

Die Bedeutung von Aquaporinen und ihren Interaktionspartnern für die Zelltodregulation in Pflanzen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Genetik
Fachgebiet Allgemeine Virologie

vorgelegt von
Tanja Anita Hoch

aus Nürtingen
2011

Dekan:	Prof. Dr. H. Breer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Pfitzner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Schaller
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. O. Spring
Eingereicht am:	4. Juli 2011
Mündliche Prüfung am:	5. Dezember 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am 30. September 2011 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

1 Einleitung	1
1.1 Aquaporine	1
1.2 Programmierter Zelltod	5
1.2.1 Apoptose in Säugern	7
1.2.2 Proteine der Bcl-2 Familie	9
1.2.3 BHRF1, ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie	10
1.2.4 Pathogenabwehr und Zelltod in Pflanzen	11
1.2.5 ROS („reactive oxygen species“)	13
1.3 Zielsetzung	15
2 Material	17
2.1 Chemikalien und Enzyme	17
2.2 Biologische Materialien	17
2.2.1 Pflanzen	17
2.2.2 Pflanzenviren	17
2.2.3 Bakterienstämme	17
2.2.4 Hefestämme	18
2.3 Vektoren	18
2.3.1 pBluescript II KS(+) (pBS)	18
2.3.2 pBluescript/T-Vektor	19
2.3.3 pUC18/19	19
2.3.4 pGAD424	20
2.3.4.1 pGAD Δ	21
2.3.5 pYEGFP	21
2.3.5.1 „Green fluorescent protein“ (GFP)	22
2.3.6 pBT3-C	23
2.3.7 pBT3-N	23
2.3.8 pPR3-N	24
2.3.9 pDSL-Nx	25
2.3.10 pGEX-3X	26
2.3.11 GFP-Vektoren (pK7WGF2N und pK7FWG2C)	27
2.3.12 pBin19 35S	28
2.3.13 pTAK35Scah	28
2.3.14 pRK2013	28
2.4 „Kits“	29
2.4.1 Plasmid Mini- und Maxi-Präparation	29
2.4.2 DNA-Eluierung aus Agarosegelen	29
2.5 Protein-Molekulargewichtsstandard	29
2.5.1 „Prestained“ Proteinmarker	29
2.5.2 „Unstained“ Proteinmarker	30
2.6 Antiseren	30
2.6.1 Detektion von GFP („green fluorescent protein“)	30

2.6.2 Detektion von BHRF1	30
2.6.3 Detektion des humanen Aquaporin 1	30
2.6.4 Detektion von GST (Glutathion-S-Transferase)	31
2.6.5 Detektion der Aminoacylase	31
2.7 Oligonukleotide (Primer)	31
2.7.1 Oligonukleotide	31
2.7.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung	33
2.8 Affinitätsmatrix	34
2.9 Faktor Xa	34
2.10 Chromatographiesäule	34
3 Methoden	35
3.1 Molekularbiologische Standardmethoden	35
3.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen	35
3.1.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i> nach Inoue und Mitarbeiter (1990)	36
3.1.2.1 Herstellung der kompetenten Bakterienzellen DH5 α , XL1-blue, BL21	36
3.1.2.2 Transformation der Bakterienzellen DH5 α , XL1-blue, BL21	36
3.1.3 Plasmidpräparation aus Bakterien	37
3.1.4 Phenolextraktion und Ethanol-fällung von DNA	38
3.1.5 Sequenzspezifische Restriktion von DNA	38
3.1.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten	38
3.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
3.1.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	39
3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten	39
3.1.10 „Colony screen“ mittels PCR	40
3.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
3.1.11.1 High Fidelity PCR	42
3.1.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
3.1.13 DNA-Sequenzierung	43
3.1.14 Herstellung von Bakterien- und Hefestammkulturen	43
3.1.15 Überexpression von GST-Fusionsproteinen	43
3.1.15.1 Überexpression zur Analyse von unabhängigen Kolonien	43
3.1.16 Reinigung von Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	44
3.1.16.1 Aufschluss der <i>E. coli</i> -Zellen durch Ultraschallbehandlung	44
3.1.16.2 Aufschluss der <i>E. coli</i> -Zellen durch Lysozymbehandlung	44
3.1.17 Reinigung von Fusionsproteinen mit GST-Affinitätsepitop unter nativen Bedingungen	45
3.1.17.1 Reinigung durch Elution des Fusionsproteins	45
3.1.17.2 Reinigung durch Spaltung des GST-Fusionsproteins mit Faktor Xa	46
3.1.18 Aminoacylase-Funktionsassay	46
3.2 Arbeiten mit Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
3.2.1 Hefemedien	48
3.2.1.1 YPAD-Medium	48

