

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 HERSTELLEN EINER cDNA-BIBLIOTHEK VON NICOTIANA TABACUM

##### 3.1.1 cDNA-SYNTHESE

Zunächst wurde gesamt RNA aus Blättern von Tabakpflanzen isoliert. Nach Anreichern der mRNA mit Oligo(dT) beschichteten Magnetpartikeln wurden 3 µg der gewonnenen mRNA für die Synthese von cDNA eingesetzt. Die Zweitstrangsynthese wurde in Gegenwart von [<sup>32</sup>P]dCTP durchgeführt. 10 µl dieser Reaktion wurden im TAE-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und die Größenverteilung der cDNA durch Autoradiographie festgehalten. Abbildung 3-1 zeigt, dass die synthetisierten cDNA-Produkte dabei einen Größenbereich von 0,2 kb bis ca. 2,5 kb abdecken.

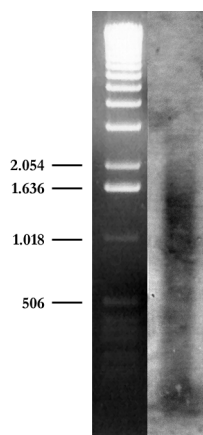


Abbildung 3-1: Autoradiographie (24 h Expositionszeit) der radioaktiv markierten cDNA-Produkte (rechts). Ein Größenvergleich ist durch den DNA-Größenstandard (1 Kb DNA-Leiter; Gibco) gegeben.

##### 3.1.2 BESTIMMUNG DES PHAGENTITERS

Zur Bestimmung des primären Phagentiters wurden von einem Teil der Phagensuspension 5 Verdünnungsstufen erstellt und für die Infektion des Wirtsstammes eingesetzt. Nach Inkubation über Nacht wurden die gebildeten Plaques einer jeden Verdünnungsstufe ausgezählt und die ermittelte Anzahl auf 1 µl der Phagensuspension umgerechnet. Der Phagentiter wird in der Einheit [pfu/µl], „plaque forming units“ angegeben. Der Tabelle 1 kann die jeweils ermittelte Anzahl an Plaques und der errechnete Phagentiter entnommen werden.

Verdünnungsstufe	Anzahl	pfu/µl
1) 1:5	263	26,3
2) 1:50	24	24
3) 1:500	0	0
4) 1:5.000	0	0
5) 1:500.000	0	0

Tabelle 1: Anzahl der gebildeten Plaques je Verdünnungsstufe und errechneter Phagentiter in [pfu/µl].

Bei einem Gesamtvolumen der Verpackungsreaktion von 500 µl entsprach dieses einer Gesamtzahl von ca. 13.000 primären Phagen. Nach der Formel von Clark & Carbon lässt sich die dadurch repräsentierte Anzahl an verschiedenen mRNA-Spezies in der cDNA-Bibliothek berechnen.

$$x = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-\frac{1}{n})} \quad \text{[Gleichung 15]}$$

x = Anzahl an Rekombinanten

p = Wahrscheinlichkeit

n = Anzahl an verschiedenen mRNA-Spezies

Bei einer Wahrscheinlichkeit von 99 % repräsentierte die hergestellte cDNA-Bibliothek eine Anzahl von ca. 2.800 verschiedenen mRNA-Spezies.

### 3.1.3 INSERTIONSHÄUFIGKEIT UND INSERTIONSGRÖSSE

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils an rekombinanten Phagen und der durchschnittlichen Insertionsgröße wurden 10 zufällig ausgesuchte Einzelplaques ausgestochen und nach Resuspendierung in Phagensuspensionspuffer für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Hierbei wurden die Primer T7 und Sp6 verwendet, welche die cDNA-Insertion flankieren. Bei nicht rekombinanten Phagen liegen die Bindungsstellen dieser Primer 150 bp auseinander. Das PCR-Produkt von rekombinanten Phagen ist um die Länge der entsprechenden Insertion vergrößert. Von jeder Reaktion wurde  $\frac{1}{10}$  Volumen im 1,5 % TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildung 3-2 zeigt das Ergebnis der 10 PCR-Reaktionen. Die Spuren 1, 3 und 4 zeigen jeweils ein Bande bei 150 bp und deuten somit auf nicht rekombinante Phagen hin. Die Spur 10 zeigt keine Bande. Die Spuren 2 und 5 bis 9 zeigen deutliche Banden mit unterschiedlichen Größen. Nach Abzug der 150 bp aus der Phagen-DNA ergibt sich ein Größenbereich von etwa 450 bp bis 1 kb für die cDNA-Insertionen. Zusammengefasst sind mindestens 6 von 10 Phagen rekombinant mit einer durchschnittlichen Insertionsgröße von ca. 800 bp.

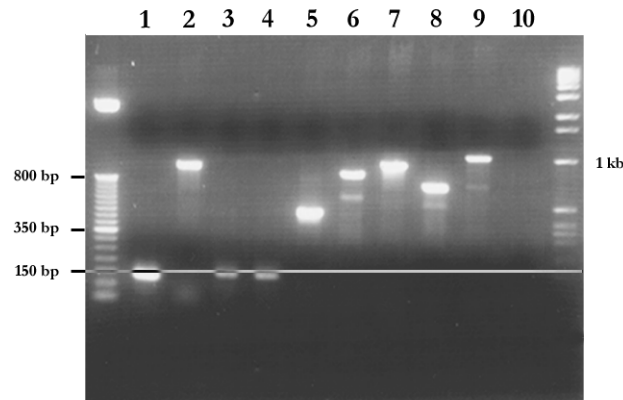


Abbildung 3-2: Gelelektrophoretische Auftrennung der 10 PCR-Reaktionen im 1,5 % Agarosegel. Als Größenstandard wurden die 50 bp und 1 kb DNA-Leiter (Gibco) verwendet. Der Schwellenwert von 150 bp ist durch eine horizontale Linie gekennzeichnet. Insgesamt waren 6 von 10 getesteten Phagen rekombinant.

#### 3.1.4 IDENTIFIZIERUNG VON AQUAPORINHOMOLOGEN SEQUENZEN

Nach der *in vitro* Verpackung standen insgesamt 500 µl Phagensuspension zur Verfügung. Die Phagen wurden durch Infektion des Wirtstammes über Nacht amplifiziert und dabei auf 10 Platten aufgeteilt. Die Phagenplaques wurden abgeschwemmt, so dass 10 Pools à 10 ml für die Durchmusterung nach aquaporinhomologen Sequenzen zur Verfügung standen. Die Durchmusterung erfolgte mittels PCR (s. 2.9.5), zunächst unter Verwendung von zwei heterologen Konsensus-Primer (K1 und K2). Die Primer wurden ursprünglich von der Nukleotidsequenz der PIP1b-cDNA (*Arabidopsis thaliana*) aus den Bereichen der beiden hochkonservierten NPA-Motive abgeleitet. Die PCR-Reaktion wurde bei einer reduzierten Annealing-Temperatur von 45°C durchgeführt da die Primer nicht direkt von einer Sequenz aus Tabak abgeleitet werden konnten. Nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel konnten allerdings keine Banden detektiert werden. Daraufhin wurden die 10 Pools erneut für eine Reihe von PCR-Reaktionen unter identischen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Dabei wurde jeder der 10 Pools mit den Primerkombinationen K1/Sp6 und T7/K2 untersucht. Die Abbildung 3-3 verdeutlicht die Strategie der Vorgehensweise.

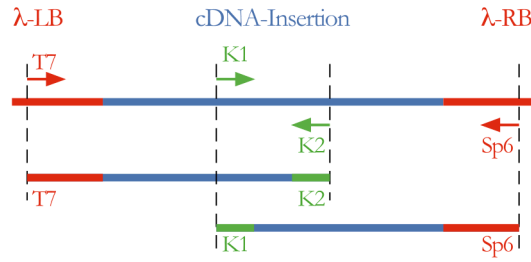


Abbildung 3-3: Dargestellt ist die rekombinate Phagen-DNA im Bereich der Polylinker-Region. Vermerkt sind die Positionen der heterologen Konsensus-Primer K1 und K2 (grün) auf der cDNA-Insertion (blau). Angrenzende Bereiche der Phagen-DNA, sowie die Position und Orientierung der Promotorprimer T7 und Sp6 sind rot dargestellt. Die gestrichelten Linien grenzen die zu erwartenden PCR-Produkte ein.

Zur Kontrolle der Reaktionsbedingungen wurde eine PCR-Reaktion mit Phagen-DNA aus Pool 1 und der Primerkombination T7/Sp6 durchgeführt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und das Bandenmuster dokumentiert. Wie aus Abbildung 3-4 ersichtlich zeigte die Spur 1/1 (Sp6/K1) eine eindeutige Bande bei ca. 700 bp. In Spur 5/1 konnte eine schwächere Bande derselben Größe ausgemacht werden. In den anderen Spuren konnten keine Banden detektiert werden. Die Kontrollreaktion mit der Primerkombination T7/Sp6 (Spur K) war positiv.

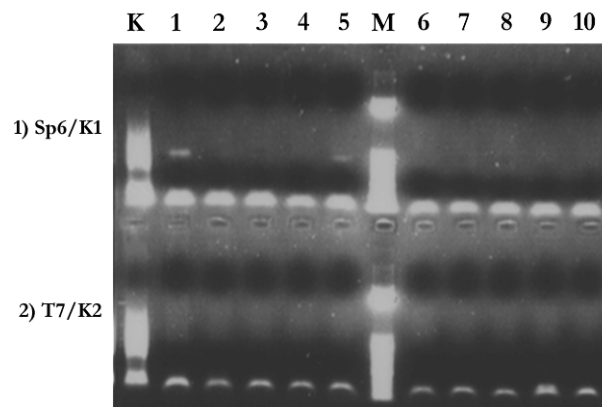


Abbildung 3-4: Gelelektrophoretische Auftrennung der 20 PCR-Reaktionen im 1 % Agarosegel. Als Größenstandard wurde die 50 bp DNA-Leiter parallel aufgetrennt (Spur M). Die Kontrollreaktion (Spur K) mit der Primerkombination T7/Sp6 zeigte den zu erwartenden „Schmier“. Mit Phagen-DNA aus Pool 1 und Pool 5 konnte unter Verwendung der Primerkombination Sp6/K1 ein PCR-Produkt nachgewiesen werden.

Bei den folgenden Untersuchungen wurde nur noch das 700 bp PCR-Produkt aus Pool 1 berücksichtigt, da die Bande in Spur 5/1 deutlich schwächer und von identischer Größe war. Das PCR-Produkt aus Spur 1/1 wurde als Matrize für eine erneute PCR-Reaktion mit den Konsensusprimern K1 und K2 eingesetzt. Bis auf eine Erhöhung der Annealing-Temperatur auf

50 °C wurden die Reaktionsbedingungen nicht verändert. Die Abbildung 3-5 zeigt in Spur 2 ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 400 bp nach Auftrennung im 1% Agarosegel. Zum Vergleich wurde das ursprüngliche 700 bp PCR-Produkt parallel mit aufgetrennt. Das 400 bp Fragment wurde zur weiteren Charakterisierung in den Vektor pCR 2.1 kloniert (s. 2.7.2). Eine Homologiestudie mittels BLAST-Algorithmus (NCBI) ergab eine hohe Ähnlichkeit des klonierten cDNA-Fragmentes zu zahlreichen pflanzlichen Wasserkanälen. Die höchste Übereinstimmung mit 98 % Nukleotidentität bestand dabei zu einer mRNA aus *Nicotiana excelsior* (#AB002148).

