

**Funktionelle Charakterisierung der**  
***Arabidopsis thaliana***  
**Aquaporine AtPIP1;2 und AtPIP2;3**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

**Dipl. Biol. Marlies Heckwolf**

aus

**Dieburg**

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Ulrich Göringer

Tag der Einreichung: 08.06.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 07.08.2009

Darmstadt 2010

D17



# Inhaltsverzeichnis

---

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1	<i>Bedeutung von Wasser und Kohlendioxid für die Pflanze</i>	7
1.1	Bedeutung von Wasser für pflanzliche Organismen	7
1.2	Bedeutung von Kohlendioxid für pflanzliche Organismen	9
2	<i>Aquaporine in pflanzlichen Organismen</i>	10
2.1	Familien pflanzlicher Aquaporine	11
2.2	Struktur und molekularer Mechanismus der Leitfähigkeit und Selektivität pflanzlicher Aquaporine	12
2.3	Physiologische Bedeutung der CO <sub>2</sub> - bzw. Wasser -Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine	14
3	<i>Ziele der Arbeit</i>	15
<b>II</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>17</b>
1	<i>Funktionelle Charakterisierung der Arabidopsis thaliana-Aquaporine AtPIP1;2 und AtPIP2;3 im heterologen Hefe-Expressionssystem</i>	17
1.1	Untersuchung der Aquaporin-Expression in <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	17
1.2	Untersuchung der Wasserleitfähigkeit von AtPIP1;2 und AtPIP2;3	18
1.2.1	Bestimmung der Größe von Protoplasten des <i>S. cerevisiae</i> Stammes W303	18
1.2.2	Bestimmung der optimalen Induktionsdauer der Aquaporin-Expression im heterologen Hefe-Expressionssystem	19
1.2.3	Bestimmung der Wasserleitfähigkeit von AtPIP1;2 und AtPIP2;3	20
1.3	Untersuchung der Kohlendioxid-Leitfähigkeit von AtPIP1;2 und AtPIP2;3	21
1.3.1	Überexpression der Carboanhydrase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.3.2	Bestimmung der optimalen Induktionsdauer der Aquaporin- und Carboanhydrase Expression	23
1.3.3	Bestimmung der Kohlendioxid-Leitfähigkeit von AtPIP1;2 und AtPIP2;3	24
2	<i>Physiologische Bedeutung von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 in Arabidopsis thaliana</i>	25
2.1	Molekulare Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien atpip1;2-1 und atpip2;3-1	26
2.1.1	Nachweis und Lokalisation der T-DNA-Insertion im AtPIP1;2- und AtPIP2;3-Gen	26
2.1.2	Untersuchung der Homozygotie der T-DNA-Insertionslinien	28
2.1.3	Untersuchung des Einflusses der T-DNA-Insertion auf die Expression von AtPIP1;2 und AtPIP2;3	29

2.1.4	Untersuchung der Anzahl an T-DNA-Insertionen in atpip1;2-1 und atpip2;3-1	29
2.1.5	Lokalisation der zusätzlichen T-DNA-Insertion in atpip2;3-1	30
2.2	Morphologische Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien atpip1;2-1 und atpip2;3-1	32
2.2.1	Untersuchung des Einflusses von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 auf die Entwicklung von Wurzeln	32
2.2.2	Untersuchung des Einflusses von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 auf die Entwicklung von Blättern	33
2.3	Physiologische Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien atpip1;2-1 und atpip2;3-1	34
2.3.1	Untersuchung des Einflusses von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 auf die hydraulische Leitfähigkeit von Wurzeln	34
2.3.2	Untersuchung des Einflusses von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 auf die photosynthetische Leistung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.3.3	Untersuchung des Einflusses von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 auf die stomatäre Leitfähigkeit von <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
<b>III</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
1	<i>Molekulare Funktion von AtPIP1;2 und AtPIP2;3</i>	47
2	<i>Physiologische Funktion von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 in Wurzeln</i>	49
3	<i>Physiologische Funktion von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 in Blättern</i>	51
4	<i>Ausblick</i>	54
<b>IV</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>55</b>
1	<i>Pflanzen und Anzuchtbedingungen</i>	55
1.1	<i>Versuchspflanze Arabidopsis thaliana (A. thaliana)</i>	55
1.2	<i>Anzucht und Kultivierung von Arabidopsis thaliana auf festen Medien</i>	55
1.3	<i>Kultivierung von Arabidopsis thaliana in hydroponischer Kultur</i>	56
1.4	<i>Morphologische Untersuchungen an Arabidopsis thaliana</i>	57
1.4.1	<i>Bestimmung der Blattanzahl und des Blattrosetten-Durchmessers</i>	57
1.4.2	<i>Bestimmung der Stomata-Größe und -Dichte</i>	57
1.4.3	<i>Bestimmung der Blattoberfläche</i>	57
1.4.4	<i>Bestimmung der Wurzeloberfläche</i>	57
1.5	<i>Physiologische Untersuchungen an Arabidopsis thaliana</i>	58
1.5.1	<i>Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit von pflanzlichem Gewebe</i>	58
1.5.2	<i>Gaswechsel Untersuchungen an Arabidopsis thaliana</i>	58
1.6	<i>Probenahme an Arabidopsis thaliana</i>	59
1.7	<i>Bestimmung des Chlorophyllgehalts</i>	59
1.8	<i>Isolierung genomischer DNA aus A. thaliana</i>	60
1.8.1	<i>Isolierung genomischer DNA aus geringen Blattmaterial-Mengen</i>	60

1.8.2	Isolierung genomischer DNA aus gesamten Blattrosetten	60
2	<i>Vorgehensweise mit Bakterien</i>	62
2.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	62
2.2	Verfahren mit <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	62
2.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	62
2.2.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	62
2.2.3	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	63
2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels Plasmid-Mini-Präparation	64
3	<i>Verfahren mit Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )	64
3.1	Die Hefestämme SY1 und W303	64
3.2	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
3.3	Herstellung einer <i>S. cerevisiae</i> -Dauerkultur	66
3.4	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen mittels Lithiumacetat	66
3.5	Homologe Rekombination <i>in vivo</i> in <i>S. cerevisiae</i>	66
3.6	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mittels Lithiumacetat-Methode	67
3.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	67
3.8	Induktion der Protein Expression transformierter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	68
3.9	Protoplastierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
3.10	Bestimmung der Größe von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protoplasten	69
3.11	Beladen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen mit Fluorescein-Bisacetat	69
3.12	Messung von Wasser- und CO <sub>2</sub> -Permeabilitätskoeffizienten der Plasmamembran von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mittels „Stopped Flow“-Spektrometrie	69
3.12.1	„Stopped-Flow“-Spektrometrie	69
3.12.2	Untersuchung der Wasserpermeabilität von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protoplasten	71
3.12.3	Berechnung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten (P <sub>f</sub> ) der Plasmamembran von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protoplasten	72
3.12.4	Untersuchung der CO <sub>2</sub> -Permeabilität von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen	72
3.12.5	Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten für CO <sub>2</sub> (P <sub>CO<sub>2</sub></sub> ) der Plasmamembran von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protoplasten	73
4	<i>Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren</i> (DNA)	74
4.1	Restriktionsabbau von DNA	74
4.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel	74
4.3	Elution von DNA aus einem Agarosegel	74
4.4	Sequenzieren von DNA-Fragmenten	74
4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction, PCR)	75
4.5.1	Standardbedingungen der PCR	75
4.5.2	TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR)	75
4.6	Klonierung von DNA	78

4.6.1	Klonierung von PCR-Produkten mit dem Gateway®-System	78
4.6.2	Generierung von cDNA mit flankierenden attB-Erkennungssequenzen	80
4.6.3	Klonierung des PCR-Produktes in einen Expressionsvektor mit Hilfe des Gateway®-Systems	80
4.7	Ligation von DNA-Fragmenten in binäre Vektoren	80
4.8	„Southern Blot“-Analyse von DNA	81
4.8.1	Herstellung einer DIG-UTP-markierten cDNA-Sonde	81
4.8.2	Behandlung der Agarose-Gele für Southern Blots	81
4.8.3	Transfer der DNA auf eine Nitrozellulose-Membran (Southern Blot)	81
4.8.4	Hybridisierung von Southern Blots mit einer DIG-markierten Sonde	82
4.8.5	Nachweis der DNA durch Chemilumineszenz	82
5	<i>Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)</i>	83
5.1	Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial	83
5.2	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	84
5.3	„Northern Blot“-Analyse von RNA	84
6	<i>Verfahren mit Proteinen</i>	85
6.1	Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterial	85
6.2	Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	85
6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	85
6.4	„Western-Blot“-Analyse von Proteinen	86
6.4.1	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran	86
6.4.2	Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz	87
6.5	Kolloidale Silberfärbung von Proteinen auf einer Nitrozellulose-Membran	87
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>VII</b>	<b>Anhang</b>	<b>101</b>
1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	101
2	<i>Primer</i>	103
3	<i>Sequenzen</i>	104
3.1	Flankierende Sequenzen der T-DNA (in gelb Sequenz der T-DNA)	104
3.2	Sequenzen der tertiären TAIL-PCR (in gelb Sequenz der T-DNA)	104
3.3	Sequenz der T-DNA-Sonde für die Southern Blot-Analyse	105
4	<i>Vektorkarten</i>	105
4.1	pDONR201 (Entry-Vektor für Gateway-Klonierung, Invitrogen)	105
4.2	pYES-DEST52 (Destination Vektor für Gateway-Klonierung zur Protein-Expression in Hefe, Invitrogen)	106
4.3	pYES2/CT (Hefeexpressionsvektor, Invitrogen)	106
4.4	pGREG505_CA (Hefeexpressionsvektor mit cDNA der Carboanhydrase aus Tabak)	107

4.5 pGREG505_2 $\mu$ ORI_CA (Hefeexpressionsvektor mit cDNA der Carboanhydrase aus Tabak und dem 2 Micron-Replikationsursprung)	107
---	-----



# I Einleitung

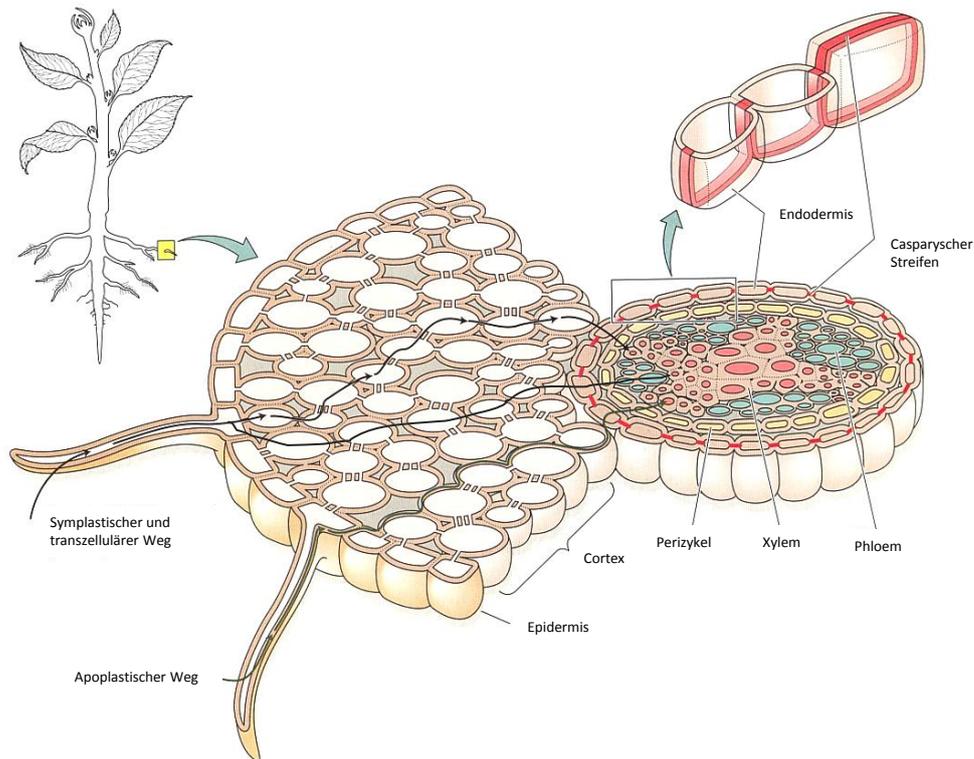
---

## 1 Bedeutung von Wasser und Kohlendioxid für die Pflanze

Pflanzen sind als photo-autotrophe Organismen in der Lage, aus anorganischen Verbindungen, die sie aus ihrer Umwelt aufnehmen, mit Hilfe der Energie des Sonnenlichts eine Vielzahl organischer Verbindungen zu generieren. Diese organischen Verbindungen werden auf allen Organisationsebenen (von der einzelnen Zelle bis zum Organ) für den Aufbau und Stoffwechsel der Pflanze benötigt.

### 1.1 Bedeutung von Wasser für pflanzliche Organismen

Wasser ist für biochemische und physikalische Prozesse wichtig und daher auch für die Physiologie von Lebewesen, darunter auch Pflanzen, von Bedeutung. Es fungiert unter anderem als Lösungsmittel für organische und anorganische Verbindungen und stellt das Medium dar, in dem sich Moleküle innerhalb und zwischen Zellen bewegen. Gleichzeitig bildet es die Umgebung in der Stoffwechselreaktionen erfolgen und ist auch direkt an vielen essentiellen chemischen Reaktionen beteiligt, wie z.B. der Photosynthese in Pflanzen. Innerhalb der gesamten Pflanze ist Wasser vor allem ein Transportmittel für gelöste Mineralien, die von der Wurzel bis in die oberirdischen Organe gelangen müssen. Pflanzen nehmen kontinuierlich Wasser an der Wurzeloberfläche auf. Es tritt überwiegend im Bereich der apikalen Wurzel, die die Wurzelhaarzone enthält, in die Wurzel ein. Nun können die Wassermoleküle drei verschiedenen Wegen bis zur Endodermis der Wurzel folgen (Abbildung I 1.1, Steudle und Peterson, 1998). Bewegen sich Wassermoleküle und in Wasser gelöste Mineralien lediglich über die Zellwand ohne eine Membran und Intrazelluläre zu passieren, spricht man vom apoplastischen Weg. Wenn die Moleküle jedoch über die Membran in eine Zelle ein- und auf der anderen Seite wieder austreten, gefolgt von erneutem Eintreten in eine Zelle usw. handelt es sich um den transzellulären Weg. Bewegen sich die Moleküle über die Plasmodesmata von einer Zelle zur nächsten, folgen sie dem symplastischen Weg. Spätestens an der Endodermis der Wurzel müssen Wassermoleküle vom apoplastischen Weg über die Plasmamembran in die Zellen eintreten, da hier die radialen Zellwände mit hydrophoben Substanzen (Suberin) imprägniert sind (Casparyscher Streifen). Anschließend stehen erneut alle drei Wege zur Verfügung, bis schließlich die Leitgefäße (Xylem) im Zentralzylinder erreicht sind. Aquaporine sind an den Transportwegen beteiligt, die eine Membranpassage beinhalten (siehe Absatz I 2).



**Abbildung I 1.1:** Mögliche Wege bei der Wasseraufnahme in der Wurzel. Ausgehend vom Cortex der Wurzel, kann Wasser drei Wege einschlagen. (1) Apoplastischer Weg: Wasser bewegt sich bis zur Endodermis über die Zellwände. Danach muss es wegen des Casparischen Streifens in die Zelle eintreten. (2) Transzellulärer Weg: Wasser bewegt sich von Zelle zu Zelle, indem es die Plasmamembran und die Zellwand passiert. (3) Symplastischer Weg: Der Wasserstrom erfolgt über den Symplasten durch die Plasmodesmata, ohne eine Zellmembran zu passieren. (aus *Plant Physiology*, Taiz, Zeiger 3. Auflage, verändert)

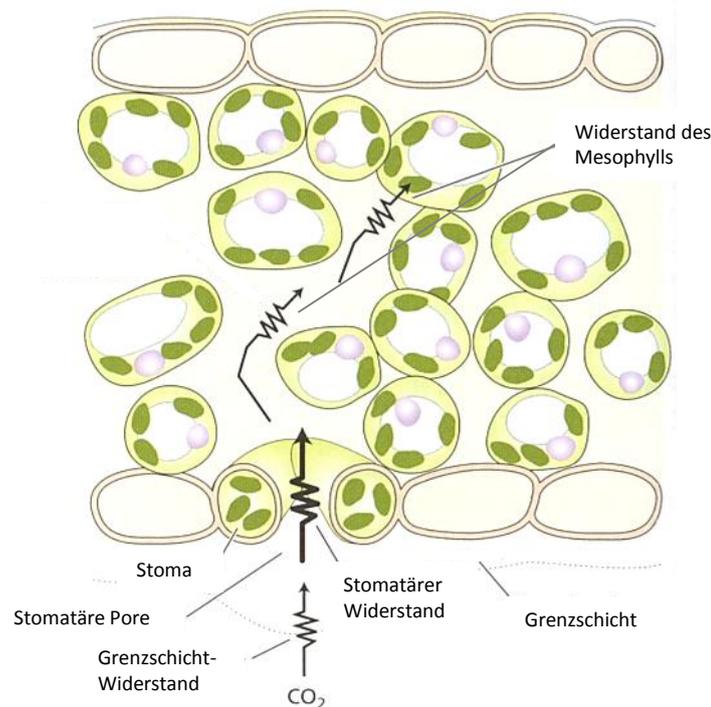
Von den Wurzeln gelangt Wasser aufgrund eines Wasserpotential-Gradienten zwischen Wurzel, Spross, Blatt und Atmosphäre bis in die Blätter (Transpirationsstrom). Dort wird es an die Atmosphäre verloren. Da bereits geringe Defizite in der Wasserversorgung einer Pflanze zu erheblichen Problemen bei den Prozessen mit Wasserbeteiligung führen, muss die Pflanze den Wasserverlust an der Blattoberfläche minimieren. Dies geschieht, indem jene eine wasserundurchlässige Epidermis und Cuticula umschließt, die lediglich von Poren, sogenannten Stomata, durchbrochen ist. Dadurch entsteht ein hoher Widerstand für Wasser, so dass dieses beinahe ausschließlich über die Stomata (geringer Widerstand) in die Atmosphäre übergeht. Darüberhinaus kann die Öffnungsweite der stomatären Pore aufgrund der besonderen Stomata-Architektur reguliert und so der Wasserverlust bei ungünstigen Wasserverhältnissen kontrolliert werden (Nilson und Assmann, 2007).

Allerdings nehmen Pflanzen über die Stomata das für die Aufrechterhaltung der Photosynthese unverzichtbare Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) auf, weshalb sie einen Kompromiss bei der Stomataregulation zwischen ständigem Wasserverlust und ausreichender  $\text{CO}_2$ -Versorgung finden müssen.

## 1.2 Bedeutung von Kohlendioxid für pflanzliche Organismen

Kohlendioxid ist die Kohlenstoff-Quelle für alle in der Photosynthese erzeugten Kohlenhydrate und damit nicht nur für photo-autotrophe Organismen essentiell, sondern indirekt auch für heterotrophe.

Die  $\text{CO}_2$ -Fixierung in den Chloroplasten kann nur erfolgen, wenn die Moleküle von der Atmosphäre in die Blätter diffundieren. Angetrieben von einem  $\text{CO}_2$ -Konzentrations-Gradienten zwischen der Atmosphäre und den aktiven Zentren der Rubisco in den Chloroplasten, diffundiert  $\text{CO}_2$  durch das Blatt.  $\text{CO}_2$ -Moleküle treffen auf ihrem Weg von der Atmosphäre in den Chloroplasten auf einige Barrieren (Diffusionswiderstände), die neben der Rubisco-Aktivität die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in den Interzellularen und Chloroplasten des Blattes bestimmen.



**Abbildung I 1.2:** Auf dem Diffusionsweg von  $\text{CO}_2$  von der Blattoußenseite bis in die Chloroplasten müssen die Moleküle Widerstände überwinden, zu denen der stomatäre und der Mesophyll-Widerstand zählen. (aus Plant Physiology, Taiz, Zeiger 3. Auflage, verändert)

In Abbildung I 1.2 ist der Weg dargestellt, den  $\text{CO}_2$ -Moleküle ins Blattinnere zurücklegen. Die Widerstände sind, analog zum elektronischen Ersatzschaltbild, mit Zick-Zack-Linien gekennzeichnet. Zunächst treffen die Moleküle auf den Widerstand der Grenzschicht an der Blattoberfläche, der aus unvermischter Luft besteht. Dieser Widerstand hängt von der Blattgröße (kleines Blatt verfügt über geringen Widerstand) und der Windgeschwindigkeit ab. Diesen Widerstand überwunden, tritt  $\text{CO}_2$  durch die stomatäre Pore, die als nächstes der freien Diffusion entgegensteht. Der stomatäre Widerstand ist durch Öffnen und Schließen der Stomata regulierbar, weshalb die Porenweite, wie auch die Anatomie und Anzahl der Stomata, einen starken Einfluss auf die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Blatt hat. Lange wurde angenommen,

dass dieser Widerstand die größte und einzig gewichtige zu überwindende Barriere ist. Allerdings hat sich in den vergangenen Jahren gezeigt, dass der Widerstand des Mesophylls nicht zu vernachlässigen ist. Dieser ist die Summe folgender Widerstände: Diffusionswiderstand der Interzellularen, Widerstand beim Übergang in die wässrige Phase der Mesophyll-Zellwand und die Diffusionswiderstände von Plasmamembran, Cytoplasma sowie Chloroplastenmembranen (Warren, 2007).

Der Widerstand der Stomata und des Mesophylls sind wichtige Kenngrößen des pflanzlichen Gaswechsels, die entscheidende Hinweise auf die Physiologie einer Pflanze geben können. In der Nomenklatur der Pflanzenphysiologie werden beide Größen in Form der Leitfähigkeit ( $1/\text{Widerstand}$ ) für Wasser an den Stomata (stomatäre Leitfähigkeit,  $g_s$ ) bzw. für  $\text{CO}_2$  im Mesophyll (Mesophyll-Leitfähigkeit,  $g_m$ ) ausgedrückt (Long und Bernacchi, 2003). Beide Widerstände tragen neben der  $\text{CO}_2$ -Fixierung durch die Rubisco dazu bei, dass die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in den Chloroplasten nicht der atmosphärischen entspricht. Bei krautigen Angiospermen wird die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in den Chloroplasten ( $c_c$ ) im Vergleich zur atmosphärischen Konzentration ( $c_a$ ) um ca. 50 % reduziert. Hierbei fallen dem stomatären Widerstand ca. 35 % und dem Mesophyllwiderstand ca. 15 % der  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsabnahme zu (Warren, 2007).

Sobald  $\text{CO}_2$ -Moleküle in den Chloroplasten vorliegen, können diese mit Hilfe des Enzyms Rubisco innerhalb des Calvin-Zyklus assimiliert werden. Die hierfür nötige Energie stammt aus den Reduktions- sowie Energie-Äquivalenten ( $\text{NADPH}+\text{H}^+$  und ATP), die während der lichtabhängigen Reaktion der Photosynthese gewonnen werden. Es entstehen Zucker, die über das Phloem in der gesamten Pflanze verteilt oder in Form von Stärke gespeichert werden.

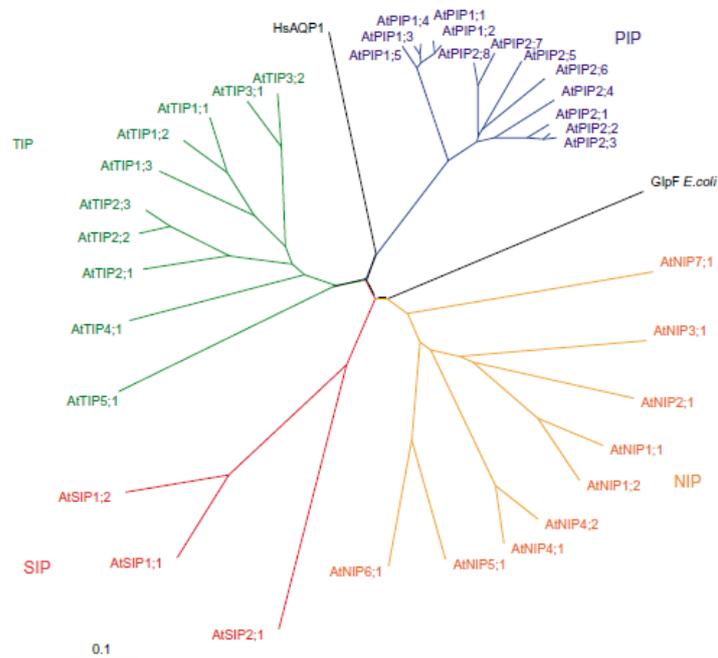
In den letzten Jahren sammelten sich die Belege, dass Aquaporine einen Einfluss auf stomatäre und Mesophyll-Leitfähigkeit, wie auch auf entscheidende Prozesse der  $\text{CO}_2$ -Assimilation haben (siehe nächstes Kapitel).

## 2 Aquaporine in pflanzlichen Organismen

Aquaporine zählen zur Super-Familie der *Membrane Intrinsic Proteins* (MIP), bei der es sich um eine Gruppe von integralen Membran-Proteinen handelt. Seit ihrer Entdeckung vor beinahe 20 Jahren konnten Aquaporine aus Organismen aller drei Domänen (Eukaryonten, Prokaryonten und Archaea) beschrieben werden (Kozono et al., 2003; Park und Saier, 1996). Ihnen fallen sowohl in Vertebraten wie auch in Pflanzen essentielle Funktionen zu, auf die nach Vorstellung der pflanzlichen Aquaporine und deren Struktur eingegangen wird.

## 2.1 Familien pflanzlicher Aquaporine

Pflanzen besitzen im Vergleich zu Tieren oder Mikroorganismen relativ viele Aquaporin-Gene. In *Arabidopsis thaliana* wurden 35, in Reis 33 und in Mais 36 Aquaporin-Gene gefunden, während in Vertebraten, wie z.B. dem Menschen lediglich 13 Gene vorliegen (Johanson et al., 2001; Quigley et al., 2001; Sakurai et al., 2005; Agre et al., 2002). Aufgrund vergleichender Sequenzanalysen werden pflanzliche Aquaporine in vier Unterfamilien eingeteilt: (1) Plasmamembran-Intrinsische Proteine (PIP), die sich in zwei Untergruppen PIP1 und PIP2 aufteilt, (2) Tonoplast-Intrinsische Proteine (TIP), (3) Nodulin-26-ähnliche-Intrinsische Proteine (NIP) und (4) kleine, basische intrinsische Proteine (small intrinsic proteins, SIP) (Abbildung I 2.1, Johanson et al., 2001; Chaumont et al., 2001; Johanson und Gustavsson, 2002).



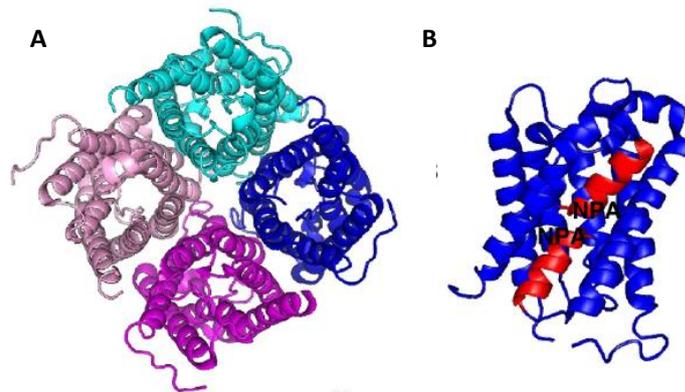
**Abbildung I 2.1:** Phylogenetischer Stammbaum der Aquaporine in *Arabidopsis thaliana*. Der Baum stellt alle 35 Aquaporin-Homologe sowie ihre Zugehörigkeit zu den vier Unterfamilien dar. (entnommen aus Quigley et al., 2001)

Die Bezeichnung der PIP und TIP-Aquaporine erfolgte aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb der pflanzlichen Zelle. Inzwischen zeigten zahlreiche Lokalisationsstudien, dass Vertreter beider Untergruppen in nahezu allen intrazellulären Membranen anzutreffen sind (Kaldenhoff und Fischer, 2006a). NIP-Aquaporine wurden basierend auf ihrer hohen Sequenzhomologie zu Nodulin26 dieser Unterfamilie zugeordnet (Wallace et al., 2006). Bei Nodulin26 handelt es sich um ein Aquaporin, das aus der Peribacteroid-Membran symbiontischer Knöllchen-Bakterien in den Wurzeln der Sojabohne isoliert wurde. Auch in Pflanzen ohne symbiontische Beziehung zu Bakterien liegen NIPs sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Membranen vor (Ma et al, 2006; Mizutani et al., 2006; Takano et al., 2006). Die Gruppe der SIP-Aquaporine ist unter den vier Unterfamilien die kleinste und erst

kürzlich innerhalb eines Genom-Sequenzanalyse-Projekts entdeckte Protein-Unterfamilie. SIPs sind vor allem in der Membran des ER anzutreffen (Johanson und Gustavsson, 2002; Ishikawa et al., 2005).

## 2.2 Struktur und molekularer Mechanismus der Leitfähigkeit und Selektivität pflanzlicher Aquaporine

Aquaporine liegen funktionell als Tetramere in der Membran vor, wobei jedes Monomer über eine funktionelle Pore verfügt (Abbildung I 2.2, Fu et al., 2000; Murata et al., 2000). Ein Monomer besteht aus sechs membrandurchspannenden Helices, die durch drei extra- und zwei intrazelluläre Loops verbunden sind. Sowohl N- als auch C-Terminus weisen zur Zytosolischen Seite der Membran. Die eigentliche Porenregion eines Aquaporins besteht aus einem doppelt vorliegenden, hoch konservierten Aminosäure-Motiv (Asparagin-Prolin-Arginin, NPA) zweier Halbhelices, die in Loop B und E gebildet werden, da diese Halbhelices von der intra- bzw. extrazellulären Seite in die Membran ragen (Borgnia et al., 1999). Diese Verjüngung der Pore stellt gemeinsam mit einer Kanalregion, die aromatische Aminosäuren sowie Arginin aufweist (Ar/R-Region), den zweistufigen Filter der Aquaporine für die durchlässigen Moleküle dar (Fujiyoshi et al., 2002).



**Abbildung I 2.2:** Molekulare Struktur eines Aquaporin-Tetramers in der Aufsicht (A) und eines Aquaporin-Monomers in der Seitenansicht (B). (aus Gomes et al., 2009)

Zunächst wurden Aquaporine- wie der Name deutlich macht- lediglich als „Wasserkanäle“ erachtet, die allerdings eine bemerkenswert hohe Selektivität und Transport-Effizienz aufweisen. Fujiyoshi et al. (2002) zeigten, dass bis zu  $10^9$  Wassermoleküle pro Sekunde durch ein humanes AQP1-Monomer treten können. Der molekulare Mechanismus der Selektivität von Aquaporinen konnte anhand struktureller Studien mit humanem AQP1 und bakteriellem GlpF aufgeklärt werden (de Groot und Grubmüller, 2001; Sui et al., 2001; de Groot et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Bereich um die NPA-Motive, als auch die tetraedrische Anordnung der vier Aminosäure-Reste innerhalb der Ar/R-Region als Selektivitätsfilter für die Leitung des Substrates durch ein Aquaporin dient.

Basierend auf zahlreichen Untersuchungen werden Aquaporine inzwischen als multifunktionelle Kanäle betrachtet, die neben Wasser weitere Substrate akzeptieren. Einige PIP-Aquaporine weisen eine Leitfähigkeit für Glycerin, Harnstoff und/oder CO<sub>2</sub> auf. Interessanterweise unterscheiden sich Vertreter der PIP1 und PIP2-Untergruppen in ihrer Selektivität, denn im Vergleich zur hohen Wasser-Leitfähigkeit von PIP2- sind PIP1-Aquaporine nahezu wasser-undurchlässig. Im Gegensatz dazu können kleine, ungeladene Moleküle (Glycerin, Harnstoff, CO<sub>2</sub>) die Pore von PIP1-Aquaporinen passieren, die von PIP2-Aquaporinen jedoch nicht (Biela et al., 1999; Dean et al., 1999; Gerbeau et al., 1999; Uehlein et al., 2003; Holm et al., 2005; Loque et al., 2005; Ishikawa et al., 2005; Takano et al., 2006).

Werden PIP1- und PIP2-Aquaporine in pflanzlichen oder tierischen Zellen (Frosch-Oozyten) co-exprimiert, erhöht sich die Wasserpermeabilität der Membran im Vergleich zu PIP2-exprimierenden Zellen. Außerdem ändert sich die Einbau-Effizienz der beiden PIP-Aquaporine in die Plasmamembran dahingehend, dass aufgrund der Interaktion mehr der PIP1- und PIP2-Proteine in der Plasmamembran vorliegen als es bei Zellen, die nur eines der beiden Aquaporine exprimieren, der Fall ist. Daher wird diskutiert, dass PIP1-Aquaporine eine rein regulatorische Funktion erfüllen könnten (Fetter et al., 2004; Zelazny et al., 2008 und 2009). Ob eine Interaktion der PIP1- und PIP2-Proteine zwischen Homotetrameren oder innerhalb von Heterotetrameren diese Änderungen verursachen wird derzeit erforscht.

Auch für einige Mitglieder der NIP bzw.- TIP-Unterfamilie konnten neben Wasser zusätzliche Substrate wie Formamid, Ammonium und Glycerin identifiziert werden (Dean et al., 1999; Gerbeau et al., 1999; Ishikawa et al., 2005).

Von besonderem physiologischen Interesse ist die Fähigkeit einiger Aquaporin-Homologe Gase wie Kohlendioxid oder Ammoniak leiten zu können (Uehlein et al., 2003; Holm et al., 2005; Loque et al., 2005). Diese Funktion einer Proteinvermittelten Diffusions-Erleichterung für Gase über Membranen ist vom biophysikalischen Standpunkt betrachtet unnötig, da kleine, neutrale Moleküle ungehindert diffundieren können. Aufgrund der Arbeit von Overton (siehe Referenz Missner et al., 2008a) bezüglich der Permeabilität löslicher Teilchen ist es gängige Lehrmeinung, dass Membranen keine ausreichende Barriere für CO<sub>2</sub>-Moleküle darstellen (Missner et al., 2008b). Die Allgemeingültigkeit dieses Dogmas wird aber aufgrund der Identifikation Gas-impermeabler Membranen sowie Proteinen, die als Gas-Poren fungieren, in Frage gestellt (Prasad et al., 1998; Terashima und Ono, 2002; Endeward und Gros, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität der apikalen Darm-Epithelien des Meerschweinchens für CO<sub>2</sub> ca. 200 Größenordnungen geringer ist als die von Erythrozyten. Aus diesem Grund wurde die Membran der Darm-Epithelien als CO<sub>2</sub> impermeabel erachtet (Endeward und Gros, 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass das humane AQP1 wie auch NtAQP1 die CO<sub>2</sub>-Permeation in Oozyten erhöhen (Nakhoul et al., 1998; Uehlein et al., 2003) und, dass der CO<sub>2</sub>-Austausch in Erythrozyten beinahe ausschließlich über AQP1 erfolgt (Blank und Ehmke, 2003). Im Gegensatz dazu konnte AQP1 und AQP5 in tierischem Lungengewebe eine solche Funktion nicht zugeschrieben werden, da man

keinen Unterschied zwischen AQP-defizienten Gewebeproben und unveränderten Gewebeproben identifizieren konnte (Fang et al., 2002). Auch Ergebnisse molekular-dynamischer Simulationen sprechen gegen eine Aquaporin-erleichterte Diffusion (Hub und de Groot, 2006). Die Diskussion über CO<sub>2</sub>-Poren ist kontrovers und noch nicht beendet. Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten auch darauf zurückgeführt werden, dass bisherige Studien mit unterschiedlich spezialisierten Geweben, Zellen und Membranen tierischer Organismen durchgeführt wurden, die verschiedene physiologische Funktionen wahrnehmen, weshalb eine Vergleichbarkeit der Daten schwierig ist. Molekulare und physiologische Erkenntnisse stützen sich bei pflanzlichen Organismen bisher ausschließlich auf Untersuchungen mit dem CO<sub>2</sub>-leitfähigen NtAQP1 aus *Nicotiana tabacum* (Bedeutung für die Pflanze siehe nächstes Kapitel).

Der molekulare Mechanismus, der der Permeation von Gasen zugrunde liegt, ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Neuere Untersuchungen an einem TIP ergaben Hinweise, dass Gase und Wasser unterschiedliche Transportwege nehmen. Während Wasser durch die Monomerpore diffundiert, tritt Ammoniak möglicherweise durch die zentrale Pore eines Aquaporin-Tetramers (Bertl und Kaldenhoff, 2007).

