

1 EINLEITUNG

1.1 PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN DES WASSERTRANSPORTES

Die besonderen physikalischen Eigenschaften des Wassers sind essentiell für die Entstehung und Existenz allen Lebens. Obwohl Wassermoleküle neutral sind, resultiert aus der gewinkelten Molekülstruktur (Valenzwinkel von $104,5^\circ$) und der hohen Elektronegativität des Sauerstoffes ein stark ausgeprägter Dipolcharakter. Dieser ist z.B. verantwortlich für die Ausbildung von Hydrathüllen, die geladene organische und anorganische Moleküle umgeben und den Quellungszustand des Zytoplasmas entscheidend beeinflussen. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einem Wasserstoffatom und dem Sauerstoffatom eines benachbarten Wassermoleküls kommt es zu einer Vernetzung („Cluster-Bildung“). Diese hat unter anderem Einfluß auf die dynamische Viskosität des Wassers. Der passive Transport von Wasser über eine Doppellipidmembran („Lipidbilayer“) kann grundsätzlich durch Diffusion (siehe 1.1.1), durch Co-Transporter (siehe 1.1.2), oder mittels Aquaporinen (siehe 1.1.3) erfolgen. Die Gesamtpermeabilität $[L_p]$ einer Membran ergibt sich dabei aus der Addition der drei Teilpermeabilitäten.

$$L_p = \frac{J_{H_2O}}{\Delta \pi} \quad [\text{Gleichung 1}]$$

$$J_{H_2O} = L_{p,Lipid} \Delta \pi + L_{p,Co-Transporter} \Delta \pi + L_{p,Aquaporin} \Delta \pi \quad [\text{Gleichung 2}]$$

$$L_p = \text{Wasserpermeabilität} [\text{cm} * \text{s}^{-1}]$$

$$J_{H_2O} = \text{Wasserfluß} [\text{l} * \text{cm}^{-2} * \text{s}^{-1}]$$

$$= \text{osmotischer Gradient} [\text{osm} * \text{l}^{-1}]$$

Jede Doppellipidmembran besitzt neben der Permeabilität für Wasser (Moleküldurchmesser etwa 0,15 nm) auch eine Durchlässigkeit für größere Moleküle, wie z.B. Harnstoff und Glycerin (Durchmesser etwa 0,2 nm). Die Abbildung 1-1 zeigt die sinkende Permeabilität einer Membran für unterschiedlich große Moleküle in Abhängigkeit zum Durchmesser des passierenden Moleküls.

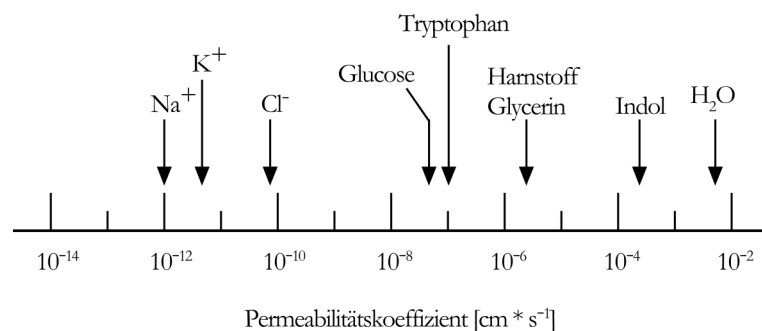


Abbildung 1-1: Permeabilitätskoeffizienten verschieden großer Moleküle (nach L. Stryer, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag 1994)

1.1.1 DIFFUSION

Die Diffusion definiert die untere Grenze der Wasserpermeabilität eines Lipidbilayers und wird durch das 1. Ficksche Gesetz beschrieben (s.u.). Entsprechend den Gesetzen der Thermodynamik wird ein dynamisches Gleichgewicht angestrebt, bei dem zwei gegenläufige Diffusionsströme sich gegenseitig in der Nettobilanz aufheben. Konzentrationsunterschiede werden dabei ausschließlich durch die thermische Bewegung der Moleküle statistisch abgebaut und so ein höheres Entropie-Niveau des gesamten Systems erreicht (Zweiter Hauptsatz der Thermodynamik).

$$1. \text{ Ficksches Gesetz: } \frac{d_m}{d_t} = -D * q \frac{-c}{x} \quad [\text{Gleichung 3}]$$

Dieses Gesetz besagt, dass die Diffusionsrate $\frac{d_m}{d_t}$ an jeder Stelle der an der Diffusion beteiligten Fläche q proportional zum Konzentrationsgefälle $-\frac{c}{x}$ in Stromrichtung x ist. Die Diffusionskonstante D ist abhängig von Temperatur, Molmasse und der Beschaffenheit der Membran.

Zur Veranschaulichung von Diffusionsprozessen in einer vakuolisierten Zelle dient die „Pfeffersche“ Zelle, die ein einfaches Osmometer darstellt. Hierbei sind zwei wässrige Lösungen mit unterschiedlichem Wasserpotential ($\mu_{\text{innen}} < \mu_{\text{außen}}$), bzw. osmotischen Potential ($\pi_{\text{innen}} > \pi_{\text{außen}}$) durch eine Niederschlagsmembran aus Kupferhexacyanoferrat (II) voneinander getrennt. Es resultiert ein Netto-Wasserfluß in Richtung des negativeren Wasserpotentials, der am Anstieg einer Wassersäule beobachtet werden kann. Der Wassereinstrom dauert so lange an, bis der von der Wassersäule erzeugte hydrostatische Druck p die Wasserpotentialdifferenz zwischen Innen- und Außenraum kompensiert.

Der Zusammenhang kann folgendermaßen dargestellt werden:

$$\mu_{\text{innen}} = \mu_{\text{außen}} + p \quad [\text{Gleichung 4}]$$

Das osmotische Potential einer nicht idealen Lösung ergibt sich aus:

$$\pi = -g * c * R * T \quad [\text{Gleichung 5}]$$

Die Werte für π werden in [bar], die Konzentration c in [mol * l⁻¹] angegeben. $R*T$ steht für das Produkt aus der Gaskonstanten R und der absoluten Temperatur T in [K]. Der osmotische Koeffizient g gilt nur bei nicht-idealen Lösungen und ist dimensionslos.

1.1.2 WASSERTRANSPORT DURCH CO-TRANSPORTER

Dieser proteinvermittelte Transport von Wasser erfolgt nur im Co-Transport mit Ionen und ist durch eine Reihe von Charakteristika definiert, die ihn von der Diffusion und dem aquaporinvermittelten Transport deutlich unterscheiden. So liegen die Arrhenius Aktivierungsenergien (E_a) mit $18 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ oberhalb derer für die Diffusion ($11 - 14 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$; Fettiplace *et al.*, 1980). Weiterhin ist die Kinetik des Wassertransportes nicht linear, sondern entspricht der einer Sättigungskurve, aus der sich eine mit Michaelis-Konstante (K_M in $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ableiten lässt. Derartige Co-Transporter, wie z.B. solche für K^+/Cl^- , H^+/Lac^- oder $\text{Na}^+/\text{Glucose}$ (Zeuthen *et al.* 1997) sind also substratspezifisch und somit in ihrer Aktivität abhängig von der chemischen Natur des osmotischen Gradienten. Dabei steht die Anzahl an transportierten Wassermolekülen und Ionen in einem definierten numerischen Verhältnis zueinander (z.B. $\text{H}_2\text{O}:\text{K}^+:\text{Cl}^-$; 500:1:1). Am Beispiel eines $\text{K}^+/\text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}$ Co-Transporters können die beschriebenen Charakteristika verdeutlicht werden. In einem Experiment wurde ein K^+/Cl^- Co-Transporter und ein Aquaporin im heterologen Oozyten Expressionssystem co-exprimiert und anschließend die Wassertransportraten in An- und Abwesenheit von externem KCl bei unterschiedlichen osmotischen Gradienten bestimmt.