3.2.1.2 SD-Medium.....	48
3.2.1.3 SD/3-AT-Medium bzw. SD/X-Gal-Medium.....	49
3.2.2 Kultivierung von Hefezellen.....	49
3.2.3 Transformation von Hefezellen.....	50
3.2.3.1 Herstellung kompetenter Hefezellen.....	50
3.2.3.1.1 Cen.PK2, NMY51, BY4741, YML007w und YHR206w.....	50
3.2.3.1.2 Transformation von Hefezellen.....	50
3.2.4 Proteinextraktion aus Hefezellen.....	51
3.2.4.1 Methode nach Printen und Sprague (1994).....	51
3.2.4.2 „Cathy’s no boil yeast extracts“.....	52
3.2.5 Analyse von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	53
3.2.6 Anfärbung von Proteingelen („Coomassie“-Färbung).....	55
3.2.7 Immundetektion von Proteinen („Western-Blotting“)......	55
3.2.7.1 Proteintransfer.....	55
3.2.7.2 Immundetektion.....	56
3.2.8 Vorbereitung der Vektoren.....	57
3.2.9 Quantitativer Test einer Protein-Protein-Interaktion im Hefezweihybridsystem.....	58
3.2.10 Transformation und Durchmusterung einer cDNA-Bank im Split Ubiquitin System.....	59
3.2.11 Plasmidpräparation aus Hefezellen.....	62
3.2.12 Anfärbung von H ₂ O ₂ mittels 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) in transgenen Hefen (Schopfer et al., 2001).....	63
3.3 Arbeiten mit Pflanzen.....	63
3.3.1 Aufzucht und Kultur im Gewächshaus.....	63
3.3.2 Inokulierung von Pflanzen mit TMV.....	64
3.3.3 Isolierung von Proteinen aus Blattmaterial.....	64
3.3.4 Isolierung von Proteinen aus Blattmaterial und Durchführung eines Cyanamidhydratase-Enzymassays.....	65
3.3.4.1 Cyanamidhydratase-Enzymassay.....	65
3.3.5 DAB- bzw. Evans Blue-Färbung.....	65
3.3.6 In vivo Detektion von ROS (H ₂ O ₂) in Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen mit Hilfe von 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) (Schopfer et al., 2001).....	65
3.3.7 Quantitative Detektion von ROS bzw. H ₂ O ₂ mit Hilfe von Xylenol Orange (FOX-Assay).....	66
3.3.8 Nachweis von Salicylat in Pflanzen (Gil und Martinez-Merino, 2007).....	67
3.3.9 Behandlung von Pflanzen mit Pelargonsäure.....	67
3.4 <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von <i>N. benthamiana</i> bzw. <i>N. tabacum</i>	68
3.4.1 Konjugativer Transfer des binären Vektors pTAK35S aus <i>E. coli</i> in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> („Triparental Mating“).....	68
3.4.2 Transformation von <i>A. tumefaciens</i> durch Elektroporation.....	69
3.4.2.1 Herstellung der elektrokompetenten Zellen.....	69
3.4.2.2 Elektroporation.....	70
3.4.3 <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Infiltration von <i>Nicotiana benthamiana</i>	70