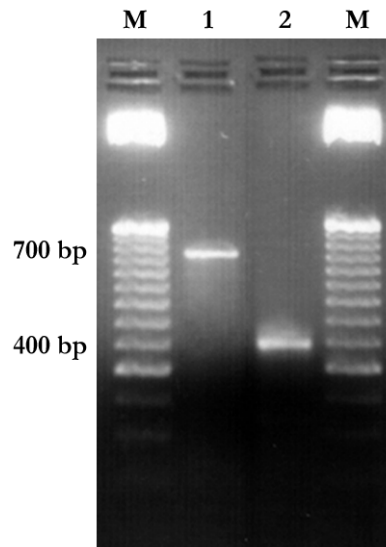


Abbildung 3-5: Gelelektrophoretische Auftrennung des 700 bp Fragmentes (Spur 1) aus der PCR-Reaktion mit der Primerkombination Sp6/K1. Spur 2 zeigt das 400 bp Fragment, das aus der Reamplifizierung des 700 bp Fragmentes mit der Primerkombination K1/K2 hervorgegangen war. Als Größenstandard (Spur M) wurde die 50 bp DNA-Leiter (Gibco) verwendet.

### 3.2 KLONIERUNG DER VOLLLÄNGEN-CDNA

Zur Klonierung der zugehörigen Vollängen-cDNA des zuvor identifizierten DNA-Fragmentes, wurde die PCR-basierte „RACE“-Methode angewendet. Ausgehend von einer cDNA-Population mit beidseitig angefügten Adaptoren ermöglichte diese Methode die Klonierung der fehlenden 5'- und 3'-Bereiche des bereits charakterisierten 400 bp DNA-Fragmentes. Dazu wurden anhand der Nukleotidsequenz zwei neue genspezifische, sogenannte „nested“ Primer konstruiert. Ihre Position ist, im Vergleich zu den heterologen Konsensus-Primern K1 und K2, jeweils in Syntheserichtung (3'-Richtung) verschoben. Die genspezifischen Primer GSP1 und GSP2 hatten folgende Sequenzen:

GSP1 („antisense“-Primer 5'-RACE):  
5'-CTTCACAACACCAGCACCACAAA-3'

GSP2 („sense-Primer“ 3'-RACE):

5'-CGTTTGGATTGTTCTTGGCAAGG-3'

Die beiden PCR-Reaktionen wurden wie unter 2.10.2 angegeben durchgeführt und die resultierenden PCR-Produkte im 1% Agarosegel aufgetrennt (s. Abbildung 3-6). Das Ergebnis des 5'-RACE ist ein 550 bp cDNA-Fragment (Spur 1), im 3'-RACE wurde ein 800 bp cDNA-Fragment amplifiziert (Spur 2). Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR2.1 kloniert und anschließend charakterisiert. Die Klone wurden mit Ntapo5-550 und Ntapo3-800 bezeichnet. Die Arbeitsnamen setzen sich zusammen aus: „*Nicotiana tabacum aquaporin*“, der Richtung des RACE und der Größe des amplifizierten PCR-Produktes.

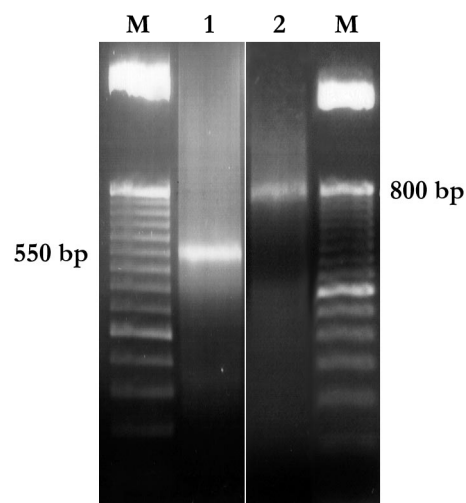


Abbildung 3-6: Gelelektrophoretische Auftrennung der 5'- und 3'-RACE Produkte im 1% Agarosegel. Als Größenstandard wurde die 50 bp DNA-Leiter verwendet. Spur 1 zeigt eine Bande bei 550 bp, Spur 2 eine solche bei 800 bp.

Anhand der gewonnen Sequenzdaten von Ntapo5-550 und Ntapo3-800 wurden zwei neue genspezifische Primer konstruiert, die im äußersten 5'- bzw. 3'-Bereich der gesuchten Vollängen-cDNA positioniert sind. Die Primer wurden mit VP1 bzw. VP2 („Vollängen-Primer“) bezeichnet und hatten folgende Sequenzen:

VP1 („sense“-Primer):

5'-GAATTCGCGCCCGGGCAGGTGTACTATCCC-3'

*Eco* RIVP2 („antisense“-Primer):

5'-TTTTTCTAGAAAGGATAAAATAAAGAACCTTCATTAATAG-3'

*xba* I

Für die spätere gerichtete Klonierung der Vollängen-cDNA in den Expressionsvektor pGemHE wurde in den 5'-Bereich der Primer jeweils eine Restriktionsschnittstelle integriert (s.o.). Die LD-PCR-Reaktion zur Vermehrung der vollständigen cDNA wurde unter Verwendung der genspezifischen Primer VP1 und VP2 wie in Kapitel 2.10.2 angegeben durchgeführt und 5 µl der Reaktion im 1% Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildung 3-7 zeigt das amplifizierte PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 1,2 kb. Das PCR-Produkt wurde zur weiteren Charakterisierung in den Vektor pCR2.1 kloniert.

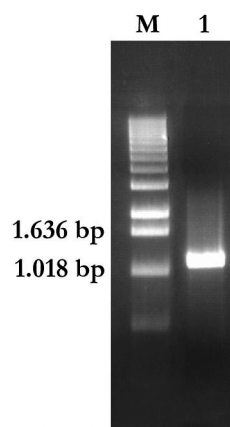


Abbildung 3-7: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktion im 1% Agarosegel (Spur 1). Als Größenstandard (Spur M) wurde die 1 kb DNA-Leiter verwendet. Das amplifizierte PCR-Produkt wies eine Größe von ca. 1,2 kb auf.

Unter Verwendung der Primer T7 und M13 Reverse wurde der cDNA-Klon vollständig mehrfach sequenziert und anschließend mittels Software näher analysiert. Dazu wurden zunächst die ermittelten Sequenzabschnitte mit der Software DNasis zusammengefügt. Zur Erstellung einer Restriktionskarte für die am häufigsten benutzten Restriktionsenzyme wurde die Software Vector NTI 4.0 verwendet. Die Abbildung 3-8 zeigt die Organisationsstruktur des 1,2 kb cDNA-Klons, der als Arbeitsnamen die Bezeichnung **NtAQP1** erhielt (*Nicotiana tabacum*; **A**quaporin 1). Weiterhin wurde das offene Leseraster (ORF; „open reading frame“) für die kodierende Region bestimmt und die Proteinsequenz abgeleitet (Abbildung 3-9).

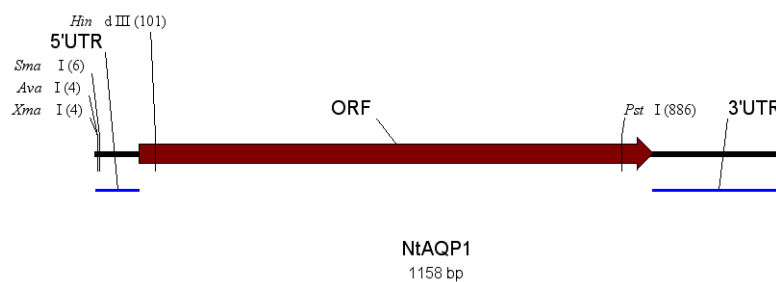


Abbildung 3-8: Organisationsstruktur der NtAQP1-cDNA. Vermerkt ist die 5'-UTR mit einer Länge von 72 bp, der kodierende Bereich (ORF; Position 73 - 933) und die 3'-UTR mit einer Länge von 225 bp. Die Gesamtlänge beträgt 1158 bp. Weiterhin sind die Positionen ausgewählter Restriktionsenzyme eingezeichnet.

NtAQP1:

	6	12	18	24	30	36	42								
1	<i>CGC</i>	<i>CCG</i>	<i>GGC</i>	<i>AGG</i>	<i>TGT</i>	<i>ACT</i>	<i>ATC</i>	<i>CAC</i>	<i>TTA</i>	<i>GCA</i>	<i>CAA</i>	<i>TAA</i>	<i>AGA</i>	<i>GAG</i>	
43	<i>AAA</i>	<i>AAC</i>	<i>AAG</i>	<i>GTA</i>	<i>AGT</i>	<i>TTA</i>	<i>GTG</i>	<i>AGT</i>	<i>GTT</i>	<i>CAA</i>	<b>ATG</b>	<i>GCA</i>	<i>GAA</i>	<i>AAC</i>	
											<i>M</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>N</i>	4
85	<i>AAA</i>	<i>GAA</i>	<i>GAA</i>	<i>GAT</i>	<i>GTT</i>	<i>AAG</i>	<i>CTT</i>	<i>GGA</i>	<i>GCT</i>	<i>AAC</i>	<i>AAA</i>	<i>TTC</i>	<i>AGA</i>	<i>GAA</i>	
	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>V</i>	<i>K</i>	<i>L</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	<i>N</i>	<i>K</i>	<i>F</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	18
127	<i>ACA</i>	<i>CAG</i>	<i>CCA</i>	<i>TTA</i>	<i>GGA</i>	<i>ACA</i>	<i>GCT</i>	<i>GCT</i>	<i>CAA</i>	<i>ACA</i>	<i>GAC</i>	<i>AAA</i>	<i>GAT</i>	<i>TAC</i>	
	<i>T</i>	<i>Q</i>	<i>P</i>	<i>L</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>Q</i>	<i>T</i>	<i>D</i>	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>Y</i>	32
169	<i>AAA</i>	<i>GAA</i>	<i>CCA</i>	<i>CCA</i>	<i>CCA</i>	<i>GCT</i>	<i>CCT</i>	<i>TTG</i>	<i>TTT</i>	<i>GAA</i>	<i>CCA</i>	<i>GGG</i>	<i>GAA</i>	<i>TTA</i>	
	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>L</i>	<i>F</i>	<i>E</i>	<i>P</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>L</i>	46
211	<i>TCA</i>	<i>TCA</i>	<i>TGG</i>	<i>TCA</i>	<i>TTT</i>	<i>TAC</i>	<i>AGA</i>	<i>GCT</i>	<i>GGA</i>	<i>ATT</i>	<i>GCA</i>	<i>GAA</i>	<i>TTT</i>	<i>ATG</i>	
	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>W</i>	<i>S</i>	<i>F</i>	<i>Y</i>	<i>R</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	60
253	<i>GCT</i>	<i>ACT</i>	<i>TTC</i>	<i>TTG</i>	<i>TTT</i>	<i>TTG</i>	<i>TAC</i>	<i>ATC</i>	<i>ACT</i>	<i>ATC</i>	<i>TTG</i>	<i>ACT</i>	<i>GTT</i>	<i>ATG</i>	
	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>F</i>	<i>L</i>	<i>F</i>	<i>L</i>	<i>Y</i>	<i>I</i>	<i>T</i>	<i>I</i>	<i>L</i>	<i>T</i>	<i>V</i>	<i>M</i>	74
295	<i>GGT</i>	<i>CTT</i>	<i>AAG</i>	<i>AGA</i>	<i>TCT</i>	<i>GAT</i>	<i>AGT</i>	<i>CTG</i>	<i>TGT</i>	<i>AGT</i>	<i>TCA</i>	<i>GTT</i>	<i>GGT</i>	<i>ATT</i>	
	<i>G</i>	<i>L</i>	<i>K</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>L</i>	<i>C</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>V</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	88
337	<i>CAA</i>	<i>GGT</i>	<i>GTT</i>	<i>GCT</i>	<i>TGG</i>	<i>GCT</i>	<i>TTT</i>	<i>GGT</i>	<i>GGT</i>	<i>ATG</i>	<i>ATC</i>	<i>TTT</i>	<i>GCT</i>	<i>TTG</i>	
	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>V</i>	<i>A</i>	<i>W</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>M</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>A</i>	<i>L</i>	102
379	<i>GTT</i>	<i>TAC</i>	<i>TGT</i>	<i>ACT</i>	<i>GCT</i>	<i>GGT</i>	<i>ATC</i>	<i>TCA</i>	<i>GGA</i>	<i>GGA</i>	<i>CAC</i>	<i>ATC</i>	<i>AAC</i>	<i>CCA</i>	
	<i>V</i>	<i>Y</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>S</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<b>N</b>	<b>P</b>	116
421	<i>GCT</i>	<i>GTG</i>	<i>ACC</i>	<i>TTT</i>	<i>GGA</i>	<i>TTG</i>	<i>TTC</i>	<i>TTG</i>	<i>GCA</i>	<i>AGG</i>	<i>AAA</i>	<i>CTG</i>	<i>TCC</i>	<i>TTA</i>	
	<b>A</b>	<i>V</i>	<i>T</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>L</i>	<i>F</i>	<i>L</i>	<i>A</i>	<i>R</i>	<i>K</i>	<i>L</i>	<i>S</i>	<i>L</i>	130
463	<i>ACC</i>	<i>AGG</i>	<i>GCT</i>	<i>ATT</i>	<i>TTC</i>	<i>TAC</i>	<i>ATA</i>	<i>GTG</i>	<i>ATG</i>	<i>CAA</i>	<i>TGC</i>	<i>CTT</i>	<i>GGT</i>	<i>GCA</i>	
	<i>T</i>	<i>R</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>Y</i>	<i>I</i>	<i>V</i>	<i>M</i>	<i>Q</i>	<i>C</i>	<i>L</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	144
505	<i>ATT</i>	<i>TGT</i>	<i>GGT</i>	<i>GCT</i>	<i>GGT</i>	<i>GTT</i>	<i>GTG</i>	<i>AAG</i>	<i>GGA</i>	<i>TTC</i>	<i>ATG</i>	<i>GTT</i>	<i>GGT</i>	<i>CCA</i>	
	<i>I</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>V</i>	<i>V</i>	<i>K</i>	<i>G</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>V</i>	<i>G</i>	<i>P</i>	158
547	<i>TAC</i>	<i>CAG</i>	<i>AGA</i>	<i>CTT</i>	<i>GGT</i>	<i>GGT</i>	<i>GGT</i>	<i>GCT</i>	<i>AAT</i>	<i>GTT</i>	<i>GTT</i>	<i>AAC</i>	<i>CAT</i>	<i>GGT</i>	
	<i>Y</i>	<i>Q</i>	<i>R</i>	<i>L</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	<i>N</i>	<i>V</i>	<i>V</i>	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>G</i>	172
589	<i>TAC</i>	<i>ACC</i>	<i>AAA</i>	<i>GGT</i>	<i>GAT</i>	<i>GGC</i>	<i>CTT</i>	<i>GGT</i>	<i>GCT</i>	<i>GAA</i>	<i>ATT</i>	<i>ATT</i>	<i>GGC</i>	<i>ACT</i>	
	<i>Y</i>	<i>T</i>	<i>K</i>	<i>G</i>	<i>D</i>	<i>G</i>	<i>L</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	186
631	<i>TTT</i>	<i>GTC</i>	<i>CTT</i>	<i>GTT</i>	<i>TAC</i>	<i>ACT</i>	<i>GTT</i>	<i>TTC</i>	<i>TCT</i>	<i>GCT</i>	<i>ACT</i>	<i>GAT</i>	<i>GCT</i>	<i>AAG</i>	
	<i>F</i>	<i>V</i>	<i>L</i>	<i>V</i>	<i>Y</i>	<i>T</i>	<i>V</i>	<i>F</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>D</i>	<i>A</i>	<i>K</i>	200
673	<i>AGA</i>	<i>AAT</i>	<i>GCC</i>	<i>AGA</i>	<i>GAC</i>	<i>TCA</i>	<i>TAT</i>	<i>GTT</i>	<i>CCT</i>	<i>ATT</i>	<i>TTG</i>	<i>GCA</i>	<i>CCA</i>	<i>CTT</i>	
	<i>R</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>R</i>	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>Y</i>	<i>V</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>L</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>L</i>	214
715	<i>CCC</i>	<i>ATC</i>	<i>GGA</i>	<i>TTC</i>	<i>GCG</i>	<i>GTT</i>	<i>TTC</i>	<i>TTG</i>	<i>GTT</i>	<i>CAT</i>	<i>TTG</i>	<i>GCC</i>	<i>ACC</i>	<i>ATT</i>	
	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>F</i>	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>F</i>	<i>L</i>	<i>V</i>	<i>H</i>	<i>L</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>I</i>	228
757	<i>CCC</i>	<i>ATC</i>	<i>ACC</i>	<i>GGA</i>	<i>ACT</i>	<i>GGC</i>	<i>ATC</i>	<i>AAC</i>	<i>CCC</i>	<i>GCT</i>	<i>AGG</i>	<i>AGT</i>	<i>CTT</i>	<i>GGA</i>	
	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>L</i>	<i>G</i>	242
799	<i>GCT</i>	<i>GCG</i>	<i>ATC</i>	<i>ATC</i>	<i>TAC</i>	<i>AAC</i>	<i>ACA</i>	<i>GAC</i>	<i>CAG</i>	<i>GCA</i>	<i>TGG</i>	<i>GAC</i>	<i>GAC</i>	<i>CAC</i>	
	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>Y</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>D</i>	<i>Q</i>	<i>A</i>	<i>W</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>H</i>	256
841	<i>TGG</i>	<i>ATC</i>	<i>TTT</i>	<i>TGG</i>	<i>GTT</i>	<i>GGA</i>	<i>CCA</i>	<i>TTC</i>	<i>ATT</i>	<i>GGA</i>	<i>GCT</i>	<i>GCA</i>	<i>CTT</i>	<i>GCT</i>	
	<i>W</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>W</i>	<i>V</i>	<i>G</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>L</i>	<i>A</i>	270
883	<i>GCA</i>	<i>GTT</i>	<i>TAC</i>	<i>CAT</i>	<i>CAA</i>	<i>ATA</i>	<i>ATC</i>	<i>ATC</i>	<i>AGA</i>	<i>GCC</i>	<i>ATT</i>	<i>CCA</i>	<i>TTC</i>	<i>CAC</i>	
	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>Y</i>	<i>H</i>	<i>Q</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>R</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>H</i>	284
925	<i>AAG</i>	<i>TCG</i>	<i>TCT</i>	<b>TAA</b>	<i>GTT</i>	<i>TCC</i>	<i>TCA</i>	<i>AGA</i>	<i>AGC</i>	<i>CTT</i>	<i>AAT</i>	<i>CTT</i>	<i>TCT</i>	<i>GAA</i>	
	<i>K</i>	<i>S</i>	<i>S</i>												287
967	<i>TTT</i>	<i>TCA</i>	<i>AGA</i>	<i>CTC</i>	<i>TGT</i>	<i>ACC</i>	<i>TTT</i>	<i>TTT</i>	<i>GGG</i>	<i>GGG</i>	<i>TTA</i>	<i>AAT</i>	<i>TTT</i>	<i>AAT</i>	
1009	<i>CCT</i>	<i>ATC</i>	<i>CTT</i>	<i>CTG</i>	<i>ATG</i>	<i>TAT</i>	<i>TTG</i>	<i>TAA</i>	<i>TGT</i>	<i>GGA</i>	<i>TTT</i>	<i>TCT</i>	<i>TGT</i>	<i>GTT</i>	
1051	<i>CAA</i>	<i>ATG</i>	<i>TCT</i>	<i>ATT</i>	<i>ATG</i>	<i>TGT</i>	<i>GTA</i>	<i>AAT</i>	<i>TAT</i>	<i>CAG</i>	<i>GTT</i>	<i>TTG</i>	<i>TTG</i>	<i>TAC</i>	
1093	<i>TGT</i>	<i>ACC</i>	<i>CTA</i>	<i>TTA</i>	<i>ATG</i>	<i>AAG</i>	<i>GTT</i>	<i>CTT</i>	<i>TAT</i>	<i>TTT</i>	<i>ATC</i>	<i>CTT</i>	<i>AAA</i>	<i>GAA</i>	
1135	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	<i>AAA</i>	1158

Abbildung 3-9: Nukleotidsequenz (schwarz) von NtAQP1. Der Translationsstartpunkt bei Position 73 (ATG) und das Stopcodon (TAA) sind hervorgehoben. Die abgeleitete Proteinsequenz ist blau im Ein-Buchstabencode dargestellt. Die zwei hochkonservierten Familienmotive der MIP-Familie (NPA) sind grau hinterlegt. Die untranslatierten Regionen (5'- und 3'-UTR) sind kursiv dargestellt



Anhand der Proteinsequenz konnte eine computergestützte Vorhersage über die mögliche Membrantopologie von NtAQP1 getroffen werden. Dabei wurde durch die Software TMPred (<http://ulrec3.unil.ch>) ein Hydrophobizitätsprofil (s. Abbildung 3-10) nach dem Algorithmus von Kyte & Doolittle erstellt. Das hypothetische Modell schlägt 6 transmembrane Helices vor, die aufgrund ihrer starken Hydrophobizität in die Membran inserieren können. Der Amino- und Carboxylterminus sind zytoplasmatisch lokalisiert. Auffällig ist der mit 55 Aminosäuren relativ lange aminotermine Abschnitt des Proteins.

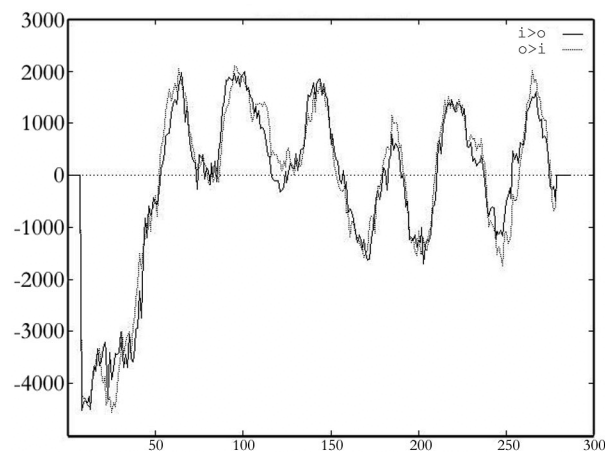


Abbildung 3-10: Hydrophobizitätsprofil von NtAQP1. Bereiche oberhalb der gestrichelten horizontalen Linie (Schwellenwert) deuten auf stark hydrophobe Proteinabschnitte hin, die möglicherweise in die Membran inseriert sind. Auf dem X-Achsenabschnitt sind die Aminosäuren kontinuierlich nummeriert. Sowohl Amino-, als auch Carboxylterminus sind zytoplasmatisch lokalisiert.

Ein Sequenzvergleich auf Proteinebene (Abbildung 3-11) von NtAQP1 mit repräsentativen Vertretern aus den drei pflanzlichen Aquaporinfamilien (PIP1, PIP2 und TIP) ermöglichte eine Zuordnung von NtAQP1. Wie in Tabelle 2 ersichtlich, bestand dabei die höchste Ähnlichkeit zu Vertretern der PIP1-Unterfamilie (PIP1b und SsAQP1), gefolgt von der PIP2-Unterfamilie (PIP2b und SsAQP2). Zu TIP aus *Phaseolus vulgaris* bestand nur noch 43,1% Ähnlichkeit. Somit ist NtAQP1 als Vertreter der PIP1-Unterfamilie anzusprechen.



	PIP1b	NtAQP1	SsAQP1	PIP2b	SsAQP2	TIP
PIP1b	----	91,6%	88,3%	70,5%	74,3%	40,3%
NtAQP1	85,0%	----	86,9%	69,3%	72,7%	41,1%
SsAQP1	83,1%	80,8%	----	68,1%	72,4%	39,7%
PIP2b	63,6%	62,4%	60,5%	----	87,5%	43,1%
SsAQP2	66,0%	64,8%	63,2%	83,3%	----	42,1%
TIP	27,5%	27,8%	28,1%	29,9%	27,2%	----

Tabelle 2: Sequenzvergleich auf Proteinebene. Zeilenweise ist die Aminosäure-ähnlichkeit der aufgeführten Aquaporine zueinander vermerkt. Das Maß der Identität (*kursiv*) ist spaltenweise abzulesen.