Dabei ergab sich folgende Kinetik:

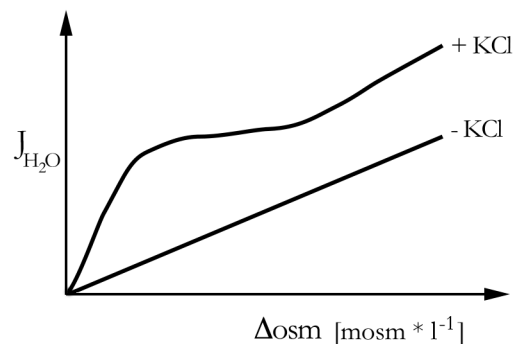


Abbildung 1-2: Ermittelte Wassertransportraten bei An- und Abwesenheit von externem KCl in Abhängigkeit vom osmotischen Gradienten (nach T. Zeuthen, Molecular Mechanism of Water Transport, Springer Verlag 1996).

Die lineare Abhängigkeit der Wassertransportrate in Abwesenheit von KCl ist darauf zurückzuführen, dass der K^+/Cl^- Co-Transporter unter diesen Bedingungen inaktiv ist und die ermittelten Transportraten ausschließlich auf der Expression des Aquaporins und der Diffusion des Wassers durch die Membran (Abbildung 1-3; B) basieren. Bei Anwesenheit von KCl addieren sich zusätzlich die durch den Co-Transporter vermittelten Wassertransportraten (Abbildung 1-3; A).

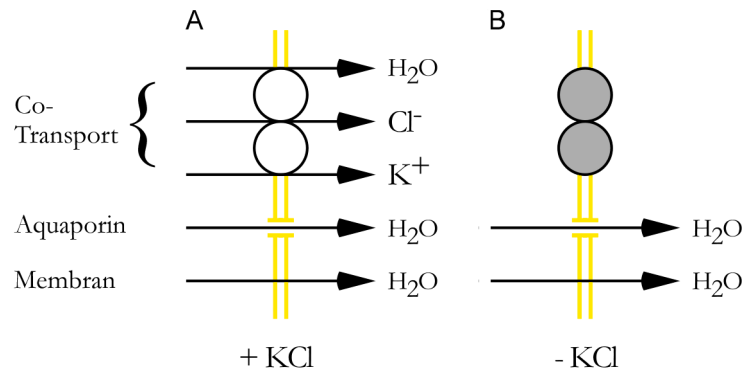


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des beschriebenen Experimentes. Die Kreise symbolisieren den K⁺/Cl⁻ Co-Transporter, die gelbe Doppellinie die Plasmamembran der Oozyten (nach T. Zeuthen, Molecular Mechanism of Water Transport, Springer Verlag 1996).

Als molekularer Mechanismus für den Co-Transport von Wasser und Ionen werden zwei Modelle diskutiert; das „Mobile Barrier“ Modell nach Mitchell (Abbildung 1-4 A) und das „Mobile Loop“ Modell (Abbildung 1-4 B).

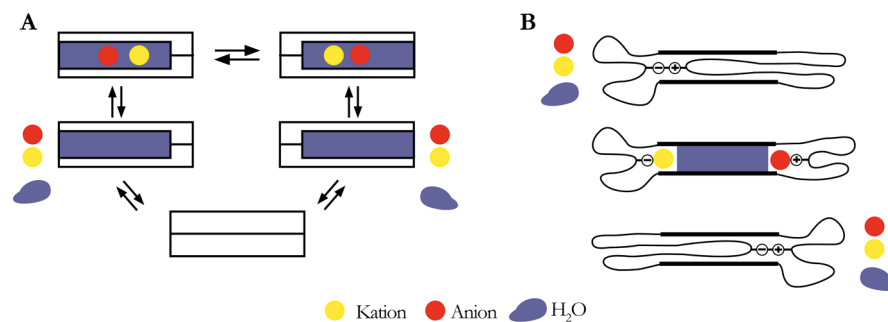


Abbildung 1-4: Das „Mobile Barrier“ Modell (A) sieht einen „Ping-Pong“ Mechanismus zum Transport von Wasser und Ionen vor. Nach Aufnahme von Wasser und Ionen erfolgt eine Konformationsänderung des Co-Transporters, die das Freisetzen von Wasser und Ionen auf der anderen Seite der Membran verursacht. Ebenfalls existiert eine inaktive Form. Das „Mobile Loop“ Modell (B) sieht einen Kanal aus α -Helices mit zwei Schleifen aus hydrophilen Aminosäuren vor, die im Lumen des Kanals über eine Salzbrücke miteinander verbunden sind. Unter Bindung von Kation und Anion wird die Verbindung gelöst und Wasser dringt von dieser Seite in das Lumen ein. Durch Rekonstruktion der Verbindung auf der anderen Seite der Membran werden Wasser und Ionen wieder freigesetzt.

1.1.3 AQUAPORIN-VERMITTELTEN WASSERTRANSPORT

Der Fluß von Wasser über membranständige Aquaporine ist gekennzeichnet durch die weitgehend lineare Abhängigkeit der Wassertransportrate vom osmotischen Gradienten, unabhängig von dessen chemischer Natur. Die Arrhenius Aktivierungsenergien (E_a) sind mit etwa $5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ signifikant niedriger, als jene für Co-Transporter und entsprechen den Werten für die freie Diffusion von Wasser in Lösung. Als theoretisches Modell für die Bewegung von Flüssigkeiten in einer idealen Kapillare dient das Hagen-Poiseuillesche Gesetz. Es wird als physikalisches Modell für den aquaporinvermittelten Transport von Wasser diskutiert (T. Zeuthen, Molecular Mechanism of Watertransport, Springer Verlag 1996). Die uneingeschränkte Anwendbarkeit dieses Gesetzes ist jedoch fraglich, da die Pore eines Aquaporins nicht einer idealen Kapillare entspricht. So wird vermutet, dass eine solche Pore über ihre gesamte Länge unterschiedliche Radien aufweist (Heymann *et al.* 1998).

$$\text{Hagen-Poiseuillesche Gesetz: } I = \frac{r^4}{8 l} p \quad [\text{Gleichung 6}]$$

I = Volumendurchfluß [$\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$]

r = Radius der Kapillare [cm]

η = dynamische Viskosität des Wassers [mPas, Millipascalsekunde]

l = Länge der Kapillare [cm]

p = Druckdifferenz [mPa]

Eine weitere Hypothese sieht den Transport von Wassermolekülen als sogenannten „single-file“ Transport. Dabei sollen die Wassermoleküle durch wechselnde Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit hydrophilen Aminosäuren entlang der Pore, einer Perlenkette gleich durch die Pore transportiert werden. Dabei kann nach einer Theorie von Levitt (1974) die Anzahl der Wassermoleküle in der Pore anhand des Quotienten aus osmotischer (P_f) und diffusionaler (P_d) Wasserpermeabilität direkt errechnet werden.

$$\frac{P_f}{P_d} = \frac{L_p \cdot R \cdot T}{\bar{V}_w \cdot P_d} = N \quad [\text{Gleichung 7}]$$

Das molare Volumen des Wassers \bar{V}_w beträgt $18 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$. N gibt die Anzahl von Wassermolekülen in der Pore an.