4 Ergebnisse	72
4.1 Untersuchung transgener Pflanzen.....	72
4.1.1 Charakterisierung der Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen.....	72
4.1.1.1 Nachweis von H ₂ O ₂ im Bereich der Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen.....	73
4.1.1.2 Quantitative Bestimmung von H ₂ O ₂ mittels Xylenol Orange (FOX-Assay).....	74
4.1.1.3 Quantitative Bestimmung von H ₂ O ₂ mittels 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA).....	75
4.1.2 Infektionsversuche von BHRF1-transgenen Pflanzen mit dem Tabakmosaikvirus (TMV).....	76
4.1.2.1 Nachweis von H ₂ O ₂ in TMV-Nekrosen von BHRF1-transgenen Pflanzen.....	78
4.1.2.2 Quantitative Bestimmung von H ₂ O ₂ mittels Xylenol Orange (FOX-Assay).....	78
4.1.2.3 Quantitative Bestimmung von H ₂ O ₂ mittels 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA).....	79
4.1.3 Nachweis der Akkumulation von Salicylat in BHRF1-transgenen Pflanzen.....	80
4.1.4 Weitere Unterschiede zwischen TMV-Nekrosen und Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen.....	81
4.1.5 Behandlung von Blättern BHRF1-transgener Pflanzen mit Pelargonsäure.....	82
4.2 Untersuchung zur Expression und Funktion von Aquaporinen in transgenen Hefen.....	85
4.2.1 Herstellung der Konstrukte zur Untersuchung der Lokalisation und Funktion von Aquaporinen.....	85
4.2.1.1 Klonierung der Aquaporine NtTIP1.1a, AtTIP1.1 und AtPIP2.2.....	85
4.2.1.2 Transformation von pYEGFP:NtPIP2.2b, pYEGFP:NtPIP2.2a, pYEGFP:NtTIP1.1a, pYEGFP:AtTIP1.1, pYEGFP:mAtPIP2.2, pYEGFP:AtPIP2.2m, pYEGFP:hAQP1, pYEGFP:rAQP8, pGADΔ:BHRF1wt, pGADΔ:BHRF1ΔTMwt, pGADΔ:mBHRF1 und pGADΔ:mBHRF1ΔTM in <i>S. cerevisiae</i> Cen.PK2, BY4741, YHR206w und YML007w.....	90
4.2.2 Untersuchung der Lokalisation von Aquaporinen in transgenen Hefen.....	90
4.2.2.1 Lokalisation von GFP und Aquaporin-GFP-Fusionen im Hefestamm Cen.PK2.....	92
4.2.2.2 Lokalisation von GFP und Aquaporin-GFP-Fusionen im Hefestamm YML007w.....	94
4.2.3 Nachweis der Expression von Proteinen in Hefestamm Cen.PK2.....	96
4.2.4 Transportfähigkeit von Wasserstoffperoxid durch Aquaporine in Hefe.....	99
4.2.4.1 Cen.PK2, ein diploider Wildtyp-Hefestamm.....	100
4.2.4.2 BY4741, ein haploider Wildtyp-Hefestamm.....	102
4.2.4.3 YHR206w, ein haploider Hefestamm mit einer Mutation/Deletion im <i>skn7</i> Gen.....	103
4.2.4.4 YML007w, ein haploider Hefestamm mit einer Mutation/Deletion im <i>yap1</i> Gen.....	104
4.2.5 Nachweis von H ₂ O ₂ mit 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) in Hefe.....	106
4.3 Transiente Expression von GFP-Fusionsproteinen in Pflanzen.....	115
4.3.1 Beschreibung der GFP-Fusionskonstrukte.....	115
4.3.2 Untersuchung des Blattgewebes von infiltrierten <i>Nicotiana benthamiana</i> Pflanzen.....	116
4.3.3 Quantitativer Nachweis von H ₂ O ₂ in infiltriertem Blattgewebe.....	120
4.3.4 Nachweis der Proteinexpression infiltrierter <i>Nicotiana benthamiana</i> Pflanzen.....	122
4.3.5 Weitere Infiltrationsexperimente zur Untersuchung der Überexpression von Aquaporinen.....	124

