotikum zufügen: 50 µg/µl Ampicilin 50 µg/µl Kanamycin		
LB-Agarmedium	LB-Medium + 1% Agar		
SOC-Medium	2%	Trypton	
	0.5%	Hefeextrakt	
	10 mM	NaCl	
	2,5 mM	KCl	
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>	
	20 mM	Glucose	pH 7.0

---

## 3 Verfahren mit *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

### 3.1 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

In dieser Arbeit verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stämme:

---

<u><i>S. cerevisiae</i>:</u>	<u>Genotyp:</u>	<u>Herkunft:</u>
SY1	MAT $\alpha$ , ura3-52, leu2-3,112, his4-619, sec6-4, GAL	J. Brodsky (Nakamoto <i>et al.</i> , 1991)
W303	MATa/ MAT $\alpha$ , leu2-3,112, trp1-1, can1-100, ura3-1, ade2-1, his3-11,15, GAL	Euroscarf

---

### 3.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die *S. cerevisiae*-Stämme SY1 bzw. W303 wurden in YPD-Medium kultiviert. Hierzu wurden 25 ml YPD-Medium mit einer Hefekolonie (mind. 3 mm Ø) unter sterilen Bedingungen angeimpft und bei 250 rpm für 16 h bis 36 h bei 30°C inkubiert. Transformierte Hefe-Zellen wurden in 25 ml Selektionsmedium angezogen und unter demselben Wachstumsbedingungen wie der Wildtyps kultiviert.

### 3.3 Erstellen einer Dauerkultur von *S. cerevisiae*

Für die dauerhafte Kultivierung wurde eine Übernachtskultur der Hefezellen angelegt. Ein Volumen der Hefekultur wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen einer 50% Glycerinlösung vermischt und bei -80°C gelagert.

### 3.4 Transformation von *S. cerevisiae* nach der LiAc/ Hitzeschockmethode

Für die Transformation der Hefen wurde eine von der Firma Clontech (K1606-1) entwickelte Methode angewandt. Die Zellen wurden in YPD/ Selektionsmedium über Nacht bei 30°C und 225 rpm angezogen. Die OD<sub>600</sub> der Hefen im Medium sollte vor der Transformation zwischen 0,8 und 1 liegen. Danach wurden die Hefen abzentrifugiert und mit 0,1 M LiAc/1x TE Lösung einmal gewaschen. Nach erneuten Zentrifugieren wurde das Pellet in 500 µl 0,1 M LiAc/1x TE Lösung aufgenommen und bei 30°C und 125 rpm für 1 h inkubiert. Die so hergestellten kompetenten Zellen konnten bis zur Transformation bei RT oder für eine spätere Verwendung in einer 0,1M LiAc/ 1x TE/ 15% Glycerin Lösung bei -80°C gelagert werden. Für die Transformation wurden unter 50 µl Heringssperma DNS (2 mg/ml) und 1 µg Plasmid-DNS zu 100 µl der kompetenten Hefezellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und gut gemischt. Danach wurden 600 µl einer 50% PEG/ 0,1 M LiAc/ 1x TE Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde dann bei 30°C und 95 rpm für 30 min. inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock (15 min, 42°C im Wasserbad). Nach 1 bis 2 min Abkühlen auf Eis wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert und nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl 1x TE Puffer gelöst und je 150 µl der Suspension auf Selektionsplatten ausgebracht. Die Kultivierung der Platten erfolgte dann bei 30°C. Nach etwa 2 Tagen konnten bei erfolgreicher Transformation erste Kolonien gesehen werden, die dann auf neuen Selektionsplatten per Verdünnungsausstrich weiterkultiviert wurden.

---

10x LiAC

1 M Litiumacetat

10x TE:

100 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA pH 7.0

---

### 3.5 Biolistische Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die biolistische Transformation von Hefezellen wurde das „Particle Delivery-System“ (PDS) 1000/He (Biorad) verwendet. Hierzu wurde eine Kultur der Hefe in YPD-Medium angelegt und für 48 h bei 30°C inkubiert, um die Zellen in die stationäre Wachstumsphase zu versetzen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 500 $\times$ g, RT) geerntet, mit sterilem bidest. Wasser gewaschen und in 3ml sterilem bidest. Wasser aufgenommen. 100  $\mu$ l der Hefesuspension wurden in die Mitte einer Petrischale mit Selektionsagarmedium, komplettiert mit 0,75 M Sorbitol (Applichem) und 0,75 M Mannitol (Applichem), gegeben und in einem Radius von 2 cm plattiert. Die präparierten Hefezellen wurden nach Verflüchtigen des Wassers zur Transformation verwendet. Die Beschichtung der Wolfram-Mikropartikel mit Plasmid-DNS und die anschließende Transformation der Hefezellen wurde nach dem Protokoll beschrieben in (Sanford *et al.*, 1993) durchgeführt.

### 3.6 Medien zur Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Alle Medien wurden in bidest Wasser angesetzt und bei 120°C für 15 min autoklaviert.

---

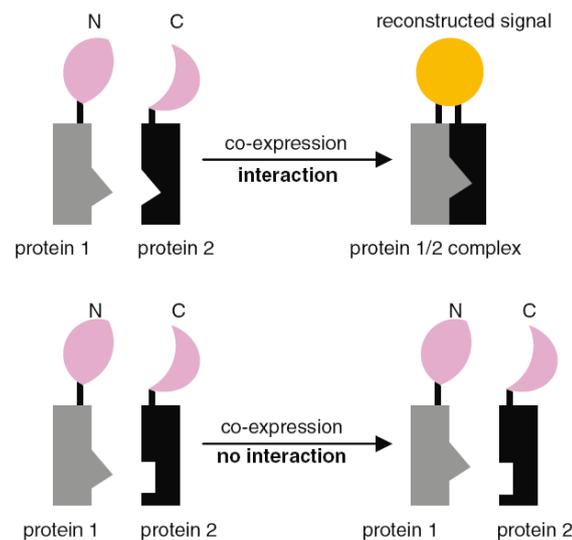
YPD (1l)	1% Hefeextrakt 2% Pepton 2% Glukose
YPD-Agarmedium	YPD-Medium + 2% Agar
SC+glu (-Ura) Medium (1l)	0,17% Yeast Nitrogen Base 0,5% Ammoniumsulfat 0,115% -Ura Amminosäure-Mix 2% Glukose
SC+gal (-Ura) Medium (1l)	0,17% Yeast Nitrogen Base 0,5% Ammoniumsulfat 0,115% -Ura Amminosäure-Mix 2% Galaktose
SC+gal/+glu (-Ura) Agarmedium	SC-gal/-glu (-Ura) Medium + 2% Agar
-Ura-Amminosäuren Mix	0,1 g Adenine, Arginin, Cystein, Lysin, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan 0,05 g Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin
-Leu-Amminosäuren Mix	0,1 g Adenine, Arginin, Cystein, Lysin, Uracil, Lysin, Threonin, Tryptophan 0,05 g Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin
-Trp-Amminosäuren Mix	0,1 g Adenine, Arginin, Cystein, Lysin, Leucin, Lysin, Threonin, Uracil 0,05 g Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin

---

## 4 Mikroskopie

### 4.1 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation

Die Methode der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (*engl.*: Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) wurde von (Hu *et al.*, 2002) entwickelt und ist seitdem vielfach zum Nachweis der Interaktion bzw. Oligomerbildung von Proteinen im Zytosol, im Zellkern und in biologischen Membranen verwendet worden (Kerppola, 2008). Wird angenommen, dass zwei Proteine miteinander Oligomere bilden, wird eines mit der C-terminalen Hälfte des Gelb-Fluoreszierenden Proteins (*engl.*: Yellow fluorescent protein, YFP) und das zweite mit der N-terminalen Hälfte fusioniert. Bei einer Oligomerisierung der beiden Fusionsproteine wird das YFP aus den beiden Hälften komplementiert, was durch die Entstehung der spezifischen Fluoreszenz angezeigt wird (Abbildung IV 4.1). Durch die Koexpression der betreffenden Fusionsproteine in *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen kann eine Interaktion der beiden Aquaporin-Isoformen durch die Fluoreszenz des komplettierten YFP in der Membran der Hefezellen nachgewiesen werden (Kerppola, 2006; Sung and Huh, 2007; Citovsky *et al.*, 2008). Der Abstand zwischen der letzten Aminosäure der sechsten Helix (der letzten in der Membran) und der ersten Aminosäure des YC/ YN wurde durch acht eingefügte Aminosäuren (GSGGSGGS) bestimmt. Er betrug bei NtPIP2;1 etwa 21 nm, bei NtAQP1 etwa 13 nm. Um sicher zu sein, dass es sich beim beobachteten Signal um YFP-Fluoreszenz als Produkt der BiFC handelt, wurden Fluoreszenzanregungs- und emissionsspektren in einem Spektrofluorometer (Perkin Elmer LS50B) aufgenommen. Weitfeldaufnahmen der Fluoreszenz der Hefen wurden mit einem iMIC 2000 (Till Photonics/ Agilent Technologies, Gräflingen) aufgenommen.



**Abbildung IV 4.1:** Schematische Darstellung der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation. Entsteht aus den beiden mit YC bzw. YN fusionierten Proteinen ein Oligomer, kann YFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Interagieren die Proteine nicht, findet keine Generation eines YFP statt (Citovsky, V. et al. 2008).

## 4.2 Das konfokale Mikroskop

Die konfokale Mikroskopie ermöglicht es, nur einen minimalen Bereich einer Probe anzuregen und nur aus diesem Bereich Fluoreszenzlicht zu detektieren. Abbildung IV 4.2 illustriert den Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Die beiden Lochblenden sind hierbei von großer Bedeutung. Durch die erste im Anregungsstrahlengang wird der Laserstrahl zu einer Punktlichtquelle reduziert. Diese punktförmige Lichtquelle wird dann auf die Objektebene fokussiert (statt einer Lochblende wird oft das Auskoppelende einer optischen Faser verwendet, um den Strahl als Punkt anzunähern) Die zweite Lochblende befindet sich in der Zwischenbildebene. Sie gewährleistet, dass nur Licht, das direkt aus dem Fokusbereich des Anregungslichtes stammt, auf den Detektor trifft. Abbildung IV 4.3 verdeutlicht diesen Zusammenhang. Sendet ein Molekül, das sich nicht im Fokus befindet, Fluoreszenzlicht aus, so kann dieses die Lochblende nicht oder nur zu einem kleinen Teil passieren und trägt somit nicht wesentlich zum Signal bei. Daher leitet sich auch der Name "kon-fokale Mikroskopie" ab, denn man bildet den Bereich minimaler Ausdehnung des Strahles (den Fokus) in der Zwischenbildebene durch eine erneute Fokussierung des Strahles noch einmal ab. Entsprechend kann natürlich auch die Öffnung des Detektors selbst so klein sein, dass man diese als punktförmig annähern kann. In dieser Arbeit wurde ein Mikroskop des Typs Leica DM IRB/E (Objektiv: HCX PL APO 100x/ 1,4-0,7 oil) verwendet.