### **2.3 Physiologische Bedeutung der CO<sub>2</sub>- bzw. Wasser -Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine**

Um die Beteiligung von Aquaporinen an physiologischen Prozessen zu untersuchen, werden vor allem Pflanzen eingesetzt, deren Aquaporin-Expression verändert ist (erniedrigt durch T-DNA-Insertion, RNA<sub>i</sub>- oder Antisense-Technik bzw. erhöht durch Überexpressionsmethoden). So konnte durch Untersuchungen der Photosynthese-Aktivität von Pflanzen gezeigt werden, dass Tabakpflanzen, die ein PIP1-Aquaporin wie NtAQP1 in Tabak bzw. AtPIP1;2 ebenfalls in Tabak überexprimierten, eine erhöhte Netto-Assimilationsrate aufweisen. Im umgekehrten Fall einer Expressionsreduktion von NtAQP1 ist die Netto-Photosyntheserate reduziert. Da in den untersuchten Pflanzen die photosynthetische Assimilationsrate in direkter Abhängigkeit vom Expressionsniveau der Aquaporine war, ist eine Erleichterung der CO<sub>2</sub>-Permeation durch diese Aquaporine denkbar (Uehlein et al., 2003; Aharon et al., 2003). Weitere Belege für die Bedeutung der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine konnte aus den physiologischen Untersuchungen der Mesophyll-Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub> (g<sub>m</sub>) in NtAQP1 über- bzw. reduziert-exprimierenden Tabak-Pflanzen gewonnen werden. Es zeigte sich, dass g<sub>m</sub> wie auch die Assimilationsrate mit der Menge an NtAQP1 korreliert (Flexas et al., 2006). Interessanterweise konnte sogar gezeigt werden, dass die Funktion einer CO<sub>2</sub>-Pore in der inneren Chloroplasten-Membran zum Tragen kommt, da eine RNA<sub>i</sub>-induzierte Reduktion von NtAQP1, prozentual betrachtet, größere Auswirkungen auf die CO<sub>2</sub>-Permeabilität der Chloroplasten-Membran hatte als auf die CO<sub>2</sub>-Permeabilität der Plasmamembran (Uehlein et al., 2008).

Außerdem fand man bei Tabak-Pflanzen, deren NtAQP1-Gehalt (ein PIP1-Aquaporin) mittels Antisense-Technik reduziert war, eine Reduktion der Wasser-Permeabilität von Wurzel-Protoplasten wie auch eine Abnahme der hydraulischen Leitfähigkeit der gesamten Wurzeln. NtAQP1 ist demnach eine Komponente des transzellulären Wasser-Transports innerhalb der Wurzel (Siefritz et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse konnten für ein PIP2-Aquaporin aus *Arabidopsis* (AtPIP2;2) erhalten werden (Javot et al., 2003). Aquaporine sind auch für die Regeneration von Pflanzen nach einer Trockenperiode von Bedeutung. *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit reduzierter PIP1 und PIP2-Expression war dies im Vergleich zu Kontroll-Pflanzen nicht so schnell möglich (Martre et al., 2002).

### 3 Ziele der Arbeit

Wie bereits erwähnt, findet man in der Unterfamilie der Plasmamembran-intrinsischen Proteine zwei Untergruppen, PIP1 und PIP2, die sich in ihren Leitfähigkeitscharakteristika unterscheiden. Dies ist besonders auffällig, da sich die Sequenzen der beiden Gruppen lediglich um ca. 30 % unterscheiden und innerhalb des Selektivitätsfilters sogar identisch sind.

Schwerpunkt dieser Arbeit war, je einen Vertreter der beiden Untergruppen aus *Arabidopsis thaliana* bezüglich ihrer molekularen Funktion zu untersuchen und diese in Bezug zu ihrer physiologischen Relevanz zu stellen. Hierfür wurden das bereits beschriebene AtPIP1;2 (Kaldenhoff et al., 1994; Kaldenhoff et al., 1998) sowie AtPIP2;3 ausgewählt.

Die Ziele der Arbeit waren:

- (1) Untersuchung der Leitfähigkeit von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 für Wasser und CO<sub>2</sub> im heterologen Expressionssystem
- (2) Analyse der physiologischen Funktion von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 in der Pflanze. Hierfür wurden zwei T-DNA-Insertionslinien verwendet. Besonderes Augenmerk sollte bei den physiologischen Untersuchungen dieser *Arabidopsis thaliana*-Linien auf möglichen Funktionsunterschieden der Aquaporine in den Organen Wurzel und Blatt liegen. Daher standen die in diesen Organen hauptsächlich ablaufenden Prozesse (Wasseraufnahme in der Wurzel bzw. Photosynthese im Blatt) im Fokus der Untersuchungen.



# II Ergebnisse

---

## **1 Funktionelle Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana*-Aquaporine AtPIP1;2 und AtPIP2;3 im heterologen Hefe-Expressionssystem**

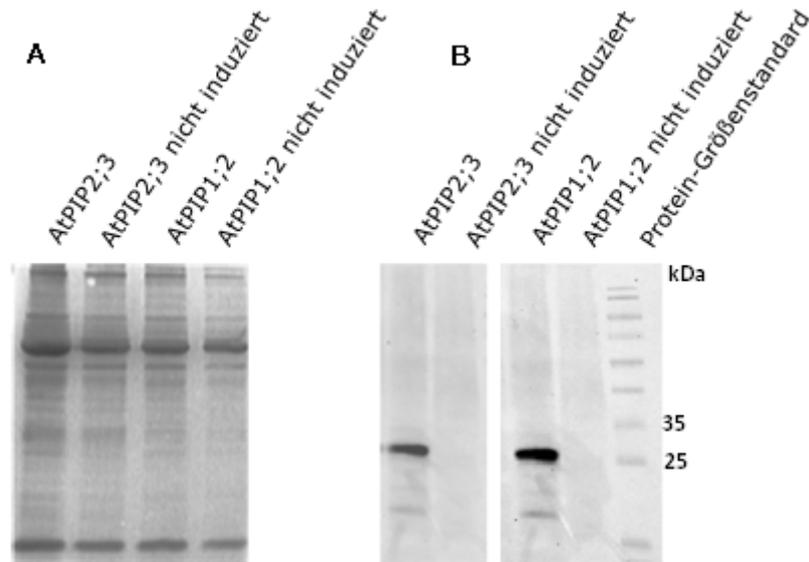
Die Mitglieder der PIP1- und PIP2-Unterfamilie der Plasmamembran-intrinsischen Proteine unterscheiden sich zum einen strukturell in der Länge des N- und C-Terminus, zum anderen funktionell in ihren Leitfähigkeitscharakteristika. Während PIP2-Aquaporine die Wasserpermeabilität von Membranen erhöhten, konnte dies für PIP1-Aquaporine unter identischen Versuchsbedingungen nicht gezeigt werden (Chaumont et al., 2000; Moshelion et al., 2002; Bots et al., 2005). Ferner wiesen PIP1-Aquaporine eine Leitfähigkeit für kleine, unpolare Moleküle wie Harnstoff, Glycerin oder Gase, wie CO<sub>2</sub> auf, PIP2-Aquaporine hingegen nicht (Biela et al., 1999; Uehlein et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob diese Leitfähigkeitscharakteristika für AtPIP1;2 bzw. AtPIP2;3 als Vertreter der PIP1- bzw. PIP2-Unterfamilie in *Arabidopsis thaliana* bestätigt werden konnten. Bislang wurde gezeigt, dass AtPIP2;3 die Membranpermeabilität von *Xenopus* Oozyten für Wasser stark erhöht, während die Expression von AtPIP1;2 lediglich eine geringe Steigerung der Wasserdurchlässigkeit der Membran verursachte (Daniels et al., 1994; Kammerloher et al., 1994). Eine Funktionsanalyse hinsichtlich einer CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit wurde für beide Aquaporine noch nicht publiziert.

### **1.1 Untersuchung der Aquaporin-Expression in *S. cerevisiae*-Zellen**

Die Expression der untersuchten *Arabidopsis thaliana* Aquaporine in der Hefe wurde mit Hilfe einer „Western-Blot“-Analyse von Membranprotein-Fractionen der *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen untersucht (Abbildung II 1.1). Durch die Hybridisierung mit aquaporinspezifischen Antikörpern konnten die Proteine in den Präparationen nachgewiesen werden.

Es zeigte sich beim Vergleich der Chemilumineszenz-Signale, dass eine ähnliche Intensität und somit Proteinkonzentration der Aquaporine zum Zeitpunkt der Leitfähigkeitsuntersuchungen in den Membranen vorlag.



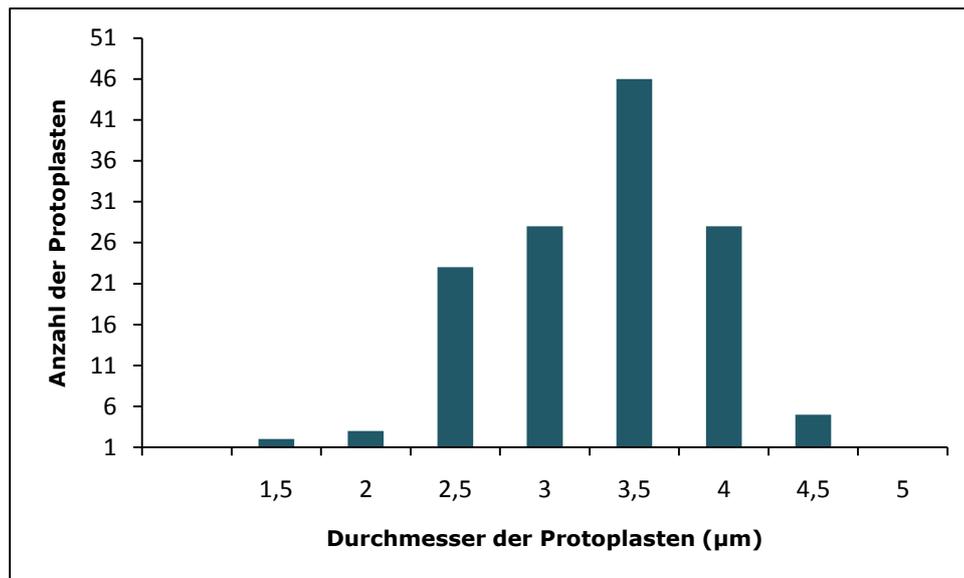
**Abbildung II 1.1:** Analyse der Aquaporin-Expression in *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen mit Hilfe des „Western-Blot“-Verfahrens. Eine Überprüfung der Proteinkonzentrationen wurde mittels einer kolloidalen Silberfärbung der Nitrozellulose-Membran durchgeführt (A). Die Hybridisierung der Proteine mit den aquaporinspezifischen Antikörpern (Anti-AtPIP1;2 bzw. Anti-NtPIP2;1) ergaben beinahe vergleichbare Chemilumineszenzsignale.

## 1.2 Untersuchung der Wasserleitfähigkeit von AtPIP1;2 und AtPIP2;3

Um die Wasserleitfähigkeit der *Arabidopsis*-Aquaporine zu untersuchen, wurden diese in *S. cerevisiae* exprimiert und die Volumenzunahmerate verschiedener Protoplasten nach einem osmotischen Schock mit Hilfe der „Stopped-Flow“-Spektroskopie ermittelt.

### 1.2.1 Bestimmung der Größe von Protoplasten des *S. cerevisiae* Stammes W303

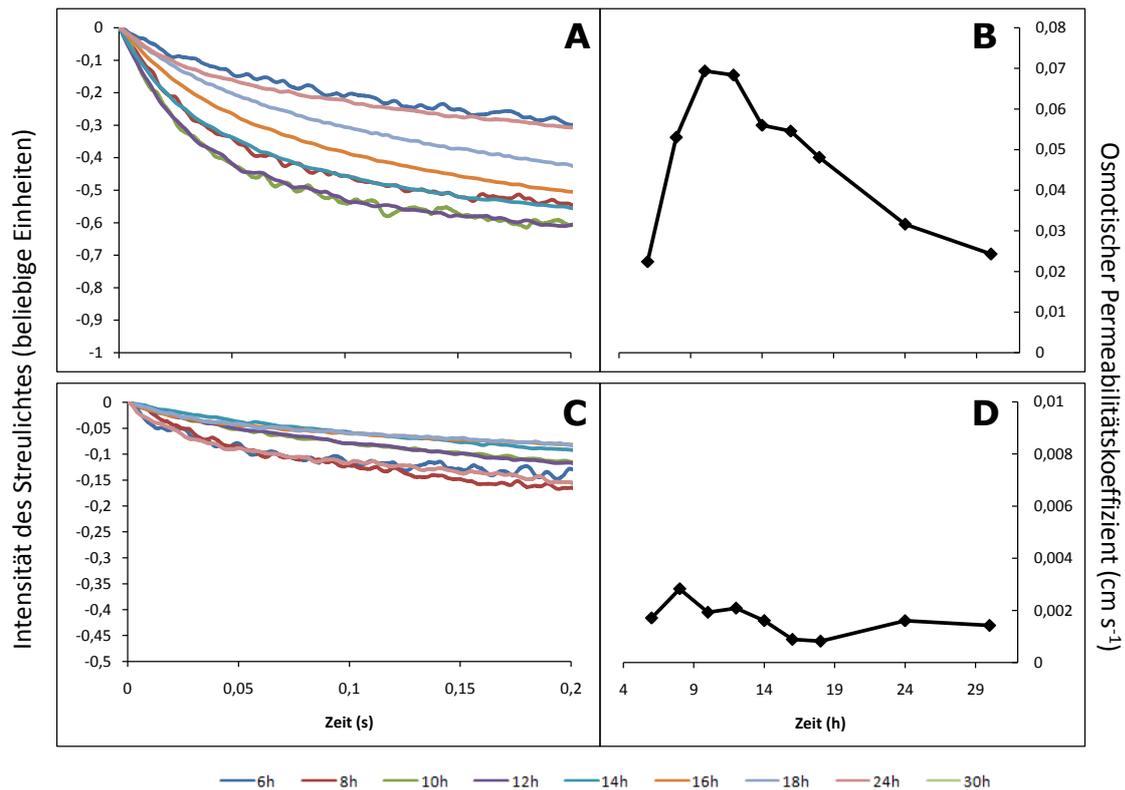
Zur Berechnung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten  $P_f$  und des Permeabilitätskoeffizienten für  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CO}_2}$ ) ist die Berechnung des Hefe-Protoplastenvolumens sowie der Oberfläche erforderlich. Daher wurde der Protoplasten-Durchmesser bestimmt, indem Hefezellen protoplastiert und lichtmikroskopisch Bilder erstellt wurden. Abbildung II 1.2 zeigt die Verteilung des mit Hilfe der Software Photoshop (Adobe) ermittelten Protoplasten-Durchmessers. Der Durchmesser lag bei  $3,42 \pm 0,05 \mu\text{m}$  (arithmetisches Mittel,  $n=140$ ).



**Abbildung II 1.2:** Verteilung des Durchmessers von W303 *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten. Die Protoplasten wurden nach dem Zellwandabbau in Puffer III der Wasserleitfähigkeitsmessungen aufgenommen.

### 1.2.2 Bestimmung der optimalen Induktionsdauer der Aquaporin-Expression im heterologen Hefe-Expressionssystem

Die Expression der Aquaporine in *Saccharomyces cerevisiae* sollte unter induzierbaren Bedingungen erfolgen. Hierfür lagen die codierenden Sequenzen der Aquaporine in einem Hefe-Expressionsplasmid im Anschluss an einen Galaktose-induzierbaren Promotor (GAL1) vor. Um im Verlauf der Untersuchungen die maximalen Leitfähigkeiten für Wasser der entsprechenden Aquaporine zu vergleichen, wurde die optimale Induktionsdauer ermittelt (Abbildung II 1.3). Nachdem die osmotischen Permeabilitätskoeffizienten ( $P_f$ ) für alle Zeitpunkte ermittelt wurden, zeigte sich, dass die höchste Wasserleitfähigkeit für AtPIP2;3 bei 10 h und die für AtPIP1;2 bei 8 h lag (Abbildung II 1.3). Die folgenden funktionellen Untersuchungen wurden nach der für die entsprechenden Aquaporine ermittelten optimalen Induktionsdauer durchgeführt.

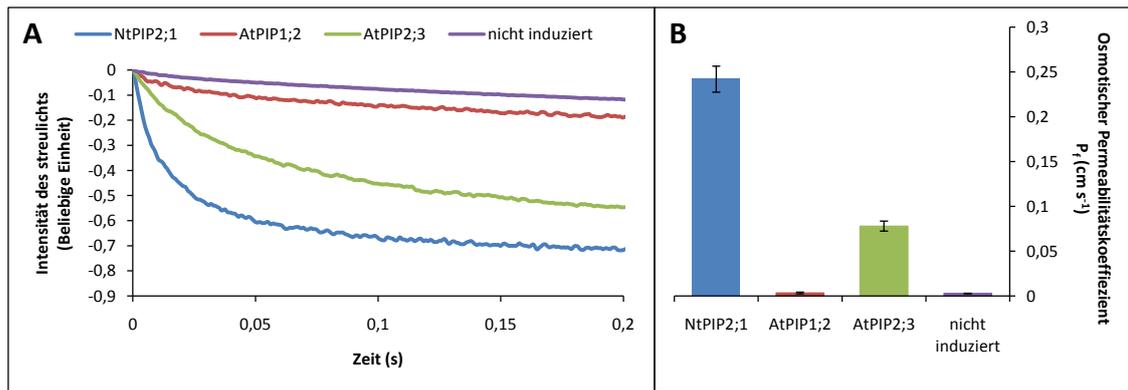


**Abbildung II 1.3:** Ermittlung der optimalen Induktionsdauer für AtPIP2;3 (A;B), und AtPIP1;2(C;D). A und C zeigen die Änderung der Streulichtintensität aufgrund der Volumenzunahme der Protoplasten nach den Induktionsdauern 6-30 h. Die Kinetiken wurden mit einer exponentiellen Funktion angepasst und die ermittelte Geschwindigkeitskonstante verwendet, um die osmotischen Permeabilitätskoeffizienten ( $P_f$ ) für die entsprechenden Induktionsdauern zu berechnen (B und D). (Kinetiken stellen Mittelwerte aus 10 Einzelkurven dar.)

### 1.2.3 Bestimmung der Wasserleitfähigkeit von AtPIP1;2 und AtPIP2;3

Nachdem die Kinetiken der Protoplastenvolumenänderung, verursacht durch einen osmotischen Schock, mit Hilfe der „Stopped-Flow“-Spektroskopie für die verschiedenen Aquaporine aufgenommen wurden, konnten die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten durch Anpassung einer Exponentialfunktion ermittelt werden. Die so erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten wurden benutzt, um nach Gleichung (IV 3.2) die osmotischen Wasserpermeabilitätskoeffizienten ( $P_f$ ) zu berechnen (Abbildung II 1.4).

Neben Protoplasten, in denen die Expression der Aquaporine NtPIP2;1, AtPIP1;2 und AtPIP2;3, durch Wachstum der Zellen in Galaktose induziert wurde, wurden für jedes dieser Aquaporine Protoplasten untersucht, deren Protein-Expression nicht induziert wurde. Die erhaltenen, sehr ähnlichen Kinetiken und  $P_f$ -Werte der „nicht induzierten“ Proben stellten die basale Wasserpermeabilität der *S. cerevisiae* Protoplasten dar. Da sich diese basale Wasserpermeabilität der drei verschiedenen, nicht induzierten Protoplasten nicht signifikant unterschied, wurden sie zu einer Kinetik bzw. einem  $P_f$ -Wert zusammen gefasst. NtPIP2;1 wurde in die Untersuchungen eingeschlossen, da es im heterologen Expressionssystem bereits als wasserleitfähig charakterisiert werden konnte (Fischer und Kaldenhoff, 2008).



**Abbildung II 1.4:** Untersuchung der Membranpermeabilität von NtPIP2;1, AtPIP1;2 und AtPIP2;3 exprimierenden *S. cerevisiae* Protoplasten für Wasser. (A) Änderung der Streulichtintensität aufgrund der Volumenänderung Aquaporin-exprimierender Hefe-Protoplasten sowie Protoplasten, deren Aquaporin-Expression nicht induziert wurde. (Kinetiken stellen Mittelwerte aus 30 Einzelkurven dar.) (B) Vergleich der  $P_f$ -Werte für die Membranpermeabilität NtPIP2;1, AtPIP1;2 und AtPIP2;3 exprimierender Protoplasten und der nicht-induzierten Protoplasten. (n=30, angegeben ist  $P_f$ -Wert  $\pm$  SE. Kinetik und  $P_f$ -Wert für nicht-induzierte Protoplasten repräsentieren den Mittelwert aus den drei nicht-induzierten AQP-Hefe-Protoplasten.)

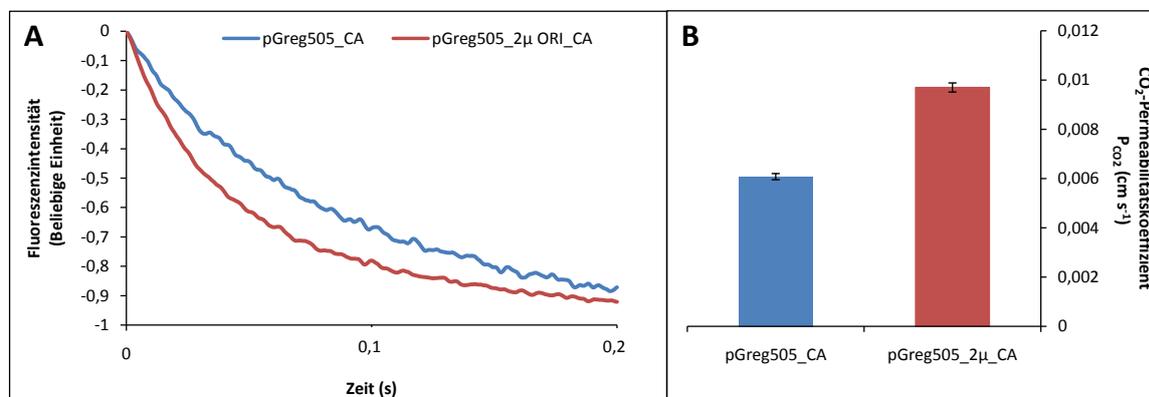
Die basale Wasserpermeabilität der Hefeprotoplasten war sehr gering ( $P_f=2,9\pm0,4\cdot10^{-3}$  cm s<sup>-1</sup>) und wurde durch Expression von AtPIP1;2 ( $P_f=3,0\pm0,1\cdot10^{-3}$  cm s<sup>-1</sup>) nicht signifikant verändert. Daraus lässt sich schließen, dass AtPIP1;2 im heterologen Hefeexpressionssystem keine Wasser-Leitfähigkeit aufweist. Ganz anders gestaltet sich dies für die PIP2-Typ Aquaporine aus Tabak (NtPIP2;1) und *Arabidopsis* (AtPIP2;3). Die entsprechenden Kurven in Abbildung II 1.4 zeigen eine deutlich schnellere Relaxation als die Kurven der Hefeprotoplasten ohne pflanzliche Aquaporine (nicht induziert) oder mit offensichtlich wasserundurchlässigen Aquaporinen (AtPIP1;2). Dies deutet auf eine signifikante Erhöhung der Wasserpermeabilität der Hefeprotoplasten durch die PIP2-Aquaporine hin. Expression von AtPIP2;3 ( $P_f=78\pm6\cdot10^{-3}$  cm s<sup>-1</sup>) in Hefe resultierte in einer 25-30 fachen Erhöhung der Wasserpermeabilität der Hefemembran, während die Expression von NtPIP2;1 ( $P_f=240\pm14\cdot10^{-3}$  cm s<sup>-1</sup>) die Wasserpermeabilität gar um mehr als das 80 fache steigerte.

### 1.3 Untersuchung der Kohlendioxid-Leitfähigkeit von AtPIP1;2 und AtPIP2;3

Um die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der *Arabidopsis*-Aquaporine zu untersuchen, wurden diese in *S. cerevisiae* exprimiert. Diese Hefezellen wurden mit einem CO<sub>2</sub>-haltigen Puffer gemischt und die in die Zellen eingetretenen CO<sub>2</sub>-Moleküle wurden im Zytosol zu Kohlensäure umgesetzt, die weiter zu Hydrogencarbonat und Protonen dissoziiert. Die daraus resultierende pH-Änderung wurde als Änderung der Fluoreszenzintensität des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein mittels „Stopped-Flow“ Spektroskopie erfasst.

### 1.3.1 Überexpression der Carboanhydrase in *Saccharomyces cerevisiae*

Um ausschließen zu können, dass die Umsetzung von CO<sub>2</sub> zu Kohlensäure der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der CO<sub>2</sub>-Permeabilitäts-Untersuchungen war, wurde eine Carboanhydrase aus Tabak co-exprimiert. Dabei sollte die CDS der Carboanhydrase in einem Hefe-Expressionsplasmid vorliegen, das mit einer hohen Kopien-Anzahl innerhalb der Zelle ein hohes Expressionsniveau ergeben sollte. Da die Aquaporin-Gene ausschließlich auf einem Expressionsplasmid vorlagen, welches die Komplementation einer Uracil-Synthese-Defizienz ermöglichte, musste das Plasmid mit der Carboanhydrase-Sequenz für eine Co-Expression über einen anderen Selektionsmarker verfügen. Hierfür wurde das Plasmid pGreg505 (enthält LEU2-Gen) gewählt. Allerdings verfügte dieses Plasmid über einen ARS/CEN-Ursprung, der lediglich 1-3 Plasmid-Kopien pro Zelle ergibt. Eine höhere Plasmid-Anzahl in der Zelle konnte erhalten werden, indem mittels homologer Rekombination *in vivo* in Hefe dieser Ursprung gegen den 2 $\mu$ -Replikationsursprung ausgetauscht wurde, der ca. 20-50 Kopien des Plasmids in der Zelle garantiert (Methods in Yeast Genetics, Amberg, D.C., 2005). Hefeklonen mit 2 $\mu$ -Replikationsursprung unterschieden sich nicht in der Fähigkeit zur Komplementation der Leucin-Synthese-Defizienz. Sie konnten aber anhand der erhöhten Geschwindigkeit der intrazellulären pH-Erniedrigung in Folge von CO<sub>2</sub>-Permeation über die Hefemembran mit Hilfe der „Stopped-Flow“-Spektroskopie identifiziert werden (Abbildung II 1.5).



**Abbildung II 1.5:** Untersuchung der Membranpermeabilität von Carboanhydrase exprimierenden *S. cerevisiae* Zellen für CO<sub>2</sub>. (A) Änderung der intrazellulären Fluoreszenzintensität aufgrund der Erniedrigung des intrazellulären pH-Werts bei Hefen mit niedriger (pGreg505\_CA) bzw. erhöhter (pGreg505\_2 $\mu$ \_CA) Expression. (Kinetiken stellen Mittelwerte aus 15 Einzelkurven dar.) (B) Vergleich der P<sub>CO<sub>2</sub></sub>-Werte für die Membranpermeabilität der Carboanhydrase exprimierenden Hefe-Zellen. (n=15, angegeben ist der P<sub>CO<sub>2</sub></sub>-Wert  $\pm$  SE).

Während Hefen, die mit dem ursprünglichen Plasmid pGreg505\_CA transfiziert waren, einen CO<sub>2</sub>-Permeabilitätskoeffizienten (P<sub>CO<sub>2</sub></sub>) von  $6,1 \pm 0,12 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  aufwiesen, lag dieser bei Hefen, ausgestattet mit pGreg505\_2 $\mu$ \_CA, bei  $9,7 \pm 0,18 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ . Die Permeabilität der Hefemembran für CO<sub>2</sub> erhöhte sich bei Vorliegen des Enzyms Carboanhydrase auf dem Plasmid mit 2 $\mu$ -Replikationsursprung (pGreg505\_2 $\mu$ \_CA) um ca. 40%. Daraus konnte geschlossen werden, dass der

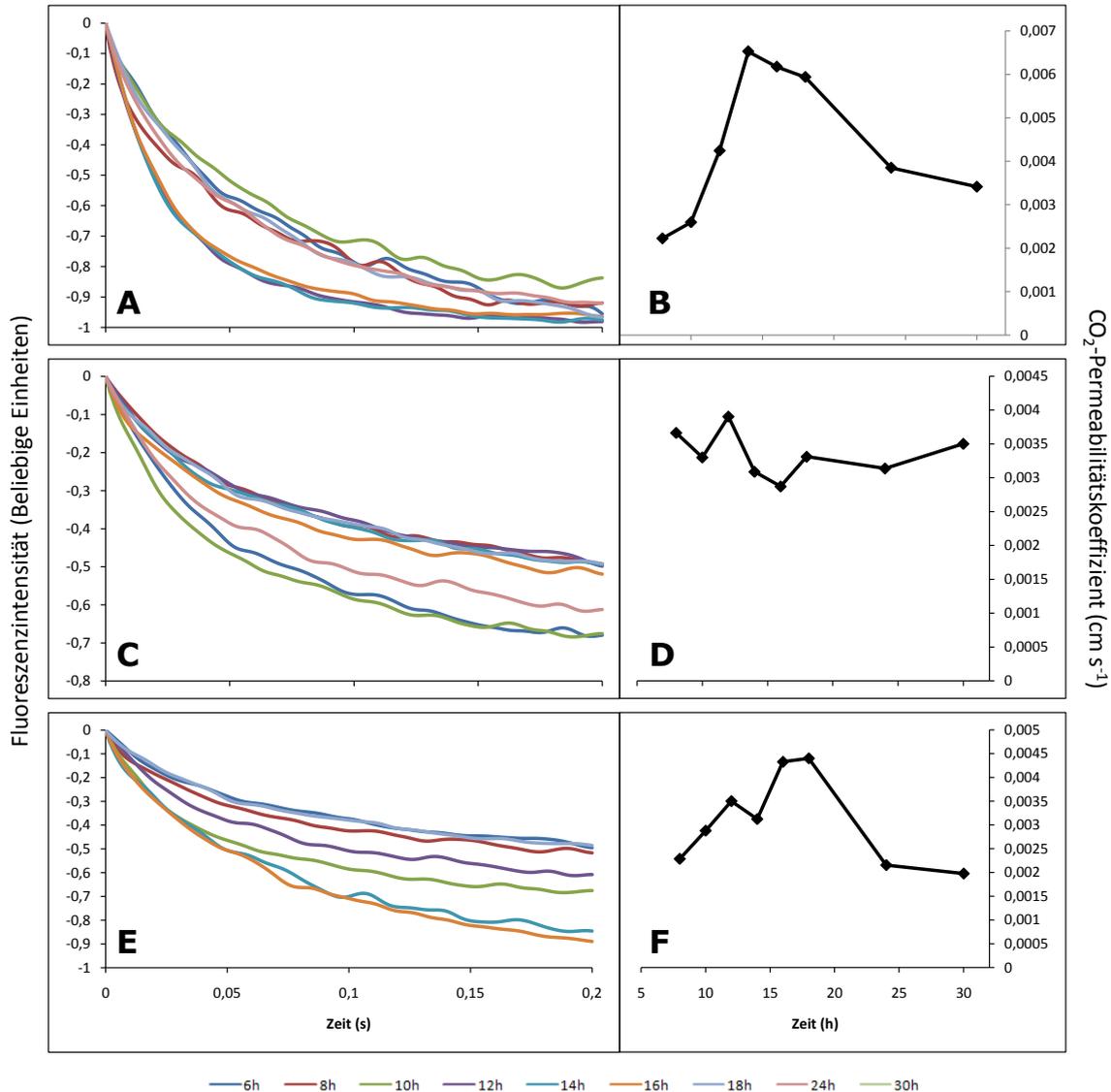
Austausch des Replikationsursprungs erfolgreich war, weshalb dieses Plasmid im Folgenden zur Co-Expression mit den Aquaporinen eingesetzt wurde.

### **1.3.2 Bestimmung der optimalen Induktionsdauer der Aquaporin- und Carboanhydrase Expression**

Die Co-Expression der Aquaporine und Carboanhydrase in *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte ebenfalls unter induzierbaren Bedingungen (siehe II 1.2), weshalb auch für diese Untersuchungen die optimale Induktionsdauer bestimmt wurde (Abbildung II 1.6). Auf diesem Weg konnte gewährleistet werden, dass die maximale Leitfähigkeit für Kohlendioxid zum ermittelten Zeitpunkt vorlag.

Mit der Expression eines Aquaporins zusätzlich zur Carboanhydrase reduziert sich die maximale Aktivität des Enzyms (siehe Dissertation N. Pede), da die Hefezellen gleichzeitig zwei Proteine bilden müssen. Um die basale CO<sub>2</sub>-Permeabilität einer Hefemembran mit AtPIP1;2 bzw. AtPIP2;3 exprimierenden Hefen vergleichen zu können, wurde daher ein weiteres Konstrukt untersucht, bei dem es sich um ein halbes NtPIP2;1-Aquaporin (NtPIP2;1-3Helix) handelte. Dieses halbe Aquaporin war nicht funktional lag jedoch in der Plasmamembran vor (siehe Dissertation N. Pede).

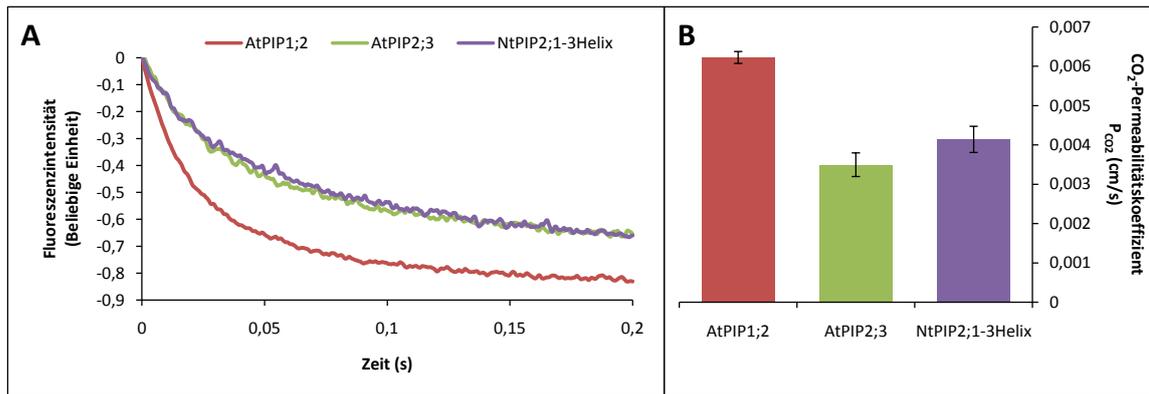
Nachdem die Permeabilitätskoeffizienten für CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ) für alle Zeitpunkte ermittelt wurden, zeigte sich, dass die höchste CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit für AtPIP1;2 bei einer Induktionsdauer von 12 h, die für AtPIP2;3 bei 10 h und die für NtPIP2;1-3Helix bei 16 h lag. In den folgenden funktionellen Untersuchungen wurden jeweils diese Induktions-dauern genutzt, um die maximale Leitfähigkeit zu erhalten.



**Abbildung II 1.6:** Ermittlung der optimalen Induktionsdauer für AtPIP1;2 (A; B), AtPIP2;3 (C;D) und NtPIP2;1-3Helix (E;F). A, C und E zeigen die Änderung der Fluoreszenzintensität infolge der intrazellulären pH-Wert-Änderung der Hefe-Zellen nach einer Induktionsdauer von 6-30 h. Die Kinetiken wurden mit einer exponentiellen Funktion angepasst und die ermittelte Geschwindigkeitskonstante verwendet, um die CO<sub>2</sub>-Permeabilitätskoeffizienten für die entsprechenden Zeitpunkte zu berechnen (B, D und F). (Kinetiken stellen Mittelwerte aus 10 Einzelkurven dar. Kinetiken wurden mit Hilfe des Programms Biokine geglättet, indem jeweils 5 Datenpunkte zu einem zusammengefasst wurden, um das Rauschen zu reduzieren.)

### 1.3.3 Bestimmung der Kohlendioxid-Leitfähigkeit von AtPIP1;2 und AtPIP2;3

Nachdem die Kinetiken der Fluoreszenzintensitäts-Änderung, verursacht durch eine Erniedrigung des intrazellulären pH-Werts, mit Hilfe der „Stopped-Flow“-Spektroskopie für die verschiedenen Aquaporine aufgenommen wurden, konnten die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten durch Anpassung einer exponentielle Funktion ermittelt werden. Anschließend erfolgte mit Hilfe der Gleichung (IV 3.3) die Berechnung der  $P_{CO_2}$ -Werte (Abbildung II 1.7).



**Abbildung II 1.7:** Untersuchung der Membranpermeabilität von AtPIP1;2, AtPIP2;3 und NtPIP2;1-3Helix exprimierenden Hefe-Zellen für CO<sub>2</sub>. (A) Änderung der Fluoreszenzintensität aufgrund der internen Ansäuerung des Zytoplasmas. (Kinetiken stellen Mittelwerte aus 25 Einzelkurven dar.) (B) Vergleich der P<sub>CO<sub>2</sub></sub>-Werte für die Membranpermeabilität von AtPIP1;2, AtPIP2;3 und NtPIP2;1-3Helix exprimierenden Hefe-Zellen (n=25, angegeben sind P<sub>CO<sub>2</sub></sub>-Wert ± SE).

AtPIP1;2-exprimierende *S. cerevisiae*-Zellen wiesen einen P<sub>CO<sub>2</sub></sub>-Wert von  $6,23 \pm 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  auf. Damit erhöhte AtPIP1;2 die Permeabilität der Membran für CO<sub>2</sub> im Vergleich zu NtPIP2;1-3Helix-exprimierenden Zellen ( $4,14 \pm 3,3 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ ) um ca. 50 %. Der P<sub>CO<sub>2</sub></sub>-Wert der AtPIP2;3-exprimierenden Zellen ( $3,5 \pm 3 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ ) unterschied sich nicht signifikant vom basalen Niveau der Zellen, die ein halbes Aquaporin in der Plasmamembran vorliegen hatten. Folglich zeigte AtPIP2;3 im Gegensatz zu AtPIP1;2 im heterologen Hefeexpressionssystem keine CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit.