1.1.4 AKTIVER TRANSPORT VON WASSER

Bei aktiven Transportprozessen wird zwischen primär und sekundär aktiven Prozessen unterschieden, welche sowohl untereinander, als auch mit dem Metabolismus der Zelle gekoppelt sind. Der Transport von Wasser erfolgt dabei durch Co-Transporter gegen einen bestehenden osmotischen Gradienten, welcher bis zu $200 \text{ mosm} \cdot \text{l}^{-1}$ betragen kann. Dies entspricht einem Transport gegen den hydrostatischen Druck einer 40 m Wassersäule. Dabei wird, z.B. durch eine Na^+/K^+ ATPase, unter Hydrolyse von ATP eine elektrochemische Potentialdifferenz erzeugt, die dann energetisch von sekundär aktiven Prozessen genutzt wird. Der resultierende „bergab“ Transport von Ionen zum Ausgleich der Potentialdifferenz ist durch Co-Transporter mit dem „bergauf“ Transport des Wassers gekoppelt. Die Abbildung 1-5 zeigt das Schema einer hypothetischen Verbindung von primär und sekundär aktiven Transportprozessen, welches durch Interpretation von experimentellen Daten gewonnen wurde.

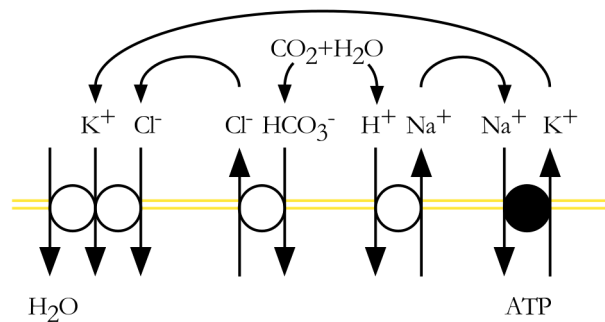


Abbildung 1-5: Mögliche Kopplung zwischen Metabolismus und aktiver Regulation des intrazellulären Wasserhaushaltes. Der gefüllte Kreis symbolisiert eine Na^+/K^+ -ATPase (primär aktiver Prozess). Offene Kreise stellen die sekundär aktiven Transportprozesse dar. Die Pfeile geben keine Verhältnisse sondern ausschließlich die jeweilige Flußrichtung an. (nach T. Zeuthen, *Molecular Mechanism of Water Transport*, Springer Verlag 1996).

1.2 ERSTE HINWEISE AUF AQUAPORINVERMITTELTEN WASSERTRANSPORT

Beobachtungen an der Haut von Fröschen zeigte, dass die experimentell ermittelte osmotische Wasserpermeabilität signifikant höher war, als die diffusionale Wasserpermeabilität. Die Applikation von antidiuretischen Hormonen (Vasopressin) führte zu einem weiteren Anstieg. Dieses deutete bereits auf einen proteinvermittelten Transport von Wasser hin und wurde 1953 von Koefoed-Johnson und Ussing zu einem Modell zusammengefaßt, welches eine Pore oder einen Kanal in der Membran vorsah. Die Ergebnisse von Koefoed-Johnson und Ussing wurden später mehrfach bestätigt (Bourguet *et al.*, 1976; Brown *et al.*, 1983). Weitere Unterstützung fand dieses Modell durch entsprechende Studien von Sidel und Solomon (1957) an roten Blutkörperchen. Zusätzlich war bekannt, dass Schwermetallionen einen reversiblen inhibitorischen Effekt auf zahlreiche Proteine

mit freien Sulfhydrylgruppen (-SH, Cystein) haben. Im Jahre 1970 konnten Macey und Farmer eine derartige Blockierung des osmotisch getriebenen Wassertransportes durch HgCl_2 demonstrieren. Weiterhin konnten sie zeigen, dass Phloretin den Transport von Glycerin und Harnstoff durch die Erythrozytenmembran hemmt, während die Wasserpermeabilität davon nicht beeinträchtigt war. Auch diese Befunde deuteten auf ein eigenständiges Transportsystem für Wassermoleküle hin.

Angeregt durch die Ergebnisse aus der humanen und tierischen Physiologie diskutierten Ray und Dainty in den 60er Jahren die Existenz entsprechender wasserpermeablen Poren in Pflanzen. Untersuchungen an Zellen von *Valonia ventricosa* hingegen ergaben einen sehr niedrigen Wasserpermeabilitätskoeffizienten (P_f -Wert), so dass Gutknecht hier auf eine Abwesenheit derartiger „Wasserporen“ schloß. Allerdings war dieses Ergebnis vermutlich auf den sogenannten „unstirred layer effect“ zurückzuführen, einem Artefakt, der bei vergleichbaren aktuellen Untersuchungen kompensiert werden kann (Henzler *et al.* 1995; Hertel *et al.* 1997). Bis zur molekularen Entdeckung des ersten Aquaporins (siehe 1.3) und der Identifizierung pflanzlicher Pendanten wurde die Vorstellung über den zellulären pflanzlichen Wassertransport von den Ergebnissen Gutknechts beeinflusst. Eine Beteiligung von wasserselektiven Proteinen wurde ausgeschlossen. Erst Untersuchungen von Wayne und Tazawa (1990) zur reversiblen quecksilbersensitiven Wasserpermeabilität von *Nitellopsis* Internodien, verdichteten erneut die Hinweise auf das Vorhandensein derartiger Proteine in Pflanzen.

1.3 ENTDECKUNG EINER NEUEN FAMILIE VON MEMBRANPROTEINEN: AQUAPORINE

Die Tatsache, dass die gemessenen Wasserpermeabilitäten von Nierenepithelzellen und Erythrozytenmembranen bis zu 20fach höher lagen, als bei anderen Membrantypen (menschliche Nieren können am Tag bis zu 150 Liter Flüssigkeit resorbieren; Borgnia *et al.*, 1999) implizierte die Beteiligung von Wasserkanalproteinen an der Regulation des Wasserhaushaltes. Dafür sprach auch der oben genannte Effekt von antidiuretischen Hormonen. Im Jahre 1987 gelang erstmalig die Isolation und biochemische Charakterisierung eines 28 kDa Proteins, welches nachweislich in Erythrozyten und im Nierentubuli exprimiert wird (Agre *et al.*, 1987; Denker *et al.*, 1988). Die bekannte Aminosäuresequenz ermöglichte das gezielte Durchmusteren einer cDNA-Bibliothek von Erythrozyten und resultierte in der Klonierung von CHIP28 („channel-like integral protein of 28 kDa; Preston *et al.* 1991). Die funktionelle Charakterisierung erfolgte durch Expression der entsprechenden cRNA in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*, deren Membran bekanntermaßen eine geringe natürliche Wasserpermeabilität aufweist (Zhang *et al.*, 1990). Tatsächlich wiesen transformierte Oozyten unter hypoosmotischen Bedingungen eine 10fach höhere osmotische Wasserpermeabilität auf, wie jene in die nur Wasser injiziert wurde (Preston *et al.*, 1992).

