

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Vorfeld zu der vorliegenden Arbeit wurden biophysikalische Untersuchungen an transgenen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. In diesen Pflanzen sollte die Inhibierung des Wassertransportes durch Expression eines Antisense-Konstrukts von PIP1b untersucht werden, um Aussagen über die Funktion von Aquaporinen *in planta* treffen zu können. Aufgrund der geringen Größe von *Arabidopsis thaliana* gestalteten sich diese Arbeiten als sehr schwierig. Als alternatives System wurde *Nicotiana tabacum* ausgewählt.

- Nach Durchmustern einer cDNA-Bibliothek von *Nicotiana tabacum* konnte eine Sequenz mit hoher Ähnlichkeit zu Aquaporinen identifiziert werden. Die entsprechende Vollängen-cDNA wurde durch eine RACE Technik isoliert. Die abgeleitete Proteinsequenz zeigte die höchste Ähnlichkeit zu Vertretern der PIP1-Familie und wurde daher als NtAQP1 bezeichnet. Eine Hydrophobizitätsanalyse ergab die für Aquaporine typische Struktur mit 6 transmembranen - Helices.
- In Northern-Experimenten wurde die Expression in Wurzeln, Spross, Blättern und Blüten untersucht. In allen untersuchten Geweben konnte eine Expression festgestellt werden. Die Expression von NtAQP1 war in Wurzeln am stärksten und in Blättern am schwächsten.
- Durch heterologe Expression von NtAQP1-cRNA in *Xenopus* Oozyten konnte für NtAQP1 eine Wassertransporteigenschaft nachgewiesen werden. Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegel und Stimulation endogener Proteinkinasen führte bei NtAQP1 nicht zu einem Anstieg der Wasserpermeabilität. In weiteren Studien zeigte sich, dass NtAQP1 quecksilberinsensitiv ist und eine Permeabilität für Glycerin und Harnstoff besitzt. Eine Ionenleitfähigkeit wurde nicht festgestellt.
- Northern-Experimente zu den zwei funktionellen Aquaporinen SsAQP1 und SsAQP2 aus *Samanea saman* zeigten für beide mRNA-Spezies eine Regulation auf Transkriptionsebene. Untersucht wurden Flexor- und Extensorgewebe von sekundären Pulvini, sowie Gesamtpulvini, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wurden. Die Transkriptmengen von SsAQP2 waren am Morgen im Flexor am höchsten und nahmen im Tagesverlauf deutlich ab. Im Extensor wurden nur schwache Signale detektiert. Das Expressionsmuster von SsAQP1 entsprach tendenziell dem von SsAQP2. Die mRNA-Menge war allerdings deutlich geringer und weniger starken Schwankungen unterworfen. Aufgrund des Expressionsmusters und der Lokalisation von SsAQP2 ist von einer Beteiligung dieses Aquaporins an der Pulvinibewegung auszugehen.
- Im Oozytensystem konnte für SsAQP2 eine Sensitivität für Quecksilber nachgewiesen werden, die von einem Cystein an Position 75 vermittelt wird. SsAQP1 erwies sich als quecksilberinsensitiv.

- Selektivitätsstudien zeigten, dass SsAQP1 eine Permeabilität für Glycerin besitzt. Dagegen ist SsAQP2 hoch selektiv für Wasser.
- Die für SsAQP2 ermittelten Wasserpermeabilitätskoeffizienten waren um den Faktor 10 höher, als die für SsAQP1. Die Fusion von GFP mit SsAQP1 bzw. SsAQP2 sollte eine relative Quantifizierung der Aquaporinmenge ermöglichen. Die detektierte Fluoreszenz war ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Die Fusionsproteine wurden demzufolge nicht in die Membran der Oozyten eingebaut. Die gewählte Methode erwies sich zur Klärung der Fragestellung als ungeeignet.

SUMMARY

In order to elucidate the role of aquaporins in water transport processes plants of *Arabidopsis thaliana* were transformed with an anti-sense construct targeted to the *PIP1b* gene. Because of the small diameter of root xylem vessels pressure measurements were hardly to perform. Therefore *Nicotiana tabacum* was chosen as an alternative model plant.

- A cDNA-clone with high homologies to aquaporins could be identified by screening a cDNA-library of *Nicotiana tabacum*. The predicted protein sequence showed highest homologies to members of the PIP1-family and was consequently named NtAQP1 (*Nicotiana tabacum* aquaporin 1). A Hydrophobicity plot revealed a structure with 6 membrane spanning α -helices, which is typical for aquaporins.
- Northern experiments showed that the NtAQP1 mRNA is highly abundant in roots and flowers, while it is rarely expressed in stems and leaves.
- Functional expression in *Xenopus* oocytes confirmed NtAQP1 to be a functional aquaporin. In addition NtAQP1 can mediate transport of glycerol and urea. Addition of mercurials or the activity of cAMP-dependent protein kinases could not modulate water permeability. Moreover, NtAQP1 is impermeable for Na^+ , Cl^- and K^+ .
- Total RNA from secondary pulvini were analysed for SsAQP transcripts by northern hybridization. For SsAQP2 highest concentration could be detected in flexor tissue and at a much lower extent in extensor. Signal intensity was low in the evening when pulvini bent and high during stretching in the morning. SsAQP1 was found to be poorly expressed in secondary pulvini.
- A cysteine at position 75 of the mercury sensitive SsAQP2 was identified as target for pore blocking heavy metal ions. Though SsAQP1 shares the same number of cysteines at identical positions, addition of mercurials did not inhibit water permeability.
- While SsAQP1 is permeable for glycerol, SsAQP2 is highly selective for water.

- Calculated waterpermeability coefficient of SsAQP2 was ten times higher than that for SsAQP1. To quantify the relative amount of aquaporin GFP was fused with SsAQP1 and SsAQP2 respectively. Since fluorescence was detected exclusively in the cytoplasm of oocytes, proteins were not integrated in the membrane. Therefore this method was not suitable to explain the striking difference regarding water permeability of SsAQP1 and SsAQP2.