## 2 Physiologische Bedeutung von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 in *Arabidopsis thaliana*

Für die Untersuchung der physiologischen Bedeutung von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 in der Pflanze wurden zwei T-DNA-Insertionslinien verwendet. Diese Linien wurden im Zuge eines Mutagenese-Projekts des Labors von J. Ecker hergestellt (Alonso et al., 2003), in dem mittels *Agrobacterium tumefaciens* Transfer-DNA (T-DNA) des T<sub>1</sub>-Plasmids (Tumor-induzierendes Plasmid) in die genomische DNA von *Arabidopsis thaliana* inserierte. Die Linien N519794 und N617876 enthalten Insertionen in den Genen AtPIP1;2 bzw. AtPIP2;3. Die Linien wurden über das Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (Nottingham, England) bezogen.

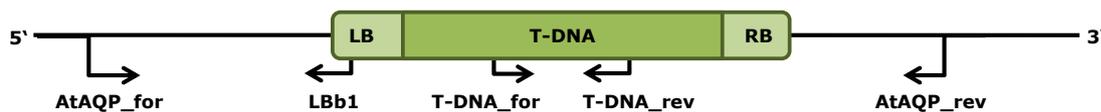
Eine Insertion mit relativ großen DNA-Abschnitten, wie z.B. einer T-DNA im Exon-Bereich eines Gens kann sich negativ auf die Expression auswirken, weshalb diese Pflanzen-Linien sehr gute Untersuchungsobjekte für die Bestimmung der Funktion der beiden Aquaporine in der Pflanze darstellen. Die Linie für AtPIP1;2 (N519794) wird im Folgenden als atpip1;2-1 und die Linie für AtPIP2;3 (N617876) als atpip2;3-1 bezeichnet.

## 2.1 Molekulare Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien atpip1;2-1 und atpip2;3-1

Über die Datenbank T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) konnten bereits Informationen über den Ort der Insertion und die Orientierung der T-DNA bezogen werden. Dennoch war es notwendig vor der Durchführung physiologischer Untersuchungen die Linien molekular zu charakterisieren, da man keine Garantie erhielt, dass neben der Insertion im Ziel-Gen keine weiteren Insertionen vorlagen und auch nicht bekannt war, ob beide Allele der Gene eine Insertion enthielten.

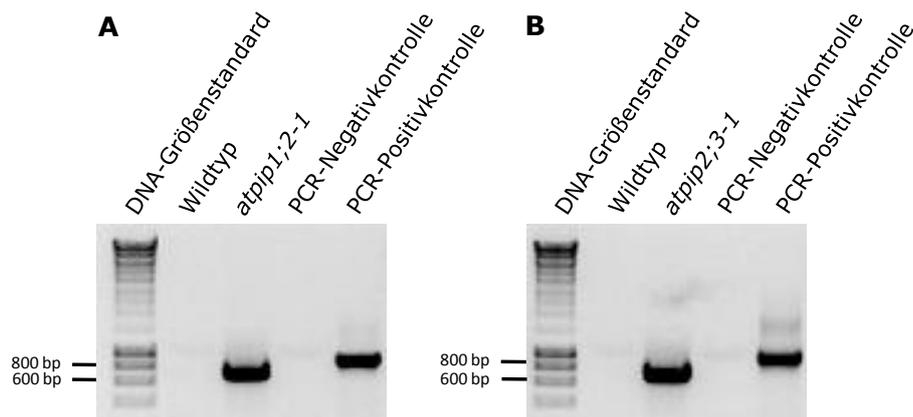
### 2.1.1 Nachweis und Lokalisation der T-DNA-Insertion im AtPIP1;2- und AtPIP2;3-Gen

Zunächst wurde mittels PCR nachgewiesen, ob eine T-DNA-Insertion im Genom der beiden Linien vorlag. Hierfür wurde ein Primer-Paar eingesetzt (T-DNA\_for und T-DNA\_rev, Abbildung II 2.1), das bei Anwesenheit einer T-DNA ein ca. 700 bp großes PCR-Produkt ergeben sollte.



**Abbildung II 2.1:** Schematische Darstellung der T-DNA-Insertion im Aquaporin-Gen (AQP-Gen) und der zur molekularen Untersuchung der Insertion verwendeten Primer. (LB, linke Grenze der T-DNA; T-DNA, Transfer-DNA des T<sub>i</sub>-Plasmids; RB, rechte Grenze der T-DNA; AQP, Aquaporin)

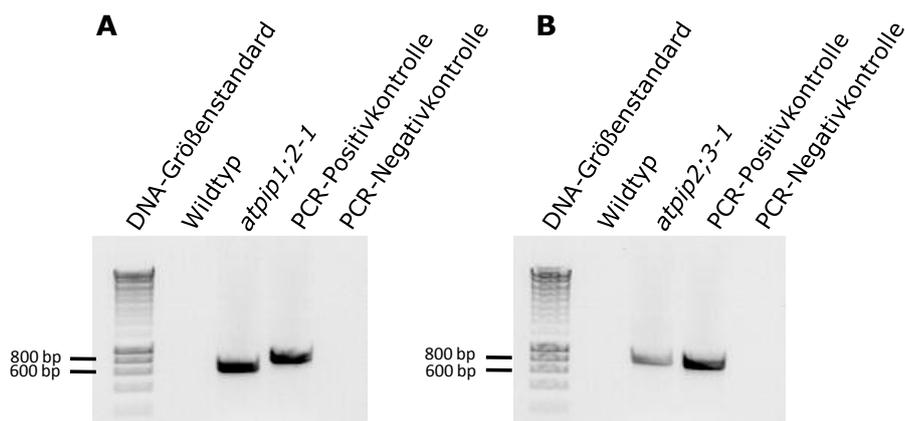
Wie in Abbildung II 2.2 zu erkennen ist, wurde für die Linien atpip1;2-1 (A) sowie atpip2;3-1 (B) ein Produkt in der zu erwartenden Größe erhalten. Wurde jedoch genomische DNA der Wildtyp-Linie zum Vergleich als Matrize eingesetzt, konnte kein PCR-Produkt detektiert werden. Folglich lagen in beiden T-DNA-Insertions-Linien eine oder mehrere Insertionen vor und es konnte nun genau bestimmt werden, wo sich diese innerhalb der Gensequenz befand.



**Abbildung II 2.2:** Amplifikation einer Teilsequenz der ca. 4,5 kb langen T-DNA aus genomischer DNA von *atpip1;2-1* (A) und *atpip2;3-1* (B) sowie Wildtyp-DNA zum Nachweis der Anwesenheit von T-DNA in der genomischen DNA. Für die Überprüfung der Reaktionsbedingungen (PCR-Positivkontrolle) diente ein Plasmid, das die CDS des entsprechenden Aquaporins enthielt und mit Hilfe der genspezifischen Primer amplifiziert wurde. Die Negativkontrolle zur Feststellung möglicher Kontaminationen enthielt keine Matrize.

In einer weiteren PCR wurden ein genspezifischer Primer (*AtPIP1;2\_for* bzw. *AtPIP2;3\_for*) sowie ein T-DNA-spezifischer Primer (*LBb1*) eingesetzt (Abbildung II 2.1), um die T-DNA-flankierende Sequenz zu amplifizieren. Mit Hilfe einer anschließenden Sequenzierung sollte die Insertionsstelle bestimmt werden.

Liegt die T-DNA innerhalb der Ziel-Gene in der in Abbildung II 2.1 dargestellten Orientierung vor, so erhält man für die Linie *atpip1;2-1* ein ca. 600 bp großes Produkt und für Linie *atpip2;3-1* ein ca. 750 bp großes Produkt. Sollte die T-DNA in 5'-3'-Richtung mit der rechten Grenze (RB) zuerst inseriert sein, würde kein Produkt erhalten werden.



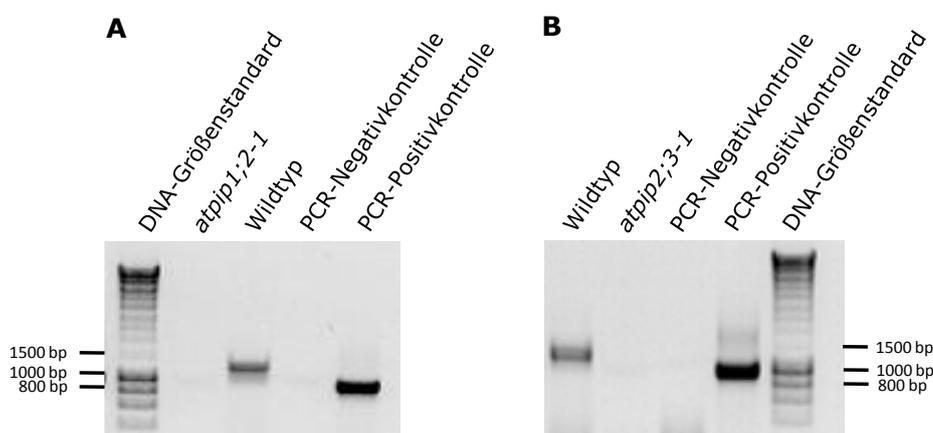
**Abbildung II 2.3:** Amplifikation der T-DNA-flankierenden Sequenz aus genomischer DNA von *atpip1;2-1* (A) und *atpip2;3-1* (B) sowie Wildtyp-DNA zum Nachweis der T-DNA-Insertion in den Aquaporin-Genen. Es wurden ein genspezifischer sowie ein T-DNA-spezifischer Primer eingesetzt. (Reaktions-Kontrollreaktionen wie unter Abbildung II 2.2 beschrieben.)

Für beide Linien wurde in der PCR zum Nachweis der T-DNA-Insertion in den Ziel-Genen ein Amplifikat der flankierenden Sequenz erhalten. Daraus konnte geschlossen werden, dass in beiden Linien eine Insertion im Aquaporin-Gen vorlag, wobei die T-DNA in beiden Fällen wie in Abbildung II 2.1 dargestellt, orientiert war. Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des Primers LBb1 sequenziert. Es konnten die Angaben des Saatgut-Vertriebs (NASC) bestätigt werden, dass die Insertionen in beiden Linien innerhalb des Exons 2 in den Aquaporin-Genen vorlag (Sequenzen siehe Anhang). Bei Linie atpip1;2-1 folgt die Insertion in 5'-3'-Richtung auf Basenpaar 867 und bei Linie atpip2;3-1 auf Basenpaar 792.

### 2.1.2 Untersuchung der Homozygotie der T-DNA-Insertionslinien

Da es sich bei *Arabidopsis thaliana* um einen diploiden Organismus handelt, konnte die T-DNA-Insertion in AtPIP1;2 bzw. AtPIP2;3 sowohl homo- als auch heterozygot vorliegen. Die Untersuchungen der physiologischen Funktion der betreffenden Aquaporine sollten nach Möglichkeit mit homozygoten Pflanzen durchgeführt werden, um einen stärkeren negativen Einfluss der Insertion auf die Expression der Aquaporine zu erhalten.

Ob die Insertion homo- oder heterozygot vorlag, wurde mit Hilfe einer PCR ermittelt, in der genomische DNA, für die bereits gezeigt werden konnte, dass eine T-DNA in den Ziel-Genen vorlag, als Matrize eingesetzt wurde. Bei den verwendeten Primern handelte es sich um die jeweils Aquaporin-spezifischen Primer (AQP\_for und AQP\_rev; siehe Abbildung II 2.1).



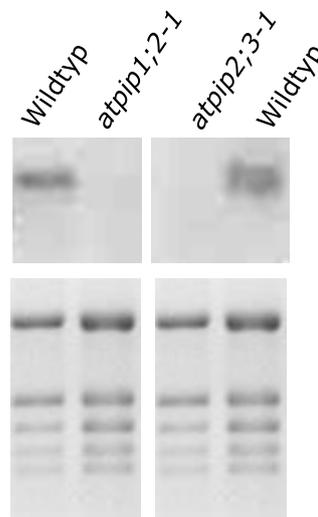
**Abbildung II 2.4:** Amplifikation der Aquaporin-Gene aus genomischer DNA von atpip1;2-1 (A) und atpip2;3-1 (B) sowie Wildtyp-DNA mittels genspezifischer Primer zum Nachweis der T-DNA-Insertion in beiden Aquaporin-Allelen. Für die allgemeine PCR-Positivkontrolle diente ein Plasmid, das die codierende Sequenz des entsprechenden Aquaporins enthielt und mit Hilfe der genspezifischen Primer amplifiziert wurde. Die Negativkontrolle enthielt keine Matrize.

Mit den aquaporinspezifischen Primern konnte das Gen von AtPIP1;2 mit einer Größe von 1250 bp und das Gen von AtPIP2;3 mit einer Größe von 1160 bp amplifiziert werden, sofern keine Insertion vorlag. Die Parameter der PCR-Reaktionen wurden so gewählt, dass das gesamte Aquaporin-Gen amplifiziert werden konnte.

Dies war auch der Fall für beide Reaktionen, in denen genomische DNA der Wildtyp-Linie eingesetzt wurde (Abbildung II 2.4). Da sowohl für Linie *atpip1;2-1* (A) als auch *atpip2;3-1* (B) kein Produkt detektiert werden konnte, folgt, dass in beiden Linien die Insertion homozygot vorlag.

### 2.1.3 Untersuchung des Einflusses der T-DNA-Insertion auf die Expression von AtPIP1;2 und AtPIP2;3

Um den Einfluss der homozygot vorliegenden Insertionen in *atpip1;2-1* und *atpip2;3-1* auf die Expression der beiden Aquaporine zu untersuchen, wurde eine „Northern Blot“-Analyse der mRNA durchgeführt. Die auf eine Nitrozellulose-Membran übertragene RNA wurde mit der entsprechenden Aquaporin-spezifischen Sonde hybridisiert.



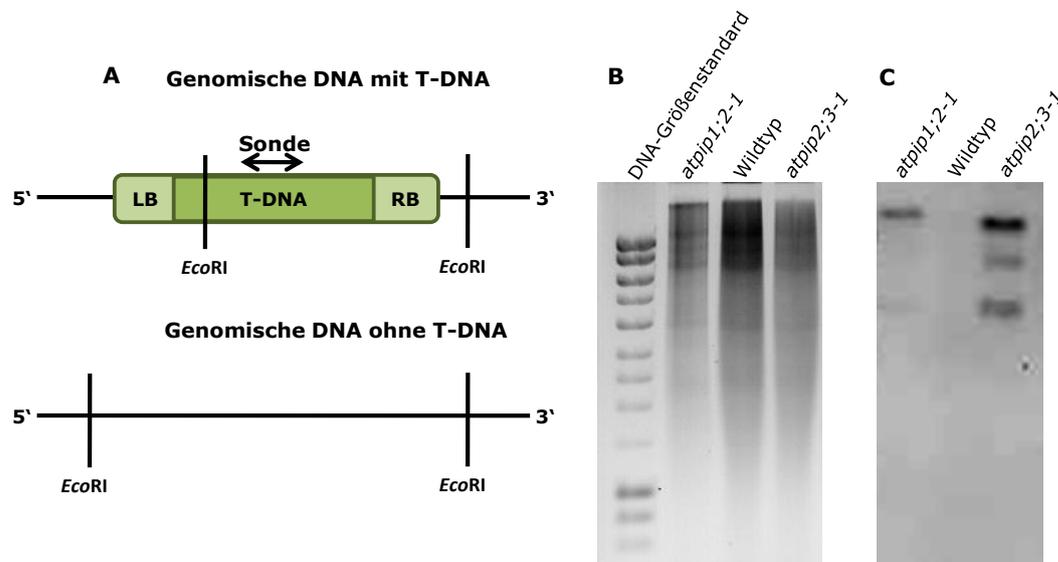
**Abbildung II 2.5:** „Northern-Blot“-Analyse der Wildtyp-, *atpip1;2-1* und *atpip2;3-1*-RNA zur Untersuchung der Expression der beiden Aquaporin-Gene.

Die Aquaporin-mRNA konnte für AtPIP1;2 und AtPIP2;3 ausschließlich in der Wildtyp-RNA detektiert werden (Abbildung II 2.5). Sowohl in *atpip1;2-1* als auch in *atpip2;3-1* konnte keine mRNA, die für das entsprechende Aquaporin codiert, nachgewiesen werden. Auf diesem Ergebnis basierend kann für *atpip1;2-1* und *atpip2;3-1* von „Knock-Out“-Linien für AtPIP1;2 bzw. AtPIP2;3 gesprochen werden.

### 2.1.4 Untersuchung der Anzahl an T-DNA-Insertionen in *atpip1;2-1* und *atpip2;3-1*

Die Anzahl der T-DNA-Insertionen wurde mittels einer „Southern Blot“-Analyse bestimmt. Dies war nötig, um ausschließen zu können, dass mögliche morphologische und/oder physiologische Veränderungen der T-DNA-Insertionslinien nicht nur auf der Abwesenheit der entsprechenden Aquaporine zurückzuführen ist, sondern durch eine oder mehrere weitere Insertionen verursacht wurde.

Es wurde genomische DNA der beiden Aquaporin-„Knock-Out“-Linien sowie der Wildtyp-Linie wie in Abbildung II 2.6 (A) dargestellt, mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten. Dieses Enzym verfügte über eine Erkennungssequenz innerhalb der T-DNA und einer Vielzahl von Erkennungssequenzen innerhalb des gesamten Genoms. Anschließend wurde die abgebaute DNA elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit einer T-DNA-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Anzahl der detektierten Banden entsprach der Anzahl an T-DNA-Insertionen im Genom.



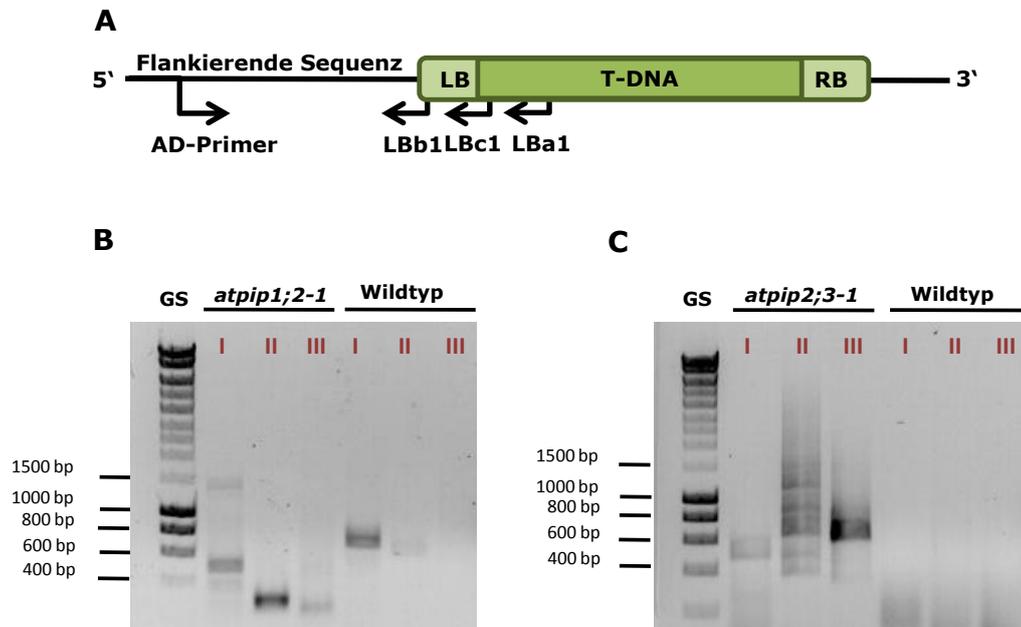
**Abbildung II 2.6:** „Southern-Blot“-Analyse zur Bestimmung der Anzahl an T-DNA-Insertionen. (A) Schematische Darstellung des Restriktionsabbaus mit *EcoRI* genomischer DNA mit und ohne T-DNA-Insertion. Die T-DNA-spezifische Sonde kann nur hybridisieren, wenn T-DNA vorliegt. (B) Restriktionsabbau genomischer DNA aus *atpip1;2-1*, Wildtyp sowie *atpip2;3-1*. (C) „Southern-Blot“ hybridisiert mit der T-DNA-spezifischen Sonde.

Während für die Wildtyp-Linie keine T-DNA-Insertion nachgewiesen werden konnte, wurden für *atpip1;2-1* zwei Banden und für *atpip2;3-1* drei Banden detektiert (Abbildung II 2.6, C). Da die Größe der jeweils obersten Bande bei beiden T-DNA-Insertionslinien mehr als 10 kb aufwies, wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um unvollständig abgebaute DNA handelte. Die verbleibenden Banden wurden je einer T-DNA-Insertion zugeordnet. Daraus ließ sich folgern, dass in *atpip1;2-1* eine Insertion im Gen für AtPIP1;2 vorlag und *atpip2;3-1* neben der Insertion im Gen für AtPIP2;3 eine weitere T-DNA an unbekannter Stelle im Genom enthielt.

### 2.1.5 Lokalisation der zusätzlichen T-DNA-Insertion in *atpip2;3-1*

Da in der Linie *atpip2;3-1* eine weitere T-DNA-Insertion mit Hilfe der „Southern-Blot“-Analyse nachgewiesen werden konnte, war es nötig diese zu lokalisieren. Hierfür wurde die Methode der „thermal asymmetric interlaced“ PCR (TAIL-PCR) angewandt. Dabei handelt es sich um eine PCR-basierte Methode, die es ermöglicht unbekannte Gen-Sequenzen zu identifizieren, die eine bekannte Sequenz flankiert. Durch Einsatz einer Kombination von T-DNA-spezifischen Primern (LBa1, LBc1, LBb1,

je ein Primer für primäre, sekundäre bzw. tertiäre TAIL-PCR) und eine Mischung aus willkürlich degenerierten Primern (AD-Primern), die irgendwo in der flankierenden Sequenz anlagern konnten, wurde in drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen die Sequenz amplifiziert, die an die T-DNA grenzt (Abbildung II 2.7). Das PCR-Produkt der primären PCR wurde als Matrize in der sekundären eingesetzt. Das Produkt der sekundären wiederum in der tertiären.



**Abbildung II 2.7:** Untersuchung der T-DNA-flankierenden Sequenzen in *atpip1;2-1* und *atpip2;3-1* mit Hilfe der TAIL-PCR. (A) Schematische Darstellung der Primer, die für eine TAIL-PCR benötigt wurden. In drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen wurde das spezifische Produkt der flankierenden Sequenz in *atpip1;2-1* (A) bzw. *atpip2;3-1* (B) amplifiziert. Die römischen Ziffern stehen für die drei Reaktionen der TAIL-PCR. GS: DNA-Größenstandard

Um ausschließen zu können, dass ein unspezifisches Produkt analysiert wird, wurde zum Vergleich neben genomischer DNA aus *atpip1;2-1* bzw. *atpip2;3-1* auch Wildtyp-DNA als Matrize eingesetzt. Desweiteren konnten unspezifische Amplifikate dadurch identifiziert werden, dass spezifische Produkte von der primären zur sekundären bzw. zur tertiären PCR um eine bestimmte bp-Anzahl kleiner werden musste. Diese Verkürzung beruhte auf der Tatsache, dass die T-DNA-spezifischen Primer 200 bp bzw. 50 bp voneinander entfernt anlagern konnten.

Für beide T-DNA-Insertionslinien konnte jeweils ein spezifisches PCR-Produkt in der tertiären PCR erhalten werden (Abbildung II 2.7, B und C). Die Analyse der Sequenz des ca. 200 bp großen Amplifikats der *atpip1;2-1*-Linie bestätigte die Insertion der T-DNA in Exon 2 an Stelle 867 bp (Sequenz siehe Anhang). Es konnte keine weitere Insertion detektiert werden.

Die Sequenzierung des PCR-Produkts für Linie *atpip2;3-1* ergab, dass im Genom dieser Linie eine weitere Insertion auf Chromosom 3 vorlag (Sequenz siehe Anhang). Dabei handelte es sich um eine nicht-codierende Region, weshalb davon ausgegangen wurde, dass die Insertion in *AtPIP2;3* die einzige in dieser Linie ist, die

einen Einfluss auf die Proteinausstattung der Pflanze hat. Allerdings konnte mit Hilfe der TAIL-PCR die Insertion im AtPIP2;3-Gen nicht bestätigt werden.

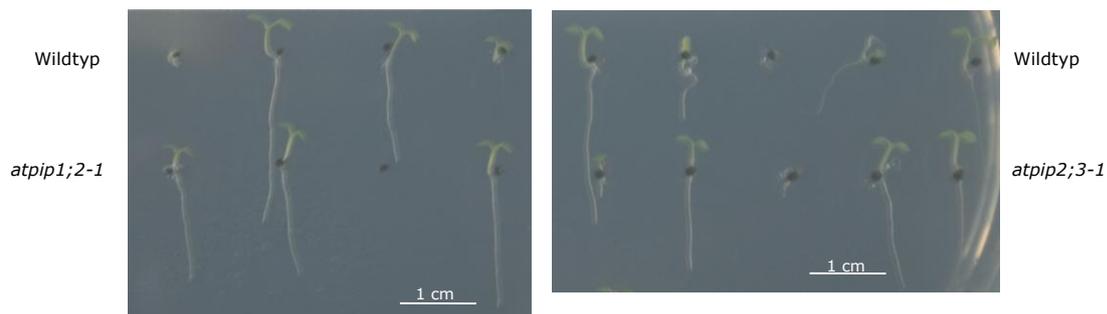
Die molekular charakterisierten Pflanzen der F3-Generation wurden anschließend vermehrt und die F4 Generation allen folgenden Untersuchungen unterzogen.

## 2.2 Morphologische Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien *atpip1;2-1* und *atpip2;3-1*

### 2.2.1 Untersuchung des Einflusses von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 auf die Entwicklung von Wurzeln

Wurzeln zählen wie z.B. auch Blätter zu den wichtigsten Pflanzenorganen. Da Wurzeln unter anderem für die Wasseraufnahme verantwortlich sind, werden eine Vielzahl von Aquaporinen in diesem Organ exprimiert (Alexandersson et al., 2005). Fehlt ein solches Protein kann das durchaus einen Einfluss auf die Entwicklung der Wurzel haben.

Zur Betrachtung von Wurzelwachstum bei Keimlingen wurden acht Tage alte Keimlinge, die senkrecht auf Nähragar gewachsen waren, untersucht (Abbildung II 2.8).



**Abbildung II 2.8:** Beispiel des Vergleichs der Wurzellänge bei Keimlingen der Wildtyp-Linie sowie *atpip1;2-1* und *atpip2;3-1*.

**Tabelle II 2.1:** Länge der Keimlingswurzeln von Wildtyp-, *atpip1;2-1* und *atpip2;3-1*-Pflanzen Angegeben sind die Parameter  $\pm$ SE, n=38.

	<b>Wildtyp</b>	<b><i>atpip1;2-1</i></b>	<b><i>atpip2;3-1</i></b>
<b>Wurzellänge (cm)</b>	1,136 $\pm$ 0,034	1,234 $\pm$ 0,033	1,24 $\pm$ 0,055

Der Vergleich der Länge der Keimlingswurzel von Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der Linien *atpip1;2-1* bzw. *atpip2;3-1* zeigte keinerlei statistisch signifikanten Unterschied (t-Test,  $p > 0.05$ ).

Auch für die Oberfläche von sechs Wochen alten Pflanzen, die mit Hilfe einer speziell für Wurzeln entwickelten Scan-Software (Winrhizo) ermittelt wurde, konnte kein Unterschied zwischen den Linien festgestellt werden, der auf das Fehlen der Aquaporine zurückzuführen wäre (t-Test,  $p > 0,05$ , Tabelle II 2.2).

**Tabelle II 2.2:** Wurzeloberfläche sechs Wochen alter Pflanzen. Angegeben sind die Parameter  $\pm$ SE, n=9.

	Wildtyp	atpip1;2-1	atpip2;3-1
<b>Wurzeloberfläche (cm<sup>2</sup>)</b>	141,80 $\pm$ 5,26	142,85 $\pm$ 7,84	140,187 $\pm$ 6,24

### 2.2.2 Untersuchung des Einflusses von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 auf die Entwicklung von Blättern

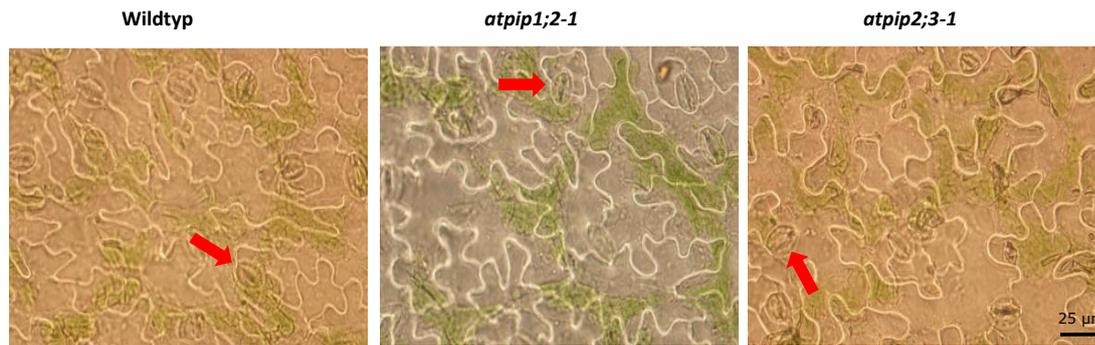
Blätter erfüllen sehr wichtige Funktionen für eine Pflanze, da sie das photosynthetisch aktive Gewebe enthalten und der Ort des kontrollierten Wasserverlustes, der Transpiration sind. Aquaporine sind auch in Blättern u.a. an wasserabhängigen Wachstumsprozessen beteiligt (Aharon et al., 2003; Siefritz et al., 2004). Daher wurden morphologische Merkmale der Blätter und der gesamten Blattrosette von *Arabidopsis thaliana* untersucht.

**Tabelle II 2.3:** Blattanzahl, Blattrosetten-Durchmesser und Blattfläche sechs Wochen alter Pflanzen. Angegeben sind die Parameter  $\pm$ SE, n=8.

	Wildtyp	atpip1;2-1	atpip2;3-1
<b>Blattanzahl</b>	16,4 $\pm$ 0,24	16,6 $\pm$ 0,4	17 $\pm$ 0,45
<b>Rosettendurchmesser (cm)</b>	8,71 $\pm$ 0,24	8,74 $\pm$ 0,28	8,79 $\pm$ 0,3
<b>Blattfläche (cm<sup>2</sup>)</b>	5,32 $\pm$ 0,3	5,12 $\pm$ 0,15	5,22 $\pm$ 0,39

Wie in Tabelle II 2.3 aufgeführt ist, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf Blattanzahl, Rosettendurchmesser und Blattfläche ermittelt werden. Alle drei Linien wiesen ähnliche Blattanatomie auf.

Auch die Länge der Stomata auf der abaxialen Blattseite und die Stomata-Dichte bei gleichalten Pflanzen zeigten keinerlei Besonderheiten (Abbildung II 2.9, Tabelle II 2.4). *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen ohne die Aquaporine AtPIP1;2 bzw. AtPIP2;3 entsprachen in ihrer Blattentwicklung denen der Wildtyp-Pflanzen.



**Abbildung II 2.9:** Nagellackabdrücke der abaxialen Blattseite von Wildtyp-, *atpip1;2-1*- und *atpip2;3-1*-Blättern. Pfeile verdeutlichen exemplarisch die Position einiger Stomata. (n=8)

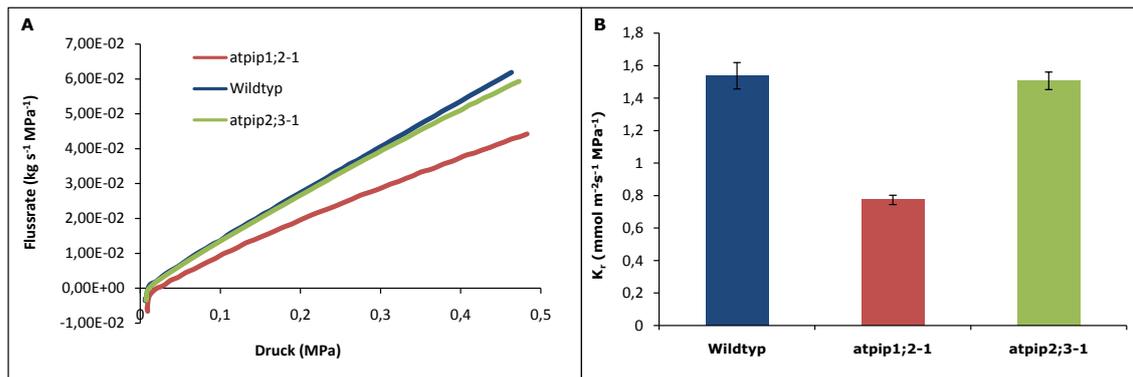
**Tabelle II 2.4:** Stomatalänge und -Dichte sechs Wochen alter Pflanzen. Angegeben sind die Parameter  $\pm$ SE, n=8.

	Wildtyp	<i>atpip1;2-1</i>	<i>atpip2;3-1</i>
<b>Stomatalänge (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	19,26 $\pm$ 0,35	20,82 $\pm$ 0,24	20,27 $\pm$ 0,32
<b>Stomatadichte (<math>\text{mm}^{-2}</math>)</b>	16,31 $\pm$ 1,8	14,39 $\pm$ 0,98	16,03 $\pm$ 1,74

## 2.3 Physiologische Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien *atpip1;2-1* und *atpip2;3-1*

### 2.3.1 Untersuchung des Einflusses von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 auf die hydraulische Leitfähigkeit von Wurzeln

Die Beteiligung von Aquaporinen an der Wasseraufnahme in der Wurzel über den symplastischen Weg konnte für Tabak-Pflanzen gezeigt werden (Siefritz et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der „High pressure flow meter“-Methode (HPFM, Tyree et al., 1995) untersucht, ob die Abwesenheit der Aquaporine AtPIP1;2 bzw. AtPIP2;3 sich in einer Änderung der spezifischen hydraulischen Leitfähigkeit ( $K_r$ ) von Wurzeln äußert. Während  $K_r$  für die Wildtyp-Linie in der gleichen Größenordnung lag wie bei Linie *atpip2;3-1* (Wildtyp=1,538 $\pm$ 0,081  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ , *atpip2;3-1*=1,506 $\pm$ 0,054  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ ) erreichte die AtPIP1;2-„Knock-Out“-Linie lediglich eine Leitfähigkeit von 0,773 $\pm$ 0,029  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$  (Abbildung II 2.10, B). Das entsprach einer um 50 % reduzierten Wasser Leitfähigkeit in *atpip1;2-1*-Wurzeln. Diese Linie zeigte demnach einen höheren Widerstand zum Wasserfluss im Vergleich zur Wildtyp-Linie. Repräsentative Flussraten der drei Linien sind in Abbildung II 2.10 (A) dargestellt.



**Abbildung II 2.10:** Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit von Wurzeln mit Hilfe der „High pressure flow meter“-Methode. (A) Repräsentative Druck/Flussrate-Beziehung der Wildtyp-, atpip1;2-1- und atpip2;3-1-Pflanzen. Alle drei Pflanzen hatten ähnliche Wurzeloberflächen (Wildtyp=0,0319 m<sup>2</sup>, atpip1;2-1=0,03204 m<sup>2</sup>, atpip2;3-1=0,0317 m<sup>2</sup>). (B) Durchschnittliche hydraulische Leitfähigkeit der Wurzeln (K<sub>r</sub>). Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Messungen sechs Wochen alt. Angegeben ist die hydraulische Leitfähigkeit der Wurzel ±SE, n=9.

### 2.3.2 Untersuchung des Einflusses von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 auf die photosynthetische Leistung von *Arabidopsis thaliana*

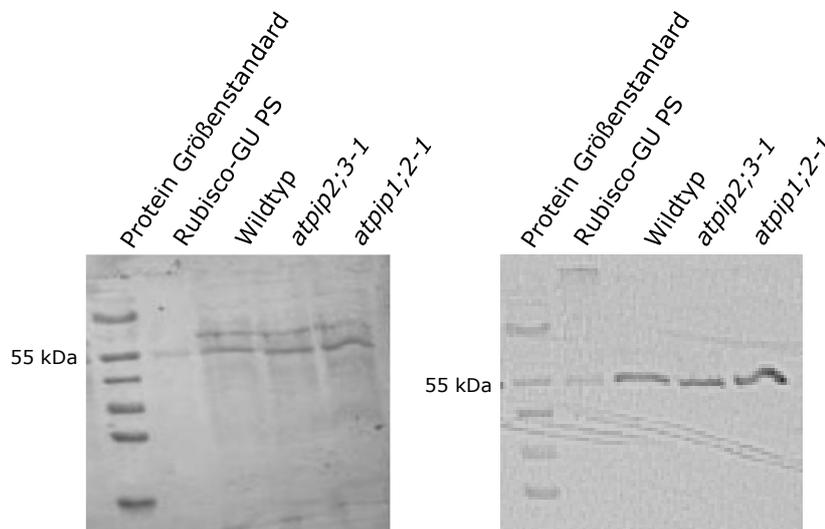
Da in den letzten Jahren vermehrt Belege dafür gefunden wurden, dass Aquaporine die CO<sub>2</sub>-Permeabilität von Membranen sowohl im heterologen Expressionssystem als auch in der Pflanze erhöhen können (Uehlein et al., 2003; Flexas et al., 2006; Uehlein et al., 2008), wurden Gaswechseluntersuchungen mit der Wildtyp- und den T-DNA Insertions-Linien atpip1;2-1 und atpip2;3-1 durchgeführt. Diese Messungen des CO<sub>2</sub>- und Wasser-Austauschs eines Blattes konnten Erkenntnisse über die Photosynthese-Effizienz liefern, ebenso wie der Rubisco- und Chlorophyll-Gehalt der *Arabidopsis thaliana*-Blätter.

