

**Zur Regulation und Expression von Aquaporinen  
unter Berücksichtigung des pflanzlichen  
Wasserhaushaltes**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von  
**Martin Eckert**  
aus  
**Gehrden bei Hannover**

**Würzburg 2000**

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Goebel

Gutachter: Prof. Dr. R. Kaldenhoff

Gutachter: Prof. Dr. R. Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## **Danksagung:**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff. Seine wertvolle Unterstützung war für mich eine feste Größe im manchmal turbulenten Labor-Alltag. Seine Kritik und sein Optimismus hielten meinen Enthusiasmus und meine Frustration in einem produktiven Rahmen. Das Arbeiten in seinem Labor verhalf mir zu der Erkenntnis, daß Forschung ein „Hybrid“ aus Zielstrebigkeit und Geduld ist. Vielen Dank für die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Doktorarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Roy Gross dafür, daß er sich als Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für seine Kreativität beim Entwerfen der Gaswechselküvetten und die freundliche Bereitstellung der Gaswechselanlagen.

Vielen Dank auch den Herren Prof. Dr. Markus Riederer und PD. Dr. Lukas Schreiber für die Möglichkeit zur Fluoreszenzmikroskopie am Lehrstuhl für Botanik II. Sehr Hilfreich war die Benutzung des Fluoreszenzspektrometers am Institut für Biochemie - ich danke Frau Prof. Dr. Beier für ihre freundliche Genehmigung.

Natürlich danke ich auch meiner Lieblingsarbeitsgruppe, der AG Kaldenhoff, für ihre Unterstützung und zahlreiche Hilfestellungen wie z.B. „Plattenindenkühlschrankstellen“, „DenletzenrestLBmedium“ oder auch „KönnteichmaldeinePipettenspitzen...?“

Ferner danke ich den vielen Leuten am Lehrstuhl für Botanik I, die meine Arbeit mit ihrem Rat unterstützt haben.

Tiefe Dankbarkeit empfinde ich für meine Eltern. Ihr Beistand und ihre Zuversicht haben mich die ganze Zeit über begleitet.

Diese Arbeit wäre nicht vollständig ohne meinen heftigsten Dank an Ela, für ihre Geduld und ihr Verständnis.

Für meine Schwester Ute

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Wasserversorgung von pflanzlichen Geweben	1
1.2	Struktur der Aquaporine	1
1.3	Expression von pflanzlichen Aquaporinen	3
1.4	Bisherige Studien zum <i>Arabidopsis thaliana</i> PIP1b Aquaporin	5
1.5	Ein <i>Nicotiana tabacum</i> Aquaporin: NtAQP1	6
1.5.1	Bisherige Untersuchungen zu NtAQP1	6
1.6	Regulation von pflanzlichen Aquaporinen	6
1.7	Zielsetzungen der Arbeit	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1	Anzucht der Versuchspflanzen und Zellkulturen	10
2.1.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
2.1.2	Anzucht von <i>Nicotiana tabacum</i> Zell-Suspensionskultur (BY2)	11
2.2	Gaswechsellmessungen	11
2.2.1	Messungen an <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
2.2.2	Messungen an <i>Nicotiana tabacum</i>	13
2.3	Verfahren mit Deoxynucleinsäuren	14
2.3.1	Methoden zur Bearbeitung von DNA	14
2.3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	14
2.3.1.1.1	Minipräparation	15
2.3.1.1.2	Midipräparation	15
2.3.1.2	Aufreinigung von DNA durch Präzipitation	16
2.3.1.3	Elektrophorese von DNA im Agarosegel	16
2.3.1.4	Verwendung von DNA-modifizierenden Enzymen	17
2.3.1.4.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	17
2.3.1.5	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	17
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur exponentiellen Amplifikation von DNA	18
2.3.2.1	Konstruktion von Startermolekülen (Primer)	18
2.3.2.2	PCR-Standardexperiment	19
2.3.2.3	Rekombinante PCR	19
2.3.3	Klonierung von DNA	20
2.3.3.1	Herstellung kompetenter Bakterien	20
2.3.3.2	Klonierung von PCR-Produkten	21
2.3.3.3	Standardverfahren zur Klonierung von cDNA-Fragmenten in Vektoren	22
2.3.3.4	Transformation von <i>E. coli</i>	23
2.3.4	Sequenzierung von DNA	24

---

2.3.5	Computergestützte Charakterisierung von DNA-Sequenzen	24
<b>2.4</b>	<b>Reporter-Systeme und Assays</b>	<b>25</b>
2.4.1	Das $\beta$ -Glucuronidase-System (GUS-System)	25
2.4.1.1	GUS-Assay	25
2.4.2	Das Luciferase-System	26
2.4.2.1	Luciferase-Assay	26
2.4.3	Das Grün-fluoreszierende-Protein (GFP) -System	27
2.4.3.1	Detektion von GFP in pflanzlichen Zellen und Geweben	27
2.4.3.1.1	Anfertigung von Dünnschnitt-Präparaten	27
2.4.3.1.2	Fluoreszenzmikroskopie	28
<b>2.5</b>	<b>Ermittlung der relativen Promotoraktivität</b>	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b>Transiente Transformation von BY2-Protoplasten mittels PEG</b>	<b>28</b>
2.6.1	Isolierung von Protoplasten	28
2.6.2	Transiente Transformation	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Vergleichende Gaswechsellmessungen</b>	<b>31</b>
3.1.1	Anpassung der Meßtechnik an <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
3.1.2	Belichtungsprogramm	32
3.1.3	Gaswechsellmessungen an PIP1b-Antisense-Pflanzen	36
3.1.4	Weitere Untersuchungen zur Regulation der Stomaöffnung	37
3.1.5	Gaswechsel an <i>Nicotiana tabacum</i>	44
<b>3.2</b>	<b>Zur transkriptionellen Regulation</b>	<b>45</b>
3.2.1	Die morphogenetische Expression eines PIP1b-GFP Reportergens in <i>A. thaliana</i> .	45
3.2.2	Vergleichende Promotoranalysen auf Sequenzebene	49
3.2.3	Herstellung der Reportergene und Promotordeletionen	51
3.2.4	Das duale Transformationssystem	52
3.2.4.1	Herstellung der Vektor-Familie pSKL	53
3.2.5	Einfluß von Phytohormonen auf den Promotor des NtAQP1-Gens	55
3.2.6	Identifikation und Charakterisierung von regulativen Elementen des NtAQP1-Gens	56
<b>3.3</b>	<b>Die subzelluläre Lokalisation von NtAQP1-Protein</b>	<b>57</b>
3.3.1	Herstellung einer GFP::NtAQP1-Genfusion	57
3.3.2	Expression von GFP::NtAQP1-Fusionsprotein	58
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Rolle des Aquaporins PIP1b bei der Stomaöffnung</b>	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Rolle des Aquaporins NtAQP1 bei der Stomaöffnung</b>	<b>60</b>
<b>4.3</b>	<b>Gaswechsellmessungen an <i>Arabidopsis thaliana</i>-Mutanten</b>	<b>61</b>

---

4.3.1	Mutanten Blaulicht-induzierter Signalwege	61
4.3.2	Mutanten Rotlicht-induzierter Signalwege	63
4.3.3	Mutanten der Phytohormon-Signaltransduktion	64
4.3.3.1	Auxin	64
4.3.3.2	Abscisinsäure	64
<b>4.4</b>	<b>Expressionsmuster des PIP1b-GFP-Reportergens</b>	<b>66</b>
<b>4.5</b>	<b>Die transkriptionelle Regulation von NtAQP1</b>	<b>67</b>
<b>4.6</b>	<b>Die subzelluläre Lokalisation von NtAQP1</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>Anhang</b>		<b>82</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
	<b>Kodierung der Aminosäuren und Nucleotide</b>	<b>85</b>
	<b>Referenzen der verwendeten Vektoren</b>	<b>86</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>87</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>88</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Die Wasserversorgung von pflanzlichen Geweben**

Die Regulation des Wasserhaushaltes stellt eine der Grundvoraussetzungen für Wachstum, Entwicklung und Fortpflanzung von Pflanzen dar. Nahezu alle Stoffwechselprozesse in der Pflanze erfordern Wasser als Medium zur Lösung und zum Transport von Mikro- und Makroelementen und Metaboliten. Darüber hinaus ist Wasser die essentielle elektronenliefernde Komponente der pflanzlichen Photosynthese. Wechselwirkungen von Wassermolekülen untereinander und mit anderen Stoffen führen zur molekularen Vernetzung (Cluster-Bildung). Das Ausmaß der resultierenden Hydratisierung von Stoffen bestimmt den Quellungszustand von Symplast und Apoplast und ist hinsichtlich der Turgeszenz und des Transportes von Nährstoffen für die Pflanzen von größter Bedeutung. Höhere Pflanzen haben eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, die zur Sicherstellung der Wasserversorgung beitragen. Dazu gehört die Regulation der Stomata, deren Öffnungsweite die Intensität des Transpirationssogs bestimmt, oder die Symbiose der Pflanzen mit Bodenpilzen (Mykorrhiza), deren Kontakthyphen u.a. Wasser aus entfernten Bodenbereichen liefern. Neben einem Ferntransport von Wasser, der zu weiten Teilen im Apoplasten verläuft, finden auch inter- und intrazelluläre Wassertransporte statt. Hierbei muß das Wasser Biomembranen passieren (Plasmalemma bzw. Tonoplast), deren hydrophobe Oberflächen nur eine beschränkte Perfusion erlauben. Spezifischen wasserpermeablen Proteinen, sogenannten Aquaporinen, kommt bei diesen Transportmechanismen eine große Bedeutung zu. Als integrale Proteine von Biomembranen bilden sie Poren aus, die die Diffusion von Wasser und damit den Transport entlang eines osmotischen Gradienten erleichtern.

## **1.2 Struktur der Aquaporine**

Aquaporine werden zusammen mit anderen membranständigen Proteinen, wie z.B. dem bakteriellen Glycerin-Transporter GlpF (Maurel *et al.*, 1994), in die Superfamilie der MIP-homologen Proteine (MIP; „major intrinsic proteins“) eingeordnet. Der zuerst entdeckte Vertreter dieser Familie ist das bovine MIP26 (Gorin *et al.*, 1984) aus der Membran von Fasern der Augenlinse. Das Molekulargewicht der meisten bisher identifizierten MIP-Proteine liegt im Bereich von 25 - 30 kDa (van Os *et al.*, 1994; Verkman *et al.*, 1996). Obwohl Homologiestudien zeigen, daß innerhalb der Aquaporinfamilie die Identität nur 25 % auf der Ebene der Aminosäuren betragen kann, weisen alle Vertreter der MIP-

Familie zwei hoch konservierte Sequenzabschnitte auf, deren zentrales Motiv allgemein als NPA-Box (Asparagin-Prolin-Arginin) beschrieben wird. Die Datenbank Prosite (<http://www.expasy.ch/tools/scnpsite.html>) gibt hierzu das Motiv [HNQA]-x-N-P-[STA]-[LIVMF]-[ST]-[LIVMF]-[GSTAFY] aus dem Bereich der ersten NPA-Box als charakteristische Signatur für die MIP-Familie an.

Weiterhin ergeben Sequenzanalysen einen hohen Grad an Sequenzähnlichkeit zwischen der amino- und carboxylterminalen Hälfte. Dies deutet darauf hin, daß die MIP-Genfamilie durch eine intragenetische Duplikation entstanden ist (Reizer *et al.*, 1993). Die Anzahl von sechs membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices wurde zunächst durch Hydrophobizitätsprofile ermittelt und durch elektronenmikroskopische Studien an zweidimensionalen Kristallen des humanen Aquaporins AQP1 bestätigt (Walz *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1997). Die Lokalisation von Amino- und Carboxylterminus im Zytoplasma konnte durch Proteolyse an definierten Epitopen aufgezeigt werden (29 Aminosäuren vom E1-Epitop des Coronavirus), die in rekombinante AQP1-Proteine inseriert wurden (Preston *et al.*, 1994). Die Vermutung, daß Aquaporine als Oligomer in die Membran inserieren, stützt sich auf die beobachtete geringe elektrophoretische Mobilität von nativen pflanzlichen Aquaporinen und ihre Eigenschaft sich *in vitro* zusammenzulagern (Johnson *et al.*, 1989; Daniels *et al.*, 1994 und 1996; Kammerloher *et al.*, 1994). Zur funktionellen Analyse von Aquaporinen hat sich unter anderem die Expression in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* etabliert. Hierbei wird durch *in-vitro*-Transkription Aquaporin-mRNA synthetisiert, die in Oozyten injiziert wird. Nachfolgende Schwellungsexperimente mit hypotonischen Bad-Lösungen ermöglichen eine Berechnung der Wasserpermeabilität der Oozyten-Membran. Eine Co-Expression von funktionellen und inaktiven Aquaporin-Mutanten führte zu dem Schluß, daß ein Monomer bereits eine funktionelle Einheit darstellt und die Bildung von Oligomeren in der Membran aus Gründen der Stabilität erfolgt. Die funktionelle Mutante konnte, im Gegensatz zur inaktiven, aufgrund des fehlenden carboxylterminalen Abschnittes nicht mehr in die Membran inserieren. In der nachfolgenden Analyse zeigten sich annähernd identische Wasserpermeabilitäten wie für das AQP1-Wildtyp-Aquaporin. Diese waren nur durch die Bildung von Oligomeren zu erklären (Preston *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 1994). Frühe Röntgenstrukturanalysen von zweidimensionalen AQP1-Kristallen ergaben vier trapezförmige Untereinheiten, jede mit einem Durchmesser von 6–7 nm und einer zentralen Vertiefung, die eine Pore in Aufsicht darstellen könnte (Walz *et al.*, 1994; Jap *et*

*al.*, 1995; Mitra *et al.*, 1995). Aus den bis dahin vorliegenden Erkenntnissen erarbeiteten Jung *et al.* (1994) das sogenannte „hourglass“ Modell (Abbildung 1.1).

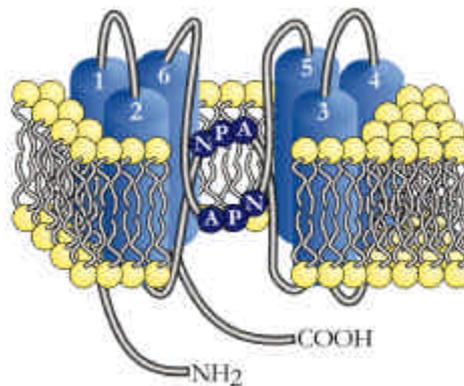


Abbildung 1.1: Allgemeines Strukturmodell eines Aquaporins (nach Jung *et al.*, 1994).

Aktuelle Studien mittels Rasterkraftelektronenmikroskopie führten bei einer Auflösung von 0,6 nm (Heymann *et al.*, 1998; Scheuring *et al.*, 1999) zu einer genaueren Vermessung eines Aquaporins. So konnten die Ausrichtungen der einzelnen  $\alpha$ -Helices in der Membran und der Radius an verschiedenen Stellen der zentralen Pore bestimmt werden. Der Radius soll im Bereich von 0,35 - 0,6 nm liegen. Das von Jung *et al.* (1994) vorgeschlagene „hourglass“ Modell wurde entsprechend modifiziert (Abbildung 1.2).

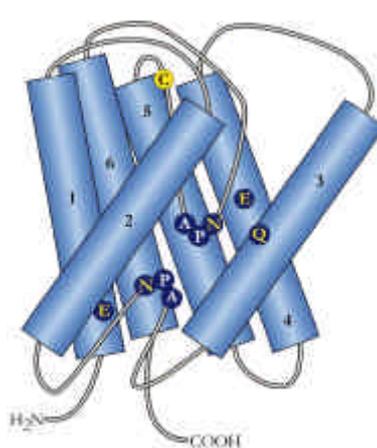


Abbildung 1.2: Modifiziertes Modell eines Aquaporins (verändert nach Heymann *et al.*, 1998).

### 1.3 Expression von pflanzlichen Aquaporinen

Etwa zeitgleich mit der Entdeckung von tierischen Aquaporinen verdichteten sich die Beweise für die Existenz derartiger Wasserkanäle in Pflanzen (Kiyosawa und Ogata, 1987; Wayne und Tazawa, 1990; Yamamoto *et al.*, 1991). Dies wurde von den Autoren als generelle Beteiligung von Aquaporinen am pflanzlichen Wassertransport interpretiert. Es folgte die Charakterisierung weiterer Aquaporin-cDNA-Klone (Kaldenhoff *et al.*, 1993;

Kammerloher *et al.*, 1994; u.a.) sowohl aus dem Tonoplasten (TIP; „tonoplast intrinsic proteins“), als auch der Plasmamembran (PIP; „plasma membrane intrinsic proteins“). Bis heute wurden aus einer Vielzahl von Pflanzenarten Aquaporin-ähnliche Gene isoliert und deren Expressionsmuster charakterisiert. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte in vielen Fällen eine starke Präsenz in meristematischen und schnell wachsenden Geweben gezeigt werden, die auf eine Beteiligung von Aquaporinen an Zellteilungsvorgängen und Zellstreckung hindeutet. Der Zusammenhang von Wassertransport und Aquaporinen äußerte sich noch deutlicher durch ihre starke Präsenz in vaskulärem Gewebe und dessen umgrenzende Zellen (Kaldenhoff *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1995; Daniels *et al.*, 1996; Otto und Kaldenhoff, 2000). An dieser Schnittstelle findet der Übergang des Wassers vom Symplasten in den Apoplasten statt. So enthalten Transferzellen, die das vaskuläre Gewebe in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) oder *Nicotiana tabacum* (Tabak) umgeben, deutlich mehr PIP-Protein als Mesophyllzellen (Robinson *et al.*, 1996; Otto und Kaldenhoff, 2000). Weiterhin gibt es Hinweise auf die Beteiligung von Aquaporinen an speziellen Vorgängen, die eine Veränderung der Wasserpermeabilität von Membranen erfordern. Aktuelle Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von TIP-homologen Aquaporinen bei der Ausbildung der arbuskulären Mykorrhiza (AM) bei *Medicago truncatula* hin (Krajinski *et al.*, 2000). Für das Tonoplasten-Aquaporin  $\alpha$ TIP aus *A. thaliana* (Höfte *et al.*, 1992) konnte ebenfalls eine entwicklungspezifische Expression gezeigt werden. Während der Keimung von *A. thaliana* ist zunächst  $\alpha$ TIP in hoher Dichte in der Membran von Proteinspeichervesikeln anzutreffen und wird später bei der Mobilisierung und Umwandlung in kleinere Vesikel durch die Isoform  $\gamma$ TIP ersetzt (Maurel *et al.*, 1997). Ebenfalls einer sehr speziellen Expression unterliegt NOD26, ein Aquaporin, das bisher ausschließlich in der Peribakteroid-Membran der knöllchentragenden Sojabohne (*Glycine max*) nachgewiesen wurde (Rivers *et al.*, 1997). In *Helianthus* (Sonnenblume) wurden zwei Aquaporine charakterisiert, deren Expression sich auf Schließzellen beschränkt (Sarda *et al.*, 1997). Die Expression von PIP1b aus *A. thaliana* konnte unter anderem auch in Schließzellen nachgewiesen werden (Kaldenhoff *et al.*, 1995). Neben diesen gewebespezifischen Expressionsmustern von Aquaporinen konnten auch Vertreter charakterisiert werden, die anscheinend konstitutiv in nahezu allen Geweben und Organen exprimiert werden (Höfte *et al.*, 1992; Daniels *et al.*, 1994; Mariaux *et al.*, 1998; u.a.).

## 1.4 Bisherige Studien zum *Arabidopsis thaliana* PIP1b Aquaporin

PIP1b gilt als eines der ersten aus Pflanzen isolierten Aquaporine (Kaldenhoff *et al.*, 1993). Die aufgrund von Sequenzhomologien angenommene Lokalisation des PIP1b-Proteins in der Plasmamembran wurde durch *in-situ* Antikörperhybridisierungen und nachfolgende elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt (Kaldenhoff *et al.*, 1995). Die funktionelle Charakterisierung von PIP1b wurde im heterologen Oozytensystem durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß PIP1b als ein für Wasser hochselektives Aquaporin anzusehen ist (Kammerloher *et al.*, 1994). Zur weiteren Aufklärung der Funktion von Aquaporinen in Pflanzen wurden transgene *A. thaliana*-Linien erzeugt, deren PIP1b-mRNA-Gehalt durch die Expression einer Antisense-RNA stark vermindert war. Die Analyse des hypotonischen Schwellungsverhaltens von Mesophyll-Protoplasten solcher Linien zeigte eine starke Verminderung der Wasserpermeabilität, die auf eine verringerte Expression von PIP1b zurückgeführt werden konnte. Somit konnte die Funktion von PIP1b als Aquaporin auch in einem homologen System bestätigt werden (Kaldenhoff *et al.*, 1998).

Die phänotypische Charakterisierung der Antisense-Linien ergab eine um den Faktor 4 erhöhte Wurzelmasse im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Abbildung 1.3), während die Morphologie der oberirdischen Organe wie Rosettenblätter, Stengel und Blüten keine Veränderung zeigte. Dies führte zu der Vermutung, daß eine verringerte Wasserleitfähigkeit durch eine Vergrößerung der Wurzeloberfläche kompensiert wird.

Experimente mit dem  $\beta$ -Glucuronidase-Reportersystem (GUS) zeigten unter anderem eine starke Expression in den Schließzellen der Stomata (Kaldenhoff *et al.*, 1995). Die Aktivität des PIP1b-Promotors konnte durch Blaulichtbestrahlung der Pflanzen sowie durch die Zugabe der Phytohormone Abscisinsäure (ABA) und Gibberellinsäure (GA) erhöht werden (Kaldenhoff *et al.*, 1996).



**Abbildung 1.3:** Vergleich der Wurzelbildung von repräsentativen Antisense- und Wildtyp-Pflanzen (aus Kaldenhoff *et al.*, 1998).

## 1.5 Ein *Nicotiana tabacum* Aquaporin: NtAQP1

Im Verlauf der Untersuchungen zur Funktion und Bedeutung von Wasserkanälen stellte sich heraus, daß *A. thaliana* aufgrund der geringen Größe kein optimales Versuchsmodell für spezielle physiologische Experimente ist. Die Analyse der Wasserleitfähigkeit einer Wurzel oder die Bestimmung des Xylemdruckes im Sproß sind nur unter großen Schwierigkeiten durchführbar. Ein größerer, ebenfalls sehr gut beschriebener Modellorganismus stand mit *N. tabacum* zur Verfügung. Aus *N. tabacum* wurde das Aquaporin NtAQP1 isoliert, das analog zu den vorher untersuchten *A. thaliana*-Aquaporinen einen Vertreter der PIP-Familie darstellt (Biela *et al.*, 1999). Somit konnten die physiologischen Fragestellungen durch Untersuchungen mit Hilfe von NtAQP1 in ihren Grundzügen weiter verfolgt werden.

### 1.5.1 Bisherige Untersuchungen zu NtAQP1

Die DNA-Sequenz von NtAQP1 zeigt die größten Übereinstimmungen mit bisher klonierten Aquaporinen der PIP-Familie. Die Charakterisierung im Oozytensystem bestätigte die Funktion eines Aquaporins. Darüber hinaus wurde ein Transport von Glycerin und Harnstoff beobachtet (Biela, *et al.*, 1999; Eckert *et al.*, 1999).

In Northern-Blot-Experimenten wurde der Gehalt von spezifischer mRNA in unterschiedlichen Gewebetypen untersucht. Die Expression zeigte sich in Wurzeln und Blättern am stärksten, konnte jedoch auch in Sproß und Blüte festgestellt werden. Immunologische Untersuchungen mit einem PIP-spezifischen Antikörper machten deutlich, daß NtAQP1 sehr stark in der Elongationszone von Wurzelspitzen exprimiert wird. Ein anderer Befund zeigte Antikörper-Reaktionen in Bereichen der Leitbündel von Blättern, insbesondere in Kolonnen von longitudinal angeordneten Xylemparenchymzellen. Dieser Zelltyp repräsentiert im allgemeinen den Übergangsort des Wassers vom Symplasten in den Apoplasten (Otto und Kaldenhoff, 2000).

Western-Blot-Experimente gaben neben der Bestätigung der Plasmamembran-Lokalisation erste Hinweise auf ein Vorkommen von Aquaporinen in Chloroplastenmembranen. Der bereits bei Immunlokalisationen eingesetzte Antikörper zeigte eine Reaktion mit Proteinen aus aufgereinigten Membranfraktionen von Mesophyll-Chloroplasten aus *N. tabacum* (Kaldenhoff *et al.*, 2000).

## 1.6 Regulation von pflanzlichen Aquaporinen

Änderungen der Umweltbedingungen sowie entwicklungspezifische Prozesse wie Wachstum oder Differenzierung erfordern oftmals kurzfristige Änderungen der

Wasserpermeabilitäten bestimmter zellulärer Membranen. Eine unzureichende Kontrolle der Expression von Aquaporinen würde den Wasserhaushalt der Pflanze stören, wenn nicht sogar zur Beeinträchtigung von Wachstum und Entwicklung führen. Dies setzt eine strenge Kontrolle der in Frage kommenden Aquaporine voraus, die auf verschiedenen Ebenen stattfinden kann. Eine transkriptionelle Kontrolle ist gegeben, wenn die Expression der Gene über die Aktivität der Promotoren reguliert wird. Dieser Mechanismus beinhaltet die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls in ihrer Synthese, Konzentration oder Aktivität gesteuert werden. Je nach Kombination verschiedener solcher DNA-bindenden Proteine kommt es zur verstärkten oder verminderten Transkription des Zielgens. Die sich anschließende Translation wird unter anderem von der Stabilität des Transkriptes sowie von vorangegangenen Modifikationen (processing) beeinflusst. Eine Kontrolle auf der Ebene des Proteins setzt Komponenten zur posttranslationellen Modifikation voraus. Diese Komponenten können Protein-abbauende oder Protein-modifizierende Enzyme sein, die, ebenfalls durch Faktoren reguliert, mit dem Zielprotein reagieren und dessen Aktivität oder Stabilität verändern.

In vielen Fällen wurde für Aquaporine eine entwicklungs- und gewebespezifische Expression beschrieben. Diese Spezifitäten werden oft durch die Ausbildung von Initiationskomplexen verursacht und deuten damit eher auf eine transkriptionelle Kontrolle von Aquaporingenen hin. Eine Regulation der Aquaporine auf transkriptioneller Ebene kann daher als ein wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes in Pflanzen gesehen werden. Die Promotoren dieser Gene müssen durch Komponenten von entsprechenden Signaltransduktionswegen aktiviert bzw. deaktiviert werden. Tatsächlich werden eine Reihe von exogenen und endogenen Stimuli beschrieben, die Einfluß auf die Expression von Aquaporinen haben. Dazu gehören Blaulicht, Phytohormone, Trockenstreß und osmotischer Streß (Kaldenhoff *et al.*, 1993; Phillips und Huttly, 1994; Guerrero *et al.*, 1990; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1997 und 1997b). Der enge Zusammenhang zwischen Streßfaktoren und Änderungen in der Expression von Wasserkanälen führte zu der Vermutung, daß die Wirkung von Phytohormonen an der Regulation beteiligt ist. Dies konnte bislang vor allem für die Phytohormone ABA und GA gezeigt werden. In *Lycopersicon* (Tomate), *Oryza* (Reis), *Pisum* (Erbse), *Arabidopsis* und *Craterostigma* (Auferstehungspflanze) korrelieren Streßbehandlungen bzw. die endogenen Konzentrationen von Phytohormonen mit einer veränderten Expression bestimmter Aquaporine (Mariaux *et al.*, 1998; Daniels *et al.*, 1994; u.a.).