Ein Datenblatt mit der Nukleotid- und Proteinsequenz von NtAQP1 ist unter der Identifikationsnummer AF024511 bei der Gendatenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) veröffentlicht.

### 3.3 UNTERSUCHUNG ZUR GEWEBESPEZIFISCHEN EXPRESSION VON NTAQP1

Für Studien der gewebespezifischen Expression des putativen Aquaporings NtAQP1 wurde Gesamt-RNA aus Einzelblüten (ohne Blütenstiele), Stengeln, Blättern (ohne Leitbündel) und Wurzeln adulter Tabakpflanzen isoliert. Je 10 µg der gewonnen RNA wurde in einem 1% MEN-Agarosegel aufgetrennt (s. Abbildung 3-12A) und mittels Kapillarblot über Nacht auf eine Nylonmembran übertragen. Für einen späteren Abgleich der RNA-Mengen wurde die Membran zunächst mit einer 18S-rRNA Sonde aus *Arabidopsis thaliana* hybridisiert. Nach Exposition eines Röntgenfilmes konnten die jeweils eingesetzten RNA-Mengen der verschiedenen Spuren anhand des Schwärzungsgrades angeglichen werden. Gleiche Mengen an Gesamt-RNA aus den verschiedenen Geweben wurden wie oben beschrieben erneut aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen. Als Hybridisierungssonde wurde das 550 bp lange 5'-RACE cDNA-Fragment Ntapo5-550 verwendet. Dazu wurde der Vektor pCR2.1, der das cDNA-Fragment enthielt, mit der Restriktionsendonuklease *Eco* RI verdaut, der Ansatz im TAE-Agarosegel aufgetrennt und die Insertion aus dem Gel eluiert. Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem „ready-to-go“-DNA-Labeling System (s. 2.4.1). Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht. Ein Röntgenfilm wurde für 24h exponiert .

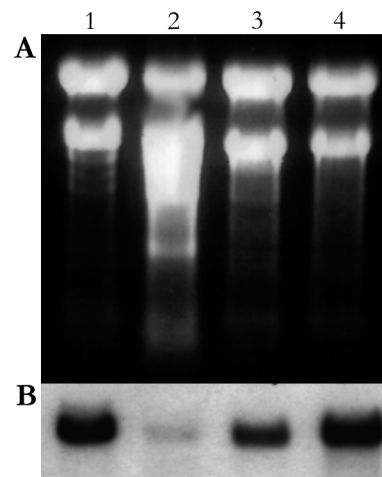


Abbildung 3-12: (A): Gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 10  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Gewebetypen von *Nicotiana tabacum*. im 1 % MEN-Agarosegel. Spur 1: Blüte; Spur 2: Blatt; Spur 3: Stengel; Spur 4: Wurzel. (B): Zugehörige Autoradiographie der Hybridisierung mit der Ntapo5-550-Sonde.

Die Expression der NtAQP1-mRNA ist in der Blüte und der Wurzel am stärksten. Ein schwächeres Signal wurde im Stengel ausgemacht. Im Blatt ist die Expression am geringsten. Aufgrund des starken Signals in der Blüte wurden hierzu weitere Northern-Experimente durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Sepalen (Kelchblättern), Petalen (Kronblätter), Stamina (Staubblätter) und Carpellen (Fruchtblätter) isoliert. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben.

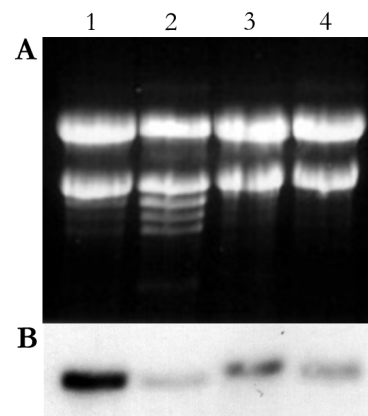


Abbildung 3-13: (A): Gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 10  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Blütengeweben von *Nicotiana tabacum*. im 1 % MEN-Agarosegel. Spur 1: Kronenblätter; Spur 2: Kelchblätter; Spur 3: Staubblätter; Spur 4: Fruchtblätter. (B): Zugehörige Autoradiographie der Hybridisierung mit der Ntapo5-550-Sonde.

Wie in Abbildung 3-13 (B) ersichtlich wird die NtAQP1-mRNA in Kronblättern am stärksten exprimiert. Signifikant niedriger ist das Expressionsniveau dagegen in Staubblättern und am niedrigsten in Kelch- und Fruchtblättern.

### 3.4 FUNKTIONSANALYSE VON NTAQP1 IM OozyTENSYSTEM

Durch Expression des Aquaporin-homologen NtAQP1 in Oozyten von *Xenopus laevis* und anschließende Schwellungsexperimente sollte überprüft werden, ob die NtAQP1-mRNA für ein funktionelles Aquaporinprotein codiert.

#### 3.4.1 KLONIERUNG DER NTAQP1-CDNA IN DEN VEKTOR pGEMHE

Zur effizienten Expression der heterologen NtAQP1-cRNA in Oozyten wurde cDNA von NtAQP1, die im Vektor pCR2.1 vorlag, mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Xba* I hydrolisiert. Der Expressionsvektor pGemHE wurde identisch behandelt. Nach Auftrennung im TAE-Agarosegel wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel eluiert und die gewonnene DNA für eine Ligationsreaktion eingesetzt. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Restriktionsabbau und Sequenzierung überprüft. Zur Synthese von NtAQP1-cRNA wurde die rekombinante Plasmid-DNA zunächst mit Restriktionsendonuklease *Nhe* I linearisiert und anschließend die cRNA ausgehend vom T7-Promotor transkribiert.

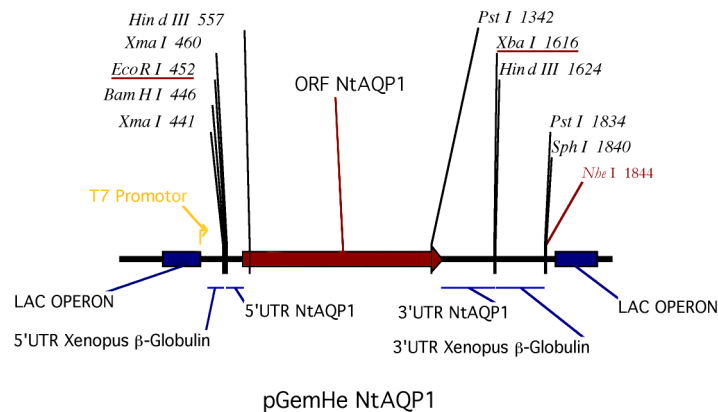


Abbildung 3-14: Ausschnitt aus der Polylinker-Region von pGemHE mit der eingefügten NtAQP1-cDNA-Insertion. Das offene Leseraster ist als roter Pfeil dargestellt. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind rot markiert, der Startpunkt der *in vitro* Transkription (T7-Promotor) ist in gelber Schrift eingezeichnet.

### 3.4.2 WASSERPERMEABILITÄT VON NTAQP1

Nach Injektion von NtAQP1-cRNA in Oozyten und einer dreitägigen Inkubation bei 16°C in ND96-Medium wurden einzelne Oozyten in  $\frac{1}{3}$  ND96-Medium (70 mosmol) überführt. Die resultierende Volumenzunahme wurde in einen Zeitraum von 6 min über ein Digitalkamerasystem an einem Computer verfolgt und anschließend ausgewertet. Zum Vergleich wurden Oozyten mit der cRNA von PIP2b aus *Arabidopsis thaliana* transformiert. Dieses Aquaporin wurde bereits von Kammerloher *et al.* (1994) funktionell charakterisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Abgrenzung der natürlichen von der aquaporinvermittelten Wasserpermeabilität dienten Oozyten, in die nur Wasser injiziert wurde.

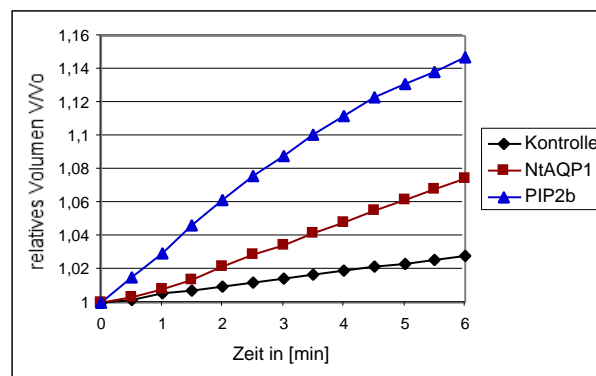


Abbildung 3-15: Entwicklung des relativen Volumens von Oozyten über einen Zeitraum von 6 min im hypotonischen Medium. Die Oozyten wurden entweder mit Wasser (Kontrolle) oder cRNA von NtAQP1 bzw. PIP2b transformiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte.

Das Volumen von mit Wasser injizierten Oozyten stieg während der sechsminütigen Inkubation im hypotonischen Medium im Mittel um den Faktor 1,028 ( $n=28$ ) an. Oozyten, die mit NtAQP1-cRNA transformiert wurden nahmen um den Faktor 1,074 ( $n=11$ ) an Volumen zu. Für Oozyten, die mit PIP2b-cRNA transformiert wurden lag der Faktor bei 1,147 ( $n=13$ ).

Die Berechnung der osmotischen Wasserpermeabilitätskoeffizienten ( $P_f$ ) erfolgte anhand der in Abbildung 3-15 dargestellten Mittelwertkurven. Das zeitliche Intervall ( $dt$ ; siehe Gleichung 7) muss dabei in einem Bereich definiert werden, indem die Steigung linear verläuft. Zur Festlegung eines geeigneten Zeitfensters wurden die  $P_f$ -Werte für NtAQP1 und PIP2b zu definierten Zeitpunkten mit einem Intervall von 30 s berechnet. Dabei ergaben sich die in Abbildung 3-16 dargestellten Werte.

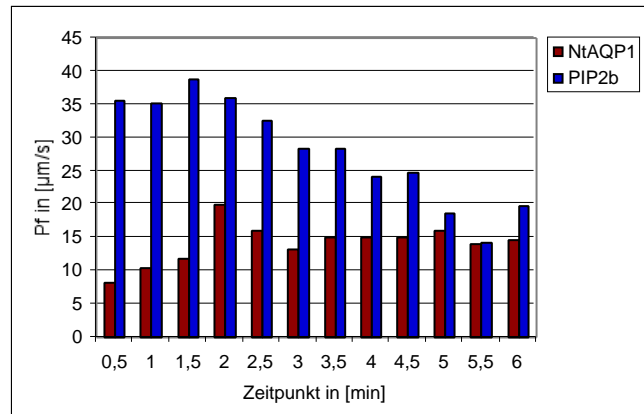


Abbildung 3-16: Wasserpermeabilitätskoeffizienten in  $[\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}]$  für NtAQP1 und PIP2b zu definierten Zeitpunkten in einem Zeitraum von 6 Minuten. Das Intervall betrug jeweils 30 s.

Wie in Abbildung 3-16 ersichtlich stiegen die  $P_f$ -Werte für NtAQP1 zunächst kontinuierlich an und erreichten dann sprunghaft bei 2 Minuten ein Maximum von ca.  $20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Danach fielen die Werte deutlich ab und pendeln sich nach 3,5 Minuten bei einem  $P_f$ -Wert von ca.  $15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ein. Die  $P_f$ -Werte für PIP2b wiesen dagegen innerhalb der ersten 2 Minuten vergleichsweise geringe Schwankungen auf und nahmen dann kontinuierlich bis zu einem Wert von ca.  $20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ab. Da kein einheitliches Zeitfenster definiert werden konnte, erfolgte die Berechnung der  $P_f$ -Werte über die gesamten 6 Minuten. Dadurch ergab sich, wie in Abbildung 3-17 dargestellt, für NtAQP1 ein  $P_f$ -Wert von  $14,5 \pm 0,9 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=11$ ), für PIP2b  $30,6 \pm 4,9 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=13$ ) und für Kontrolloozyten  $6,4 \pm 2,4 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=28$ ).