#### Rubisco- und Chlorophyll-Gehalt

Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase-oxygenase (Rubisco) ist das Hauptenzym der Photosynthese. Es ist für die Fixierung von CO<sub>2</sub> in den Chloroplasten zuständig. Die dafür nötige Energie stammt aus der Lichtreaktion der Photosynthese, an der die Pigmente Chlorophyll a und b beteiligt sind.

Ein Vergleich des Rubisco-Gehalts von Wildtyp-Blattgewebe mit dem des atpip1;2-1- bzw. atpip2;3-1-Gewebes erfolgte mit Hilfe einer „Western-Blot“ Analyse, wobei ein spezifischer Antikörper für die große Untereinheit der Rubisco (GU) verwendet wurde (Abbildung II 2.11). Bei ähnlich aufgetragenen Proteinmengen konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp-, AtPIP1;2- sowie AtPIP2;3-„Knock-Out“-Pflanzen festgestellt werden, weshalb davon ausgegangen wurde, dass die Abwesenheit der beiden Aquaporine in den entsprechenden Linien keinen Einfluss auf den Rubisco-Gehalt hatte. Ähnlich verhielt es sich mit dem Chlorophyllgehalt, der sich in den *Arabidopsis thaliana*-Linien nicht signifikant unterschied (Tabelle II 2.5).

Somit waren die T-DNA-Insertionslinien *atpip1;2-1* und *atpip2;3-1* bezüglich ihrer Ausstattung an untersuchten Photosynthese-Pigmenten und -Enzymen nicht beeinträchtigt.



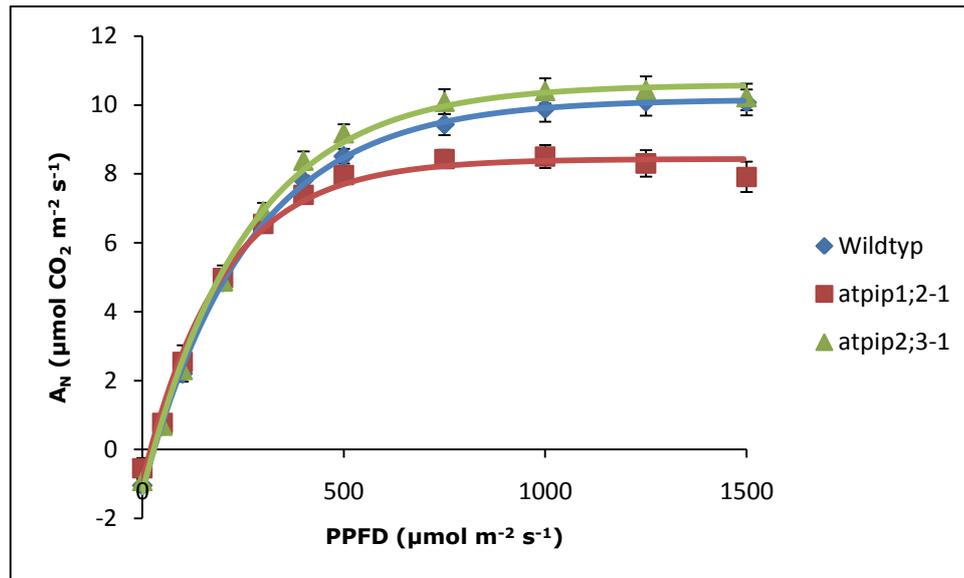
**Abbildung II 2.11:** „Western-Blot“-Analyse zum Vergleich des Rubisco-Großen-Untereinheit (GU)-Gehalts in Blättern der Wildtyp-, *atpip1;2-1*- und *atpip2;3-1*-Linien. (A) Silberfärbung der auf eine Nitrozellulose-Membran transferierten Proteine. (B) Nachweis der Großen Untereinheit der Rubisco mittels spezifischen Antikörpers. (Rubisco-GU PS: Rubisco-GU Proteinstandard.)

**Tabelle II 2.5:** Blatt-Chlorophyllgehalt der *Arabidopsis thaliana*-Linien. Angegeben sind die Parameter  $\pm$ SE, n=5.

	Wildtyp	<i>atpip1;2-1</i>	<i>atpip2;3-1</i>
<b>Chlorophyllkonzentration (<math>\mu</math>g Chlorophyll a+b/ml)</b>	82,04 $\pm$ 3,57	84,85 $\pm$ 1,92	79,73 $\pm$ 3,76

### Lichtkurven

Zunächst wurde mittels Gaswechselformen ermittelt, wie sich die Nettophotosynthese-Rate ( $A_N$ ) in Abhängigkeit von verschiedenen Lichtintensitäten verhält. Verglichen mit der unveränderten Wildtyp-Linie zeigte *atpip1;2-1* eine reduzierte Photosynthese-Rate. Besonders bei Lichtintensitäten  $>500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  war dies auffällig (Abbildung II 2.12). Außerdem ist deutlich zu erkennen, dass diese „Knock-Out“-Linie bereits bei einer Lichtintensität von ca.  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in die lichtgesättigte Phase der Kurve übergeht, während sowohl Wildtyp- als auch *atpip2;3-1*-Pflanzen erst bei ca.  $750 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  eine deutliche Abflachung der Kurve zeigten. Die Änderung der Photosynthese-Rate der Linie *atpip2;3-1* im Verlauf der Lichtkurve zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Wildtyp-Linie.



**Abbildung II 2.12:** Lichtkurven der verschiedenen *Arabidopsis thaliana*-Linien (Wildtyp, atpip1;2-1 und atpip2;3-1). Es wurde das siebte oder achte Blattpaar gemessen (MW±SE, n=6). Formel (II 2.1) wurde zur Kurvenanpassung verwendet. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Messungen 6 Wochen alt.

Die Reaktion der Nettophotosynthese-Rate auf eine Erhöhung der Lichtintensitäten konnte mit einer nicht linearen Funktion, der Mitscherlich Gleichung (II 2.1), angepasst werden (Potvin et al., 1990).

$$A = A_{max} \times [1 - e^{-A_{qe} \times (PPF - LCP)}] \quad (\text{II 2.1})$$

Dabei bezeichnet  $A_{max}$  die maximale, lichtgesättigte Photosyntheserate,  $A_{qe}$  den linearen Anstieg zu Beginn der Kurve, LCP den Lichtkompensationspunkt und PPF den photosynthetischen Photonenfluss. In Tabelle II 2.6 sind die Ergebnisse der Kurvenanpassung zusammengefasst.

Die maximale, lichtgesättigte Assimilationsrate  $A_{max}$  war bei atpip2;3-1-Pflanzen geringfügig größer als bei Wildtyp-Pflanzen. Allerdings war der Unterschied nicht signifikant, wohingegen eine deutliche Reduktion von  $A_{max}$  bei atpip1;2-1-Pflanzen vorlag. Dies entsprach einer ca. 20%igen Abnahme der maximalen Photosyntheserate im Vergleich zum Wildtyp.

**Tabelle II 2.6:** Parameter der Kurvenanpassung von Lichtkurven der *Arabidopsis thaliana*-Linien Wildtyp, atpip1;2-1 und atpip2;3-1. Die verwendete Gleichung findet sich im Text. Angegeben sind die Parameter  $\pm$ SE, n=6. Verschiedene Buchstaben stehen für statistisch signifikante Unterschiede,  $p < 0,05$ . ( $A_{\max}$ : maximale, lichtgesättigte Photosyntheserate;  $A_{qe}$ : linearer Anstieg zu Beginn der Kurve, LCP: Lichtkompensationspunkt)

	Wildtyp	atpip1;2-1	atpip2;3-1
$A_{\max}$	10,17 $\pm$ 0,066 a	8,43 $\pm$ 0,17 b	10,6 $\pm$ 0,16 a
$A_{qe}$	0,0038 $\pm$ 8,3E-5 a	0,0051 $\pm$ 0,0004 b	0,0039 $\pm$ 0,0002 a
LCP	29,383 $\pm$ 1,74 a	20,772 $\pm$ 5,09 a	28,422 $\pm$ 4,03 a

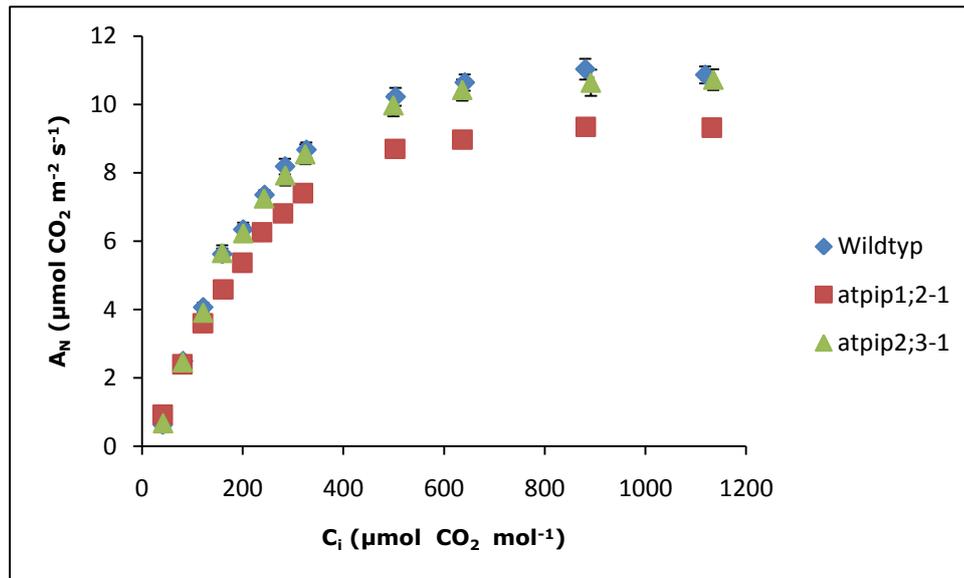
Auch der lineare Anstieg zu Beginn der Lichtkurven ( $A_{qe}$ ) wies deutliche Unterschiede auf, wobei Wildtyp-Pflanzen sowie AtPIP2;3-„Knock-Out“-Pflanzen ein ähnliches Verhalten zeigten. In atpip1;2-1-Pflanzen war die Rate des Anstiegs in der Photosyntheserate mit zunehmender Lichtintensität um ca. 35 % höher als bei den Kontroll-Pflanzen. Folglich konnten diese Pflanzen bei geringeren Lichtintensitäten im Vergleich zu den Wildtyp- und atpip2;3-1-Pflanzen schneller reagieren, erreichten jedoch eine geringere maximale Photosyntheserate, da sie die höheren Lichtintensitäten weniger effizient nutzen konnten.

Die Werte des Lichtkompensationspunktes unterschieden sich minimal. Die statistische Analyse (t-Test,  $p > 0,05$ ) zeigte keinerlei signifikante Abweichung. Demnach lag die Lichtintensität, bei der die Photosynthese soviel  $\text{CO}_2$  verbrauchte wie durch die gleichzeitig ablaufende Atmung produziert wurde, im gleichen Bereich.

### A/C<sub>i</sub>-Kurven

Betrachtet man die Änderung der Nettophotosynthese-Rate in Abhängigkeit von unterschiedlichen internen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen ( $c_i$ ) innerhalb der stomatären Kavität, ist es möglich die Resistenz der Stomata für  $\text{CO}_2$  zu vernachlässigen und unter anderem Erkenntnisse über die Leitfähigkeit der Zellwand, Plasmamembran und Chloroplasten-Membran bis zum Ort der Photosynthese für  $\text{CO}_2$ -Moleküle zu erhalten. Diese interne Leitfähigkeit für  $\text{CO}_2$  wird als Mesophyll-Leitfähigkeit bezeichnet und mit  $g_m$  abgekürzt.

Die Änderung der Assimilationsrate in Abhängigkeit von  $c_i$  zeigte für Pflanzen der Wildtyp- sowie atpip2;3-1-Linie keinen signifikanten Unterschied im Verlauf der Kurve. Für die Linie atpip1;2-1 hingegen konnte beobachtet werden, dass bereits ab internen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen von ca. 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  eine signifikante Reduktion der Photosynthese-Rate vorlag (Abbildung II 2.13). Pflanzen dieser Linie waren demnach in ihrer Photosynthese-Leistung gehemmt.



**Abbildung II 2.13:** A/C<sub>i</sub>-Kurven der verschiedenen *Arabidopsis thaliana*-Linien (Wildtyp, atpip1;2-1 und atpip2;3-1). Es wurde das siebte oder achte Blattpaar gemessen (MW±SE, n=6). Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Messungen 6 Wochen alt.

Eine weiterführende Betrachtung der Kurven erfolgte basierend auf dem Photosynthese-Modell von Farquhar et al. (1980; von Caemmerer, 2000). Hiernach sind die Carboxylierungsraten einer A/C<sub>i</sub>-Kurve durch einen der drei bzw. zwei im Folgenden aufgeführten Prozesse limitiert (eine Einschränkung durch (3) liegt nicht immer vor):

- (1) die Menge, Aktivität und Kinetik der Rubisco (A<sub>c</sub>)
- (2) die Regenerationsrate der Ribulose-1,5-bisphosphat (A<sub>j</sub>)
- (3) durch die Triosephosphat-Verfügbarkeit (A<sub>p</sub>)

In der zusammenfassenden Formel für A/C<sub>i</sub>-Kurven begrenzt das jeweilige Minimum der Faktoren die CO<sub>2</sub>-Assimilation (unter Ausschluss der dritten Phase, Formel (II 2.2). Formel (II 2.3) beschreibt die erste bzw. zweite Phase einer A/C<sub>i</sub>-Kurve mit Hilfe einer Hyperbel. Durch eine Anpassung dieser Phasen können biochemisch-kinetische Schlüsselvariablen der Photosynthese-Leistung ermittelt werden. Dabei handelt es sich um g<sub>m</sub> (Mesophyll-Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub>), V<sub>c,max</sub> (maximale Carboxylierungsrate der Rubisco) und J<sub>max</sub> (lichtgesättigte Elektronentransportrate). Der Übergang von Phase 1 zu Phase 2 wurde so gewählt, dass in beiden Kurvenabschnitten die gleiche Mesophyll-Leitfähigkeit vorlag (Ethier et al. 2006).

$$A_N = \min\{A_c, A_j\} \quad (\text{II 2.2})$$

$$A_c \text{ bzw. } A_j = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (\text{II 2.3})$$

für  $A_c$  gilt:

$$a = -1/g_i$$

$$b = (V_{c,max} - R_d)/g_i + c_i + 2 * \Gamma^*$$

$$c = R_d * (c_i + K_M) - V_{c,max} * (c_i - \Gamma^*)$$

für  $A_j$  gilt:

$$a = -1/g_i$$

$$b = (J_{max}/4 - R_d)/g_i + c_i + 2 * \Gamma^*$$

$$c = R_d * (c_i + 2 * K_M) - J_{max}/4 * (c_i - \Gamma^*)$$

AtPIP1;2-Knock-Out-Pflanzen zeigten eine deutliche Erniedrigung der Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$  im Vergleich zu Wildtyp- und AtPIP2;3-Knock-Out Pflanzen (Tabelle II 2.7). Ohne das Aquaporin der PIP1-Untergruppe lag die Leitfähigkeit des Mesophylls für  $\text{CO}_2$  bei ca. 50 %, während keine Änderung für Pflanzen ohne AtPIP2;3 zu beobachten war. Auch die Carboxylierungsrate  $V_{c,max}$  der Rubisco war in der atpip1;2-1-Linie gehemmt und erreichte lediglich 65 % der Rate des Wildtyps bzw. der atpip2;3-1-Linie. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Elektronentransportrate  $J_{max}$ , da auch diese in Pflanzen der atpip1;2-1-Linie um 22 % reduziert war, während kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und atpip2;3-1-Pflanzen zu verzeichnen war. Die Abwesenheit von AtPIP1;2 hatte demnach auf alle ermittelten Parameter der Assimilationsrate einen begrenzenden Einfluss.

**Tabelle II 2.7:** Parameter der Kurvenanpassung von  $A/c_i$ -Kurven der *Arabidopsis thaliana*-Linien Wildtyp, atpip1;2-1 und atpip2;3-1. Die verwendeten Gleichungen finden sich im Text. Angegeben sind die Parameter  $\pm$ SE,  $n=3$ . Verschiedene Buchstaben stehen für statistisch signifikante Unterschiede,  $p<0,05$ . ( $g_m$ : Mesophyll-Leitfähigkeit für  $\text{CO}_2$ ,  $V_{c,max}$ : maximale Carboxylierungsrate,  $J_{max}$ : maximale Elektronentransportrate)

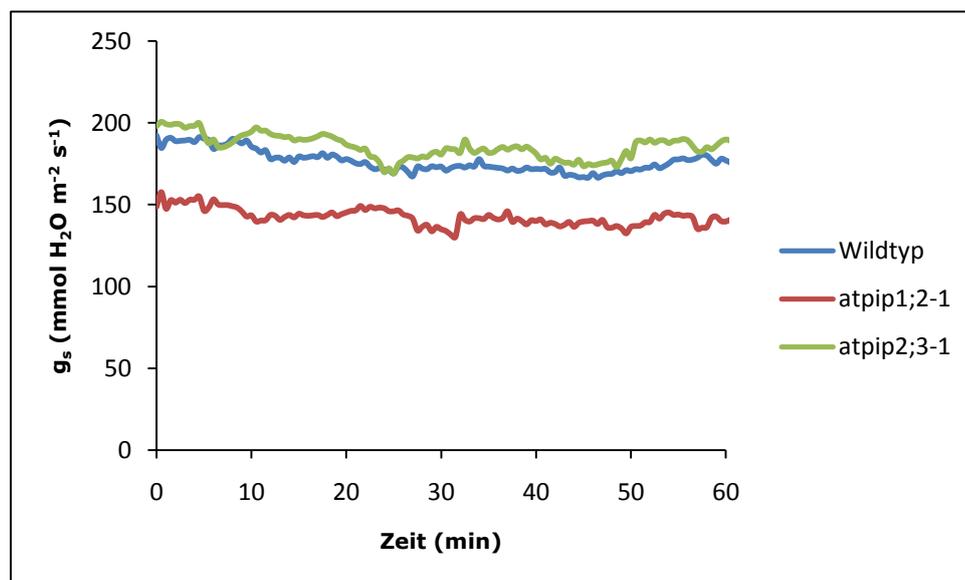
	Wildtyp	atpip1;2-1	atpip2;3-1
$g_m$ ( $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ )	0,134 $\pm$ 0,0085 a	0,064 $\pm$ 0,0037 b	0,135 $\pm$ 0,012 a
$V_{c,max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	69,675 $\pm$ 0,906 a	45,4 $\pm$ 5,316 b	70,2 $\pm$ 1,044 a
$J_{max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	58,7 $\pm$ 0,297 a	46,133 $\pm$ 2,702 b	58,33 $\pm$ 0,41 a

### 2.3.3 Untersuchung des Einflusses von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 auf die stomatäre Leitfähigkeit von *Arabidopsis thaliana*

#### Untersuchung der stomatären Leitfähigkeit ( $g_s$ ), Nettophotosynthese-Rate ( $A_N$ ) und interner $CO_2$ -Konzentration ( $c_i$ ) unter konstanten Bedingungen

Eine Limitierung der Nettophotosynthese-Rate, verursacht durch Regulation der stomatären Öffnungsweite, wird bereits seit geraumer Zeit diskutiert (Reddy et al., 2004). Da die AtPIP1;2-„Knock-Out“-Linie eine reduzierte Photosyntheserate in Abhängigkeit von variierenden Lichtintensitäten bzw.  $CO_2$ -Konzentrationen aufwies, wurde unter konstanten Bedingungen (Belichtung und  $CO_2$ -Konzentration wurden nicht verändert) untersucht, wie sich die stomatäre Leitfähigkeit ( $g_s$ ), ein Maß für die Öffnungsweite der Stomata, dieser Linie sowie der AtPIP2;3-„Knock-Out“-Linie im Vergleich zur Kontroll-Linie über einen längeren Zeitraum verhielt.

Abbildung II 2.14 zeigt den Verlauf der stomatären Leitfähigkeit für Wasser der drei *Arabidopsis thaliana*-Linien. Bei atpip1;2-1-Pflanzen war eine deutliche Reduktion der Öffnungsweite der Stomata im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zu erkennen. Diese Abnahme in  $g_s$  lag durchschnittlich bei 20 % (Tabelle II 2.8). Der geringe Unterschied in  $g_s$  zwischen der atpip2;3-1- und Wildtyp-Linie war statistisch nicht signifikant.



**Abbildung II 2.14:** Stomatäre Leitfähigkeit ( $g_s$ ) der drei *Arabidopsis thaliana*-Linien unter konstanten Bedingungen ( $400 \mu\text{mol mol}^{-1} CO_2$ , Lichtintensität von  $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Dargestellt sind gemittelte Kurven ( $n=6$ ).

Neben  $g_s$  war auch die Nettophotosynthese-Rate bei atpip1;2-1 im Vergleich zu den Kontroll- und atpip2;3-1-Pflanzen geringer. Allerdings lag der Unterschied unter diesen Bedingungen lediglich bei ca. 10% (Tabelle II 2.8).

Ein Vergleich der ermittelten Werte für die interne  $CO_2$ -Konzentration ( $c_i$ ) zeigte auch hier, dass sich diese für die drei Linien nicht unterschieden. Demnach standen der

Photosynthesereaktion trotz der reduzierten stomatären Öffnungsweite die gleichen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen zur Verfügung.

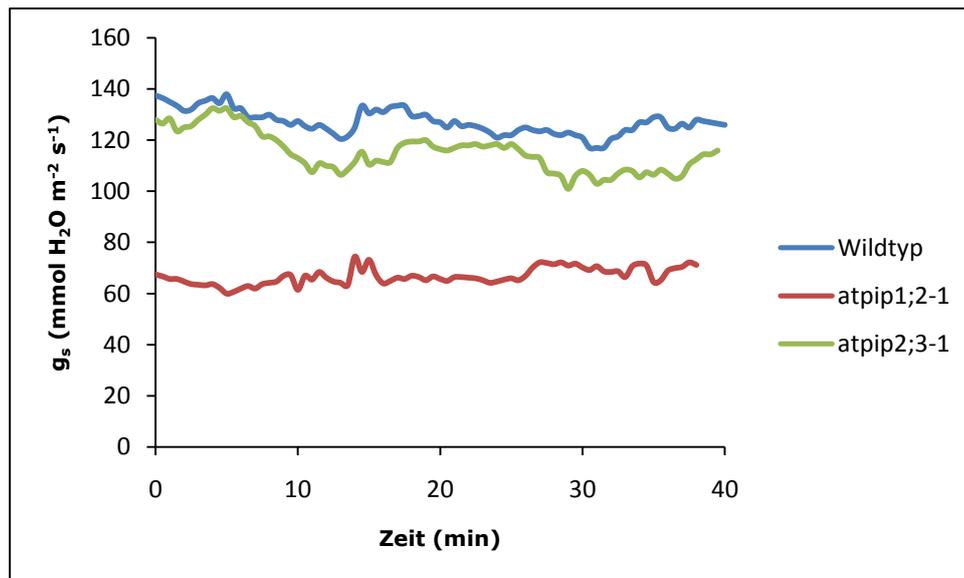
**Tabelle II 2.8:** Stomatäre Leitfähigkeit ( $g_s$ ), Nettophotosynthese-Rate ( $A_N$ ) und interne CO<sub>2</sub>-Konzentration ( $c_i$ ) der drei *Arabidopsis thaliana*-Linien bei konstanten Bedingungen (300  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und 400  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ ). Angegeben sind die Parameter  $\pm\text{SE}$ ,  $n=6$ . Verschiedene Buchstaben stehen für statistisch signifikante Unterschiede,  $p<0,05$ .

	Wildtyp	atpip1;2-1	atpip2;3-1
$g_s$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	176 $\pm$ 2,12 a	142 $\pm$ 1,63 b	185,41 $\pm$ 2,3 a
$A_N$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	8,46 $\pm$ 0,04 a	7,86 $\pm$ 0,05 b	8,63 $\pm$ 0,07 a
$c_i$ ( $\mu\text{mol mol}$ )	293,84 $\pm$ 8,62 a	286,56 $\pm$ 8,31 a	300,48 $\pm$ 1,52 a

### Untersuchung der stomatären Leitfähigkeit ( $g_s$ ) abgeschnittener Blättern

Schließzellen reagieren auf eine Vielzahl von Signalen, die ein Öffnen oder Schließen der Stomata induzieren können (Roelfsema und Hedrich, 2005). So bewirkt z.B. das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) als Reaktion auf Trockenstress ein Schließen der Stomata, um einen weiteren Wasserverlust aufgrund der Transpiration zu unterbinden. ABA wird vor allem in den Wurzeln produziert und gelangt über die Leitbahnen bis in die Blätter. Es ist denkbar, dass dieses Stresssignal bei atpip1;2-1 durch die reduzierte hydraulische Leitfähigkeit der Wurzeln ausgeschüttet wurde und dadurch die Reduktion in  $g_s$  verursacht wurde.

Um zu untersuchen, ob die Wurzeln der „AtPIP1;2-Knock-Out“-Pflanzen dieses Hormon an die Blätter senden, wurde der Gaswechsel von abgeschnittenen Blättern analysiert. Dies hatte den Vorteil, dass jeglicher Molekülaustausch, so auch der Austausch von Signalmolekülen wie Phytohormonen, zwischen Wurzel und Blatt unterbunden war.



**Abbildung II 2.15:** Stomatäre Leitfähigkeit ( $g_s$ ) abgeschnittener Blätter der drei *Arabidopsis thaliana*-Linien unter konstanten Bedingungen ( $400 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ , Lichtintensität von  $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Dargestellt sind gemittelte Kurven ( $n=5$ ).

Linie atpip2;3-1 lag mit einer durchschnittlichen stomatären Leitfähigkeit von  $115,27 \pm 0,89 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  im Bereich der Wildtyp-Pflanzen ( $127,14 \pm 0,54$ ). Bei Linie atpip1;2-1 ( $66,84 \pm 0,36$ ) blieb es bei einer signifikant reduzierten stomatären Leitfähigkeit, ungeachtet der Tatsache, dass nun die Wurzel nicht mehr mit dem Blatt in Verbindung stand (Abbildung II 2.15). Allerdings lag der Unterschied in  $g_s$  zwischen atpip1;2-1 und Wildtyp-Pflanzen nun bei ca. 50 % im Vergleich zu 20 % bei einer intakten Pflanzen (siehe Tabelle II 2.8).

Zusätzlich hatte sich die stomatäre Leitfähigkeit bei allen drei *Arabidopsis thaliana*-Linien verglichen mit Messungen eines mit der Pflanze verbundenen Blattes verringert. Bei WT-Pflanzen nahm  $g_s$  um knapp 30 %, bei atpip2;3-1-Pflanzen um knapp 40 % und bei atpip1;2-1-Pflanzen um 50 % ab.

### Untersuchung des ABA-induzierten Verlaufs der stomatären Schließkinetik

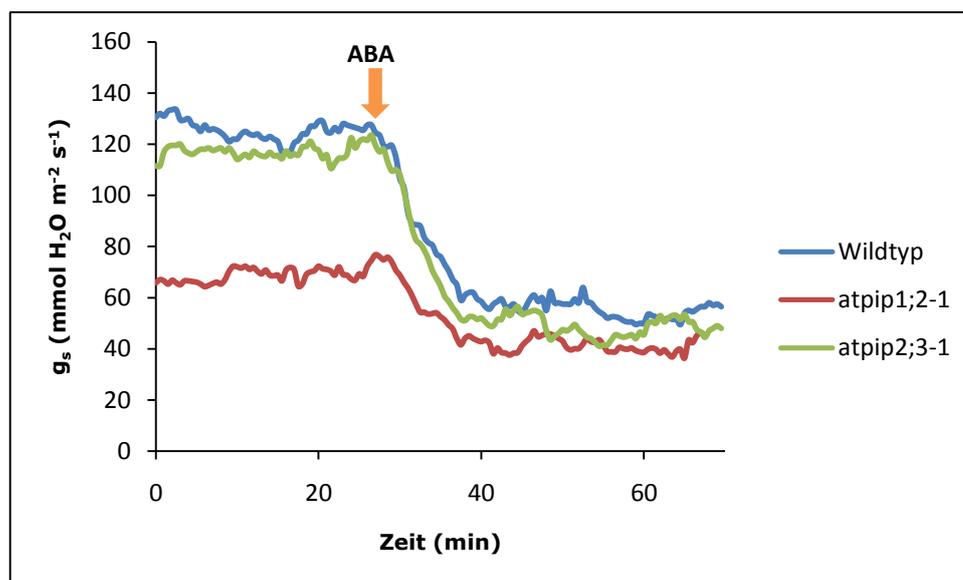
Wie bereits erwähnt, bewirkt ABA ein Schließen der Stomata. Die Reduktion der stomatären Öffnungsweite ist u.a. abhängig vom zügigen Wasser-Austritt aus den Schließzellen. Dies kann Aquaporin-vermittelt sein, da diese auch in den Schließzellen der Stomata vorliegen (Kaldenhoff et al., 1995; Uehlein et al., 2008).

Um zu untersuchen, ob AtPIP1;2 bzw. AtPIP2;3 an diesem Prozess beteiligt sein könnten, wurde die Reaktionskinetik der stomatären Leitfähigkeit auf ABA ermittelt. Zunächst konnte bei konstanten Bedingungen (Lichtintensität und  $\text{CO}_2$ -Konzentration wurden nicht verändert) der bereits beschriebene Verlauf von  $g_s$  der drei *Arabidopsis thaliana*-Linien beobachtet werden. Nach 30 Minuten wurde den Blättern Abscisinsäure appliziert und es konnte bei allen drei Linien eine Abnahme in  $g_s$  beobachtet werden (Abbildung II 2.16). Die stomatäre Leitfähigkeit nahm als

Reaktion auf ABA stark ab, wobei alle drei Linien einen ähnlichen, für atpip1;2-1-Pflanzen signifikant geringeren, Bereich erreichten (Tabelle II 2.9).

**Tabelle II 2.9:** Stomatäre Leitfähigkeit ( $g_s$ ) abgeschnittener Blätter der drei *Arabidopsis thaliana*-Linien vor und nach Applikation des Phytohormons Abscisinsäure (ABA). Angegeben sind die Parameter  $\pm$ SE,  $n=5$ . Verschiedene Buchstaben stehen für statistisch signifikante Unterschiede,  $p<0,05$ .

	Wildtyp	atpip1;2-1	atpip2;3-1
$g_s$ (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) -ABA	125,38±2,21 a	69,96±1,77 b	117,06±1,53 a
$g_s$ (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) +ABA	55,16±1,98 a	41,33±1,61 b	48,3±2,4 a



**Abbildung II 2.16:** Verlauf der stomatären Leitfähigkeit von Blättern der drei *Arabidopsis thaliana*-Linien vor und nach Applikation von 100  $\mu$ M ABA (Pfeil). Messungseinstellungen waren 400  $\mu$ mol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, Lichtintensität von 300  $\mu$ mol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Dargestellt sind gemittelte Kurven ( $n=5$ ).

Ein Vergleich des linearen Abfalls in  $g_s$  unmittelbar nach Zugabe von ABA bis zum Erreichen des Gleichgewichts (Abbildung II 2.16) ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den drei *Arabidopsis thaliana*-Linien (Tabelle II 2.10). Folglich waren alle drei Linien in der Lage ihre Stomata mit ähnlichen Geschwindigkeiten zu schließen, was gegen eine Beteiligung der untersuchten Aquaporine sprechen würde.

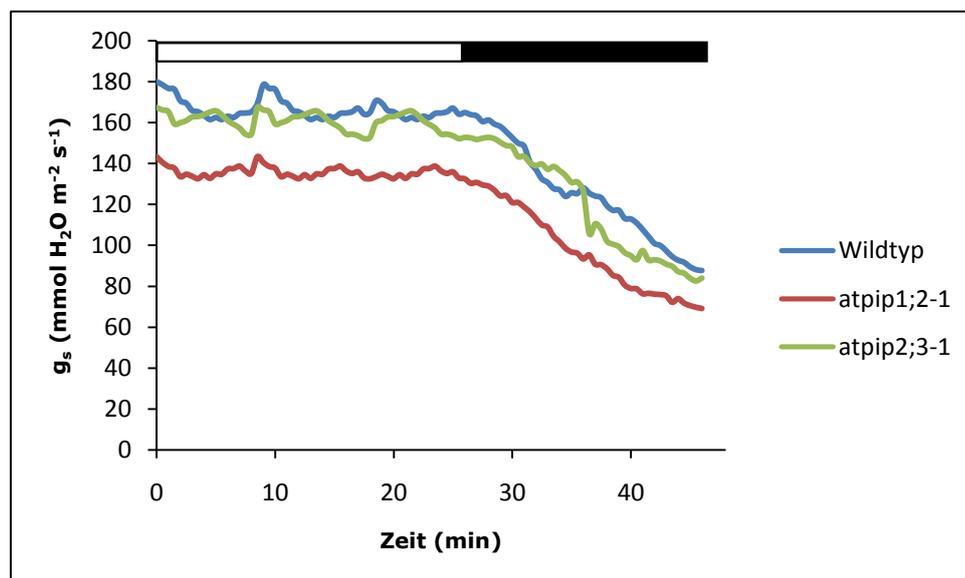
**Tabelle II 2.10:** ABA-induzierte Änderung der stomatären Leitfähigkeit ( $g_s$ ) pro Zeiteinheit. Angegeben sind die Parameter  $\pm SE$ ,  $n=5$ . Verschiedene Buchstaben stehen für statistisch signifikante Unterschiede,  $p < 0,05$ .

	Wildtyp	atpip1;2-1	atpip2;3-1
$g_s/\text{min}$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$-5,02 \pm 2,09$	$-3,84 \pm 0,92$	$-5,9 \pm 1,04$

### Untersuchung der durch Lichtentzug induzierten stomatären Schließkinetik

Neben Abscisinsäure hat auch Licht Signalcharakter für die Schließzellen. Wird die Pflanze von der Dunkelheit in Licht überführt, öffnen die Stomata und umgekehrt schließen sie, wenn man sie Dunkelheit aussetzt (Vavasseur und Raghavendra, 2005). Der Verlust des Turgordrucks wird im Verlauf des durch Dunkelheit induzierten Schließprozesses ebenso wie beim ABA-induzierten Schließen durch zügigen Austritt von Wasser erreicht. Eine Beteiligung von Aquaporinen ist daher nicht auszuschließen, da sie auch in Schließzellen exprimiert werden (Kaldenhoff et al., 1995; Uehlein et al., 2008).

Wie in Abbildung II 2.17 zu erkennen ist, lag unter konstanter Belichtung der Pflanzen mit  $500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei allen drei *Arabidopsis thaliana*-Linien eine konstante stomatäre Leitfähigkeit vor. Wiederum konnte beobachtet werden, dass atpip1;2-1-Pflanzen eine Reduktion in  $g_s$  von ca. 20 % aufwiesen, während sich  $g_s$  bei Wildtyp- und atpip2;3-1-Pflanzen nicht unterschied.



**Abbildung II 2.17:** Verlauf der stomatären Leitfähigkeit der drei *Arabidopsis thaliana*-Linien vor und nach Ausschalten der Lichtquelle. Zunächst lag eine Lichtintensität von  $500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  vor (heller Balken), anschließend eine Lichtintensität von  $0 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (dunkler Balken) Dargestellt sind gemittelte Kurven ( $n=5$ ).

Lag die Belichtung bei  $0 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  konnte ein Schließen der Stomata induziert werden. Dieser Abfall in der stomatären Leitfähigkeit erfolgte nahezu linear und bei allen drei Linien mit einer ähnlichen Geschwindigkeit (Tabelle II 2.11).

**Tabelle II 2.11:** Licht-induzierte Änderung der stomatären Leitfähigkeit ( $g_s$ ) pro Zeiteinheit. Angegeben sind die Parameter  $\pm\text{SE}$ ,  $n=5$ . Verschiedene Buchstaben stehen für statistisch signifikante Unterschiede,  $p<0,05$ .

	<b>Wildtyp</b>	<b>atpip1;2-1</b>	<b>atpip2;3-1</b>
<b><math>g_s/\text{Zeit (mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ min}^{-1})</math></b>	-2,93 $\pm$ 0,55	-3,0 $\pm$ 0,22	-3,45 $\pm$ 0,47

AtPIP1;2 sowie AtPIP2;3 scheinen demnach keinen Einfluss auf das durch Dunkelheit induzierte Schließen der Spaltöffnungen zu haben.