Bisher konnte für zwei pflanzliche Aquaporine eine Regulation auf Proteinebene festgestellt werden. In *Vicia faba* (Saubohne) wiesen Johnson *et al.* (1992) eine *in-vivo*-Phosphorylierung von  $\alpha$ TIP über eine Tonoplasten-gebundene,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteinkinase nach. Ein identisches Ergebnis zeigten Johansson *et al.* (1998) für das Plasmamembran-Aquaporin PM28A aus Spinat. Im Oozytensystem konnte unter definierten Bedingungen mittels *in vivo*-Phosphorylierung eine Steigerung der Wasserpermeabilität bei beiden Aquaporinen erreicht werden (Maurel *et al.*, 1995). Als mögliche Phosphorylierungsstellen wurden Serine an verschiedenen Positionen innerhalb der Proteine durch Expression entsprechender Mutanten untersucht. Dabei zeigte sich für PM28A eine Diskrepanz zwischen der *in vivo* und der im Oozytensystem phosphorylierten Aminosäure.

## 1.7 Zielsetzungen der Arbeit

Das Auftreten von Aquaporinen in Pflanzen und ihre Funktion als membranständige Poren zur Erleichterung der Diffusion von Wasser gelten mittlerweile als belegt (Eckert *et al.*, 1999; Kaldenhoff und Eckert, 1999). In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Aquaporinengen aus unterschiedlichen Pflanzenarten isoliert und die Funktion der Genprodukte als Wasserkanäle experimentell bestätigt. Es stellte sich heraus, daß in den meisten Fällen mehrere Isoformen dieser Aquaporine in Pflanzen vorkommen (Maurel, 1997b). Die physiologische Relevanz solcher Genfamilien konnte bisher in den meisten Fällen nicht bewertet werden. Charakteristisch für Genfamilien sind jedoch geringe funktionelle Unterschiede sowie unterschiedliche transkriptionelle Regulationen der einzelnen Mitglieder.

Grundsätzlich stellte sich die Frage nach der physiologischen Relevanz von Aquaporinen, sowie nach den Mechanismen ihrer transkriptionellen und translationellen Regulation in Pflanzen. Hierzu sollten die Expressionsmuster des Aquaporingens PIP1b aus *A. thaliana* im Verlauf der pflanzlichen Entwicklung untersucht werden. Als nicht-invasive Nachweismethode sollte hierfür das Grün-fluoreszierende Protein (engl.: green fluorescence protein; GFP) in Reporter-gen-Konfiguration verwendet werden.

Die in einer vorangegangenen Arbeit beschriebene starke Expression von PIP1b in Schließzellen deutet auf eine Beteiligung von Aquaporinen an Vorgängen der Stomabewegung hin (Kaldenhoff *et al.*, 1995). Dies erscheint insofern sinnvoll, als daß die

durch die Aktivität von Ionenkanälen erzeugten osmotischen Gradienten zu einer verhältnismäßig schnellen Verschiebung von Wasser führen. An diesen interzellulären Wassertransporten könnten Aquaporine maßgeblich beteiligt sein. Mit Hilfe von PIP1b-Antisense Pflanzen sollte die physiologische Relevanz des PIP1b-Aquaporins während der durch Licht induzierten Stomabewegung näher untersucht werden.

Durch den bereits beschriebenen Wechsel des Modell-Organismus von *A. thaliana* zu *N. tabacum* ergab sich die Gelegenheit, die erhaltenen experimentellen Daten auf ihre Übertragbarkeit auf das System *N. tabacum* zu überprüfen. Analog zu *A. thaliana* standen hier NtAQP1-Antisense-Linien zur Verfügung.

Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Aquaporinen und Phytohormonen. Vorangegangene Arbeiten an *A. thaliana*-PIP1b ergaben Hinweise auf das Vorhandensein solcher Wechselwirkungen (Kaldenhoff *et al.*, 1996), für *N. tabacum*-Wasserkanäle lagen jedoch noch keine Daten vor. Mit Hilfe von geeigneten Reportergenen sollte die Phytohormon-Wirkung analysiert und regulative Elemente des NtAQP1-Promotors durch Deletionsstudien eingegrenzt werden.

Von besonderer Bedeutung war die Frage nach der subzellulären Lokalisation des NtAQP1-Aquaporins. Aufgrund von Sequenzvergleichen kann NtAQP1 in die Familie der Plasmamembran-intrinsischen-Aquaporine eingeordnet werden. Untersuchungen mit *in situ* detektierbaren Fusionsproteinen sollten dazu experimentelle Daten liefern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Anzucht der Versuchspflanzen und Zellkulturen

#### 2.1.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die bei 4 °C gelagerten Samen wurden vor der Keimung einer Oberflächensterilisation unterzogen. Sie wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Ethanol (98 %ig) versetzt und für 15 min in einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Anschließend folgte eine weitere Sterilisation mit 5 %iger wäßriger Hypochlorit-Lösung + 0,02 % Triton X-100. Die Samen wurden dann auf GM-Agar in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) ausgebracht. Zur Synchronisation der Keimung blieben sie für drei bis vier Tage bei 4 °C im Dunkeln. Danach wurden die Keimlinge in einer Klimakammer (TC 6, Firma TRITEC-GmbH, Hannover) über zwei bis vier Wochen im Weißlicht-Dunkel-Wechsel (16:8) gezogen (TLD 36W/25 Philips bzw. NL 36/21 Radium). Die Energieflußrate (EFR) betrug  $7 \text{ Wm}^{-2}$ , die Temperatur 22 °C und die Luftfeuchte 85 %. Unter den gleichen Umweltbedingungen wurden auch unsterile Pflanzen angezogen. Als Substrat wurde handelsübliche Pikiererde verwendet.

<u>GM-Nährmedium (pro Liter):</u>	100 ml 10 x MS-Nährsalze
	10 g Saccharose
	100 mg myo-Inosit
	0,5 g MES, pH 5,7 (KOH)
	1,0 mg Thiamin
	0,5 mg Pyridoxin
	0,5 mg Nicotinsäure
	7,0 g Plant Agar

<u>10 x MS-Nährsalze (pro Liter):</u>	3,32 g $\text{CaCl}_2$
	0,25 mg $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
	0,25 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
	367,0 mg FeNaEDTA
	62,0 mg $\text{H}_3\text{BO}_3$
	1,7 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	8,3 mg KI
	19,0 g $\text{KNO}_3$
	3,7 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
	69,0 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
	2,5 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

16,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
86,0 mg ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

Nach dem Autoklavieren (20 min bei 121 °C) und Abkühlen auf etwa 50 - 60 °C wurde das komplette Nährmedium auf Petrischalen (Durchmesser = 9 cm) verteilt. Für die Anzucht von Antibiotika-resistenten Pflanzen wurde das Nährmedium vor dem Verteilen mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (50 µg/ml Endkonzentration).

### **2.1.2 Anzucht von *Nicotiana tabacum* Zell-Suspensionskultur (BY2)**

Die Kultur wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Palme (MPIZ, Köln) zur Verfügung gestellt.

BY2 Medium (pro Liter):

4,3 g MS Mikro-und Makroelemente  
(Imperial Labs)  
200 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
100 mg/l Thiamin HCl  
0,2 mg/l 2,4-Dichlorophenoxazonsäure  
30 g Saccharose  
2 g 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure  
(MES)  
pH 5,8 (1 M KOH), autoklavieren

Zur Kultivierung von 100 ml Zellsuspensionen wurden 300 ml Kolben ohne Schikane verwendet. Das Umsetzen der Kulturen erfolgte wöchentlich durch eine 1:10-Verdünnung mit frischem Medium. Die Kolben wurden auf einem Rundschüttler bei 25 °C und 100 Upm im Dunkeln plaziert.

## **2.2 Gaswechselfmessungen**

### **2.2.1 Messungen an *Arabidopsis thaliana***

*A. thaliana*-Samen wurden hauptsächlich vom Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) und dem Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) bezogen:

Ler (NW20); Col (N908); *abi1-1* (CS22); *abi3-1* (CS24); *aba3-2* (CS158); *axr1-3* (CS3075); *axr2* (CS3077); *aux1-7* (CS8040); *eto1-1* (CS3072); *ein1-1* (CS3070); *hyl* (CS68); *hy3* (CS69); *hy4* (CS70); *fha-1* (CS108); *npq1-2* (CS3771).



Die Küvetten wurden an ein offenes Gaswechselmeßsystem HCM-1000 (Walz, Effeltrich, Deutschland) angeschlossen. Der Gasfluß betrug 600 ml/min. Wasser- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen wurden mit differentiellen Gasanalysatoren am Küvettenein- und ausgang gemessen (BINOS-100/4PS, Walz, Deutschland). Die erhaltenen Daten wurden in 2-minütigen Intervallen automatisch aufgezeichnet (Walz "DATA-1000" und PC). Nach einer Messung wurden die Blätter abgeschnitten, mit einem Kopierer abgelichtet und die Blattfläche anhand der Kopie bestimmt (DIAS II, Digitale Flächenerfassung, Delta-T Devices LTD, Cambridge, UK). Die Weiterverarbeitung der Daten und Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel™. Statistische Analysen wurden unter der Verwendung des Student's t-Test durchgeführt.

Zur Fluoreszenzmessung diente ein Chlorophyll-Fluorometer der Marke TEACHING-PAM (Walz, Effeltrich, Deutschland). Untersuchungen zur nichtphotochemischen Fluoreszenz-Löschung (nonphotochemical quenching, NPQ) wurden nach der Beschreibung von Niyogi *et al.* (1998) durchgeführt. Die Bestimmung von photosynthetischen Kapazitäten erfolgte durch das Messen der Photosystem II-Fluoreszenz in 0 - 1400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Licht (Schreiber, 1997).

<u>Nährlösung:</u>	5 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
	1mM CaCl <sub>2</sub>
	4 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2 mM MgSO <sub>4</sub>
	0,2 mM Na-Fe-EDTA
	4 $\mu\text{M}$ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	10 $\mu\text{M}$ MnCl <sub>2</sub>
	1 $\mu\text{M}$ ZnSO <sub>4</sub>
	0,3 $\mu\text{M}$ CuSO <sub>4</sub>
	0,1 $\mu\text{M}$ Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>

### 2.2.2 Messungen an *Nicotiana tabacum*

Aufgrund der ausreichenden Größe der Blätter von *N. tabacum* konnten die Messungen mit den Original-Küvetten durchgeführt werden. Der erfaßte Blattbereich betrug 2,5 cm<sup>2</sup>. Die Bestrahlung mit Weißlicht wurde mittels einer auf die Küvette aufsetzbaren Lichtquelle vorgenommen.

## 2.3 Verfahren mit Deoxynucleinsäuren

### 2.3.1 Methoden zur Bearbeitung von DNA

#### 2.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

<u>P1 (Resuspensionspuffer):</u>	50 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNaseA
<u>P2 (Lysispuffer):</u>	200 mM NaOH 1 % SDS
<u>P3 (Neutralisationspuffer):</u>	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
<u>QBT (Equilibrierungspuffer):</u>	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Isopropanol 0,15 % Triton X-100
<u>QC (Waschpuffer):</u>	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Isopropanol
<u>QF (Elutionspuffer):</u>	1,25 M NaCl 50 mM Tris/HCl 15 % Isopropanol

Plasmid-DNA wurde durch das Mini- bzw. Midipräparationssystem der Firma QIAGEN gewonnen. Die beiden Systeme unterscheiden sich durch die einzusetzende Bakterienmenge und die Ausbeute an DNA. Das Prinzip beruht auf einer alkalischen Lyse der *E. coli*-Zellen und der selektiven Präzipitation der bakteriellen genomischen DNA, die an der Zellmembran anhaftet, während die Plasmid-DNA bei diesem Schritt im Überstand

verbleibt. Verschiedene Puffer wurden für die Resuspension (P1) und die Lyse der Zellen (P2), die Neutralisation der Lyse und die Fällung der Proteine (P3) verwendet.

#### 2.3.1.1.1 Minipräparation

<u>LB (Luria-Bertani) Nährmedium (pro Liter):</u>	10,0 g NaCl
	5,0 g Hefe-Extrakt
	10,0 g Trypton
	pH 7,5
	autoklavieren
	50 µg/ml Antibiotikum
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA

Bakterien mit rekombinanten Plasmiden wurden in 3 ml selektivem LB-Nährmedium über Nacht bei 37 °C und 300 Upm in einem Schüttelinkubator angezogen. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 13000 Upm für 30 sec sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Zum Lysieren der Zellen wurden 300 µl Puffer P2 zugegeben, vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur (RT) belassen. Zur Neutralisation wurden 300 µl Puffer P3 zugegeben und 10 min im Eisbad inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min 13000 Upm) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß mit 630 µl vorgelegtem Isopropanol überführt. Dieses wurde bei 13000 Upm 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Präzipitat mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in 30 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentrationsmessung einer geeigneten Verdünnung fand am Photometer (GeneQuant II, PROMEGA) statt. Die Berechnung erfolgte nach:

$$E_{260} - E_{320} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000 = \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$$

#### 2.3.1.1.2 Midipräparation

Für die Midi-Präparation von Plasmiden mit hoher Kopienzahl pro Bakterienzelle wurde eine 25 ml Übernachtskultur in SS34 Röhrchen überführt und durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 6000 Upm sedimentiert. Das Präzipitat wurde in 4 ml Puffer P1 aufgenommen. Für die Lyse der Zellen wurden 4 ml Puffer P2 zugegeben, die Röhrchen

verschlossen, vorsichtig invertiert und 5 min bei RT stehen gelassen. Für eine Neutralisierung wurden 4 ml Puffer P3 zugegeben und 20 min im Eisbad inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 min 13000 Upm in der Sorvall-Zentrifuge) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, in ein neues SS34 Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Röhrchen mit 0,7 Vol Isopropanol überführt und bei 16000 Upm 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Präzipitat mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die gefällte DNA wurde im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung fand am Photometer (GeneQuant II, PHARMACIA BIOTECH) statt.

War hochreine DNA wie z.B. für Sequenzierungen nötig, erfolgten weitere Präparationsschritte mit den im QIAGEN-System vorhandenen Säulen. Hierfür wurde der Überstand nach der zweiten Zentrifugation auf die mit 4 ml Puffer QBT equilibrierte QIAGEN-tip-20-Säule aufgetragen. Diese wurde zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Das Eluat wurde mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt und 30 min bei 4 °C zentrifugiert, anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und im gewünschten Vol TE-Puffer aufgenommen.

### **2.3.1.2 Aufreinigung von DNA durch Präzipitation**

Zu einem Volumen DNA wurde 1/10 Vol Natrium-Acetat (pH 4,5), 2,5 Vol eiskaltes 98 %iges Ethanol und bei sehr geringen DNA-Mengen als Fällungshilfe Glykogen zugegeben. Die Präzipitation erfolgte für 30 min auf Eis. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 13000 Upm wurde das Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem gewünschten Vol TE-Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Die Konzentration einer geeigneten Verdünnung (1:70) der DNA wurde photometrisch bestimmt (GeneQuant II, Pharmacia, Biotech).

### **2.3.1.3 Elektrophorese von DNA im Agarosegel**

Die größenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese im Agarosegel. Die Konzentration der Agarose (ICN) richtete sich dabei nach der zu erwartenden Fragmentgröße und lag zumeist bei 1 %. Als Puffer diente 1 x TAE-Puffer. Zur Auftrennung wurde eine Spannung zwischen 5 - 10 Volt/cm gewählt. Als Größenstandard dienten DNA-Fragmente definierter Länge (1 kb DNA-Leiter, Gibco BRL). Die Sichtung und Dokumentation der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht



Eine mit Ethidiumbromid angefärbte DNA-Bande wurde nach Auftrennung im Agarosegel unter UV-Licht (Transilluminator, 302 nm) gesichtet und zusammen mit der umgebenden Agarose ausgeschnitten. Der Agaroseblock wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem QIAEXII-System (QIAGEN, Hilden) unter Verwendung der mitgelieferten Pufferlösungen anhand des Herstellerprotokolls. Die Agarose wurde während einer 10-minütigen Inkubation bei 50 °C in einem dreifachen Volumen Puffer QX1 aufgelöst und die DNA in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration an spezielle Partikel (QIAEX-Suspension) gebunden. Es folgten mehrere Zentrifugations- und Waschschrte, zuerst mit 500 µl Puffer QX1, dann mit 500 µl Puffer PE. Dabei wurde die Salzkonzentration in den Pufferlösungen kontinuierlich verringert. Anschließend wurde das Partikelsediment an der Luft vollständig getrocknet und die DNA durch Zugabe von 20 µl TE-Puffer von den Partikeln eluiert. Die Ausbeute konnte dabei durch eine Inkubation für 5 min bei 50 °C erhöht werden. Nach einer abschließenden Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit konnten etwa 15 µl DNA-haltige Lösung vorsichtig abgenommen werden. Zur Überprüfung der Elutionseffizienz wurde ein Teil des Eluates erneut im Agarosegel aufgetrennt.

### **2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur exponentiellen Amplifikation von DNA**

Zum Nachweis bzw. zur Klonierung von DNA-Abschnitten wurden diese mittels PCR exponentiell amplifiziert. Zur qualitativen und quantitativen Kontrolle der Reaktionsprodukte wurde in der Regel 1/10 Vol des Reaktionsansatzes im Agarosegel aufgetrennt.

#### **2.3.2.1 Konstruktion von Startermolekülen (Primer)**

Die Sequenzen und Eigenschaften geeigneter Primer, sowie die Parameter zur Durchführung der PCR wurden am Computer unter Anwendung der Software Oligo™ 5.0 (National Biosciences) ermittelt. Besonders berücksichtigt wurde dabei der GC-Gehalt der Primer, die thermische Stabilität von Sekundärstrukturen, die Genspezifität sowie eine möglichst hohe Anlagerungstemperatur ( $T_A = T_M - 5 \text{ °C}$ ). Primer mit angefügten Restriktionsschnittstellen wurden um die entsprechende Nucleotidsequenz verlängert und die Änderung der berechneten Anlagerungstemperatur ignoriert. Die Primer wurden von der Firma MWG bezogen.

### 2.3.2.2 PCR-Standardexperiment

Unter Kühlung wurden folgende Komponenten in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß zusammengestellt.

<u>Standardansatz (20µl):</u>	1 - 10 ng DNA-Matrize (Template)
	10 pmol „sense“ Primer (+Strang)
	10 pmol „antisense“ Primer (- Strang)
	1 x Taq-Reaktionspuffer
	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,2 mM dNTP-Mix (Eurogentech)
	1 U Taq-DNA Polymerase (Biotherm)

Nach den Vorgaben der Software Oligo 5.0 wurden die Parameter zur Programmierung des verwendeten Thermocyclers festgelegt. Standardmäßig wurden dabei 3 verschiedene Programmabschnitte definiert. Der erste Abschnitt sah eine Vordenaturierung der DNA bei 94 °C für 1 bis 3 min vor. Danach folgten mit 30 bis 40 Wiederholungen Denaturierung, Anlagerung der Primer an die Zielsequenzen und die Verlängerung der Primer durch die Aktivität der *Taq*-DNA Polymerase. Die Reaktion wurde durch einen 5 bis 10 min dauernden Syntheseschritt abgeschlossen. Dieser Schritt bewirkte die vollständige Verlängerung aller Abbruchfragmente und war vor allem für die Klonierung von PCR-Produkten mittels TA-Klonierung (siehe 2.3.3.2) notwendig. Für die Durchführung standen Thermocycler der Firmen Landgraf, Stratagene (RoboCycler Gradient 40) und Hybaid zur Verfügung.

### 2.3.2.3 Rekombinante PCR

Diese spezielle PCR-Anwendung begann mit der unabhängigen Amplifikation von zwei PCR-Produkten. Hierbei entstanden durch die Wahl geeigneter Primer komplementäre Sequenzbereiche, die nach Denaturierung der vereinigten PCR-Produkte durch langsames Abkühlen reassozierten. Durch die Anlagerung des 3'-Bereiches des einen PCR-Produktes mit dem komplementären 5'-Bereich des anderen entstanden teilweise doppelsträngige DNA-Moleküle, die eine Fusion beider Gene darstellten. Durch nachfolgende Taq-Polymerase-Aktivität wurden diese Fusionsgene zu DNA-Doppelsträngen komplettiert und dienten als Template für eine PCR-Amplifikation mit flankierenden Primern (vgl. Abbildung 2.2). Das so entstandene rekombinante PCR-Produkt stand für weitere Klonierungen zur Verfügung.

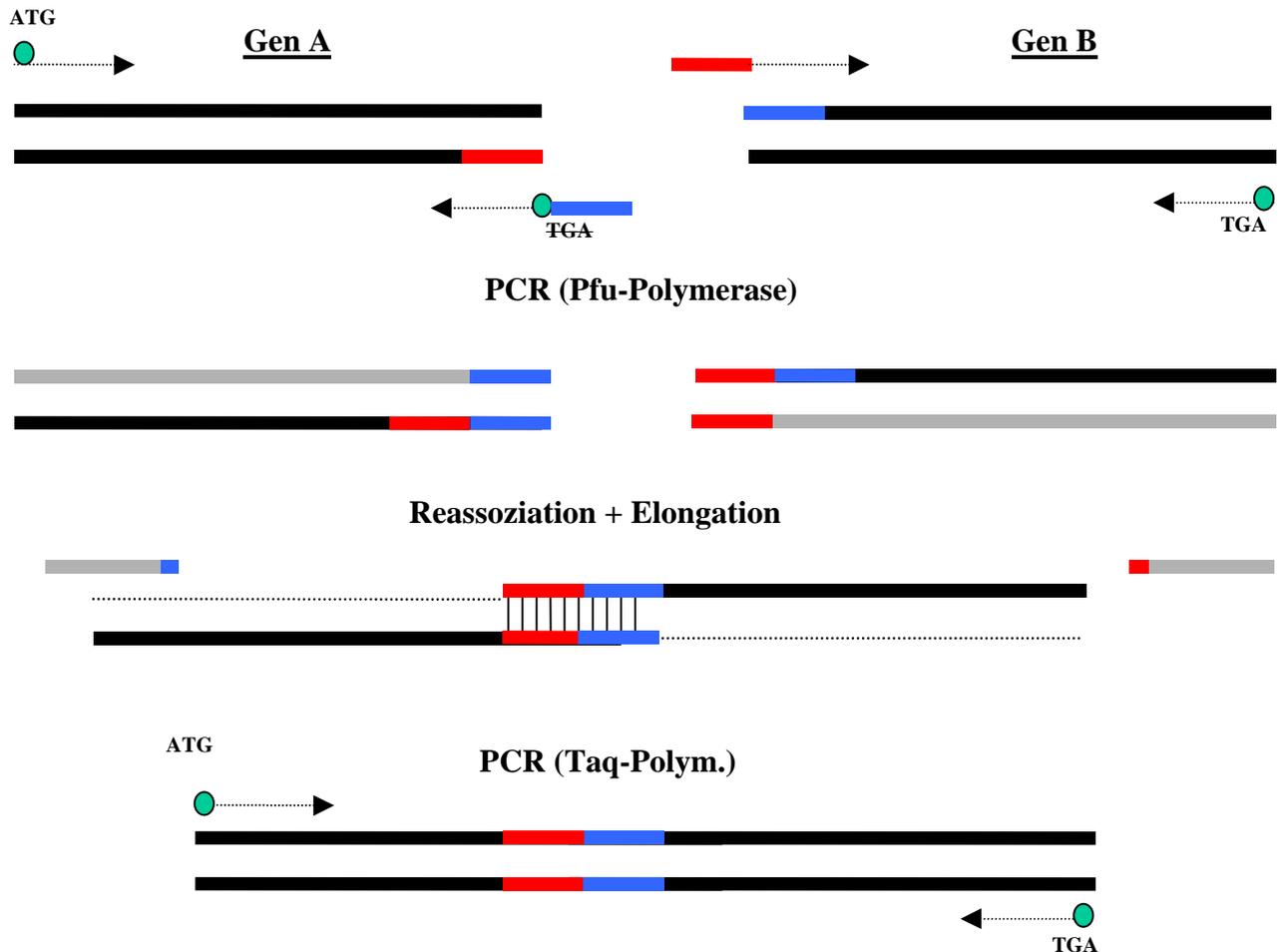


Abbildung 2.2: Strategie der rekombinanten PCR. Zueinander komplementäre Bereiche sind jeweils in der gleichen Farbe dargestellt.

### 2.3.3 Klonierung von DNA

#### 2.3.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

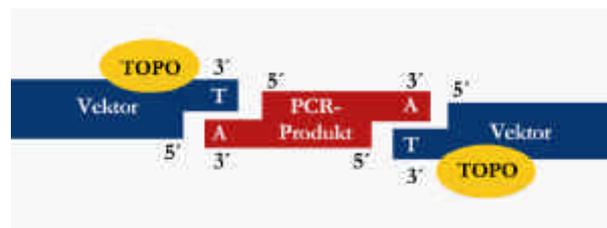
Eine einfache Methode zur Herstellung kompetenter Bakterien ist die Behandlung von *E. coli*-Zellen mit 0,1 M Calciumchlorid unter ständiger Kühlung. Die Transformations-effizienz einer Probe kompetenter Zellen beträgt  $5 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^7$  transformierte Kolonien pro  $\mu\text{g}$  Plasmid DNA und ist für „Routine-Klonierungen“ ausreichend.

Eine Einzelkolonie von *E. coli* XL1-blue Top 10F'-Zellen wurde von einer frischen LB-Tetracyclin-Platte (15 mg/ml) in eine 50 ml LB-Kultur überimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 bei 37 °C vermehrt. Nach Abkühlen der Bakterienkultur auf 4 °C wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 10 min bei 3000 Upm und 4 °C sedimentiert und in 10 ml eiskalter 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung aufgenommen. Sie wurden danach unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und in 2 ml 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert. Anschließend wurden

Proben von je 50 µl dieser Suspension mit 100 µl Glycerin versetzt und bei -70 °C gelagert. Die Kompetenz wurde durch Transformation der Zellen mit 1 µg eines gängigen Plasmids überprüft. Bei Klonierungen wurden 2 - 10 µl eines Ligationsansatzes (siehe 2.3.3.3) zu einer Probe kompetenter Zellen gegeben und für 30 min bei 4 °C belassen. Anschließend wurde die Suspension 30 sec bei 42 °C in einem Wasserbad inkubiert und wie unter 2.3.3.4 beschrieben weiter behandelt.

### 2.3.3.2 Klonierung von PCR-Produkten

Der Vektor pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO ist Bestandteil des Klonierungssystems „TA-TOPO Cloning Kit<sup>®</sup>“ der Firma Invitrogen. Dieses System wurde speziell zur schnellen Subklonierung der durch *Taq*-DNA-Polymeraseaktivität entstandenen Amplifikationsprodukte konstruiert. Das Enzym besitzt eine matrixunabhängige terminale Transferaseaktivität mit einer hohen Präferenz für dATP. Dadurch weisen die meisten 3'-Enden der PCR-Produkte ein überhängendes Adenin auf, während der linearisierte Vektor komplementär dazu ein überhängendes Thymin besitzt. An die freien Enden des Vektors ist eine Topoisomerase konjugiert, die die Durchführung der Ligation bei Raumtemperatur innerhalb von 5 Minuten erlaubt. Dazu wurde der Ansatz entsprechend der Angaben des Herstellers unmittelbar nach Beendigung der PCR-Reaktion zusammengestellt und 1 µl nach Abstoppen der Ligation für die anschließende Transformation eingesetzt. Die Abbildung 2.3 erläutert das Prinzip der TOPO-TA-Klonierung.



**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung der Polylinker-Region des Vektors pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO zur Verdeutlichung des Klonierungsprinzips. Die Topoisomerase ist gelb dargestellt.

Die Polylinker-Region des Vektors pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO (Abbildung 2.4) weist unterschiedliche Restriktionsschnittstellen auf und besitzt den Promotorabschnitt für die T7 RNA-Polymerase. Nach erfolgter Klonierung können beide DNA-Stränge der Insertion durch Nutzung von flankierenden Primern sequenziert werden.