4.3.6 Einfluss von BHRF1 auf die transiente Aquaporin-Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> ...	129
4.4 Untersuchung der Interaktion von Aquaporinen mit BHRF1 im Split Ubiquitin System.....	130
4.4.1 Herstellung der Konstrukte für Interaktionsstudien im Split Ubiquitin System.....	133
4.4.1.1 Klonierung der Aquaporine NtTIP1.1a, AtTIP1.1, mAtTIP1.1, mAtPIP2.2, AtPIP2.2m, hAQP1, rAQP8 sowie Deletionen der <i>Nicotiana tabacum</i> Aquaporinklone NtPIP2.2b und NtTIP1.1a in pBT3-C bzw. pBT3-N.....	133
4.4.1.2 Klonierung von BHRF1wt, BHRF1 Δ TMwt, mBHRF1 und mBHRF1 Δ TM in pPR3-N.....	138
4.4.2 Transformation der Aquaporine, der NtPIP2.2b- und NtTIP1.1a-Deletionen sowie BHRF1 in <i>S. cerevisiae</i> NMY51.....	141
4.4.3 Nachweis der Expression von Proteinen im Hefestamm NMY51.....	141
4.4.4 Interaktionstests mittels Split Ubiquitin System.....	142
4.4.4.1 Interaktionsstudien im Split Ubiquitin System unter Verwendung des <i>HIS3</i> -Reportergens.....	142
4.4.4.1.1 Interaktion zwischen BHRF1wt und pflanzlichen Aquaporinen.....	146
4.4.4.1.2 Interaktion zwischen BHRF1 Δ TMwt und pflanzlichen Aquaporinen.....	147
4.4.4.1.3 Interaktion zwischen mBHRF1 und pflanzlichen Aquaporinen.....	148
4.4.4.1.4 Interaktion zwischen mBHRF1 Δ TM und pflanzlichen Aquaporinen.....	150
4.4.4.1.5 Interaktion zwischen BHRF1 und tierischen Aquaporinen.....	151
4.4.4.1.6 Interaktion zwischen BHRF1 und NtPIP2.2b-Deletionen.....	153
4.4.4.1.7 Interaktion zwischen BHRF1 und NtTIP1.1a-Deletionen.....	156
4.4.4.2 Quantitativer Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion im Split Ubiquitin System unter Verwendung des <i>lacZ</i> -Reportergens.....	159
4.4.4.2.1 Interaktion zwischen BHRF1 und Aquaporine.....	159
4.4.4.2.2 Interaktion zwischen Bcl-X _L und Aquaporine.....	160
4.4.4.2.3 Interaktion zwischen BHRF1 und NtPIP2.2b-Deletionen.....	161
4.4.4.2.4 Interaktion zwischen BHRF1 und NtTIP1.1a-Deletionen.....	164
4.4.4.2.5 Interaktion zwischen BHRF1-Deletionen und Aquaporine.....	165
4.5 Durchmusterung einer <i>Arabidopsis thaliana</i> cDNA-Bank im Vektor pDSL-Nx.....	168
4.5.1 Klonierung und Expression der Vollängenaminoacylase aus <i>Nicotiana tabacum</i>	169
4.5.1.1 Amplifikation der Vollängenaminoacylase.....	169
4.5.1.2 Amplifikation der Aminoacylasedeletionen NtACY Δ PWW und NtACY Δ VWW.....	170
4.5.1.3 Transformation von pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94, pPR3-N:NtACY, pPR3-N:NtACY Δ PWW und pPR3-N:NtACY Δ VWW in <i>S. cerevisiae</i> NMY51.....	171
4.5.2 Nachweis der Expression von AtACY Δ 1-94 und <i>Nicotiana tabacum</i> Aminoacylase in <i>S. cerevisiae</i> NMY51.....	171
4.5.3 Interaktionstests von AtACY Δ 1-94 und NtACY mit verschiedenen Aquaporinen mittels Split Ubiquitin System.....	173
4.5.3.1 Qualitative Interaktionsstudien im Split Ubiquitin System unter Verwendung des <i>HIS3</i> -Reportergens.....	173
4.5.3.1.1 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 und Aquaporine.....	173
4.5.3.1.2 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 und Aquaporindeletionen.....	174