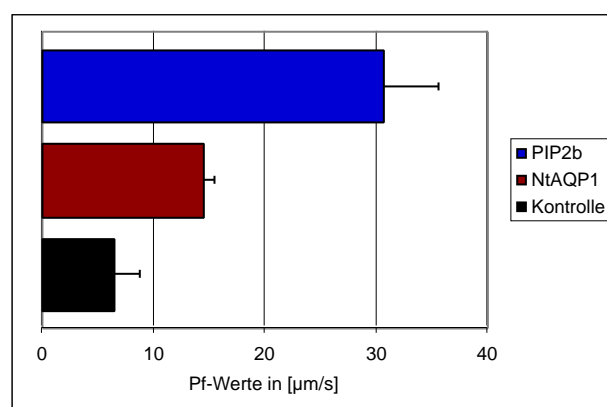


Abbildung 3-17: Berechnete Wasserpermeabilitätskoeffizienten in  $[\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}]$  als Maß für die Geschwindigkeit des Wassertransportes über die Membran von transformierten Oozyten. Mit Wasser injizierte Oozyten dienten als Kontrolle.

### 3.4.3 EINFLUSS VON QUECKSILBERIONEN AUF DIE WASSERPERMEABILITÄT VON NTAQP1

Bei dieser Studie wurde das Aquaporin PIP2b (Kammerloher *et al.*, 1994) als Beispiel für einen quecksilbersensitiven Wasserkanal verwendet. Zunächst wurden transformierte Oozyten im Schwellungsexperiment auf Expression des jeweiligen Aquaporins getestet (s. 3.4.2). Geeignete Oozyten wurden für 1 h in 1 \* ND96 Medium mit 1 mM HgCl<sub>2</sub> inkubiert. Die behandelten Oozyten wurden in das hypotonische Inkubationsmedium überführt und die relative Volumenzunahme ermittelt.

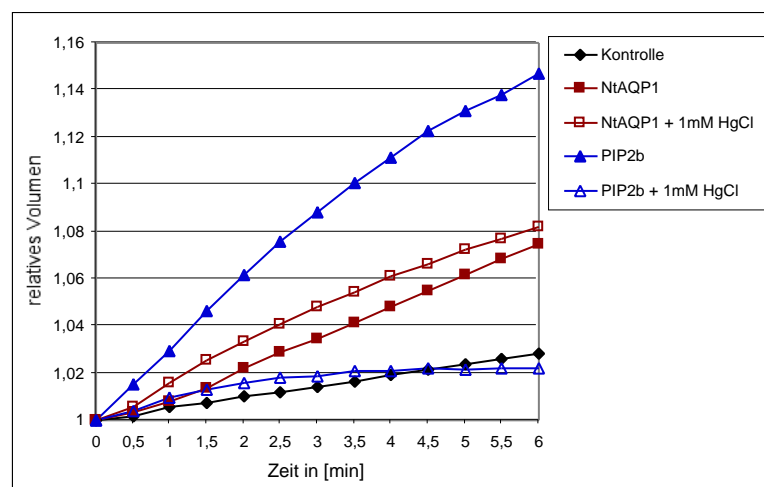


Abbildung 3-18: Mittelwerte der relativen Volumenzunahme von Oozyten im hypotonischen Medium nach vorhergehender Inkubation in quecksilberhaltiger ND96-Lösung. Die Oozyten wurden entweder mit Wasser (Kontrolle) oder cRNA von NtAQP1 bzw. PIP2b transformiert.

Für PIP2b konnten die Ergebnisse von Kammerloher *et al.* (1994) bestätigt werden. Eine Inkubation von mit PIP2b-cRNA transformierten Oozyten in 1 mM HgCl<sub>2</sub>-Lösung reduzierte die relative Volumenzunahme von ursprünglich 1,147 auf 1,022 (n=7). Unter identischen Bedingungen stieg dagegen der Faktor für NtAQP1-cRNA injizierte Oozyten innerhalb von 6 min von 1,074 auf 1,082 (n=19). Aus der Volumenzunahme wurden die in Abbildung 3-19 dargestellten P<sub>r</sub>-Werte ermittelt. Zum Vergleich wurden die in Abbildung 3-17 dargestellten Wasserpermeabilitätskoeffizienten erneut aufgeführt.



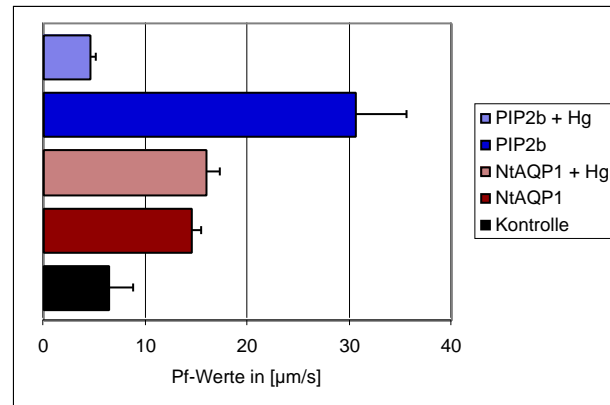


Abbildung 3-19: Effekt von 1mM HgCl<sub>2</sub> auf die P<sub>f</sub>-Werte von PIP2b und NtAQP1.

Die einstündige Inkubation der transformierten Oozyten in quecksilberhaltiger ND96-Lösung führte bei NtAQP1 zu einem Anstieg des P<sub>f</sub>-Wertes von  $14,5 \pm 0,9 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  auf  $15,9 \pm 2,7 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  (n=19). Der Wasserpermeabilitätskoeffizient für PIP2b reduzierte sich von  $30,6 \pm 4,9 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  auf  $4,6 \pm 1,1 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  (n=7).

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss verschiedener Quecksilberkonzentrationen auf die osmotische Wasserpermeabilität von NtAQP1 getestet. Hierzu wurden von der 1 mM HgCl<sub>2</sub>-Lösung (in ND96-Lösung) 2 weitere Verdünnungen mit 0,5 mM HgCl<sub>2</sub> und 0,1 mM HgCl<sub>2</sub> hergestellt. Die Inkubation der mit NtAQP1-cRNA transformierten Oozyten in den quecksilberhaltigen Lösungen betrug 1 h. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 3.4.2 beschrieben. Die Entwicklung der relativen Volumenzunahmen ist in Abbildung 3-20 und die korrespondierenden P<sub>f</sub>-Werte in Abbildung 3-21 dargestellt. Das Volumen von NtAQP1 exprimierenden Oozyten ohne Quecksilberbehandlung nahm innerhalb der sechsminütigen Inkubation im hypotonischen Medium um den Faktor 1,071 zu, was einem P<sub>f</sub>-Wert von  $14,21 \pm 1,50 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  (n=13) entspricht. Oozyten, die zuvor in 0,5 mM HgCl<sub>2</sub>-Lösung inkubiert wurden, zeigten mit einem Faktor von 1,070 und einem P<sub>f</sub>-Wert von  $14,08 \pm 3,64 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  (n=8) nahezu identische Werte. Die Inkubation in 0,1 mM HgCl<sub>2</sub> führte dagegen zu einer verringerten Volumenzunahme mit einem Faktor von 1,056. Der errechnete P<sub>f</sub>-Wert betrug  $11,32 \pm 0,97 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  (n=4). Die Behandlung mit 1 mM HgCl<sub>2</sub>-Lösung führte zu einer signifikant gesteigerten Volumenzunahme um den Faktor 1,09. Dieses entspricht einem P<sub>f</sub>-Wert von  $18,13 \pm 2,80 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  (n=9). Mit Wasser injizierte Oozyten nahmen innerhalb von 6 min um den Faktor 1,008 an Volumen zu. Der P<sub>f</sub>-Wert lag bei  $1,65 \pm 0,47 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  (n=11).

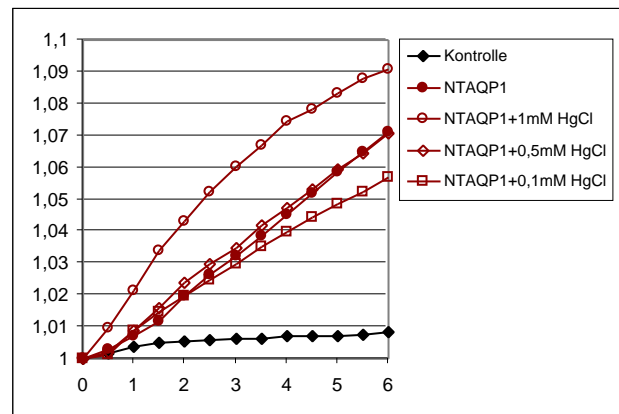


Abbildung 3-20: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Quecksilber auf die Entwicklung der relativen Volumenzunahme von Oozyten im hypotonischen Medium über einen Zeitraum von 6 min. Die Oozyten wurden entweder mit Wasser (Kontrolle) oder cRNA von NtAQP1 transformiert.

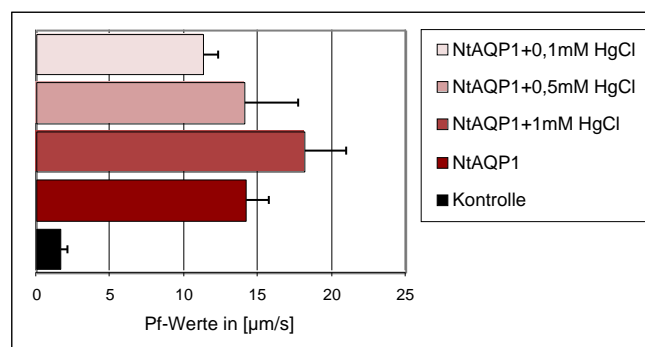


Abbildung 3-21: Errechnete Wasserpermeabilitätskoeffizienten in  $[\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}]$

#### 3.4.4 MODIFIZIERUNG DER AKTIVITÄT DURCH PHOSPHORYLIERUNG

Für das Tonoplasten Aquaporin TIP aus *Phaseolus vulgaris* demonstrierten Maurel *et al.* 1995 eine Steigerung der Wassertransportaktivität durch Phosphorylierung. In einem identischen Ansatz wurden Oozyten 3 Tage nach Injektion der NtAQP1-cRNA zunächst für 1 h in einer ND96-Lösung inkubiert, die zusätzlich cAMP, IBMX und Forskolin enthielt (s. 2.13.5). Die stimulierende Wirkung beruht auf einer Anhebung des intrazellulären cAMP-Spiegels und der Aktivierung einer endogenen Proteinkinase A. Danach erfolgten die eigentlichen Schwellungsexperimente (s. 3.4.2). Das Aquaporin TIP wurde bei dieser Studie zur Überprüfung der Versuchsbedingungen verwendet.

Die Phosphorylierung von TIP führte zu einer gesteigerten Wasserpermeabilität der Oozytenmembran von ca. 65 %. Der  $P_f$ -Wert stieg von  $16,38 \pm 2,14 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=10$ ) auf  $26,99 \pm 3,23 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=10$ ). Dagegen konnte für NtAQP1 keine Aktivitätssteigerung beobachtet werden. Der  $P_f$ -Wert für unbehandelte Oozyten lag bei  $14,84 \pm 2,52 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=13$ ), der für behandelte bei  $15,77 \pm 2,98 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=11$ ).