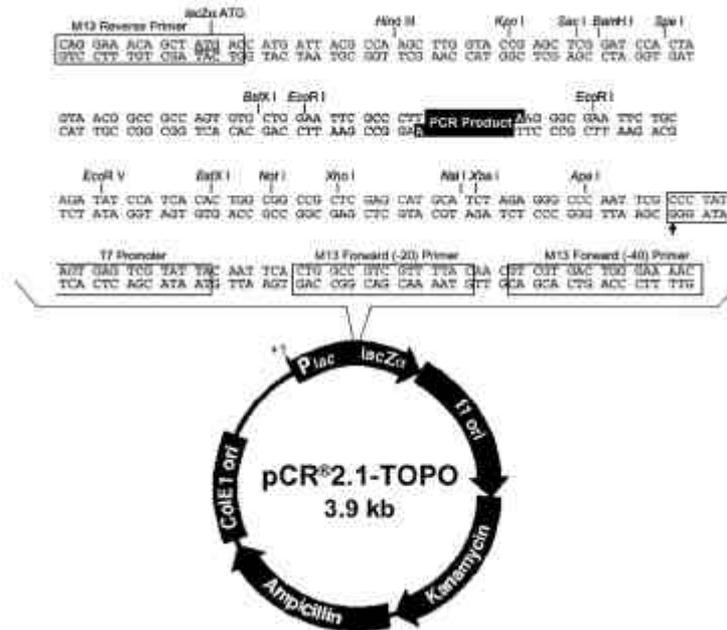


Abbildung 2.4: Aufbau des Vektors pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO. Vermerkt sind die Bereiche der beiden Resistenzgene, das Lactose Operon (P<sub>lac</sub> und lacZ $\alpha$ ), der Startpunkt für die Infektion mit einem Helferphagen (F1 ori) sowie der Replikationsstartpunkt für das Plasmid (ColE1 ori). Ebenfalls angegeben ist die Sequenz des Polylinkers mit den Positionen der Primer „M13 Reverse“, „M13-(20 und 40) Forward“ und die des T7-Promotors. Restriktionsschnittstellen und der Bereich für die Insertion des PCR-Produktes sind gekennzeichnet.

### 2.3.3.3 Standardverfahren zur Klonierung von cDNA-Fragmenten in Vektoren

Bei einer Ligationreaktion beeinflusst das molare Verhältnis von linearisiertem Vektor zu cDNA die Effizienz der Rekombination. Ein Mißverhältnis von Vektor zu cDNA fördert die unerwünschte Re-Ligation des Vektors und die Bildung von cDNA-Concatemeren. Der Hersteller des Ligationssystems (MBI Fermentas) empfiehlt für eine optimale Ligation ein Verhältnis von 1:1 bis 3:1 (cDNA zu Vektor). Die Berechnung der benötigten Menge an modifizierter cDNA in Relation zur eingesetzten Menge an linearisiertem Vektor erfolgte nach folgender Formel:

$$x \text{ ng cDNA} = \frac{V \cdot (\text{Länge cDNA [Bp]}) \cdot \text{ng Vektor}}{\text{Länge Vektor [Bp]}}$$

mit  $V$  = Verhältnis cDNA zu Vektor

Für die Ligation wurden Komponenten der Firma MBI Fermentas verwendet. Die Zusammenstellung des Reaktionsansatzes wurde entsprechend der Angaben des Herstellers vorgenommen.

<u>Ligationsansatz:</u>	2 µl	10 x Ligationspuffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM DTT, 5 mM ATP; pH 7,8)
	x µl	cDNA
	1 µl	50 ng modifizierter Vektor
	4 µl	50 % PEG 4000, nur bei „blunt-end“ Ligation mit bidest. Wasser auf 20 µl auffüllen
	4 µl	T4 DNA Ligase (1 Weiss U/µl)

Der Ansatz wurde kurz durchmischt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die T4-DNA-Ligase wurde anschließend für 5 min bei 75 °C inaktiviert und maximal 5 µl des Ansatzes für die nachfolgende Transformation eingesetzt.

#### 2.3.3.4 Transformation von *E. coli*

Als Bakterienstamm für die Klonierung diente der *E. coli* Stamm TOP10F', welcher als kompetente Zellen (One Shot™) mit dem TOPO TA-Klonierungssystem (Invitrogen) zur Verfügung gestellt wurde. Alternativ dazu wurden auch die in 2.3.3.1 beschriebenen Zellen verwendet. Der Bakterienstamm hat folgenden Genotyp: F' {lacI<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG.

Die Transformation kompetenter Zellen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen. Dazu wurden 1 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl einer Suspension von kompetenten Zellen vermischt und für 30 min im Eisbad inkubiert. Dann wurden die Bakterien einem Hitzeschock (42 °C für 30 sec) ausgesetzt. Nach erneuter Abkühlung im Eisbad wurde die Suspension mit 450 µl SOC-Medium bei 37 °C für 1 h mit 225 Upm geschüttelt. Proben wurden dann auf LB-haltigem Agar-Nährboden, welcher Ampicillin (50 µg/ml), IPTG (60 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) enthielt, ausgestrichen. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37 °C. Transformanden wurden durch die Ampicillin-Resistenz und die weiße Färbung ihrer Kolonien selektiert.

<u>SOC-Medium:</u>	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
<u>LB-Nähragar (pro Liter):</u>	10 g NaCl
	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	15 g Agar
	pH 7,5

Von weißen Kolonien wurden nach Über-Nacht-Kultivierung DNA-Minipräparationen hergestellt. Zur Charakterisierung der Insertion wurden 1 µg Plasmid-DNA eines jeden Klons mit geeigneten Restriktionsendonucleasen bei 37 °C für 1 h abgebaut (siehe 2.3.1.4.1). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Größenbestimmung mit der 1 kb DNA-Leiter (Gibco BRL) als Größenstandard.

### 2.3.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalyse von DNA wurde als Service-Leistung des SFB 251 in Anspruch genommen. Die Durchführung der Sequenzierung wurde freundlicher Weise von Susanne Michel, technische Angestellte des SFB 251, übernommen.

Zur Charakterisierung und Überprüfung von DNA-Fragmenten wurden diese in den Vektor pCR2.1-TOPO subkloniert. Die Polylinker-Region dieses Vektors trägt beidseitig Sequenzen zur spezifischen Bindung von gebräuchlichen Primer-Oligomeren (siehe Abbildung 2.4). Die Sequenzreaktionen erfolgten nach dem Protokoll des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ der Firma Amersham in einem Thermocycler (Primus, MWG-Biotech, Deutschland).

### 2.3.5 Computergestützte Charakterisierung von DNA-Sequenzen

DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm „PC/Gene“ (Intelligenetics, Genf, Schweiz) oder VectorNTI (InforMax Inc., MD, USA) analysiert. Homologien von Sequenzen wurden mit dem Blast-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) von NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland USA) ermittelt. Vergleiche auf

Nucleotideebene wurden mit der Computersoftware Clustal W 1.60 (Thompson *et al.*, 1994) erstellt.

## 2.4 Reporter-Systeme und Assays

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide sind meist nur als Teil-Sequenzen abgebildet. Ferner sind nur solche Restriktionsschnittstellen aufgeführt, die bei Klonierungsschritten genutzt wurden. Ein Verzeichnis von Internet-Adressen, die auf die Datensätze der vollständigen Sequenzen verweisen, ist im Anhang beigefügt.

### 2.4.1 Das $\beta$ -Glucuronidase-System (GUS-System)

Der GUS-Gen ist ein zuverlässiges System für den Nachweis von Promotoraktivität in pflanzlichen Zellen. Bei Expression des GUS-Gens kommt es zu einer Akkumulation aktiver Glucuronidase im Zytosol der Zellen. Der Vektor pBI221 (Clontech-ITC) enthielt bereits ein in Pflanzen voll funktionsfähiges Reporter-Gen, bestehend aus dem 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus (CaMV35S), dem GUS-Strukturgen (Jefferson *et al.*, 1986) und einem 300 bp-Element, welches das Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase-Gens vom *Agrobacterium*-Ti-Plasmid (NosT; Bevan *et al.*, 1983, Farrel *et al.*, 1990) enthält (Abbildung 2.5). Dieses Reporter-Gen wurde aus dem binären Vektor pBI121 (Jefferson *et al.*, 1987) über die flankierenden Restriktionsschnittstellen *Hind* III / *Eco*R I in den Vektor pUC19 eingefügt. Der selektive Marker für pBI221 ist die Ampicillin-Resistenz.

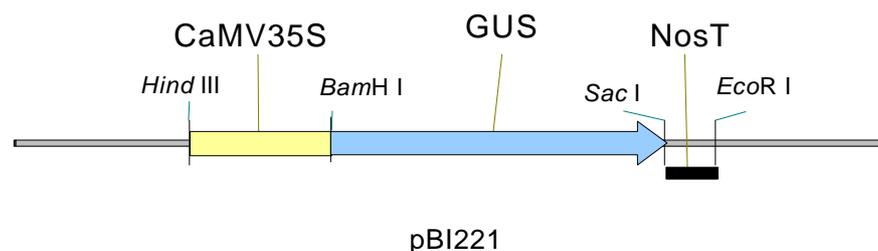


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der GUS-Kassette des Vektors pBI221 (Clontech). Die wichtigsten Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

#### 2.4.1.1 GUS-Assay

Zur Bestimmung der Promotoraktivität von Promotor-GUS-Genen wurde die  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität im Proteinextrakt fluorometrisch gemessen. Als Substrat diente 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (MUG), welches von  $\beta$ -Glucuronidase nach Hydrolyse zu 7-Hydroxy-4-Methylcoumarin (4-Methylumbelliferon; MU) umgesetzt wird.

Dieses Produkt der Enzymaktivität fluoresziert bei UV-Anregung (365 nm) im Blaulicht-Bereich (455 nm).

Zur Analyse wurden transient transformierte Protoplasten mit 300 µl GUS-Extraktionspuffer unter Kühlung mechanisch aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 Upm entfernt. Ein Teil des Überstandes diente zur Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bradford-Reagenz (Bradford, 1976). Einhundert µl des verbliebenen Proteinextraktes wurden mit 50 µl MUG-Lösung (2 mM MUG in Protein-Extraktionspuffer) gemischt und bei 37 °C inkubiert. Nach 2 min wurden 75 µl entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 1250 µl 0,2 M Na<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>) abgestoppt. Die verbliebenen 75 µl wurden insgesamt 30 min bei 37 °C belassen, bevor die Reaktion ebenfalls durch Zugabe von 1250 µl 0,2 M Na<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>) beendet wurde. Die Proben wurden bis zur Analyse mit einem LS30-Spektralphotometer (Perkin-Elmer) bei 4 °C gekühlt. Die ermittelten Werte der relativen Fluoreszenz wurden durch Subtraktion des 2-Minuten-Wertes bereinigt. Als relative Meßgröße für die GUS-Aktivität diente die Fluoreszenz des gebildeten MU.

GUS-Extraktionspuffer:                    0,1 M KPO<sub>4</sub>, pH 7,8  
    2 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
    2 mM DTT  
    5 % Glycerol

## **2.4.2 Das Luciferase-System**

Als weiteres Reportersystem kam das Luciferase-Gen zum Einsatz. Luciferase ist ein monomeres Protein von 61 kDa und ist ohne post-translationelle Modifikationen aktiv (Ow *et al.*, 1986). Als Substrat diente Luciferin, welches in Anwesenheit von ATP oxidiert wird. Die dabei entstandene Chemilumineszenz wurde anhand eines Luminometers detektiert.

### **2.4.2.1 Luciferase-Assay**

Zum Nachweis der Luciferase-Aktivität wurde das „Luciferase Assay-Reagent“ der Firma Promega verwendet. Das Reagenz enthielt das Substrat Luciferin, sowie ATP und andere Komponenten in unbekanntem Konzentrationen.

Zur Extraktion von löslichem Gesamtprotein wurden transformierte Protoplasten mit 300 µl GUS-Extraktionspuffer unter Kühlung mechanisch aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 Upm entfernt. Ein Teil des

Überstandes diente zur Bestimmung des Proteingehalts mittels Bradford-Reagenz (Bradford, 1976).

In einem Luminometer-Röhrchen (Sarstedt, 55.476) wurde 1 µl des Proteinextraktes mit 50 µl Reagenz vermischt und unverzüglich in ein Luminometer (Lumat IB9501 Berthold, Wildbau, Deutschland) gegeben. Nach einem Messintervall von 10 sec wurde die Anzahl an emittierten relativen Lichteinheiten (RLU) notiert.

### 2.4.3 Das Grün-fluoreszierende-Protein (GFP) -System

Das GFP-Gen (englisch: „green fluorescence protein“) wurde ursprünglich aus *Aequoria victoria* isoliert und dient als Reporter für *in vivo* Studien auf Zellebene bis hin zu Gesamtpflanzen. Die fluorophore Gruppe (ein p-Hydroxybenzylidenimidazolinon Chromophor) geht aus einer Zyklisierung der Aminosäuren Serin<sup>65</sup>, Tyrosin<sup>66</sup> und Glycin<sup>67</sup> mit anschließender 1,2-Dehydrogenierung des Tyrosins hervor. Das Anregungsspektrum des GFPs weist Maxima bei 396 (UV-Licht) und 475 nm (blaues Licht) auf. Die resultierende grüne Fluoreszenz hat ihr Maximum bei 508 nm. Durch Aminosäuresubstitutionen in der Chromophorregion konnten die spektralen Eigenschaften des GFP variiert und negative Eigenschaften wie Photoisomerisation und Bleichung reduziert werden. In dieser Arbeit wurde das im Vektor pUC118 vorliegende „sm RS-GFP“ (englisch: soluble modified red-shifted GFP) verwendet (ABRC, USA; Abbildung 2.6) Die Anregung erfolgte durch Blaulicht (470 - 490 nm). Die emittierte Fluoreszenz wurde im Bereich von 500 - 520 nm detektiert.

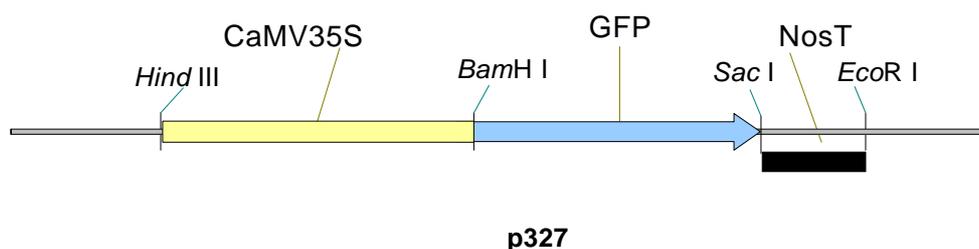


Abbildung 2.6: Linearisierte Darstellung des Vektors p327 mit pflanzlicher GFP-Reporterkassette und den wichtigsten Restriktionsschnittstellen.

#### 2.4.3.1 Detektion von GFP in pflanzlichen Zellen und Geweben

##### 2.4.3.1.1 Anfertigung von Dünnschnitt-Präparaten

Sterilisierte Samen von *A. thaliana* wurden auf sterilem wassergetränktem Filterpapier (Whatman 3MM) ausgestreut und in Petrischalen 3 Tage im Licht inkubiert. Nach erfolgter Quellung wurden jeweils 4 - 5 Samen mit Einbettungsmedium (Micron) vermischt und auf

einem Aluminium-Objektträger auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Nach Einspannen des Objektträgers in ein Mikrotom (Micron, HM 500 M) wurden unter permanenter Kühlung Präparate mit einer Schichtdicke von  $5\text{ }\mu\text{m}$  hergestellt und auf einem Glas-Objektträger plziert. Anschließend erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung.

#### 2.4.3.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Bilderfassung von transformiertem Pflanzenmaterial erfolgte mit einem Kamerasystem der Firma Intas (Intas XC-003P), das auf einem Stereomikroskop (MZ FLIII; Leica, Filtersatz *GFP*) bzw. einem Mikroskop (Axioplan 135, Filtersatz 09; Zeiss) montiert war. Die Verwendung der Filtersätze ermöglichte eine Fluoreszenzanregung im Bereich von  $450 - 488\text{ nm}$  und die Beobachtung der charakteristischen GFP-Fluoreszenz bei  $500 - 520\text{ nm}$ .

### 2.5 Ermittlung der relativen Promotoraktivität

Bedingt durch die Konzeption des dualen Vektorsystems wurden zur Berechnung der relativen Promotoraktivität die Rohdaten der GUS- bzw. Luciferase-Assays herangezogen.

Die relative Promotoraktivität (rel. Pa) ergab sich aus: 
$$rel.Pa = \frac{GUS\_Signal}{Luc\_Signal}$$

### 2.6 Transiente Transformation von BY2-Protoplasten mittels PEG

#### 2.6.1 Isolierung von Protoplasten

Enzym-Lösung:

- 2 % Cellulase OnozukaRS (DUCHEFA)
- 0,1 % Pectolyase (DUCHEFA)
- 0,4 M Mannitol
- pH 5,5 (1 M KOH)
- Sterilfiltration (Porengröße  $0,2\text{ }\mu\text{m}$ )

Waschlösung W5:

- 154 mM NaCl
- 125 mM  $\text{CaCl}_2$
- 5 mM KCl
- 5 mM Saccharose
- 0,1 % MES
- pH 5,6 - 6,0 (1 M KOH)
- autoklavieren

<u>Mannitol-Magnesium-Medium:</u>	450 mM Mannitol
	15 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,1 % MES
	pH 5,6 (1 M KOH)

Die Protoplasten wurden aus einer drei Tage alten BY2-Suspensionskultur isoliert (siehe 2.1.2). Entsprechend der gewünschten Anzahl an Protoplasten wurden 10 - 30 ml der Kultur entnommen, mit Hilfe eines Siebes (100 µm) vom Medium getrennt und restliches Medium durch Waschen mit 0,45 M Mannitol entfernt. Die Zellen wurden anschließend in eine mit 10 ml Enzymlösung gefüllte Petrischale (Durchmesser 9 cm) transferiert, die auf einem rotierenden Schüttler bei 40 Upm und 28 °C bis zu 4 h im Dunkeln belassen wurde. Der vollständige Abbau von Zellwandmaterial führte zu kugelförmigen Zellen und wurde mikroskopisch überprüft. Die Protoplasten-Suspension wurde auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt (je 5 ml), mit 5 ml Waschlösung W5 durch vorsichtiges Schwenken versetzt und bei 850 Upm für 2 min zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig dekantiert und die Protoplasten sofort in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die beiden Suspensionen wurden vereinigt und mit W5-Waschlösung auf 10 ml aufgefüllt. Die Anzahl an Protoplasten pro µl wurde mikroskopisch in einer Zählkammer (Hartnack) bestimmt und nach erneuter Sedimentation durch Resuspendieren in Mannitol-Magnesium-Medium auf  $2 \times 10^6$ /ml eingestellt. Mit der Transformation wurde unverzüglich begonnen.

### 2.6.2 Transiente Transformation

<u>Polyethylenglycol-Lösung:</u>	25 % PEG 1450
	100 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	450 mM Mannitol
	20 mM HEPES
	pH 6 (nach 1 h, 1 M KOH)

<u>Expressionsmedium:</u>	wie BY2 Zell-Suspensionskultur-Medium jedoch ohne 2-4-D (2.1.2)
	Osmolalität = 650 mMol/kg (Mannitol)

Die einzubringende Plasmid-DNA wurde durch Plasmid-Midi-Präparation isoliert (siehe 2.3.1.1.2), einer zusätzlichen Ethanol-Präzipitation unterworfen (siehe 2.3.1.2) und mit H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Für einen Transformationsansatz wurden 600 µl PEG-Lösung, verteilt auf 5 Tropfen, in ringförmiger Anordnung auf eine Petrischale (Durchmesser 9 cm) gegeben. Anschließend wurden 330 µl Protoplastensuspension in die Mitte des Rings gegeben und mit 20 - 50 µl der DNA-Lösung vermischt. Mit einer 1 ml-Pipettenspitze erfolgte das sukzessive Einrühren der PEG-Tropfen in das Protoplasten-DNA-Gemisch und eine 20-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurden aufeinanderfolgend erst 1 ml, dann 9 ml W5-Waschlösung zugegeben, die Protoplasten durch vorsichtiges Schwenken der Petrischale vom Boden abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 850 Upm für 4 min wurde der Überstand abgeschüttet, die Protoplasten im verbleibenden Medium resuspendiert und in 5 ml Expressionsmedium aufgenommen. Die Inkubation der transformierten Protoplasten erfolgte in mit Parafilm verschlossenen Petrischalen (Durchmesser 4 cm) für 18 - 24 h im Dunkeln. Zur Durchführung der verschiedenen Assays und Detektionsmethoden wurde die Protoplasten-Suspension anschließend mit 5 ml W5-Waschlösung gemischt, 4 min bei 850 Upm sedimentiert und nach Entfernung des Überstandes in GUS-Extraktionspuffer (siehe 2.4.1.1) oder im Falle einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse in 1 ml W5-Lösung resuspendiert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Promotor-Deletions-Studien (siehe 3.2.6) und die Analyse von Phytohormon-Wirkungen auf NtAQP1-Promotorbereiche erforderten eine Vielzahl von Transformationsansätzen innerhalb eines einzelnen Experimentes. Um die Protoplasten möglichst nur kurze Zeit dem Mannitol-Magnesium-Medium auszusetzen, wurde die weitere Vorgehensweise beschleunigt. Dazu wurden die oben genannten Volumina zur Durchführung der Transformation vervierfacht. Weiterhin wurde das Einrühren der PEG-Lösung sowie der Gebrauch von Petrischalen durch vorsichtiges Schwenken und den Einsatz von 50 ml Falcon-Röhrchen ersetzt. Die Parameter für die Aufnahme im Expressionsmedium sowie die nachfolgende Behandlung der Protoplasten wurden jedoch beibehalten.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Vergleichende Gaswechsellmessungen**

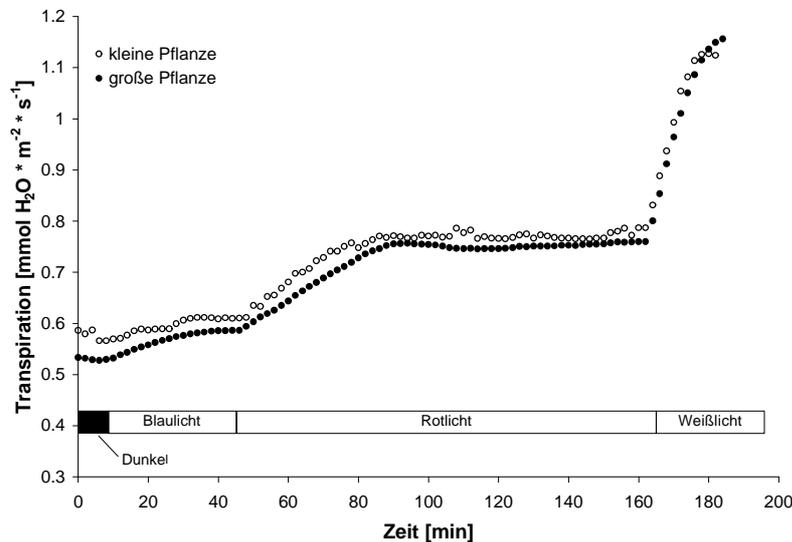
#### **3.1.1 Anpassung der Meßtechnik an *Arabidopsis thaliana***

Bei ausreichender Wasserversorgung der Pflanze hat die Öffnungsweite der Stomata einen direkten Einfluß auf die Transpirationsrate des Blattes. Die Regulation der Stomata wird durch eine Vielzahl von Faktoren direkt oder indirekt beeinflusst. Im Falle der hier beschriebenen Arbeit sollte die Funktion von Aquaporinen als möglicher Teil von Stomamechanismen eingehender untersucht werden.

Der Einsatz hochempfindlicher Infrarot-Gasanalytoren ermöglicht die Messung der abgegebenen Wassermenge, bezogen auf Blattfläche und Zeit. Änderungen der Stomaöffnungsweiten äußern sich somit als Änderungen der gemessenen Transpirationsraten. Konventionelle Gaswechsel-Küvetten ermöglichen das Einspannen eines einzelnen Blattes. Die gemessene Blattfläche beträgt zwischen 2,5 und 10 cm<sup>2</sup>. Aufgrund der geringen Blattgröße von *A. thaliana* und ihrer rosettenförmigen Anordnung war der Einsatz solcher Gaswechsel-Küvetten nicht möglich. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein neuer Küvetten-Typ konstruiert, der es erlaubt, den kompletten oberirdischen Teil der Pflanze in die Gaswechsellmessung mit einzubeziehen (siehe 2.2.1). Dieser experimentelle Aufbau hatte zwei Vorteile: Zum einen wurden durch die Vergrößerung der Blattfläche die gemessenen Signale verstärkt, zum anderen konnte durch die Form der Küvette das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis entscheidend verbessert werden.

Die Blattfläche stellte bei der Berechnung der Transpirationsraten eine feste Bezugsgröße dar. Obwohl die Flächen der einzelnen Rosettenblätter nach einer Messung bestimmt werden konnten, war es aufgrund von Selbstbeschattung nicht möglich, die Flächen der tatsächlich belichteten Blätter zu bestimmen. Vorbereitende Experimente sollten klären, inwieweit sich Unterschiede in der Blattfläche auf die Vergleichbarkeit der Transpirationmessungen auswirken. Hierzu wurde der Einfluß der Blattfläche auf die Öffnungskinetik der Stomata bei Belichtung mit unterschiedlichen Lichtqualitäten und -quantitäten bestimmt. Eine kleine und eine große Pflanze (3 cm bzw. 8 cm Durchmesser) wurden in paralleler Anordnung gemessen. Abbildung 3.1 zeigt die lichtinduzierten Änderungen der Transpirationsraten, bezogen auf die Gesamt-Blattflächen. Es konnten identische Öffnungskinetiken unter verschiedenen Belichtungsbedingungen festgestellt

werden. Demzufolge wirkten sich mögliche Unterschiede zwischen belichteter Blattfläche und tatsächlicher Blattfläche nicht auf die relativen Änderungen der Transpirationsraten aus. Somit war es möglich, unter Einbeziehung der Blattflächen unterschiedlich große *A. thaliana*-Pflanzen miteinander zu vergleichen.



**Abbildung 3.1:** Messung der Transpiration von *A. thaliana*. Parallel-Messungen einer kleinen und einer großen Pflanze (3 cm bzw. 8 cm Durchmesser). Blaulicht =  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Rotlicht =  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Weißlicht =  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Anhand dieser Vorversuche konnte davon ausgegangen werden, daß durch vergleichende Transpirationmessungen Unterschiede zwischen zwei *Arabidopsis*-Linien erkennbar werden, wenn der Stomaöffnungsmechanismus verändert ist.

### 3.1.2 Belichtungsprogramm

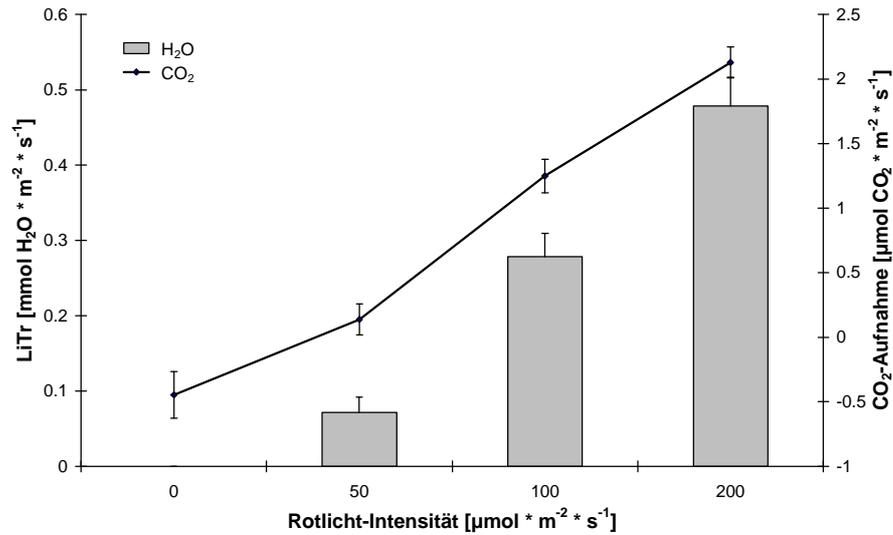
Ein wichtiger Faktor zur Regulation der Stomata ist das Licht. Die Wahrnehmung erfolgt durch zelluläre Photorezeptorsysteme, die mit zwei Signaltransduktionswegen interagieren. Photosynthetisch aktive Strahlung (engl.: photosynthetic active radiation, PAR) führt zu einer Signaltransduktion, die durch photosynthetische Reaktionen in Schließzell-Chloroplasten vermittelt wird. Der für dieses Signal wesentliche Spektralbereich von PAR ist Rotlicht. Blaues Licht führt zu der Induktion eines anderen Signalweges. Das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten dieser Reizleitungskette ist jedoch bisher noch kaum verstanden. Die Beteiligung von Blaulicht wurde unter anderem von Zeiger (1990) demonstriert, der zeigte, daß unter Berücksichtigung der Lichtintensitäten die durch Rotlicht hervorgerufene Stomaöffnung viel geringer ist, als die durch Weißlicht induzierte. Später konnte außerdem gezeigt werden, daß Schließzell-Protoplasten einige für Blaulicht spezifische Reaktionen zeigen. Nach Induktion wird eine Protonenpumpe aktiviert, es kommt zu einer Hyperpolarisation der Zytoplasmamembran und damit zu einem Ionen-

Influx sowie zu Stärke-Spaltung und der Synthese von Malat (Ogawa *et al.*, 1978; Assmann *et al.*, 1985; Tallman und Zeiger, 1988; Hedrich und Schroeder, 1989; Talbot und Zeiger, 1993). Diese Blaulicht-induzierten Vorgänge führen zu einer Änderung des osmotischen Potentials der Zelle und zur Stomaöffnung aufgrund des nachfolgenden Wassereinstroms in die Schließzellen.