4.5.3.1.3 Interaktion zwischen NtACY und Aquaporine.....	175
4.5.3.1.4 Interaktion zwischen NtACY und Deletionen von NtPIP2.2b.....	176
4.5.3.1.5 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY und NtTIP1.1a-Deletionen.....	177
4.5.3.2 Quantitativer Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion zwischen <i>Arabidopsis</i> - aminoacylase bzw. Tabakaminoacylase und Aquaporine im Split Ubiquitin System unter Verwendung des <i>lacZ</i> -Reportergens.....	178
4.5.3.2.1 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY und Aquaporine.....	178
4.5.3.2.2 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY und NtPIP2.2b-Deletionen.....	179
4.5.3.2.3 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY und NtTIP1.1a-Deletionen.....	179
4.5.3.2.4 Interaktion zwischen NtACY Δ PWW bzw. NtACY Δ VWW und Aquaporine.....	180
4.5.4 Überexpression der Vollängenaminoacylase aus <i>Nicotiana tabacum</i> als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in <i>E. coli</i>	181
4.5.4.1 Klonierung und Expression der Vollängenaminoacylase aus <i>Nicotiana tabacum</i>	182
4.5.4.1.1 Überexpression des GST-Aminoacylase-Fusionsproteins.....	182
4.5.4.1.2 Funktionsanalyse der Aminoacylase aus <i>Nicotiana tabacum</i> in vitro.....	185
4.5.5 Transiente Expression der Aminoacylase in <i>Nicotiana benthamiana</i>	187
4.5.5.1 Klonierung und Expression der Vollängenaminoacylase aus <i>Nicotiana tabacum</i>	187
4.5.5.2 Infiltrationsexperimente von <i>Nicotiana benthamiana</i> mittels Agrobakterien.....	187
4.5.5.3 Funktionsanalyse der Aminoacylase aus <i>Nicotiana tabacum</i> in vivo.....	191
4.5.5.4 Bestimmung der Cyanamidhydratase-Aktivität.....	192
4.5.5.5 Untersuchungen möglicher Auswirkungen der Aminoacylase auf Aquaporine.....	193
5 Diskussion.....	195
5.1 Identifizierung von Aquaporinen und ihre Bedeutung bzw. Funktion für den PCD in Pflanzen.....	195
5.1.1 Untersuchungen und Charakterisierung BHRF1-transgener Pflanzen.....	195
5.1.2 Analyse der Funktion und Interaktion von Aquaporinen.....	196
5.1.2.1 Sequenzanalyse der Aquaporinkonstrukte.....	196
5.1.2.2 Lokalisation und Expression der Aquaporin-GFP-Fusionsproteine in transgenen Hefen.....	200
5.1.2.3 Einfluss und Detektion von H ₂ O ₂ auf Aquaporin exprimierende Hefen.....	202
5.1.2.4 Einfluss der Überexpression von Aquaporinen in Pflanzen.....	206
5.1.2.4.1 Lokalisation und transiente Expression von Fusionsproteinen in Pflanzen.....	206
5.1.2.4.2 Auswirkungen der transienten Expression von Aquaporin-Fusionsproteinen auf Pflanzen.....	208
5.1.2.5 Analyse der Interaktion und Bestimmung der Bindungsdomänen im Split Ubiquitin System.....	210
5.1.2.5.1 Analyse der Interaktion von BHRF1 mit pflanzlichen und tierischen Aquaporinen.....	210
5.1.2.5.2 Bestimmung der Bindungsdomäne von Aquaporinen bei der Interaktion mit BHRF1.....	212
5.1.2.5.3 Charakterisierung der Bindungsdomäne von BHRF1 für die Interaktion mit Aquaporinen.....	213
5.1.3 Analyse der Interaktion und Funktion einer Aminoacylase.....	215

5.1.3.1 Interaktion der Aminoacylase mit Aquaporinen im Split Ubiquitin System.....	215
5.1.3.2 Analyse der Funktion einer Aminoacylase.....	216
5.1.3.3 Charakterisierung der Bindungsdomäne der Aminoacylase für die Interaktion mit Aquaporinen	218
6 Zusammenfassung.....	220
6 Summary.....	221
7 Literaturverzeichnis	223
8 Abkürzungsverzeichnis	242
9 Anhang.....	249
10 Erklärung gemäß §8 Absatz 2 Aufzählungspunkt 2 der Promotionsordnung zum Dr. rer. nat. der Universität Hohenheim	254
11 Tagungsbeiträge und Publikationen	255
12 Danksagung.....	256

1 Einleitung

Wasser ist für alle lebenden Organismen von zentraler Bedeutung. Als grundlegende Voraussetzung für das Leben spielt der Transport von Wasser durch die Zellmembranen eine entscheidende Rolle für die Funktion der Zellen.