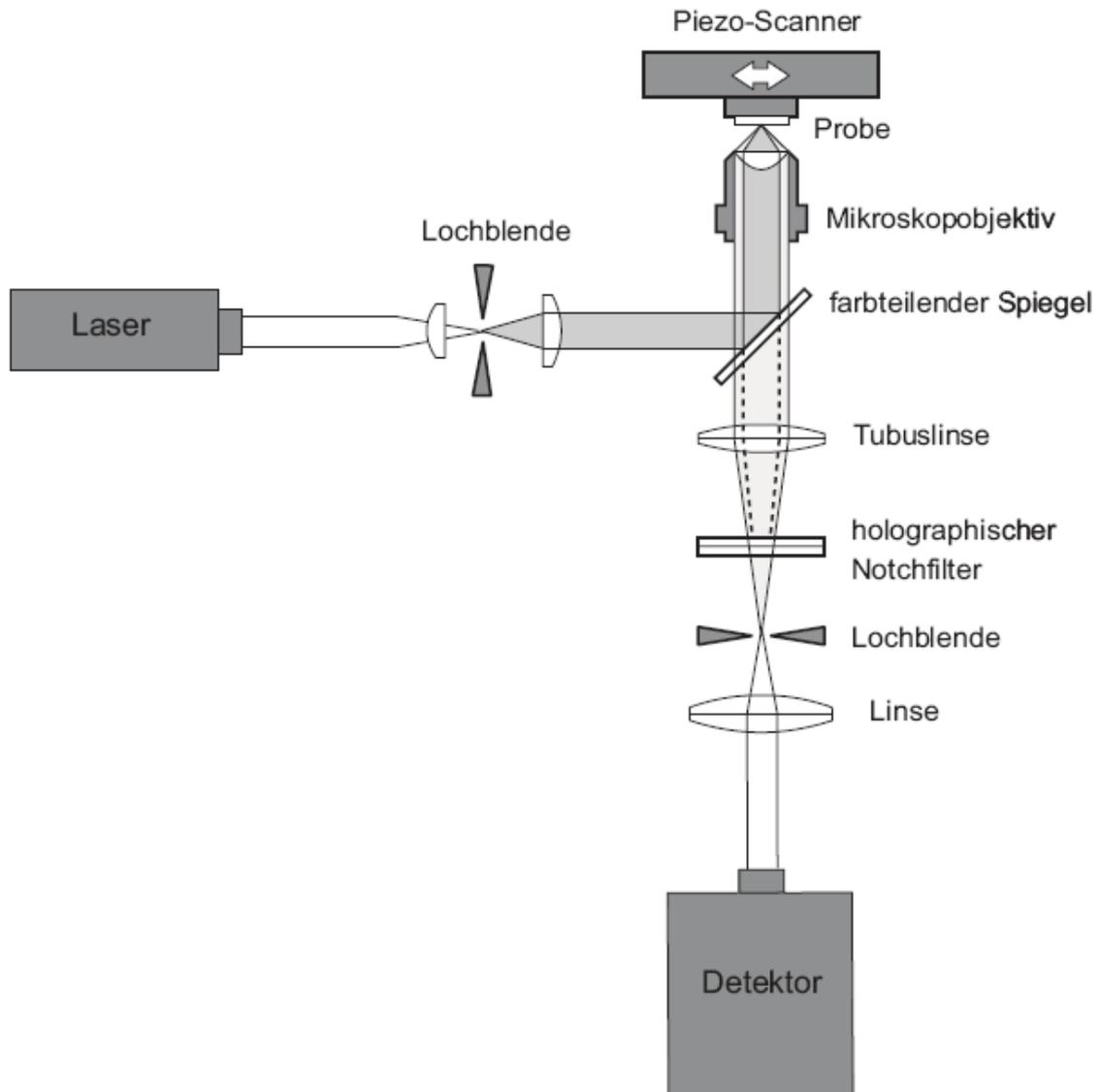
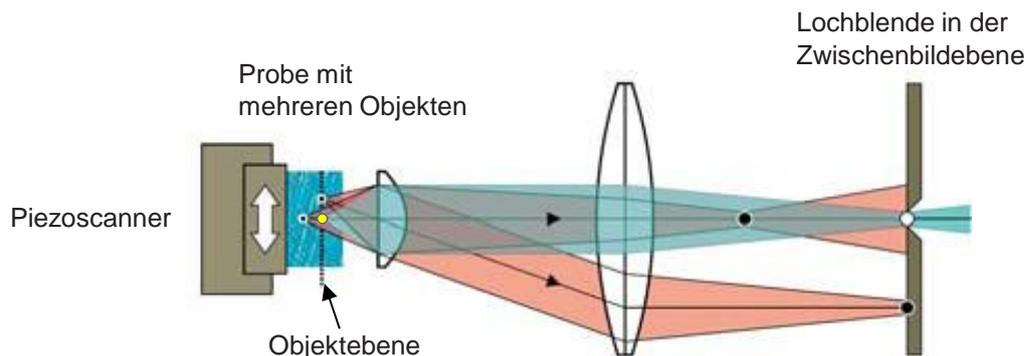


Abbildung IV 4.2: Prinzipieller Aufbau eines konfokalen Mikroskopes (Koberling, Felix 2001)

Das Anregungslicht wird am dichroitischen Strahlteiler reflektiert und durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Diese sendet Fluoreszenzlicht aus, das ebenfalls über das Objektiv gesammelt und vom Dichroit transmittiert wird, da es langwelliger ist als das Anregungslicht. Die Tubus-Linse fokussiert das transmittierte Licht auf die zweite Lochblende (Abbildung IV 4.3).

Um möglichst alle Moleküle auf einer Oberfläche zu erfassen, wird mit Hilfe eines Piezoscanners ein zweidimensionales Bild von dieser aufgenommen. Dazu wird der Probenstisch schrittweise durch das beleuchtete Volumen verschoben und das vom Detektor eingesammelte Fluoreszenzlicht Pixel für Pixel mittels eines Computers zu einem Bild zusammengesetzt (Petzke, 2002).



**Abbildung IV 4.3:** Ortsabhängige Lichtunterdrückung durch eine Lochblende in der Zwischenbildebene (Petzke, Frank 2002).

Die Verteilung der Lichtintensitäten in x- und y-Richtung des Fokus ist gaußförmig. Deshalb ist es möglich, die Größe des Fokus über die Anpassung der Abbildungen von Objekten, die in ihrer Größe dem Fokus entsprechen oder kleiner sind, mit einer zweidimensionalen Gaußverteilung zu ermitteln.

$$f(x, y) = A \cdot e^{-\left( \frac{(x-x_0)^2}{2\sigma_x^2} + \frac{(y-y_0)^2}{2\sigma_y^2} \right)} \quad 4.1$$

### 4.3 Bildanalyse

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software Igor Pro 6 (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA). Die Kolokalisationsanalysen wurden nach Kirber et al., 2007 durchgeführt. Danach wurde für jedes zu analysierende Bildpaar (FM4-64-Fluoreszenzaufnahme und YFP-Fluoreszenzaufnahme) je ein Bild erzeugt, auf dem nur kolokalisierte Pixel noch Helligkeitswerte größer 0 haben. Der Hintergrund wird bei der Kolokalisationsanalyse nach Kirber et al. schon auf 0 gesetzt. Als nächster Schritt wurde dieses Bild mit einem Rauschfilter (der für Unterscheidung zwischen Signal und Rauschen die von Shannon, 1948) entwickelte Methode der Bildentropie verwendet) bearbeitet. Dann wurden auf diesem Bild allen verbliebenen hellen Pixeln der Wert 1 zugeordnet. Durch dieses Vorgehen entsteht aus dem Kolokalisationsbild eine 0-1-Matrix. Nun wurde das Original-YFP-Bild mit dieser 0-1-Kovarianzmatrix multipliziert. Dadurch entstand ein neues Bild, auf dem nur noch die Pixel mit ihrem YFP-Fluoreszenzsignal verblieben sind, die mit dem FM4-64-Fluoreszenzsignal kolokalisierten. Deshalb konnte man auf diesem Bild nur die YFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine, die tatsächlich in der Plasmamembran lokalisiert waren, beobachten. Für die Ermittlung des Anteils der Gesamtfluoreszenz in der Plasmamembran wurden die Helligkeiten auf dem so erzeugten „Kolokalisationsbild“ und auf dem Original-YFP-Fluoreszenz-Bild aufsummiert und mit dem Mittelwert der Helligkeit des jeweiligen

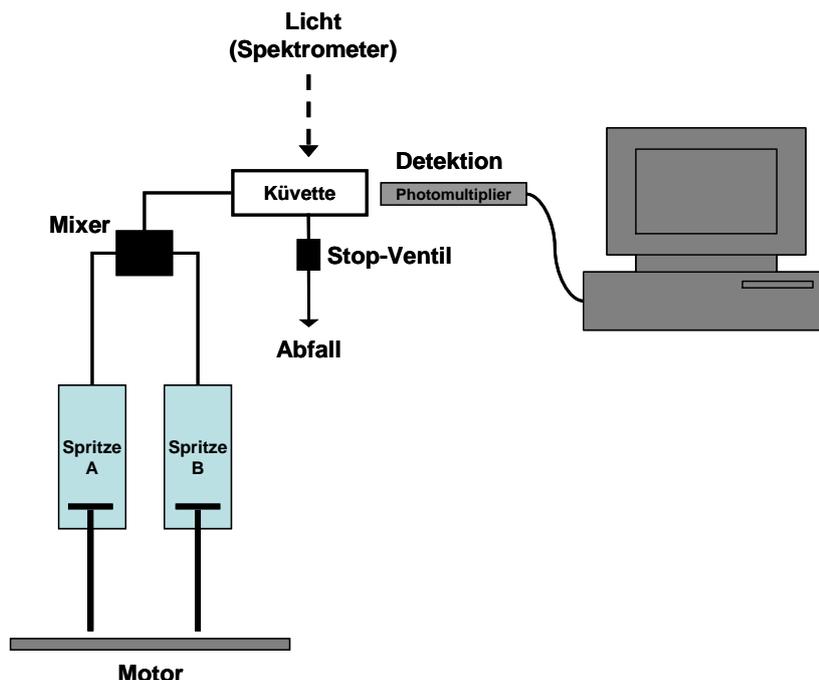
Hintergrundes korrigiert. Danach wurde der Anteil der YFP-Fluoreszenz aus der Membran an der Gesamtfluoreszenz ermittelt.

## 5 Permeabilitätsbestimmungen

### 5.1 „Stopped Flow“-Spektrometrie

Das Merkmal eines „Stopped-Flow“-Experiments ist das schnelle Mischen zweier (oder mehrerer) Lösungen oder von Reaktanten in Lösung und die sofortige spektroskopische Beobachtung der Reaktion.

Die hier verwendete Apparatur der Firma BioLogic besteht aus zwei funktionellen Einheiten, der Mischeinheit (SFM 300) und der Detektionseinheit (MOS250) (Abbildung IV 5.1). Messungen bei verschiedenen Temperaturen wurden durch einen zusätzlich an das Gerät angeschlossenen Thermostaten ermöglicht, Standardmessungen wurden bei 0°C durchgeführt. Die Mischeinheit besteht aus zwei Spritzen (Volumen 10 ml) mit motorbetriebenen und computergesteuerten Stempeln und einem Mixer am Ausgang der beiden Spritzen. Der Mixer ist direkt mit der Detektionseinheit verbunden. Vom Mixer wird das Reaktionsgemisch in eine Küvette (FC-08) geleitet und am Ausgang der Küvette von einem Stopp-Ventil registriert. Das Ventil wird geschlossen und gleichzeitig der Motor der Spritzen gestoppt. Der Verlauf der Reaktion wird innerhalb der Küvette detektiert.



**Abbildung IV 5.1:** Schematische Darstellung der Stopped Flow-Apparatur. Der Inhalt der Spritzen A und B wird bei einer Messung über einen Mixer in die Detektionseinheit (Küvette) geleitet. In der Detektionseinheit wird die Reaktion über die Veränderung der Intensität der Fluoreszenz bzw. des Streulichtes durch einen Photomultiplier wahrgenommen und im Computer dargestellt (Fischer, Matthias 2007).

Von einer Lichtquelle (Xenon/Quecksilber Lampe) wurde Licht einer bestimmten Wellenlänge in die Küvette geleitet. Über die Änderung der Intensität des an den Untersuchungsobjekten gestreuten Lichts in einem festen Winkel oder über die Änderung der durch dieses Licht angeregten Fluoreszenz kann die dort stattfindende Reaktion verfolgt werden. Die Lichtsignale werden über einen Photomultiplier detektiert.

Um die Wasserleitfähigkeit der Plasmamembranen der Hefezellen zu untersuchen, wurde durch schnelles Mischen mit einer hypoosmolaren Lösung ein Schwellen der protoplastierten Hefezellen induziert. Das einfallende Licht streut an der Oberfläche der Protoplasten. Durch die Vergrößerung der Oberfläche der Protoplasten nimmt die Intensität des Streulichtes im  $90^\circ$  Winkel ab. Der zeitliche Verlauf der Abnahme der Streulichtintensität wurde von einem mit dem Photomultiplier verbundenen Computer aufgezeichnet.

Zur Aufnahme der Kinetiken des  $\text{CO}_2$ -Flusses in die Zellen wurde monochromatisches Licht (Wellenlänge 490 nm) in die Küvette eingestrahlt. Die Änderung der Fluoreszenz in den Hefezellen bei  $\text{CO}_2$ -Einstrom wurde im  $90^\circ$  Winkel über den Photomultiplier detektiert. Um den Hintergrund durch Detektion des Anregungslichts zu minimieren, wurde vor den Detektor ein 505 nm Hochpassfilter montiert, durch den alles Licht mit Wellenlängen größer 505 nm herausgefiltert werden soll. Alle Fluoreszenzsignale wurden über den Multiplier aufgenommen.