# III Diskussion

---

## 1 Molekulare Funktion von AtPIP1;2 und AtPIP2;3

Die passive Diffusion gelöster Teilchen über biologische Membranen ist von großer Bedeutung für den zellulären Stoffwechsel und somit für den gesamten Organismus. Mit Hilfe der erleichterten Diffusion durch Membran-durchspannende Proteine können Zellen die Diffusion unterstützen und variieren. Je nach Proteinausstattung ändern sich die Membraneigenschaften und bestimmte Moleküle können vermehrt aufgenommen oder ausgeschlossen werden. Aquaporine zählen zu den Proteinen, die Permeation von Wasser und kleinen, ungeladenen Molekülen ermöglichen, wodurch die Zelle nicht ausschließlich auf die passive Diffusion dieser Moleküle durch die Lipidphase der Membran angewiesen ist (Kaldenhoff und Fischer, 2006b).

Mit der Entdeckung der Aquaporine Ende der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts konnte erklärt werden, weshalb man Membrantypen identifizieren konnte, die eine sehr hohe, theoretischen Annahmen widersprechende, Durchlässigkeit für Wasser aufwiesen (Hevesy et al., 1935). Auch AtPIP2;3, dessen Leitfähigkeitscharakteristika in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ist in der Lage die Wasser-Permeabilität der *Saccharomyces cerevisiae*-Membran deutlich zu erhöhen. Lag es in den Zellen vor, konnte verglichen mit Hefe-Zellen, die diesen Wasserkanal nicht exprimiert hatten, Wasser 30 mal schneller in die Zelle aufgenommen werden. Alle bislang in heterologen Expressionssystemen charakterisierten PIP2-Aquaporine unterschiedlichster Pflanzenarten wiesen eine hohe Wasserleitfähigkeit auf. Diese molekulare Funktion der Aquaporine ist nicht auf dikotyle Pflanzen wie Tabak und *Arabidopsis* beschränkt, sondern auch in Monokotylen wie Mais und Reis präsent. Die Untersuchungen zur Wasserleitfähigkeit von AtPIP2;3 zeigen einmal mehr, dass PIP2-Aquaporine die Funktion „echter“ Wasserkanäle erfüllen.

Im Gegensatz zu Mitgliedern der PIP2-Untergruppe zeigten pflanzliche PIP1-Aquaporine - mit Ausnahme von *Arabidopsis* PIP1;1 und PIP1;2 (Kammerloher et al., 1994) - bislang keine Wasserleitfähigkeit, sobald sie heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten oder *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert wurden (Fetter et al., 2004; Sakurai et al., 2005; Biela et al., 1999).

AtPIP1;2 war in den Analysen der vorliegenden Arbeit nicht in der Lage die Membranpermeabilität für Wasser zu erhöhen, obwohl das Protein in etwa in gleichen Mengen in der Membran vorlag wie AtPIP2;3. Die erhaltenen Ergebnisse zur Wasserleitfähigkeit der untersuchten Aquaporine bestätigen die bisher identifizierten Leitfähigkeitscharakteristika pflanzlicher PIP1- und PIP2-Aquaporine, die auch bei vergleichenden Analysen von Mais, Tabak und Reis-Aquaporinen gefunden wurden (Fetter et al., 2004; Sakurai et al., 2005; Biela et al., 1999).

Kammerloher et al. (1994) hingegen zeigten, wie oben erwähnt, eine durch Quecksilberchlorid inhibierbare Wasser-Leitfähigkeit für AtPIP1;2 sowie vier weitere

PIP1- und PIP2-Vertreter aus *Arabidopsis thaliana*. Allerdings ist dies derzeit die einzige Studie, in der dieser Unterschied zwischen den beiden PIP-Untergruppen bezüglich ihrer Substrat-Präferenz nicht vorlag.

AtPIP1;2 wurde aufgrund von Untersuchungen mit pflanzlichen Protoplasten eine wasserleitende Funktion zugeschrieben (Kaldenhoff et al. 1998), die im heterologen Hefe-System nicht vorlag. Der Vergleich der osmotischen Wasser-Permeabilität der Blattprotoplasten unveränderter Pflanzen und im AtPIP1;2-Gehalt reduzierter Pflanzen zeigte eine deutliche Abnahme des  $P_f$ -Wertes, sobald AtPIP1;2 nicht mehr vorlag. Allerdings ist bei der Bewertung dieser Ergebnisse zu bedenken, dass sie im homologen System erhalten wurden. Im Gegensatz zu heterologen Systemen enthalten pflanzliche Protoplasten intrinsische Aquaporine, deren Funktion durch die Wegnahme von AtPIP1;2 beeinträchtigt sein könnten. In Untersuchungen zur Interaktion von PIP1 und PIP2 Aquaporinen in tierischen wie auch pflanzlichen Zellen konnte gezeigt werden, dass bei einer Co-Expression der beiden wesentlich mehr PIP2 gemeinsam mit PIP1 in der Plasmamembran vorliegt. Dadurch erhöhte sich die Wasser-Permeabilität der Membran deutlich. Bei der Expression eines PIP2-Aquaporins ohne PIP1-Vertreter wurde die Wasser-Permeabilität wiederum verringert (Fetter et al., 2004). Daher wäre es denkbar, dass aufgrund der Abwesenheit von AtPIP1;2 in den Blattprotoplasten ebenfalls weniger PIP2-Aquaporine in der Plasmamembran vorliegen. Dadurch würde eine geringere Wasser-Permeabilität erhalten werden und die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus dem homologen Pflanzen-System und dem heterologen Hefe-System erklären. Ob AtPIP1;2 in pflanzlichen Zellen eine rein regulatorische Funktion zukommt, die nur die Einbau-Effizienz von PIP2-Mitgliedern verändert, oder ob das Protein selbst aufgrund der Interaktion wasserleitfähig wird, ist unklar. Im heterologen Hefe-System jedoch konnte die molekulare Funktion der erleichterten Wasser-Diffusion durch AtPIP1;2 nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die basale Membranpermeabilität für  $\text{CO}_2$  in Hefezellen durch die Expression von AtPIP1;2 erhöht wurde, während AtPIP2;3 hierzu nicht in der Lage war. Betrachtet man die Permeabilitätskoeffizienten für  $\text{CO}_2$  der Carboanhydrase-exprimierenden Zellen, so wird ersichtlich, dass dieser um 35 % höher war, als für AtPIP1;2 exprimierende Zellen. Daraus könnte man schließen, dass AtPIP1;2 über keine  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit verfügt. Allerdings muss man bedenken, dass diese AtPIP1;2 exprimierenden Hefen zwei Proteine bilden mussten, ein Aquaporin und die Carboanhydrase. Es konnte gezeigt werden, dass mit der Expression eines zusätzlichen Proteins die Aktivität des Enzyms Carboanhydrase um 50 % reduziert wird (Dissertation N. Pede). Aufgrund dessen nahm die gemessene Membranpermeabilität für  $\text{CO}_2$  der Aquaporin-exprimierenden Zellen ab. Diese Abnahme war aber nicht proportional zur Aktivitätsabnahme der Carboanhydrase. Aus diesem Grund konnte geschlossen werden, dass das  $\text{CO}_2$ -umsetzende Enzym für die Untersuchungen nicht limitierend war, sondern vielmehr die Anwesenheit eines  $\text{CO}_2$ -leitfähigen Aquaporins die Variation der  $\text{CO}_2$  Transportrate bestimmte.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten  $P_{\text{CO}_2}$ -Werte für AtPIP1;2 lagen im Bereich von  $10^{-3} \text{ cm sec}^{-1}$ . Diese Werte liegen mindestens zwei Größenordnungen unterhalb der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität von Erythrozyten (Endeward et al., 2006) und weit unter dem theoretisch zu erwartenden Wert für eine  $\text{CO}_2$ -Permeabilität (Cooper et al., 2002). Dieser gravierende Unterschied ist ein steter Kritikpunkt innerhalb der regen Diskussion über eine proteinvermittelte, erleichterte  $\text{CO}_2$ -Diffusion. Basierend auf den vergleichsweise kleinen Werten, gehen Biophysiker von der Anwesenheit sogenannter „unstirred layer“ (USL) aus, die die Zelle umgeben (Missner et al., 2008). Diese Schichten können weniger schnell von den permeierenden Molekülen überwunden werden und möglicherweise dazu führen, dass etwaige Unterschiede in der Membranpermeabilität überlagert werden. Es ist möglich, dass die erhaltenen Werte aufgrund der USL um ein 10-100 faches unterschätzt wurden. Dies könnte auch erklären, weshalb die  $P_f$ -Werte der Wasser-Leitfähigkeitsuntersuchungen eine Größenordnung höher sind, als die der  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit. Dennoch kann man davon ausgehen, dass die Zunahme der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität durch die Expression von AtPIP1;2 auf eine molekulare Funktion des Proteins als  $\text{CO}_2$ -Pore zurückzuführen ist, denn in den Untersuchungen konnten trotz der möglichen Anwesenheit von USL Unterschiede zwischen verschiedenen Aquaporinen festgestellt werden. Dies gilt aber nur unter der Annahme, dass jede Hefezelle, unabhängig vom exprimierten Aquaporin, über gleich große „unstirred layer“ verfügte.

Die Untersuchungen zur  $\text{CO}_2$ - und Wasserleitfähigkeit von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 zeigten, dass sich PIP1- und PIP2-Vertreter aus *Arabidopsis thaliana* in ihren Leitfähigkeitscharakteristika unterscheiden. AtPIP1;2 als PIP1-Aquaporin verfügt demnach im heterologen System über eine molekulare Leitfähigkeit und ist nicht nur ein regulatorisches Protein für die Wasserleitfähigkeit der PIP2-Aquaporine.

## 2 Physiologische Funktion von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 in Wurzeln

Die physiologische Bedeutung eines einzelnen Proteins in einer Pflanze kann am besten untersucht werden, wenn man über Einzel-Knock-Out-Pflanzen verfügt, in denen nur die Expression des Ziel-Proteins unterbunden ist. Wie die molekulare Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Arabidopsis thaliana* Linien atpip1;2-1 und atpip2;3-1 ergab, erfüllten beide diese Bedingung. In beiden Linien führte die T-DNA-Insertion innerhalb des Gens zu einem Verlust des entsprechenden Aquaporins. Linie atpip2;3-1 enthielt zwar eine weitere T-DNA-Insertion, wurde aber dennoch verwendet, da die Insertion in einer nicht codierenden Region lokalisiert werden konnte. Dass diese zusätzliche Insertion einen Einfluss auf die Proteinausstattung und Expressionsregulation der Pflanze hatte, konnte nicht ausgeschlossen werden, wurde aber als eher unwahrscheinlich angenommen. Aus diesem Grund konnte man in allen Untersuchungen davon ausgehen, dass mögliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und T-DNA-Insertions-Pflanzen auf die Abwesenheit

des jeweiligen Proteins zurückzuführen waren. In diesem Punkt unterscheidet sich die Methode der T-DNA-Insertions-induzierten Expressionsreduktion von der der Antisense-Technik. Möchte man mit dieser Technik eine gezielte Expressionsreduktion eines einzelnen Proteins erzielen, muss die in die Pflanze eingebrachte Antisense-Sequenz sehr spezifisch sein. Diese Aufgabe zu erfüllen, kann im Bereich der Aquaporine sehr schwierig sein, denn Aquaporin-Gene weisen untereinander sehr hohe Sequenz-Homologien auf (Johanson et al. 2001). So zeigte sich z.B. in NtAQP1-Antisense-Pflanzen, dass auch die Expression von NtPIP1;1 beeinträchtigt war (Siefritz et al., 2002). Desweiteren wiesen AtPIP1;2-Antisense-Pflanzen veränderte Expressionsniveaus weiterer PIP-Aquaporine auf (Kaldenhoff et al., 1998). Boursiac et al. (2005) zeigten, dass die untersuchten T-DNA-Insertionslinie für AtPIP2;2 keinen nennenswerten Einfluss auf die verbleibenden 12 PIP-Aquaporine hatte. T-DNA-Insertionslinien scheinen demnach die geeigneteren Untersuchungsobjekte zu sein.

Die naheliegendste Funktion eines pflanzlichen Aquaporins liegt wohl in der Fähigkeit, die Diffusion von Wasser über biologische Membranen zu erleichtern. Diese Funktion erscheint besonders in der Wurzel von Bedeutung zu sein. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass AtPIP2;3 im heterologen System in der Lage war, die Permeabilität der Hefemembran für Wasser zu erhöhen, die für CO<sub>2</sub> jedoch nicht. Mit Hilfe der *Arabidopsis thaliana*-Linie atpip2;3-1 konnte ermittelt werden, dass diese Wasserleitfähigkeit in den Wurzeln nicht von physiologischer Bedeutung ist. Es konnte keine Änderung der hydraulischen Leitfähigkeit des Wurzelgewebes festgestellt werden, wenn AtPIP2;3 nicht mehr in der Pflanze vorlag. Betrachtet man Analysen der Aquaporin-Expression in *Arabidopsis thaliana*, so wird deutlich, dass AtPIP2;3 nicht zu den häufig vorliegenden Aquaporin-Proteinen zählt (Boursiac et al., 2005). Sowohl in der Wurzel, als auch im Blatt erreicht es lediglich einen Bruchteil der Expression von AtPIP2;2. Bei AtPIP2;2 handelt es sich um das in der Wurzel am häufigsten vorliegende Mitglied der PIP2-Untergruppe, das bereits als Wasserleitfähig charakterisiert wurde (Kammerloher et al., 1994). Es erreicht, verglichen mit AtPIP2;3, bis zu 17 x höhere mRNA-Level in hydroponisch gewachsenen Pflanzen. Ist die Expression hingegen ebenfalls mittels T-DNA-Insertion unterbunden, führt das lediglich zu einer ca. 10%igen Abnahme der hydraulischen Leitfähigkeit in der Wurzel (Javot et al., 2003). Während die Abwesenheit von AtPIP2;2 durchaus Auswirkungen auf die hydraulische Leitfähigkeit von Wurzeln hat, ist dies für AtPIP2;3 nicht der Fall. Es wäre denkbar, dass die verbleibenden sieben PIP2 Proteine in Linie atpip2;3-1 einen möglichen Funktionsverlust durch die T-DNA-Insertion im AtPIP2;3-Gen kompensieren können.

Betrachtet man hingegen die hydraulische Leitfähigkeit der atpip1;2-1-Wurzeln, stellt man fest, dass diese im Vergleich zum Wildtyp um ca. 50 % reduziert war. AtPIP1;2, ein in der Wurzel hoch exprimiertes Aquaporin (Kaldenhoff et al., 1995), stellt folglich eine Komponente der Wasseraufnahme in der Wurzel dar. Darüberhinaus verdeutlicht dieses Ergebnis, dass ein Großteil des Wassers innerhalb der Wurzel den Weg über die Membran geht. Bedenkt man, dass AtPIP1;2 in den Untersuchungen zur

molekularen Funktion keine Wasser-Leitfähigkeit aufwies, ist dieses Resultat durchaus erstaunlich.

Wie bereits erwähnt, gibt es Belege, dass PIP1-Aquaporine eine regulatorische Funktion erfüllen, indem sie bei einer Co-Expression von PIP1- und PIP2-Aquaporinen die Einbau-Rate der beiden PIP-Proteine erhöhen und so die Membranpermeabilität für Wasser erhöhen (Fetter et al., 2004, Zelazny et al., 2008 und 2009). Ob eine Interaktion der PIP1- und PIP2-Proteine zwischen Homotetrameren oder innerhalb von Heterotetrameren diese Änderungen verursachen wird derzeit untersucht.

Auch AtPIP1;2 könnte über eine Protein-Wechselwirkung mit AtPIP2-Proteinen die hydraulische Leitfähigkeit von Wurzeln modulieren. Durch die Abwesenheit des Proteins AtPIP1;2 in den Wurzeln der *atpip1;2-1*-Linie könnten weniger PIP2-Proteine in die Plasmamembran gelangen. Dies würde zu einer Abnahme der hydraulischen Leitfähigkeit führen. Neben der regulatorischen Funktion könnte AtPIP1;2 in den Wurzeln allerdings auch wasserleitfähig sein. Bei einer Studie zur hydraulischen Leitfähigkeit von *Arabidopsis thaliana*-Wurzeln wurden Linien mit unterschiedlichem Aquaporin-Gehalt verwendet (Martre et al., 2002). Es handelte sich um PIP1- und PIP2-Antisense Pflanzen sowie einer Kreuzung aus beiden (PIP1/2-Antisense), in denen die Expression beider Aquaporin-Gruppen reduziert war. Während PIP2-Antisense-Pflanzen eine Abnahme der hydraulischen Leitfähigkeit von 47 % aufwiesen, führte die zusätzliche Wegnahme der PIP1-Aquaporine zu einer Verringerung von 68% in der PIP1/2-Antisense-Linie. Der Unterschied zwischen den beiden Linien könnte dadurch entstehen, dass in der PIP2-Antisense-Linie noch PIP1-Aquaporine vorliegen, die die verbleibenden PIP2-Aquaporine über die Interaktions-Regulation in die Membran begleiten. Denkbar ist aber auch, dass die PIP1-Aquaporine in dieser Linie selbst zur hydraulischen Leitfähigkeit beitragen und daher in der Kreuzungslinie jene noch stärker abnimmt. Interessanterweise wiesen diese Antisense-Linien eine veränderte Wurzelgröße auf. Die Pflanzen verfügten über einen vergrößerten Wurzelballen und damit eine erhöhte Wurzel zu Blatt-Trockenmasse. So konnten sie die veränderte Aquaporin-Expression kompensieren und bezogen auf die Wurzeloberfläche vergleichbare Mengen Wasser wie der Wildtyp aufnehmen. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Javot et al. (2003) konnte keine Veränderung der pflanzlichen Morphologie oder Entwicklung festgestellt werden. Möglicherweise ist die Anzahl der Aquaporine, deren Expression modifiziert wird, für einen solchen Kompensationsmechanismus relevant.

### **3 Physiologische Funktion von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 in Blättern**

Die photosynthetische Kohlenstoff-Assimilation ist ein zentraler Prozess der Pflanzenphysiologie, der eng an die pflanzliche Wasserversorgung gekoppelt ist (Flexas et al., 2004). Die Untersuchungen zur Funktion von AtPIP1;2 und AtPIP2;3 in Blättern ergaben, dass das Fehlen von AtPIP1;2 zu einer Reduktion der

Nettophotosynthese-Rate führt. Außerdem nimmt auch die stomatäre Leitfähigkeit ( $g_s$ ) ab, wobei sich die interne  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der stomatären Kavität nicht signifikant von der der Kontrollpflanzen unterscheidet.

Eine verminderte Photosyntheserate kann durch eine geringere stomatäre Öffnungsweite verursacht werden. Dadurch würde weniger  $\text{CO}_2$  ins Blattinnere gelangen und die Photosynthese limitieren (Reddy et al., 2004). Die stomatäre Leitfähigkeit ist vom Turgor der Schließzellen abhängig und kann nur unter ausreichender Wasserversorgung aufrecht gehalten werden. Daher könnte die hier beobachtete Änderung von  $g_s$  das direkte Resultat der Wassertransport-Hemmung in der Wurzel und eventuell der gesamten Pflanze sein, die durch das fehlende wasserleitfähige AtPIP1;2 verursacht wird. Eine solche Hemmung wird von Pflanzen als Stress wahrgenommen. Als Reaktion darauf wird das Phytohormon ABA in den Wurzeln ausgeschüttet. Auf diesem Weg werden in den Blättern  $g_s$  und der Transpirations-Wasserungsverlust verringert (Reddy et al., 2004). Diese Wurzel-Blatt-Kommunikation lag in Pflanzen der atpip1;2-1-Linie jedoch nicht vor, da auch von den Wurzeln getrennte Blätter in der Gaswechsel-Analyse eine reduzierte stomatäre Leitfähigkeit aufwiesen, obwohl jegliche Signal-Transduktion aus den Wurzeln unterbunden war.

Verfügen Pflanzen über eine reduzierte Menge an Rubisco im Blatt, hat dies, ebenfalls im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, eine Abnahme der Nettophotosynthese-Rate zur Folge (von Caemmerer, 2004). Linie atpip1;2-1 hingegen enthält vergleichbare Mengen Rubisco (große Untereinheit), dem Schlüsselenzym der Photosynthese. Auch der Chlorophyllgehalt unterschied sich nicht. Demnach war die Grundausstattung der Photosynthese in diesen Pflanzen nicht beeinträchtigt.

Die Ursache für die Hemmung der Assimilationsrate ist eher in der schlechteren  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit im Stroma der Chloroplasten zu vermuten. atpip1;2-1-Pflanzen wiesen eine reduzierte Mesophyll-Leitfähigkeit für  $\text{CO}_2$  ( $g_m$ ) auf. Dadurch wird der Widerstand der  $\text{CO}_2$ -Diffusion innerhalb des  $\text{C}_3$ -Blattes erhöht und die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Stroma der Chloroplasten reduziert. Dies hat eine Limitierung der Photosynthese vor allem bei hohen Lichtintensitäten zur Folge (Tyerman et al., 2002). Bei niedrigeren Lichtintensitäten ist die Photosynthese durch die Elektronentransportrate und nicht durch die  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit begrenzt. Die verminderte stomatäre Leitfähigkeit der atpip1;2-1-Pflanzen ist vermutlich auf eine Co-Regulation der Nettophotosynthese, stomatären Leitfähigkeit und Mesophyll-Leitfähigkeit zurückzuführen (Evans et al., 1994; Flexas et al., 2004). Aufgrund der molekularen Funktion von AtPIP1;2 als  $\text{CO}_2$ -Pore ändert sich mit dem Aquaporin Gehalt der Membranen  $g_m$  und dadurch die Photosyntheserate und  $g_s$ .

AtPIP1;2 ist nicht das einzige bekannte Aquaporin, das die  $\text{CO}_2$ -Diffusion im Blatt erleichtert. Auch NtAQP1 und HvPIP2;1 haben einen Einfluss auf  $g_m$  (Flexas et al., 2006; Hanba et al., 2004). Für NtAQP1-überexprimierende, wie auch im NtAQP1-Gehalt reduzierte Tabak-Pflanzen konnte gezeigt werden, dass  $g_m$  in Abhängigkeit von der Aquaporin-Menge variierte. Auch HvPIP2;1- ein PIP2-Vertreter aus Gerste konnte in Reis überexprimiert,  $g_m$  und dadurch die Photosynthese erhöhen. Allerdings

fürte die Überexpression dieses Proteins zu gravierenden Veränderungen der Blatt-Anatomie. Möglicherweise wurden diese Veränderungen durch die Expression eines fremden Proteins in Reis hervorgerufen. Ob das Aquaporin selbst oder die veränderte Blattstruktur die Ursache für eine Zunahme in  $g_m$  war, kann nicht eindeutig festgestellt werden. Darüberhinaus fehlt in dieser Studie eine molekulare Charakterisierung des Proteins, die zeigen könnte, ob es sich um ein  $\text{CO}_2$ -leitfähiges Aquaporin handelt. Im Gegensatz dazu wurde NtAQP1 wie auch AtPIP1;2 als  $\text{CO}_2$ -leitfähig charakterisiert. Morphologische Untersuchungen an den verwendeten Pflanzenlinien ergaben keine Auffälligkeiten (Uehlein et al., 2003).

Neben  $g_m$  war in den Pflanzen der *atpip1;2-1* Linie auch noch die maximale Elektronentransportrate ( $J_{\text{max}}$ ), sowie die maximale Carboxylierungsrate ( $V_{\text{c,max}}$ ) reduziert. Dies ist erstaunlich, da  $g_m$  eigentlich keinen Einfluss auf die Photosynthesekapazität der Elektronentransportkette und des Calvin-Zyklus haben sollte (Long und Bernacchi, 2003). Es wäre allerdings denkbar, dass sich die Expression unterschiedlicher Photosynthese-Gene ändert, sobald  $g_m$  die vorliegende  $\text{CO}_2$ -Konzentration in den Zellen variiert, da sie  $\text{CO}_2$  als Regulator benötigen (Deng et al., 2003; Ludewig und Sonnewald, 2000; Van Osten et al., 1994).

Die Bedeutung der Mesophyll-Leitfähigkeit und die Beteiligung bestimmter Aquaporine wird besonders deutlich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass in Blättern ein geringerer  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsgradient vorliegt als das z.B. in der Lunge der Fall ist. Dennoch erreicht die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme in Pflanzen vergleichbare Geschwindigkeiten. Daher müssen Pflanzen eine wesentlich höhere  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit aufweisen (Evans und von Caemmerer, 1996). Diese ist vermutlich besonders in der inneren Chloroplasten-Membran von Bedeutung. Uehlein et al. (2008) konnten zeigen, dass eine RNAi-Reduktion von NtAQP1 in Tabakpflanzen zu einer verringerten  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate von Chloroplasten-Membranvesikeln führte. Dieser Unterschied zwischen RNAi- und Wildtyp-Pflanzen war bei Chloroplasten-Membranvesikeln stärker ausgeprägt als bei Plasmamembranvesikeln der gleichen Pflanzen. Bedenkt man, dass das Lipid zu Protein-Verhältnis der inneren Chloroplasten-Membran bei Spinat mit  $1 \text{ mg Lipid mg}^{-1} \text{ Protein}$  wesentlich geringer ist, als das Verhältnis der äußeren Membran ( $2,5\text{-}3 \text{ mg Lipid mg}^{-1} \text{ Protein}$ , Block, et al., 2007), könnte dies die Membran-Eigenschaften so verändern, dass eine ungehinderte  $\text{CO}_2$ -Diffusion nicht mehr möglich ist und die Protein-vermittelte, erleichterte Diffusion durch ein Aquaporin nötig ist.

Während AtPIP1;2 in Blättern die Funktion einer  $\text{CO}_2$ -Pore zukommt, konnte für AtPIP2;3 nicht festgestellt werden, ob die molekular vorhandene Wasser-Leitfähigkeit für die Pflanzen im Blatt von Bedeutung ist. Ähnlich wie in den Wurzeln, könnte eine Kompensation durch die verbleibenden PIP2-Aquaporine eine Erklärung sein.

AtPIP1;2 hingegen ist sowohl in der Wurzel als auch im Blatt für essentielle Prozesse wie Wasseraufnahme und  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit im Stroma verantwortlich. Es scheint, dass es je nach Organ unterschiedliche Funktionen erfüllt, wobei im heterologen System lediglich eine  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit ermittelt werden konnte.

## 4 Ausblick

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, ist ein heterologes Expressionssystem zur Untersuchung von Aquaporin-Transporteigenschaften zwar ein nützliches Werkzeug, es kann aber auch zu Fehlinterpretationen der Aquaporin-Funktion führen. Daher könnte es von Interesse sein, zusätzliche Untersuchungen im homologen System mit Pflanzenmembran-Vesikeln durchzuführen. Im Fall der hier untersuchten Aquaporine könnte man Membranen von Wildtyp- sowie Aquaporin-T-DNA-Insertionslinien zur Ermittlung der Wasser- bzw. Kohlendioxid-Permeabilitäten verwenden. Dabei wäre es bezüglich der Wasserleitfähigkeit besonders interessant, Plasmamembran-Vesikel aus Wurzel- und Blattgewebe zu vergleichen. So könnte man mögliche Unterschiede zwischen den Organen analysieren.

Bei der Betrachtung der  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit von Aquaporinen könnte man zusätzlich zu den Plasmamembran-Vesikeln die innere Chloroplasten-Membran aus Blättern isolieren und diese ebenfalls untersuchen. Dies könnte Hinweise liefern, ob auch im Fall von AtPIP1;2 die innere Chloroplasten-Membran zur Erniedrigung von  $g_m$  beiträgt, sobald dieses Aquaporin nicht mehr exprimiert wird.

Neben diesen funktionellen Untersuchungen auf zellulärer Ebene könnte ein molekularbiologischer Ansatz dazu beitragen, mehr über die Regulation der Photosynthese bzw. der Mesophyll-Leitfähigkeit zu erfahren. Ein Vergleich des Expressionsprofils einer Wildtyp-Pflanze mit dem der atpip1;2-1-Linie könnte aufzeigen, ob und bei welchen Genen die Expression möglicherweise durch die Abwesenheit von AtPIP1;2 beeinflusst wurde. Dabei sind vor allem die in dieser Arbeit nicht untersuchten Aquaporin-Gene von Interesse und Gene, die mit der Photosynthese in Zusammenhang stehen. Sollten signifikante Unterschiede festgestellt werden, könnte man mit Hilfe von T-DNA-Insertionslinien für die identifizierten Gene deren physiologische Funktion ermitteln. Auf diese Weise könnte man weitere Komponenten benennen, die  $g_m$  modifizieren. Dies ist von besonderem Interesse, da man bislang zwar Umweltfaktoren kennt, die  $g_m$  beeinflussen können, aber abgesehen von der Beteiligung der Aquaporine keine weiteren Hinweise auf Bestandteile der Mesophyll-Leitfähigkeit hat.

# IV Material und Methoden

---

## 1 Pflanzen und Anzuchtbedingungen

### 1.1 Versuchspflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*)

In der vorliegenden Arbeit wurde *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Acker-Schmalwand) untersucht. *Arabidopsis thaliana* ist eine krautige, einjährige Rosettenpflanze mit grundständigen Blättern aus der Familie der Brassicaceae. Die Acker-Schmalwand ist weltweit in den gemäßigten Klimazonen anzutreffen. In den 40er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde sie als Modellorganismus der Pflanzenwissenschaften etabliert.

Die physiologischen Untersuchungen zur Funktion von Aquaporinen in *Arabidopsis thaliana* wurden mit zwei T-DNA Insertionslinien (N519794 und N617876) des Ökotyps Columbia (Col) durchgeführt. Diese Linien wurden beim Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC, Nottingham) bezogen. Die Versuchspflanzen stammten der F4-Generation ab, deren Elternpflanzen (Col-0, Linie N60000) mittels *Agrobacterium tumefaciens* mit der T-DNA des Plasmids pROK2 transformiert und über Selbstbefruchtung vermehrt wurden (Alonso et al., 2003). In beiden Fällen handelt es sich um Insertionen der T-DNA im Exon 2, wobei laut der Datenbank T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) die Insertion bei N519794 auf das Basenpaar 579 und bei N617876 auf das Basenpaar 548 innerhalb der genomischen Sequenz folgt.

### 1.2 Anzucht und Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* auf festen Medien

Samen der verschiedenen *Arabidopsis thaliana*-Linien wurden entweder auf Murashige und Skoog (MS)-Agarplatten oder auf Erde ausgesät.

Für die Anzucht auf MS-Agarplatten mussten die Samen zunächst sterilisiert werden, um mögliche Kontaminationen der Agarplatten zu vermeiden. Hierfür wurden die Samen unter sterilen Bedingungen in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für zwei Minuten mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte für fünf Minuten eine Inkubation der Samen in Sterilisierungslösung. Um die Samen danach zu waschen, wurden fünf einminütige Waschschriffe mit sterilem Wasser durchgeführt. Die Samen wurden daraufhin in sterilem Wasser aufgenommen und mit Hilfe einer blauen Pipettenspitze auf das MS-Medium überführt.

Nach einer zweitägigen Inkubation bei 4° C wurden die Agarplatten zur Keimung und weiteren Anzucht in eine klimatisierte Phytokammer überführt. In der Anzuchtkammer herrschten folgende Bedingungen: Belichtung Tag/Nacht 12h/12h, Lichtintensität von 70-100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , Raumtemperatur Tag/Nacht 24 °C/20 °C und eine Luftfeuchtigkeit von ca. 65 %.

MS-Medium (1 l)	4,3 g 10 g	MS-Salze Pflanzenagar pH 5,7 (KOH)
Sterilisierungslösung	5 % 0,02 %	Hypochlorid Triton-X 100 ad H <sub>2</sub> O (steril)

Die Anzucht auf Erde erfolgte zunächst auf einem Erde/Sandgemisch (Verhältnis 2:1). Im Anschluss an die Aussaat wurden auch diese Samen zur Stratifikation zwei Tage bei 4 °C inkubiert und in die klimatisierte Anzuchtkammer überführt. Zwei Wochen nach der Keimung wurden diese Pflanzen in düngerhaltige Erde umgesetzt und unter den genannten Bedingungen weiter kultiviert.

### 1.3 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* in hydroponischer Kultur

Um physiologische Messungen an intakten *Arabidopsis*-Wurzeln durchführen zu können, war es nötig die Pflanzen in hydroponischer Kultur wachsen zu lassen. In Anlehnung an Huttner und Bar-Zvi (2003) wurden mit Hilfe von Heinrich Heckwolf Anzuchtkisten hergestellt. Eine herkömmliche Plastikkiste mit Deckel und einem Volumen von ca. 20 l wurde vollständig mit schwarzer Teichfolie beklebt, um jegliche Lichteinstrahlung zu unterbinden. In die Deckel wurden 20 Löcher mit einem Durchmesser von 3 cm gebohrt, in die das ca. 4 cm lange Ende eines 50 ml Falcon-Röhrchens gesteckt wurde. Dieses Röhrchen-Stück war unten offen, da das konische Ende zuvor abgeschnitten wurde, so dass jeweils ein 1,5 x 1,5 x 5 cm großes Steinwolle-Stück hindurch gesteckt werden konnte.

Die Pflanzen wurden zunächst wie beschrieben auf MS-Agarplatten angezogen und nach zwei Wochen auf die Steinwolle umgesetzt. Die Steinwolle-Stücke reichten in das Nährmedium, das sich in den Kisten befand. Um eine stetige Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten, wurde das Nährmedium mit einem 6 cm langen Aquariums-Sprudelstein begast. In den ersten 1-2 Wochen wurden die Pflanzen mit einem durchsichtigen Plastik-Schnapsglas abgedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit vorliegen zu haben. Mit zunehmender Wurzelgröße wurde der Pegel des Nährmediums verringert, so dass immer ein Teil der Wurzeln in das Medium reichte. Die hydroponischen Pflanzenkulturen wurden unter den Bedingungen, wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, kultiviert.

#### Hydroponisches Nährmedium

Makroelemente		Mikroelemente	
1,5 mM	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	50 µM	KCl
1,25 mM	KNO <sub>3</sub>	50 µM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,75 mM	MgSO <sub>4</sub>	10 µM	MnSO <sub>4</sub>
0,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 µM	ZnSO <sub>4</sub>
72 µM	Fe(III)-EDTA-Natriumsalz	1.5 µM	CuSO <sub>4</sub>
		0,075µM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>

## 1.4 Morphologische Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana*

### 1.4.1 Bestimmung der Blattanzahl und des Blattrosetten-Durchmessers

Die Blattanzahl der sechs Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurde abgezählt. Der Durchmesser der Blattrosetten wurde mit Hilfe eines Lineals an drei verschiedenen Stellen der Pflanzen ausgemessen. Die Bestimmung der Blattanzahl und des Rosettendurchmessers erfolgte im gleichen Entwicklungsstadium wie die Gaswechsel-Untersuchungen.

### 1.4.2 Bestimmung der Stomata-Größe und -Dichte

Zur Bestimmung der Stomata-Größe und -Dichte der Blattunterseite wurden Abdrücke mit durchsichtigem Nagellack angefertigt. Der Nagellack wurde aufgetragen und die Blätter für 3-5 min bei RT inkubiert. Anschließend konnte die Nagellackschicht abgezogen werden und unter einem Lichtmikroskop (Leica DM IBRE) betrachtet werden. Digitale Bilder dieser Abdrücke wurden mit Hilfe einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera (EOS 300D, Canon) aufgenommen. Die Größe und Anzahl der Spaltöffnungen wurde für 5 je 0,368 mm<sup>2</sup> große Ausschnitte pro untersuchtes Blatt bestimmt.

### 1.4.3 Bestimmung der Blattoberfläche

Die Oberfläche wurde mit Hilfe eines Scanners (Canon 3000) und der Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) ermittelt. Die Bestimmung der Blattoberfläche erfolgte im gleichen Entwicklungsstadium wie die Gaswechsel-Untersuchungen.

### 1.4.4 Bestimmung der Wurzeloberfläche

Die Bestimmung der Wurzeloberfläche war nötig, um die hydraulische Leitfähigkeit des Wurzelgewebes auf die Oberfläche beziehen zu können und so die spezifische Leitfähigkeit zu erhalten.

Die Oberfläche wurde mit Hilfe des Scanners und der dazugehörigen Software Winrhizo (Regent Instruments) der Arbeitsgruppe von Prof. Scheu ermittelt. Dazu wurden die Wurzeln vor dem Scannen 1 min in 1% Methylenblau inkubiert, um den Kontrast zu erhöhen und die feinen Seitenwurzeln sichtbar zu machen. Anschließend konnte die Wurzel in einer mit Wasser gefüllten Schale auf den Scanner gestellt werden. Vor der Aufnahme mussten die feinen Seitenwurzeln von einander getrennt werden, um die gesamte Wurzel erfassen zu können.

## 1.5 Physiologische Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana*

### 1.5.1 Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit von pflanzlichem Gewebe

Die hydraulische Leitfähigkeit von Wurzeln ( $K_r$ ) wurde wie bei Tyree et al. (1995) beschrieben ermittelt.