Da die meisten Lebewesen zu 90 % aus Wasser bestehen, ist nicht nur die Aufrechterhaltung des Wasserhaushalts wichtig. Wasser dient auch als Lösungs- und Transportmittel für gelöste Ionen und Salze, die auf diese Weise durch die Membranen geschleust werden und somit den gesamten Organismus versorgen.

Um den Wasserhaushalt und -transport aufrecht zu erhalten und zu regeln, stehen dem Organismus verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung.

Passive Vorgänge wie z. B. Diffusion und Osmose bestimmter Stoffe durch die semipermeable Membran der Zellen sind für einige physiologische Prozesse oft zu langsam. Für einen schnellen Wassertransport von Zelle zu Zelle sorgen deshalb Kanalproteine in der Membran. Sie verleihen den Zellen eine hohe Wasserleitfähigkeit.

1.1 Aquaporine

Die Existenz von „Membranpartikeln“, in tierischen und ähnlichen Membranen, die den Durchfluss von Wasser zulassen, wurde schon 1877 von Pfeffer verkündet. Um die außergewöhnlich hohe Wasserleitfähigkeit von roten Blutkörperchen in Säugern zu erklären, postulierten Paganelli und Solomon 1957, das in der Membran „Wasserkanäle“ verankert sind. Heute werden diese kleinen, integralen Transmembranproteine (Chaumont et al., 2004) als Aquaporine bezeichnet, die einen passiven Transport von kleinen Molekülen durch die Membranen ermöglichen. Sie sind hauptsächlich in der Plasmamembran von Zellen und der Vakuolenmembran (Tonoplast) vieler Organismen vertreten (Johansson et al., 1998), können aber auch in anderen intrazellulären Membranen vorkommen (Liu et al., 2003). Als erstes Aquaporin wurde AQP1 (CHIP28, ein 28 kDa „channel-forming intrinsic protein“; Preston und Agre, 1992) in menschlichen Erythrozyten identifiziert. Durch die Expression in *Xenopus laevis* Oozyten konnte eine hohe Wasserpermeabilität beobachtet werden.

Aquaporine sind ubiquitär, d. h. sie sind in allen Organismen von Bakterien über Pilze und Pflanzen bis hin zu Tieren und Menschen vertreten.

Bakterien besitzen meist nur ein Aquaporin, welches beim Zellwachstum und der Osmoregulation mitwirkt (Calamita, 2000). Während bei Menschen und Tieren die Aquaporine für den Wassertransport in der Niere, den Erythrozyten, dem Gehirn und der Augenlinse verantwortlich sind (Preston und Agre, 1992), liegt die Funktion von pflanzlichen Aquaporinen in der Wasseraufnahme durch die Wurzeln und die Weiterleitung in die restliche Pflanze, der Bildung von Samen und deren Keimung sowie Verhinderung der

Austrocknung, der Erhaltung des Zellurgors, der Verhinderung der Selbstbestäubung sowie der Transpiration und Regelung der Schließzellen (Sansom und Law, 2001; Johansson et al., 2000).