## 5.2 Bestimmung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten ( $P_f$ )

### 5.2.1 Medien zur Protoplastierung von *Saccharomyces cerevisiae*

---

Puffer I (Inkubationspuffer)	50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ mit KOH auf pH 7,2 eingestellt
	0,2% $\beta$ -Mercaptoethanol
Puffer II (Protoplastierungspuffer)	Puffer I mit 2,4 M Sorbitol
	0,01-0,03mg/ml Zymolyase (20T)
	25 mg/ml BSA (Sigma)
	0,2% $\beta$ -Mercaptoethanol

---

### 5.2.2 Medien zur Aufnahme der Schwellungskinetiken von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten

---

Puffer III (Misch-Puffer 1)	1,8 M	Sorbitol
	50 mM	NaCl
	5 mM	$\text{CaCl}_2$
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
Puffer IV (Misch-Puffer 2)	1,2 M	Sorbitol
	50 mM	NaCl
	5 mM	$\text{CaCl}_2$
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5

---

### 5.2.3 Protoplastierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Der Zellwandabbau von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen erfolgte mit Hilfe des aus *Arthrobacter luteus* gewonnenen Enzymgemisches Zymolyase. Neben  $\beta$ -1,3-Glucanasen (zum Abbau von Glucanen/ Hemicellulosen) enthält das Enzymgemisch auch Proteasen, welche die zu untersuchenden Kanalproteine schädigen können. Um dies zu verhindern, müssen beim Abbau der Zellwand andere, durch Proteasen spaltbare Substrate wie zum Beispiel Rinderserumalbumin (BSA) im Überschuss zugesetzt werden. Die Protoplastierung der Hefezellen erfolgte nach (Bertl *et al.*, 1998).

10 ml einer Hefekultur wurden bei 2000 rpm für 5 Minuten in einer Beckmann-Zentrifuge zentrifugiert, in 3 ml Puffer I resuspendiert und für 15 Minuten bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer II wurde der Zellsuspension Zymolyase 20T und BSA bis zu einer Endkonzentration von 0,03 mg/ml (Z20T) bzw. 25 mg/ml (BSA) zugesetzt. Um ein effektives Aufbrechen der Hefezellwand zu erreichen, erfolgte eine Inkubation dieses Ansatzes bei 30°C und 200 rpm für 45 Minuten. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Hefezellen in Puffer III resuspendiert.

#### 5.2.4 Aufnahme von Schwellungskinetiken der *S. cerevisiae*-Protoplasten

Die Hefezellen wurden vor Beginn der Messungen protoplastiert. Durch die Protoplastierung stellt die rigide Zellwand der Hefen keine Barriere mehr für die Ausdehnung der Plasmamembran dar. Zusätzlich nehmen sie dadurch die Gestalt einer Kugel an, so dass die Kinetik der Schwellung bei allen Hefen gleich abläuft. Im Anschluss an die Aufspaltung der Zellwand wurden die Zellen in Puffer III resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in die Spritze B der Mischeinheit gefüllt. In die Spritze A wurde Puffer IV gefüllt (siehe Abbildung IV 5.1). Die weiteren Einstellungen an der „Stopped-Flow“-Apparatur waren:

---

Licht	436 nm	
Temperatur	10°C	
Aufnahmeraten	200 $\mu$ s	4000 Datenpunkte
	2 ms	2000 Datenpunkte
	20 ms	2000 Datenpunkte
Filter	300 $\mu$ s	

---

Durch die Mischung der Hefe-Protoplasten mit den Misch-Puffern wurde ein osmotischer Gradient über die Plasmamembran der Hefezellen von 300 mOsmol angelegt. Wasser wurde entlang des Gradienten in die Zellen transportiert und führte zu einem Anschwellen der Protoplasten. Je nach hoher oder niedriger Leitfähigkeit der Membran für Wasser erfolgt diese Schwellung schnell oder langsam. Aus der Schwellungskinetik konnte im Anschluss der osmotische Permeabilitätskoeffizient der Plasmamembran berechnet werden.

### 5.2.5 Berechnung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten ( $P_f$ )

Bei der Auswertung der Schwellungsversuche kann man davon ausgehen, dass es sich beim primären Einstrom des Wassers in die Zelle um eine Reaktion erster Ordnung handelt, deren Kinetik man mit einer Gleichung der Form  $c(H_2O) = c_0(H_2O) \cdot e^{-k \cdot t}$  anpassen kann ( $c$  = Konzentration in der Zelle,  $c_0$  = Konzentration vor Beginn des Experimentes,  $t$  = Zeit,  $k$  = Ratenkonstante). Aus den aufgenommenen Kinetiken wurde die jeweilige Ratenkonstante bestimmt. Hierzu wurde der Algorithmus „simplex“ der Biokine Software verwendet. Der osmotische Permeabilitätskoeffizient  $P_f$  mit der von (Vanheeswijk and Vanos, 1986) hergeleiteten Gleichung

$$P_f = k \times \frac{V_0}{S_o \times V_w \times C_{out}} \quad 5.1$$

berechnet werden. Die zu Grunde gelegten Werte waren die Ratenkonstante ( $k$ ) der angeglichenen Exponentialfunktion, das molare Volumen von Wasser ( $V_w = 18 \frac{cm^3}{mol}$ ), das Volumen der Protoplasten vor Beginn der Schwellung ( $V_0 = 6,5 \cdot 10^{-11} cm^3$  (SY1) bzw.  $1,4 \cdot 10^{-11} cm^3$  (W303)), die Oberfläche der Protoplasten vor Beginn der Schwellung ( $S_0 = 7,8 \cdot 10^{-7} cm^3$  (SY1) bzw.  $3,6 \cdot 10^{-7} cm^3$  (W303)) und die Konzentration osmotisch wirksamer Teilchen im Außenmedium ( $C_{out} = 1,5$  M) der Protoplasten zu Beginn der Messungen. Die  $P_f$  Werte werden in cm/s angegeben

## 5.3 Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten für $CO_2$ ( $P_{CO_2}$ )

### 5.3.1 Färben ganzer Zellen mit Fluoreszeinbisacetat (FBA\*)

Für die  $CO_2$ -Messungen wurde Hefen (transformiert mit Tabak-Carboanhydrase und unterschiedlichen Aquaporinkonstrukten) wie beschrieben angezogen. Von einer Übernachtskultur wurden 20 ml abgenommen und anschließend bei  $4^\circ C$  für 3 min und 3000 rpm zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstands wurden die Zentrifugenröhrchen kopfüber auf Zellpapier gestellt und vorsichtig ausgeklopft. Die Pellets wurden in 10 ml bidest. Wasser resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand vollständig entfernt. Dann wurde jeder Ansatz mit 5 ml Färbelösung versetzt, resuspendiert und für 20 min bei  $30^\circ C$  und 125 rpm inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Arbeiten auf Eis ausgeführt. Nach erneuter Zentrifugation bei  $4^\circ C$  und Verwerfen des Überstandes wurden die nun gelb gefärbten Pellets in eiskaltem Aufnahmepuffer gelöst und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos entfernt und die Pellets dann bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert. Für die Messung wurden etwa 3 ml (je nach der Größe des Pellets) des Aufnahmepuffers auf die Zellen gegeben.

Die gelb gefärbte Zellsuspension wurde dann in Spritze A des Stopped Flow Spektrofluorometers überführt. Eine zweite Spritze wurde mit Mischpuffer gefüllt. Beide Lösungen konnten nun mit Hilfe der Apparatur unter definierten Bedingungen gemischt, und die Veränderung in der Fluoreszenz beobachtet und dokumentiert werden.

\*(wird unter dem Namen Fluoresceindiacetat (FDA) bei Aldrich vertrieben)

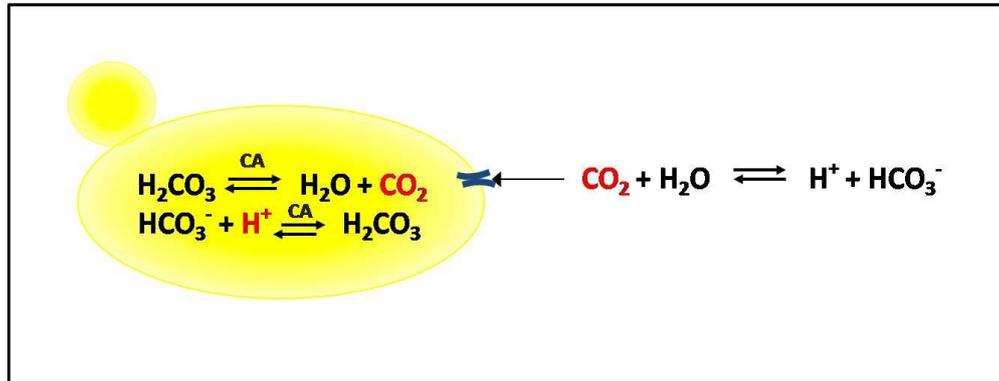
---

Färbelösung:	50 mM HEPES-NaOH (pH 7,0) 5 mM 2-Deoxy-D-Glukose 50 $\mu$ M FBA* (Stammlösung 5 mM in DMSO)
Aufnahmepuffer:	25 mM HEPES-NaOH (pH 7,0) 75 mM NaCl auf pH 6 titriert
CO <sub>2</sub> - Mischpuffer:	25 mM HEPES-NaOH (pH 7,0) 75 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) In einer geschlossenen Flasche über Nacht equilibriert und am nächsten Tag auf pH 6 eingestellt.

---

### 5.3.2 Prinzip der CO<sub>2</sub>-Permeabilitätsmessungen

Diffundiert CO<sub>2</sub> ins Zellinnere, katalysiert die Carboanhydrase (in dieser Arbeit die aus Tabak) dessen Umsetzung mit Wasser zu Kohlensäure (Abbildung IV 5.2). Das Zytosol der Zelle wird dadurch angesäuert. Mit fallendem pH sinkt auch die Quantenausbeute des Fluoreszeins (Slavik, 1982; Slavik, 1983). Dies kann durch das Spektrofluorometer detektiert werden. Die Geschwindigkeit, mit der diese Reaktion abläuft, ist dabei ein Maß für die Durchlässigkeit der Aquaporin-Konstrukte.



**Abbildung IV 5.2:** Schematische Darstellung des durch die Tabak-Carboanhydrase katalysierten Umsatzes von  $\text{CO}_2$  zu Kohlensäure in mit FBA beladenen Hefezellen (Pede, Nadine 2008).

---

Licht	$\lambda_{\text{ex}}$ : 490 nm, $\lambda_{\text{em}}$ : >510 nm	
Temperatur	10°C	
Aufnahmeraten	20 $\mu\text{s}$	4000 Datenpunkte
	200 $\mu\text{s}$	2000 Datenpunkte
	2 ms	2000 Datenpunkte
Filter	300 $\mu\text{s}$	

---

### 5.3.3 Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten für $\text{CO}_2$ ( $P_{\text{CO}_2}$ )

Über die Ratenkonstanten wurde der Permeabilitätskoeffizient der Plasmamembranen für  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CO}_2}$ ) nach (Yang *et al.*, 2000) berechnet. Hierbei ist  $k$  die ermittelte Ratenkonstante,  $\text{pH}_f$  der intrazellulären pH nach dem Einstrom des  $\text{CO}_2$ ,  $\text{pK}_s$  die Säurekonstante der Kohlensäure  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (= 6,4) und  $S/V$  der Quotient aus Zelloberfläche zu Volumen.

$$P_{\text{CO}_2} = k \times \frac{10^{\text{pH}_f - \text{pK}_s}}{\left(\frac{S}{V}\right)} \quad 5.2$$

Der Permeabilitätskoeffizient wird analog zur Wasserleitfähigkeit in cm/s angegeben.