Zusätzlich wurde eine reversible Inhibition des Wassertransportes durch HgCl_2 und kein messbarer Anstieg der Ionenleitfähigkeit festgestellt. Diese frühen Studien zeigten auch, dass der Wassertransport bidirektional erfolgen kann und die Richtung des Wasserflusses von der Orientierung des osmotischen Gradienten bestimmt wird. Dieser Funktionstest gilt heute als anerkannte Methode zur Bestimmung der Wassertransporteigenschaften von Vertretern der Aquaporin-Familie. Entsprechend einer Übereinkunft des „Human Genome Nomenclature Committee“ wurde CHIP28 später in AQP1 umbenannt und die Bezeichnung „Aquaporin“ für diesen Typ von Membranproteinen offiziell eingeführt (Agre P., 1997). Mittlerweile sind weitere homologe Aquaporine aus Säugetieren identifiziert worden (AQP0-AQP9), die in verschiedenen Geweben lokalisiert wurden und dort an unterschiedlichen sekretorischen und resorptiven Prozessen beteiligt sind (Borgnia *et al.*, 1999).

1.4 STRUKTUR VON AQUAPORINEN

Aquaporine werden zusammen mit anderen membranständigen Proteinen, wie z.B. dem bakteriellen Glycerin Transporter GlpF (Maurel *et al.*, 1994), in die Super-Familie der MIP-homologen Proteine („major intrinsic proteins“) eingeordnet. Der erste Vertreter dieser Familie ist das bovine MP26 (Gorin *et al.*, 1984) aus der Membran von Muskelfasern der Augenlinse. Das Molekulargewicht aller 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 Ebene der Aminosäuren betragen kann, weisen alle Vertreter der MIP-Familie zwei hoch konservierte Sequenzmotive auf, deren zentrales Motiv allgemein als NPA-Boxen (Asparagin-Prolin-Alanin) 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 deuten Sequenzanalysen darauf hin, dass die MIP-Genfamilie durch eine intragenetische Duplikation entstanden ist (Reizer *et al.*, 1993). Die Abbildung 1-6 (A) verdeutlicht die resultierende Spiegelbildsymmetrie der Proteine, welche sich in einem hohen Grad an Sequenzähnlichkeit zwischen der amino- und carboxylterminalen Hälfte zeigt. Die Anzahl von 6 membrandurchspannenden α -Helices wurde zunächst durch Hydrophobizitätsprofile ermittelt und durch elektronenmikroskopische Studien an zweidimensionalen Kristallen von AQP1 (Walz *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1997) bestätigt. Die Lokalisation von Amino- und Carboxylterminus im Zytoplasma konnte durch Proteolyse an definierten Epitopen aufgezeigt werden (29 Aminosäuren vom E1 Epitop des Coronavirus), welche in rekombinierte 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). Eine Co-Expression in Oozyten von Wildtyp AQP1 mit einer inaktiven Mutante von AQP1 ließ den Schluss zu, dass das Monomer bereits eine funktionelle Einheit darstellt und die Bildung des Oligomers in der Membran aus Gründen der Stabilität erfolgt (Preston *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1994). Ergänzt wurden diese Ergebnisse durch Arbeiten von Jung *et al.* aus dem Jahre 1994. Hier wurden eine funktionelle und eine inaktive Mutante von AQP1 in Oozyten co-exprimiert. Die funktionelle Mutante konnte, im Gegensatz zur inaktiven, aufgrund des fehlenden carboxylterminalen Abschnitts nicht mehr in die Membran inserieren. In der nachfolgenden Wasserpermeabilitätsanalyse zeigten sich annähernd identische Schwellungskinetiken, wie für den AQP1 Wildtyp. Dieses war nur durch die Bildung von Oligomeren zu erklären. Frühe Röntgenstrukturanalysen von zweidimensionalen AQP1-Kristallen ergaben vier trapezförmige Untereinheiten (Abbildung 1-6, D), 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 1-6 B, C). Hierbei kommt die zentrale Vertiefung im Monomer durch die partiell hydrophoben Schleifen B und E zustande, die sowohl von der zytoplasmatischen, als auch von der extrazellulären Seite in die Membran eintauchen. Aktuelle Studien mittels Rasterkraftelektronenmikroskopie ließen bei einer Auflösung von 0,6 nm (Scheuring *et al.*, 1999; Abbildung 1-7 und Heymann *et al.*, 1998; Abbildung 1-8) erstmals die genauere Vermessung eines Aquaporins zu. So konnte der Winkel der einzelnen α -Helices in der Membran und der Radius an verschiedenen Stellen der zentralen Pore bestimmt werden. Dieser soll im Bereich von 0,35 - 0,6 nm liegen. Das von Jung *et al.* vorgeschlagene „hourglass“ Modell wurde entsprechend modifiziert (Abbildung 1-9). Eine hierauf basierende Hypothese schlägt die Beteiligung der fünf Aminosäuren [E-N-N-E-Q] am Wassertransport, im Sinne des „single-file“ Mechanismus vor.