Um Wurzeln zu untersuchen, wurden selbige unter Wasser von der Blattrosette mit einer Rasierklinge getrennt. Wasser wurde von der Wurzelbasis in den Wurzelstock gedrückt. Der Druck des Wasserstroms wurde von 0 bis 500 kPa mit ca. 8 kPa pro Sekunde linear erhöht, während der Fluss durch die Wurzel alle zwei Sekunden gemessen wurde. Um die spezifische hydraulische Leitfähigkeit zu ermitteln, wurde der Fluss gegen den vorliegenden Druck aufgetragen und die daraus resultierende Steigung durch die Wurzeloberfläche geteilt.

### 1.5.2 Gaswechsel Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana*

Nettophotosynthese-Rate ( $A_N$ ) und stomatäre Leitfähigkeit ( $g_s$ ) wurden mit Hilfe von Gaswechsellmessungen an intakten Pflanzen sowie abgeschnittenen Blättern bestimmt. Hierzu wurde ein tragbares, offenes Gaswechselsystem (CIRAS-2, PP Systems) verwendet. An dieses Gerät war eine Messküvette (PLC6 *Arabidopsis*) angeschlossen, die klimatisiert war, über eine interne Lichtquelle verfügte und einen Messöffnungsquerschnitt von 1,3 cm<sup>2</sup> hatte. Das Gaswechselsystem besitzt eine CO<sub>2</sub>-Dosierungseinheit über differentielle Infrarot-Gas-Analysatoren, die eine Messung der Wasserdampf- und CO<sub>2</sub>-Konzentration ermöglichte. Der Gas-Strom durch die Küvette wurde bei allen Messungen auf 300 ml min<sup>-1</sup> eingestellt, während die Blocktemperatur in der Blattkammer auf 22 °C und die Luftfeuchtigkeit auf 50-60 % festgelegt wurde. Die Pflanzen waren bei allen Gaswechsellmessungen sechs Wochen alt (Zeit nach der Keimung). Es wurden Blätter des siebten oder achten Blattpaares untersucht.

Unter konstanten Messbedingungen betrug die Lichtintensität 300  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und die CO<sub>2</sub>-Konzentration 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ . Datenpunkte wurden mit Hilfe der Software CIRAS-2 Remote Control alle 30 Sekunden automatisch aufgezeichnet.

Für die Lichtkurven wurde die Nettophotosyntheserate bei elf verschiedenen Lichtintensitäten gemessen. Die Pflanzen wurden zunächst schrittweise an eine maximale Lichtintensität von 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angepasst. Die Intensitäten wurden dann stufenweise auf 0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  verringert. In der Blattkammer war eine CO<sub>2</sub>-Konzentration von 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  eingestellt.

Die Kurvenanpassung der Lichtkurven wurde mit einer nicht-linearen Funktion, der Mitscherlich Gleichung (Potvin et al., 1990), mit Hilfe der Software Igor Pro 6 (WaveMetrics) vorgenommen (VI 1.1).

$$A = A_{max} \times [1 - e^{-A_{qe} \times (PPF - LCP)}] \quad (\text{VI 1.1})$$

Dabei bezeichnet  $A_{\max}$  die maximale, lichtgesättigte Photosyntheserate,  $A_{qe}$  den linearen Anstieg zu Beginn der Kurve, LCP den Lichtkompensationspunkt und PPF den photosynthetischen Photonenfluss.

Für die Messung der Nettophotosyntheserate in Abhängigkeit der internen  $\text{CO}_2$ -Konzentration wurden sogenannte  $A/c_i$ -Kurven aufgenommen. Hierzu wurde bei konstanter Lichtintensität ( $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), die im Bereich der Lichtsättigung lag, und den beschriebenen Einstellungen des Gaswechselsystems die  $\text{CO}_2$ -Konzentration innerhalb der Blattküvette variiert. Die Blätter wurden zunächst schrittweise an eine maximale  $\text{CO}_2$ -Konzentration von  $1250 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  angepasst. Anschließend wurde die Konzentration dann bis auf  $50 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  reduziert. Mit Hilfe der Gleichung (VI 1.2) wurden die  $A/c_i$ -Kurven angepasst und die Mesophyll-Leitfähigkeit ( $g_m$ ), maximale Carboxylierungsrate ( $V_{c,\max}$ ) und maximale Elektronentransportrate ( $J_{\max}$ ), wie von Ethier et al. (2006) beschrieben, ermittelt.

$$A_c \text{ bzw. } A_j = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (\text{VI 1.2})$$

für  $A_c$  gilt:

$$a = -1/g_i$$

$$b = (V_{c,\max} - R_d)/g_i + c_i + 2 * I^*$$

$$c = R_d * (c_i + K_M) - V_{c,\max} * (c_i - I^*)$$

für  $A_j$  gilt:

$$a = -1/g_i$$

$$b = (J_{\max}/4 - R_d)/g_i + c_i + 2 * I^*$$

$$c = R_d * (c_i + 2 * K_M) - J_{\max}/4 * (c_i - I^*)$$

## 1.6 Probenahme an *Arabidopsis thaliana*

Für analytische Zwecke wurden junge Blätter mit einer Rasierklinge abgeschnitten, in ein gefaltetes Alufolie-Tütchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Wurde eine große Menge an Blattmaterial benötigt, wurden alternativ vollständige Blattrosetten von 2 bis 3 Wochen alten Pflanzen verwendet. Die Lagerung des Blattmaterials erfolgte bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 1.7 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts in *Arabidopsis thaliana* Blättern beruht auf der Methode von Arnon (1949). Dabei nutzt man die Tatsache aus, dass bei einer Wellenlänge von 652 nm Chlorophyll a und b den gleichen Extinktionskoeffizienten von  $34,5 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$  haben.

Für die Bestimmung wurde jeweils 150 mg Blattmaterial in 10 mM Tris/HCl (pH7,4) und einer Spartelspitze Seesand gemörsert. 1 ml der Suspension wurde in ein Reagenzglas überführt und dort mit 4 ml 100% Aceton durch invertieren gemischt. Die erhaltene Suspension wurde filtriert und 1 ml der erhaltenen Lösung bei 652 nm

photometrisch vermessen. Mit folgender Formel kann anschließend der Chlorophyllgehalt in mg Chlorophyll pro ml in der untersuchten Probe ermittelt werden:

$$c_{Chl(a+b)} = \frac{E_{652}}{34,5} \quad (\text{IV 1.3})$$

## 1.8 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

### 1.8.1 Isolierung genomischer DNA aus geringen Blattmaterial-Mengen

Diese Methode eignet sich gut für die Isolierung genomischer DNA aus geringen Mengen Pflanzenmaterials. Hierzu wurden 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und darin gemörsert. Zu der gefrorenen Probe wurden 750 µl DNA-Extraktionspuffer und 750 µl Chloroform in ein 2 ml- Eppendorf-Reaktionsgefäß zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben für 30 min bei 65 °C inkubiert und dabei von Zeit zu Zeit der Deckel geöffnet. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 7500 xg. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 Vol. Isopropanol zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurde für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde das Ethanol abgenommen und das Präzipitat in 100 µl sterilem bidest. Wasser aufgenommen.

Um enthaltene RNA abzubauen wurde das Volumen zunächst mit sterilem bidest. Wasser auf 200 µl aufgefüllt und 6 µl RNase A (10mg/ml) zugegeben. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C. Im Anschluss wurden 2 Vol. 100 % Ethanol und 1/10 Vol. 3 M NaOAc zugegeben und der Ansatz für mindestens 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Die Proben wurden dann für 5 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde das Ethanol abgenommen, das Präzipitat in 50 µl Wasser aufgenommen und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei +4 °C.

DNA-Extraktionspuffer	1 %	Sarcosyl
	0,8 M	NaCl
	0,022 M	EDTA
	0,22 M	Tris/HCl pH 7,8
	0,8 %	CTAB
	0,14 M	Mannitol (oder Sorbitol)

Vor Gebrauch 14 µl 2-Mercaptoethanol pro 10 ml Puffer frisch zugeben.

### 1.8.2 Isolierung genomischer DNA aus gesamten Blattrosetten

Mit der Methode nach Dolferus (1991) kann eine für Southern Blots ausreichende Menge genomischer DNA gewonnen werden. Es wurden 0.5-2.0 Gramm

Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, gemörsert und mit 15 ml Extraktionspuffer vermischt. Im Anschluss wurde 1 ml 20 % SDS zugegeben und das Homogenat wurde für 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 5 ml 5 M Kaliumacetat wurden die Proben 20 min auf 4 °C abgekühlt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 20000 rpm für 20 min im SS34-Rotor in einer Sorvall-Zentrifuge (RC5C Sorvall Instruments Du Pont). Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 ml Isopropanol vermischt. Die Fällung erfolgte für mindestens 30 min bei -20 °C. Danach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10000 rpm im SS34-Rotor. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 850 µl T<sub>50</sub>E<sub>10</sub>-Puffer resuspendiert. Es wurden 10 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben und die Proben wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde 1 Vol. 1:1 Phenol/Chloroform zugegeben und 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit 1 Vol. 1:1 Phenol/Chloroform versetzt. Die Zentrifugation erfolgte bei 10000 rpm für 10 Minuten. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,2 Vol. 3 M Natriumacetat und 0,6 Vol. Isopropanol versetzt. Die Fällung erfolgte über mindestens 2 Stunden (bis zu über Nacht) bei -20 °C. Anschließend wurde für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 100 ml TE-Puffer aufgenommen und die Probe bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert, um Ethanol-Reste vollständig zu entfernen. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei +4 °C.

DNA-Extraktionspuffer	100 mM	Tris/HCl pH 8,0
	50 mM	EDTA
	500 mM	NaCl
	10 mM	Mercaptoethanol (direkt vor Gebrauch zugeben)
T <sub>50</sub> E <sub>10</sub> -Puffer	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA pH 8,0
TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA pH 8,0

## 2 Vorgehensweise mit Bakterien

### 2.1 *Escherichia coli*-Stämme

**Tabelle IV 2.1:** In der vorliegenden Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Organismus	Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i>	Dh5 $\alpha$	F- deoR recAI endAI hsdR1(r <sub>k</sub> - m <sub>k</sub> +) supE44 1-thi gyrA96 relAI
<i>E. coli</i>	XL1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI q Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )
<i>E. coli</i>	DB3.1	F- gyrA462 endA1 (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm <sup>r</sup> ) xyl-5 $\Delta$ leu mtl1

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

#### 2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Für eine Über-Nacht-Kultur wurden *E. coli*-Bakterien mit Hilfe eines Zahnstochers entweder von einer Agar-Platte oder aus einer Glycerin-Kultur in ein Kulturröhrchen mit 3 ml LB-Medium überimpft, dem gegebenenfalls das zur Selektion entsprechende Antibiotikum zugegeben wurde. Die Kulturen wurden über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C und ca. 250 rpm inkubiert.

Über-Nacht-Kulturen wurden in der Regel für die Plasmidisolierung verwendet. In einigen Fällen wurde die Kultur am folgenden Tag für die Herstellung einer Glycerin-Kultur verwendet. Zu diesem Zweck wurde 500  $\mu$ l Kultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und Glycerin (Endkonzentration 25 %) zugegeben. Die Bakterien-Kulturen wurden zunächst in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80 °C eingefroren.

LB-Medium nach Luria-Bertani (1l)	10 g	NaCl
	5 g	Hefe-Extrakt
	10 g	Trypton
	ad 1 l	bidest. Wasser
		pH 7,5

Das Medium wurde vor der Verwendung autoklaviert und nach dem Abkühlen wurden die entsprechenden Antibiotika zugesetzt. Im Normalfall waren dies 50 $\mu$ g/ml Ampicillin oder 100  $\mu$ g/ml Kanamycin.

#### 2.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml einer frischen *E. coli*-Über-Nacht-Kultur angeimpft. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 180 rpm bis zu einem OD<sub>600</sub>-Wert von 0,5 bis 0,6 kultiviert. Danach

erfolgte eine Inkubation für 10 min auf Eis. Die Zellen wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen bei 4000 rpm für 10 min bei 4° C sedimentiert (Sorvall Multifuge L-R, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10 ml eisgekühlter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung vollständig durch Schütteln resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert und das Sediment in 2 ml eisgekühlter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Daraufhin wurde 1 ml einer Glycerinlösung (45%) hinzugegeben und durchmischt. Je 200 µl wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden die in Tabelle IV 2.1 aufgeführten *E. coli*-Stämme verwendet. Die kompetenten Zellen wurden zuvor bei -80 °C gelagert und vor Beginn der Transformation auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 50–100 ng Plasmid eines Ligationsansatzes mit 50-100 µl kompetenter Zellen vorsichtig vermischt und für 20 min auf Eis belassen. Nach einer kurzzeitigen Hitzeschockbehandlung der Zellen (45 s bei 42 °C) wurden sie für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen mit 250 µl SOC-Medium bei 37 °C für 1h mit 225 rpm geschüttelt, bis sie auf LB-Agar-Platten, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielten, ausgestrichen wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und transformierte Bakterien durch die entsprechende Resistenz selektiert.

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
LB-Nähragar	1 %	NaCl
	1 %	Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	1,5 %	Agar
		pH 7,5

Kolonien transformierter Bakterien dienen zur Isolierung von Plasmid-DNA, indem jeweils eine Übernachtskultur angezogen und diese wie beschrieben behandelt wurde. Nachfolgend wurde die Plasmid-DNA durch Restriktionsspaltung und elektrophoretische Auftrennung charakterisiert.

### 2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels Plasmid-Mini-Präparation

Dem verwendeten Verfahren zur Gewinnung von Plasmid-DNA liegt ein alkalischer Aufschluss der Bakterien zugrunde. Aus dem Lysat lässt sich die bakterielle genomische DNA selektiv durch Erniedrigung des pH-Wertes ausfällen, so dass im Überstand nur die Plasmid-DNA verbleibt. Proteine werden auf diese Weise ebenfalls entfernt.

Von einer Bakterienkultur, die über Nacht in LB-Nährmedium unter Schütteln (150-200 rpm) bei 37 °C gewachsen war, wurden 1,5 ml entnommen und in einem Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur 30 sek. bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Bakterien-Pellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 und unter leichtem Schwenken wurden die Zellen innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Hinzufügen von 300 µl Puffer P3 und 15 min Inkubation auf Eis wurden genomische DNA und Proteine durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm sedimentiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 700 µl Isopropanol aus dem Überstand präzipitiert. Um störende Salze zu entfernen, wurde das Präzipitat mit 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde entweder in bidest. Wasser oder TE-Puffer gelöst. Um etwaige Ethanol-Reste zu entfernen, wurde das geöffnete Eppendorf-Gefäß für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Plasmide wurden bei -20 °C aufbewahrt.

P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA, pH 8,0 RNase A
P2 (Lysepuffer)	200 mM 1 %	NaOH SDS
P3 (Neutralisationspuffer)	3 M	Kaliumacetat pH 5,5

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

### 3.1 Die Hefestämme SY1 und W303

In der vorliegenden Arbeit wurden die *S. cerevisiae*-Stämme SY1 und W303 verwendet (siehe Tabelle IV 3.1).

Mit Hilfe von SY1 wurde die homologe Rekombination zum Austausch des Replikationsursprungs des Plasmids pGREG505-CA durchgeführt. Der Stamm W303 wurde zur funktionellen Untersuchung verschiedener Aquaporine mittels Stopped-Flow-Spektrophotometrie verwendet.

**Tabelle IV 3.1:** In der vorliegenden Arbeit verwendete Hefe-Stämme.

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

### 3.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefestämmen erfolgte entweder auf YPD-Vollmedium-Agar-Platten, die 2 % Glukose enthielten, oder im entsprechenden Flüssig-Medium. Dabei wurde bei der Kultivierung auf Agar-Medium ein Verdünnungsausstrich mit Hilfe einer sterilen Impföse angefertigt. Die Inkubation der Agar-Platten erfolgte bei 30 °C für 2 bis 3 Tage im Inkubator.

Zum Ansetzen einer Über-Nacht-Kultur wurden 3 ml YPD-Flüssigmedium in einem Kulturröhrchen mit einer Hefekolonie unter sterilen Bedingungen angeimpft und bei 225 rpm und 30 °C inkubiert.

Im Fall von transformierten Hefestämmen wurde an Stelle des YPD-Mediums SC-Selektionsmedium verwendet (-ura, -ura/-leu oder -leu). Die Selektion der transformierten Hefestämme konnte dadurch erfolgen, dass erfolgreich transformierte Hefen die Defizienz zur Synthese von Uracil bzw. Leucin mit Hilfe der entsprechenden auf den Plasmiden vorliegenden Selektionsmarkern komplementieren konnten.

YPD-Medium	1 %	Hefeextrakt
	2 %	Pepton
	2 %	Glukose
	1,5 %	Agar (im Fall von YPD-Agar-Medium)
SC-Medium	0,5 %	Ammoniumsulfat
	0,17 %	Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren/Ammoniumsulfat
	2 %	Glukose bzw. Galaktose
	1,15 g	Aminosäure-Mix pH 6,0
	1,5 %	Agar (im Fall von SC-Agar-Medium)

Die Medien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert (20 min, 121 °C).

Aminosäure-Mix	0,005 %	Aspartat	0,01 %	Adenin
	0,005 %	Histidin	0,01 %	Arginin
	0,005 %	Isoleucin	0,01 %	Cystein
	0,005 %	Methionin	0,01 %	Leucin
	0,005 %	Phenylalanin	0,01 %	Lysin
	0,005 %	Prolin	0,01 %	Threonin
	0,005 %	Serin		
	0,005 %	Tyrosin		
	0,005 %	Valin		

### 3.3 Herstellung einer *S. cerevisiae*-Dauerkultur

Für die dauerhafte Lagerung von Hefezellen wurden Dauerkulturen hergestellt. Dazu wurden in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß ein Volumen Hefe-Über-Nacht-Kultur mit dem gleichen Volumen einer 40 % Glycerinlösung vermischt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

### 3.4 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen mittels Lithiumacetat

Für die Transformation von Hefen wurde eine 25 ml Hefekultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 kultiviert und anschließend für 5 min bei 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 8 ml LiAc/TE-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Sediment in 250 µl LiAc/TE-Lösung aufgenommen und für eine Stunde bei 30 °C und 75 rpm geschüttelt. Danach konnten die kompetenten Hefen entweder direkt transformiert werden oder in 0,1 M LiAc/TE-Lösung mit 15 % Glycerin aufgenommen und bei -80 °C gelagert werden.

LiAc/TE-Lösung	100 mM	Lithiumacetat
	10 mM	Tris/HCl
	1 mM	EDTA, pH 8,0

### 3.5 Homologe Rekombination *in vivo* in *S.cerevisiae*

Lineare DNA-Fragmente können in *Saccharomyces cerevisiae* sehr effizient eine Rekombination stimulieren. Dies kann unter anderem dazu genutzt werden, DNA-Fragmente nach einer Restriktion *in vivo* in der Hefezelle in ein linearisiertes Plasmid zu rekombinieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet um den Hefe-Replikationsursprung ARS/CEN des Plasmids pGREG505-CA gegen einen 2µ-Ursprung auszutauschen. Die angewandte Methode basierte auf Oldenburg et al. (1997). Der Replikationsursprung 2µ wurde mittels PCR amplifiziert, um die 2µ-Sequenz mit den Rekombinationssequenzen zu versehen. Als Matrize wurde das Plasmid pYESDest52 (Invitrogen) verwendet. Die Primer bestanden insgesamt aus 64 bp; sie waren unterteilt in 24 bp, die homolog zum Replikationsursprung waren und 40 bp, die homolog zu den *upstream* bzw. *downstream* Regionen der Rekombinations-Insertionsstelle des pGREG505-CA-Plasmids waren. Es wurden 100 ng linearisiertes Plasmid in einem molaren Verhältnis von 1:6 Plasmid zu Insert eingesetzt und Hefezellen des Stammes SY1 damit transformiert und entsprechend kultiviert. Die erhaltenen Klone wurden in einer Plasmid-Isolierung eingesetzt. Da die Ausbeute einer Plasmid-Isolierung aus Hefe meist gering ist, wurden *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid transformiert und nach einer Plasmid-Isolation aus den Bakterien konnte das Rekombinationsprodukt analysiert werden.

### 3.6 Transformation von *S. cerevisiae* mittels Lithiumacetat-Methode

Um kompetente Hefezellen zu transformieren, wurden zu 100 µl kompetenter Hefen 50 µl Heringssperma, 1 µl Plasmid-DNA (1µg/µl) und 600 µl PEG/LiAc/TE-Lösung gegeben. Das Heringssperma wurde zuvor 10 min bei 100 °C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Hefezellen wurden für 30 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Der anschließende Hitzeschock wurde bei 42 °C für 15 min durchgeführt. Danach wurden die Zellen für 3 min auf Eis gehalten. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 500 rpm wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 300 µl TE-Puffer resuspendiert. Jeweils 150 µl der Hefen wurden zur Selektion auf einer Agar-Selektions-Platte ausgestrichen. Die Hefen wurden für drei bis vier Tage bei 30 °C inkubiert.

PEG/LiAc/TE-Lösung (10ml)	40%	50% PEG
	1 M	10 M LiAc
	1 M	10 M TE

### 3.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die Methode zur Plasmid-DNA-Isolierung aus Hefe beruht auf einer klassischen Phenol-Chloroform-Extraktion, bei der sich die Nukleinsäuren in der oberen, wässrigen Phase anreichern, während Proteine denaturiert werden und sich in der unteren organischen bzw. in der Interphase (Grenzschicht zwischen oberer und unterer Phase) sammeln.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde eine Hefe-Über-Nacht-Kultur angefertigt. Je 2 ml der Kultur wurden in ein steriles 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 14000 rpm 5 sec. in einer Tischzentrifuge (Z160M Hermle) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mittels kurzem vortexen resuspendiert. Den Zellen wurden 300 µl Extraktionspuffer, 300 µl einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung und 0,3 g Säure-behandelte Glaskügelchen (Ø 0,5 mm) hinzugegeben. Danach wurden die Proben für 5 min mit Hilfe eines Vortexers durchmischt. Anschließend wurde bei 10000 rpm für 5 min zentrifugiert und die obere, wässrige Phase abgenommen. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem identischen Volumen an Isopropanol überschichtet und gemischt. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte bei -80 °C für 30 min. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm wurde der Überstand verworfen und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde luftgetrocknet und in 20 µl bidest. Wasser aufgenommen.

Extraktionspuffer	2 %	Triton X-100
	1 %	SDS
	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA

---

Phenol-Chloroform-Lösung	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1
--------------------------	--

---

### 3.8 Induktion der Protein Expression transformierter *S. cerevisiae*-Zellen

Die Hefezellen wurden mit Vektoren (pYES-DEST52, pYES2/CT (Invitrogen) oder pGREG505 (Euroscarf), siehe Anhang) transformiert, die unter anderem einen Galaktose-induzierbaren Promotor besitzen. Aus diesem Grund konnte die Proteinexpression durch die Anzucht der Hefen in Galaktose-haltigem Medium erfolgen.

Dazu wurden zunächst mit einer Einzelkolonie 20 ml SC-Medium (-ura, -ura/-leu oder -leu), das 2 % Glukose enthielt, angeimpft und über Nacht (12 -14 h) bei 30 °C und 225 rpm kultiviert. Die Zellen wurden am Morgen bei 3000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und in 10 ml sterilem bidest. Wasser aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in 8 ml sterilem bidest. Wasser aufgenommen und die OD<sub>600</sub> einer 1:20 Verdünnung bestimmt. Es wurden hieraus 20 ml SC-Medium (-ura, -ura/-leu oder -leu), das 2 % Galaktose enthielt, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 angeimpft und bis zum Zeitpunkt der optimalen Protein-Expression schüttelnd kultiviert.

### 3.9 Protoplastierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Der Zellwandabbau der *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Bertl et al. (1998). Dazu wurden 10 ml einer Hefekultur bei 300 rpm und für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 6 ml Puffer I resuspendiert und für 15 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 6 ml Puffer II, sowie ca. 2 mg Zymolyase 20T und 100 mg BSA. Danach wurden die Zellen bei 30 °C für 45 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 300 rpm und für 3 min wurde der Überstand verworfen und die sedimentierten Hefe-Protoplasten in 5 ml Puffer III resuspendiert. Die Effizienz der Protoplastierung konnte am Mikroskop überprüft werden.

Puffer I	50 mM 0,2 %	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2 mit KOH β-Mercaptoethanol
Puffer II	50 mM 2,4 M 0,2 %	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2 mit KOH Sorbitol β-Mercaptoethanol
Puffer III	1,8 M 50 mM 5 mM 10 mM	Sorbitol NaCl CaCl <sub>2</sub> Tris/HCl, pH 8,0

### 3.10 Bestimmung der Größe von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten

Die Bestimmung der Protoplasten-Größe wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen einer Über-Nacht-Kultur protoplastiert und wie in Abschnitt IV 3.9 beschrieben in Puffer III aufgenommen. Ein Aliquot der protoplastierten Zellen wurde in eine Thoma-Zähl-Kammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Von den Protoplasten wurden mit einer Digitalkamera (Canon EOS300D) Bilder aufgenommen und digital gespeichert. Mit der Software Photoshop (Adobe) wurde anschließend die Größe der Protoplasten bestimmt.

### 3.11 Beladen von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen mit Fluorescein-Bisacetat

Um CO<sub>2</sub>-Permeabilitäts-Messungen mit Hilfe der „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie durchführen zu können, mussten die Hefe-Zellen mit Fluorescein-Bisacetat beladen werden. Dies erfolgte nach Bertl und Kaldenhoff (2007). Dafür wurden 20 ml Hefekultur bei 2300 rpm für 3 min sedimentiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Hefen wurden mit sterilem bidest. Wasser gewaschen, indem das Sediment darin resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde. Das Sediment wurde in 5 ml Ladepuffer aufgenommen. Danach wurden die Zellen für 15 bis 30 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Sobald eine intensive Gelbfärbung der Zellen vorlag, wurden sie bei 2300 rpm für 3 min sedimentiert und anschließend zweimal mit 5 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen. Schließlich konnten die Hefezellen in 3 ml Inkubationspuffer aufgenommen werden.

Ladepuffer	50 mM 5 mM 50 µM	HEPES/NaOH, pH 7,0 2-deoxy-D-Glukose Fluorescein-Bisacetat
Inkubationspuffer	25 mM 75 mM	HEPES/NaOH, pH 7,0 NaCl pH 6,0

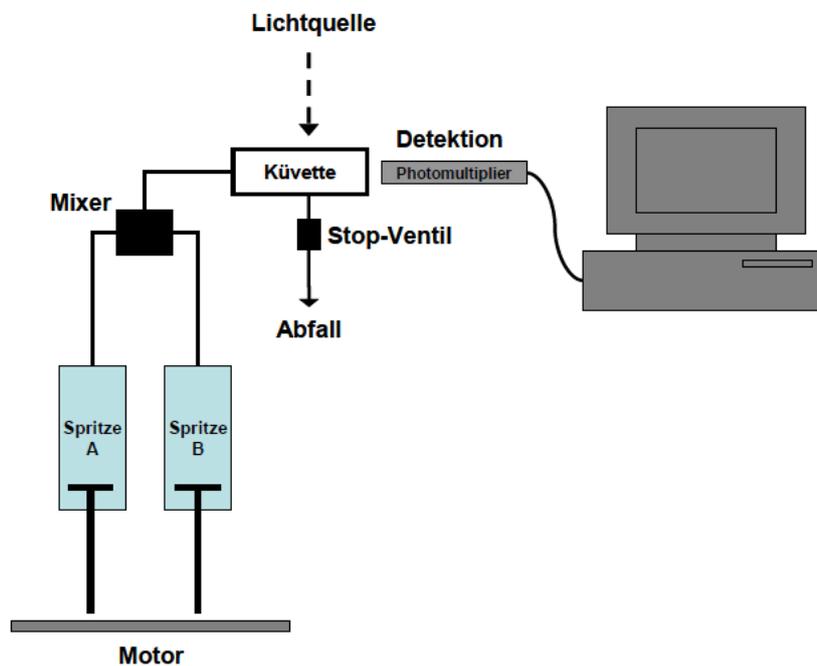
### 3.12 Messung von Wasser- und CO<sub>2</sub>-Permeabilitätskoeffizienten der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* mittels „Stopped Flow“-Spektrometrie

#### 3.12.1 „Stopped-Flow“-Spektrometrie

Die Grundlage eines „Stopped-Flow“-Experiments ist das schnelle Mischen zweier oder mehrerer Lösungen und die sofortige spektrometrische Beobachtung der Reaktion.

Die hier verwendete Apparatur der Firma BioLogic besteht aus zwei funktionellen Einheiten, der Mischeinheit (SFM 300) und der Detektionseinheit (MOS250, siehe Abbildung IV 3.1 ). Für die Messung bei verschiedenen Temperaturen war die

Mischeinheit an einen Thermostaten angeschlossen. Die Mischeinheit besteht aus zwei Spritzen mit motorbetriebenen und computergesteuerten Stempeln. Die Ausgänge der Spritzen sind durch einen hoch effizienten Mischer miteinander verbunden. Der Mischer ist wiederum mit einer Küvette verbunden. Die zwei Reaktions-Lösungen in den Spritzen werden während eines „Stopped-Flow“-Experiments vermischt und in die Küvette geleitet. Ein Ventil am Ausgang der Küvette registriert den Fluss des Reaktions-Gemisches aus der Küvette heraus. Daraufhin wird das Ventil geschlossen und der Antrieb der Spritzen wird gestoppt. Der Fluss des Reaktions-Gemisches in der Küvette kommt zum Erliegen und die Reaktion der beiden Lösungen kann detektiert werden.



**Abbildung IV 3.1:** Schematische Darstellung der „Stopped-Flow“-Apparatur. Die Mischeinheit bestehend aus Spritze A und B ist durch einen Mixer mit der Detektionseinheit verbunden. In der Detektionseinheit wird die Reaktion in der Küvette durch die Veränderung der Intensität der Fluoreszenz oder des Streulichtes durch einen Photomultiplier wahrgenommen. Der Photomultiplier ist mit einem Computer verbunden, wodurch die Änderungen in der Streulicht- bzw. Fluoreszenz-Intensität aufgezeichnet werden können.

Von einer Lichtquelle wird Licht einer bestimmten Wellenlänge in die Küvette geleitet und kann dort die Reaktion, z.B. durch Anregen eines Fluoreszenzfarbstoffes, visualisieren. Die Lichtsignale werden von einem Photomultiplier aufgenommen und in elektronische Signale umgewandelt. Die elektronischen Signale können am angeschlossenen Computer aufgezeichnet werden.

Die hier beschriebene Apparatur wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl zur Aufzeichnung von Schwellungskinetiken von Hefe-Protoplasten als auch von Ansäuerungskinetiken von Hefezellen verwendet. In beiden Fällen erfolgte die Detektion der Reaktion in einem Winkel von 90° zum einfallenden Licht. Der zeitliche

Verlauf der Streulicht-Intensität bzw. der Ansäuerung wird von einem mit dem Photomultiplier verbundenen Computer mit der Software Biokine aufgezeichnet.

### 3.12.2 Untersuchung der Wasserpermeabilität von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten

Die Hefezellen wurden vor Beginn der Messungen protoplastiert (siehe Abschnitt IV 3.9). Durch die Protoplastierung stellt die rigide Zellwand der Hefen keine Barriere für die Ausdehnung der Plasmamembran dar. Die Hefe-Protoplasten wurden im Anschluss an die Aufspaltung der Zellwand in Puffer III resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Spritze 3 der Mischeinheit gefüllt und mit dem hypoosmolaren Puffer IV, der sich in der Spritze 1 befand, in der Küvette gemischt. Durch die Mischung wurde ein osmotischer Gradient über die Plasmamembran der Protoplasten von 300 mOsmol angelegt. Dieser induzierte einen Wassereinstrom entlang des Gradienten in die Protoplasten, was zu einer Volumenzunahme führte. Das einfallende Licht streut an der Oberfläche der Protoplasten. Durch die Vergrößerung der Oberfläche der Protoplasten nimmt die Intensität des Streulichtes in einem Winkel von 90° zum einfallenden Licht ab. Diese Abnahme der Streulicht-Intensität wurde vom Photomultiplier detektiert.

Die Geschwindigkeit der Streulicht-Intensitäts-Abnahme wurde durch die Leitfähigkeit der Plasmamembran für Wasser bestimmt. Mit der Kinetik des Schwellens konnte im Anschluss der osmotische Permeabilitätskoeffizient der Plasmamembran berechnet werden.

Puffer III	1,8 M	Sorbitol
	50 mM	NaCl
	5 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
Puffer IV	1,2 M	Sorbitol
	50 mM	NaCl
	5 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0

Die Einstellungen an der „Stopped-Flow“-Apparatur waren wie folgt:

Licht	436 nm	
Temperatur	10 °C	
Aufnahmeraten	200 µs	4000 Datenpunkte
	2 ms	2000 Datenpunkte
	20 ms	1000 Datenpunkte
Filter	1 ms	

### 3.12.3 Berechnung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten ( $P_f$ ) der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten

Der osmotische Permeabilitätskoeffizient  $P_f$  dient als Maß für die Transportgeschwindigkeit ( $\text{cm s}^{-1}$ ) von Wassermolekülen über eine Membran.

Zur Bestimmung des  $P_f$  der Plasmamembran der *S.cerevisiae*-Protoplasten wurde eine Exponentialfunktion an die Schwellungskinetiken der Protoplasten angeglichen und die Geschwindigkeitskonstante  $k$  bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe des Algorithmus „simplex“ der Biokine Software. Die angegliche Exponentialfunktion hatte die Gleichung:

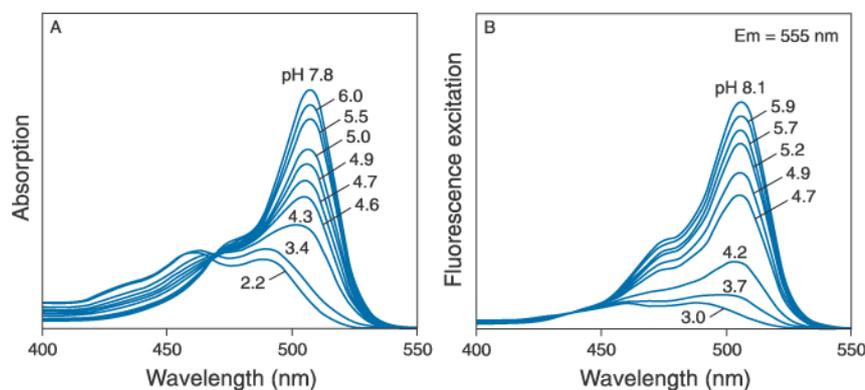
$$f(x) = at + b + \sum_{i=1}^n c_i e^{-k_i t} \quad (\text{IV 3.1})$$

Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  der angeglichenen Exponentialfunktion konnte nun neben dem molaren Volumen von Wasser ( $V_w$ ), dem Volumen ( $V_0$ ) und der Oberfläche ( $S_0$ ) der Protoplasten und der Konzentration der osmotisch wirksamen Teilchen im Außenmedium ( $c_{\text{out}}$ ) der Protoplasten zu Beginn der Messungen dazu genutzt werden, den osmotischen Permeabilitätskoeffizienten  $P_f$  mit folgender Formel (van Heeswijk und van Os, 1986) zu berechnen:

$$P_f = k \times \frac{V_0}{S_0 \times V_0 \times c_{\text{out}}} \quad (\text{IV 3.2})$$

### 3.12.4 Untersuchung der $\text{CO}_2$ -Permeabilität von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen

Für die Messung der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität von Hefe-Zellen wurden diese mit Fluorescein-Bisacetat beladen (siehe Abschnitt IV 3.11). Dieser Fluoreszenzfarbstoff zeigt nach einer Anregung bei 490 nm eine pH-abhängige Fluoreszenzintensität (Abbildung IV 3.2).



**Abbildung IV 3.2:** Absorptions- (A) und Emissionsspektrum (B) des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein-Bisacetat. Beide Spektren sind in ihren Maxima vom vorliegenden pH-Wert abhängig. (www.Invitrogen.com)

Die beladenen Zellen wurden im Inkubationspuffer aufgenommen und anschließend erfolgte mittels Stopped-Flow-Spektrometrie ein schneller Mischvorgang mit einem Puffer, der Natriumhydrogencarbonat enthielt (Mischpuffer). Kommt es zu einem Einstrom von CO<sub>2</sub> in die beladenen Zellen, erfolgt eine Änderung des pH-Wertes als Folge der Umsetzung von CO<sub>2</sub> zunächst zu Bicarbonat, katalysiert durch das Enzym Carboanhydrase, gefolgt von der Dissoziation zu Hydrogencarbonat und Proton. Die Änderung des pH-Wertes kann über die Änderung der Fluoreszenzintensität von Fluorescein-Bisacetat detektiert werden.

Dies erfolgte mit Hilfe der Biokine-Software am Computer, der mit der Stopped-Flow-Apparatur verbunden war. Für die Messung wurde ein 515 nm Cut-Off-Filter verwendet. Die weiteren Einstellungen bei den Messungen entsprachen den in Abschnitt IV 3.12.2 aufgeführten Einstellungen.