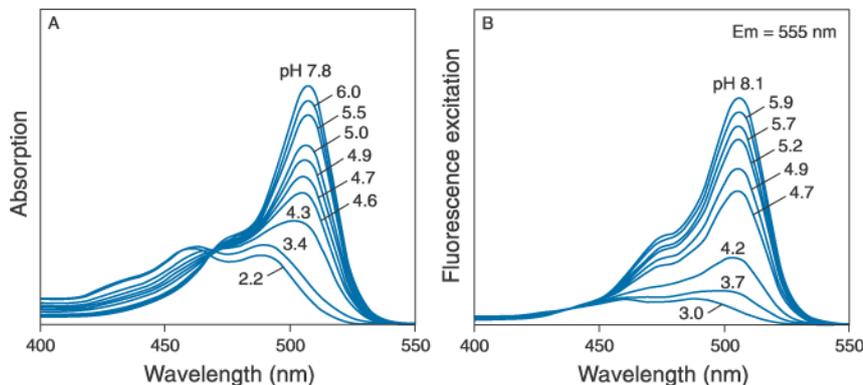
### 5.3.4 Fluoreszeinbisacetat

Fluoreszein und viele seiner Derivate weisen mehrere ionische Gleichgewichtszustände auf, deren Bildung pH-abhängig ist (Unciti-Broceta *et al.*, 2009).

Bei pH 9 liegt es als Dianion vor. Wird der pH gesenkt, so wird zuerst die phenolische Gruppe protoniert ( $pK_S \sim 6,4$ ). Dies führt zur Verschiebung des Gleichgewichtes zur monoanionischen Form des Fluorescein. Durch die zusätzliche Protonierung der Carboxylgruppe ( $pK_S < 5$ ) erhält die Verbindung eine neutrale Ladung. Bei weiterer Ansäuerung wird ein Fluorescein-Kation ( $pK_S \sim 2,1$ ) erzeugt.

Einzig die di- und monoanionische Form des Fluoreszeins zeigen Fluoreszenz. Das Absorptionsspektrum von Fluorescein zeigt deutlich die pH-Abhängigkeit der Absorption. Diese ist auf die Konzentration des Fluoreszein-Kations zurückzuführen. Das Emissionsspektrum weist einen nahezu identischen Verlauf auf. Hier ist, in Analogie zur Absorption, die deutliche Abnahme der Fluoreszenz-Intensität bei saurem pH zu beobachten (Abbildung IV 5.3).

Für die Messungen der Änderung des zytosolischen pH-Wertes von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen wurde das farblose membranpermeable Fluoreszeinbisacetat verwendet. Durch intrazelluläre Hydrolasen werden die beiden Acetat-Gruppen abgespalten, was zur Bildung des impermeablen fluoreszierenden Fluoreszeins führt



**Abbildung IV 5.3:** Der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein: Bei gleicher Fluoreszeinkonzentration, gleicher Anregungsleistung und verschiedenen pH-Werten aufgenommene Absorptionsspektren (A) und Emissionsspektren (B) ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))

## 6 Verfahren mit Proteinen

### 6.1 Proteinisolation aus Hefe

Alle Arbeiten zur Proteinisolation wurden auf Eis ausgeführt. Die Hefe wurde dafür erst in geeignetem Selektionsmedium angezogen, abzentrifugiert (Heraeus LR-1) und nach

Abschütten des Überstands gewogen. Vor dem Aufschluss der Hefen wurden Glaskugeln ( $\varnothing$  0,5 mm, Sigma) für mind. 10 min. in 5,8 M Salzsäure geschwenkt und danach mind. 10-mal mit bidest. Wasser intensiv gespült. Pro Gramm Hefepellet wurden 3 ml Homogenisierungspuffer und ein dem Pelletvolumen gleiches Volumen säuregewaschener Glaskugeln auf die Hefen gegeben. Danach wurde jeder Ansatz für 20 min. im Wechsel 20 s stark gevortext und 20 s auf Eis gekühlt. Der Überstand wurde bei 1500 g und 4°C für 3 min. zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Aus dem Überstand dieser Zentrifugation wurden die Membranen mit Hilfe einer Ultrazentrifuge (Sorvall Discovery M120) bei 50.000xg und 10°C für 20 min. pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Membranpellet wurde in 500  $\mu$ l Solubilisierungspuffer ohne Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM) resuspendiert. Danach konnte es bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde dem Solubilisierungspuffer DDM (Endkonzentration 2%) hinzugefügt. Die Suspension aus Puffer und Pellet wurde für 30 min. unter sanftem Schütteln bei 4°C inkubiert. Um die Membranen aus der Lösung zu entfernen, wurden sie in der Ultrazentrifuge (Sorvall Discovery M120) bei 50.000 xg und 10°C für 15 min. pelletiert. 1  $\mu$ l des Überstands wurde auf einen Saccharosedichtegradienten von 20% bis 2% aufgetragen. Der Gradient wurde für 16 h bei 38000 xg und 10°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Gradient wurde in 14 Fraktionen unterteilt, die einzelnen Fraktionen wurden auf ein SDS Polyacrylamid Gel aufgetragen und dort einer Elektrophorese unterzogen. Der Nachweis der Aquaporine in den Fraktionen erfolgte über eine Western Blot Analyse.

---

Homogenisierungspuffer:	50 mM	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH7,5
	1 mM	EDTA
	5%	Glycerin
	1 $\mu$ g/ml	Leupeptin
	1 $\mu$ g/ml	Pepstatin
Solubilisierungspuffer:	20 mM TRIS	
	100 mM NaCl	
	2 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	
	10% Glycerin	
	2% DDM	
Zuckerlösungen:	20 mM TRIS	
	100 mM NaCl	
	2 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	
	10% Glycerin	
	2% Saccharose / 20% Saccharose	

---

## 6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen in wässrigen Lösungen wurde mittels des Farbstoffes „Commassie Brilliant Blue G-250“ (CBBG) bestimmt (Bradford, 1976). Der Farbstoff bindet spezifisch an die Aminosäuren Arginin, Tryptophan, Tyrosin, Histidin, und Phenylalanin. An diese gebunden liegt der Farbstoff in der anionischen Form vor, deren Absorptions-Maximum bei 595 nm liegt. Frei in Lösung liegt CBBG als Kation vor und hat ein Absorptions-Maximum bei 470 nm.

Für die Protein-Konzentrationsbestimmung in wässrigen Lösungen wurde das Roti Nanoquant Kit (Roth) verwendet und nach der Vorschrift im Begleitheft vorgegangen. Als Standard wurde Rinderserum-Albumin (BSA) in 0,5 M NaOH verwendet.

## 6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird zur Trennung von Proteingemischen eingesetzt. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt durch seine Anlagerung an Proteine deren Eigenladung so effektiv, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (1,4 g SDS pro 1 g Protein).

Polyacrylamidgele bestehen aus Acrylamid, Bisacrylamid, N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS). Durch die Polymerisierung von Acrylamid entstehen lineare Acrylamid-Polymere. Erst durch die Vernetzung mit Bisacrylamid entsteht eine dreidimensionale Gelmatrix. APS dient als Katalysator für die Polymerisation von Acrylamid. APS bildet im Wasser freie Radikale, die mit Acrylamid reagieren. Das entstandene Acrylamidradikal kann mit einem weiteren Acrylamidmolekül (Monomer oder Polymer) weiterreagieren. TEMED, das selbst ein stabiles Radikal darstellt, erleichtert die Radikalbildung des APS und dient somit als Katalysator der Polymerisation.

Die Elektrophorese erfolgt in einem von (Laemmli, 1970) eingeführten diskontinuierlichen Tris/HCl-Tris/Glycin Puffersystem. Ein weitporiges Sammelgel überschichtet ein engmaschiges Trenngel. Durch den Feldstärkegradienten im Sammelgel erfolgt zu Beginn der Elektrophorese eine Vortrennung und eine Aufkonzentrierung der Proteinklassen. Beim Auftreffen auf das Trenngel erfahren die Proteine einen hohen Reibungswiderstand, was zur Zonenschärfung führt. Im Trenngel wirkt nun auf alle Proteine die gleiche Feldstärke, sodass ausschließlich die Größe für die Wandergeschwindigkeit ausschlaggebend ist.

Die Gele wurden in einem „Gel Casting System“ (Biometra) angefertigt. Durchgeführt wurde die Elektrophorese in einer Elektrophoresekammer der Fa. Hoefer (Mighty Small II SE 250), in die wahlweise ein oder zwei Gele eingespannt werden konnten. Die Elektrophorese wurde bei einem Stromfluss von 30 mA/Gel durchgeführt. Sobald die Front des Markierungsfarbstoff Bromphenolblau des Gel-Ladungs-Puffers aus dem Gel ausgetreten war, wurde die Auftrennung beendet.

---

Sammelgel (4%)	4%	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
	125 mM	Tris/HCl pH6,8
	0,2%	SDS
	0,1%	TEMED
	0,6%	APS
Trenngel (12,5%)	12,5%	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
	375 mM	Tris/HCl pH8,8
	0,2%	SDS
	0,05%	TEMED
	0,33%	APS
Laufpuffer	129 mM	Glycin
	0,1%	SDS
	25 mM	Tris pH 8,3
4xProbenpuffer	250 mM	Tris/HCl pH6,8
	200 mM	DTT
	8%	SDS
	40%	Glycerin
	0,01%	Bromphenolblau

---

## 6.4 Western Bolt Analyse von Proteinen

### 6.4.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran

Nach der Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die aufgetrennten Proteine in einer Tank-Blot-Aparatur (BioRad) auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran BA 83 Cellulosenitrat, Schleicher und Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 25 V über Nacht. Der Transferpuffer wurde während des Transfers auf 10°C gekühlt.

---

Transferpuffer	10 mM	CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid) pH 8 (frische 5 M NaOH-Lsg. Zum Einstellen des pH verwendet)
	10%	Methanol

---

### 6.4.2 Kolloidale Silberfärbung von Proteinen auf einer Nitrozellulose-Membran

Um die gesamten Proteine nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran sichtbar zu machen, wurde vor der Inkubation mit dem primären Antikörper eine Silberfärbung durchgeführt.

Hierfür wurde die Membran in der Färbelösung etwa 10 min bei RT geschwenkt. Um die Färbung zu stoppen, wurde die Membran unter laufendem bidest. Wasser gewaschen. Anschließend konnte die Dokumentation mit Hilfe des Detektionsgeräts ChemiDoc XRS System (BIO-RAD) erfolgen. Im Anschluss wurde die Membran zunächst zwei Mal je 5 min bei RT in der Entfärberlösung geschwenkt und dann drei Mal je 5 min ebenfalls bei RT in bidest. Wasser schwenkend inkubiert.

---

Färbelösung (50 ml)	2,5 ml	40% Natrium-Citrat-Dihydrat
	2 ml	20% Eisen(II)-sulfat
	0,5 ml	20% Silbernitrat
	45 ml	bidest. H <sub>2</sub> O
Entfärberlösung	15 mM	Kaliumhexacyanoferrat (III)
	50 mM	Natriumthiosulfat

---

### 6.4.3 Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz

Nach dem Transfer der Proteine wurde zur Maskierung der unbesetzten Bindungsstellen die Membran für 30 min in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation mit dem in Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min mit Waschpuffer, schloss sich eine 30 minütige Inkubation mit einem mit einer alkalischen Phosphatase fusionierten sekundären Antikörper an. Danach wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer für 10 min gewaschen und anschließend zweimal für 5 min mit Assay-Puffer.

Für die Detektion wurde ein Chemilumineszenz-Kit (Western-Star™ System, Applied Biosystems) verwendet. Mit Hilfe dieses Systems erfolgte der Nachweis des Sekundären Antikörpers, der an die aquaporinspezifischen Antikörper auf der Membran gebunden war. Die enzymatische Dephosphorylierung des Substrates CDP-Star durch die alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers führt zur Bildung eines meta-stabilen Dioxetan Phenolat-Anions, welches zerfällt und in gepufferter Lösung Licht emittiert. Die Lichtsignale wurden in einer Chemilumineszenz Dokumentations-Apparatur (ChemiDoc XRS System, BioRad) mit einer sensitiven CCD-Kamera aufgenommen. Die Expositionszeiten lagen zwischen 2 min und 2 h.

---

10xPBS-Puffer (1l)	82.3 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	23.5 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	40 g	NaCl
Blockierungslösung	1 x	PBS
	0,5%	Tween20
	5%	Magermilchpulver
Wasch-Puffer	1x	PBS
	0,5%	Tween20
Assay-Puffer	20 mM	Tris/HCl pH 9,8
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
Chemilumineszenz-Substrat (1ml)	20 mM	Tris/HCl pH 9,8
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,25 mM	CDP-Star®
	1x	Nitro-BlockII™ (20x)

---



## V Zusammenfassung

---

Aquaporine sind Proteine, die die Diffusion von Wasser oder kleiner, ungeladener Teilchen (wie Glycerin oder Ammoniak) durch biologische Membranen erleichtern. In Pflanzen kommen vier unterschiedliche Aquaporingruppen vor. In dieser Arbeit wurden zwei Vertreter aus der Gruppe der Plasmamembran Intrinsic Proteine (PIP) untersucht. Diese lässt sich funktionell in die PIP1-Aquaporine, die die Membranpassage kleiner neutraler Teilchen wie CO<sub>2</sub> erleichtern, und PIP2-Aquaporine, die hochselektiv für Wasser sind, unterteilen.