Ein experimenteller Ansatz zur getrennten Analyse der zwei Licht-Signaltransduktionswege wurde (1978) von Ogawa *et al.* entwickelt. Die spezifischen Antworten auf Rot- und Blaulicht wurden durch eine Doppelbestrahlung (dual beam protocol) erzielt, wobei eine anfängliche Rotlichtbestrahlung und nach abgeschlossener Öffnungsreaktion eine zusätzliche Belichtung mit schwachem Blaulicht erfolgte. Die daraufhin stattfindende zweite Reaktion lief somit in einem Rotlicht-Hintergrund ab und wurde als Blaulicht-spezifisch definiert. Stomata, die sich unter Rotlicht zu einem gewissen Grad öffnen, erfahren infolge einer zusätzlichen Blaulichtbestrahlung die oben erwähnten spezifischen Reaktionen und öffnen sich weiter (Ogawa *et al.*, 1978; Assmann, 1988). Die bisher beschriebenen Untersuchungen mit diesem experimentellen Ansatz wurden größtenteils mit der Saubohne *Vicia faba* durchgeführt. Ob diese Methode auch bei *A. thaliana* anwendbar ist, sollte geklärt werden.

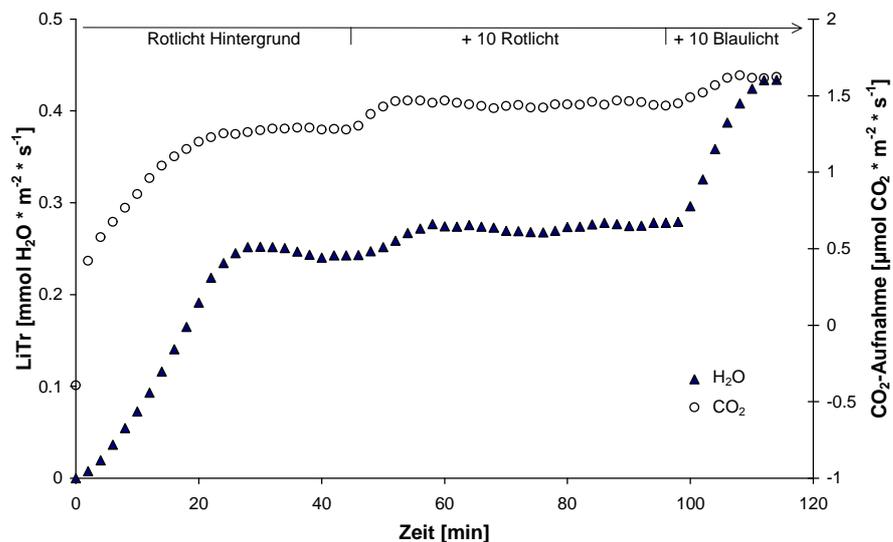
Um die spezifischen Stoma-Antworten auf Rot- und Blaulicht zu erhalten, wurde das Doppelbestrahlungs-Protokoll von Ogawa *et al.* (1978) an *A. thaliana* angepaßt. Die erhaltenen Werte von den Transpirationsraten während der Dunkelphase des Versuchs wurden von den Werten nach entsprechender Belichtung abgezogen und die resultierenden Daten als Licht-induzierte Transpirationsraten (LiTr) bezeichnet.

In einem ersten Schritt wurde die geeignete Lichtintensität der Rotlichtbestrahlung ermittelt. Als Kriterien hierfür galten eine signifikante LiTr und eine adäquate photosynthetische CO<sub>2</sub>-Aufnahme. Gleichzeitig sollte die Bestrahlung jedoch so schwach sein, daß keine meßbare Temperaturänderung der Blattoberfläche stattfindet. Abbildung 3.2 zeigt die LiTr und CO<sub>2</sub>-Aufnahme in Abhängigkeit von der Rotlicht-Intensität. Ab 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> kam es zu einem Anstieg der Blattemperatur, sodaß eine Rotlicht-Intensität von 80 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> als optimal ermittelt wurde.



**Abbildung 3.2:** Licht-induzierte Transpiration und CO<sub>2</sub>-Aufnahme von *A. thaliana* Pflanzen (Ecotyp Col). Gleichgewichtszustand der Antworten auf steigende Rotlicht-Intensitäten. Die Daten sind Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (SE).  $n = 4$ .

Basierend auf dieser Rotlicht-Intensität als Hintergrundbestrahlung wurde der Effekt von zusätzlichen  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Licht untersucht. Wie aus Abbildung 3.3 hervorgeht, führte die Zugabe von  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Rotlicht zu einem geringen Anstieg der LiTr und zu einer geringen Zunahme der CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate. Nach Zugabe von  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Blaulicht kam es jedoch zu einem sehr starken Anstieg der LiTr, während die CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate verhältnismäßig wenig zunahm.



**Abbildung 3.3:** Licht-induzierte Transpiration und CO<sub>2</sub>-Aufnahme von *A. thaliana* (Col) während eines Doppelbestrahlungs-Experimentes. In einem Rotlicht-Hintergrund von  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  wurden zusätzlich jeweils  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Rotlicht oder  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Blaulicht gegeben.

Somit verursachten  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blaulicht, gegeben zu einem Hintergrund von  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Rotlicht, nur einen geringen Anstieg der photosynthetischen Aktivität, führten jedoch zu einer spezifischen und überproportionalen zusätzlichen Öffnung der Stomata.

Anhand dieser Voruntersuchungen wurde deutlich, daß Gaswechsellmessungen an *A. thaliana* mit den speziell konstruierten Meßküvetten möglich ist. Ferner zeigt *A. thaliana* eine Blaulicht-abhängige Stomaöffnung, wie sie schon für *Vicia faba* und andere Pflanzenspezies beschrieben wurde. Durch Verwendung des Doppelbestrahlungs-Protokolls ist eine Analyse der Stomamechanismen hinsichtlich unterschiedlicher Lichtperzeptionssysteme oder Signaltransduktionswege möglich. Der zeitliche Verlauf der Lichtgaben wurde so gewählt, daß die maximalen Stoma-Antworten sowohl auf Rot- als auch auf Blaulicht konstante Werte erreichen konnten.

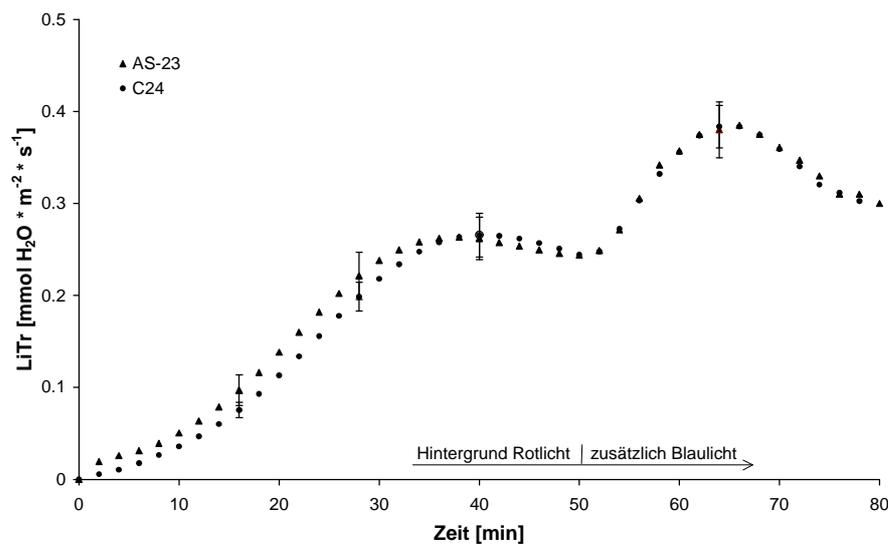
### 3.1.3 Gaswechselformen an PIP1b-Antisense-Pflanzen



**Abbildung 3.4:** Histologische GUS-Färbung der Blatt-Unterseite einer transgenen PIP1b-Promotor-GUS-Pflanze (aus Kaldenhoff *et al.*, 1995).

Transgene *A. thaliana*-Pflanzen, die ein PIP1b-Promotor-GUS Konstrukt tragen, zeigen starke GUS-Aktivität in Schließzellen (Abbildung 3.4). Dies gab Anlaß zu der Vermutung, daß PIP1b an der Stomabewegung beteiligt ist. Um die Relevanz des PIP1b-Aquaporins für den Stomamechanismus eingehender zu untersuchen, wurde eine transgene Linie verwendet, die durch die Transkription einer PIP1b-spezifischen Antisense-mRNA einen sehr geringen PIP1b-Proteingehalt aufweist. Die parallele Messung der

Transpirationsraten von Antisense- und Wildtyp-Pflanzen sollte eventuell vorhandene Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Stomaöffnung aufzeigen.



**Abbildung 3.5:** LiTr von *A. thaliana*. Wildtyp-Pflanzen (C24) im Vergleich mit der Antisense-Linie AS-23. Belichtet wurde mit  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Rotlicht und nach 50 min mit zusätzlichen  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blaulicht. Die Daten sind MW  $\pm$  SE zu aussagekräftigen Zeitpunkten der Messungen. n = 8 (C24), n = 9 (AS-23).

Wie aus der Abbildung 3.5 ersichtlich wird, zeigen unter den hier gewählten Bedingungen sowohl die Antisense-Pflanzen als auch die verwendeten Kontrollpflanzen vergleichbare Stomaöffnungs-Kinetiken. Der Antisense-Effekt – verringerter Gehalt an PIP1b-Protein in der Pflanze – hat demnach keine Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Stomaöffnung. Dies gilt sowohl für den Rot- als auch für den Blaulicht-abhängigen Öffnungsmechanismus.

### 3.1.4 Weitere Untersuchungen zur Regulation der Stomaöffnung

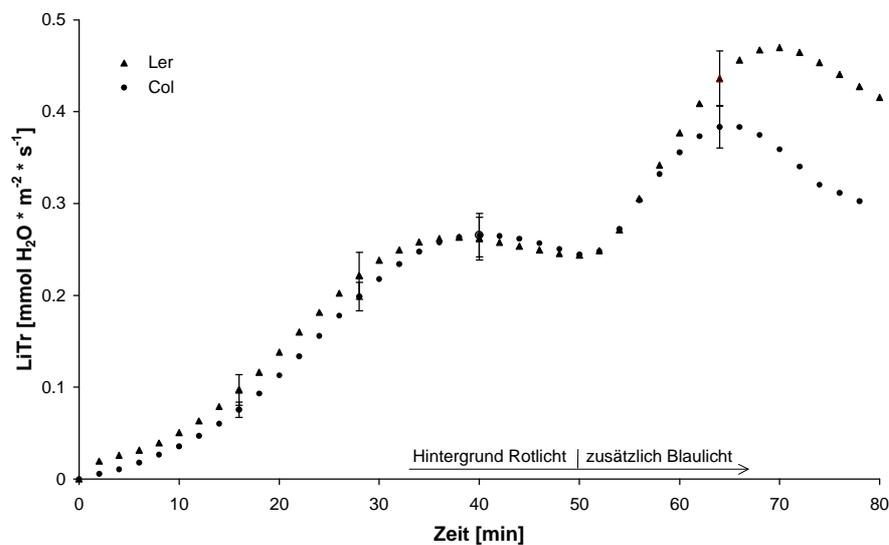
Die in dieser Arbeit entwickelte Meßmethode ermöglichte eine detaillierte Analyse der Stomaöffnungsmechanismen von intakten *A. thaliana*-Pflanzen. Das Ergebnis der oben beschriebenen Antisense-Experimente wies nicht darauf hin, daß Wasser als limitierender Faktor anzusehen ist, bzw. daß bei den Antisense-Pflanzen eine mechanische Barriere für den Wassertransport in die Schließzellen existiert. Aufgrund der zur Verfügung stehenden methodischen Mittel wurde die Zielsetzung der Arbeit um die Suche nach Faktoren, die die Stomaöffnung beeinflussen, erweitert. Hierfür wurden mutagenisierte *A. thaliana*-Linien verwendet, deren jeweilige Mutation Licht- oder Phytohormon-induzierte Signalwege betrifft (Tabelle 3-1). Durch die Auswahl eines breiten Spektrums von Phytohormon-Mutanten sollten verschiedene Signaltransduktionswege erfaßt werden. Ausgewählt wurden die Signalwege für ABA, das ein Schließen der Stomata auslöst (Schroeder und Hagiwara, 1989), für Auxin, für das eine stomaöffnende Wirkung beschrieben ist (Marten *et al.*, 1991) und für Ethylen, dessen Wirkung bisher nicht eindeutig mit einem Stomamechanismus in Verbindung gebracht werden konnte. Zur Analyse der Licht-gesteuerten Signalwege wurden Mutanten der Rotlicht-abhängigen Phytochromsysteme und Mutanten unterschiedlicher Blaulichtrezeptoren ausgewählt.

**Tabelle 3-1: Liste der untersuchten *A. thaliana*-Mutanten. Alternative Linien-Bezeichnungen in Klammern. +: Mutante zeigt eine mit dem Wildtyp vergleichbare Transpirationskinetik. --: Abweichende Kinetik. n: Anzahl der untersuchten Einzelpflanzen.**

Signalweg / Rezeptor	Mutante / genetischer Hintergrund	Transpiration wie Wildtyp
ABA	<i>abi1-1</i> / Ler	-- / n=8
	<i>abi3-1</i> / Ler	+ / n=8
	<i>aba3-2</i> / Ler	-- / n=10
Auxin	<i>axr1-3</i> / Col	-- / n=11
	<i>axr2</i> / Col	+ / n=10
	<i>aux1-7</i> / Col	+ / n=12
Ethylen	<i>eto1-1</i> / Ler	+ / n=10
	<i>ein1-1</i> / Ler	+ / n=10
Phytochrome	<i>hy1</i> / Ler	+ / n=10
	<i>hy3 (phyB)</i> / Ler	+ / n=12
	<i>phyA-103</i> / Col	-- / n=10
Blaulicht	<i>hy4 (cry 1)</i> / Ler	+ / n=12
	<i>nph1-5</i> / Col	+ / n=13
	<i>fha-1 (cry2)</i> / Ler	+ / n=10
	<i>npq1-2</i> / Col	+ / n= 5

Den verwendeten Mutanten lagen zwei genetisch verschiedene *A. thaliana*-Ecotypen - Columbia (Col) und Landsberg erecta (Ler) - zugrunde. Um eventuelle Unterschiede zwischen diesen beiden Wildtyp-Linien beurteilen zu können, befaßten sich die ersten Experimente mit einem Vergleich der Stomaöffnungskinetiken dieser zwei Linien.

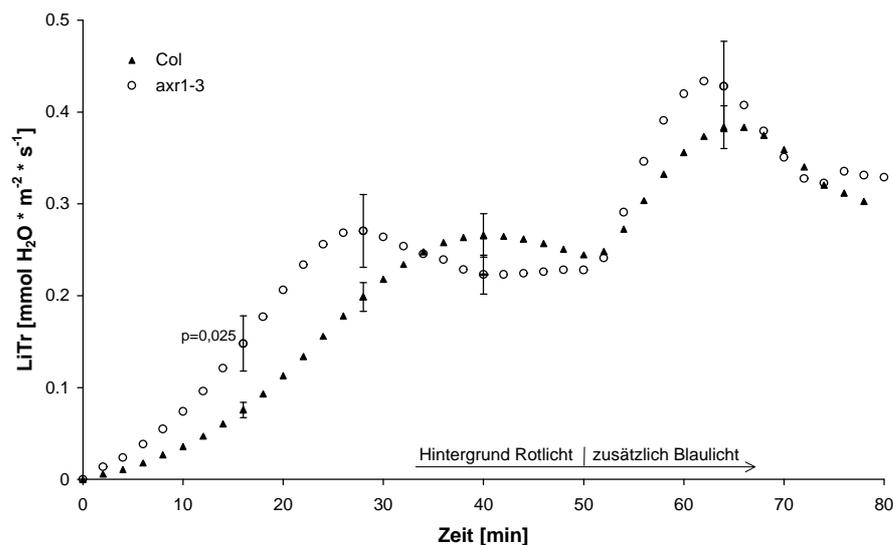
Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer LiTr während der Bestrahlung mit zusätzlichem Blaulicht. Aus diesem Grund wurden bei den weiteren Experimenten die Mutanten mit dem jeweils zugrundeliegenden Wildtyp verglichen.



**Abbildung 3.6:** Vergleichende Messungen der LiTr von zwei unterschiedlichen *A. thaliana*-Wildtyp-Ecotypen Ler und Col. Belichtet wurde mit  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Rotlicht und zusätzlichem  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blaulicht wie angegeben. Die Daten sind  $\text{MW} \pm \text{SE}$  zu aussagekräftigen Zeitpunkten der Messungen.  $n = 10$  (Ler),  $n = 12$  (Col).

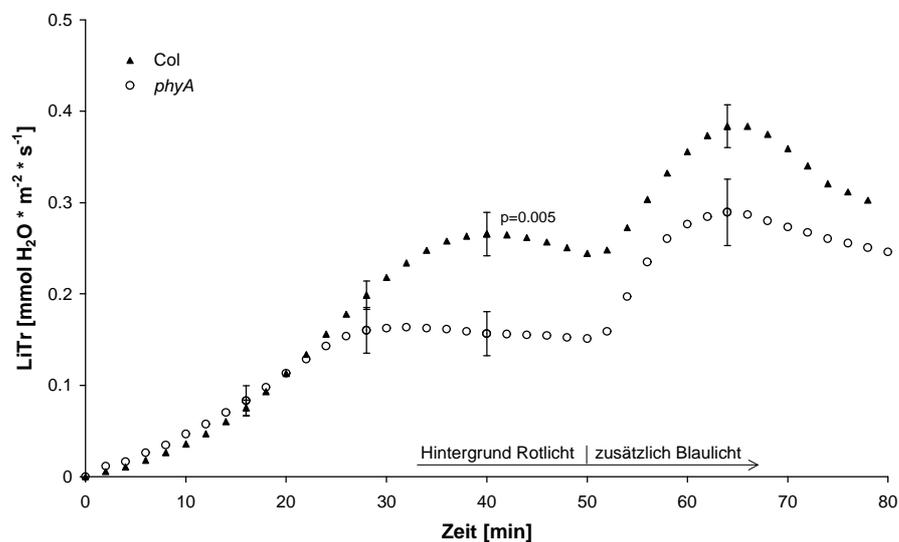
Im folgenden werden Ergebnisse aufgeführt, die auf eine abweichende Regulation der Stomaöffnung schließen lassen.

Die Mutante *axr1-3* zeigt morphologische Defekte, die auf eine verringerte Sensibilität gegenüber Auxin schließen lassen (Estelle und Sommerville, 1987). Das AXR1-Genprodukt wird für eine normale Auxin-Wirkung in der gesamten Pflanze benötigt (Lincoln *et al.*, 1990). *Axr1-3* stellt die am wenigsten morphologisch veränderte Linie unter den *axr1*-Mutanten dar und wurde aus diesem Grund für die Gaswechsellmessungen ausgewählt. Die Messungen zeigten eine schnellere Transpirationszunahme als Antwort, sowohl auf Rot- als auch auf Blaulicht (Abbildung 3.7). Die Transpirationsrate der Mutante im Rotlicht war in der Anfangsphase signifikant höher ( $p=0,025$ ) als beim Wildtyp, und erreichte ihr Maximum ca. 10 min früher. Im weiteren Verlauf sank die Transpirationsrate unter die der Kontrolle und pendelte sich bei Ablauf der alleinigen Rotlichtbestrahlung wieder auf einen normalen Zustand ein. Die Blaulicht-induzierte Antwort erschien ebenfalls etwas früher und war in ihrer Ausprägung größer.



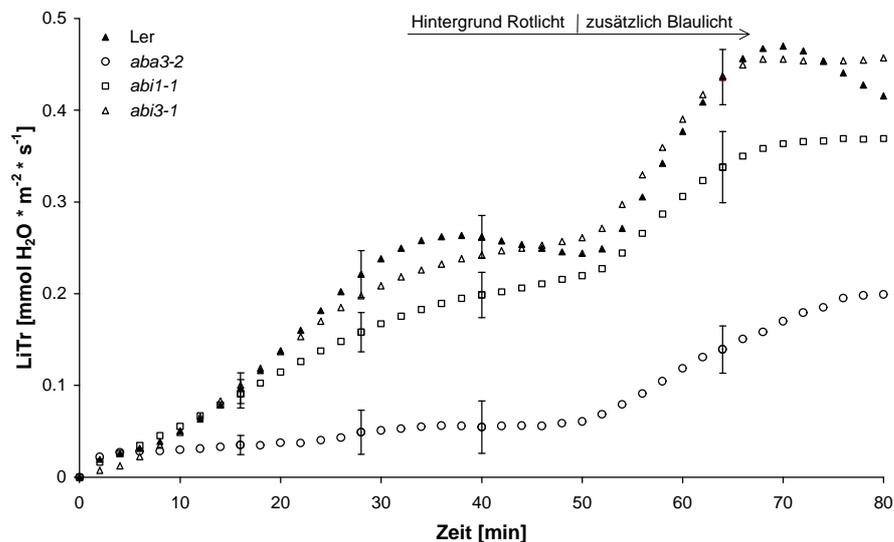
**Abbildung 3.7:** Vergleichende Messungen der LiTr von der Mutante *axr1-3* und des entsprechenden Wildtypes Col. Belichtet wurde mit  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Rotlicht und zusätzlich  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blaulicht wie angegeben. Die Daten sind  $\text{MW} \pm \text{SE}$  zu aussagekräftigen Zeitpunkten der Messungen.  $n = 11$  (*axr1-3*),  $n = 12$  (Col).

Die Mutante *phyA-103* bildet mit dem Wildtyp vergleichbare Mengen an Phytochrom A-Protein, das jedoch aufgrund der Mutation regulatorisch inaktiv ist (Parks und Quail, 1993). Von den Auswirkungen dieser Mutation schien die Rotlicht-abhängige Stomaöffnung betroffen zu sein (Abbildung 3.8). Zu Beginn der Bestrahlung glich die Transpirationsrate der Mutante noch der der Kontrolle, erreichte ihren Gleichgewichtszustand jedoch erheblich früher. Nach Abschluß der Reaktion auf Rotlicht zeigte *phyA-103* eine stark verringerte LiTr. Die hohe Signifikanz ( $p=0,005$ ) wies auf eine reduzierte Rotlicht-Antwort hin. Basierend auf der reduzierten Öffnungsweite während der Hintergrundbestrahlung verhielt sich die Blaulicht-abhängige Stomaöffnung in ihrer Ausprägung normal.



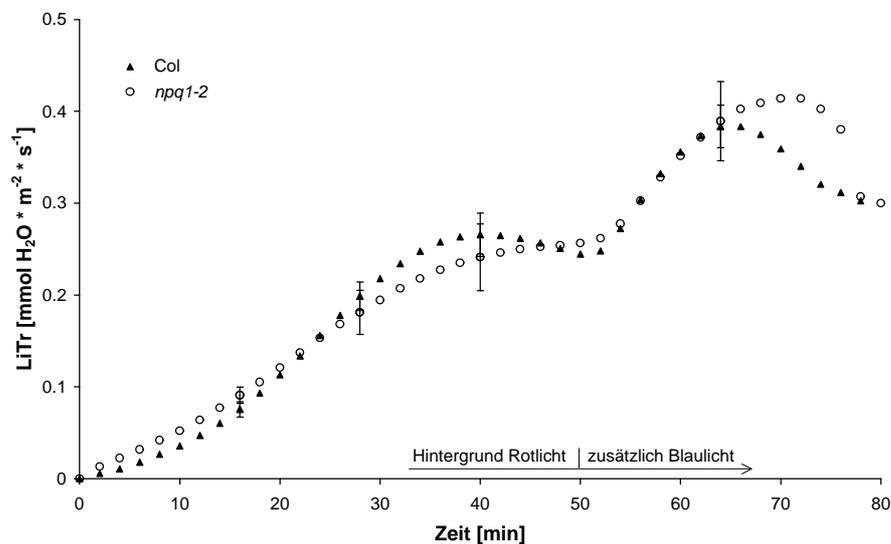
**Abbildung 3.8:** Vergleichende Messungen der LiTr von der Mutante *phyA* und des entsprechenden Wildtypes Col. Belichtet wurde mit  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Rotlicht und zusätzlichen  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blaulicht wie angegeben. Die Daten sind  $\text{MW} \pm \text{SE}$  zu aussagekräftigen Zeitpunkten der Messungen.  $n = 10$  (*phyA*),  $n = 12$  (Col).

Die Mutante *aba3-2* besitzt einen sehr geringen Gehalt an ABA. Dies ist auf einen gestörten Syntheseschritt von ABA-Aldehyd zu ABA zurückzuführen. Die Aktivität der verantwortlichen Aldehyd-Oxidase ist durch die Abwesenheit eines Molybdän-haltigen Cofaktors stark herabgesetzt (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1997). Das fehlende ABA-Signal führt zu einem „welken“ Phänotyp mit permanent geöffneten Stomata. Die Pflanzen konnten nur unter hoher Luftfeuchte angezogen werden. Die Transpirations-Kinetik der Mutante *aba3-2* ist nicht zu vergleichen mit dem Wildtyp. Rotlicht-Bestrahlung führte zu keinem nennenswerten Anstieg der LiTr, wohingegen eine deutliche Stomaöffnung bei zusätzlicher Blaulichtbestrahlung erkennbar wurde (Abbildung 3.9). Im Gegensatz zu *aba3-2* zeigten andere ABA-Mutanten verhältnismäßig normale Stomaöffnungs-Kinetiken.

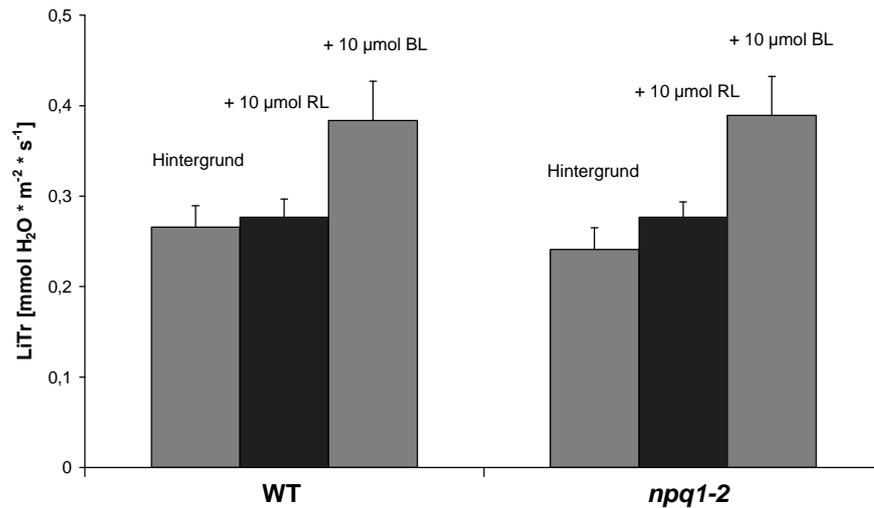


**Abbildung 3.9:** Vergleichende Messungen der LiTr verschiedener ABA-Mutanten und des entsprechenden Wildtypes Ler. Belichtet wurde mit  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Rotlicht und zusätzlich  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blaulicht wie angegeben. Die Daten sind  $\text{MW} \pm \text{SE}$  zu aussagekräftigen Zeitpunkten der Messungen.  $n = 10$  (*aba3-2*),  $n = 8$  (*abi3-1*),  $n = 8$  (*abi1-1*),  $n = 10$  (Ler).