Inkubationspuffer	25 mM 75 mM	HEPES/NaOH, pH 7,0 NaCl pH 6,0
Mischpuffer	25 mM 75 mM	HEPES/NaOH, pH 7,0 Natriumhydrogencarbonat pH 6,0

### 3.12.5 Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten für CO<sub>2</sub> (P<sub>CO<sub>2</sub></sub>) der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten

Der Permeabilitätskoeffizient P<sub>CO<sub>2</sub></sub> dient als Maß für die Transportgeschwindigkeit (cm s<sup>-1</sup>) von CO<sub>2</sub>-molekülen über eine Membran.

Zur Bestimmung des P<sub>CO<sub>2</sub></sub> der Plasmamembran der *S.cerevisiae*-Zellen wurde eine Exponentialfunktion an die Kinetiken der pH-Wert-Änderung innerhalb der Zellen angeglichen und die Geschwindigkeitskonstante k bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe des Algorithmus „simplex“ der Biokine Software (IV 3.1).

Die Geschwindigkeitskonstante k der angeglichenen Exponentialfunktion konnte nun neben dem finalen intrazellulären pH-Wert (pH<sub>f</sub>=6,27, ermittelt durch N. Pede nach Slavik , 1982; Dissertation N. Pede), dem pKa-Wert für Kohlensäure sowie der Oberfläche (S) und des Volumens (V) einer Hefezelle dazu genutzt werden, den Permeabilitätskoeffizienten P<sub>CO<sub>2</sub></sub> mit folgender Formel (Yang et al., 2000) zu berechnen:

$$P_{CO_2} = k \times \frac{10^{(pH_f - pK_a)}}{\left(\frac{S}{V}\right)} \quad (\text{IV 3.3})$$

## 4 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

### 4.1 Restriktionsabbau von DNA

Zur Manipulation der DNA, z.B. zum Einbau verschiedener Gene in Plasmide, war es notwendig, die DNA mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen zu spalten. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Empfehlung der Hersteller (MBI Fermentas, NEB) gewählt. In einem Reaktionsansatz wurden pro  $\mu\text{g}$  DNA 2 Einheiten (U) Enzym eingesetzt, um einen vollständigen Abbau der DNA zu gewährleisten. Die Reaktion wurde für mindestens 1 h bei vorgeschriebener Temperatur, meist  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , inkubiert. Das Ergebnis der Spaltung wurde durch Elektrophorese überprüft.

### 4.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte in Agarosegelen unterschiedlicher Konzentrationen. Für Standardgele betrug diese 0,8 %. Als Puffersystem diente 1x TAE. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 5-10 Volt/cm durchgeführt. Zum Vergleich der Molekülgröße wurde parallel ein Standard (HyperLadderI, Bioline) mit Fragmenten definierter Größe aufgetrennt. Der Nachweis der DNA war durch die Fluoreszenz des im Gel enthaltenen DNA-interkalierenden Ethidiumbromids ( $0,05\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) unter UV-Licht möglich (Imagemaster, Pharmacia Biotech).

50x TAE	242 g	Tris, pH 8,0
	57,1 ml	Essigsäure
	0,5 M	EDTA, pH 8,0

### 4.3 Elution von DNA aus einem Agarosegel

DNA-Banden, die durch Einlagerung von Ethidiumbromid im UV-Licht ( $302\text{ nm}$ ) sichtbar gemacht wurden, wurden mitsamt der Agarose aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolation der DNA aus dem Gel wurde das NuclSpin Extract II Kit (MACHERY-NAGEL) entsprechend der Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Effizienz der Elution wurde durch erneute Auftrennung eines Anteils der gewonnenen DNA überprüft.

### 4.4 Sequenzieren von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Kettenabbruchmethode bei der Firma SEQLAB (Göttingen). Bei der Vorbereitung des Sequenzierungsansatzes, der aus dem DNA-Fragment und dem benötigten Primer bestand, wurden die Anweisungen von SEQLAB befolgt.

## 4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction, PCR)

### 4.5.1 Standardbedingungen der PCR

Die PCR dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Dabei wird eine DNA-Matrize mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus in vitro* repliziert. Als Matrize konnte dabei ein Plasmid oder genomische DNA verwendet werden.

Standard-PCR-Ansatz (25 µl)	2,5 µl 1 µl 0,5 µl 0,5 µl 0,5 µl 0,5 µl 5-10 ng ad 25 µl	10x Biotherm PCR-Puffer (10x) MgCl <sub>2</sub> (25 mM) dNTP-Mix (10 mM, 2,5 mM je Nukleotid) Primer sense (10 µM) Primer antisense (10 µM) Biotherm Taq-Polymerase (1U/µl) Matrize bidest. Wasser
--------------------------------	---	---

Folgendes Standard-PCR-Programm wurde verwendet:

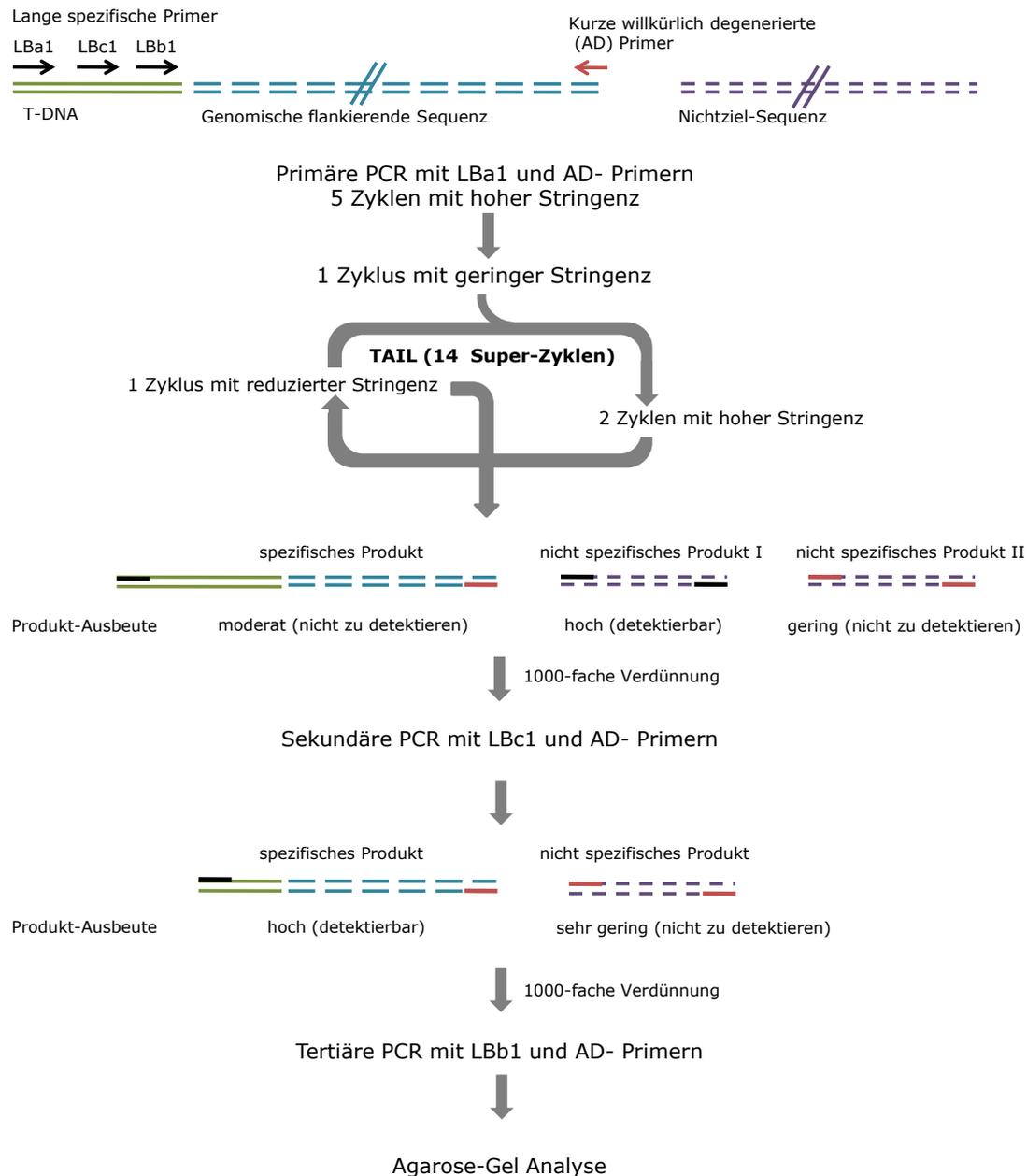
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Zyklen: Denaturierung	95 °C	20 sek
Primer-Anlagerung	T <sub>m</sub> -4 °C	20 sek
Elongation	72 °C	1 min pro 1000 bp
Finale Elongation	72 °C	5 min

Die Anzahl der Zyklen betrug 20 (Plasmid-DNA) bzw. 30 (genomische DNA).

### 4.5.2 TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR)

Mit Hilfe der TAIL-PCR kann man unbekannte Gen-Sequenzen identifizieren, die an eine bekannte Gen-Sequenz angrenzen. Diese Methode kann somit eingesetzt werden, um die flankierende Sequenz einer T-DNA Insertion im *Arabidopsis thaliana*-Genom zu amplifizieren. Die Durchführung erfolgte nach Liu et al. (1995).

Hierfür wurde in drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen drei spezifische „nested“-PCR-Primer (LBa1, LBc1, LBb1) und eine Mischung degenerierter Primer (AD1, AD2, AD3) verwendet. Die T-DNA spezifischen Primer konnten sich an der bekannten T-DNA-Sequenz anlagern, die degenerierten Primer irgendwo innerhalb der T-DNA-flankierenden Sequenz. Mit dieser Primer-Kombination kann man die Amplifikation spezifischer und unspezifischer PCR-Produkte über die Wahl der PCR-Bedingungen kontrollieren. Dies geschieht durch die Anwendung einer bestimmten Abfolge von Zyklen mit hoher und niedriger Stringenz (hoher bzw. niedriger Temperatur). Mit jeder PCR steigt die Ausbeute spezifischer Produkte, während die Menge an unspezifischen Produkten abnimmt. Nach der tertiären PCR können die spezifischen PCR-Produkte zur Sequenzierung gegeben werden. Das Prinzip der TAIL-PCR ist schematisch in Abbildung IV 4.1 dargestellt.



**Abbildung IV 4.1:** Schematische Darstellung der TAIL-PCR für die spezifische Amplifikation der genomischen, flankierenden Sequenz einer T-DNA-Insertion. Drei aufeinanderfolgende PCR Reaktionen werden durchgeführt, um die Zielsequenzen mit Hilfe der „nested“ T-DNA spezifischen Primer (schwarze Pfeile) auf der einen Seite und den AD Primern (roter Pfeil) auf der anderen zu amplifizieren. Eine oder mehrere Stellen innerhalb der flankierenden Sequenz können den AD Primern innerhalb eines Zyklus mit niedriger Temperatur (geringer Stringenz) für eine Anlagerung zur Verfügung stehen. Selbst wenn ein unspezifisches Produkt nur mit Hilfe der AD Primer entstanden ist, wird während des Zyklus mit hoher Stringenz das spezifische Produkt favorisiert amplifiziert. Dadurch wird das Zielmolekül im Verlauf der drei PCR Durchläufe amplifiziert. (Abbildung verändert nach Liu et al. 1995).

Folgende Ansätze und PCR-Programme wurden verwendet:

**Primäre TAIL-PCR**

Ansatz (20 µl)	20 ng	genomische DNA
	2 µl	Biotherm PCR-Puffer (10x)
	1,6 µl	dNTP-Mix (10 mM, 2,5 mM je Nukleotid)
	0,4 µl	LBa1 (10 µM)
	2 µl	AD1 (20 µM)
	3 µl	AD2 (20 µM)
	4 µl	AD3 (20 µM)
	1 U	Biotherm Taq-Polymerase
	ad 20 µl	Wasser

Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen	
1	93 °C	1min	5x	
2	95 °C	1 min		
3	94 °C	30 sek		
4	62 °C	1 min		
5	72 °C	2 min 30 sek		
6	94 °C	30 sek	12x	
7	25 °C	3 min		Rampe zu 72 °C in 3 min
8	72 °C	3 min		
9	94 °C	10 sek		
10	68 °C	1 min		
11	72 °C	2 min 30 sek		
12	94 °C	10 sek		
13	68 °C	1 min		
14	72 °C	2 min 30 sek		
15	94 °C	10 sek		
16	44 °C	1 min		
17	72 °C	2 min 30 sek		
18	72 °C	5 min		

**Sekundäre TAIL-PCR**

Ansatz (20 µl)	1µl	1:50 verdünntes primäres PCR-Produkt
	2 µl	Biotherm PCR-Puffer (10x)
	1,6 µl	dNTP-Mix (10 mM, 2,5 mM je Nukleotid)
	0,4 µl	LBc1 (10 µM)
	1,5 µl	AD1 (20 µM)
	2 µl	AD2 (20 µM)
	2,2 µl	AD3 (20 µM)
	1 U	Biotherm Taq-Polymerase
	ad 20 µl	Wasser

Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	94 °C	3 min	12x
2	94 °C	10 sek	
3	64 °C	1 min	
4	72 °C	2 min 30 sek	
5	94 °C	10 sek	
6	64 °C	1 min	
7	72 °C	2 min 30 sek	
8	94 °C	10 sek	
9	44 °C	1 min	
10	72 °C	2 min 30 sek	
11	72 °C	7 min	

### Tertiäre PCR

Ansatz (20 µl)	1 µl	1:50 verdünntes sekundäres PCR-Produkt
	2 µl	Biotherm PCR-Puffer (10x)
	1,6 µl	dNTP-Mix (10 mM, 2,5 mM je Nukleotid)
	0,4 µl	LBc1 (10 µM)
	1,5 µl	AD1 (20 µM)
	2 µl	AD2 (20 µM)
	2,2 µl	AD3 (20 µM)
	1 U	Biotherm Taq-Polymerase
	ad 20 µl	Wasser

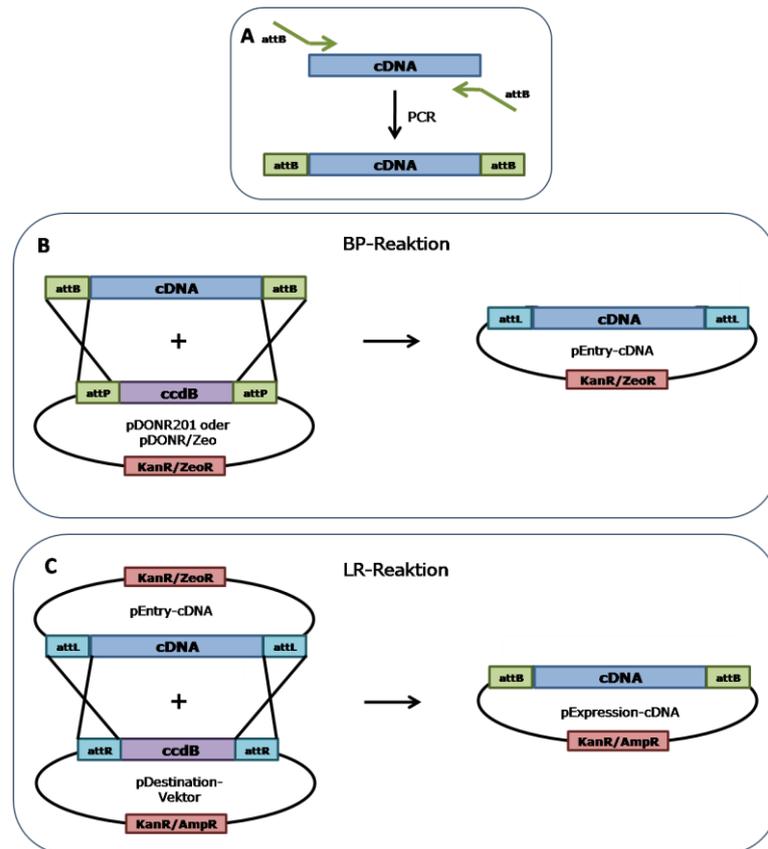
Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	94 °C	1 min	20x
2	44 °C	1 min	
3	72 °C	2 min 30 sek	
4	72 °C	5 min	

## 4.6 Klonierung von DNA

### 4.6.1 Klonierung von PCR-Produkten mit dem Gateway®-System

Das Prinzip der Klonierung von PCR-Produkten mit Hilfe des Gateway®-Systems (Integrase und Excisionase aus dem Bakteriophagen  $\lambda$  und dem Integration Host Factor aus *E. coli*, Invitrogen) beruht auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Phagen  $\lambda$ . Dieser kann mit Hilfe von Rekombinationsenzymen seine DNA in das Genom von *E. coli* integrieren.

In einer PCR-Reaktion wird das zu klonierende cDNA-Fragment mit den Rekombinations-Erkennungssequenzen (attB-Sequenzen) für die Integrase fusioniert (siehe Abbildung IV 4.2 A). In der folgenden homologen Rekombination (BP-Reaktion) zwischen den attB- und den attP-Rekombinationssequenzen des Donor-Vektors (pDONR201 (Invitrogen), siehe Anhang) wird das PCR-Produkt in den Donor-Vektor integriert (Abbildung IV 4.2 B). Der so entstandene „Eingangs-Vektor“ enthält in Folge der homologen Rekombination die Rekombinations-Erkennungssequenzen (attL) der Excisionase.



**Abbildung IV 4.2:** Prinzip der Klonierung von PCR-Produkten mit dem Gateway<sup>®</sup>-System. (A) Die cDNA erhält die Erkennungssequenzen der Rekombinase in einer PCR mit überhängenden Primern. (B) Herstellung des Eingangs-Vektors: durch die Rekombinationsreaktion des PCR-Produktes mit einem Donor-Vektor an homologen Erkennungssequenzen (attB-attP) wird das PCR-Produkt in den Donor-Vektor kloniert. (C) Herstellung des Ziel-Vektors: Durch die homologe Rekombination an den Erkennungssequenzen der Klonase-Enzyme wird die cDNA des Eingangs-Vektors in den Ziel-Vektor kloniert. (Abbildung modifiziert in Anlehnung an das Begleitheft des Herstellers)

Als negativen Selektionsmarker trägt der Donor-Vektor vor der BP-Reaktion zwischen den Erkennungssequenzen der Integrase ein „Killer-Gen“ (*ccdB*-Gen). Dieses Gen codiert für einen Inhibitor der bakteriellen DNA-Gyrase. Durch die Expression des Inhibitors wird die DNA-Replikation unterbrochen und die Bakterien sterben ab (Bernard und Couturier, 1992; Miki et al. 1992). Durch die Rekombination in der BP-Reaktion wird das *ccdB*-Gen durch das PCR-Produkt ersetzt.

Der Eingangs-Vektor dient nach der BP-Reaktion als Ausgangsverbindung für die Klonierung des PCR-Produkts in Expressions-Vektoren (Ziel-Vektoren) verschiedenster Organismen. In einer zweiten Rekombinationsreaktion (LR-Reaktion, Abbildung IV 4.2 C) zwischen den attL-Sequenzen des Eingangs-Vektors und den attR-Sequenzen des Ziel-Vektors wird das DNA-Fragment durch die Excisionase in den Ziel-Vektor integriert. Die Selektion erfolgt anschließend durch die Antibiotika-Resistenzen der Eingangs- und Ziel-Vektoren sowie durch den Austausch des *ccdB*-Gens durch das PCR-Produkt.

#### 4.6.2 Generierung von cDNA mit flankierenden attB-Erkennungssequenzen

Mit Hilfe einer PCR wurde die cDNA der Aquaporine mit den spezifischen Rekombinations-Erkennungssequenzen attB1 und attB2 für die weitere Verwendung mit der Gateway®-Technologie erzeugt. Die benötigten Oligonukleotid-Sequenzen wurden mit der Software VectorNTI™ für die PCR-Reaktion erstellt. Diese enthielten die genspezifischen Sequenzen und die attB-Erkennungssequenzen für die Integrase.

**Tabelle IV 4.1:** Primer für die Fusion einer cDNA mit Erkennungssequenzen (gelb) für das Gateway®-System

attB1-sense-Primer 5'-3'

GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACC-genspezifische-Sequenz

attB2-antisense-Primer 5'-3'

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT-genspezifische-Sequenz

Die PCR erfolgte unter Standardbedingungen (siehe Abschnitt 4.5.1). Im Anschluss konnte das PCR-Produkt über ein Agarose-Gel gereinigt und für die BP-Reaktion verwendet werden.

#### 4.6.3 Klonierung des PCR-Produktes in einen Expressionsvektor mit Hilfe des Gateway®-Systems

Das PCR-Produkt wurde in der BP-Reaktion in den Donor-Vektor (pDONR201, Invitrogen) integriert. In der folgenden LR-Reaktion wurde die cDNA der Aquaporine für die Expression in Hefe in den Vektor pYES-DEST52 (Invitrogen) kloniert. Die Reaktionsansätze wurden wie im Begleitheft des Gateway®-Cloning-Kits (Invitrogen) vorbereitet und zur Integration des PCR-Produktes wurde ebenfalls wie beschrieben verfahren.

#### 4.7 Ligation von DNA-Fragmenten in binäre Vektoren

Das molare Verhältnis zwischen linearisiertem Vektor und einem restringierten DNA-Fragment beeinflusst die Effizienz einer Ligationsreaktion. Für eine optimale Ligation wurde ein molares Verhältnis von 5:1 von DNA-Fragment zu Vektor-DNA empfohlen. Die Stoffmenge (in pmol) eines beliebigen DNA-Moleküls kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$DNA[pmol] = \frac{2 \times 10^{-6} \times DNA[\mu g]}{DNA[bp] \times 660 Da} \quad (IV 4.1)$$

Ligationsansatz (20µl)	100 ng	linearisierte Vektor-DNA
	X ng	DNA-Fragment
	2 µl	10x T4 Ligase Puffer
	2 U	T4 DNA-Ligase
	ad 20 µl	Wasser

Das Reaktionsgemisch wurde kurz gemischt und für ca. 5 s zentrifugiert. Der Ansatz wurde anschließend über Nacht bei 16 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnte der Ansatz für die Transformation von *E. coli* weiter verwendet.

**4.8 „Southern Blot“-Analyse von DNA**

**4.8.1 Herstellung einer DIG-UTP-markierten cDNA-Sonde**

Mit DIGoxigenin markiertes Uracil-Tri-Phosphat (DIG-11-UTP) wurde während einer PCR in die cDNA-Sonde eingebaut. Es wurde dabei exakt nach dem Protokoll der Firma Roche vorgegangen.

PCR-Ansatz zur Markierung von cDNA-Sonden (50µl)	5 µl	Biotherm PCR-Puffer (10x)
	1 µl	dNTP-Mix (10mM, 2,5 mM je Nukleotid)
	5 µl	DIG-11-UTP (10mM)
	2,5 µl	Primer
	2,5 µl	Primer
	50 ng	Plasmid (Matrize)
	1 µl	Biotherm Taq-Polymerase
	ad	50 µl Wasser

Die PCR-Ansätze wurden in einem Thermocycler nach dem Standard-Protokoll vervielfältigt. Als Kontrolle wurde außerdem eine identische Reaktion ohne DIG-11-UTP angesetzt und beide in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. War der Einbau von DIG-11-UTP in die Sonde erfolgreich, so lief die DNA-Bande aufgrund seiner sperrigeren Struktur ein kleines Stück oberhalb der Kontroll-Bande.

**4.8.2 Behandlung der Agarose-Gele für Southern Blots**

Für einen Southern Blot ist die gute Auftrennung der zuvor restringierten DNA im Agarosegel von großer Bedeutung. Daher wurde die DNA über einen Zeitraum von 8-10 Stunden bei 15 Volt in 0,7 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Damit später die DIG-markierte Sonde an die DNA binden konnte, musste anschließend eine Denaturierung der DNA durchgeführt werden. Hierfür wurde das Gel gut bedeckt zweimal für 15 min in Denaturierungslösung und anschließend zweimal für 30 min in Neutralisierungslösung auf einem Schüttler bei RT inkubiert.

Denaturierungslösung	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Neutralisierungslösung	1,5 M	NaCl
	1,0 M	Tris/HCl, pH 8,0

**4.8.3 Transfer der DNA auf eine Nitrozellulose-Membran (Southern Blot)**

Das hier verwendete Verfahren zum Transfer von DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran wird als „Southern Blot“ bezeichnet. Über Kapilarkräfte wurde die DNA vom

Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran BA 83 Cellulosenitrat, Schleicher und Schüll) transferiert.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel luftblasenfrei auf einer mit Transferpuffer (10x SSC) getränkten Membran von der Größe des Gels und einem Stapel saugfähigen Papiers (Höhe ca. 15 cm) so angeordnet, dass die Unterseite des Gels die Oberfläche der Membran berührt. Die Verbindung zwischen Gel und Pufferreservoir wurde durch das Auflegen eines Streifen Filterpapiers (Whatman 3MM) von der Breite des Gels und etwa 30 cm Länge hergestellt. Der Transfer erfolgte über Nacht vertikal von oben nach unten.

Die DNA wurde anschließend auf der Membran durch 120 mJoules UV-Licht (UVStratalinker 2400, Stratagene) fixiert.

10x SSC-Puffer	1,5 M	NaCl
	0,15 M	Na 3-Citrat, pH7,0

#### 4.8.4 Hybridisierung von Southern Blots mit einer DIG-markierten Sonde

Die Hybridisierung der Membran mit einer DIG-11-UTP markierten Sonde erfolgte nach dem Protokoll der Firma Roche mit den von ihnen vertriebenen Reagenzien. Für die Prähybridisierung wurde die Membran in ein 50 ml Falkonröhrchen überführt und mit 10 ml „DIG easy hyb“ (Roche) in einem Rotor bei 42 °C für mindestens zwei Stunden inkubiert.

Für die Hybridisierung wurden 10-20 ng der Sonde pro ml Hybridisierungslösung zu 100 µl „DIG easy hyb“ in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, 10 min bei 95 °C denaturiert, danach für 2 min auf Eis gestellt und anschließend zur Membran in das Falkonröhrchen gegeben.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (16 h) bei 42 °C im Rotor. Die Membran wurde am nächsten Tag unter Schütteln zweimal 15 min in 2x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal 15 min in 0,5x SSC/0,1 % SDS bei 62 °C im Wasserbad gewaschen. Dabei ist zu beachten, dass der Waschpuffer auf 62 °C vorgewärmt sein sollte. Der letzte Waschschrift erhöhte die Stringenz, d.h. nur die spezifisch gebundenen Sonden blieben an der Membran haften, unspezifisch gebundene Sonden wurden abgewaschen.

#### 4.8.5 Nachweis der DNA durch Chemilumineszenz

Direkt im Anschluss an das Waschen der Membran wurde selbige für 5 min in DIG-Waschpuffer bei RT äquilibriert. Die Membran wurde zwei Stunden in je 10 ml DIG-Blocking-Puffer (ca. 10 ml auf 10 cm<sup>2</sup> Membran) bei RT im Rotor geblockt. Vor der Zugabe des Anti-DIG-Antikörpers (Roche) wurde dieser für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, von der Oberfläche 1 µl der Antikörperlösung abgenommen und mit 10 ml DIG-Blocking-Puffer in einem 50 ml Falkonröhrchen vermischt. Die Membran wurde zu der Lösung in das Falkonröhrchen gegeben und für 1 Stunde im Rotor bei

RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min in DIG-Waschpuffer auf einem Schüttler gewaschen.

DIG-Waschpuffer	0,1 M	Maleinsäure
	0,15 M	NaCl
	0,3 %	Tween (frisch zugeben)
		pH 7,5

DIG-Blocking-Puffer	1:10 verdünnt mit DIG-Waschpuffer ohne Tween
---------------------	--

Vor der Detektion wurde die Membran 5 min in DIG-Detektionspuffer gewaschen und auf einer ebenen Unterlage auf eine Folie gelegt. Der Anti-DIG-Antikörper ist an eine alkalische Phosphatase gekoppelt. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase (AP) wurde CDP-Star<sup>®</sup> (Applied Biosystems) verwendet. Die AP kann CDP-Star<sup>®</sup> dephosphorylieren, wobei instabile Anionen entstehen, die sofort zerfallen und Licht emittieren. Die so entstandene Chemilumineszenz kann detektiert werden.

Bevor das Substrat auf die Membran gegeben wurde, wurde zunächst 1 ml eines in Detektionspuffer AssayB 1:20 verdünnten Signalverstärkers, Nitro-BlockII<sup>™</sup> (Applied Biosystems), auf der Membran gleichmäßig verteilt und für 5 min bei RT inkubiert. Nachdem die Membran kurz in AssayB gespült wurde, wurde das Substrat auf der Membran verteilt. Dazu wurde das CDP-Star<sup>®</sup> 1:50 mit (AssayB) (1ml Lösung pro 100 cm<sup>2</sup> Membran). Nach 5 min wurde die CDP-Star<sup>®</sup>-Lösung mit einem Filterpapier abgesaugt und die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die auf dem Southern Blot vorhandenen Signale wurden mittels eines Chemilumineszenz-Detektionsgeräts der Firma BIO-RAD (ChemiDoc XRS System) aufgenommen. Die Einstellungen wurden je nach Situation und Signalstärke angepasst und entsprechend modifiziert. Zum kurzfristigen Aufbewahren wurde die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt und bei 4 °C gelagert.

AssayB	200 mM	Tris/HCl, pH9,8
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>

## 5 Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)

### 5.1 Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial

Die RNA-Isolation erfolgte mittels RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Es wurde genau nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen, die RNA wurde im letzten Schritt in 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Die RNA-Menge und -Reinheit wurde photometrisch bestimmt, indem die Absorption (A) bei 260, 230 und 280 nm gemessen wurde. Reine RNA mit einer geringen Proteinverunreinigung sollte bei dem Verhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  einen Wert von 1,8-2,0 haben. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

## 5.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Um RNA in einem „northern Blot“ analysieren zu können, musste diese zunächst in einem denaturierenden Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Hierfür wurden 10 µg der Gesamt-RNA mit einem Volumen des RNA-Gel-Ladepuffers versetzt und bei 65 °C für 10 min denaturiert. Nach einer Inkubation von 2 min auf Eis wurden die RNA-Proben aufgrund ihrer Größe in einem 1 % denaturierenden 1x MEN-Agarose-Formaldehyd-Gel bei einer Stromspannung von 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss konnte das typische rRNA-Bandenmuster unter UV-Licht (Imagemaster, Pharmacia Biotech) aufgrund der Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden. Klare und voneinander zu unterscheidende Banden sprechen für die Qualität der RNA-Präparation.

10x MEN-Puffer	200 mM 10 mM 50 mM	MOPS (Morpholinopropan-sulfursäure) EDTA, pH 8,0 Natriumacetat	
RNA-Gel-Ladepuffer	0,72 ml 0,16 ml 0,26 ml 0,18 ml 0,10 ml 0,08 ml 3 µl	Formamid 10x MEN 37 % Formaldehyd bidest. Wasser 80 % Glycerin 2 % Bromphenol 1 % Ethidiumbromid	
MEN-Agarose-Gel (35ml)	0,35 g 3,5 ml 30 ml 2,7 ml	Agarose 10x MEN bidest. Wasser. 37 % Formaldehyd	in der Mikrowelle lösen und auf 50 °C abkühlen

## 5.3 „Northern Blot“-Analyse von RNA

Der Transfer von RNA auf eine Nitrozellulose-Membran wurde im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der RNA mit Hilfe der „Kapillar-Blot-Technik“ durchgeführt. Dabei unterschieden sich der Aufbau des Blots, die verwendeten Reagenzien sowie das durchgeführte Protokoll nicht von dem des „Southern Blots“ (siehe Abschnitt IV 4.8). Das RNA-Gel wurde direkt im Anschluss an die Elektrophorese wie beschrieben auf die Nitrozellulose-Membran gelegt und durch die großen Mengen an Transferpuffer (10x SSC), die durch das Gel und die Membran hindurchtraten, wurde die RNA auf die Membran übertragen. Alle folgenden Schritte unterschieden sich nicht von denen, die bei einer „Southern-Blot“-Analyse durchgeführt wurden. Es wurde eine DNA-DIG-UTP-markierte Sonde eingesetzt.

## 6 Verfahren mit Proteinen

### 6.1 Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterial

Für die Extraktion von Proteinen wurden 200 mg Blattmaterial in 500 µl Extraktionspuffer und einer Spatelspitze Sand fein gemörsert. Das Homogenat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 3 min bei 3000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, so dass der Sand und Zellreste sedimentierten. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend konnte eine Proteinbestimmung (siehe Abschnitt 6.2) durchgeführt werden.

### 6.2 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen wurde durch den Einsatz des Farbstoffs "Coomassie Brilliant Blue G-250" (CBBG) bestimmt (Bradford, 1976). Der Farbstoff bindet spezifisch an die Aminosäuren Arginin, Tryptophan, Tyrosin, Histidin und Phenylalanin. An den Aminosäuren gebunden, liegt der Farbstoff in der anionischen Form vor und hat ein Absorptions-Maximum für Licht der Wellenlänge von 595 nm. In freier ungebundener Form 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.

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

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

Polyacrylamidgele bestehen aus Acrylamid, Bisacrylamid, N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS). Durch die Polymerisierung von Acrylamid entstehen lineare Acrylamid-Polymere. Erst mit der Vernetzung der Acrylamid-Polymere 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 Acrylamid-Radikal kann mit einem weiteren Acrylamidmolekül (Monomer und Polymer) weiterreagieren. TEMED wirkt als Katalysator der Polymerisation, indem es die Radikalbildung des APS erleichtert und dabei selbst ein stabiles Radikal darstellt.

Die Elektrophorese erfolgt in einem von U.K. Laemmli (1970) eingeführten diskontinuierlichen Tris/HCl-Tris/Glycin-Puffersystem. Ein weitporiges Sammelgel überschichtet ein engmaschiges Trenngel. Durch die Ausbildung eines Feldstärkegradienten im Sammelgel erfolgt zu Beginn der Elektrophorese eine

Aufkonzentrierung verschiedener Proteinklassen. Beim Auftreffen auf das Trenngel erfahren die Proteine einen hohen Reibungswiderstand, was zur weiteren Zonenschärfung führt. Im Trenngel wirkt nun auf alle Proteine die gleiche Feldstärke, so dass ausschließlich die Größe für die Wandergeschwindigkeit ausschlaggebend ist. Die Gele wurden in einem „Gel Casting System“ (Biometra) angefertigt. Durchgeführt wurde die Elektrophorese-Kammer der Fa. Hoefer (Mighty Small II SE 250), in die wahlweise ein oder zwei Gele eingespannt wurden konnten. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem 4X konzentrierten Probenpuffer versetzt, so dass er einfach konzentriert vorlag. Anschließend wurden sie 10 min bei 65 °C erhitzt und konnten dann aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 30 mA/Gel durchgeführt. Sobald die Front des Markierungsfarbstoffs Bromphenolblau des Gel-Ladungspuffers aus dem Gel ausgetreten war, wurde die Auftrennung beendet.

Sammelgel (4 %)	4 %	40 % Acrylamid/Bisacrylamid
	125 mM	0,5 M Tris/HCl, pH 6,6
	0,1 %	10 % SDS
	0,05 %	40 % APS
	0,08 %	TEMED
	0,25 x 10 <sup>-3</sup> %	1 % Bromphenolblau
Trenngel (12 %)	12 %	40 % Acrylamid/Bisacrylamid
	375 mM	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
	0,1 %	10 % SDS
	0,033 %	TEMED
	0,05 %	40 % APS
Laufpuffer	129 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
	25 mM	Tris/HCl pH 8,3
4x Probenpuffer	250 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	8 %	SDS
	40 %	Glycerin
	200 mM	DTT
	0,01 %	Bromphenolblau

## 6.4 „Western-Blot“-Analyse von Proteinen

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

Im Anschluss an die Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die aufgetrennten Proteine in einer Tank-Blot-Apparatur (BIO-RAD) auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran BA 83 Cellulosenitrat, Schleicher und Schüll) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 80 V für zwei Stunden. Während des Transfers betrug die Temperatur des Transferpuffers 10 °C.

Transferpuffer	10 mM	CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure), pH 8,0 (mit frischer NaOH-Lösung) Methanol
	10 %	

#### 6.4.2 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 RT eine einstündige Inkubation mit dem in Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min mit Waschpuffer, erfolgte die Inkubation mit dem alkalischen-Phosphatase-konjugierten sekundären Antikörper. Danach wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer für 10 min gewaschen und anschließend zweimal für 5 min mit Detektionspuffer AssayB behandelt.

Die Detektion erfolgte wie in Abschnitt IV 4.8.5 beschrieben mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits (Western-Star™ System, Applied Biosystems).