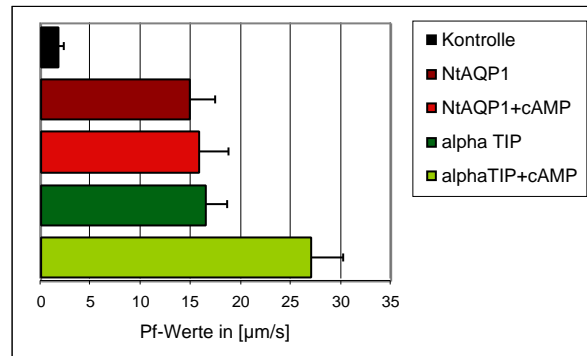


Abbildung 3-22: Wasserpermeabilitätskoeffizienten in  $[\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}]$ . Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels bei gleichzeitiger Aktivierung einer endogenen Proteinkinase führte im Fall von TIP zu einer 65% Aktivitätssteigerung. Unter identischen Bedingungen konnten bei NtAQP1 keine erhöhten  $P_f$ -Werte festgestellt werden.

### 3.4.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR SELEKTIVITÄT

#### 3.4.5.1 PERMEABILITÄT FÜR GLYCERIN

Für diese Studie wurden transformierte, bzw. nur mit Wasser injizierte Oozyten 10 min in einer isotonischen ND96-Lösung mit  $[\text{H}^3]$ -Glycerin inkubiert und anschließend mehrfach mit eiskalter ND-96-Lösung gewaschen. Die in die Oozyten aufgenommene Radioaktivität wurde durch Szintillation gemessen. Die unter den Inkubationsbedingungen gegebene natürliche Permeabilität der Oozytenmembran wurde anhand der ermittelten Werte für mit Wasser injizierte Oozyten bestimmt. Der Mittelwert der einzelnen Messwerte wurde als Schwellenwert definiert und auf einen Wert von 1 ( $1 \pm 0,22$ ;  $n=14$ ) umgerechnet. Die Ergebnisse für transformierte Oozyten wurden zur Auswertung in Relation zu diesem Schwellenwert gesetzt. Als Beispiel für eine proteinvermittelte Aufnahme von Glycerin wurde der Glycerintransporter GlpF aus *E. coli* in Oozyten exprimiert. Dieses Protein ist Aquaporinen sehr ähnlich und wird ebenfalls zur Familie der MIP-homologen Proteine gezählt. In Schwellungsexperimenten führte die Expression von GlpF nicht zu einem Anstieg der Wasserpermeabilität (Daten nicht aufgeführt). Dagegen wurde die Permeabilität für Glycerin um den Faktor  $6,71 \pm 0,4$  ( $n=8$ ) gesteigert. Unter identischen Bedingungen steigerte die Expression von NtAQP1 die Permeabilität für Glycerin um den Faktor  $5,29 \pm 0,68$  ( $n=15$ ). Zur Klärung, ob bereits die Expression eines membranständigen Proteins zu einem Anstieg der Glycerinpermeabilität führt, wurden Oozyten mit cRNA von TIP transformiert. Dieses Aquaporin wurde bereits als selektiv für Wasser charakterisiert (Maurel *et al.*, 1995 und 1997). Es konnte kein Anstieg der Glycerinpermeabilität ( $0,64 \pm 0,27$ ;  $n=15$ ) festgestellt werden.

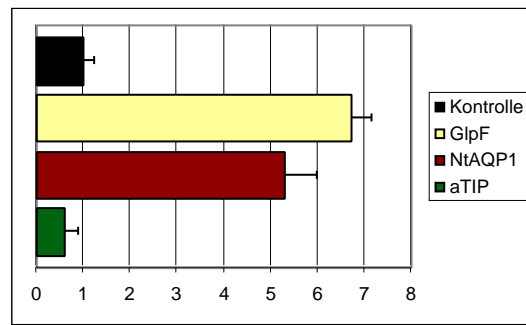


Abbildung 3-23: NtAQP1-, GlpF- und TIP-vermittelte Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Glycerin in Relation zu mit Wasser injizierten Oozyten (Kontrolle).

### 3.4.5.2 EFFEKT VON QUECKSILBER AUF DIE GLYCERINPERMEABILITÄT

Für diese Studie wurde PIP2b als Beispiel für ein quecksilbersensitives und für Glycerin permeables Aquaporin ausgewählt. Zum Vergleich wurden mit Wasser, bzw. mit GlpF-cRNA injizierte Oozyten verwendet. Mit PIP2b-cRNA transformierte Oozyten wurden zuvor im Schwellungsexperiment auf Expression getestet. Ein Teil der so ausgewählten Oozyten wurde für 30 min in 1 mM HgCl<sub>2</sub>-Lösung inkubiert und anschließend im Schwellungsexperiment auf eine reduzierte Wasserpermeabilität überprüft. Die Permeabilitätsstudie und Auswertung wurde wie unter 3.4.5.1 beschrieben durchgeführt.

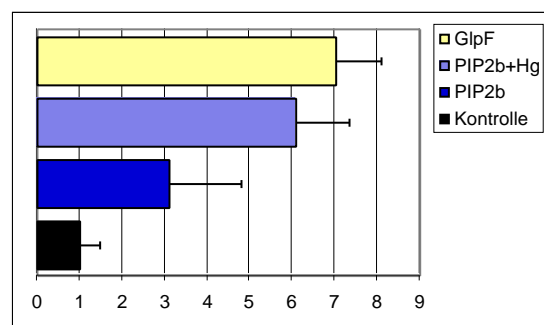


Abbildung 3-24: Einfluss von Quecksilber auf die Glycerinpermeabilität von PIP2b. Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Glycerin in Relation zu mit Wasser injizierten Oozyten (Kontrolle)

Der Mittelwert für mit Wasser injizierte Oozyten wurde auf den Wert 1 umgerechnet ( $1 \pm 0,4$ ;  $n=9$ ) und die Ergebnisse für transformierte Oozyten in Relation zu diesem Schwellenwert gesetzt. Die Expression von PIP2b führte zu einer relativen Steigerung der Permeabilität auf  $3,11 \pm 1,7$  ( $n=9$ ). Die Inkubation mit Quecksilber erhöhte die Permeabilität auf  $6,08 \pm 1,39$  ( $n=10$ ). Für GlpF ergab sich ein Wert von  $7,01 \pm 1,07$  ( $n=5$ ).

### 3.4.5.3 PERMEABILITÄT FÜR HARNSTOFF

Für diese Studie wurden transformierte, bzw. nur mit Wasser injizierte Oozyten 10 min in einer isotonischen ND96-Lösung mit [ $^{14}$ C]-Harnstoff inkubiert und anschließend mehrfach mit eiskalter Nd-96-Lösung gewaschen. Die in die Oozyten aufgenommene Radioaktivität wurde durch Szintillation gemessen. Die Auswertung erfolgte analog zu der Beschreibung in Kapitel 3.4.5.1. Ein Harnstofftransporter, wie z.B. der humane HUT11 (Wintour; 1997), stand für einen Vergleich nicht zur Verfügung. Die Expression von NtAQP1 erhöhte die Permeabilität für Harnstoff im Vergleich zu mit Wasser injizierten Oozyten ( $1 \pm 0,08$ ;  $n=7$ ) um den Faktor  $2,03 \pm 0,02$  ( $n=9$ ). Mit cRNA von PIP2b transformierte Oozyten zeigten unter identischen Bedingungen eine um den Faktor  $1,43 \pm 0,03$  ( $n=7$ ) erhöhte Permeabilität.

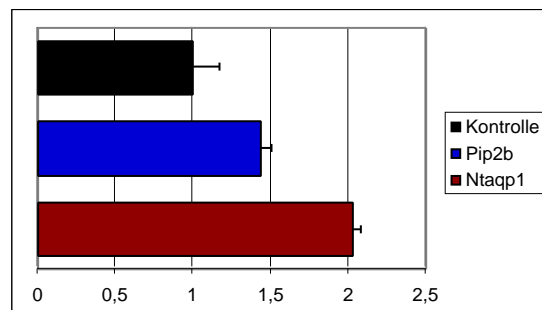


Abbildung 3-25: Permeabilität von NtAQP1 und PIP2b für Harnstoff in Relation zu mit Wasser injizierten Oozyten (Kontrolle).

### 3.4.5.4 PERMEABILITÄT FÜR IONEN

Zunächst wurden mit NtAQP1-cRNA transformierte Oozyten im Schwellungsexperiment auf Expression getestet. Die Inkubationsdauer im hypotonischen Medium wurde dabei auf 3 min verkürzt, da eine zu starke Volumenzunahme ein Platzen der Oozyten beim Einstechen der Messelektroden bewirkte. Einzelne ausgewählte Oozyten wurden dann in die Messkammer eingebracht und kontinuierlich von der jeweiligen Messlösung (s. 2.13.6.4) umspült. Nach Einbringen der Messelektroden wurde für jeweils 5 s ein Spannungspuls im Bereich von 0 mV bis -130 mV an der Membran angelegt. Dabei wurden keine Ströme für  $K^+$ ,  $Na^+$  oder  $Cl^-$  festgestellt. In einem weiteren Experiment wurde das Membranpotential für 20 min auf -100 mV gehalten. Auch hierbei konnten keine Ströme für  $K^+$ ,  $Na^+$  oder  $Cl^-$  gemessen werden. Unter den gewählten Bedingungen vermittelte NtAQP1 keinen messbaren Ionenfluss.

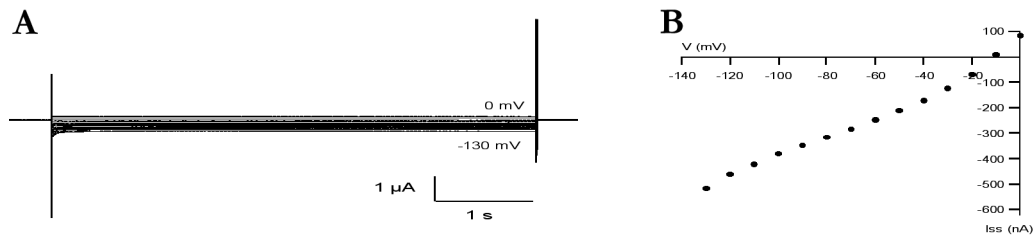


Abbildung 3-26: Permeabilität von NtAQP1 für Ionen. **(A)**: Bei einer Haltespannung von -20 mV wurden 5 s Spannungspulse von 0 bis -130 mV an der Membran angelegt. Weder bei 100 mM Na<sup>+</sup>, noch bei 100 mM K<sup>+</sup> wurden Ströme gemessen. **(B)**: Zugehörige Stromspannungskennlinie

### 3.5 GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VON SsAQP1 UND SsAQP2 ZU BESTIMMTEN TAGESZEITEN

In einer vorangegangenen Studie (Doktorarbeit Karsten Grote, 1998) konnten die beiden mRNA-Spezies SsAQP1 und SsAQP2 in verschiedenen Geweben von *Samanea saman* lokalisiert und die jeweiligen mRNA-Mengen relativ quantifiziert werden. Die SsAQP2-mRNA wurde nahezu ausschließlich in sekundären Pulvini auf sehr hohem Niveau expremiert und war in den übrigen untersuchten Geweben kaum nachweisbar. Die SsAQP1-mRNA konnte in Stengeln, Blättern und sekundären Pulvini nachgewiesen werden. Die Konzentration der SsAQP2-mRNA in sekundären Pulvini war doppelt so hoch wie die der SsAQP1-mRNA in diesem Gewebe.