Die Mutante *npq1-2* (Niyogi *et al.*, 1998) besitzt einen Defekt in der Violaxanthin De-Epoxidase und ist somit nicht in der Lage, das Produkt Zeaxanthin zu bilden. Zeaxanthin ist eine von drei Substanzen des Xanthophyll-Zyklus, dessen Funktion vermutlich der Photooxidationsschutz von Photosynthese-Pigmenten ist. *Npq1-2* zeigte eine stomatare Antwort, die sich nur in geringem Maße von der des Wildtypes unterscheidet (Abbildung 3.10). Weder die Betrachtung des zeitlichen Verlaufes der Stomaöffnung, noch die Auswertung der maximal erreichten Transpirationsraten (Abbildung 3.11) deuteten auf eine abweichende Stomaöffnung der Mutante *npq1-2* hin. Dies steht im Widerspruch zu kürzlich beschriebenen Beobachtungen, nach denen die Stomata von *npq1-2* eine stark reduzierte Antwort auf Blaulicht aufweisen (Zeiger und Zhu, 1998, Frechilla *et al.*, 1999).

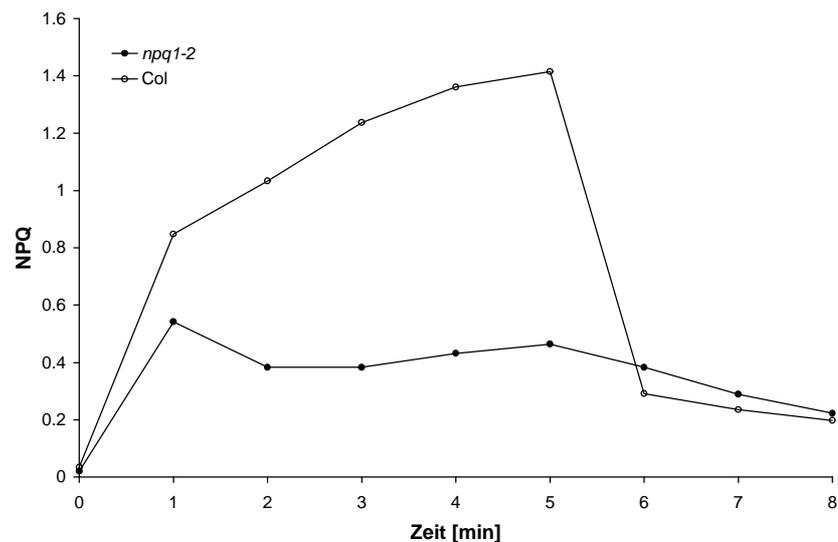


**Abbildung 3.10:** Vergleichende Messungen der LiTr von der Mutante *npq1-2* und des entsprechenden Wildtypes Col. Belichtet wurde mit  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Rotlicht und zusätzlichen  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blaulicht wie angegeben. Die Daten sind  $\text{MW} \pm \text{SE}$  zu aussagekräftigen Zeitpunkten der Messungen.  $n = 5$  (*npq1-2*),  $n = 12$  (Col).



**Abbildung 3.11: Vergleich der Effekte von zusätzlichem Licht auf die Transpiration der Mutante *npq1-2* und des Wildtypes (WT). Belichtungen wie angegeben. Die Daten sind MW  $\pm$  SE. n = 5. RL = Rotlicht, BL = Blaulicht.**

Um sicherzustellen, daß die gemessenen *npq1-2*-Pflanzen tatsächlich nur einen geringen Gehalt an Zeaxanthin besaßen, wurde jede Pflanze nach der Gaswechselformung einem Test auf “nonphotochemical quenching” (NPQ) unterzogen. Es zeigte sich bei allen in Frage kommenden Pflanzen ein stark verringertes NPQ, das mit den Angaben von Niyogi *et al.* (1998) übereinstimmt. Es konnte also mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß die erhaltenen Daten zur Licht-induzierten Transpiration von der Mutanten-Linie *npq1-2* stammten.



**Abbildung 3.12: Repräsentativer Verlauf für Induktion und Relaxation des NPQ in Blättern von *npq1-2* und Wildtyp (Col). Aktinisches Licht wurde zum Zeitpunkt 0 gegeben und nach 5 min abgeschaltet. Vorbehandlung der Pflanzen und Fluoreszenzmessung wie bei Niyogi *et al.* (1998) beschrieben.**

Insgesamt wurden 15 Mutanten-Linien untersucht. Fünf dieser Linien zeigten Abweichungen im Ausmaß der stomatären Antwort, in der Kinetik der Stomaöffnung oder in der erwarteten Reaktion auf zusätzliches Blaulicht (Tabelle 3-1).

### 3.1.5 Gaswechsel an *Nicotiana tabacum*

Das *N. tabacum*-Aquaporin NtAQP1 ist, wie in Abschnitt 1 beschrieben, vorwiegend in der Wurzel und in Blättern exprimiert. Dieses Expressionsmuster deutet auf eine Beteiligung des Aquaporins an der Wasseraufnahme und am interzellulären Wassertransport hin. Im Gegensatz zu der Vorgehensweise bei *A. thaliana* sollte im folgenden Experiment die Rolle von NtAQP1 während eines starken Transpirationsstromes vom Wurzelsystem bis zur Blattoberfläche untersucht werden. Dazu wurde kontinuierliches Weißlicht mit hoher Intensität eingesetzt.

Infolge des in der Einleitung erwähnten Wechsels zum *N. tabacum*-System standen auch hier transgene Aquaporin-Antisense-Linien zur Verfügung. Die Charakterisierung von mehreren NtAQP1-Antisense-Linien hinsichtlich des spezifischen mRNA-Gehaltes in diesen Geweben führte zur Isolation der Antisense-Linie AS 5-5 (Bearbeitung durch F. Siefert, AG Prof. Kaldenhoff). Diese Linie zeigte die größte Reduktion von NtAQP1-mRNA und wurde für die folgende Transpirationsanalyse eingesetzt. Im Gegensatz zu den Messungen an *A. thaliana* konnten die Transpirationsraten von *N. tabacum*-Blättern mit Hilfe der Original-Küvetten gemessen werden.

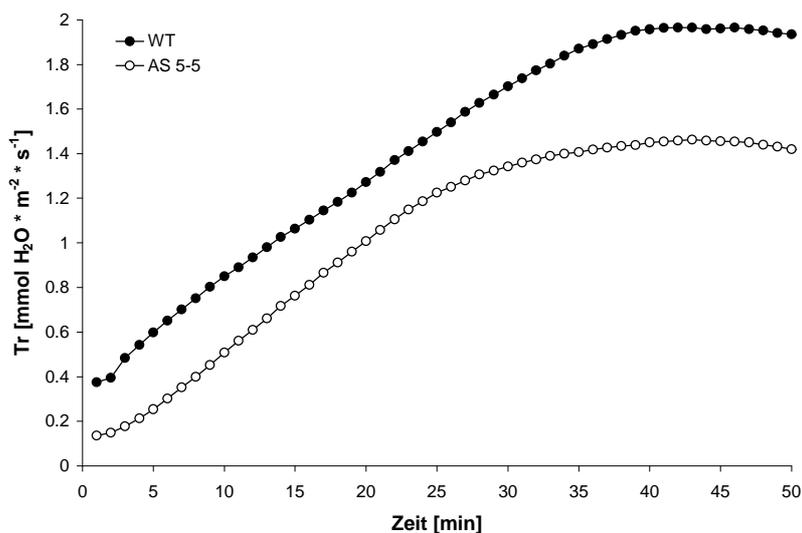


Abbildung 3.13: Messungen der Transpirationsraten (Tr) von Wildtyp (n = 4) und Antisense-Linie AS 5-5 (n = 4). Die Daten sind MW. Belichtet wurde kontinuierlich mit  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Weißlicht.

Wie in Abbildung 3.13 deutlich wird, zeigten die Pflanzen der Antisense-Linie eine reduzierte Transpirationsleistung. Die Grundtranspiration zu Beginn des Experimentes war

im Vergleich zum Wildtyp niedriger. Der Anstieg der Transpirationsraten beider Linien verlief in den ersten 25 min nahezu synchron, schwächte sich dann bei der Antisense-Linie jedoch früher ab.

## 3.2 Zur transkriptionellen Regulation

### 3.2.1 Die morphogenetische Expression eines PIP1b-GFP Reportergens in *A. thaliana*.

Die Herstellung eines PIP1b-GFP Reportergens (Abbildung 3.14) wurde von Daniela Dietrich (1999) im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt und beschrieben.



**Abbildung 3.14:** Ausschnitt aus dem Vektor pPIP1bP-327. Der CaMV35S-Promotor des Vektors p327 (vgl. Abbildung 2.6) wurde gegen den *A. thaliana*-PIP1b-Promotor ausgetauscht (Dietrich, Diplomarbeit 1999).

Die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Reportergen-Aktivität basiert auf einer transgenen Linie von *A. thaliana*-Pflanzen, die mit diesem Konstrukt mittels *Agrobacterium*-Transformation erzeugt wurde (Dietrich, 1999). Aufgrund des nicht-invasiven Nachweises von GFP war es möglich, die Aktivität des PIP1b-Promotors während mehrerer Entwicklungsstadien in der Pflanze zu beobachten. Die folgenden Abbildungen zeigen mikroskopische Aufnahmen von kryoskopischen Schnitten quellender *A. thaliana*-Samen, Keimlinge und Pflanzenteile bzw. -organe (Abbildung 3.15 bis Abbildung 3.20).

Die mikroskopischen Aufnahmen der Dünnschnittpräparate zeigen den Embryo, mit Kotyledonen und Radikel (Abbildung 3.15). Im Gegensatz zum Wildtyp war bei Samen der transgenen Linie eine leichte Fluoreszenz im Bereich der Kotyledonen zu beobachten. Es fluoreszierten jedoch nicht beide Kotyledonen gleichermaßen. Vielmehr schien die Promotoraktivität des PIP1b-Gens in dem vorliegenden Entwicklungsstadium der Samenquellung in den Kotyledonen unterschiedlich starker Regulation zu unterliegen.

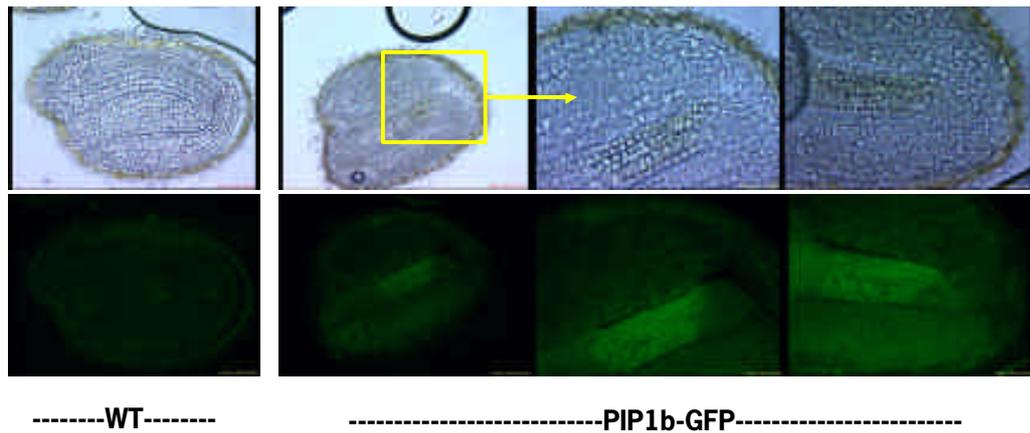


Abbildung 3.15: Dünnschnittpräparate (5  $\mu\text{m}$ ) von *A. thaliana*-Samen. GFP-Fluoreszenz nach 2 Tagen Quellung. Oben: Hellfeld-Aufnahmen. Unten: GFP-Fluoreszenz. Vergrößerung 200-fach (links) und 400-fach (rechts). WT = Wildtyp, PIP1b-GFP = Transgene Samen.

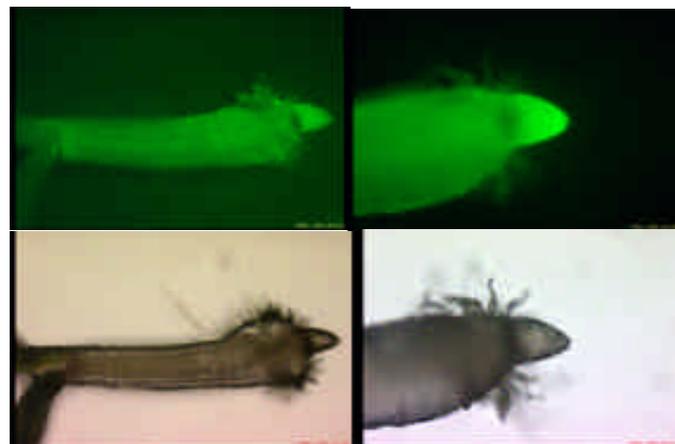
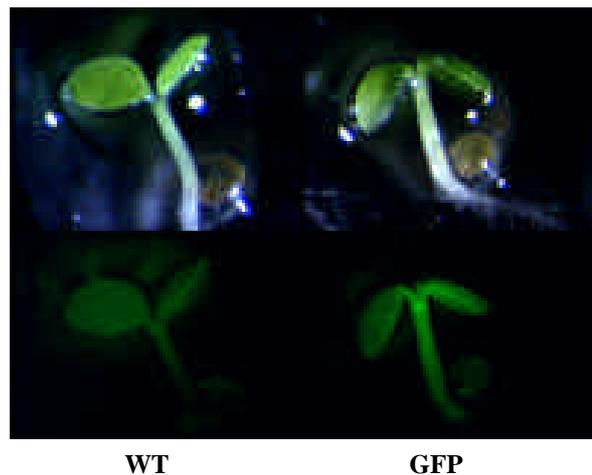


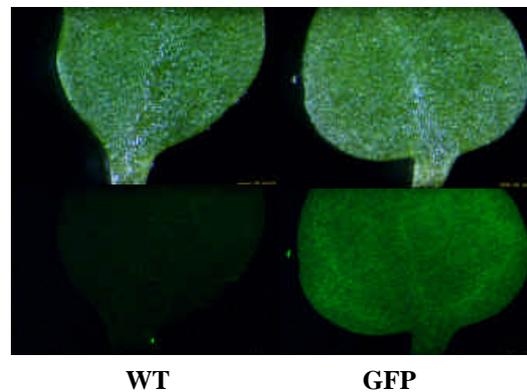
Abbildung 3.16: Keimling nach 4 Tagen im Licht. Oben: GFP-Fluoreszenz. Unten: Hellfeld-Aufnahmen. Vergr. ca. 40-fach.

Junge Keimlinge transgener Pflanzen zeigten eine relativ starke Gesamt-Fluoreszenz (Abbildung 3.16). Besonders hohe Promotoraktivität trat im Bereich des initialen Wurzelmeristems auf.



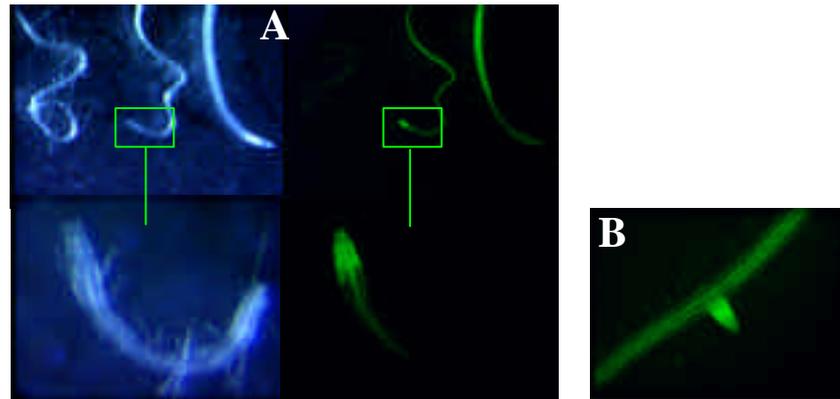
**Abbildung 3.17:** Keimlinge nach 1 Woche im Licht. WT = Wildtyp, GFP = Transgene Pflanze. Vergr. ca. 20-fach. Oben: Hellfeld-Aufnahmen. Unten: GFP-Fluoreszenz.

Voll ausgebildete Keimlinge mit geöffneten Kotyledonen ließen eine weniger diffuse Fluoreszenz erkennen (Abbildung 3.17). Die Promotoraktivität war in diesem Stadium besonders stark in den Leitgefäßen des Hypokotyls und der Keimblätter sowie im Bereich um das Apikalmeristem.



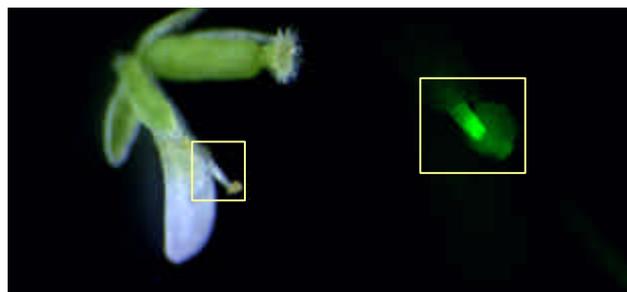
**Abbildung 3.18:** Blätter von 2 Wochen alten Pflanzen. Oben: Hellfeld-Aufnahmen. Unten: GFP-Fluoreszenz. Vergr. ca. 40-fach. WT = Wildtyp, GFP = Transgene Pflanze.

In jungen Blättern folgte eine starke GFP-Fluoreszenz dem Muster des Leitbündelsystems (Abbildung 3.18). Zusätzlich war eine diffuse Fluoreszenz zu beobachten, die sich über Bereiche erstreckte, die den Wachstumszonen eines Blattes zugeordnet werden können.



**Abbildung 3.19:** A: Wurzeln von unterschiedlichen *A. thaliana*-Linien. Links: Hellfeld-Aufnahmen. Rechts: GFP-Fluoreszenzen. In den Einzelbildern oben von links nach rechts: Wildtyp, PIP1b-GFP, CaMV35S-GFP, Vergr. ca. 5-fach. Unten: Ausschnittvergrößerung der Wurzelspitze einer PIP1b-GFP-Pflanze. B: Seitenwurz-Knospe einer PIP1b-GFP-Pflanze.

Die PIP1b-Promotoraktivität in Wurzeln zeigte sich besonders in der Wurzelspitze, insbesondere direkt hinter der Wurzelhaube und im Zentralzylinder (Abbildung 3.19, A). Der Vergleich mit einer transgenen Pflanze, dessen GFP-Genaktivität von einem konstitutiven CaMV35S-Promotor reguliert wird, verdeutlicht die gewebespezifische Aktivierung des PIP1b-Promotors. Während der Ausbildung von Seitenwurzeln (Abbildung 3.19, B) konnte ebenfalls eine starke Promotoraktivität beobachtet werden.



**Abbildung 3.20:** Blüte einer transgenen Pflanze. Links: Hellfeld-Aufnahme, Vergr. ca. 20-fach. Rechts: GFP-Fluoreszenz des Filamentes (vergrößerter Ausschnitt).

Blüten von transgenen *A. thaliana*-Pflanzen zeigten eine verhältnismäßig starke und diffuse Fluoreszenz (Abbildung 3.20). Durch Verringerung der Detektionsempfindlichkeit trat ein begrenzter Bereich des Staubblattes hervor, der eine hohe PIP1b-Promotoraktivität zeigte.

### 3.2.2 Vergleichende Promotoranalysen auf Sequenzebene

Frühere Arbeiten zur Regulation des *A. thaliana*-PIP1b-Promotors (Kaldenhoff *et al.*, 1996) zeigten, daß die Phytohormone Abscisinsäure (ABA) und Gibberellinsäure (GA) direkt oder indirekt die Promotoraktivität beeinflussen können. Da während der hier beschriebenen Untersuchungen das bevorzugte Modellsystem von *Arabidopsis thaliana* zu *Nicotiana tabacum* wechselte, wurden die Arbeiten an dem *A. thaliana*-Aquaporin PIP1b eingestellt. Die dazu parallel verlaufende Suche nach *N. tabacum*-Aquaporinen führte zur Isolierung und Charakterisierung des Aquaporins NtAQP1 (Biela *et al.*, 1999). Im Rahmen der Diplomarbeit von Franka Siefritz (1998) wurde außerdem ein ca. 1500 bp langer, dem NtAQP1-Gen stromaufwärts gelegener DNA-Abschnitt isoliert, der für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stand. Die Sequenzanalyse dieses Bereiches ergab keinen Hinweis auf ein eventuell unvollständiges offenes Leseraster. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß dieser DNA-Abschnitt nicht für ein Protein kodiert, sondern als regulativer Bereich des NtAQP1-Gens fungiert.

Eine zentrale Frage dieser Arbeit bezog sich auf die transkriptionelle Regulation des Aquaporins NtAQP1. Veränderungen der Umwelteinflüsse sowie entwicklungsbedingte Änderungen werden in Pflanzen unter anderem durch die Wirkung von Phytohormonen vermittelt und gesteuert. In vielen Fällen beruht diese Vermittlung auf Interaktionen zwischen den entsprechenden Genen und Komponenten von Signaltransduktionswegen. Durch Vergleiche mit genregulativen Elementen in Datenbanken (Higo *et al.*, 1999) stellte sich heraus, daß der NtAQP1-Promotor Sequenzbereiche enthält, die als spezifische Anlagerungsstellen für DNA-bindende Proteine bereits identifiziert werden konnten (Abbildung 3.21). Darüber hinaus wurde die Aktivität dieser in der Literatur beschriebenen Transkriptionsfaktoren mit der Wirkung der Phytohormone ABA und GA in Verbindung gebracht. Zur Charakterisierung der identifizierten Bindungsmotive des NtAQP1-Promotors wurden Promotor-Reportergen-Konstrukte und solche mit deletierten Promotorbereichen verwendet.

```

-1449*****
AAA ATA TAT GGA GCC TTT TTC TGA GGC AAC AAT TTC ATG GGA GTT TAT TAA ATA ATT AAG AAG TTT TGC ACC CCA
TTT TAT ATA CCT CGG AAA AAG ACT CCG TTG TTA AAG TAC CCT CAA ATA ATT TAT TAA TTC TTC AAA ACG TGG GGT

-1374 TTA TCT GAT AAT TAT TAA TTT TCT AAA GTT TGC TTA GCT GCC CAC ATT CTT ACA ACT ATT GAA AGA TTA GGT GAA
AAT AGA CTA TTA ATA ATT AAA AGA TTT CAA ACG AAT CGA CGG GTG TAA GAA TGT TGA TAA CTT TCT AAT CCA CTT

-1299 TAA GTT GGT CCA GAC CAG CTA ATC AAG TAC AAA ATG TTT TCA AAT AAT TAA TAC TGA CAC TCT GTA TAG GAT AAG
ATT CAA CCA GGT CTG GTC GAT TAG TTC ATG TTT TAC AAA AGT TTA TTA ATT ATG ACT GTG AGA CAT ATC CTA TTC

MYBGAHV
=====
AMYBOX1
=====
-1224 AAT AAC AAA TAA ACC ACA CAA TAT TAA TCT GTC AAC ATC CCT CTC CCC ACT CTG GCC CCA TTT CCA GAA CAC TCT
TTA TTG TTT ATT TGG TGT GTT ATA ATT AGA CAG TTG TAG GGA GAG GGG TGA GAC CGG GGT AAA GGT CTT GTG AGA

-1149 ATT CTT TCT CTG TTC AAG ACA CTA ATA ATA TTC TCA TAT AGT ACT GTC CAT AAT GTC ATT AAC AAG ATA ATT ATT
TAA GAA AGA GAC AAG TTC TGT GAT TAT TAT AAG AGT ATA TCA TGA CAG GTA TTA CAG TAA TTG TTC TAT TAA TAA

MYBCORE
=====
MYBCORE
=====
MYB2AT
=====
-1074 CTA ACT AGA AAA ATT AAG ATT AGA CCA ACC CAA CAG TTA ATC ATA TCA TTT CAA TAG GTC CGT CAC ACT TTT ATT
GAT TGA TCT TTT TAA TTC TAA TCT GGT TGG GTT GTC AAT TAG TAT AGT AAA GTT ATC CAG GCA GTG TGA AAA TAA

-999 TAT TTG TGT AAG TAA TTA CTA GCA CTT AGT ATT TAC ACT AAA ATA TAA TTT GCT TCA ATA ACT AAA AGT TGA AGT
ATA AAC ACA TTC ATT AAT GAT CGT GAA TCA TAA ATG TGA TTT TAT ATT AAA CGA AGT TAT TGA TTT TCA ACT TCA

-924 GAA AAT ACA TAT ATT AAT TGA TAT ATA TCT CGC ATT CAT TAG TTC CAT AAA AAA TAT GTA CCA CCA TTT TTG TAT
CTT TTA TGT ATA TAA TTA ACT ATA TAT AGA GCG GAA GTA ATC AAG GTA TTT TTT ATA CAT GGT GGT AAA AAC ATA

-849 TTA ATA GAC TAA ATA TTC TCA TCG GGG TCG TTT TGT TGG AAA TAA ATT ATT TTA GGA TTA ATT ATT TTG AGA TTA
AAT TAT CTG ATT TAT AAG AGT AGC CCC AGC AAA CCA ACC TTT ATT TAA TAA AAT CCT AAT TAA TAA AAT TCT AAG

-774 TTA TCC CAC CTT CTC ATA GAA ATA AAA ATA ATA TTA CAG TTC CGA AAT AAC TAA TTC CAA TAT TAG TCA TAG TAC
AAT AGG GTG GAA GAG TAT CTT TAT TTT TAT TAT AAT GTC AAG GCT TTA TTG ATT AAG GTT ATA ATC AGT ATC ATG

MYBPLANT
=====
MYBATRD22
=====
-665*****
-699 TAC TTT ATT CTA ACC AAA CGT GGG ATA AAC TCA TCT CAA ATA TAA TCC ACA GGT TAG TTA TCC CTT ATT TCT CGT
ATG AAA TAA GAT TGG TTT GCA CCC TAT TTG AGT AGA GTT TAT ATT AGG TGT CCA ATC AAT AGG GAA TAA AGA GCA

-624 ATC AAG CTA GCC CAT AGT GTA CAA CAC ATA ATA TGT TAA TGA CAG ATT AAA GGA CAG TCT GGT ACA CTA AGC TCT
TAG TTC GAT CGG GTA TCA CAT GTT GTG TAT TAT ACA ATT ACT GTC TAA TTT CCT GTC AGA CCA TGT GAT TCG AGA

-549 CGC TAT GCG GTA TTC ATA GAG GTG CCA GAC CCT AAA GGT CTA TTG TAT GCA GTC TTA CCT TAT ATT TTG TAA GCG
GCG ATA GCG CAT AAG TAT CTC CAC GGT CTG GGA TTT CCA GAT AAC ATA CGT CAG AAT GGA ATA TAA AAC ATT CGC

-474 GGA TTC GGA AAG GGT CGA ACT CTA AGG TCT ATA TAT GCA GTC TTA CCC TTC ATT TAT GCA AGA GAT TGT TTT CAT
CCT AAG CCT TTC CCA GCT TGA GAT TCC AGA TAT ATA CGT CAG AAT GGG AAG TAA ATA CGT TCT CTA ACA AAA GTA

-399 GGC TCA AAT TCA TAA CCT TCT GAC ATC AAC TTT ACC GAT TAA GCC TGG ACA GAA TGT TTA TGC TAA TTA GGA AAA
CCG AGT TTA AGT ATT GGA AGA CTG TAG TTG AAA TGG CTA ATT CGG ACC TGT CTT ACA AAT ACG ATT AAT CCT TTT

-324 AAA TAT AGA CCG ACC AAC TCA ATA ATT AAC CAG ACC AAT TTA ATA AGA ATG TGA CAC TTT AAT GGC TCA AAT TCA
TTT ATA TCT GGC TGG TTG AGT TAT TAA TTG GTC TGG TTA AAT TAT TCT TAC ACT TTG AAA TTA CCG AGT TTA AGT

-249 TAA CTT TAC CGA TTA AGT CAG GAC AGA ATG TTT ATG CTA ATT AGG AAA AAA ATA TAG ACC GAC CAA CTC AAT AAT
ATT GAA ATG GCT AAT TCA GTC CTG TCT TAC AAA TAC GAT TAA TCC TTT TTT TAT ATC TGG CTG GTT GAG TTA TTA

-174 TAA CCA GAC CAA TTT AAT AAG AAT GTA ACA CTT TAA TTA ATT TGT CTT CAT AAA TGA GTT CTC CAC TAT AAA ACA
ATT GGT CTG GTT AAA TTA TTC TTA CAT TGT GAA ATT AAT TAA ACA GAA GTA TTT ACT CAA GAG GTG ATA TTT TGT

-99 ACC ACA ACT CTA TCT TTC CTC AAC ACC AAA CTT GGT TTT TGT ACT ATC CAC TTA GCA CAA TAA AGA GAG AGG TAA
TGG TGT TGA GAT AGA AAG GAG TTG TGG CCA AAA ACA TGA TAG GTG AAT CGT GTT ATT TCT CTC TCC ATT

-24 GTT TAG TGA GTG TTC AAA TGG CAG
CAA ATC ACT CAC AAG TTT ACC GTC Primer NtP2
    
```

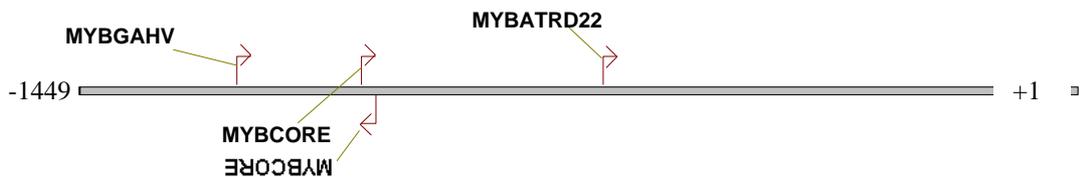
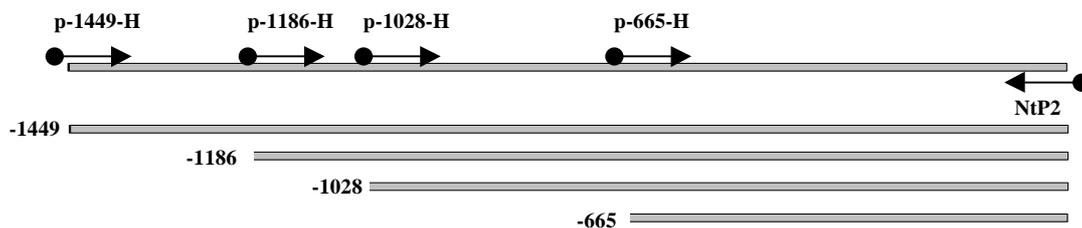


Abbildung 3.21: Oben: Nucleotid-Sequenz des NtAQP1-Promotors. Die Markierungen zeigen mögliche Bindungsstellen für pflanzliche MYB-ähnliche Transkriptionsfaktoren. Primer-Sequenzen sind unterstrichen. Unten: Schematische Darstellung des Promotors und der möglichen Bindungsstellen.