Zur Regulation der Wasserdurchlässigkeit von Zellmembranen durch Aquaporine werden verschiedene Mechanismen diskutiert, so z. B. differentielle Genexpression, ein Gating-Mechanismus oder eine kooperative Regulation der Aquaporinpermeabilität durch Heteromerisierung von PIP1- und PIP2-Aquaporinen. Um zu untersuchen, ob PIP1 und PIP2 *in vivo* in eukaryotischen Plasmamembranen direkt miteinander interagieren, wurde in dieser Arbeit die Methode der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation verwendet. Hierzu wurden Fusionsproteine aus den Tabak-Aquaporinen NtAQP1 (PIP1) und NtPIP2;1 (PIP2) mit jeweils der N-terminalen bzw. C-terminalen Hälfte von YFP fusioniert und in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Alle betrachteten Kombinationen (NtAQP1-YC+NtAQP1-YN; NtAQP1-YC+NtPIP2;1-YN; NtPIP2;1-YC+NtPIP2;1-YN;) führten zur Bildung von YFP-Fluoreszenz.

Bei allen Kombinationen wurden sowohl Strukturen innerhalb der Zellen als auch die Plasmamembran fluoreszent markiert. Durch die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten war es möglich, die Menge an exprimierten Aquaporinen in den Zellen zu vergleichen. Über Kollokalisationsanalyse mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff FM4-64 konnte der relative Anteil der Aquaporine in der Plasmamembran an der Gesamtheit der exprimierten Aquaporine ermittelt werden.

Um die Art der Wechselwirkung zwischen den beiden Aquaporinen zu charakterisieren, wurden NtAQP1-YC, NtPIP2;1 und NtAQP1-YC + NtPIP2;1 einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Es zeigte sich, dass NtAQP1-YC + NtPIP2;1 langsamer als NtPIP2;1 sedimentierte, aber schneller als NtAQP1-YC. Dies ist ein Indiz, dass die beiden verschiedenen Aquaporine miteinander Heterotetramere bilden.

Der Einfluss einer Heteromerisierung auf die Wasser- bzw. CO<sub>2</sub>-Permeabilität der Aquaporine wurde über Stopped Flow Spektrophotometrie bzw. -fluorometrie untersucht. Die Permeabilitäten der Membranen, in die die Aquaporine inseriert wurden, waren durch die Bildung des YFP gegenüber der Permeabilität von Membranen, in die unfusionierte Proteine integriert waren, erheblich reduziert. Durch Korrelation der ermittelten Permeabilitätskoeffizienten mit den Helligkeiten und dem relativen Anteil der Aquaporine in der Plasmamembran wurde gezeigt, dass die hohe Wasserdurchlässigkeit von Membranen bei Koexpression von PIP1- und PIP2-Aquaporinen aus einem gesteigerten Einbau von PIP2 in die Plasmamembran resultiert. PIP1-Aquaporine zeigen keine Wasserleitfähigkeit, ihr Einbau in die Membranen der Hefen scheint allerdings deren Kohlendioxidpermeabilität zu erhöhen.



## VI Literaturverzeichnis

---

1. Agre P (2004) Aquaporin water channels (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition*, **43**, 4278-4290.
2. Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, and Nielsen S (2002) Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine. *Journal of Physiology-London*, **542**, 3-16.
3. Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, and Nielsen S (1993) Aquaporin Chip - the Archetypal Molecular Water Channel. *American Journal of Physiology*, **265**, F463-F476.
4. Antonenko YN, Denisov GA, and Pohl P (1993) Weak Acid Transport Across Bilayer-Lipid Membrane in the Presence of Buffers - Theoretical and Experimental Ph Profiles in the Unstirred Layers. *Biophysical Journal*, **64**, 1701-1710.
5. Bacia K and Schwille P (2007) Fluorescence correlation spectroscopy. *Methods Mol Biol*, **398**.
6. Baker ME and Saier MH (1990) A Common Ancestor for Bovine Lens Fiber Major Intrinsic Protein, Soybean Nodulin-26 Protein, and Escherichia-Coli Glycerol Facilitator. *Cell*, **60**, 185-186.
7. Bertl A, Bihler H, Reid JD, Kettner C, and Slayman CL (1998) Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K<sup>+</sup> channel, DUK1 (TOK1), in situ. *Journal of Membrane Biology*, **162**, 67-80.
8. Bertl A and Kaldenhoff R (2007) Function of a separate NH<sub>3</sub>-pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat. *Febs Letters*, **581**, 5413-5417.
9. Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R, and Kaldenhoff R (1999) The Nicotiana tabacum plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant Journal*, **18**, 565-570.
10. Bignell GR and Evans IH (1996) Genomic yeast DNA clone banks. Construction and gene isolation. *Methods Mol Biol*, **53**.
11. Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, and Satiat-Jeunemaitre B (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy-Oxford*, **214**, 159-173.
12. Borgnia M, Nielsen S, Engel A, and Agre P (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annual Review of Biochemistry*, **68**, 425-458.
13. Bots M, Feron R, Uehlein N, Weterings K, Kaldenhoff R, and Mariani T (2005) PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 113-121.

14. Bouley R, Breton S, Sun TX, McLaughlin M, Nsumu NN, Lin HY, Ausiello DA, and Brown D (2000) Nitric oxide and atrial natriuretic factor stimulate cGMP-dependent membrane insertion of aquaporin 2 in renal epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, **106**, 1115-1126.
15. Bradford MM (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
16. Buck TM, Wagner J, Grund S, and Skach WR (2007) A novel tripartite motif involved in aquaporin topogenesis, monomer folding and tetramerization. *Nature Structural & Molecular Biology*, **14**, 762-769.
17. Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, and Jung R (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol*, **125**, 1206-1215.
18. Chaumont F, Moshelion M, and Daniels MJ (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell*, **97**, 749-764.
19. Choi WG and Roberts DM (2007) Arabidopsis NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *J Biol Chem*, **282**, 24209-24218.
20. Citovsky V, Gafni Y, and Tzfira T (2008) Localizing protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in planta. *Methods*, **45**, 196-206.
21. de Groot BL, Frigato T, Helms V, and Grubmuller H (2003) The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *Journal of Molecular Biology*, **333**, 279-293.
22. de Groot BL and Grubmuller H (2001) Water permeation across biological membranes: Mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, **294**, 2353-2357.
23. Dean RM, Rivers RL, Zeidel ML, and Roberts DM (1999) Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry*, **38**, 347-353.
24. Dordas C and Brown PH (2001) Evidence for channel mediated transport of boric acid in squash (*Cucurbita pepo*). *Plant and Soil*, **235**, 95-103.
25. Dreyer I, Antunes S, Hoshi T, MullerRober B, Palme K, Pongs O, Reintanz B, and Hedrich R (1997) Plant K<sup>+</sup> channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophysical Journal*, **72**, 2143-2150.
26. Eckert M, Biela A, Siefritz F, and Kaldenhoff R (1999) New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. *Journal of Experimental Botany*, **50**, 1541-1545.
27. Epimashko S, Fischer-Schliebs E, Christian AL, Thiel G, and Luttge U (2006) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transporter, H<sup>+</sup>-pumps and an aquaporin in light and heavy tonoplast

- membranes from organic acid and NaCl accumulating vacuoles of the annual facultative CAM plant and halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta*, **224**, 944-951.
28. Fang XH, Yang BX, Matthay MA, and Verkman AS (2002) Evidence against aquaporin-1-dependent CO<sub>2</sub> permeability in lung and kidney. *Journal of Physiology-London*, **542**, 63-69.
  29. Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, and Chaumont F (2004) Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell*, **16**, 215-228.
  30. Finkelstein A (1987). "Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes: Theory and reality"., . (New York, Wiley.
  31. Finn JT, Krautwurst D, Schroeder JE, Chen TY, Reed RR, and Yau KW (1998) Functional co-assembly among subunits of cyclic-nucleotide-activated nonselective cation channels, and across species from nematode to human. *Biophysical Journal*, **74**, 1333-1345.
  32. Fischer M and Kaldenhoff R (2008) On the pH Regulation of Plant Aquaporins. *J Biol Chem*, **283**, 33889-33892.
  33. Fischer M (2007). *Untersuchungen zur Modifikation von Aquaporinen aus Nicotiana tabacum. [Dissertation], TU Darmstadt, 2007.*
  34. Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, Grubmuller H, Agre P, and Engel A (2002) Structure and function of water channels. *Current Opinion in Structural Biology*, **12**, 509-515.
  35. Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, Santoni V, Ripoche P, and Maurel C (2002) The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant Journal*, **30**, 71-81.
  36. Gerbeau P, Guclu J, Ripoche P, and Maurel C (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant Journal*, **18**, 577-587.
  37. Golestaneh N, Fan JG, Zelenka P, and Chepelinsky AB (2008) PKC putative phosphorylation site Ser(235) is required for MIP/AQP0 translocation to the plasma membrane. *Molecular Vision*, **14**, 1006-1014.
  38. Gomes D, Agasse A, Thiebaud P, Delrot S, Geros H, and Chaumont F (2009) Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1788**, 1213-1228.
  39. Gorter E and Grendel F (1925) ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *J Exp Med*, **41**, 439-443.
  40. Grote K, von Trzebiatowski P, and Kaldenhoff R (1998) RNA levels of plasma membrane aquaporins in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, **204**, 139-144.

41. Guenther JF, Chanmanivone N, Galetovic MP, Wallace IS, Cobb JA, and Roberts DM (2003) Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell*, **15**, 981-991.
42. Hachez C, Moshelion M, Zelazny E, Cavez D, and Chaumont F (2006a) Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: A clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Molecular Biology*, **62**, 305-323.
43. Hachez C, Zelazny E, and Chaumont F (2006b) Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions? *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1758**, 1142-1156.
44. Harvengt P, Vlerick A, Fuks B, Wattiez R, Ruyschaert JM, and Homble F (2000) Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-regulated kinase. *Biochemical Journal*, **352**, 183-190.
45. Holm LM, Jahn TP, Moller ALB, Schjoerring JK, Ferri D, Klaerke DA, and Zeuthen T (2005) NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, **450**, 415-428.
46. Hu CD, Chinenov Y, and Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZip and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, **9**, 789-798.
47. Hub JS and de Groot BL (2006) Does CO<sub>2</sub> permeate through aquaporin-1? *Biophysical Journal*, **91**, 842-848.
48. Ikeda M, Beitz E, Kozono D, Guggino WB, Agre P, and 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**, 39873-39879.
49. Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, and Marumo F (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 6269-6273.
50. Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato M, Nakanishi Y, and Maeshima M (2005) Analysis of *Arabidopsis thaliana* aquaporin SIPs. *Plant and Cell Physiology*, **46**, S159.
51. Johanson U and Gustavsson S (2002) A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 456-461.
52. Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjovall S, Fraysse L, Weig AR, and Kjellbom P (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*, **126**, 1358-1369.

53. Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, and Kjellbom P (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*, **10**, 451-459.
54. Johansson I, Larsson C, Ek B, and Kjellbom P (1996) The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca<sup>2+</sup> and apoplastic water potential. *Plant Cell*, **8**, 1181-1191.
55. Johnson KD and Chrispeels MJ (1992) Tonoplast-Bound Protein-Kinase Phosphorylates Tonoplast Intrinsic Protein. *Plant Physiol*, **100**, 1787-1795.
56. Johansson N and Varshavsky A (1994) Split Ubiquitin As A Sensor of Protein Interactions In-Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 10340-10344.
57. Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, and Agre P (1994) Molecular-Structure of the Water Channel Through Aquaporin Chip - the Hourglass Model. *J Biol Chem*, **269**, 14648-14654.
58. Kaldenhoff R and Fischer M (2006) Functional aquaporin diversity in plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1758**, 1134-1141.
59. Kaldenhoff R, Kolling A, Meyers J, Karmann U, Ruppel G, and Richter G (1995) The Blue Light-Responsive Athh2 Gene of Arabidopsis-Thaliana Is Primarily Expressed in Expanding As Well As in Differentiating Cells and Encodes A Putative Channel Protein of the Plasmalemma. *Plant Journal*, **7**, 87-95.
60. Kaldenhoff R, Kolling A, and Richter G (1996) Regulation of the Arabidopsis thaliana aquaporin gene AthH2 (PIP1b). *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, **36**, 351-354.
61. Kamsteeg EJ, Duffield AS, Konings IBM, Spencer J, Pagel P, Deen PMT, and Caplan MJ (2007) MAL decreases the internalization of the aquaporin-2 water channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 16696-16701.
62. Kamsteeg EJ, Heijnen I, van Os CH, and Deen PMT (2000) The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers. *Journal of Cell Biology*, **151**, 919-929.
63. Kerppola TK (2006) Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7**, 449-456.
64. Kerppola TK (2008) Biomolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual Review of Biophysics*, **37**, 465-487.
65. Kim SA, Heinze KG, and Schwille P (2007) Fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Nature Methods*, **4**, 963-973.

66. Kirber MT, Chen K, and Keane JF (2007) YFP photoconversion revisited: confirmation of the CFP-like species. *Nature Methods*, **4**, 767-768.
67. Kremers GJ, Goedhart J, vanMunster EB, and Gadella TWJ (2006) Cyan and Yellow Super Fluorescent Proteins with Improved Brightness, Protein Folding, and FRET Förster Radius. *Biochemistry*, **45**, 6570-6580.
68. Kukulski W, Schenk AD, Johanson U, Braun T, de Groot BL, Fotiadis D, Kjellbom P, and Engel A (2005) The 5 angstrom structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. *Journal of Molecular Biology*, **350**, 611-616.
69. Kuwahara M, Fushimi K, Terada Y, Bai L, Marumo F, and Sasaki S (1995) cAMP-dependent Phosphorylation Stimulates Water Permeability of Aquaporin-collecting Duct Water Channel Protein Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J Biol Chem*, **270**, 10384-10387.
70. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, **227**, 680-&.
71. Laize V, Gobin R, Rousselet G, Badier C, Hohmann S, Ripoche P, and Tacnet F (1999) Molecular and functional study of AQY1 from *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the C-terminal domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **257**, 139-144.
72. Langmuir I (1917) THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. II. LIQUIDS.1. *Journal of the American Chemical Society*, **39**, 1848-1906.
73. Lebaudy A, Hosy E, Simonneau T, Sentenac H, Thibaud JB, and Dreyer I (2008) Heteromeric K<sup>+</sup> channels in plants. *Plant Journal*, **54**, 1076-1082.
74. Lee K, Song EH, Kim HS, Yoo JH, Han HJ, Jung MS, Lee SM, Kim KE, Kim MC, Cho MJ, and Chung WS (2008a) Regulation of MAPK phosphatase 1 (AtMKP1) by calmodulin in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, **283**, 23581-23588.
75. Lee MCS, Moura PA, Miller EA, and Fidock DA (2008b) *Plasmodium falciparum* Sec24 marks transitional ER that exports a model cargo via a diacidic motif. *Molecular Microbiology*, **68**, 1535-1546.
76. Liu B, Archer CT, Burdine L, Gillette TG, and Kodadek T (2007) Label transfer chemistry for the characterization of protein-protein interactions. *Journal of the American Chemical Society*, **129**, 12348-+.
77. Liu K, Kozono D, Kato Y, Agre P, Hazama A, and Yasui M (2005) Conversion of aquaporin 6 from an anion channel to a water-selective channel by a single amino acid substitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 2192-2197.
78. Liu K, Nagase H, Huang CG, Calamita G, and Agre P (2006) Purification and functional characterization of aquaporin-8. *Biology of the Cell*, **98**, 153-161.

79. Loque D, Ludewig U, Yuan LX, and von Wiren N (2005) Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole. *Plant Physiol*, **137**, 671-680.
80. Lu HAJ, Sun TX, Matsuzaki T, Yi XH, Eswara J, Bouley R, Mckee M, and Brown D (2007) Heat shock protein 70 interacts with aquaporin-2 and regulates its trafficking. *J Biol Chem*, **282**, 28721-28732.
81. Ludevid D, Hofte H, Himmelblau E, and Chrispeels MJ (1992) The Expression Pattern of the Tonoplast Intrinsic Protein {gamma}-TIP in Arabidopsis thaliana Is Correlated with Cell Enlargement. *Plant Physiol*, **100**, 1633-1639.
82. Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, and Yano M (2006) A silicon transporter in rice. *Nature*, **440**, 688-691.
83. Macey RI and Farmer REL (1970) Inhibition of Water and Solute Permeability in Human Red Cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **211**, 104-&.
84. Maurel C (2007) Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *Febs Letters*, **581**, 2227-2236.
85. Maurel C, Kado RT, Guern J, and Chrispeels MJ (1995) Phosphorylation Regulates the Water Channel Activity of the Seed-Specific Aquaporin Alpha-Tip. *Embo Journal*, **14**, 3028-3035.
86. Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, and Santoni V (2008) Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 595-624.
87. Meckel T (2004). *Endocytosis against the high turgor of guard cells [Dissertation] TU Darmstadt, Fachbereich Biologie.*
88. Mikosch M, Hurst AC, Hertel B, and Homann U (2006) Diacidic motif is required for efficient transport of the K<sup>+</sup> channel KAT1 to the plasma membrane. *Plant Physiol*, **142**, 923-930.
89. Missner A, Horner A, and Pohl P (2008a) Cholesterol's decoupling effect on membrane partitioning and permeability revisited: Is there anything beyond Fick's law of diffusion? *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1778**, 2154-2156.
90. Missner A, Kugler P, Antonenko YN, and Pohl P (2008b) Passive transport across bilayer lipid membranes: Overton continues to rule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, E123.
91. Missner A, Kugler P, Saporov SM, Sommer K, Mathai JC, Zeidel ML, and Pohl P (2008c) Carbon dioxide transport through membranes. *J Biol Chem*, **283**, 25340-25347.
92. Moller C, Fotiadis D, Suda K, Engel A, Kessler M, and Muller DJ (2003) Determining molecular forces that stabilize human aquaporin-1. *Journal of Structural Biology*, **142**, 369-378.

93. Muller DJ, Baumeister W, and Engel A (1999) Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 13170-13174.
94. Musa-Aziz R, Chen LM, Pelletier MF, and Boron WF (2009) Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 5406-5411.
95. Myers AM, Pape LK, and Tzagoloff A (1985) Mitochondrial Protein-Synthesis Is Required for Maintenance of Intact Mitochondrial Genomes in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Embo Journal*, **4**, 2087-2092.
96. Nakamoto RK, Rao R, and Slayman CW (1991) Expression of the Yeast Plasma-Membrane [H<sup>+</sup>]ATPase in Secretory Vesicles - A New Strategy for Directed Mutagenesis. *J Biol Chem*, **266**, 7940-7949.
97. Nakhoul NL, Hering-Smith KS, Abdulnour-Nakhoul SM, and Hamm LL (2001) Transport of NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in oocytes expressing aquaporin-1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **281**, F255-F263.
98. Neely JD, Christensen BM, Nielsen S, and Agre P (1999) Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*, **38**, 11156-11163.
99. Nemeth-Cahalan KL, Kalman K, Froger A, and Hall JE (2007) Zinc modulation of water permeability reveals that aquaporin 0 functions as a cooperative tetramer. *Journal of General Physiology*, **130**, 457-464.
100. Nishimoto G, Zelenina M, Li D, Yasui M, Aperia A, Nielsen S, and Nairn AC (1999) Arginine vasopressin stimulates phosphorylation of aquaporin-2 in rat renal tissue. *Am J Physiol Renal Physiol*, **276**, F254-F259.
101. Ockleford CD, Whyte A, and Bowyer DE (1977) Variation in Volume of Coated Vesicles Isolated from Human Placenta. *Cell Biology International Reports*, **1**, 137-146.
102. Otto B and Kaldenhoff R (2000) Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta*, **211**, 167-172.
103. Pede N (2008). *Untersuchungen zur CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine im heterologen Hefesystem. [Dissertation], TU Darmstadt.*
104. Petrasek Z, Hoegge C, Mashaghi A, Ohrt T, Hyman AA, and Schwille P (2008) Characterization of Protein Dynamics in Asymmetric Cell Division by Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal*, **95**, 5476-5486.
105. Petzke F (2002). *Skript zum PC-F-Praktikum "Versuche zur optischen Spektroskopie"*.
106. Pohl P, Saparov SM, and Antonenko YN (1998) The size of the unstirred layer as a function of the solute diffusion coefficient. *Biophysical Journal*, **75**, 1403-1409.

107. Prak S, Hem S, Boudet J, Viennois G, Sommerer N, Rossignol M, Maurel C, and Santoni V (2008) Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins. *Molecular & Cellular Proteomics*, **7**, 1019-1030.
108. Quigley F, Rosenberg JM, Shachar-Hill Y, and Bohnert HJ (2002) From genome to function: the Arabidopsis aquaporins. *Genome Biol*, **3**.
109. Ries J, Chiantia S, and Schwille P (2009) Accurate Determination of Membrane Dynamics with Line-Scan FCS. *Biophysical Journal*, **96**, 1999-2008.
110. Riethmuller C, Oberleithner H, Wilhelmi M, Franz J, Schlatter E, Klokckers J, and Edemiry B (2008) Translocation of aquaporin-containing vesicles to the plasma membrane is facilitated by actomyosin relaxation. *Biophysical Journal*, **94**, 671-678.
111. Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, and Maeshima M (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant and Cell Physiology*, **46**, 1568-1577.
112. Sanderson CM (2008) A new way to explore the world of extracellular protein interactions. *Genome Research*, **18**, 517-520.
113. Sanford JC, Smith FD, and Russell JA (1993) Optimizing the Biolistic Process for Different Biological Applications. *Methods in Enzymology*, **217**, 483-509.
114. Santoni V, Vinh J, Pflieger D, Sommerer N, and Maurel C (2003) A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. *Biochemical Journal*, **373**, 289-296.
115. Sarda X, Tusch D, Ferrare K, Legrand E, Dupuis JM, Casse-Delbart F, and Lamaze T (1997) Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant Journal*, **12**, 1103-1111.
116. Schelhorn SE, Lengauer T, and Albrecht M (2008) An integrative approach for predicting interactions of protein regions. *Bioinformatics*, **24**, I35-I41.
117. Schenk AD, Werten PJJ, Scheuring S, de Groot BL, Muller SA, Stahlberg H, Philippsen A, and Engel A (2005) The 4.5 angstrom structure of human AQP2. *Journal of Molecular Biology*, **350**, 278-289.
118. Scheuring S, Muller DJ, Ringler P, Heymann JB, and Engel A (1999) Imaging streptavidin 2D crystals on biotinylated lipid monolayers at high resolution with the atomic force microscope. *Journal of Microscopy-Oxford*, **193**, 28-35.
119. Scheuring S, Muller DJ, Stahlberg H, Engel HA, and Engel A (2002) Sampling the conformational space of membrane protein surfaces with the AFM. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, **31**, 172-178.
120. Shannon CE (1948) A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, **27**, 379-423.

121. Shyu YJ, Suarez CD, and Hu CD (2008a) Visualization of AP-1-NF-kappa B ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 151-156.
122. Shyu YJ, Suarez CD, and Hu CD (2008b) Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay. *Nature Protocols*, **3**, 1693-1702.
123. Siddiqi BA (1971) Ems-Induced and Uv-Induced Mitotic Recombination in *Saccharomyces-Cerevisiae* in A Heterozygous Diploid at Ade2 Locus. *Hereditas-Genetiskt Arkiv*, **69**, 305-&.
124. Siefritz F, Tyree MT, Lovisollo C, Schubert A, and Kaldenhoff R (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: From cellular effects to function in plants. *Plant Cell*, **14**, 869-876.
125. Sjøvall-Larsen S, Alexandersson E, Johansson I, Karlsson M, Johanson U, and Kjellbom P (2006) Purification and characterization of two protein kinases acting on the aquaporin SoPIP2; 1. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1758**, 1157-1164.
126. Slavik J (1982) Intracellular Ph of Yeast-Cells Measured with Fluorescent-Probes. *Febs Letters*, **140**, 22-26.
127. Slavik J (1983) Intracellular Ph Topography - Determination by A Fluorescent-Probe. *Febs Letters*, **156**, 227-230.
128. Smolin N, Li B, Beck DAC, and Daggett V (2008) Side-chain dynamics are critical for water permeation through aquaporin-1. *Biophysical Journal*, **95**, 1089-1098.
129. Soveral G, Veiga A, Loureiro-Dias MC, An TH, Van Dijck P, and Moura TF (2006) Water channels are important for osmotic adjustments of yeast cells at low temperature. *Microbiology-Sgm*, **152**, 1515-1521.
130. Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N, and te Heesen S (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 5187-5192.
131. Stahlberg H, Engel A, and Philippsen A (2002) Assessing the structure of membrane proteins: combining different methods gives the full picture. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire*, **80**, 563-568.
132. Sui HX, Han BG, Lee JK, Walian P, and Jap BK (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, **414**, 872-878.
133. Sung MK and Huh WK (2007) Bimolecular fluorescence complementation low analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **24**, 767-775.

134. Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wiren N, and Fujiwara T (2006) The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell*, **18**, 1498-1509.
135. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, and Hasegawa T (2008) Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochemistry and Cell Biology*, **130**, 197-209.
136. Tao RH and Maruyama IN (2008) All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *Journal of Cell Science*, **121**, 3207-3217.
137. Temmei Y, Uchida S, Hoshino D, Kanzawa N, Kuwahara M, Sasaki S, and Tsuchiya T (2005) Water channel activities of Mimosa pudica plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation. *Febs Letters*, **579**, 4417-4422.
138. Tornroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, and Kjellbom P (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, **439**, 688-694.
139. Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, and Maurel C (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*, **425**, 393-397.
140. Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, and Kaldenhoff R (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature*, **425**, 734-737.
141. Uehlein N, Otto B, Hanson DT, Fischer M, McDowell N, and Kaldenhoff R (2008) Function of Nicotiana tabacum aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO<sub>2</sub> permeability. *Plant Cell*, **20**, 648-657.
142. Unciti-Broceta A, Yusop MR, Richardson PR, Walton JGA, and Bradley M (2009) A fluorescein-derived anthocyanidin-inspired pH sensor. *Tetrahedron Letters*, **50**, 3713-3715.
143. van Balkom BWM, van Raak M, Breton S, Pastor-Soler N, Bouley R, van der Sluijs P, Brown D, and Deen PMT (2003) Hypertonicity is involved in redirecting the aquaporin-2 water channel into the basolateral, instead of the apical, plasma membrane of renal epithelial cells. *J Biol Chem*, **278**, 1101-1107.
144. Van Wilder V, Miecielica U, Degand H, Derua R, Waelkens E, and Chaumont F (2008) Maize plasma membrane aquaporins belonging to the PIP1 and PIP2 subgroups are in vivo phosphorylated. *Plant and Cell Physiology*, **49**, 1364-1377.
145. Vanheeswijk MPE and Vanos CH (1986) Osmotic Water Permeabilities of Brush-Border and Basolateral Membrane-Vesicles from Rat Renal-Cortex and Small-Intestine. *Journal of Membrane Biology*, **92**, 183-193.
146. Vera-Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ, and Pantoja O (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol*, **135**, 2318-2329.

147. Vida TA and Emr SD (1995) A New Vital Stain for Visualizing Vacuolar Membrane Dynamics and Endocytosis in Yeast. *Journal of Cell Biology*, **128**, 779-792.
148. Wallace IS, Choi WG, and Roberts DM (2006) The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1758**, 1165-1175.
149. Walz T, Smith BL, Zeidel ML, Engel A, and Agre P (1994) Biologically-Active 2-Dimensional Crystals of Aquaporin Chip. *J Biol Chem*, **269**, 1583-1586.
150. Weaver CD and Roberts DM (1991) Phosphorylation of Nodulin-26 by A Calcium-Dependent Protein-Kinase. *Faseb Journal*, **5**, A426.
151. Weigt M, White RA, Szurmant H, Hoch JA, and Hwa T (2009) Identification of direct residue contacts in protein-protein interaction by message passing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 67-72.
152. Willis S, Davidoff C, Schilling J, Wanless A, Doranz BJ, and Rucker J (2008) Virus-like particles as quantitative probes of membrane protein interactions. *Biochemistry*, **47**, 6988-6990.
153. Wistow GJ, Pisano MM, and Chepelinsky AB (1991) Tandem Sequence Repeats in Transmembrane Channel Proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **16**, 170-171.
154. Xiong L and Zhu JK (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell and Environment*, **25**, 131-139.
155. Yamada S, Komori T, Myers PN, Kuwata S, Kubo T, and Imaseki H (1997a) Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant and Cell Physiology*, **38**, 1226-1231.
156. Yamada S, Nelson DE, Ley E, Marquez S, and Bohnert HJ (1997b) The expression of an aquaporin promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* in tobacco. *Plant and Cell Physiology*, **38**, 1326-1332.
157. Yang BX, Fukuda N, van Hoek A, Matthay MA, Ma TH, and 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**, 2686-2692.
158. Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA, and Chaumont F (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 12359-12364.
159. Zelazny E, Miecielica U, Borst JW, Hemminga MA, and Chaumont F (2009) An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *Plant Journal*, **57**, 346-355.

# VII Anhang

---

## 1 Abkürzungsverzeichnis

<i>xg</i>	mal Erdbeschleunigung
$\mu$	Mikro
AQP	Aquaporin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNS	copy DNS
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
g	Gramm
GFP	<i>englisch</i> : green fluorescent protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HsAQP1	<i>Homo sapiens</i> Aquaporin 1
l	Liter
m	Meter
M	molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNS	<i>englisch</i> : messenger RNA
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NtAQP1	<i>Nicotiana tabacum</i> Aquaporin 1
NtPIP2;1	<i>Nicotiana tabacum</i> Plasmamembran Intrinsic Protein 2;1
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
$P_f$	osmotischer Permeabilitätskoeffizient
PIP	Plasmamembran Intrinsic Protein
pmol	Picomol
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minuter ( <i>englisch</i> : rounds per minute)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>englisch</i> : Sodium Dodecylsulfate)
sec	Sekunde
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit ( <i>englisch</i> : Unit)
V	Volt
Vol.	Volumen

## 2 Ein- bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren

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

## 3 Verwendete Vektoren

### 3.1 Vektoren zur Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

<u>Plasmide</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Herkunft</u>
pGREG505-2 $\mu$	GAL1-Promotor, CYC1-Terminator, LEU2-Selektionsmarker, Amp-Resistenz, Kan- Resistenz multiple Erkennungsequenzen für Restriktionsendonukleasen, 2 $\mu$ -Replikationsursprung	Euroscarf / Marlies Heckwolf
pYes2/CT®	Gal1-Promotor, CYC1-Terminator, Amp-Resistenz, URA3-Selektionsmarker, multiple Erkennungsequenzen für Restriktionsendonukleasen	Invitrogen
YEplac112_GAL	GAL1-Promotor, 2 $\mu$ -Replikationsursprung, Amp-Resistenz, Aktin-Terminator, multiple Erkennungsequenzen für Restriktionsendonukleasen, TRP1-Selektionsmarker	Prof Dr. Koch, Erlangen/ diese Arbeit

### 3.2 Klonierungsvektor

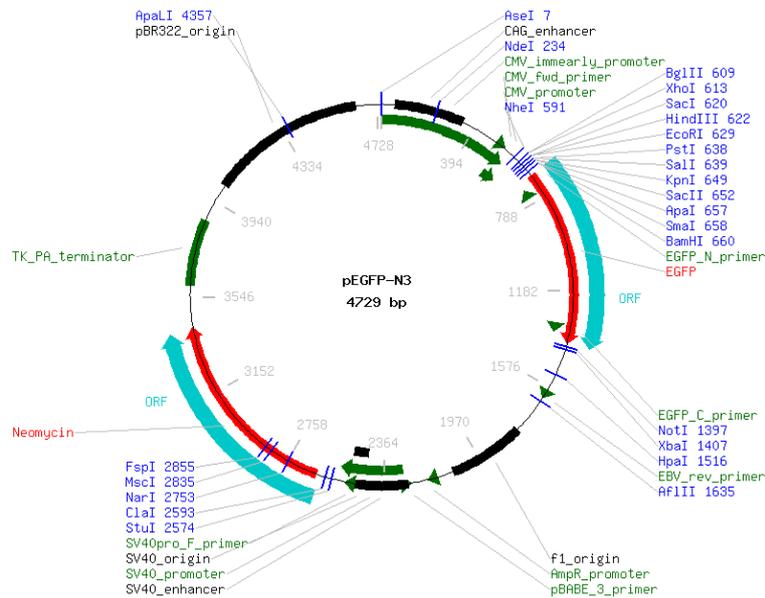
<u>Plasmid</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Herkunft</u>
pDrive®	T/A-Klonierungs-vektor, Multiple Erkennungsequenzen für Restriktionsendonukleasen, Kan-/Amp-Resistenz	Qiagen

### 4 Zur Klonierung verwendete synthetische Oligonukleotide (Primer)

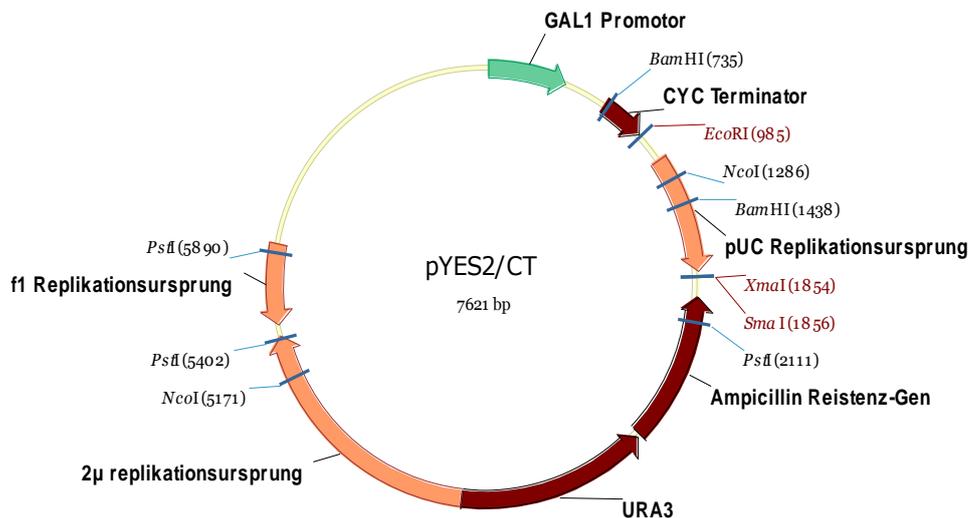
<u>Name</u>	<u>Sequenz 5'-3'</u>	<u>Anlagerungs Temperatur / °C</u>
SacI_GAL_s	AAGAGCTCACGGATTAGAAGCCGCCG	67,9
Sall_YC_as	AAAGTCGACCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG AGA	63,2
KpnI_MDL1p_s	AAAAGGTACCATGGCGAATTCGTCCACC	67,5
XhoI_MDL1p_as	AAAAC TCGAGTACTTCCCGGGCAACACTATT G	68,5
PvuII_GAL_s	AAACAGCTGACGGATTAGAAGCCGCCG	69,16
PvuII_YC_as	AAACAGCTGCTACTTGTACAGCTCGTCCATG CC	70,87
PvuII_CA_as	AAACAGCTGTGTCATACGGAAAGAGAAGGA GGAGAAAGAC	68,19
XhoI_YN_s	AAAAC TCGAGGGCGGCAGTGGCGGC	72,78
XbaI_YN_as	AAACATCTAGACTAGGCCATGATATAGACGT TGTGG	68,09
Sall_GAL_s	AAAGTCGACACGGATTAGAAGCCGCCGAG	70,3
EcoRI_YC_as	AAAGAATTCCTACTTGTACAGCTCGTCCATG CC	68,4
EcoRI_CA_as	AAAGAATTCCTCATAACGGAAAGAGAAGGAGG AGAAAG	67,0
BamHI_EYFP_s_a	AAAAGGATCCCCGGGTCCGGTCGCCAC	72,9
BamHI_EYFP_s_b	AAAAGGATCCAACCGGGTACCGGTCGCCAC	72,2
NotI_EYFP_as	AAAAGCGGCCGCTTTACTTGTACAGCTCGTC CATG	72,3