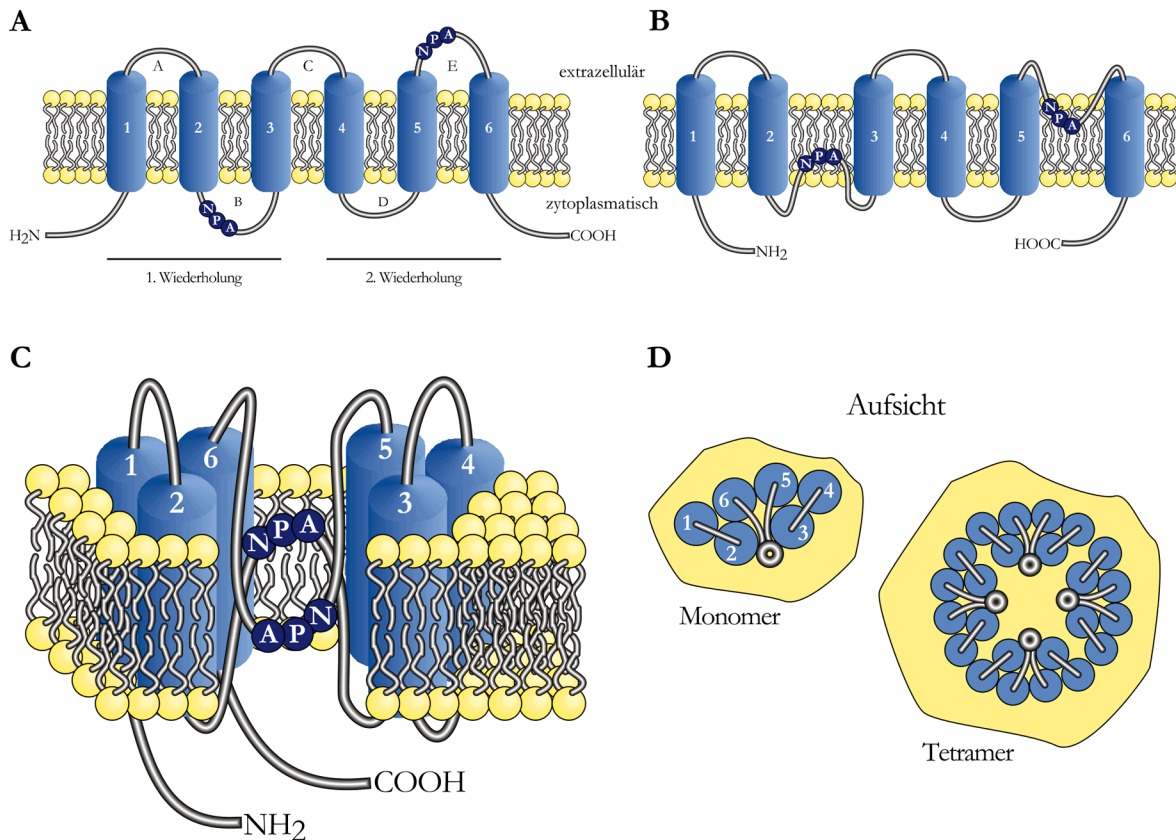


Abbildung 1-6: Strukturmodell eines Aquaporins mit allgemeiner Gültigkeit für alle Vertreter der MIP-Familie. Das Monomer (**A**) mit 6 transmembranen Helices und den zwei hochkonservierten NPA-Motiven. Das Protein zeigt eine Spiegelsymmetrie (1. und 2. Wiederholung), die evolutionär eventuell durch Genduplikation entstanden. Die für die Funktion essentiellen Schleifen B und E tauchen aufgrund ihres partiell hydrophoben Charakters in die Membran ein (**B**) und bilden eine Pore (**C**). In der Membran bilden dann vier funktionell eigenständige Monomere aus Stabilitätsgründen ein Tetramer (**D**) (verändert nach Kaldenhoff).

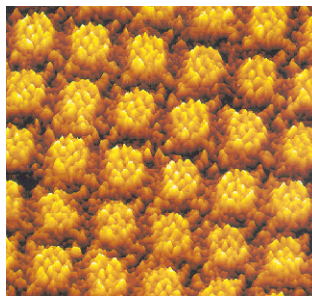


Abbildung 1-7: Strukturanalyse von AQP Z 2D-Kristallen (aus *Escherichia coli*) durch Rasterkraftelektronenmikroskopie. (Quelle: Titelbild *The EMBO Journal* Vol. 18, No. 18).

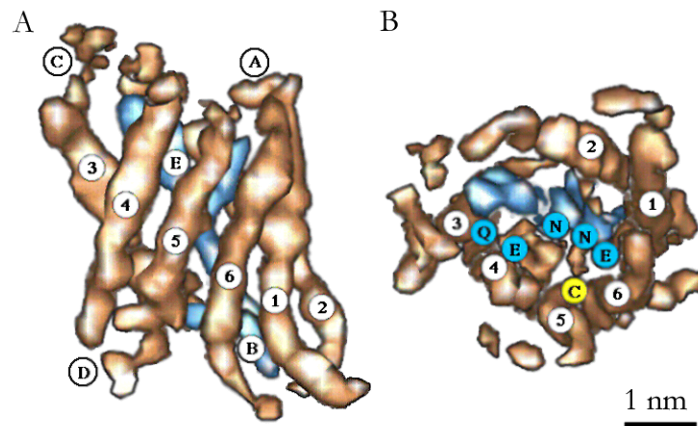


Abbildung 1-8: Seitenansicht (A) und Aufsicht (B) eines dreidimensionalen Bildes des AQP1 Monomers bei einer Auflösung von 0,6 nm, das durch computergestützte Auswertung von rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen entsprechender 2D Kristalle gewonnen wurde (aus Heymann *et al.*, 1998). Die einzelnen α -Helices (goldfarben) sind von 1 bis 6 nummeriert, die wahrscheinliche Position der Schleifen durch die weiß hinterlegten Buchstaben A bis E angegeben. Die porenbildenden Schleifen B und E sind zusätzlich blau eingefärbt. Die nach einer Hypothese am Wassertransport beteiligten Aminosäuren [E-N-N-E-Q] sind blau hinterlegt. Der Amino- und Carboxylterminus sind nicht dargestellt.

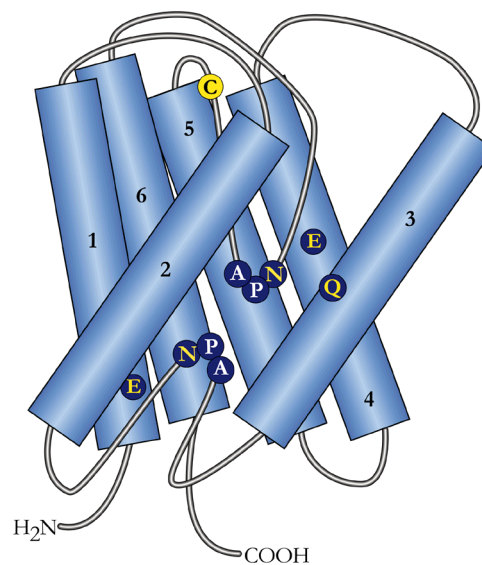


Abbildung 1-9: Anhand von Abbildung 1-8 modifiziertes „hourglass“-Modell (verändert nach Heymann *et al.*, 1998)

1.5 AQUAPORINE IN PFLANZEN

Wasser bestimmt zu 70 – 90% das Frischgewicht von Pflanzen. Unter normalen Bedingungen kann eine Landpflanze an einem Tag in etwa das gleiche Volumen an Wasser durch Transpiration verlieren. Verantwortlich hierfür ist u. a. das gegenüber dem Boden negativere Wasserpotential der Luft. Der resultierende Transpirationssog ist die treibende Kraft für den Langstreckentransport des Wassers vom Wurzelsystem über das Xylem zu den Blättern. Dabei muss das Wasser zunächst vom Apoplasten in den Symplasten übertreten, um den Kasparischen Streifen in der Wurzelendodermis passieren zu können. Angesichts der großen Wassermengen, die in das Xylem transportiert werden, liegt eine Beteiligung von Aquaporinen nahe. Zeitgleich mit der Entdeckung von CHIP28 verdichteten sich die Beweise für die Existenz derartiger Wasserkanäle in Pflanzen (Kiyosawa und Ogata, 1987; Wayne und Tazawa, 1990). Im Jahre 1990 identifizierten Conkling *et al.* die Genfamilie *TobRB7* (*TobRB7-5A* & *TobRB7-18C*) aus Tabak. Die beiden Gene sind Mitglieder der MIP-Familie und werden während eines frühen Entwicklungsstadiums spezifisch im vaskulären Gewebe der Wurzel exprimiert (Yamamoto *et al.*, 1991). Dieses wurde von den Autoren als generelle Beteiligung von Aquaporinen am pflanzlichen Wassertransport interpretiert. Sehr schnell folgte die Identifizierung weiterer cDNA-Klone (Kaldenhoff *et al.*, 1993), sowohl aus dem Tonoplasten (TIP; „tonoplast intrinsic proteins“), als auch der Plasmamembran (PIP; „plasma membrane intrinsic proteins“). Durch Reporter-Experimente (GUS-Expression) konnte auch hier während früher Entwicklungsstadien eine Expression vor allem in vaskulärem Gewebe und den umgebenen Zellen nachgewiesen werden (Kaldenhoff *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1995; Daniels *et al.*, 1996). So enthalten Transferzellen, die das vaskuläre Gewebe in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* umgeben, deutlich mehr PIP-Proteine als die Mesophyllzellen (Kölling A., Doktorarbeit 1994; Robinson *et al.* 1996; Otto *et al.*, 2000). Gleichsam wurden Aquaporine vom PIP- und TIP-Typ in hoher Konzentration in Zonen der Elongation und des Zellwachstums gefunden. Ihre Funktion liegt hier in der Wasseraufnahme während der Zellexpansion. Aktuelle Ergebnisse deuten eine Beteiligung von TIP-homologen Aquaporinen bei der Ausbildung der arbuskulären Mykorrhiza (AM) in *Medicago truncatula* an (Krajinski *et al.* 2000). Für die Tonoplasten Aquaporine TIP aus *Phaseolus vulgaris* (Johnson *et al.*, 1990), sowie für TIP und TIP aus *Arabidopsis thaliana* (Höfte *et al.*, 1992), konnte ebenfalls eine entwicklungspezifische Expression nachgewiesen werden. Während der Keimung von *Arabidopsis thaliana* ist zunächst TIP in hoher Dichte in der Membran von Proteinspeichervesikeln anzutreffen und wird später bei der Mobilisierung und Umwandlung in kleinere Vesikel durch die Isoform TIP ersetzt (Maurel *et al.* 1997). Letzterer war das pflanzliche Aquaporin, dessen Funktion als erstes im Oozyten-Expressionssystem bestätigt wurde (Maurel *et al.*, 1993). Die Familie der PIPs stellt zahlenmäßig bei weitem die größte Gruppe der pflanzlichen Aquaporine dar, wobei bislang nur ein Teil funktionell charakterisiert wurde. Am bekanntesten sind