### 3.2.3 Herstellung der Reportergene und Promotordeletionen

Zur Deletion von stromaufwärts gelegenen Promotorelementen wurde die PCR-Technik eingesetzt. Die verwendeten sequenzspezifischen Sense- und Antisense-Primer enthielten *Hind* III- bzw. *Bam*H I-Restriktionsschnittstellen, die für eine spätere Subklonierung hilfreich waren. Als Ausgangsmaterial für die PCR diente DNA mit der NtAQP1-Promotorsequenz voller Länge (Abbildung 3.22). Die PCR-Bedingungen entsprachen denen eines Standard-PCR-Experimentes. Die entstandenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TA-TOPO-Cloning-Systems (2.3.3.2) in den Vektor pCR2.1-Topo subkloniert und die Nucleotidsequenzen überprüft.

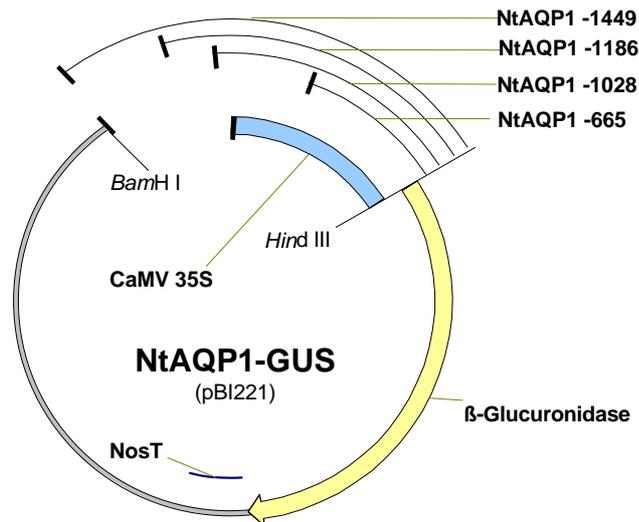


**Abbildung 3.22:** Schematische Darstellung der PCR-Reaktionen zur Herstellung von Promotordeletionen. P-1449-H = Primer zur Amplifikation des Promotors voller Länge, p-1186-H bis p-665-H = Primer zur Amplifikation von verkürzten Fragmenten des Original-Promotors. Die Pfeile markieren die Positionen auf der Template-DNA. Ausgefüllte Kreise markieren die Restriktionsschnittstellen. Im unteren Teil sind die entstandenen PCR-Produkte angedeutet.

Sequenzen der verwendeten Primer:

p-1449-H	5'-aagcttaaaatatatggagccttttctgaggc-3'
p-1186-H	5'-aagcttccctctccccactctggc-3'
p-1028-H	5'-aagcttcattcaataggtccgtc-3'
p-665-H	5'-aagcttctcaaatataatccacagg-3'
NtP2	5'-ggatcccctgccattgaacactcactaaacttacc-3'

Die Herstellung der Promotor-GUS-Konstrukte erfolgte im Vektor pBI221 (2.4.1). Die Restriktionsschnittstellen *Hind* III und *Bam*H I ermöglichten den Austausch des CaMV35S-Promotors gegen den NtAQP1-Promotor bzw. dessen hergestellte Promotordeletionen (Abbildung 3.23).



**Abbildung 3.23:** Schematisierte Darstellung der NtAQP1-Promotor-Gus-Konstrukte. Der CaMV35S-Promotor wurden gegen die oben beschriebenen Promotor-Fragmente ausgetauscht. Es entstanden vier GUS-Kassetten mit unterschiedlichen Promotor-Fragmenten.

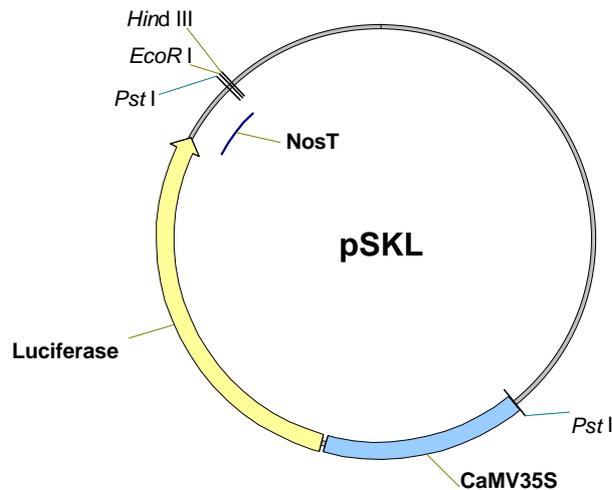
Die so entstandenen Reportergene wurden bei der Herstellung der dualen Transformationsvektoren eingesetzt.

### 3.2.4 Das duale Transformationssystem

Die transiente Transformation von pflanzlichen Einzelzellen ermöglicht eine verhältnismäßig schnelle Durchführung von Reportergen-Studien. Wenn diese Studien der Analyse von Promotoraktivitäten dienen sollen, ist eine äußerst präzise Quantifizierung des Reportersignals erforderlich. Aufgrund des Einsatzes verschiedener Phytohormone in unabhängigen Transformationsexperimenten und Varianzen in Transformationseffizienz und Zellvitalität war es nicht möglich, Daten aus unabhängigen Experimenten miteinander zu vergleichen. Zur Standardisierung aller Daten wurde ein duales Vektorsystem entwickelt, bei dem zwei Reportersysteme auf einem Transformationsvektor liegen. Während eines der Reportergene der Kontrolle eines konstitutiven Promotors unterliegt, wird ein andersartiges Reportergen über den zu untersuchenden Promotorabschnitt reguliert. Somit trägt eine transformierte Pflanzenzelle zwei Fremdgene, deren Kopienzahlen identisch sind. Nach der Messung der jeweiligen Reportersignale besteht folglich eine direkte Korrelation zwischen beiden Promotoraktivitäten. Basierend auf der Annahme, daß der konstitutive Promotor keiner Aktivitätsänderung durch Phytohormone unterliegt, liefert ein solches System durch das Einbringen eines internen Expressionsstandards eine hoch-reproduzierbare Quantifizierung der zu analysierenden Promotoraktivität.

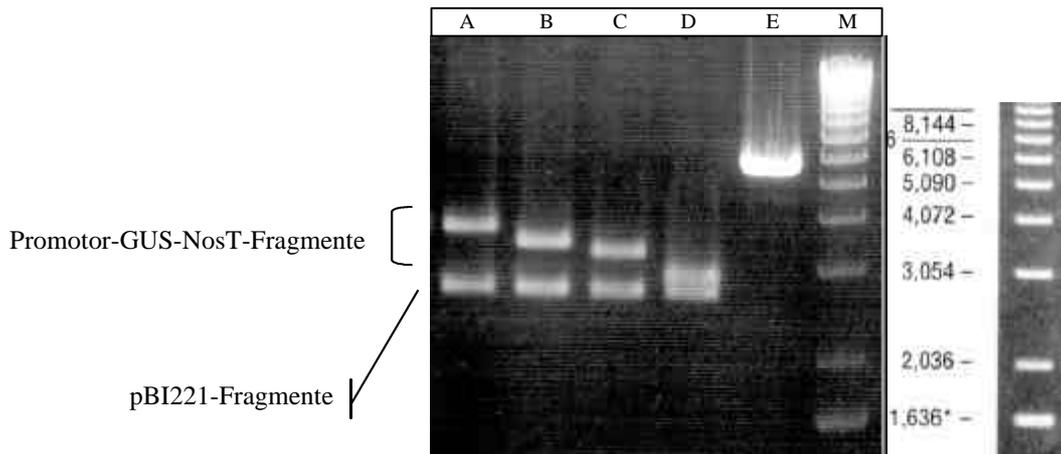
### 3.2.4.1 Herstellung der Vektor-Familie pSKL

Das Konzept des dualen Transformationssystems bestand in der Kombination von zwei unterschiedlichen Reportgen-Kassetten auf einem Plasmid. Zur Vermeidung von eventuellen polycistronischen Effekten wurden die Transkriptionsrichtungen beider Gene entgegengesetzt angeordnet. Als geeigneter Rezipient erwies sich der Vektor pBlueScript SK II (Stratagene, CA, USA). Als primäres Insert diente die Luciferase-Kassette des Vektors pGN35S-luc<sup>+</sup> (freundlicherweise von der AG Prof. Hedrich zur Verfügung gestellt). Diese Reportergen-Kassette wurde über die flankierenden *Pst* I-Schnittstellen in pBlueScript SK II eingefügt. Um die Religation der einzelnen Restriktionsfragmente zu vermeiden, ging der Ligationsreaktion eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase gemäß der Herstellerangaben (MBI) voraus. Nach dieser ungerichteten Subklonierung erfolgte durch Restriktionsanalyse die Identifikation eines Klons mit der gewünschten Orientierung der Insertion. Das resultierende Plasmid wurde als pSKL bezeichnet (Abbildung 3.24).

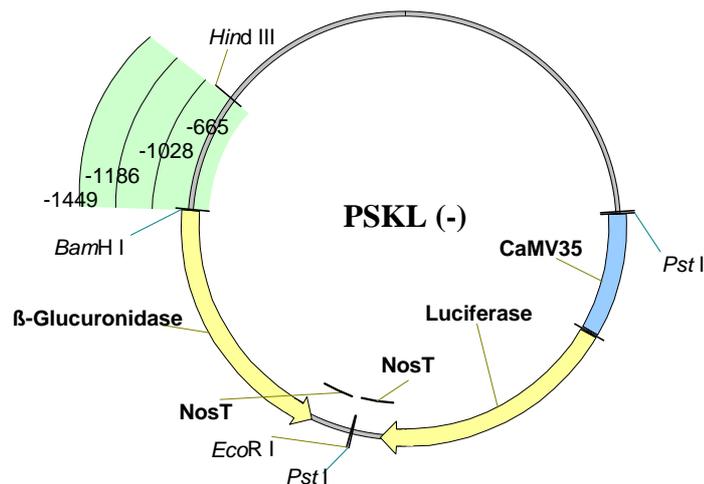


**Abbildung 3.24:** Der Vektor pSKL trägt ein konstitutiv reguliertes Luciferasegen und diente als Rezipient zur Herstellung der dualen Transformationsvektoren. Nur die wichtigsten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

In einem zweiten Schritt wurde dieses Plasmid durch Restriktion mit *Hind* III und *Eco*R I geöffnet und somit für die Insertion der oben beschriebenen Promotor-GUS-Konstrukte (siehe 3.2.3) vorbereitet. Die Promotor-GUS-Konstrukte wurden ebenfalls mit *Hind* III und *Eco*R I behandelt, im Gel aufgetrennt (Abbildung 3.25), eluiert und mit dem vorbereiteten pSKL ligiert. Nach Überprüfung der erfolgreichen Subklonierung wurden diese Vektoren, entsprechend ihrer abnehmenden Promotorlänge, als pSKL-1449, -1186, -1028 und pSKL-665 benannt (Abbildung 3.26).



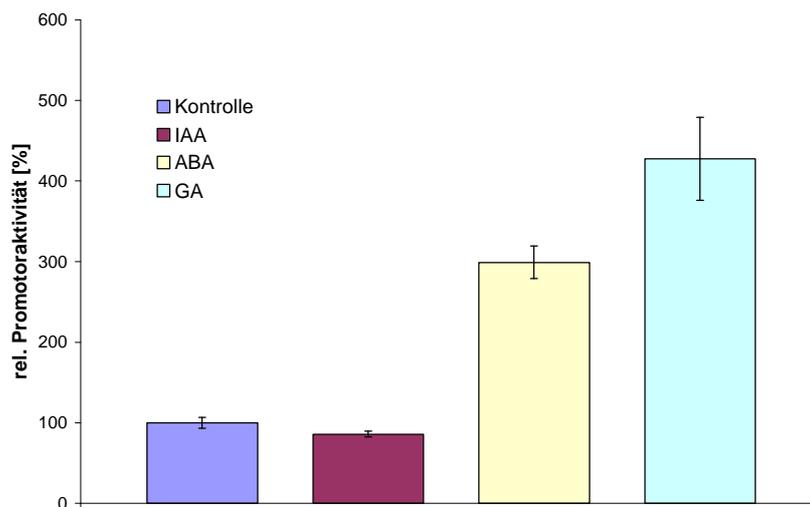
**Abbildung 3.25:** Auftrennung von Promotor-Gus-Konstrukten nach Restriktion mit *Hind* III / *Eco*R I im Agarosegel (1 %). A: -1449-GUS; B: -1186-GUS; C: -1028-GUS; D: -665-GUS. E: Mit *Hind* III / *Eco*R I vorbereiteter Vektor pSKL. M: Marker.



**Abbildung 3.26:** Schematische Darstellung der dualen Transformationsvektoren. Die Promotor-GUS-Konstrukte unterschiedlicher Länge wurden über die *Hind* III / *Eco*R I-Schnittstellen in den Vektor pSKL einkloniert. Nur die wichtigsten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

### 3.2.5 Einfluß von Phytohormonen auf den Promotor des NtAQP1-Gens

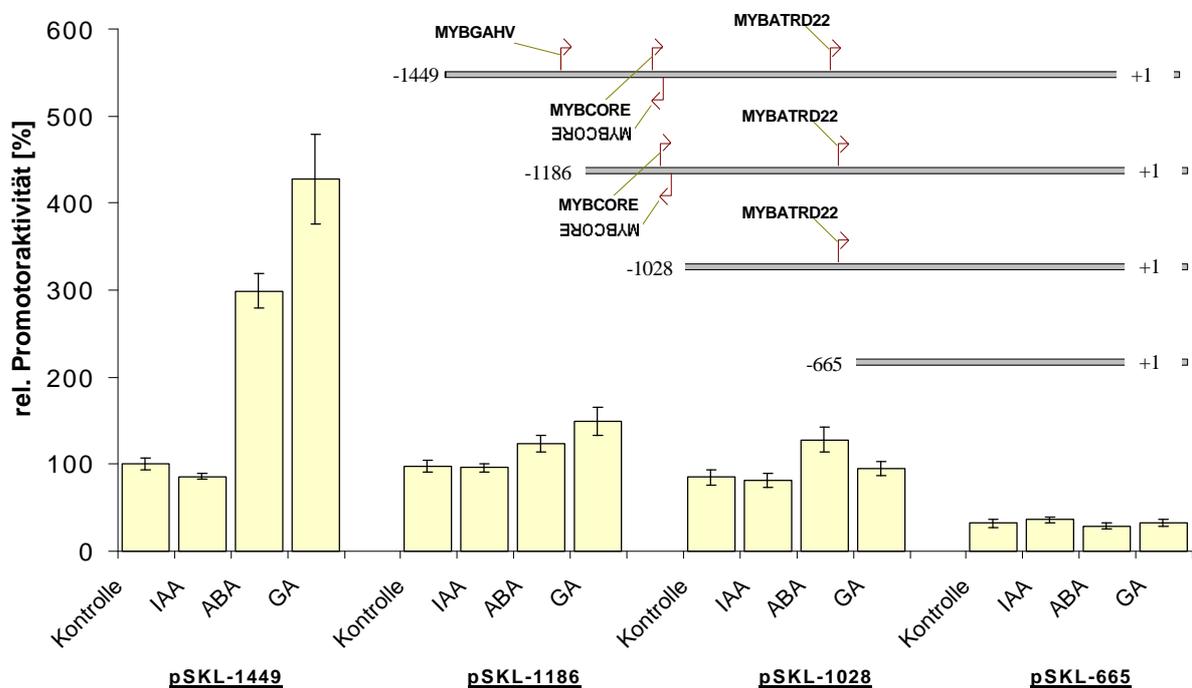
Mit Hilfe der transienten Protoplastentransformation (siehe 2.6) wurde der duale Vektor pSKL-1449 (Vollängen-Promotor) in BY2-Zellen eingebracht. Während einer Expressionszeit von ca. 18 h wurden die Protoplasten mit verschiedenen phytohormonhaltigen Medien inkubiert. Im Anschluß wurden GUS- bzw. Luciferase-Assays mit Gesamt-Proteinextrakten der Protoplasten durchgeführt und die relativen Promotoraktivitäten ermittelt (vgl. 2.5). In der Abbildung 3.27 sind die Ergebnisse des Vollängen-Promotors von NtAQP1 zusammengefaßt. Die Expression des GUS-Gens wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ M ABA um den Faktor 3 erhöht. 10  $\mu$ M GA führten zu einer Erhöhung um den Faktor 4. Die Behandlung mit IAA zeigte keinen Einfluß auf die relative Promotoraktivität.



**Abbildung 3.27:** Effekte von Phytohormonen (10  $\mu$ M) auf die relativen Promotoraktivitäten des NtAQP1-Promotors voller Länge (dualer Vektor pSKL-1449). Die Aktivität der unbehandelten Kontrolle wurde auf 100 Prozent gesetzt. Die Daten sind MW  $\pm$  SD. n = 3. IAA = 3-Indol-Essigsäure, ABA = Abscisinsäure, GA = Gibberellinsäure.

### 3.2.6 Identifikation und Charakterisierung von regulativen Elementen des NtAQP1-Gens

Zur Identifizierung von regulativen Promotorelementen wurden verkürzte Derivate des Promotors hergestellt. Jede Verkürzung eliminierte hierbei ein weiteres Bindungsmotiv (siehe Abbildung 3.21). Diese Promotordeletionen lagen in Reportergenkonfiguration in den dualen Vektoren pSKL-1186, pSKL-1028 und pSKL-665 vor (vgl. 3.2.4). Nach transienter Transformation in BY2-Protoplasten, Inkubation in phytohormonhaltigen Medien und Messung der relativen Promotoraktivität konnten die Phytohormonwirkungen auf die einzelnen Deletionen analysiert werden.



**Abbildung 3.28:** Vergleich der Effekte von Phytohormonen (10  $\mu$ M) auf die relativen Promotoraktivitäten des NtAQP1-Promotors voller Länge und dessen Deletionen. Die Promotor-Deletionen sind schematisch angedeutet. Die Aktivität der unbehandelten Kontrolle des Vollängen-Promotors wurde auf 100 Prozent gesetzt. Die Daten sind MW  $\pm$  SD. Unten aufgeführt sind die für die Transformation verwendeten Vektoren. n = 3. IAA = 3-Indol-Essigsäure, ABA = Abscisinsäure, GA = Gibberellinsäure.

Wie aus Abbildung 3.28 deutlich wird, führte die Deletion des Promotorbereiches von -1449 bis -1186 zu einem rapiden Absinken der durch ABA- bzw. GA-induzierten Aktivitätssteigerung. Die Wirkung der beiden Phytohormone beschränkte sich auf eine geringe Zunahme der relativen Promotoraktivität. Eine weitere Deletion bis zur Position -1028 bewirkte einen weiteren Rückgang des GA-Effektes, hatte aber auf die Promotoraktivität der unbehandelten Kontrolle keinen Einfluß. Zu einer drastischen

Reduktion führte das Entfernen eines Promotorfragmentes bis zur Position -665. Hier kam es, im Vergleich mit dem Promotor voller Länge, zu einer auf ca. 30 % verminderten Promotoraktivität. Eine Induktion durch Phytohormone konnte nicht festgestellt werden.

### 3.3 Die subzelluläre Lokalisation von NtAQP1-Protein

#### 3.3.1 Herstellung einer GFP::*NtAQP1*-Genfusion

Die Fusion der GFP-cDNA mit dem 5'-Ende der NtAQP1-cDNA erfolgte mittels rekombinanter PCR (2.3.2.3). Als Ausgangsmaterialien dienten die cDNA des NtAQP1-Aquaporins und das unter 2.4.3 beschriebene Plasmid p327. Bei der Erstellung der Primersequenzen wurde das Stop-Kodon der GFP-cDNA deletiert. Das resultierende Fusionsgen besaß somit ein offenes Leseraster, welches beim ATG des GFP-Gens begann und am TGA des Aquaporins endete. Das ursprüngliche GFP-Gen in p327 wurde mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Bam*H I und *Sac* I gegen das GFP::*NtAQP1*-Fusionsgen ausgetauscht. Das Resultat war ein konstitutiv reguliertes, Plasmid-kodiertes Aquaporinogen mit Amino-terminaler GFP-Sequenz (Abbildung 3.29). Das Plasmid erhielt den Arbeitstitel p327-AQP und wurde bei der Transformation von pflanzlichen Zellen eingesetzt.

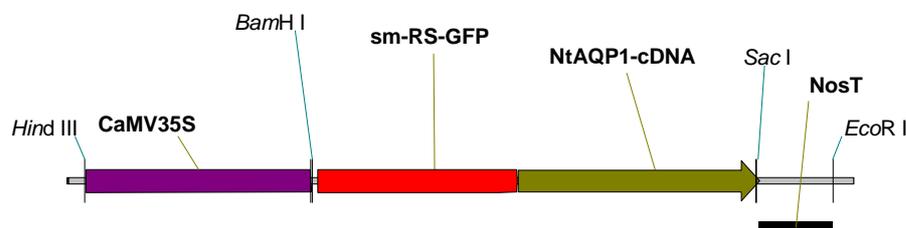


Abbildung 3.29: Das Plasmid p327-AQP. Das GFP::Aquaporin-Fusionsgen wird durch den CaMV35S-Promotor reguliert.

#### Sequenzen der verwendeten Primer:

GFP-B-S 5'-ggagaggatccaaggagatataacaatgagtaaagg-3'

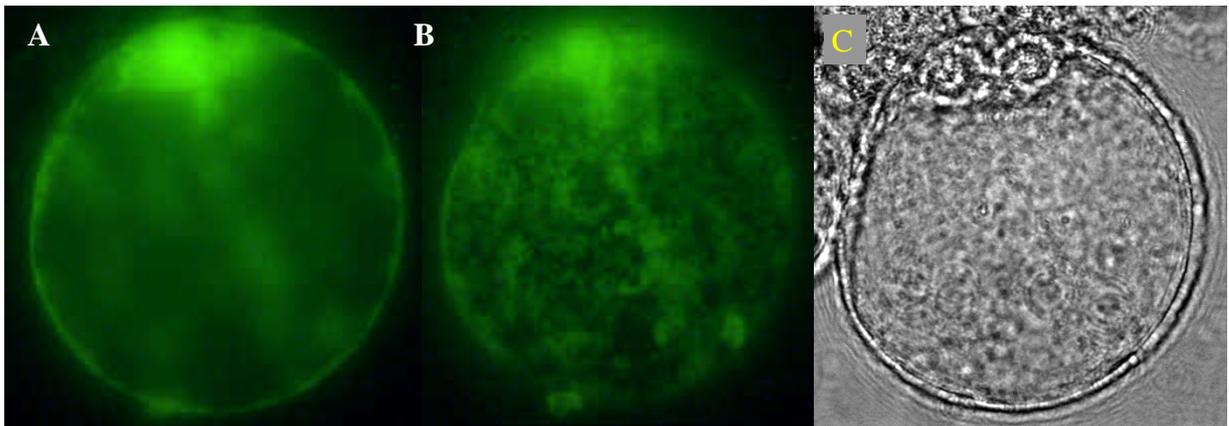
GFP-link 5'-gtttcctgccattttgtatagccatccatgcc-3'

NtAQP1-link 5'-ggcatggatgaactatacaaaatggcagaaaac-3'

NtAQP-S-AS 5'-gagctcggcttcttgaggaaacttaagacg-3'

### 3.3.2 Expression von GFP::NtAQP1-Fusionsprotein

Das Plasmid p327-AQP wurde mittels transients Protoplastentransformation in BY2-Zellen eingebracht. Nach 18 h erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (Abbildung 3.30). Die nicht-invasive Erfassung von GFP-Fluoreszenz ermöglichte einen direkten Nachweis des Fusionsproteins in der lebenden Zelle.