Durch die vorliegende Studie sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression der beiden mRNA-Spezies und der nyktinastischen Bewegung der sekundären Pulvini aufgezeigt werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus sekundären Pulvini isoliert, die um 7 Uhr (Übergang zur Tagstellung), 13 Uhr und 19 Uhr (Übergang zur Nachtstellung) geerntet wurden. Zusätzlich wurde Gesamt-RNA aus Flexor- und Extensorgewebe von sekundären Pulvini (7 Uhr geerntet) isoliert. Je 10 µg der gewonnenen RNA wurde in einem 1% MEN-Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillarblot über Nacht auf eine Nylonmembran übertragen. Für einen späteren Abgleich der RNA-Mengen wurde die Membran zunächst mit einer 18S-rRNA Sonde aus *Arabidopsis thaliana* hybridisiert. Nach Exposition eines Röntgenfilmes konnten die jeweils eingesetzten RNA-Mengen der verschiedenen Spuren anhand des Schwärzungsgrades angeglichen werden. Gleiche Mengen an Gesamt-RNA aus den verschiedenen Geweben wurden wie oben beschrieben erneut aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen. Als Hybridisierungssonden wurden die vollständigen cDNAs von SsAQP1 bzw. SsAQP2 verwendet. Dazu wurde der Vektor pBluescript SK, der das jeweilige cDNA-Fragment enthielt, mit den Restriktionsendonukleasen *Bam* und *Hin* dIII verdaut, der Ansatz im TAE-Agarosegel aufgetrennt und die Insertionen aus dem Gel eluiert. Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem „ready-to-go“-DNA-Labeling System (s. 2.4.1). Die Hybridisierung mit der SsAQP1-Sonde erfolgte bei 68°C über Nacht. Ein Röntgenfilm wurde

für 24h exponiert. Nach Entfernen der SsAQP1-Sonde, wurde die Nylonmembran mit der SsAQP2-Sonde hybridisiert.

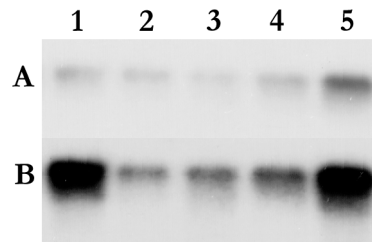


Abbildung 3-27: Autoradiographie der Hybridisierung mit der SsAQP1-Sonde (**A**) bzw. der SsAQP2-Sonde (**B**). 1: Flexor (7 Uhr); 2: Extensor (7 Uhr); 3: Gesamtpulvinus (19 Uhr); 4: Gesamtpulvinus (13 Uhr); 5: Gesamtpulvinus (7 Uhr). In Klammern ist die Tageszeit der Ernte angegeben. Pulvini öffnen um 7 Uhr und schließen um 19 Uhr.

Die SsAQP1-mRNA wurde im Vergleich zur SsAQP2-mRNA in allen untersuchten Pulvinigeweben deutlich schwächer exprimiert. Am stärksten war die Expression der SsAQP1-mRNA in Gesamtpulvini, die um 7 Uhr geerntet wurden. Im Tagesverlauf nahm die Konzentration dann stetig ab. Die Signalintensität war im Flexor geringfügig stärker als im Extensor. Die Expression der SsAQP2-mRNA war um 7 Uhr im Flexorgewebe sehr hoch und vergleichsweise niedrig im Extensor. Im Tagesverlauf war die Signalintensität während der Streckungsbewegung der Pulvini um 7 Uhr am stärksten. Bei vollständig gestreckten Pulvini um 13 Uhr war die Expression deutlich niedriger und um 19 Uhr, bei vollständig gebeugten Pulvini am niedrigsten.

### 3.6 FUNKTIONSANALYSE VON SsAQP1 UND SsAQP2 IN OOZYTEN

#### 3.6.1 WASSERPERMEABILITÄT UND QUECKSILBERSENSITIVITÄT

Nach Injektion von SsAQP1- bzw. SsAQP2-cRNA in Oozyten und einer dreitägigen Inkubation bei 16°C in ND96-Medium wurden einzelne Oozyten in  $\frac{1}{3}$  ND96-Medium (70 mosmol) überführt. Die resultierende Volumenzunahme wurde in einen Zeitraum von 6 min über ein Digitalkamerasystem an einem Computer verfolgt und anschließend ausgewertet. Zur Untersuchung des Einflusses von Quecksilber wurden Oozyten ausgewählt, die zuvor im Schwellungsexperiment auf Expression geprüft wurden. Geeignete Oozyten wurden für 1 h in 1 \* ND96 Medium mit 0,5 mM HgCl<sub>2</sub> inkubiert. Die behandelten Oozyten wurden in das hypotonische Inkubationsmedium überführt und die relative Volumenzunahme ermittelt. Zur Abgrenzung der natürlichen von der aquaporinvermittelten Wasserpermeabilität dienten Oozyten, in die nur Wasser injiziert wurde.

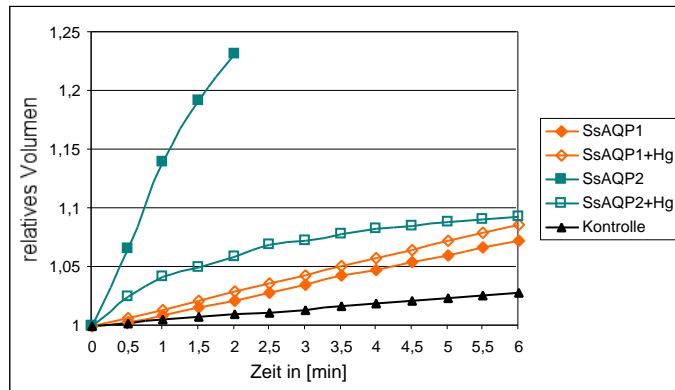


Abbildung 3-28: Entwicklung des relativen Volumens von Oozyten mit und ohne Quecksilberbehandlung über einen Zeitraum von 6 min im hypotonischen Medium. Die Oozyten wurden entweder mit Wasser (Kontrolle) oder cRNA von SsAQP1 bzw. SsAQP2 transformiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte.

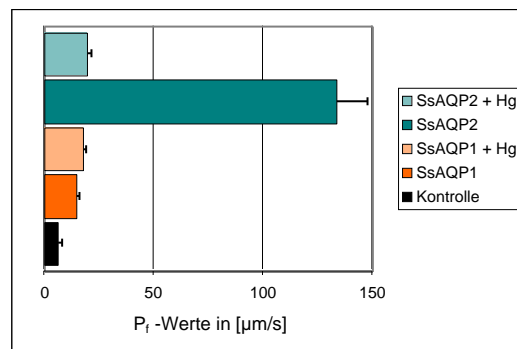


Abbildung 3-29: Berechnete Wasserpermeabilitätskoeffizienten in  $[\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}]$  als Maß für die Geschwindigkeit des Wassertransportes über die Membran. Zusätzlich ist der Effekt einer einstündigen Inkubation der Oozyten in 0,5 mM Quecksilberlösung aufgeführt. Mit Wasser injizierte Oozyten dienen als Kontrolle.

Oozyten, in die Wasser injiziert wurde, nahmen während der sechsminütigen Inkubation im hypotonischen Medium um den Faktor 1,028 zu. Dieses entsprach einem  $P_f$ -Wert von  $6,4 \pm 2,4 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=28$ ). Mit SsAQP1-cRNA transformierte Oozyten nahmen unter diesen Bedingungen um den Faktor 1,072 an Volumen zu. Der errechnete  $P_f$ -Wert lag bei  $14,6 \pm 1,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=15$ ). Durch die einstündige Inkubation in quecksilberhaltiger ND96-Lösung stieg der  $P_f$ -Wert auf  $17,5 \pm 1,3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=12$ ). Die Inkubation von mit SsAQP2-cRNA injizierten Oozyten im hypotonischen Medium führte bereits nach 2 min zum Platzen der Oozyten. Aus der relativen Volumenzunahme von 1,23 wurde ein  $P_f$ -Wert von  $133,6 \pm 14,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=18$ ) errechnet. Durch die Behandlung mit Quecksilber wurde der  $P_f$ -Wert auf  $19,3 \pm 1,9 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n=6$ ) reduziert.



### 3.6.1.1 MODIFIZIERUNG DER QUECKSILBERSENSITIVITÄT VON SsAQP2 DURCH AUSTAUSCH EINES CYSTEIN

Eine Sequenzanalyse zeigte, dass die Quecksilbersensitivität von SsAQP2 durch ein oder mehrere von insgesamt 4 Cysteinen (siehe Abbildung 3-11) vermittelt werden kann. Während 3 Cysteine in transmembranen Bereichen lokalisiert sind, ist das Cystein an Position 75 in der ersten extrazellulären Schleife vergleichsweise stärker exponiert und wurde deshalb für diese Studie gegen ein Alanin ausgetauscht. Hierfür wurde das „Site Directed Mutagenesis“-System der Firma Stratagene unter Verwendung der Primer „SsAQP2:C75A sense/SsAQP2:C75A antisense“ genutzt.

SsAQP2:C75A sense:

5´-GCCGGCGGCGATGTCGCCGGCGGCGTCGTCGGC-3´

SsAQP2:C75A antisense:

5´-GCCGACGACGCCGCCGGCGACATCGCCGCCGGC-3´

Zur Untersuchung der Quecksilbersensitivität von SsAQP2:C75A wurden Oozyten ausgewählt, die zuvor im Schwellungsexperiment auf Expression geprüft wurden. Geeignete Oozyten wurden für 10 min in 1 \* ND96 Medium mit 0,5 mM HgCl<sub>2</sub> inkubiert. Die behandelten Oozyten wurden in das hypotonische Inkubationsmedium überführt und die relative Volumenzunahme ermittelt (siehe Abbildung 3-30). Zur Abgrenzung der natürlichen von der aquaporinvermittelten Wasserpermeabilität dienten Oozyten, in die nur Wasser injiziert wurde. Mit SsAQP2-cRNA transformierte Oozyten wurden zur Kontrolle der experimentellen Bedingungen verwendet. Aus den relativen Volumenzunahmen wurden die Wasserpermeabilitätskoeffizienten ermittelt und in Abbildung 3-31 dargestellt. Für mit Wasser injizierte Oozyten ergab sich ein P<sub>f</sub>-Wert von 7,1±1,7 µm \* s<sup>-1</sup> (n=10). Die Expression von SsAQP2 erhöhte die Permeabilität auf 63,15±7,1 µm \* s<sup>-1</sup> (n=6). Für die Mutante SsAQP2:C75A wurde ein P<sub>f</sub>-Wert von 28,15±1,6 µm \* s<sup>-1</sup> (n=11) ermittelt. Die Inkubation mit Quecksilberchlorid reduzierte die Wasserpermeabilität von SsAQP2 auf 30,1±4,8 µm \* s<sup>-1</sup> (n=5), während der P<sub>f</sub>-Wert von SsAQP2:C75A unter identischen Bedingungen unverändert bei 28,14±2,4 µm \* s<sup>-1</sup> (n=7) lag.

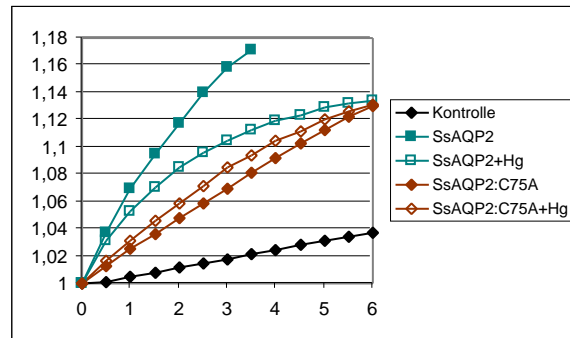


Abbildung 3-30: Entwicklung der relativen Volumenzunahme von mit Wasser (Kontrolle), SsAQP2- und SsAQP2:C75A-cRNA injizierten Oozyten über einen Zeitraum von 6 min im hypotonischen Medium.

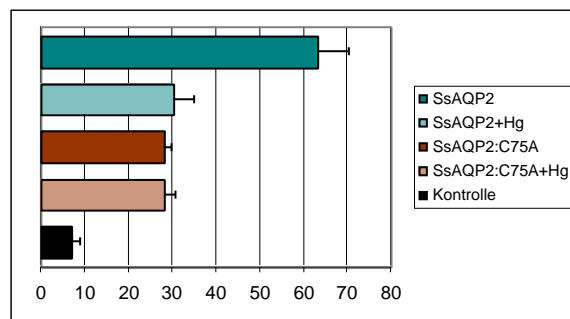


Abbildung 3-31: Errechnete Wasserpermeabilitätskoeffizienten in [ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ] von mit Wasser (Kontrolle), SsAQP2- und SsAQP2:C75A-cRNA injizierten Oozyten. Effekt von Quecksilber auf die  $P_f$ -Werte von SsAQP2 und SsAQP2:C75A.