hier zwei Vertreter aus der PIP1- und drei Vertreter aus der PIP2-Unterfamilie aus *Arabidopsis thaliana* (Kaldenhoff *et al.*, 1993; Kammerloher *et al.*, 1994). Neben der entwicklungspezifischen Expression wurden auch eine Reihe von exogenen und endogenen Stimuli beschrieben, die Einfluß auf die Expression von Aquaporinen haben. Dazu gehören Blaulich, 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.*, 1995 und 1997).

Zusätzlich zur Möglichkeit einer transkriptionellen Regulation, konnte bisher für zwei pflanzliche Aquaporine eine Regulation auf Proteinebene festgestellt werden. In der Bohne wiesen Johnson *et al.* 1992 eine *in vivo* Phosphorylierung von TIP über eine Tonoplasten gebundene 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 Wasserkanalaktivität 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. Eine sehr interessante hormongesteuerte Regulation findet man bei AQP2 im menschlichen Nierenepithel. Hier können mit AQP2-Proteinen beladene Membranvesikel in einer vasopressinabhängigen Reaktion mit anderen Membranen verschmelzen, bzw. auch wieder ausgegliedert werden. Einen vergleichbaren Mechanismus vermutet man bei den aquaporinbeladenen Plasmalemmasomen in Mesophyllzellen von *Arabidopsis thaliana* (Robinson *et al.*, 1996).

1.6 SELEKTIVITÄT UND SENSITIVITÄT VON AQUAPORINEN

Bereits vor der molekularen Identifizierung der Aquaporine, gab es indirekte Hinweise auf die hohe Selektivität von Wasserkanälen bei Tieren und Pflanzen (Macey, 1984; Kiyosawa *et al.*, 1987). Erwartungsgemäß führte die Expression von TIP und TIP in Oozyten nicht zu einer Erhöhung der Permeabilität für Glycerin bzw. für Ionen (Maurel *et al.*, 1995 und 1997). Allerdings berichteten Yool *et al.* (1996) von einer Forskolin stimulierten Leitfähigkeit für Kationen bei AQP1. Diese Studie wurde aber später mehrfach unabhängig voneinander widerlegt (Agre *et al.*, 1997). Jüngste Ergebnisse demonstrierten allerdings eine durch $HgCl_2$ stimulierte Ionenleitfähigkeit für AQP6 (aus *Rattus norvegicus*; Yasui *et al.*, 1999) Bereits 1994 wiesen Ishibashi *et al.* in Oozyten einen AQP3-vermittelten Transport für die Testsubstanzen Glycerin und Harnstoff nach. Eine Inkubation mit selektiven Inhibitoren, wie z.B. Phloretin senkte die Wassertransportraten um 35%, beeinflusste aber nicht den Transport von Glycerin oder Harnstoff (Echevarriá *et al.*, 1996). Die Autoren schlossen daher auf zwei unabhängige Wege für Wasser und kleine, neutrale Substanzen. Dem widersprachen

die Ergebnisse von Kuwahara *et al.* (1997). Die Autoren zeigten, dass der Austausch einzelner Aminosäuren in AQP3 nicht nur zu einer Modulation der Sensitivität gegenüber Quecksilberionen führt, sondern auch die Permeabilität für Wasser und Glycerin gleichzeitig herabgesetzt wird. Dieses spricht für einen gemeinsamen Transport über eine einzelne Pore. In Folge konnte für weitere humane Aquaporine eine geringe Diskriminierung zwischen Wasser und Glycerin nachgewiesen werden (Ishibashi *et al.*, 1997a und 1997b; Kuriyama *et al.*, 1997), obgleich die physiologische Bedeutung und der molekulare Mechanismus noch unklar ist. Borgnia *et al.* (1999) diskutieren zu letztgenannten Punkt einige Sequenzmotive, die für die Glycerinpermeabilität verantwortlich sein könnten. So weisen sogenannte Aquaglyceroporine in der Schleife C das Motiv [GLYY] und in der Schleife E das Motiv [NPARD], anstelle von [NPARS] auf. Die zugrundeliegende Sequenzanalyse berücksichtigte aber ausschließlich humane Aquaporine. Für pflanzliche Aquaporine demonstrierten Rivers *et al.* 1997 erstmals eine Glycerinpermeabilität für NOD26 aus der Peribakteroidmembran von nodulierten Sojabohnenwurzeln. Von besonderem Interesse könnte der kürzlich beschriebene AQP1-vermittelte Transport von CO₂ sein (Cooper *et al.*, 1998; Nakhoul *et al.*, 1999). Auch hier handelt es sich um Ergebnisse, die im Oozytensystem ermittelt wurden und deren physiologische Bedeutung *in vivo* noch völlig unklar ist. So ist z.B. aus klinischen Studien bekannt, dass einige wenige Menschen trotz nicht funktionellem AQP1 keinerlei Nierendisfunktionen aufweisen (Agre P., 1998).

Der Effekt von Schwermetallen auf den Wassertransport wurde bereits Ende des letzten Jahrhunderts von Pflanzenphysiologen beschrieben. So demonstrierte Haberlandt 1884, dass die Blätter von abgeschnittenen Zweigen, welche in eine quecksilberhaltige Lösung tauchten, keinerlei Guttation mehr zeigten. Wie zuvor beschrieben (siehe 1.2) deutete dieser inhibitorische Effekt bereits vor ihrer molekularen Entdeckung auf die Existenz von Wasserkanälen hin. Die ersten molekularen Untersuchungen zu diesem Effekt wurden an AQP1 durchgeführt, das nur über ein Cystein in Schleife E an Position 189 verfügt (siehe Abbildung 1-8). Durch Austausch gegen ein Serin konnte eindeutig gezeigt werden, dass dieses Cystein die Sensitivität vermittelt (Preston *et al.*, 1993). Diese Charakteristik wurde darauffolgend bei verschiedenen pflanzlichen und tierischen Aquaporinen festgestellt (Maurel *et al.*, 1997; Borgnia *et al.*, 1999). Allerdings präsentierten Daniels *et al.* 1994 mit RD28 ein pflanzliches Aquaporin, das trotz mehrerer vorhandener Cysteine nicht quecksilbersensitiv ist. Interessanterweise zeigen Homologiestudien, dass die Positionen der Cysteine innerhalb der gesamten MIP-Familie nicht konserviert ist. Während sich bei pflanzlichen Aquaporinen vom PIP-Typ die Cysteine anscheinend auf die carboxylterminale Hälfte des Proteins beschränken, sind sie in tierischen Aquaporinen oft über das gesamte Proteine verteilt. Entscheidend ist wohl aber die Distanz zu einem der porenbildenden NPA-Motive. So konnten Daniels *et al.* (1994) durch Einfügen eines Cysteins in der Schleife E nahe des zweiten konservierten