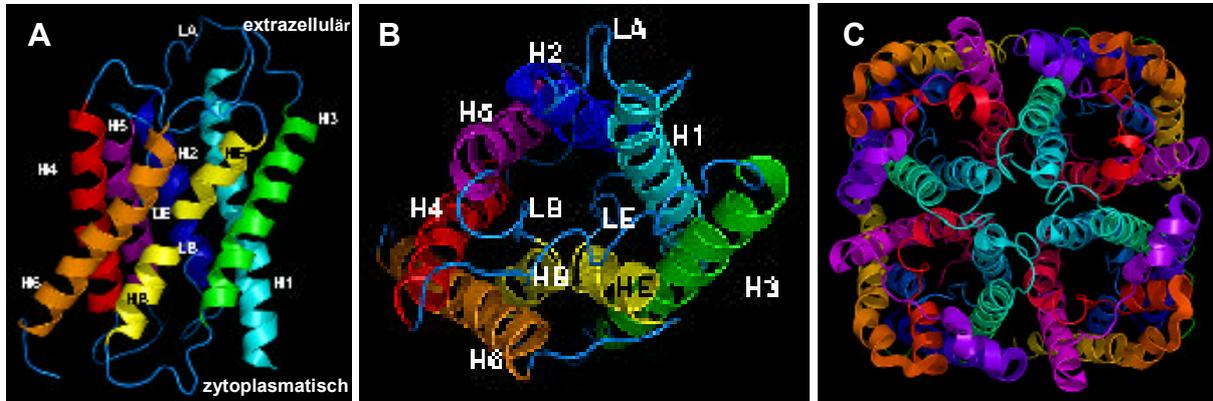


Abb. 1.1-1: Bändermodell von AQP1 (aus *Biochemistry and Molecular Biophysics*, The University of Arizona, „Aqauporin-1: the original water channel“, Sarah Nelson, 2007)

(A) Seitenansicht eines Aquaporin 1 Monomers mit den sechs transmembranen α -Helices H1 bis H6 sowie den Schleifen „loop“ A (LA) bis „loop“ E (LE). (B) Ansicht der extrazellulären Seite eines Aquaporin 1 Monomers. Die Wasserpore ist in der Mitte des Monomers zu erkennen. (C) Ansicht der extrazellulären Seite eines Aquaporin 1 Tetramers.

Aquaporine gehören zur Familie der „major intrinsic proteins“ (MIPs), die nach MIP26, einem Membranprotein aus Zellen der Rinderlinse benannt sind (Gorin et al., 1984). Sie haben ein Molekulargewicht von 23 bis 34 kDa (Chaumont, 2004). Alle Mitglieder der MIP-Familie bestehen aus sechs transmembranen α -Helices, die durch fünf Schleifen („loops“) miteinander verbunden sind. „Loop“ B und E enthalten die beiden hochkonservierten Asparagin-Prolin-Alanin (NPA)-Motive (Reizer et al., 1993; Chrispeels und Agre, 1994; Park und Saier, 1996), die beinahe in allen MIPs vertreten sind. Diese NPA-Motive bilden die eigentliche Pore und versorgen den gesamten Organismus mit Wasser und anderen kleinen Molekülen. Während „loop“ B die zweite und dritte Transmembrandomäne (TM) verbindet, ist „loop“ E zwischen der fünften und sechsten lokalisiert. Durch diese Anordnung entsteht ein „tandem-repeat“ aus je zwei Transmembrandomänen, einer Schleife und noch einer Transmembrandomäne (TM1, TM2, „loop“ B, TM3 und TM4, TM5, „loop“ E, TM6). Die beiden Proteinhälften sind um 180° zu einander gedreht und bilden das sogenannte „hourglass model“ (Preston und Agre, 1992), wodurch ein bidirektionaler Transport (Preston und Agre, 1992) von Wasser und anderen kleinen Molekülen ermöglicht wird. Es wird vermutet, dass Aquaporine vor der Diversifikation dieser Familie durch Intraduplikation eines Urgens entstanden sind (Reizer et al., 1993; Chrispeels und Agre, 1994). Vier dieser asymmetrischen Untereinheiten (UE) bilden ein Tetramer mit einer zentralen Senkung, der

Pore. Diese können unabhängig voneinander Moleküle transportieren. N- und C-Termini aller Mitglieder der MIP-Familie sind auf der zytoplasmatischen Seite der Zelle lokalisiert.