### 3.6.2 PERMEABILITÄT FÜR GLYCERIN

Für diese Studie wurden transformierte, bzw. nur mit Wasser injizierte Oozyten 10 min in einer isotonischen ND96-Lösung mit [ $^3\text{H}$ ]-Glycerin inkubiert und anschließend mehrfach mit eiskalter ND-96-Lösung gewaschen. Die in die Oozyten aufgenommene Radioaktivität wurde durch Szintillation gemessen. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.4.5.1 beschrieben. Die Expression von SsAQP1 erhöhte die Permeabilität der Oozytenmembran im Vergleich zu mit Wasser injizierten Oozyten ( $1\pm 0,4$ ;  $n=11$ ) um den Faktor  $4,9\pm 1,4$  ( $n=8$ ). Mit cRNA von SsAQP2 transformierte Oozyten zeigten unter identischen Bedingungen eine um den Faktor  $1,22\pm 0,4$  ( $n=9$ ) erhöhte Permeabilität.

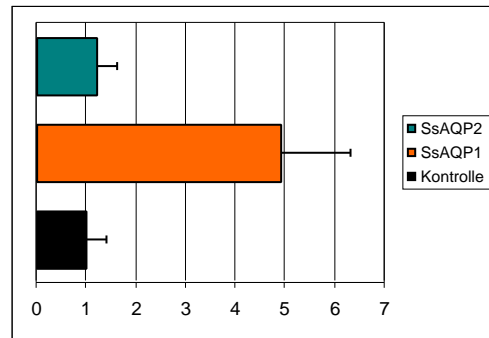


Abbildung 3-32: Permeabilität von SsAQP1 und SsAQP2 für Glycerin in Relation zu mit Wasser injizierten Oozyten (Kontrolle).

### 3.7 FUSION VON SsAQP1 UND SsAQP2 MIT GFP

In Schwellungsexperimenten vermittelte SsAQP2 eine etwa 10fach höhere Wasserpermeabilität im Vergleich zu mit SsAQP1-cRNA transformierten Oozyten. Unter der Annahme, dass jeweils identische Mengen an cRNA injiziert wurden, ist dieser Unterschied auf die Eigenschaften von SsAQP2, bzw. auf eine höhere Translationseffizienz der SsAQP2-cRNA zurückzuführen. Die Fusion von GFP mit SsAQP1 bzw. mit SsAQP2 sollte eine relative Quantifizierung der Aquaporinmenge in der Oozytenmembran ermöglichen. Um zu überprüfen, ob eine GFP-vermittelte Fluoreszenz in Oozyten detektiert werden kann, wurden im Vorfeld zu dieser Studie Oozyten mit GFP-cRNA transformiert. Nach einer dreitägigen Inkubation wurde die Expression von GFP durch Fluoreszenzmikroskopie (Leica MZ FLIII) verfolgt. Zur Abgrenzung der GFP-vermittelten Fluoreszenz von einer natürlichen Eigenfluoreszenz wurden mit Wasser injizierte Oozyten verwendet. Die Abbildung 3-33 zeigt die über einen Zeitraum von 4 s aufgenommene Fluoreszenz von untransformierten (**A**) und mit GFP transformierten Oozyten (**B**). Auffällig ist die Eigenfluoreszenz untransformierter Oozyten, sowie die reduzierte Fluoreszenzintensität im Bereich des pigmentierten Pols der Oozyten. Die Abbildung 3-33 (**B**) zeigt, dass die Detektion einer GFP-vermittelten Fluoreszenz in Oozyten möglich ist.

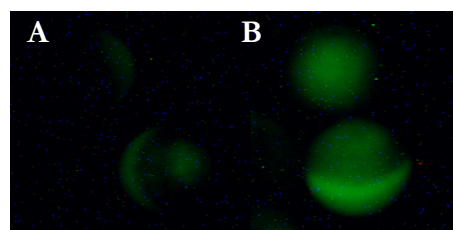


Abbildung 3-33: Bei einer Belichtungszeit von 4 s zeigten mit Wasser (**A**) injizierte Oozyten eine schwache Eigenfluoreszenz. Unter identischen Bedingungen konnte für GFP-cRNA (**B**) transformierte Oozyten eine starke Fluoreszenz festgestellt werden.

Im folgenden wurden Oozyten mit cRNA von GFP:SsAQP1 bzw. GFP:SsAQP2 transformiert. Nach der dreitägigen Inkubation wurden die Oozyten für Schwellungsexperimente, wie unter 3.4.2 beschrieben eingesetzt. Dabei konnte im Vergleich zu mit Wasser injizierten Oozyten keine erhöhte Wasserpermeabilität festgestellt werden. In der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie zeigten die transformierten Oozyten eine stärkere Fluoreszenz als solche, die mit Wasser injiziert wurden. Zur genauen Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine wurden von den zuvor getesteten Oozyten Gefrierschnitte (Mikrotom HM 500M; MICROM GmbH) mit einer Stärke von 50  $\mu\text{m}$  angefertigt. Von angeschnittenen Oozyten wurde jeweils eine deckungsgleiche Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme (Leica MZ FLIII; Belichtungszeit 5s) bei 50facher Vergrößerung angefertigt (Bild **A**; Abbildungen 3-34 bis 3-36). Die 50  $\mu\text{m}$  Gefrierschnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht und deckungsgleiche Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen (Zeiss Axioplan; Belichtungszeit 5s) bei 400facher Vergrößerung aufgenommen (Bild **B**; Abbildungen 3-34 bis 3-36). Anhand der Abbildungen 3-35 und 3-36 (**A** und **B**) ist zu erkennen, dass die emittierte Fluoreszenz nicht von der Oozytenmembran, sondern vom Zytoplasma ausging. Folglich wurden die Fusionsproteine GFP:SsAQP1 und GFP:SsAQP2 nicht in die Membran integriert, was mit den Ergebnissen der Schwellungsexperimente übereinstimmt.

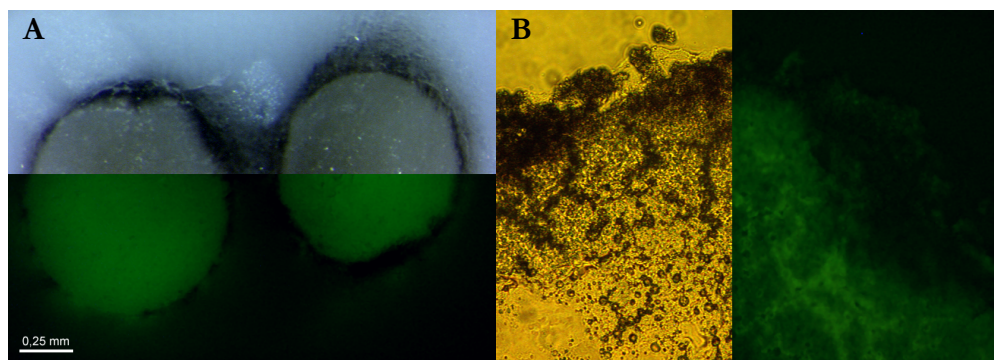


Abbildung 3-34: Mit Wasser injizierte Oozyten. (**A**) Aufgeschnittene Oozyten im gefrorenen Einbettmedium (MICROM GmbH). Die Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme wurde bei einer 50fachen Vergrößerung aufgenommen und deckungsgleich aneinandergesetzt. (**B**) Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme eines 50  $\mu\text{m}$  Gefrierschnitts bei einer 400fachen Vergrößerung.

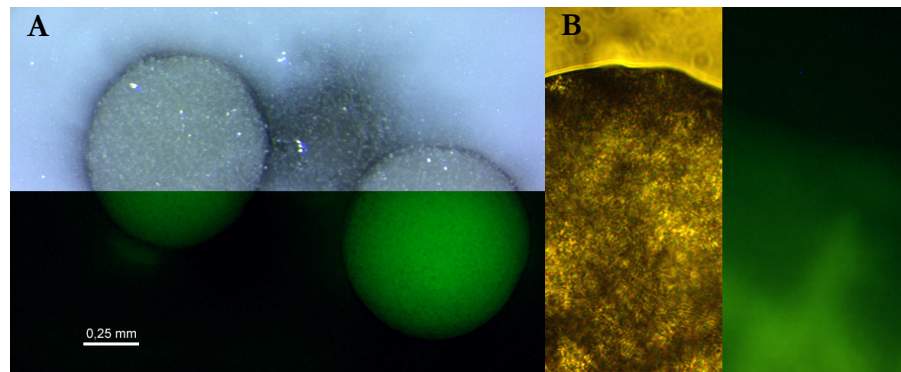


Abbildung 3-35: Mit GFP:SsAQP1-cRNA injizierte Oozyten. (A) Aufgeschnittene Oozyten im gefrorenen Einbettmedium. Die Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme wurde bei einer 50fachen Vergrößerung aufgenommen und deckungsgleich aneinandergesetzt. (B) Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme eines 50 µm Gefrierschnitts bei einer 400fachen Vergrößerung.

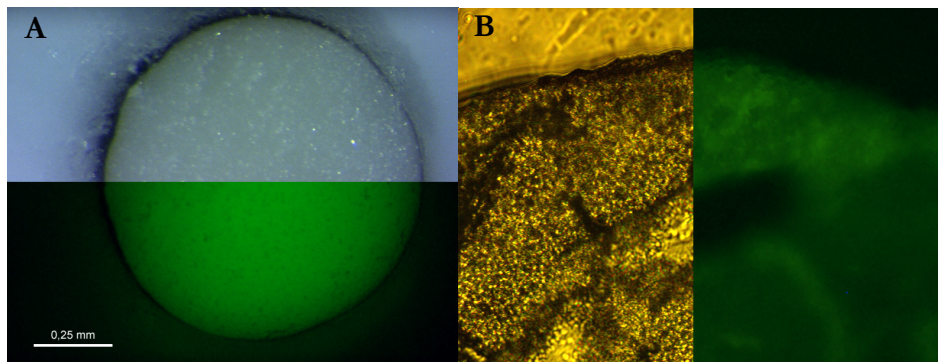


Abbildung 3-36: Mit GFP:SsAQP2-cRNA injizierte Oozyte. (A) Aufgeschnittene Oozyte im gefrorenen Einbettmedium. Die Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme wurde bei einer 50fachen Vergrößerung aufgenommen und deckungsgleich aneinandergesetzt. (B) Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme eines 50 µm Gefrierschnitts bei einer 400fachen Vergrößerung.

### 3.8 ÜBERPRÜFEN DER TRANSLATIONSEFFIZIENZ MITTELS GUS-FÄRBUNG

Mit GUS-cRNA transformierte Oozyten wurden 2 Tage nach der Injektion einzeln in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit je 50 µl GUS-Färbelösung überführt. Nach Inkubation über Nacht wurde die Blaufärbung der Oozyten fotografisch dokumentiert. Eine relative Quantifizierung anhand der Farbintensität wurde nicht vorgenommen. Das Ergebnis wurde lediglich zur Abschätzung der zu erwartenden Translationseffizienz von Oozyten, die 3 Tage zuvor mit Aquaporin-cRNA transformiert wurden, herangezogen.

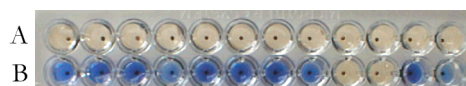


Abbildung 3-37: A: Mit Wasser injizierte Oozyten zeigten keine Blaufärbung. B: 10 von 12 mit GUS-cRNA transformierte Oozyten exprimierten die  $\beta$ -Glucuronidase.