10x PBS-Puffer (1 l)	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	1x	PBS
	0,5 %	Tween20
	5 %	Magermilchpulver
Waschpuffer	1x	PBS
	0,5 %	Tween20
Detektionspuffer (AssayB)	200 mM	Tris/HCl, pH 9,8
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>

#### 6.5 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 ca. 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 Entfärbelösung 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

---

Entfärbelösung	15 mM	Kaliumhexacyanoferrat (III)
	50 mM	Natriumthiosulfat

---

# V Zusammenfassung

---

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die *Arabidopsis thaliana* Aquaporine AtPIP1;2 und AtPIP2;3 funktionell charakterisiert werden. Das besondere Interesse galt hierbei den seit langem untersuchten unterschiedlichen Leitfähigkeitscharakteristika für PIP1 und PIP2-Aquaporinen und ihrer physiologischen Bedeutung. Im Vergleich zur hohen Wasser-Leitfähigkeit von PIP2-Aquaporinen, sind PIP1-Aquaporine nahezu wasserundurchlässig. Im Gegensatz dazu können kleine, ungeladene Moleküle (Glycerin, Harnstoff, CO<sub>2</sub>) die Pore von PIP1-Aquaporinen passieren, die von PIP2-Aquaporinen jedoch nicht.

AtPIP1;2 und AtPIP2;3 wurden zunächst in einem Hefe-Expressionssystem mit Hinblick auf ihre Wasser- und Kohlendioxid-Leitfähigkeit untersucht. Dabei zeigte sich, dass AtPIP2;3 die Membranpermeabilität für Wasser signifikant erhöhen konnte, wohingegen AtPIP1;2 dies nicht vermochte. Im Gegensatz dazu war AtPIP1;2 in der Lage, die Diffusion von CO<sub>2</sub> über die Hefe-Plasmamembran zu erleichtern, AtPIP2;3 jedoch nicht.

Die physiologische Relevanz dieser verschiedenen Aquaporin-Leitfähigkeiten wurde mit Hilfe von T-DNA-Insertionslinien untersucht. Die verwendeten *A. thaliana*-Linien atpip1;2-1 und atpip2;3-1 konnten als homozygot charakterisiert werden. Linie atpip1;2-1 enthält lediglich die Insertion im AtPIP1;2-Gen. In Linie atpip2;3-1 findet sich neben der Insertion im AtPIP2;3-Gen eine weitere in einer nicht codierenden Region des 3. Chromosoms. Bei beiden Linien führt die T-DNA-Insertion zum Verlust der entsprechenden Aquaporin-mRNA.

Die Untersuchung der hydraulischen Leitfähigkeit von *Arabidopsis*-Wurzeln der beiden Insertionslinien ergab, dass im Vergleich zur Kontroll-Linie die Abwesenheit von AtPIP2;3 keinen Einfluss auf die hydraulische Leitfähigkeit hat. Dagegen scheint AtPIP1;2 eine Komponente des symplastischen Transportweges von Wasser in der Wurzel zu sein, da atpip1;2-1-Wurzeln eine deutliche Reduktion der hydraulischen Leitfähigkeit aufwiesen.

Auch im Blatt konnte eine physiologische Bedeutung von AtPIP1;2 nachgewiesen werden, da Messungen des pflanzlichen Gaswechsels der Linie atpip1;2-1 eine signifikant verringerte photosynthetische Assimilationsrate und stomatäre Leitfähigkeit ergaben. Als Ursache hierfür konnte die starke Reduktion der Mesophyll-Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub> (g<sub>m</sub>) identifiziert werden. Hier kommt vermutlich die im heterologen Expressionssystem nachgewiesene molekulare CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von AtPIP1;2 zum Tragen. Für Linie atpip2;3-1 konnten bezüglich der Gaswechsel-Analysen keinerlei Unterschiede zu den Kontroll-Pflanzen festgestellt werden.

Die Ergebnisse weisen auf eine Funktion von AtPIP1;2 sowohl in der Wasser-Aufnahme durch die Wurzeln als auch in der Erleichterung der CO<sub>2</sub>-Diffusion im Blatt hin. Hingegen konnte basierend auf den durchgeführten Untersuchungen nicht festgestellt werden, inwieweit AtPIP2;3 von physiologischer Bedeutung ist.



## VI Literaturverzeichnis

---

- Agre, P., King, L.S., Yasui, M., Guggino, W.B., Ottersen, O.P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., und Nielsen, S.** (2002). Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* **542**, 3-16.
- Aharon, R., Shahak, Y., Winger, S., Bendov, R., Kapulnik, Y., und Galili, G.** (2003). Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* **15**(2), 439-47.
- Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjøvall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., Johansson, U., und Kjellbom, P.** (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol. Biol.* **59**, 469-484.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmermann, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, c., Heller, C.M., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geratl, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, C., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., und Ecker, J.R.** (2003). Genome-Wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Amberg, A.C., Daniel, J.B., und Strathern, J.N.** *Methods in Yeast Genetics 2005 Edition. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual.*
- Arnon, D.I.** (1949). Copper Enzymes in isolated Chloroplasts. Polyphenyloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24** (1), 1-15.
- Bernard, P., and Couturier, M.** (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**, 735-745.
- Bertl, A., Bihler, H., Reid, J.D., Kettner, C., und Slayman, C.L.** (1998). Physiological characterization of the yeast plasmamembrane outward rectifying K<sup>+</sup> channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J. Membr Biol* **162**, 67-80.
- Bertl, A., und Kaldenhoff, R.** (2007). Function of a separate NH<sub>3</sub>-pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat. *FEBS Letters* **581** (28), 5413-5417.
- Biela, A., Grote, K., Otto, B., Hoth, S., Hedrich, R., und Kaldenhoff, R.** (1999). The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J* **18**, 565-57
- Blank, M.E., und Ehmke, H.** (2003). Aquaporin-1 and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>Cl<sup>-</sup> transporter-mediated transport of CO<sub>2</sub> across the human erythrocyte membrane. *Journal of Physiology* **550**, 419-429

- Block, M.A., Douce, R., Joyard, J., und Rolland, N.** (2007). Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the Zytosol. *Photosynthesis Res.* **92**, 225-244.
- 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. *J Exp Bot* **56**, 113-121
- Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A., and Agre, P.** (1999). Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* **68**, 425-458.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.-T., Sorieul, M. van den Dries, N., Maurel, C.** (2005). Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression. *Plant Physiology* **139**, 790-805.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R., and Chrispeels, M.J.** (2000). Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol* **122**, 1025-1034.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M.J., and Jung, R.** (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol* **125**, 1206-1215.
- Cooper, G. J., Zhou, Y., Bouyer, P., Grichtchenko, I.I., und Boron, W.F.** (2002). Transport of volatile solutes through AQP1. *J Physiol* **542**, 17-29.
- Daniels, M.J., Mirkov, T.E., und Chrispeels, M.J.** (1994). The Plasma Membrane of *Arabidopsis thaliana* Contains a Mercury-Insensitive Aquaporin That Is a Homolog of the Tonoplast Water Channel Protein TIP. *Plant Physiol* **106**, 1325-1333.
- Dean, R.M., Rivers, R.L., Zeidel, M.L., Roberts, D.M.** (1999). Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry* **38**, 347-353.
- de Groot, B.L., and Grubmuller, H.** (2001). Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* **294**, 2353-2357.
- de Groot, B.L., Frigato, T., Helms, V., and Grubmuller, H.** (2003). The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *J Mol Biol* **333**, 279-293.

- Deng, Y., Ye, J., und Mi, H. (2003).** Effects of low CO<sub>2</sub> on NAD(P)H dehydrogenase, a mediator of cyclic electron transport around photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Cell Physiol.* **44**, 534-540.
- Dolferus, R. (1991).** Isolation of DNA and RNA from *Arabidopsis thaliana*. In: *Bio Methods*, Negrutia, J., Gharti-Chhetri, G.B. eds, Birkhäuser Verlag 4, 131-146
- Endeward, V., und Gros, G. (2005).** Low carbon dioxide permeability of the apical epithelial membrane of guinea-pig colon. *J Physiol* **567**, 253-265.
- Endeward, V., Musa-Aziz, R., Cooper, G.J., Pelletier, M.F., Virkki, L.V., Supuran, C.T., King, L.S., Boron, W.F., und Gros, G. (2006).** Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO<sub>2</sub> transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB Journal* **20**, 1974-1981.
- Endeward, V., und Gros, G. (2009).** Extra- and intracellular unstirred layer effects in measurements of CO<sub>2</sub> diffusion across membranes—a novel approach applied to the mass spectrometric 18O technique for red blood cells. *J Physiol* **587**, 1153-67.
- Ethier, G.J., Livingston, N.J., Harrison, D.L., Black, T.A. and Moran, J.A. (2006).** Low stomatal and internal conductance to CO<sub>2</sub> versus Rubisco deactivation as determinants of the photosynthetic decline of ageing evergreen leaves. *Plant, Cell and Environment* **29**, 2168-2184.
- Evans, J.R., von Caemmerer, S., Setchell, B.A., und Hudson, G.S. (1994).** The relationship between CO<sub>2</sub> transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with reduced content of Rubisco. *Aust. J. Plant Physiol.* **21**, 475-495.
- Evans, J.R., und von Caemmerer, S. (1996).** Carbon Dioxide Diffusion inside Leaves. *Plant Physiol* **110**, 339-346.
- Fang, X., Yang, B., Matthay, M.A., und Verkman, A.S. (2002).** Evidence against aquaporin-1-dependent CO<sub>2</sub> permeability in lung and kidney. *J Physiol* **542**, 63-69.
- Farquhar, G.D., von Caemmerer, S.V., und Berry, J.A. (1980).** A biochemical-model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* **149**, 78-90.
- Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M., und Chaumont, F. (2004).** Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* **16**, 215-228.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., und Sharkey, T.D. (2004).** Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C<sub>3</sub> plants. *Plant Biology* **6**, 269-279.

- Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Hanson, D.T., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., McDowell, N., Medrano, H. und Kaldenhoff, R.** (2006). Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in vivo. *Plant J* **48**(3), 427-39.
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L.J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., and Stroud, R.M.** (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**, 481-486.
- Fujiyoshi, Y., Mitsuoka, K., de Groot, B.L., Philippsen, A., Grubmuller, H., Agre, P., and Engel, A.** (2002). Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 509-515.
- 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 J* **18**, 577-587.
- Gomes, D., Agasse, A., Thiébaud, P., Delrot, s., Gerós, H., und Chaumont, F.** (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochemica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1788**, 1213-1228.
- Hanba, Y. T., Shibaska, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I., und Katsuhara, M.** (2004). Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO<sub>2</sub> conductance and CO<sub>2</sub> assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* **45**(5), 521-9.
- Hevesy, G., Hofer, E., and Krogh, A.** (1935). The permeability of the skin of frogs to water as determined by D<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O. *Skand. Arch. Physiol.* **72**, 199.
- Holm, L.M., Jahn, T.P., Moller, A.L., Schjoerring, J.K., Ferri, D., Klaerke, D.A., and Zeuthen, T.** (2005). NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* **450**, 415-428.
- Hub, J. S., und de Groot, B. L.** (2006). Does CO<sub>2</sub> permeate through aquaporin-1?. *Biophys J* **91**(3), 842-8.
- Huttner, D., und Bar-Zvi, D.** (2003). An improved, simple, hydroponic method for growing *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter* **21**, 59-63.
- Ishikawa, F., Suga, S., Uemura, T., Sato, M.H., and Maeshima, M.** (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **579**, 5814-5820.
- Javot, H., Lauvergeat, V., Santoni, V., Martin-Laurent, F., Guclu, J., Vinh, J., Heyes, J., Franck, K.I., Schaffner, A.R., Bouchez, D., and Maurel, C.** (2003). Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell* **15**, 509-522.

- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjoval, S., Fraysse, L., Weig, A.R., 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.
- Johanson, U., and Gustavsson, S.** (2002). A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol Biol Evol* **19**, 456-461.
- Kaldenhoff, R., Kölling, A., Meyers, J., Karmann, U., Ruppel, G., und 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.
- Kaldenhoff, R., Grote, K., Zhu, J.-J., und Zimmermann, U.** (1998). Significance of plasmalemma aquaporins for watertransport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **14**, 121-128.
- Kaldenhoff, R., und Fischer, M.** (2006a). Functional aquaporin diversity in plants. *Biochemica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1758**, 1134-1141.
- Kaldenhoff, R., und Fischer, M.** (2006a). Aquaporins in plants. *Acta Physiol* **187**, 169-176.
- Kammerloher, W., Fischer, U., Piechottka, G.P., and Schaffner, A.R.** (1994). Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J* **6**, 187-199.
- Kozono, D., Ding, X., Iwasaki, I., Meng, X., Kamagata, Y., Agre, P., und Kitagawa, Y.** (2003). Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin. AqpM from methanothermobacter marburgensis. *J Biol Chem* **278** (12), 10649-56.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., und Whittier, R.F.** (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Journal* **8**, 457-463.
- Loque, D., Ludewig, U., Yuan, L., and von Wieren, N.** (2005). Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole. *Plant Physiol* **137**, 671-680.
- Long, S.P., und Bernacchi, C.J.** (2003). Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J of experimental Botany* **54**, 2393-2401.

- Ludewig, F., und Sonnewald, U.** (2000). High CO<sub>2</sub>-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. *FEBS Lett.* **11**, 19-24.
- Ma, J.F., 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.
- Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G.B., Nobel, P.S. und Chrispeels, M.J.** (2002). Plasma Membrane Aquaporins Play a Significant Role during Recovery from Water Deficit. *Plant Physiol* **130**, 2101-2110.
- Miki, T., Park, J.A., Nagao, K., Murayama, N., and Horiuchi, T.** (1992). Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. *J Mol Biol* **225**, 39-52.
- Missner, A., Kügler, P., Antonenko, Y.N., und Pohl, P.** (2008a). Passive Transport across bilayer lipid membranes: Overton continues to rule. *PNAS* **105** (52), E123.
- Missner, A., Kügler, P., Saparov, s., Sommer, K., Mathai, J.C., Zeidel, M.L. und Pohl, P.** (2008b). Carbon Dioxide Transport through Membranes. *J Biol Chem* **283**, 25340-25347.
- Mizutani, M., Watanabe, S., Nakagawa, T., and Maeshima, M.** (2006). Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**, 1420-1426.
- Moshelion, M., Becker, D., Biela, A., Uehlein, N., Hedrich, R., Otto, B., Levi, H., Moran, N., and Kaldenhoff, R.** (2002). Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *Plant Cell* **14**, 727-739.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A., and Fujiyoshi, Y.** (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**, 599-605.
- Nakhoul, N. L., Davis, B.A., Romero, M.F., und Boron, W.F.** (1998). Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO<sub>2</sub> permeability of *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* **274**, C543-8.
- Nilson, S.E., und Assmann, S.M** (2007). The control of transpiration. Insights from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**, 19-27.
- Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S., und Paddon, C.** (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Research* **25**, 451-452.

- Park, J.H., und Saier, M.H.Jr.** (1996). Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol* **153**, 171-180.
- Pede, N.** (2008). Untersuchungen zur CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine im heterologen Hefesystem. Dissertation an der TU Darmstadt.
- Potvin, C., und Lechowicz, M.J.** (1990). The statistical analysis of ecophysiological response curves obtained from experiments involving repeated measures. *Ecology* **71** (4), 1389-1400.
- Prasad, G. V., Coury, L.A., Finn, F., und Zeidel M.L.** (1998). Reconstituted aquaporin 1 water channels transport CO<sub>2</sub> across membranes. *J Biol Chem* **273** (50), 33123-6.
- Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shachar-Hill, Y., and Bohnert, H.J.** (2002). From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0001.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., und Vivekanandan, M.** (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiol.* **161**, 1189-1202.
- Roelfsema, M.R., und Hedrich, R.** (2005). In the light of stomatal opening: new insights into the watergate. *New Phytologist* **167**, 665-691.
- Sakurai, J. Ishikawa, F., Yamaguchi, T., Uemura, M., und Maeshima, M.** (2005). Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1568-1577.
- Siefritz, F., Tyree, M.T., Lovisolo, 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.
- Siefritz, F., Otto, B., Bienert, G.P., van der Krol, A., und Kaldenhoff, R.** (2004). The plasma membrane aquaporin NtAQP1 is a key component of the leaf unfolding mechanism in tobacco. *The Plant Journal* **37**, 147-155.
- Slavik, J.** (1982). Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. *FEBS Lett* **140**, 22-26.
- Slavik, J.** (1983). Intracellular pH topography: determination by a fluorescent probe. *FEBS Lett* **156**, 227-230.
- Steudle, E., und Peterson, C.A.** (1998). How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* **49**, 775-788.
- Sui, H., Han, B.G., Lee, J.K., Walian, P., and Jap, B.K.** (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* **414**, 872-878.

- 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.
- Terashima, I., und Ono, K.** (2002). Effects of HgCl<sub>2</sub> on CO<sub>2</sub> dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO<sub>2</sub> diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiol* **43**, 70-78.
- Tyerman, S.D. Niemitz, C.M., und Bramley, H.** (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell and Environment* **25**, 173-194.
- Tyree, M.T., Patino, S., Bennink, J. und Alexander, J.** (1995). Dynamic measurements of root hydraulic conductance using a high-pressure flowmeter in the laboratory and field. *Journal of Exp Bot* **46**, 83-94.
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F., Kaldenhoff, R.** (2003). The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature* **425**, 734-737.
- Uehlein, N., Otto, B., Hanson, D.T., Fischer, M., McDowell, N., 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**(3), 648-657.
- van Heeswijk, M.P., and van Os, C.H.** (1986). Osmotic water permeabilities of brush border and basolateral membrane vesicles from rat renal cortex and small intestine. *J Membr Biol* **92**, 183-193.
- van Osten, J.-J., Wilkins, S., und Besford, R.T.** (1994). Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by high CO<sub>2</sub> is mimicked by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment* **17**, 913-923.
- von Caemmerer, S.** (2000). Biochemical models of leaf photosynthesis. Canberra, Australia, CSIRO Publishing.
- Von Caemmerer, S., Lawson, T., Oxborough, K., Baker, N.R., Andrews, T.J., und Raines, C.A.** (2004). Stomatal conductance does not correlate with photosynthetic capacity in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco. *J. Exp. Bot.* **55**, 1157-1166.
- Wallace, I.S., Choi, W.G., and Roberts, D.M.** (2006). The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1165-1175.
- Warren, C.R.** (2007). Stand aside stomata, another actor deserves centre stage: the forgotten role of the internal conductance to CO<sub>2</sub> transfer. *Journal of Exp Bot* **59**, 1475-1487.

- Yang, B., Fukuda, N., van Hoek, A., Matthay, M.A., Ma, T., und Verkman, A.S.** (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.
- Zelazny, E., Borst, J.W., Muylaert, M., Batoko, H., Hemminga, M.A., and Chaumont, F.** (2007). FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12359-12364.
- Zelazny, E., Micielica, U., Borst, J.W., Hemminga, M.A. und Chaumont, F.** (2009). An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;3 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *Plant Journal* **57**, 346-355.



# VII Anhang

---

## 1 Abkürzungsverzeichnis

-xg	-mal Erdbeschleunigung
$\mu$	Mikro
$A_N$	Netto-Photosyntheserate
AtPIP1;2	<i>Arabidopsis thaliana</i> Plasmamembrane Intrinsic Protein 1;2
AtPIP2;2	<i>Arabidopsis thaliana</i> Plasmamembrane Intrinsic Protein 2;2
AtPIP2;3	<i>Arabidopsis thaliana</i> Plasmamembrane Intrinsic Protein 2;3
AQP	Aquaporin
AQP1	Humanes Aquaporin 1
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
cDNA	copy DNA
$c_a$	atmosphärische CO <sub>2</sub> -Konzentration
$c_c$	Chloroplasten CO <sub>2</sub> -Konzentration
$c_i$	interne CO <sub>2</sub> -Konzentration in den Interzellularen
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
$g_m$	Mesophyll-Leitfähigkeit für CO <sub>2</sub>
$g_s$	stomatäre Leitfähigkeit für Wasser
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	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mOsmol	Milliosmolar
mRNA	englisch: messenger RNA
MS-Medium	Murashige und Skoog- Medium
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm

---

nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NIP	englisch: Nodulin26-like Intrinsic Protein
NtAQP1	<i>Nicotiana tabacum</i> Aquaporin 1
NtPIP2;1	<i>Nicotiana tabacum</i> Plasmamembrane Intrinsic Protein 2;1
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
P <sub>CO2</sub>	Permeabilitätskoeffizient für CO <sub>2</sub>
P <sub>f</sub>	osmotischer Permeabilitätskoeffizient
PIP	englisch: Plasmamembrane Intrinsic Protein
pmol	Picomol=10 <sup>-12</sup> mol
PPFD	englisch: photosynthetic photon flux density
ppm	englisch: parts per million
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	englisch: rounds per minute
s	Sekunde
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	englisch: Sodium Dodecylsulfate
SIP	englisch: small and basic Intrinsic Protein
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
T-DNA	Transfer-DNA des T <sub>i</sub> -Plasmids
TIP	englisch: Tonoplast Intrinsic Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	englisch: Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol.	Volumen

## 2 Primer

Name	Nukleotidsequenz	T <sub>m</sub> (°C)
<b>AD1</b>	5' (AGCT)TCGA(GC)T(AT)T(GC)G(AT)GTT 3'	42,7
<b>AD2</b>	5' (AGCT)GTCGA(GC)(AT)GA(AGCT)A(AT)GAA 3'	46,6
<b>AD3</b>	5' (AT)GTG(AGCT)AG(AT)A(AGCT)CA(AGCT)AGA 3'	45,3
<b>attB1-AtPIP1;2 (fwd)</b>	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGGAGATAGAACCATGGAAGGTAAAGAAGA AGA 3'	>75
<b>attB2-AtPIP1;2 (rev)</b>	5' GGGGACCACATTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT TAGCTTCTGGACTTGAATG 3'	>75
<b>AtPIP2;3_gateway s</b>	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTC G ATGGCTAAAGACGTGGAAGGACCTG 3'	60,5
<b>AtPIP2;3 gateway as (ohne Stop)</b>	5' GGGGACCACATTTGTACAAGAAAGCTGGGTC AACGTTGGCTGCACTTCTGAATGAAC 3'	60,8
<b>AtPIP2;3_attB2</b>	5' GGGGACCACATTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT TAAACGTTGGCTGCACTTCTGAATGAAC 3'	75,88
<b>Ca1_fw</b>	5'GGATTCATGGAATTGCAATCATCAGATGA3'	63,9
<b>Ca1_rev</b>	5'AAGCTTTCATACGGAAAGAGAAGGAGAAAG3'	64,0
<b>Lba1</b>	5' TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG 3'	64,0
<b>LBb1</b>	5' GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT 3'	65,8
<b>LBc1</b>	5' CGGAACCACCATCAAACAGGAT 3'	60,3
<b>NtPIP2_3Helix_as</b>	5' CCACCTAATGTGTTGTAGTAATGTT 3'	61,8
<b>NtPIP2_s_HindIII</b>	5'TAAGCTTATGTCAAAGGACGTGATTGAAG3'	62,4
<b>T-DNA_for</b>	5' ACTCCATGGCCTTTGATTCAGTGG 3'	62,7
<b>T-DNA_rev</b>	5' TGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGG 3'	62,7
<b>2μ_ORI_for</b>	5' GATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCAT GATAATAATGCTTATCGATGATAAGCTGTC AAAG 3'	69,9
<b>2μ_ORI_rev</b>	5' GAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCG CACATTTCCCCGAACCCATTGCGAATACC GCTTC 3'	76,19

### 3 Sequenzen

#### 3.1 Flankierende Sequenzen der T-DNA (in gelb Sequenz der T-DNA)

##### Linie atpip1;2-1

CGGCGNGTAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGGTGAAAAGAAAAACCACCCAG  
TACATTA AAAACGTCCGCAATGTGTTATTAATGTGTCCACCTGAAAGGTCATAACATACACAA  
ACACAGATTA AAAACATCTGCAAATCAAATGATTCCAAGCAGAACAAAGCTGGAAC TAACATCA  
AAGTCCCCCATTTACTGAGTTTGTA AACCTAATTTGTTCTGATTGAATCCTAACATGCTAA  
GATTTGAATTACGCTACCTAGCTAACACAGGATCTATATTCGAAATCGTTAGATCGGAGAAAC  
CAGTGA ACTTACCGGAGATACCAGCGGTGCAGTAGACGAGAGCGAAGATCATACCACCGAA  
AGCCCA

##### Linie atpip2;3-1

CGGCGGTGTAAGGCATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCAGTA  
CATTAAAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTCCACA ACTGAT  
AAAAATAAATACTA ACCGGAACGTGGGAGTCTCTAGCGTTGCGTTTGGGATCAGTAGCGGA  
GAAGACTGTGTAGACAAGCACGAATGTTCCGATGATCTCTGCCGCGAGTCCGGTGCCTGTAT  
TGTAGCCGTCAGCTAGAAAGTTGGCTCCTCCACCGTAATTAACATAGTGAGAGCTTTGAAAT  
GCCTTCACAAACCCA ACTCCACAAATAGCACCCAAACACTGAGCCACCATGTAAAGCACCGC  
CCTAATCAGC

#### 3.2 Sequenzen der tertiären TAIL-PCR (in gelb Sequenz der T-DNA)

##### Linie atpip1;2-1

NGGCGGGTAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCAGTA  
CATTAAAAACGTCCGCAATGTGTTATTAATGTGTCCACCTGAAAGGTCATAACATACACAAAC  
ACAGATTA AAAACATCTGCAAATCAAATGATTCCAAGCAGAACAAAGCTGGAAC TAACACCAA  
AGTCGATANNCGGTGNNTCGNT

##### Linie atpip2;3-1

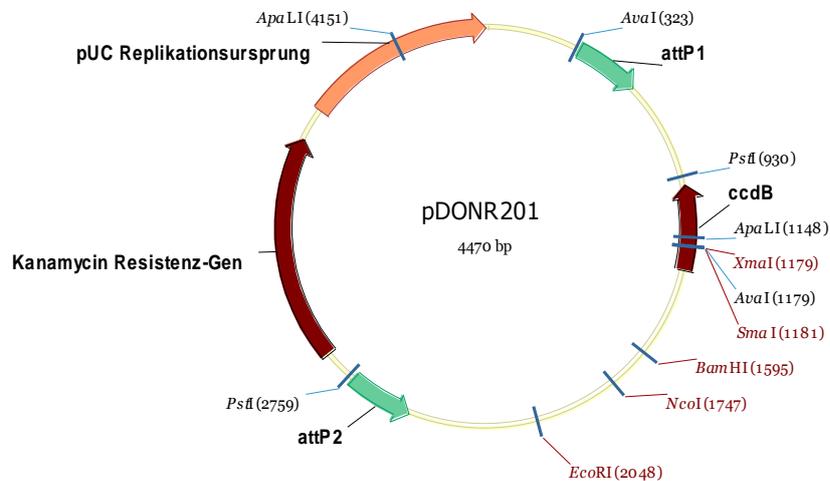
CGCGGGTAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCAGTAC  
ATTA AAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGCCAGATTGATTGATGAGTTATGTTATTATTG  
ACATATCTATCATTTACTCAATACACTCACACGTAGAAAAAGTTGACTTCGAAAATATTGGTT  
AAAAGAACTACAAAATTTGTTTTACTCACAAAGTTGATAATGTCCAAAACATAATTTTTACG  
ATTGTTTTATTTGGACAAAATAAAAATCATTGTTCTACCGAAAAATAAATAAATAAATTCATTC  
TCATTGTCTTAATTTTTTTACGAAATTATGAAGTGGGAAATGGATCAAGTAAGTTTCACAAGT  
GGGAGTCCAA

### 3.3 Sequenz der T-DNA-Sonde für die Southern Blot-Analyse

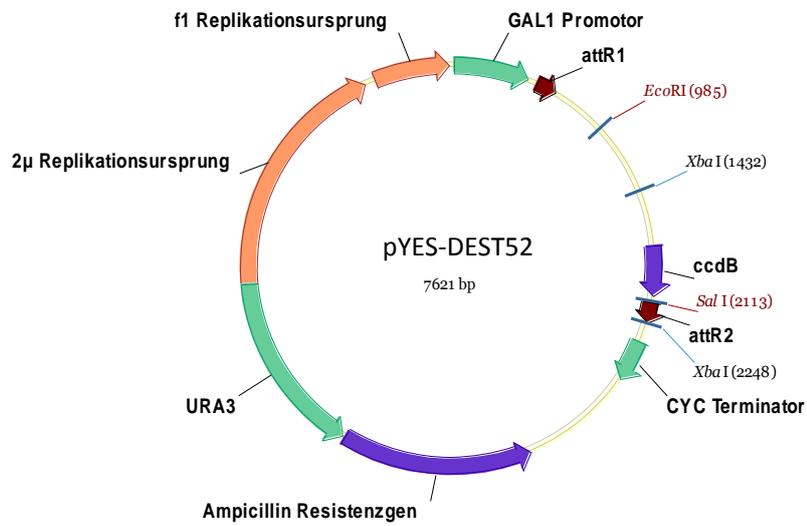
ACTCCATGGCCTTTGATTCAGTGGGAACTACCTTTTTAGAGACTCCAATCTCTATTACTTGCC  
 TTGGTTTGTGAAGCAAGCCTTGAATCGTCCATACTGGAATAGTACTTCTGATCTTGAGAAATA  
 TATCTTTCTCTGTGTTCTTGATGCAGTTAGTCTGAATCTTTTGACTGCATCTTTAACCTTCTT  
 GGGAAGGTATTTGATTTCTGGAGATTATTGCTCGGGTAGATCGTCTTGATGAGACCTGCTG  
 CGTAAGCCTCTCTAACCATCTGTGGGTTAGCATTCTTTCTGAAATTGAAAAGGCTAATCTGGG  
 GACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTT  
 ATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCC  
 TAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAA  
 CCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATT  
 GGGCCAAAGACAAAAGGGCGACATTCAACCGATTGAGGGAGGGAAGGTAAATATTGACGGA  
 AATTATTCATTAAGGTGAATTATCACCGTCACCGACTTGAGCCATTTGGGAATTAGAGCCAG  
 CAAAATCACCGTAGCACCA

## 4 Vektorkarten

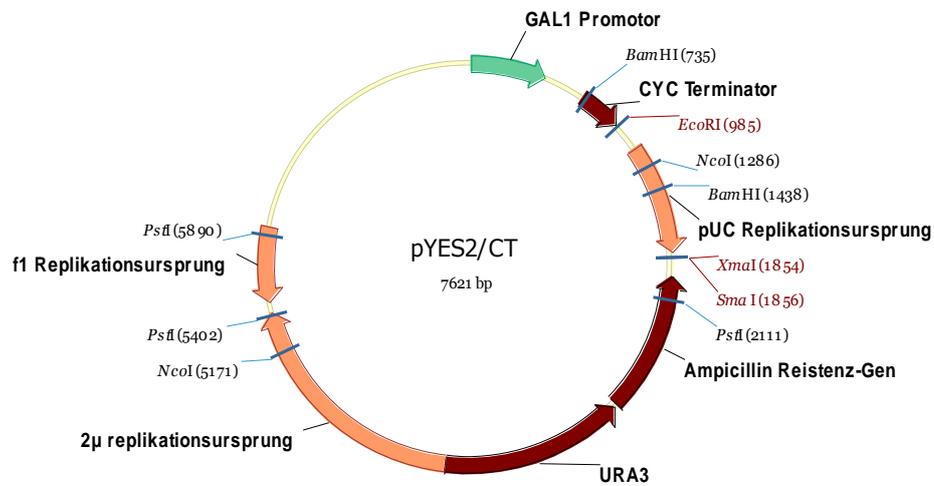
### 4.1 pDONR201 (Entry-Vektor für Gateway-Klonierung, Invitrogen)



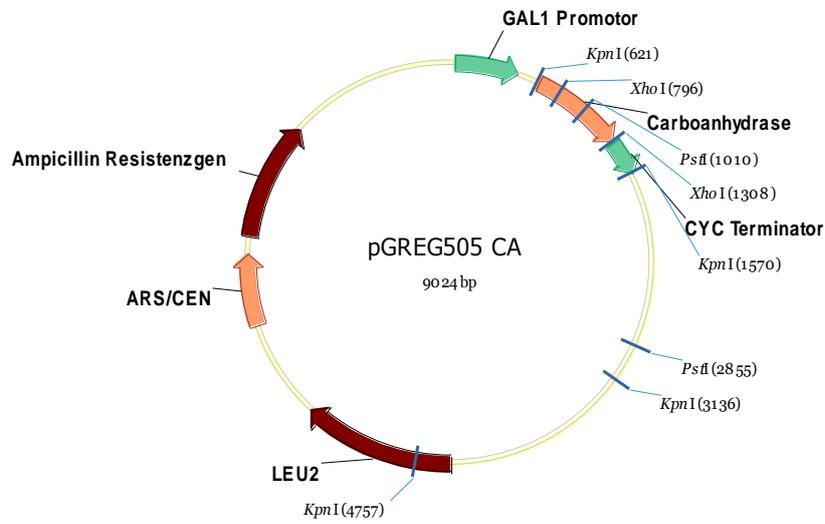
#### 4.2 pYES-DEST52 (Destination Vektor für Gateway-Klonierung zur Protein-Expression in Hefe, Invitrogen)



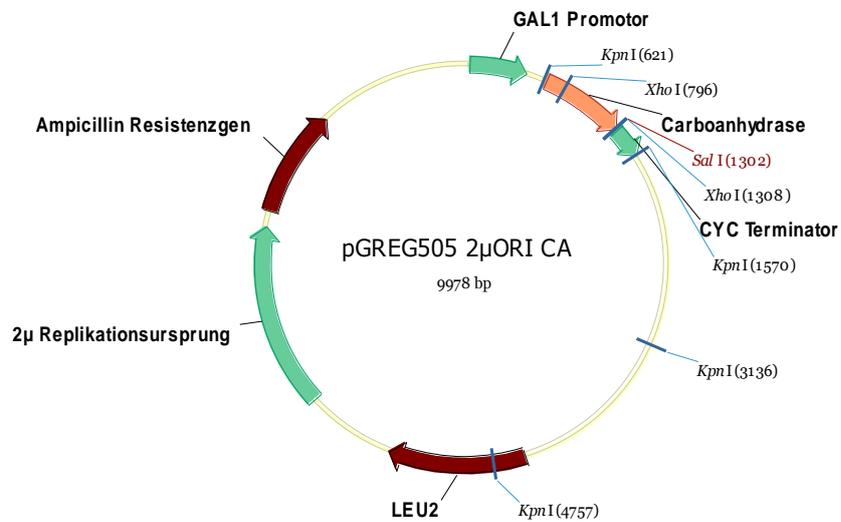
#### 4.3 pYES2/CT (Hefeexpressionsvektor, Invitrogen)



#### 4.4 pGREG505\_CA (Hefeexpressionsvektor mit cDNA der Carboanhydrase aus Tabak)



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





## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht und mich unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die Bereitstellung des Themas, sein Vertrauen und die stete Unterstützung sowie Diskussionsbereitschaft

Herrn Prof. H. Ulrich Göringer für die Bereitschaft, sich als Gutachter meiner Arbeit zur Verfügung zu stellen

Meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen der AG Kaldenhoff für die Hilfe, Aufmunterungen und gute Laune im Labor. Ganz besonderer Dank gilt Beate Otto für die vielen hilfreichen Tipps in punkto Molekularbiologie und Norbert Uehlein für die Unterweisung in die Welt der pflanzenphysiologischen Methoden.

Herrn Dr. Claudio Lovisolo (Universität Turin) für die sehr gute Einführung in das High Pressure Flow Meter und die italienische Forscherkultur

Herrn Dr. Jaume Flexas (Universität der Balearen) für die tatkräftige Unterstützung bei der Berechnung der Mesophyll-Leitfähigkeit.

Prof. Dr. Stefan Scheu für die Nutzung seiner Winrhizo-Apparatur.

Melanie Herker und Elisa Bauer für ihren erfolgreichen Einsatz beim Klonieren während ihrer Forschungs-Praktika.

Karolina Heckwolf für die gute gärtnerische Pflege meiner Pflänzchen.

Allen Korrekturlesern

Den Wölfen, besonders meinen Eltern, die mir ihr uneingeschränktes Vertrauen geschenkt haben und ohne die ich die Jahre meines Studiums und der Doktorarbeit bestimmt nicht geschafft hätte.



## **Publikationen**

**Kaldenhoff, R., Ribas-Cabro, M., Flexas Sans, J., Lovisolo, C., Heckwolf, M., & Uehlein, N.** (2008). Aquaporins and plant water balance. *Plant, Cell and Environment* **31**, 658-666.

## **Posterpräsentationen**

XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB) Tampere (Finland) 2008 "Dual function of *Arabidopsis thaliana* PIP1;2 Aquaporin in facilitating water and CO<sub>2</sub> permeability"



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Marlies Heckwolf
Geburtsdatum	27.02.1980
Geburtsort	Dieburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### Schulbildung:

1986-1990	John-F.-Kennedy-Schule, Münster
1990-1996	Schule auf der Aue, gymnasiale Mittelstufe, Münster
1996-1999	Alfred-Delp-Schule, gymnasiale Oberstufe, Dieburg
Juni 1999	Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulstudium:

1999-2005	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt mit den Schwerpunktfächern Pflanzenphysiologie, Mikrobiologie und Biochemie
2005-2006	Diplomarbeit mit dem Thema „Identifikation molekularer Komponenten der CO <sub>2</sub> -Wahrnehmung von <i>Arabidopsis thaliana</i> “ bei Prof. Ralf Kaldenhoff am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt

### Promotion:

2006-2009	Promotionsstudium bei Prof. Ralf Kaldenhoff am 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, Juni 2009

.....