**Abbildung 3.30: Spezifische Fluoreszenz von GFP::NtAQP1-Fusionsprotein in transient transformierten BY2-Zellen. A: Fokussierung auf den größtmöglichen Durchmesser des Protoplasten. B: Fokussierung auf die obere Halbkugel des Protoplasten. C: Hellfeld-Aufnahme. Vergrößerung = 1000-fach.**

In Abbildung 3.31 (A) wurde die fokussierte Ebene auf den Mittelpunkt des Protoplasten gelegt. Die GFP-Fluoreszenz des Randbezirkes deutet auf eine Lokalisation des Fusionsproteins in der Plasmamembran hin. Eine ebenfalls starke Fluoreszenz war im Bereich der Zellkerne und des umliegenden endoplasmatischen Reticulums (ER) zu sehen. In Abbildung 3.31 (B) wurde die fokussierte Ebene in einen Bereich näher zum Betrachter hin verschoben. Die hierbei erkennbaren unregelmäßigen Strukturen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Es ist jedoch möglich, daß es sich um proteinbeladene Membranvesikel oder um eine unregelmäßige Verteilung des Fusionsproteins in der Zytoplasmamembran handelte.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die Rolle des Aquaporins PIP1b bei der Stomaöffnung**

Vorangegangene Experimente mit dem GUS-Reporter gen beschrieben eine PIP1b-Promotor-aktivierte GUS-Expression in Schließzellen von *A. thaliana* (Kaldenhoff *et al.*, 1995). Dies gab Anlaß zu der Vermutung, das PIP1b-Aquaporin könnte an Wassertransportvorgängen während der Stomabewegung beteiligt sein. Die Verfügbarkeit einer PIP1b-Antisense-Linie ermöglichte Experimente an Pflanzen mit reduziertem Gehalt an PIP1b-Protein. Mittels vergleichender Gaswechsellmessungen an *A. thaliana* Wildtyp und PIP1b-Antisense-Pflanzen konnte jedoch unter den gewählten Bedingungen keinerlei Beeinträchtigung der Antisense-Pflanzen hinsichtlich der Stomaöffnung beobachtet werden. Bei der Interpretation dieses Resultats müssen folgende Überlegungen mit einbezogen werden:

Die Antisense-Technik basiert auf der artifiziellen Produktion einer zum Ziel-Transkript komplementären mRNA. Durch das Ausbilden von RNA-Doppelsträngen steht das Zieltranskript nicht mehr für eine Translation zur Verfügung. Eine hundertprozentige Hemmung wird in der Pflanze jedoch nicht erreicht. Unter anderem spielen hier Positionierungseffekte während der Integration der Fremd-DNA in das Pflanzengenom eine Rolle. Bei der untersuchten Antisense-Linie ist ein PIP1b-mRNA-Gehalt von ca. 20 % des Wildtypes beschrieben (Kaldenhoff *et al.*, 1998).

Einer der PIP1b-Antisense-Effekte äußert sich in der Vervierfachung der Wurzelmasse. Es wird davon ausgegangen, daß verringerte zelluläre Wasserpermeabilitäten über eine vergrößerte Wurzeloberfläche ausgeglichen werden. Im Gegensatz zu wachsenden Geweben, die ein dynamisches System darstellen, sind Schließzellen nach ihrer Ausdifferenzierung eher statisch. Dies bedeutet, daß eine Reduktion der spezifischen Transkriptmenge im zeitlichen Verlauf trotzdem zu einer Wildtyp-ähnlichen Akkumulation von Aquaporinen in der Plasmamembran von Schließzellen führen kann.

Sequenzvergleiche in *A. thaliana*-cDNA-Datenbanken ergaben mehr als 23 mögliche Mitglieder der MIP-Familie (Weig *et al.*, 1997). Davon sind 11 auf Sequenzebene der PIP-Unterfamilie zuzuordnen. Obwohl bisher nur wenige dieser Isoformen experimentell als Aquaporine bestätigt wurden, deutet diese hohe Zahl auf die Existenz einer größeren

Genfamilie hin. Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, daß die durch einen Antisense-Effekt inhibierte Expression von PIP1b in Schließzellen über genetische Rückkopplungsmechanismen zur verstärkten Expression eines oder mehrerer anderer Aquaporine führt. Diese Art der Kompensation eines Antisense-Effektes kann jedoch nicht ohne genaue Kenntnis aller beteiligten Aquaporingene überprüft werden.

Die Physiologie von Schließzellen ist stark auf die Produktion und Speicherung, sowie auf den In- und Efflux osmotisch aktiver Substanzen ausgerichtet. Die Aktivitäten von membranständigen Ionenpumpen und Carrier-Proteinen sind durch ein regulatorisches Netzwerk eng miteinander verknüpft. Eine verringerte Wasserpermeabilität von Schließzell-Plasmamembranen, wie sie für die Antisense-Pflanzen angenommen werden kann, könnte durch eine „Übersteuerung“ von osmotischen Gradienten kompensiert werden.

Anhand der Versuchsergebnisse schien PIP1b nicht an der Stomaöffnung beteiligt zu sein. Sollte PIP1b bei der Stomaöffnung eine Rolle spielen, könnten die beschriebenen Mechanismen verhindert haben, daß bei den Untersuchungen der *A. thaliana* Antisense-Linien Unterschiede im Gaswechsel sichtbar wurden.

## **4.2 Die Rolle des Aquaporins NtAQP1 bei der Stomaöffnung**

Die Funktion des *N. tabacum*-Aquaporins NtAQP1 konnte ebenfalls anhand transgener Antisense-Pflanzen untersucht werden. Diese Pflanzen zeigten keinen abweichenden Phänotyp. In Gaswechsel-Experimenten konnte eine reduzierte Transpiration im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Außerdem wurde eine geringere Grundtranspiration im Dunkeln festgestellt. Da die Unterschiede zwischen Antisense-Pflanzen und Wildtyp nicht signifikant waren, können sie lediglich als Hinweis auf einen beeinträchtigten Wassertransport der Antisense-Pflanzen gesehen werden. Untersuchungen an Wurzeln von NtAQP1-Antisense-Pflanzen haben erst kürzlich gezeigt, daß die hydraulische Leitfähigkeit für Wasser herabgesetzt ist (Tyree, persönliche Mitteilung, 2000). Dies könnte auch die Ursache für die verringerte Transpiration im Gaswechsel-Experiment gewesen sein.

### 4.3 Gaswechselfmessungen an *Arabidopsis thaliana*-Mutanten

Die Anpassung der Gaswechsel-Meßtechnik an *A. thaliana* ermöglichte die Suche nach Faktoren, die die Stomaöffnung beeinflussen. Mit Hilfe ausgewählter Mutanten konnte geprüft werden, ob einige der bereits charakterisierten pflanzlichen Signaltransduktionswege an der Stomaöffnung beteiligt sind. Durch den Einsatz des Dual-Beam-Protokolls konnten die Reaktionen auf unterschiedliche Lichtqualitäten separat beobachtet werden (Eckert und Kaldenhoff, 2000).

#### 4.3.1 Mutanten Blaulicht-induzierter Signalwege

Für Pflanzen ist blaues Licht als regulatorische Komponente bei der Vermittlung von Umwelteinflüssen von großer Bedeutung. Eine Vielzahl pflanzlicher Reaktionen wird durch Blaulicht-Signale ausgelöst. Die Mutationen der in dieser Arbeit eingesetzten *A. thaliana*-Linien beziehen sich auf den Verlust physiologischer Funktionen wie die durch einseitige Blaulichtbestrahlung hervorgerufene phototrope Krümmung des Hypokotyls (*nph1-5*; Liscum und Briggs, 1995), die durch Blaulicht verursachte Inhibierung der Hypokotyl-Elongation (*hy4* bzw. *cry1*; Henning *et al.*, 1999) und die durch Blaulicht vermittelte Einleitung der Blühphase, gesteuert durch Erkennung der Tageslänge (*cry2*; Guo *et al.*, 1998).

Wie anhand der Gaswechselfmessungen gezeigt werden konnte, besitzt *A. thaliana* während der Bestrahlung mit Rotlicht eine Blaulicht-induzierbare Signalkette, die zur verstärkten Öffnung der Stomata führt. Die Analyse der Stomaöffnung von Mutanten, die mit großer Wahrscheinlichkeit in den oben beschriebenen Blaulicht-Signaltransduktionswegen beeinträchtigt sind, ergab jedoch keinerlei Beeinträchtigungen hinsichtlich dieser Blaulicht-abhängigen Stomaöffnung. Somit ist es wahrscheinlich, daß eine bislang unbekannte und eventuell für die Stomabewegung spezifische Reizerkennung bzw -weiterleitung existiert. Neuere Studien beschreiben eine *A. thaliana*-Mutante, die einen gestörten Xanthophyll-Zyklus aufweist (*npq1-2*). Aufgrund eines Defektes der Violaxanthin-De-Epoxidase ist diese Linie nicht in der Lage, Zeaxanthin zu bilden (Abbildung 4.1). Der resultierende Phänotyp zeigt nach Bestrahlung mit einem Licht-Sättigungspuls eine starke Fluoreszenz. Die vermutlich von Zeaxanthin verursachte nicht-photochemische Löschung (non-photochemical quenching, NPQ) dieser Fluoreszenz findet in der Mutante *npq1-2* nicht statt.



### 4.3.2 Mutanten Rotlicht-induzierter Signalwege

Bisherige Studien haben gezeigt, daß die Rotlicht-Antwort der Stomata durch photosynthetische Aktivität ausgelöst wird (Wu und Assmann, 1993). Über eine Beteiligung von Rot/Dunkelrot-spezifischen Phytochromsystemen war bislang nichts bekannt. Im Rahmen der Gaswechselfmessungen an *A. thaliana* wurden sowohl Phytochrom A-, als auch Phytochrom B-Mutanten untersucht. Während die Phytochrom B-Mutante *hy3* keine abweichende Stomaöffnung zeigte, wurde bei der Phytochrom A-Mutante *phyA-103* eine reduzierte Antwort der Stomata beobachtet. Diese Reduktion äußerte sich in einer verringerten maximalen Transpirationsrate während der Rotlicht-Bestrahlung, jedoch nicht im zeitlichen Verlauf der Stomaöffnung. Die sich anschließende Blaulicht-abhängige Reaktion schien in ihrem Ausmaß nicht berührt zu sein. *PhyA-103* produziert aufgrund einer Missense-Mutation ein regulatorisch inaktives Phytochrom A-Protein. Interessanter Weise zeigte *hy1*, eine Mutante die weder Phytochrom A noch Phytochrom B bilden kann, keinerlei Abweichung vom Wildtyp. Es ist beim derzeitigen Stand der Kenntnis nicht erklärbar, warum die Abwesenheit von Phytochrom A und B (*hy1*) keinen Einfluß auf die Stomaöffnung im Rotlicht hatte, während eine Abweichung der Aminosäuresequenz von Phytochrom A (*phyA-103*) zu den beobachteten Veränderungen führte.

### 4.3.3 Mutanten der Phytohormon-Signaltransduktion

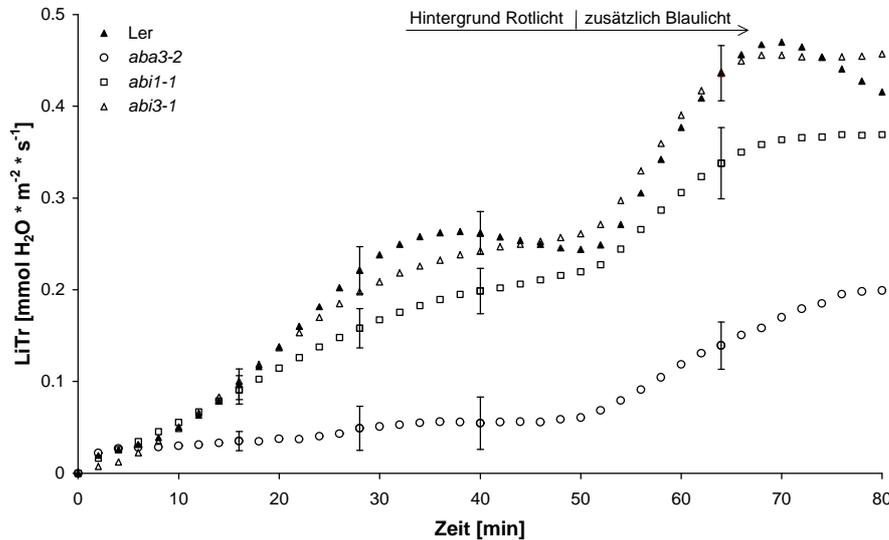
#### 4.3.3.1 Auxin

Von den *A. thaliana*-Mutanten, die auf das Phytohormon Auxin nicht mehr oder nur in geringem Maße reagieren, zeigte nur die Linie *axr1-3* eine veränderte Stomaöffnung. Die Gaswechselfmessungen zeigten eine schnellere Zunahme der Transpirationsraten sowohl bei Rot- als auch bei Rot-/Blaulicht-Bestrahlung. Nach molekularbiologischen Untersuchungen von Leyser *et al.* (1993) und Pozo *et al.* (1998) bindet das AXR1-Genprodukt als Bestandteil eines Heterodimers an Ubiquitin-ähnliche Proteine (RUBs). RUBs ihrerseits aktivieren vermutlich Proteine des Ubiquitinierungsweges und tragen damit zum spezifischen Abbau von Zielproteinen bei (Finley und Chau, 1991). Nach einem Modell von Ruegger *et al.* (1998) handelt es sich bei diesen Zielproteinen um Zellkern-lokalisierte Repressorproteine, deren Abbau zu einer Aktivierung Auxin-induzierter Gene führen könnte. Dieses Modell konnte jedoch noch nicht in seinen Einzelheiten bestätigt werden. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Gaswechselfmessungen konnte kein Bezug zwischen einem defekten AXR1-Protein und der schnelleren Stomaöffnung hergestellt werden. Da jedoch zwei andere Auxin-Mutanten eine normale Stomaöffnung zeigten (*axr2* und *aux1-7*), ist zu vermuten, daß mehrere unabhängige Signaltransduktionswege die Wirkung von Auxin vermitteln.

#### 4.3.3.2 Abscisinsäure

Die *aba3*-Mutation führt zur Beeinträchtigung einer spezifischen Aldehyd-Oxidase-Aktivität, die einen schwefelhaltigen Molybdän-Cofaktor (MOCO) benötigt. Dadurch wird der letzte ABA-Biosyntheseschritt von ABA-Aldehyd zu ABA verhindert. Der Phänotyp besitzt einen sehr niedrigen internen ABA-Gehalt und wird als kleinwüchsig und welkend (wilty) beschrieben (Leon-Kloosterziel *et al.*, 1996). Die Regulation der Stomaöffnungsweite ist durch das Fehlen von ABA stark beeinträchtigt. Die Gaswechselfmessungen ergaben aufgrund der konstitutiv geöffneten Stomata vor Beginn des Belichtungsprogramms eine verhältnismäßig starke Transpiration im Dunkeln. Die stomatare Öffnung während der Rot- Rot-/Blaulicht-Bestrahlung war nicht mit dem Wildtyp vergleichbar. Rotlicht führte lediglich zu einem geringen Anstieg der Transpirationsraten, während zusätzliches Blaulicht eine weitaus stärkere Wirkung auf die Stomata ausübte. Da die verhältnismäßig hohe Grundtranspiration im Dunkeln möglicherweise den normalen Öffnungsvorgang im Rotlicht überlagert haben könnte,

wurden die Messungen mit denen an anderen ABA-Mutanten verglichen. Bei diesen Mutanten handelte es sich um die ABA-insensitiven Linien *abi3-1*, deren Mutation sich nur im Stadium der Samenbildung zeigt (Koorneef et al., 1989), und um *abi1-1*, die ebenfalls eine hohe Grundtranspiration im Dunkeln besitzt (Roelfsma und Prins, 1995).



**Abbildung 4.2:** Vergleich der Messungen an verschiedenen ABA-Mutanten und dem entsprechenden Wildtyp Ler. Belichtet wurde mit  $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  Rotlicht und zusätzlich  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  Blaulicht wie angegeben. Die Daten sind MW  $\pm$  SE zu aussagekräftigen Zeitpunkten der Messungen.  $n = 10$  (*aba3-2*),  $n = 8$  (*abi3-1*),  $n = 8$  (*abi1-1*),  $n = 10$  (Ler). (Wiederholung der Abbildung 3.9 von Seite 41).

Der Vergleich der Mutanten *aba3-2* und *abi1-1* ergab keine Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Stomaöffnung im Rotlicht (vgl. Abbildung 4.2). Trotz hoher Grundtranspiration der *abi1-1*-Pflanzen wurde eine Zunahme der Transpirationsraten gemessen. Somit führte die Mutation der *aba3-2*-Pflanzen zu einem Verlust der durch Rotlicht ausgelösten Stomaöffnung. *abi1-1* hingegen ist in der Funktion einer Proteinphosphatase vom 2C-Typ mutiert, zeigte aber eine fast vollständige Reaktion im Rotlicht. Die Unterschiede zwischen diesen zwei Mutanten könnten in der Abfolge der durch Rotlicht ausgelösten Signaltransduktion begründet sein. Die Tatsache, daß *aba3-2* trotz fehlender Rotlicht-Antwort auf zusätzliches Blaulicht reagierte, bestätigt die Annahme der Existenz zwei voneinander unabhängiger Signaltransduktionswege für Rot- bzw. Blaulicht-abhängige Stomaöffnungsmechanismen.

#### 4.4 Expressionsmuster des PIP1b-GFP-Reportergens

Zur Analyse der Expressionsmuster des *A. thaliana* Aquaporins PIP1b wurde das GFP-Reportersystem eingesetzt. Durch die spezifische Fluoreszenz des Proteins konnten die entwicklungsabhängigen Promotoraktivitäten in unterschiedlichen Geweben und Organen beobachtet werden. Dabei wurde deutlich, daß PIP1b vorwiegend in Bereichen exprimiert wird, in denen ein starker interzellulärer Wassertransport angenommen wird. Diese Bereiche lagen meist in unmittelbarer Nähe von Meristemen, wie etwa dem Wurzelmeristem (sowohl in Haupt-, als auch in Seitenwurzeln) und dem Apikalmeristem der Sproßachse. Hinsichtlich der Funktion von PIP1b zeichnete sich hier die Beteiligung an Zell-zu-Zell-Wassertransporten ab, die mit einer frühen Phase des Streckungswachstums einhergingen.

Ein weiterer Ort der PIP1b-Promotoraktivität scheint innerhalb des Zentralzylinders der Wurzel zu liegen. Sowohl unmittelbar an der Wurzelspitze, als auch im Bereich der Wurzelhaarzone wurde eine sehr differenzierte GFP-Fluoreszenz beobachtet. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Betrachtung der Sproßachse. Auch hier fluoreszierte ein Bereich innerhalb oder in der Nähe der Leitbündel. Dieses Prinzip setzte sich in den Blättern fort. Hier folgte die Fluoreszenz der Anordnung des vaskulären Systems. Dieses Expressionsmuster des Reportergens deutet auf eine Einflußnahme des Aquaporins auf die Wasserpermeabilitäten von Elementen der Leitbündel hin. Es ist denkbar, daß PIP1b bei der Be- bzw. Entladung des Gefäßsystems den zytoplasmatischen Übergang von Wasser in die oder aus den umliegenden Xylemparenchymzellen erleichtert.

Eine frühzeitige Aktivierung des Pip1b-Promotors wurde während der Quellung der Samen beobachtet. Dies erscheint insofern plausibel, als daß während der Keimung die Mobilisierung von Speicherstoffen stark vom Wassergehalt der Zellen abhängig ist. Ferner finden direkt im Anschluß an die Quellung Zellstreckungsvorgänge statt. Wenn man die Expression von PIP1b als Marker für dieses Streckungswachstum heranzieht, scheint die Keimung asynchron in einer der beiden Kotyledonen zu beginnen.

Während der Blüte von *A. thaliana* führen die Filamente der Staubblätter ein Krümmungswachstum durch, sodaß es zu einer Selbstbestäubung kommt. Diese Krümmung wird durch einseitiges Wachstum der physiologischen Außenseite der

Filamente hervorgerufen. Während der Krümmung, die durch Streckungswachstum vollzogen wird, konnte eine hohe Promotoraktivität beobachtet werden. Somit ist auch hier eine Korrelation zwischen Zellstreckung und der Aktivität des PIP1b-Promotors gegeben.

Die Funktion des *A. thaliana*-PIP1b ist sowohl im heterologen Oozytensystem, als auch in Protoplasten als Wasserkanal bestätigt worden (Kammerloher *et al.*, 1994; Kaldenhoff *et al.*, 1998). Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen eine enge Korrelation zwischen einer hohen PIP1b-Promotoraktivität und dem Streckungswachstum von Zellen unterschiedlicher Gewebetypen. Zusätzlich scheint PIP1b an den zellulären Wassertransportmechanismen zwischen Symplast (Gewebe) und Apoplast (vaskuläres System) beteiligt zu sein.

#### **4.5 Die transkriptionelle Regulation von NtAQP1**

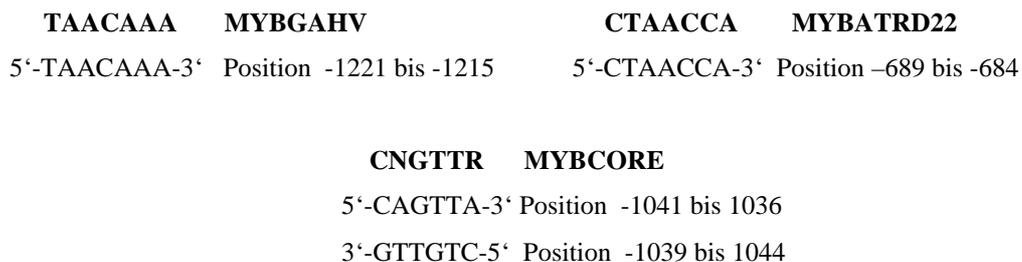
Die computergestützte Analyse von Sequenzbereichen des *N. tabacum*-NtAQP1-Promotors führte zu der Identifizierung von Motiven, die von DNA-bindenden Proteinen erkannt werden können (Higo *et al.*, 1999). Hierbei handelt es sich um Bindungsstellen für MYB-ähnliche Transkriptionsfaktoren. MYB- oder MYB-ähnliche Proteine wurden bereits in allen daraufhin untersuchten Eukaryonten identifiziert (Gonda *et al.*, 1985; Amaravadi *et al.*, 1994; Ohi *et al.*, 1994; u.a.). In höheren Pflanzen sind MYB-Proteine u.a. aus *Zea mays* (Paz-Ares *et al.*, 1987), aus *Arabidopsis thaliana* (Oppenheimer *et al.*, 1991), aus *Petunia hybrida* (Avila *et al.*, 1993) und aus *Hordeum vulgare* (Gubler *et al.*, 1995) bekannt. Die Zahl der Vertreter der pflanzlichen MYB-Familie kann sehr unterschiedlich sein. So werden in *A. thaliana* über 100 MYB-Gene geschätzt, während das Moos *Physcomitrella* nur 6 besitzt (Leech *et al.*, 1993; Solano *et al.*, 1995). Die DNA-bindende Domäne der MYB-Proteine besteht aus zwei oder drei Helix-Loop-Helix Strukturmotiven, in denen auch die spezifische Nucleotiderkennung determiniert ist. Des Weiteren besitzen MYB-Proteine einen Sequenzabschnitt, der als Transaktivierungs-Domäne bezeichnet wird und an der Ausbildung des Initiationskomplexes beteiligt ist (Lüscher und Eiseman, 1990).

MYB-Proteine sind DNA-bindende Proteine mit der Fähigkeit, Promotoren zu aktivieren. Die Promotor-Sequenzen, die zur Bindung des Proteins und zur erfolgreichen Aktivierung des Promotors führen, sind zwar spezifisch, lassen sich aber nicht in einem Motiv zusammenfassen. So wird das Kernmotiv für alle tierischen und mindestens zwei pflanzliche MYB-Proteine mit CNGTTR angegeben (Luscher und Eiseman, 1990; Urao

*et al.*, 1993), während ein MYB-Homolog der Tomate an die Sequenz GGATA bindet (Baranowskij *et al.*, 1994), und ein MYB-Protein in unterschiedlichen Pflanzenarten die Sequenz MACCWAMC von Promotoren der Phenylpropanoid-Biosynthese erkennt (Sablowski *et al.*, 1994).

In Pflanzen sind MYB-Proteine in unterschiedliche physiologische Prozesse eingebunden. Das Spektrum reicht von der Flavonoid-Biosynthese über die Trichom-Entwicklung bis zur Ausbildung der Zellgestalt (Paz-Ares *et al.*, 1987; Oppenheimer *et al.*, 1991; Noda *et al.*, 1994). Ein für diese Arbeit wichtiger Aspekt waren Berichte zur Beteiligung von MYB-Proteinen an der Signaltransduktion von Phytohormonen. Gubler *et al.* konnten 1995 zeigen, daß Gibberellinsäure die Expression eines alpha-Amylasegens der Gerste induziert. An der Signaltransduktion ist ein MYB-Protein (MYBGAHV) beteiligt, das an eine spezifische Sequenz des Amylase-Promotors bindet und für die Aktivierung des Promotors essentiell ist. Diese Sequenz (TAACAAA) wurde als „GA-response-element“ (GARE) bezeichnet (Skriver *et al.*, 1991). Ähnliches konnte in *A. thaliana* für die Signaltransduktion von Abscisinsäure gezeigt werden. ABA induziert die Expression von MYBATRD22. Dieses Protein aktiviert den Promotor von rd22, einem Trockenstreß-induzierten Gen (Abe *et al.*, 1997).

Die Suche in der NtAQP1-Promotorsequenz nach spezifischen Anlagerungsstellen für Transkriptionsfaktoren führte zur Identifikation von MYBGAHV- und MYBATRD22-spezifischen Bindungssequenzen in unterschiedlichen Bereichen. Ferner konnte ein Sequenzabschnitt lokalisiert werden, der mit dem Kern-Motiv CNGTTR aller tierischen sowie mit dem Trockenstreß-induzierter pflanzlicher MYB-Proteine übereinstimmt. Dieses Kernmotiv liegt auf dem „Plus-Strang“ und in gegenläufiger Orientierung auf dem „Minus-Strang“ (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3: Die putativen MYB-Bindungsstellen des NtAQP1-Promotors.**

Das Vorhandensein dieser Sequenzmotive führte zu der Vermutung, daß der NtAQP1-Promotor durch ABA und GA induziert werden kann. Dies konnte mittels der transienten Transformation von BY2-Zellen mit DNA des dualen Vektors pSKL-1449 bestätigt werden. Nach Inkubation mit den entsprechenden Phytohormonen kam es zu einer 3- bzw. 4-fachen Erhöhung der relativen Promotoraktivitäten. Durch anschließende Deletionsstudien konnte der Bereich von -1186 bis -1449 als verantwortlich für diese Aktivierungen bestimmt werden. In diesem Bereich befindet sich das Motiv für MYBGAHV. Somit ist die Beteiligung eines MYB-homologen Proteins in *Nicotiana*-BY2-Zellen wahrscheinlich. Daß sowohl die GA- als auch die ABA-Induktion durch Eliminierung dieser Bindungssequenz verringert wurde, deutet auf eine gemeinsame Komponente bei der Expression oder Regulation dieses putativen MYB-Proteins hin. Während die sukzessive Deletion des MYBCORE-Bereiches anscheinend keine Auswirkung zeigte, führte die folgende Deletion, bei der nun sämtliche MYB-Bindungsstellen eliminiert waren, zu einer basalen relativen Promotoraktivität.

Das MYBGAHV-Motiv kann als wichtigstes Element bei der Vermittlung der Phytohormon-Wirkungen gesehen werden. Aufgrund der relativ großen Entfernung zum Transkriptionsstart (1215 bp) handelt es sich um ein entferntes regulatorisches Element. Diese Entfernung ist für das MYB-Motiv nicht ungewöhnlich. So konnten Mur *et al.* (1995) in der Promotorsequenz des GA-induzierten *Petunia*-Gens pmyb92 GARE-Elemente im Bereich zwischen 1000 und 1200 bp stromaufwärts des putativen Transkriptionsstartes lokalisieren.

In *N. tabacum* sind bisher nur 5 myb- oder myb-ähnliche Gene bekannt. Die Expression dieser Gene wird durch die Infektion mit dem Tabak-Mosaik-Virus ausgelöst. Eine Beteiligung von MYB-Proteinen bei der Signaltransduktion von Phytohormonen wurde bislang für *Nicotiana* nicht beschrieben. Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern erste Hinweise für eine MYB-vermittelte Transduktion von GA- und ABA-Signalen bei der transkriptionellen Regulation des Aquaporins NtAQP1.