NPA-Motives eine Quecksilbersensitivität bei RD28 hervorrufen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bis dato noch völlig unklar. Es ist bekannt, dass Quecksilberionen an SH-Gruppen von Proteinen binden und durch reduzierende Agenzien, wie z.B. 2-Mercaptoethanol wieder entfernt werden können. Andere blockierende Substanzen, wie pCMBS (pChloromercuribenzensulphonat) zeigten in identischen experimentellen Ansätzen dagegen häufig keinen Effekt auf den Wassertransport. Dieses könnte im Zusammenhang mit unterschiedlichen Reflexionskoeffizienten der Membran für diese Agenzien stehen und durch Temperatur und pH beeinflusst sein (Naccache und Sha`afi, 1974). So bildet HgCl_2 ein relativ lipophiles Ionenpaar, das über die Membran diffundieren und dabei auch membranintrinsische Proteindomänen beeinflussen kann. Dagegen ist pCMBS deutlich weniger permeabel (Tyerman *et al.*, 1999). Daniels *et al.* berichteten 1996 von Cysteinen in TIP und TIP, die in der zweiten putativen transmembranen - Helix lokalisiert sind. Entsprechend den Ergebnissen der durchgeführten Mutationsexperimente, konnten diese Cysteine als diejenigen identifiziert werden, die die Quecksilbersensitivität vermitteln. Dies ist bislang der einzige Bericht über Cysteine, die in einer transmembranen Domäne lokalisiert sind und eine Quecksilbersensitivität vermitteln. Ein Zusammenhang mit dem möglichen Effekt von HgCl_2 auf membranintrinsische Proteindomänen ist in diesem Fall denkbar. Während Heymann *et al.* (1998) eine quecksilberinduzierte Konformationsänderung des Proteins für unwahrscheinlich halten, konnten Barone *et al.* (1997) eine quecksilberinduzierte Veränderung im Bandenmuster von proteolytischen Spaltprodukten eines Aquaporins nachweisen. Die Autoren vermuten eine Konformationsänderung, die zur Exposition einer zusätzlichen proteolytischen Erkennungssequenz zwischen der dritten und vierten -Helix führt. Diese Konformationsänderung könnte die Pore derart beeinflussen, dass es zur Blockierung des Wassertransportes kommt.

1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

1.7.1 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON AQUAPORINEN AUS

NICOTIANA TABACUM

Zahlreiche pflanzliche Aquaporine sind bis heute z.B. im Oozytenexpressionssystem funktionell charakterisiert und als wasserpermeables Protein bestätigt worden. Die Frage, ob derartige Aquaporine tatsächlich zum Wassertransport in der Pflanze beitragen war jedoch noch nicht vollständig beantwortet. Aus diesem Grund wurde *Arabidopsis thaliana* mit einem Antisense-Konstrukt von PIP1b unter der Kontrolle des konstitutiven 35S Promotors stabil transformiert und hinsichtlich einer Veränderung im Wassertransport untersucht (Kaldenhoff *et al.*, 1998). Eine molekulare Analyse bestätigte signifikant reduzierte steady-state mRNA-Niveaus für PIP1a- und PIP1b-Transkripte, die 83% Sequenzidentität zueinander aufweisen. Aquaporine unterhalb dieses Schwellenwertes waren davon nicht betroffen. Aus „RNase protection“ Studien (Grote *et al.*, 1998)

war bekannt, dass PIP1b-mRNA in Blättern, Sproß und Wurzeln den mit Abstand größten Anteil an allen untersuchten PIP-Transkripten stellt. Es wurde daher erwartet, dass die Expression des Antisense-Konstruktes in der Ausprägung eines deutlichen Phänotyps resultieren würde. Tatsächlich wiesen die transgenen Pflanzen eine um den Faktor 5 vergrößerte Wurzelmasse auf (Abbildung 1-10). Oberirdische Pflanzenteile zeigten in Bezug auf Morphologie und Entwicklung keine Veränderung. Um mögliche Unterschiede im Wassertransport auf zellulärer Ebene aufzuzeigen, wurden Schwellungsexperimente mit isolierten Protoplasten durchgeführt. Hierbei konnte eine reduzierte Permeabilität der Plasmamembran für Wasser demonstriert werden, welche auf die verringerte PIP1a- und PIP1b-Transkriptmenge zurückgeführt wurde. Dieses hatte aber keinerlei Auswirkungen auf die von den Wurzeln aufgenommene Wassermenge, wie Messungen mittels Potometer zeigten. Die auf zellulärer Ebene reduzierte Wasserpermeabilität wurde anscheinend von den Antisense-Pflanzen durch die vergrößerte Wurzeloberfläche kompensiert. Um die Frage zu klären, ob dieses zu veränderten physikalischen Parametern, wie z.B. dem Xylemdruck führt, wurde eine Druckmesssonde in das Xylem der Hauptwurzel von Kontroll- und Antisensepflanzen eingeführt (Kaldenhoff *et al.*, 1998). Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede ersichtlich. Als problematisch erwies sich bei diesen Studien die geringe Größe von *Arabidopsis thaliana*. Als alternatives System empfahl sich *Nicotiana tabacum*, da diese Pflanze deutlich größer ist und hier bereits Druckmessungen am Xylem erfolgreich vorgenommen wurden (Balling und Zimmermann, 1990).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte folglich zunächst ein Aquaporin aus *Nicotiana tabacum* identifiziert und nach molekularer und funktioneller Charakterisierung im Oozytensystem zur Herstellung entsprechender Antisense-Pflanzen genutzt werden. An diesen sollten dann die zuvor beschriebenen biophysikalischen Experimente wiederholt werden.



Abbildung 1-10: Morphologie von transgenen *Arabidopsis thaliana* (links). Als Vergleich Kontrollpflanzen (rechts). Die PIP1b-Antisense Pflanzen weisen eine um den Faktor 5 vergrößerte Wurzelmasse auf. Oberirdische Pflanzenteile zeigten keine Unterschiede in Morphologie und Entwicklung.

1.7.2 STRUKTUR- UND FUNKTIONSBEZIEHUNGEN VON AQUAPORINEN

Anhand von vergleichenden Sequenzanalysen von bisher bekannten und charakterisierten Aquaporinen sollten Sequenzmotive herausgestellt werden, die in Zusammenhang mit bestimmten Charakteristika stehen könnten. Ein gezielter Austausch von einzelnen Aminosäuren, bzw. der Transfer von Sequenzmotiven zwischen verschiedenen Aquaporinspezies sollte zur Überprüfung ihrer Relevanz hinsichtlich Aktivität, Selektivität und Sensitivität durchgeführt werden. Anhand der gewonnenen Daten sollte es möglich sein, Vorhersagen über bestimmte Eigenschaften von Aquaporinen zu treffen.