## 5 Vektorkarten

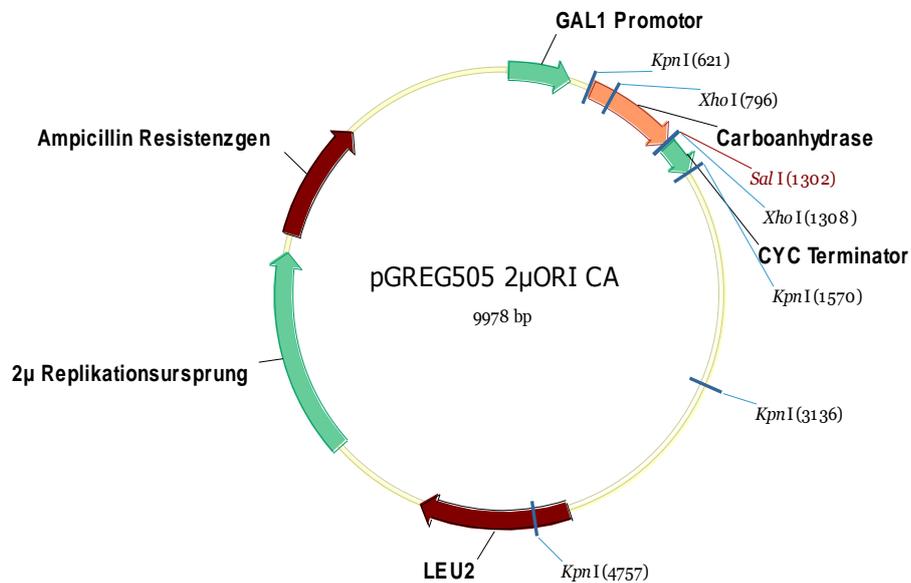
### 5.1 pEGFP-N3 (Vektor zur Fusion eines Gens mit eGFP und Expression in *E. coli*)



### 5.2 pYES-DEST52 (Destination Vektor für Gateway-Klonierung zur Protein-Expression in Hefe, Invitrogen)

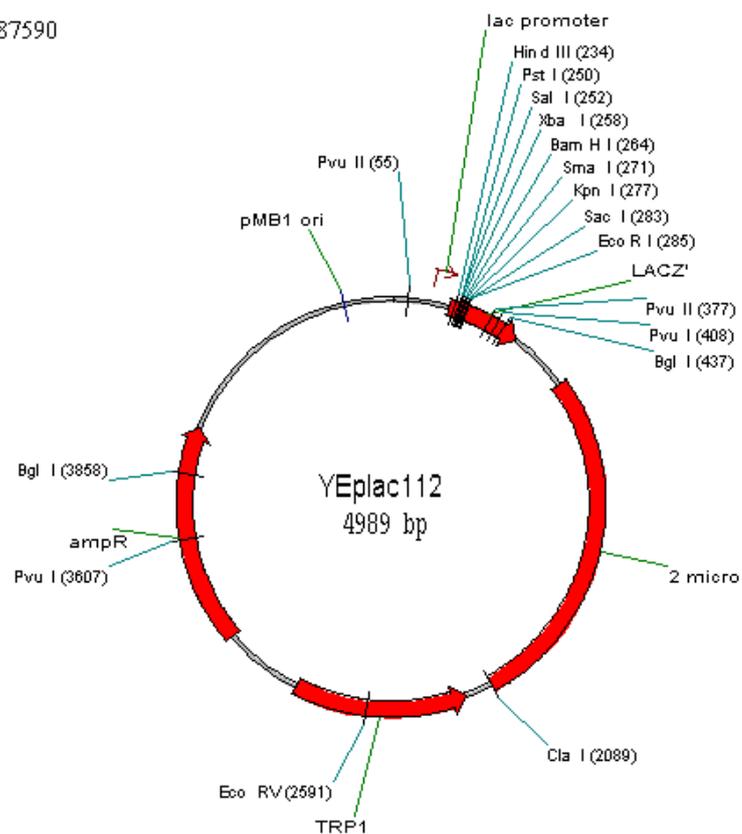


### 5.3 pGREG505\_2 $\mu$ ORI\_CA (Hefeexpressionsvektor mit cDNA der Carboanhydrase aus Tabak und dem 2 Micron-Replikationsursprung)



### 5.4 YEplac112 (Hefeexpressionsvektor mit lac-Promotor, lacZ und 2 Micron-Replikationsursprung)

ATCC 87590



## 6 Sequenzen

### 6.1 Nukleotidsequenz YC

GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATC  
 GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCG  
 GCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGC  
 CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTC  
 GTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG

### 6.2 Nukleotidsequenz YN

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCCG  
 AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG  
 AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGG  
 CAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGC  
 AGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC  
 GCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG  
 GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAA  
 CCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG  
 CACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCTAG

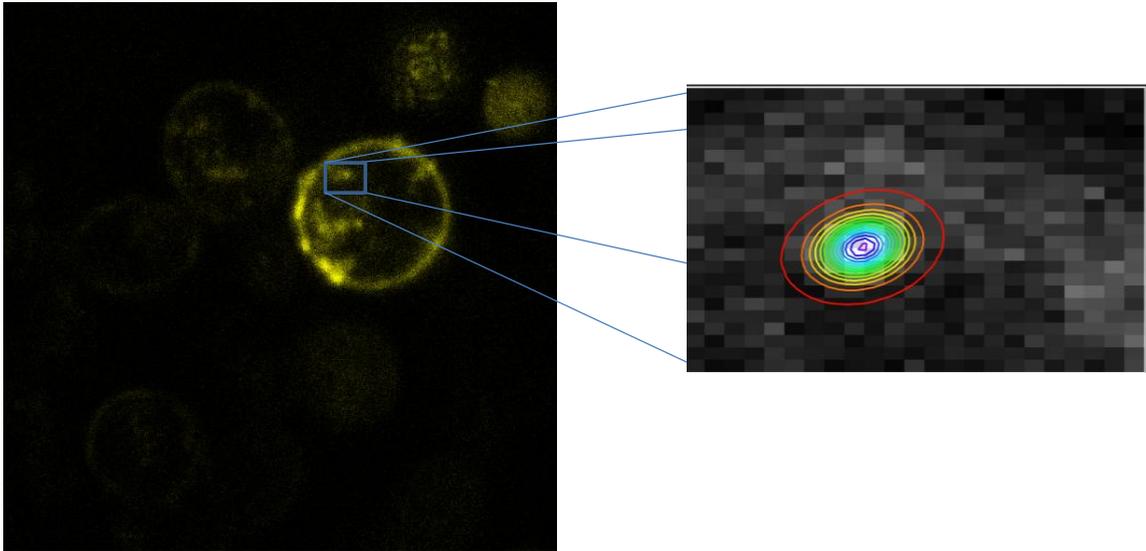
### 6.3 Aminosäuresequenz NtPIP2;1

MSKDVEEGQ VHQQHGKDYV DPPAPLLDF AELKLWSFHR ALIAEFIATL  
 LFLYVTVATV IGHKKLNGAD KCDGVGILGI SWAFGGMIFV LUYCTAGISG  
 GHINPAVTFG LFLARKVSLR RAVGYIIAQS LGAICGVGLV KGFMKHYINT  
 LGGGANFVQP GYNKGTALGA EIIGTFVLVY TVFSATDPKR SARDSHVPVL  
 APLPIGFAVF MVHLATIPIT GTGINPARTF GAAVIYNTEK IWDDQWIFWV  
 GPFV GALVAA VYHQYILRGS AIKALGSFRS NPTN\*

### 6.4 Aminosäuresequenz NtAQP1

MAENKEEDVK LGANKFRETQ PLGTAAQTDK DYKEPPPAPL FEPGELSSWS  
 FYRAGIAEFM ATFLFLYITI LTVMGLKRSD SLCSSVGIQG VAWAFGGMIF  
 ALUYCTAGIS GGHINPAVTF GLFLARKLSL TRAIYIVMQ CLGAICGAGV  
 VKGF MVGPYQ RLGGANVVN HGYTKGDGLG AEIIGTFVLV YTVFSATDAK  
 RNARDSHVPI LAPLPIGFAV FLVHLATIPI TGTGINPARS LGAAIYNTD  
 QAWDDHWIFW VGPFIGAALA AVYHQIIRA IPFHKSS\*

## 7 Ermittlung der Größe eines Vesikels durch Anpassung mit einer doppelten Gaußverteilung



**Abbildung 7.1:** Anpassung der Abbildung der Intensitätsverteilung des Fluoreszenzlichts im Fokus, abgebildet an einem YFP-markierten Vesikel, das von der Plasmamembran aus endozytiert wird. Die Anpassung erfolgte mit einer zweidimensionalen Gaußverteilung.



## **Danksagung**

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die Bereitstellung des Themas, sein Interesse, sein Vertrauen und seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Markus Engstler für die Bereitschaft, sich als Gutachter meiner Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Beate Otto und Norbert Uehlein für die Einarbeitung in den Laborbetrieb und die Unterstützung.

Niko Heddergott für die Unterstützung am iMIC in der AG Engstler.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der AG Kaldenhoff für die gute Atmosphäre, besonders Marlies Heckwolf, Jan Rehker und Henrik Sperling, ohne die diese Arbeit eine andere wäre

Alexander Schreiner (Universität Frankfurt, AG Starzinski-Powitz) für die Überlassung der Plasmide pYC und pYN.

Prof. Dr. Adam Bertl für das Überlassen des Hefestamms W303.

Prof. Dr. Koch (Universität Erlangen) für das Überlassen des Vektors YEplac112.

Allen Korrekturlesern.

Meinen Eltern



## Veröffentlichungen

1. W. Erker, S. Sdorra and T. Basche:  
**Detection of single oxygen molecules with fluorescence-labeled hemocyanins**  
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 127 (42): 14532-14533, OCT 26, 2005
2. P. Scheu<sup>†</sup>, S. Sdorra<sup>†</sup>, Y.-F. Liao, M. Wegner, T. Basché, G. Unden and W. Erker:  
**Polar accumulation of the metabolic sensory histidine kinase DcuS in *Escherichia coli***  
MICROBIOLOGY 154: 2463-2472, AUG 2008

## Posterpräsentationen

1. W. Erker, S. Sdorra and T. Basche:  
**Detection of single oxygen molecules by single-molecule fluorescence microscopy**  
Jahrestagung des Materialwissenschaftlichen Forschungszentrums der Johannes Gutenberg-Universität (MWFZ)  
19. 05. 2006, Mainz
2. S. Sdorra, P. Scheu, Y.-F. Liao, G. Unden, T. Basché and W. Erker:  
**Polar localisation of the Fumarate Sensor DcuS in *Escherichia coli***  
Jahrestagung der Deutschen Biophysikalischen Gesellschaft (DGfB)  
24. 09. – 27. 09. 2006, Mainz
3. S. Sdorra and R. Kaldenhoff:  
**Functional change of plant Plasma Membrane Intrinsic Proteins (PIP) as a result of protein - protein interaction**  
4th EMBO Conference: From Functional Genomics to Systems Biology  
15. 11. – 18. 11. 2008, EMBL, Heidelberg

## Teilnahme am Workshop

### **Dynamic Microscopy,**

Rudolf Virchow Zentrum/ DFG Forschungszentrum für experimentelle Biomedizin,

09.10.2006 – 11. 10. 2006, Julius-Maximilians-Universität Würzburg



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Sven Sdorra
Geburtsdatum	8.10.1979
Geburtsort	Zweibrücken
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung:

1986-1990	Grundschule Bottenbach
1990-1999	Helmholtz-Gymnasium, Zweibrücken
Juni 1999	Allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst:

1999 – 2000:	4. Batterie / Panzerartillerie Lehr Bataillon 345 in Kusel
--------------	--

### Hochschulstudium:

1999 - 2005	Biologiestudium (Diplom), Johannes Gutenberg-Universität Mainz
2002 - 2005:	Chemie- und Biologiestudium (Lehramtskandidat), Johannes Gutenberg Universität Mainz
2004 - 2005	Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. Th. Basché, Institut für Physikalische Chemie Thema: „Einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen am Hämocyanin der Vogelspinne <i>Eurypelma californicum</i> “
2005 - 2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis von Prof. Dr. Th. Basché, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Arbeitsgebiet: optische bildgebende Verfahren)

### Promotion:

2007 - 2009	Promotionsstudium im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Kaldenhoff Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt. Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter
-------------	---



## **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, Juli 2009

.....