#### 4.6 Die subzelluläre Lokalisation von NtAQP1

Durch Auswertung der Sequenzübereinstimmungen des NtAQP1 mit anderen bereits charakterisierten Aquaporinen zeigten sich die größten Ähnlichkeiten mit Proteinen des PIP-Typs. Dies deutet auf eine Lokalisation des NtAQP1 in der Plasmamembran hin. Barkla *et al.* (1999) haben diese auf Sequenzvergleiche basierende Klassifizierung von Aquaporinen näher untersucht. Durch immunologische Analysen stellte sich heraus, daß der PIP-Familie zugeordnete Proteine in manchen Fällen auch in der Tonoplastenfraktion von Membranaufreinigungen anzutreffen sind. Hieraus begründete sich der Bedarf nach einer *in-vivo*-Analyse der subzellulären Lokalisation von NtAQP1. Die Amino-terminale Genfusion von GFP und NtAQP1 sollte Aufschluß über die subzelluläre Lokalisation des Aquaporins geben. Die spezifische Fluoreszenz des Fusionsproteins wurde in der Plasmamembran beobachtet. Durch Änderung der Fokussierung wurde zusätzlich eine unstrukturierte Häufung von Fusionsprotein in den Randbereichen der Zellen festgestellt. Hierbei könnte es sich um proteinbeladene Membranvesikel handeln, die dem Auf- oder Abbau der Zytoplasmamembran dienen. Barkla *et al.* (1999) vermuten sogar Transportvorgänge von PIPs zwischen Zytoplasmamembran und Endomembranen, wie sie bei Aquaporinen in tierischen Zellen gezeigt werden konnten (Tamarappoo und Verkman, 1998). Da das Fusionsgen unter der Kontrolle des starken CaMV35S-Promotors stand, ist ebenso denkbar, daß eine Überexpression des Fusionsgens zu einer Ausschleusung von überschüssigem Protein durch Sekretation führte.

## **5 Zusammenfassung**

- Die Methodik und Technik der Gaswechselformung von Pflanzen wurde für den Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* optimiert und für Untersuchungen zur Beteiligung des Aquaporins PIP1b an Wassertransportvorgängen während der Stomaöffnung verwendet. Die Messungen der Transpirationsraten von PIP1b-Antisense-Pflanzen ergaben keine Hinweise auf Veränderungen des zeitlichen Verlaufs der Stomaöffnung. Die Wasserpermeabilitäten von Schließzell-Plasmamembranen scheinen somit nicht von der Expression des Aquaporins PIP1b beeinflusst zu sein.
- Gaswechselformungen an *Nicotiana tabacum* NtAQP1-Antisense-Pflanzen zeigten eine Verringerung der Transpirationsraten im Licht und eine geringere Grundtranspiration im Dunkeln. Dies deutet auf eine Beteiligung von NtAQP1 am Wassertransport hin.
- Ausgewählte *Arabidopsis thaliana*-Mutanten wurden hinsichtlich ihrer stomatären Antwort auf Rot- und Rot-/Blaulicht-Bestrahlung analysiert. Hierfür wurde ein Doppelbestrahlungs-Protokoll entwickelt. Vergleiche mit den Wildtypen ergaben signifikante Unterschiede bei der Phytochrom-Mutante *phyA-103*, der Abscisinsäure-Mutante *aba3-2* und der Auxin-resistenten Mutante *axr1-3*. Ferner zeigte die Mutante *npq1-2* nicht die beschriebene Abweichung der stomatären Antwort auf Blaulicht.
- Die Expressionsmuster eines PIP1b-GFP-Reportergens in transgenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurden analysiert. Hohe Promotor-Aktivitäten konnten in meristematischen Bereichen von Wurzel und Sproß, in Elementen der Leitbündel, in jungen Kotyledonen und in Staubblättern beobachtet werden. Es zeigte sich eine enge Korrelation zwischen PIP1b-Promotoraktivität und Streckungswachstum.
- Eine Sequenzanalyse des NtAQP1-Promotors ergab Übereinstimmungen mit spezifischen Bindungsmotiven von MYB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren. Mit Promotor-Reportergenen konnte die Beteiligung eines dieser Sequenzmotive an der GA- und ABA-induzierten Aktivierung des NtAQP1-Promotors gezeigt werden. Zur Analyse der Phytohormon-Wirkungen auf deletierte Promotorbereiche wurde ein duales Vektorsystem entwickelt und bei der transienten Transformation von BY2-Protoplasten eingesetzt.
- Die Expression eines GFP::NtAQP1-Fusionsgens in BY2-Zellen zeigte die subzelluläre Lokalisation des Aquaporins in der Zytoplasmamembran. Ferner wurde Fusionsprotein in Vesikel-ähnlichen Strukturen beobachtet.

## **6 Summary**

- Gas exchange measurement of plants was optimized for the model organism *Arabidopsis thaliana*. Consequently, studies on the participation of aquaporin PIP1b in water transport processes became possible. The transpiration rates obtained for PIP1b anti-sense plants revealed no differences in the time course of stomatal opening. Thus, water permeabilities of guard cell plasma membranes seem not to be influenced by the extent of PIP1b expression.
- Gas exchange measurement of the *Nicotiana tabacum* NtAQP1 anti-sense plants showed a reduced transpiration in response to light and a reduced basal transpiration in the dark. This indicates the participation of NtAQP1 in water movement.
- Selected *Arabidopsis thaliana* mutants were analyzed with regard to their stomatal response to red, red/blue light irradiation. For that, a dual beam protocol was developed. A comparison of the mutant lines to the wild-type revealed significant differences for the phytochrome A (*phyA-103*), the abscisic acid (*aba3-2*) and the auxin resistant (*axr1-3*) mutants. Furthermore, the mutant line *npq1-2* did not show the abnormal stomatal response to blue light reported previously.
- The expression patterns of a PIP1b-GFP-reporter gene in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants were analyzed. High promoter activities were obtained in areas of meristematic tissue in roots and shoot, in vascular elements, in young cotyledons and in stamens. A close correlation between PIP1b-promoter activity and cell elongation was obvious.
- Sequence analysis of the NtAQP1 promoter discovered DNA-motifs that correspond to specific binding sites of MYB-related transcriptional activators. By using promoter-reporter constructs, the involvement of one of these motifs in a GA- and ABA-induced increase of NtAQP1-promoter activity could be shown. In order to elucidate the effects of phytohormones on deleted promoter elements a dual vector system has been created, which was employed in the transient transfection of BY2-protoplasts.
- The expression of a GFP::NtAQP1 translational fusion in BY2-cells revealed a subcellular location in the cytoplasmic membrane. Furthermore, the protein-fusion was recorded in small vesicle-like structures.

## **7 Literaturverzeichnis**

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K.** 1997. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9** (10), 1859-1868.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Amaravadi L, King MW.** 1994. Characterization and expression of the *Xenopus c-myc* homolog. *Oncogene* **9**, 971-974.
- Assmann SM, Simoncini L, Schroeder JI.** 1985. Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **318**, 285-287.
- Assmann SM.** 1988. Enhancement of the stomatal response to blue light by red light, reduced intercellular concentrations of CO<sub>2</sub> and low vapor pressure differences. *Plant Physiology* **87**, 226-231.
- Avila J, Nieto C, Canas L, Benito MJ, Paz-Ares J.** 1993. *Petunia hybrida* genes related to the maize regulatory *CI* gene and to animal *myb* proto-oncogenes. *Plant J.* **3**, 553-562
- Baranowskij N, Froberg C, Prat S, Willmitzer L.** 1994. A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *EMBO J.* **13**, 5383-5392.
- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O, Kirch H-H, Bohnert HJ.** 1999. Aquaporin localization – how valid are the TIP and PIP labels ? *Trends in Plant Science* **4** (3), 86-88.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD.** 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* **304**, 184-187.
- Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R, Kaldenhoff R.** 1999. The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *The Plant Journal* **18** (5), 565-570.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cheng A, van Hoek AN, Yeager M, Verkman AS, Mitra AK.** 1997. Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature* **387**, 627-630.

- Daniels MJ, Mirkov TE, Chrispeels MJ.** 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.
- Daniels MJ, Chaumont F, Mirkov TE, Chrispeels MJ.** 1996. Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell* **8**, 587-599.
- Dietrich D.** 1999. Analyse der Regulation des Aquaporin-Gens Pip1b aus *Arabidopsis thaliana* mit Reportergenkonstrukten von green fluorescence protein. *Diplomarbeit*, J.-v.-S.-Institut f. Biowissenschaften, Universität Würzburg.
- Eckert M, Biela A, Siefritz F, Kaldenhoff R.** 1999. New aspects of plant aquaporin regulation and specificity, review article. *J. Exp. Bot.* **50** (339), 1541-1545.
- Eckert M, Kaldenhoff R.** 2000. Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. *J. Exp. Bot.* **51** (349), 1435-1442.
- Estelle MA, Sommerville C.** 1987. Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Molecular and General Genetics* **206**, 200-206.
- Farrel L, Beachy RN.** 1990. Manipulation of glucuronidase for use as a reporter gene in vacuolar targeting studies. *Plant Mol. Biol.* **15**, 821-824.
- Finley D, Chau V.** 1991. Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 25-69.
- Frechilla S, Zhu J, Talbott LD, Zeiger E.** 1999. Stomata from *npq1*, a zeaxanthin-less *Arabidopsis* mutant, lack a specific response to blue light. *Plant Cell Physiol.* **40** (9), 949-954.
- Gonda JT, Gough NM, Dunn AR, Blaquire de J.** 1985. Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine *myb* proto-oncogene. *EMBO J.* **4**, 2003-2008.
- Gorin MB, Yancey SB, Cline J, Revel J-P, Horwitz J.** 1984. The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: Characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell* **39**, 49-59.
- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV.** 1995. Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: Evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell.* **7** (11), 1879-1891.
- Guerrero FD, Jones JT, Mullet JE.** 1990. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* **15**, 11-26.
- Guo H, Yang H, Mockler TC, Lin C.** 1998. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* **279**, 1360-1363.

- Hedrich R, Schroeder JI.** 1989. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **40**, 539-569.
- Henning L, Poppe C, Unger S, Schafer E.** 1999. Control of hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* by photoreceptor interaction. *Planta* **208** (2), 257-263.
- Heymann J B, Agre P, Engel A.** 1998. Progress on the structure and function of aquaporin 1. *Journal of Structural Biology* **121** (2), 191-206.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T.** 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* **27** (1), 297-300.
- Höfte H, Hubbard L, Reizer J, Ludevid D, Herman EM, Chrispeels MJ.** 1992. Vegetative and seed-specific forms of tonoplast intrinsic protein in the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **99**, 561-570.
- Jap BK, Li H.** 1995. Structure of the osmo-regulated H<sub>2</sub>O-channel, AQP-CHIP, in projection at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **251**, 413-420.
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D.** 1986. β-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. *Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8447-8451.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW.** 1987. GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.
- Johansson I, Karlson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larson C, Kjellbom P.** 1998. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *The Plant Cell* **10**, 451-459.
- Johnson KD, Herman EM, Chrispeels MJ.** 1989. An abundant, highly conserved tonoplast protein in seeds. *Plant Physiol.* **91**, 1006-1013.
- Johnson KD, Chrispeels MJ.** 1992. Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. *Plant Physiol.* **100**, 1787-1795.
- Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P.** 1994. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP: The hourglass model. *J. Biol. Chem.* **269**, 14648-14654.
- Kaldenhoff R, Kölling A, Richter G.** 1993. A novel blue light- and abscisic acid-inducible gene of *Arabidopsis thaliana* encoding an intrinsic membrane protein. *Plant Mol. Biol.* **23**, 1187-1198.
- Kaldenhoff R, Kölling A, Meyers A, Karman U, Ruppel G, 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. *Plant Journal* **7**, 87-95.

- Kaldenhoff R, Kolling A, Richter G.** 1996. Regulation of the *Arabidopsis thaliana* aquaporin gene AthH2 (PIP1b). *J. Photochem. Photobiol. B* **36** (3), 351-354.
- Kaldenhoff R, Grote K, Zhu J, Zimmermann U.** 1998. Significance of plasmalemma aquaporins for watertransport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **14** (1), 121-128.
- Kaldenhoff R, Eckert M.** 1999. Features and function of plant aquaporins. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **52**, 1-6.
- Kaldenhoff R, Otto B, Biela A, Siefritz F, Eckert M.** 2000. Expression, location and function of a plasma membrane and chloroplast located aquaporin from tobacco. In: Molecular biology and physiology of water and solute transport. (Hohmann S und Nielsen S, eds.) *Kluwer Academic / Plenum Publishers*, Dordrecht, New York, 43.
- Kammerloher W, Fischer U, Piechottka GP, Schäffner AR.** 1994. Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J.* **6**, 187-199.
- Kiyosawa K, Ogata K.** 1987. Influence of external osmotic pressure on water permeability and electrical conductance of Chara cell membrane. *Plant Cell Physiol.* **28**, 1013-1022.
- Koorneef M, Hanhart CJ, Hilhorst HWM, Karssen CM.** 1989. *In vivo* inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **90**, 463-469.
- Krajinski F, Biela A, Schubert D, Gianinazzi-Pearson V, Kaldenhoff R, Franken P.** 2000. Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of MtAQP1 encoding a mercury insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* **211** (1), 85-90.
- Leech, MJ, Kammerer W, Cove DJ, Martin C, Wang TL.** 1993. Expression of *myb*-related genes in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **3**, 51-61.
- Léon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JA, Koornneef M.** 1996. Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *The Plant Journal* **10**, 655-661.
- Leyser HMO, Lincoln CA, Timpte C, Lammer D, Turner J, Estelle M.** 1993. *Arabidopsis* auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**, 161-164.

- Lincoln C, Britton JH, Estelle M.** 1990. Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **2**, 1071-1080.
- Liscum E, Briggs WR.** 1995. Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* **7** (4), 473-485.
- Mariaux JB, Bockel C, Salamini F, Bartels D.** 1998. Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* **38** (6), 1089-1099.
- Marten I, Lohse G, Hedrich R.** 1991. Plant growth hormones control voltage-dependent activity of anion channels in plasma membrane of guard cells. *Nature* **353**, 759-762.
- Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ, Saier MHJr.** 1994. Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus oocytes*. *J. Biol. Chem.* **269** (16), 11869-11872.
- Maurel C, Kado RT, Guern J, Chrispeels MJ.** 1995. Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin  $\alpha$ -TIP. *EMBO J.* **14**, 3028-3035.
- Maurel C, Chrispeels MJ, Lurin C, Tacnet F, Geelen D, Ripoche P, Guern J.** 1997. Function and regulation of seed aquaporins. *J. Exp. Bot.* **48**, 421-430.
- Maurel C.** 1997b. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 399-429.
- Mitra AK, van Hoek AN, Wiener MC, Verkman AS, Yeager M.** 1995. The CHIP28 water channel visualized in ice by electron crystallography. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 726-729.
- Mur LA.** 1995. Characterization of members of the *myb* gene family of transcription factors from *petunia hybrida*. Academisch Proefschrift (Dissertation), Freie Universitat Amsterdam.
- Niyogi KK, Grossman AR, Björkman O.** 1998. *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *The Plant Cell* **10**, 1121-1134.
- Noda K, Glover BJ, Linstead P, Martin C.** 1994. Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature* **23** 369 (6482), 661-664.
- Ogawa T, Ishikawa H, Shimada K, Shibata K.** 1978. Synergistic action of red and blue light and action spectra for malate formation in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **142**, 61-65.

- Ohi R, Mccollum D, Hirani B, Denhaese GH, Zhang X, Burke JD, Turner K, Gould KL.** 1994. The *Schizosaccharomyces pombe cdc5(+)* gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. *EMBO J.* **13**, 471-483.
- Oppenheimer DG, Herman PL, Sivakumaran S, Esch J, Marks MD.** 1991. A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell* **67** (3), 483-493.
- Otto B, Kaldenhoff R.** 2000. Cell specific expression of the mercury-insensitive plasma membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta* **211** (2), 167-172.
- Ow D.** 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**, 856ff.
- Parks BM, Quail PH.** 1993. *hy8*, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *The Plant Cell* **5**, 39-48.
- Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H.** 1987. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J.* **6** (12), 3553-3558.
- Phillips AL, Huttly AK.** 1994. Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridisation: Expression of the tonoplast water channel  $\gamma$ -TIP is increased by GA<sub>3</sub>. *Plant Mol. Biol.* **24**, 603-615.
- Pozo JC, Timpte C, Tan S, Callis J, Estelle M.** 1998. The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science* **280**, 1760-1763.
- Preston GM, Jung GS, Guggino WB, Agre P.** 1993. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J. Biol. Chem.* **268**, 17-20.
- Preston GM, Jung GS, Guggino WB, Agre P.** 1994. Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis. *J. Biol. Chem.* **269**, 1668-1673.
- Reizer J, Reizer A, Saier MHJ.** 1993. The MIP family of integral proteins: Sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 235-257.
- Rivers RL, Dean RM, Chandy G, Hall JE, Roberts DM, Zeidel ML.** 1997. Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. *J. Biol. Chem.* **272** (26), 16256-16261,

- Robinson DG, Sieber H, Kammerloher W, Schäffner AR.** 1996. PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *Plant Physiol.* **111**, 645-649.
- Roelfsema MRG, Prins HBA.** 1995. Effect of abscisic acid on stomatal opening in isolated epidermal strips of *abi* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **95**, 373-378.
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M.** 1998. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast *grr1p*. *Genes Dev.* **12** (2), 198-207.
- Sablowski RWM, Moyano E, Culianez-Macia FA, Schuch W, Martin C, Bevan M.** 1994. A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.* **13**, 128-137.
- Sarda X, Tusch D, Ferrare K, Legrand E, Dupuis JM, Casse-Delbart F, Lamaze T.** 1997. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant J.* **12** (5), 1103-1111.
- Scheuring S, Ringler P, Borgnia M, Stahlberg H, Müller DJ, Agre P, Engel A.** 1999. High resolution AFM topographs of the *Escherichia coli* water channel aquaporin Z. *EMBO J.* **18** (18), 4981-4987.
- Schreiber U.** 1997. Chlorophyllfluoreszenz und photosynthetische Energieumwandlung. Heinz Walz GmbH, 69-76.
- Schroeder JI, Hagiwara S.** 1989. Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**, 427-430.
- Schwartz SH, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M, Zeevaart JAD.** 1997. Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **114**, 161-166.
- Shi L-B, Verkman AS.** 1994. Functional independence of monomeric CHIP28 water channels revealed by expression of wild-type mutant heterodimers. *J. Biol. Chem.* **269**, 10417-10422.
- Siefritz F.** 1998. Identifikation und Analyse des NtAQP1-Aquaporin-Promotors aus *Nicotiana tabacum*. Diplomarbeit, J.-v.-S.-Institut f. Biowissenschaften, Universität Würzburg.
- Skriver K, Olsen FL, Rogers JC, Mundy J.** 1991. cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (16), 7266-7270.

- Solano R, Nieto C, Avila J, Canas L, Diaz I, Paz-Ares J.** 1995. Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*, *EMBO J.* **14**, 1773-1784.
- Talbott LD, Zeiger E.** 1993. Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. *Plant Physiology* **102**, 1163-1169.
- Tallman D, Zeiger E.** 1988. Light quality and osmoregulation in *Vicia* guard cells: Evidence for *Vicia* involvement of three metabolic pathways. *Plant Physiology* **88**, 887-895.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Tyree MT.** 2000. Persönliche Mitteilung. Department of Botany & Agricultural Biochemistry. University of Vermont, Burlington, USA.
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K.** 1993. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**, 1529-1539.
- Van Os CH, Deen PMT, Dempster JA.** 1994. Aquaporins: Water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution. *Biochem. Biophys. Acta* (1197), 291-309.
- Verkman AS, van Hoeck AN, Ma T, Frigeri A, Skach WR.** 1996. Water transport across mammalian cell membranes. *Am. J. Physiol.* **270**, 12-30.
- Walz T, Smith BL, Agre P, Engel A.** 1994. The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP. *EMBO J.* **13** (13), 2985-2993.
- Walz T, Hirai T, Murata K, Heymann JB, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Smith BL, Agre P, Engel A.** 1997. The 6Å three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* **387**, 624-627.
- Wayne R, Tazawa M.** 1990 Nature of the water channels in the internodal cells of *Nitellopsis*. *J. Membr. Biol.* **116**, 31-39.
- Weig A, Deswarte C, Chrispeels MJ.** 1997. The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol.* **114** (4), 1347-1357.
- Wu W, Assmann SM.** 1993. Photosynthesis by guard cell chloroplasts of *Vicia faba* L.: Effects of factors associated with stomatal movement. *Plant Cell Physiology* **34** (7), 1015-1022.

- Yamada S, Katsuhara M, Kelly WB, Michalowski CB, Bohnert HJ.** 1995. A family of transcripts encoding water channel proteins: Tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* **7**, 1129-1142.
- Yamada S, Komori T, Myers PN, Kuwata S, Kubo T, Imaseki H.** 1997. Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol.* **38** (11), 1226-1231.
- Yamada S, Nelson DE, Ley E, Marquez S, Bohnert HJ.** 1997b. The expression of an aquaporin promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* in tobacco. *Plant Cell Physiology* **38**, 1326-1332.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K.** 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* **33**, 217-224.
- Yamamoto YT, Taylor CG, Acedo GN, Cheng CL, Conkling MA.** 1991. Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco. *The Plant Cell* **3**, 371-382.
- Zeiger E.** 1990. Light perception in guard cells. *Plant, Cell and Environment* **13**, 739-747.
- Zeiger E, Zhu J.** 1998. Role of zeaxanthin in blue light photoreception and the modulation of light-CO<sub>2</sub> interactions in guard cells. *Journal of Experimental Botany* **49**, 433-442.

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
*g	-mal Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
A	Adenin
ABA	Abscisinsäure
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
AQP	Aquaporin
ATP	Adenosintri-phosphat
ATPase	Adenosintri-phosphatase
BL	Blaulich
bp	Basenpaare
BY2	<i>Nicotiana tabacum</i> Bright-Yellow 2
C	Cytosin
ca.	Zirka
cDNA	copy DNA
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadrat-zentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubik-zentimeter
dATP	Deoxyadenosintri-phosphat
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNTP	deoxy-Nucleotidtri-phosphat
DTT	Dithio-treitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EFR	Energieflußrate
g	Gramm
G	Guanin
GA	Gibberellinsäure
GARE	englisch: GA-response-element
GFP	englisch: green fluorescence protein
GUS	Glucuronidase
h	Stunde
IAA	3-Indol-Essigsäure
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LiTr	Licht-induzierte Transpirationsrate
LUC	Luciferase
m	Meter
M	Molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MES	4-Morpholin-ethansulfonsäure

mg	.....	Milligramm
min	.....	Minuten
MIP	.....	englisch: major intrinsic protein
ml	.....	Milliliter
mM	.....	Millimolar
MOPS	.....	4-Morpholino-propansulfonsäure
mosm	.....	Milliosmolar
mRNA	.....	englisch: messenger RNA
MUG	.....	Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid
MW	.....	Mittelwert
N	.....	Normal
ng	.....	Nanogramm
nl	.....	Nanoliter
nm	.....	Nanometer
NPQ	.....	englisch: non-photochemical quenching
NtAQP1	.....	<i>Nicotiana tabacum</i> Aquaporin 1
OD	.....	Optische Dichte
p	.....	P-Wert
Pa	.....	Promotoraktivität
PAR	.....	englisch: photosynthetic active radiation
PCR	.....	englisch: Polymerase Chain Reaction
PEG	.....	Polyethylenglycol
PH	.....	negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PIP	.....	englisch: plasmalemma intrinsic protein
pmol	.....	Picomol = 10 <sup>-12</sup> Mol
rel.	.....	Relativ
RL	.....	Rotlicht
RLU	.....	englisch: relative light units
RNA	.....	Ribonucleinsäure
RNase	.....	Ribonuclease
RT	.....	Raumtemperatur
RUB	.....	englisch: related to ubiquitine
SD	.....	Standardabweichung
SDS	.....	englisch: sodium dodecylsulfate
SE	.....	Standardfehler
sec	.....	Sekunde
smGFP	.....	englisch: soluble modified GFP
T	.....	Thymin
Ta	.....	Primer-Anlagerungstemperatur
TAE	.....	Tris-Acetat-EDTA
Taq	.....	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	.....	N,N,N,N-Tetramethylaminomethan
TIP	.....	englisch: tonoplast intrinsic protein
Tm	.....	Schmelztemperatur
Tr	.....	Transpirationsrate
Tris	.....	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	.....	englisch: unit
Upm	.....	Umdrehungen pro Minute
UV	.....	Ultraviolett
V	.....	Volt
Vergr	.....	Vergrößerung

vgl.....vergleiche

Vol.....Volumen

W.....Watt

w/v.....englisch: weight/volume

WT.....Wildtyp

X-Gal.....5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galaktosid

## Kodierung der Aminosäuren und Nucleotide

### Aminosäuren:

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

### Nucleotide:

<u>Code</u>	<u>Basen</u>
A, C, G, T	A, C, G, T
R	A oder G
Y	T oder C
W	A oder T
S	C oder G
M	A oder C
K	G oder T
B	C, G oder T
D	A, G oder T
H	A, C, oder T
V	A, C oder G
N	A, G, C oder T

## Referenzen der verwendeten Vektoren

(Alle Internet-Adressen eingesehen im September 2000)

### **p327**

Plasmid mit CaMV35S – GFP – NosT - Kasette

Genbank accession number: U70495

URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list\\_uids=1619748&dopt=GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=1619748&dopt=GenBank)

### **pBluescript SK II**

Klonierungs- und Expressionsvektor

URL: [http://vectordb.atcg.com//vector\\_descrip/PBLUE2SKP.html](http://vectordb.atcg.com//vector_descrip/PBLUE2SKP.html)

### **pBI221**

Plasmid mit CaMV35S -  $\beta$ -Glucuronidase – NosT – Kasette

URL: [http://vectordb.atcg.com//vector\\_descrip/PBI221.html](http://vectordb.atcg.com//vector_descrip/PBI221.html)

Zugang zu der internationalen Sequenzdatenbank *Genbank*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Zugang zu einer umfangreichen Vektor-Datenbank: <http://vectordb.atcg.com/>

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Eckert, Martin  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Alter: 32  
Geboren am: 19.02.1968 / Robert-Koch-Krankenhaus, Gehrden  
Eltern: Marianne Eckert (geb. Möllmann), Klaus Eckert

### Schule:

1974 - 1977 Grundschole Harenberg, OT Seelze  
1977 - 1979 Orientierungsstufe Ahlem, Hannover  
1979 - 1987 Georg-Büchner-Gymnasium Letter, OT Seelze  
Hochschulreife erlangt im Mai 1987

### Nebenbeschäftigungen

06/1987 - 07/1987 Werkstudent bei der Continental AG, Werk Limmer  
11/1987 - 12/1987 Freie Mitarbeit am Institut für Zoologie / Entomologie der  
Universität Hannover

### Wehr/Ersatzdienst

12/1987 - 08/1989 Zivildienst beim Diakonischen Werk, Hannover

### Studium

10/1989 Beginn des Studiums, Biologie-Diplom, Universität Hannover  
04/1992 Diplomvorprüfungen  
02/1995 Diplomprüfungen  
06/1995 Beginn der Diplomarbeit am Institut f. Botanik, Uni Hannover  
Titel: Molekulare Analyse der Regeneration des blaublichtabhängigen  
Phototropismus von Mais-Koleoptilen. Betreuer: Prof. Dr. R. Kaldenhoff  
05/1996 Abgabe der Diplomarbeit  
10/1996 Erhalt des Diplomzeugnisses, Beendigung des Studiums  
01/1997 Umzug nach Würzburg, Beginn der Doktorarbeit am neu gegründeten  
Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie des J.v.S.-Institut f.  
Biowissenschaften, Prof. Dr. R. Kaldenhoff

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

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

Ich erkläre ferner, daß ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Oktober 2000

-----