

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Physikalische Grundlagen des Wassertransportes	1
1.1.1	Diffusion	2
1.1.2	Wassertransport durch Co-Transporter	3
1.1.3	Aquaporin-vermittelter Wassertransport	5
1.1.4	Aktiver Transport von Wasser	6
1.2	Erste Hinweise auf aquaporinvermittelten Wassertransport	6
1.3	Entdeckung einer neuen Familie von Membranproteinen: Aquaporine	7
1.4	Struktur von Aquaporinen	8
1.5	Aquaporine in Pflanzen	12
1.6	Selektivität und Sensitivität von Aquaporinen	13
1.7	Zielsetzung der Arbeit	15
1.7.1	Funktionelle Charakterisierung von Aquaporinen aus <i>Nicotiana tabacum</i>	15
1.7.2	Struktur- und Funktionsbeziehungen von Aquaporinen	17
1.7.3	Sind Aquaporine bei der pulvinusvermittelten Blattbewegung von <i>Samanea saman</i> beteiligt?	17
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
2.1	Anzucht der Pflanzen	20
2.2	Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)	20
2.2.1	Isolation von Gesamt-RNA	20
2.2.1.1	Lithiumchlorid-Methode	20
2.2.1.2	Säulenchromatographie	21
2.2.2	Isolierung von Poly(A) <sup>+</sup> -RNA	22
2.2.2.1	Isolation mit Oligo(dT)-Zellulose	22
2.2.2.2	Isolation mit Dynabeads Oligo(dT)25	23
2.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	24
2.2.4	Transferverfahren für RNA	25
2.3	Verfahren mit Deoxyribonukleinsäuren	25
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	25
2.3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA (schnelle Methode)	26
2.3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA (Säulenmethode)	27
2.3.2	Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen	27
2.3.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	28
2.3.4	Elution von DNA aus dem Agarosegel	29

---

2.3.5	Transferverfahren für DNA ("Southern-Blot")	29
2.4	Radioaktive Markierung von DNA	30
2.4.1	"Random Priming" mit Oligonukleotiden	30
2.4.2	Synthese einer spezifischen Einzelstrang-sonde	31
2.5	Hybridisierung von Nukleinsäuren	31
2.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
2.6.1	Konstruktion der Primer	32
2.6.2	PCR Standardexperiment	33
2.7	Klonierung von DNA-Fragmenten	33
2.7.1	TA-Klonierung von PCR-Produkten	33
2.7.2	Standardverfahren zur klonierung von cDNA-Fragmenten in Plasmid-DNA	35
2.7.3	Transformation	36
2.8	Sequenzierung	37
2.9	Herstellen einer cDNA-Bibliothek	39
2.9.1	Synthese von cDNA	39
2.9.2	Ligation der cDNA mit ZipLox	40
2.9.3	In vitro Verpackung und Infektion von Escherichia coli	40
2.9.4	Bestimmen der Insertionsgröße mittels PCR	42
2.9.5	Identifizierung von aquaporinhomologen Sequenzen	42
2.10	Marathon "RACE"	44
2.10.1	cDNA-Synthese	45
2.10.2	5'- und 3'-RACE PCR	46
2.11	Gezielter Austausch von Nukleinsäuren	47
2.11.1	Konstruktion der Primer	48
2.11.2	PCR-Reaktion	49
2.12	Synthese von cRNA (in vitro Transkription)	50
2.13	Verfahren mit Oozyten von Xenopus laevis	51
2.13.1	Präparation der Oozyten	51
2.13.2	Injektion von cRNA	52
2.13.3	Schwellungsexperimente mit Oozyten	52
2.13.4	Aufnahme von Glycerin und Harnstoff	53
2.13.5	Stimulation der Aquaporinaktivität	54
2.13.6	Elektrophysiologische Studien	54
2.13.6.1	Das Messprinzip	55
2.13.6.2	Der Messaufbau	55
2.13.6.3	Elektroden und Pipetten	55

---

2.13.6.4	Messlösungen	56
2.13.7	Fusion von Aquaporinen mit "Green Fluorescence Protein"	56
2.13.8	Farbreaktion mit b-Glucuronidase ("GUS-Assay")	59
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>61</b>
3.1	Herstellen einer cDNA-Bibliothek von <i>Nicotiana tabacum</i>	61
3.1.1	cDNA-Synthese	61
3.1.2	Bestimmung des Phagentiters	61
3.1.3	Insertionshäufigkeit und Insertionsgrösse	62
3.1.4	Identifizierung von aquaporinhomologen Sequenzen	63
3.2	Klonierung der Vollängen-cDNA	65
3.3	Untersuchung zur gewebespezifischen Expression von NtAQP1	71
3.4	Funktionsanalyse von NtAQP1 im Oozytensystem	73
3.4.1	Klonierung der NtAQP1-cDNA in den Vektor pGemHE	73
3.4.2	Wasserpermeabilität von NtAQP1	74
3.4.3	Einfluss von Quecksilberionen auf die Wasserpermeabilität von NtAQP1	76
3.4.4	Modifizierung der Aktivität durch Phosphorylierung	78
3.4.5	Untersuchungen zur Selektivität	79
3.4.5.1	Permeabilität für Glycerin	79
3.4.5.2	Effekt von Quecksilber auf die Glycerinpermeabilität	80
3.4.5.3	Permeabilität für Harnstoff	81
3.4.5.4	Permeabilität für Ionen	81
3.5	Gewebespezifische Expression von SsAQP1 und SsAQP2 zu bestimmten Tageszeiten	82
3.6	Funktionsanalyse von SsAQP1 und SsAQP2 in Oozyten	83
3.6.1	Wasserpermeabilität und Quecksilbersensitivität	83
3.6.1.1	Modifizierung der Quecksilbersensitivität von SsAQP2 durch Austausch eines Cystein	85
3.6.2	Permeabilität für Glycerin	86
3.7	Fusion von SsAQP1 und SsAQP2 mit GFP	87
3.8	Überprüfen der Translationseffizienz mittels GUS-Färbung	89
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>90</b>
4.1	Identifizierung eines Aquaporins aus <i>Nicotiana tabacum</i>	90
4.2	Berechnung der Wasserpermeabilitätskoeffizienten	90
4.3	Quecksilberinsensitivität von NtAQP1	91
4.4	Selektivität von NtAQP1	92
4.5	Regulation der Wasserpermeabilität	94
4.6	Funktionelle Charakterisierung von SsAQP1 und SsAQP2	95

4.7	Fusion mit GFP	96
4.8	Sind SsAQP1 und SsAQP2 an der Bewegung von Pulvini beteiligt?	96
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>109</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis	109
7.2	Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren	110
7.3	Makro zur Berechnung des Oozytenflächeninhalts	111