1.7.3 SIND AQUAPORINE BEI DER PULVINUSVERMITTELTEN BLATTBEWEGUNG VON *SAMANEA SAMAN* BETEILIGT?

Als weiteres geeignetes Modell für Studien zur physiologischen Bedeutung von pflanzlichen Aquaporinen sollte die nyktinastische Blattbewegung der Leguminose *Samanea saman* untersucht werden. Nastien basieren auf gewebespezifischen Veränderungen des Turgors und werden von relativ großen Wasserströmen begleitet. Die Blätter nehmen bei Sonnenaufgang eine geöffnete Tagstellung und bei Sonnenuntergang eine geschlossene Nachtstellung ein (Abbildung 1-11 A). Die lichtgesteuerte Bewegung wird dabei von Pulvini (Abbildung 1-11 B), das sind Motororgane die gleichsam als Gelenk fungieren, vermittelt und ist nach etwa 30 Minuten abgeschlossen. Über die gesamte Länge eines Pulvinus sind die Leitbündel zu einem vaskulärem Strang zusammengefaßt, um die Krümmungsbewegung zu erleichtern. Dieser ist von dünnwandigen Parenchymzellen umgeben, die wiederum entsprechend ihrer Funktion als Extensor, bzw. Flexor angesprochen werden. Laut Definition werden diejenigen Motorzellen als Extensor bezeichnet, die bei der geöffneten Tagstellung der Blätter axial getreckt sind. Im Fall von *Samanea saman* wird daher die untere (abaxiale, dem Sproß abgewandte) Hälfte des Pulvinus als Extensor und die (adaxiale) Oberseite als Flexor bezeichnet. Bereits 1837 vermutete R. H. J. Dutrochet (1776-1847, Mediziner und Privatgelehrter in der Touraine und in Paris), dass das Heben und Senken der Blätter durch einen Antagonismus der oberen und unteren Gelenkhälften hervorgerufen wird. Direkte Messungen durch den Physiologen E. W. von Brücke (1848) ergaben, dass der Turgor in den Blattgelenken zunimmt, wenn Blätter die Nachtstellung einnehmen, wobei die Zunahme auf die Gelenkoberseite beschränkt bleibt. Ergänzende Untersuchungen von J. v. Sachs (1859) und W. Pfeffer (1873) bestätigten, dass es sich hierbei um eine Turgorbewegung handelt. Eine Beteiligung von Aquaporinen erscheint damit möglich. Bei *Mimosa pudica*, deren Blattbewegung vergleichbaren Mechanismen folgt, konnte bereits gezeigt werden, dass hier vermutlich ein Aquaporin beteiligt ist. In ausgereiften Zellen des Motororgans existieren zwei Typen von Vakuolen, eine kleine tanninhaltige und eine große wassergefüllte. Beide Vakuolen zeigen, bedingt durch das Biegen des

Pulvinus, einen Wasserefflux beim plötzlichen Turgorverlust der Zellen. Allerdings ist die größere Vakuole ungleich stärker involviert. In der Membran dieser Vakuole konnte, neben einer H^+ -ATPase auch ein möglicher Wasserkanal mit hoher Homologie zum TIP identifiziert werden (Fleurat-Lessard *et al.*, 1997). Grundsätzlich vermutet man bei der Krümmungsbewegung der Pulvini ähnliche Prozesse, die auch am Öffnen und Schließen von Stomata beteiligt sind (Gorton, 1990). Das Anschwellen von Pulvinus Motorzellen wird durch die Aktivität einer Plasmamembran H^+ -ATPase initiiert. Der resultierende Protonengradient verschiebt das Membranpotential zu negativeren Werten (Hyperpolarisation), wodurch spannungsabhängige Kaliumkanäle geöffnet werden und ein Einstrom von Kaliumionen einsetzt. Dieser wird von einem Cl^- -Einstrom über H^+/Cl^- -Co-Transporter begleitet und vom Protonengradient getrieben. Es gilt als wahrscheinlich, dass diese Ionen in der Vakuole transient gespeichert werden. Durch den Anstieg des intrazellulären osmotischen Potentials strömt Wasser in die Motorzellen ein, die sich aufgrund der relativ hohen Elastizität ihrer Zellwände verformen und so zu einer Kontraktion des gesamten Zellverbandes führt. Das Anschwellen der Motorzellen stellt keine Umkehrung der Prozesse dar, die zuvor zum Anschwellen führten. Eine Membrandepolarisation, für die vermutlich eine Ca^{2+} -Aufnahme und/oder ein Cl^- -Efflux verantwortlich ist, öffnet auswärts gleichrichtende K^+ -Kanäle. Als Folge strömt Wasser aus den Zellen und sie verlieren an Volumen. Messungen des hydrostatischen Druckes an intakten Pulvini von *Samanea saman* zeigten, dass bei der geöffneten Tagstellung der Druck in Extensor und Flexor identisch ist. Bei der geschlossenen Nachtstellung ist der hydrostatische Druck im Flexor jedoch um 50% gegenüber dem im Extensor erhöht (Gorton, 1987).

Um eine Beteiligung von Aquaporinen an der Bewegung der Pulvini zu evaluieren, wurde eine cDNA-Bibliothek von *Samanea saman* auf MIP-homologe Sequenzen durchmustert (Karsten Grote, Doktorarbeit 1998). Ausgangsmaterial für diese Bibliothek waren ausschließlich sekundäre Pulvini, welche ein besonders großes Organ darstellen, da sie bei der Klappbewegung den gesamten Fiederstengel bewegen müssen. Es wurden zwei verschiedene cDNAs (SsAQP1 und SsAQP2) mit einem vollständigen codierenden Bereich (ORF „open reading frame“) identifiziert und diese hinsichtlich einer möglichen Funktion als Aquaporin im Oozytensystem überprüft.

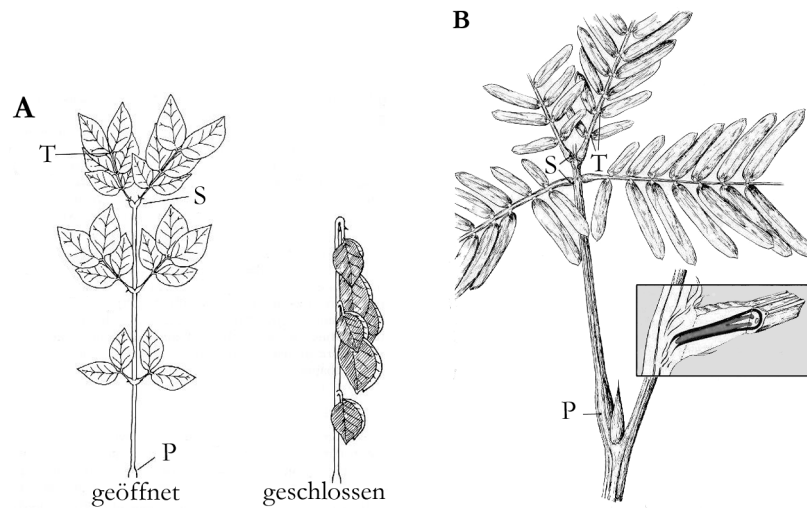


Abbildung 1-11: **A:** Schematische Darstellung der Tag- und Nachtstellung der Fiederblätter von *Samanea saman* (nach Satter *et al.*, 1974). **B:** Vergrößerte Darstellung eines Pulvinus von *Mimosa pudica*, der dem von *Samanea saman* sehr ähnlich ist. (P= primärer Pulvinus; S= sekundärer Pulvinus; T= tertiärer Pulvinus)