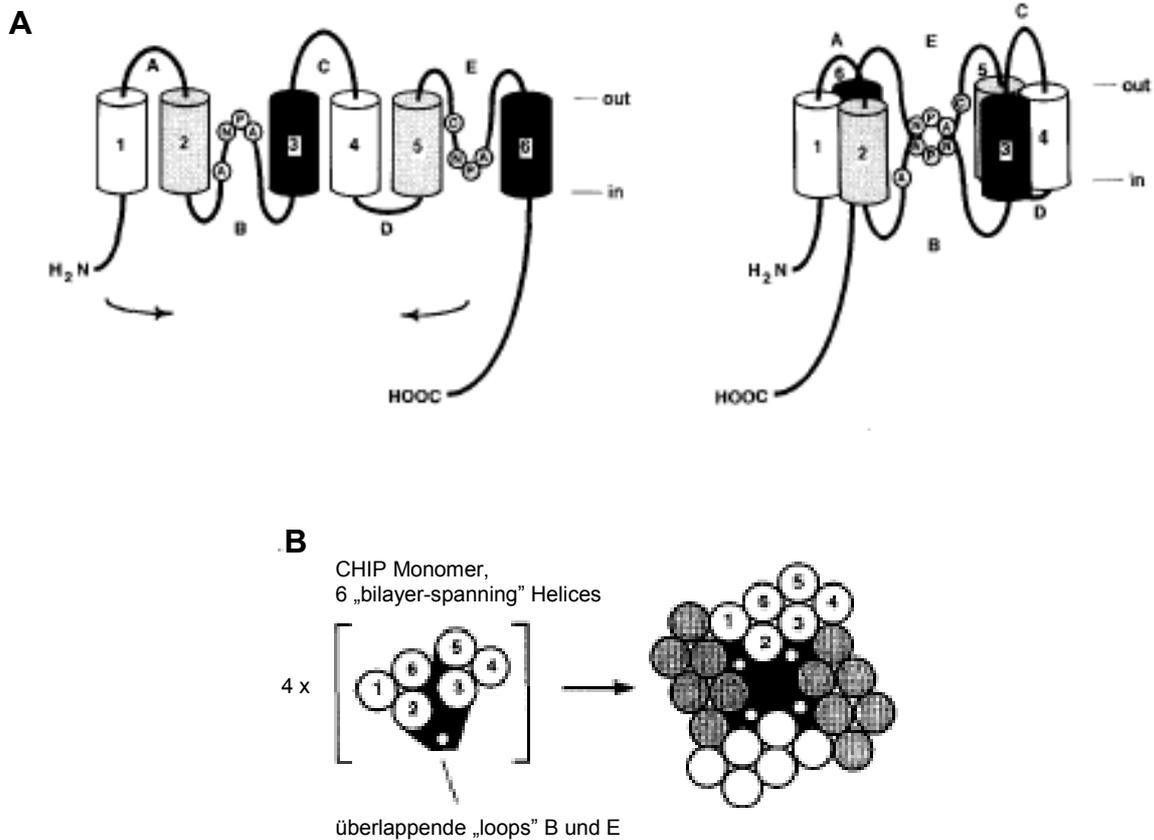


Abb. 1.1-2: „Hourglass“ Modell der Aquaporine (aus The Journal of Biological Chemistry, „Molecular structure of the water channel through Aquaporin CHIP“, Peter Agre, 1994)

(A) Dargestellt ist die Struktur von Aquaporinen, die aus sechs transmembranen α -Helices (1 bis 6) und fünf Schleifen (A bis E) besteht. Die porenbildenden Schleifen B und E enthalten je eins der NPA-Motive. (B) Vier asymmetrische Untereinheiten bilden ein Tetramer mit einer zentralgelegenen Senkung, die vier Wasserporen beinhaltet.

Die pflanzlichen Proteine der MIP-Familie werden aufgrund ihrer Sequenzhomologie in vier Unterfamilien eingeteilt: PIPs („plasma membrane intrinsic proteins“), TIPs („tonoplast intrinsic proteins“), NIPs („Nodulin26-like intrinsic membrane proteins“) und SIPs („small and basic intrinsic proteins“) (Chaumont et al., 2001; Johanson und Gustavsson, 2002; Johanson et al., 2001).

Während PIPs und TIPs hauptsächlich nach ihrer subzellulären Lokalisation, die auch davon abweichen kann, eingeteilt sind, haben Proteine der NIP-Unterfamilie gewisse Ähnlichkeit zu Nodulin26-like aquaporin NOD26. NOD26 ist ein Gen, welches Nodulin exprimiert. Dieses abundant vorkommende Aquaporin befindet sich in den peribakteroiden Membranumgebenden Knötchen von Sojabohnenwurzeln, die der Symbiose mit N_2 -fixierenden

Bakterien dienen (Fortin et al., 1987; Wallace et al., 2006). NIPs sind in der Plasmamembran von Zellen und anderen intrazellulären Membranen vertreten (Ma et al., 2006; Mizutani et al., 2006; Takano et al., 2006). Die Unterfamilie der SIPs bildet die kleinste Gruppe mit nur 2 bis 3 Proteinen, die vor allem im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind (Ishikawa et al., 2005).

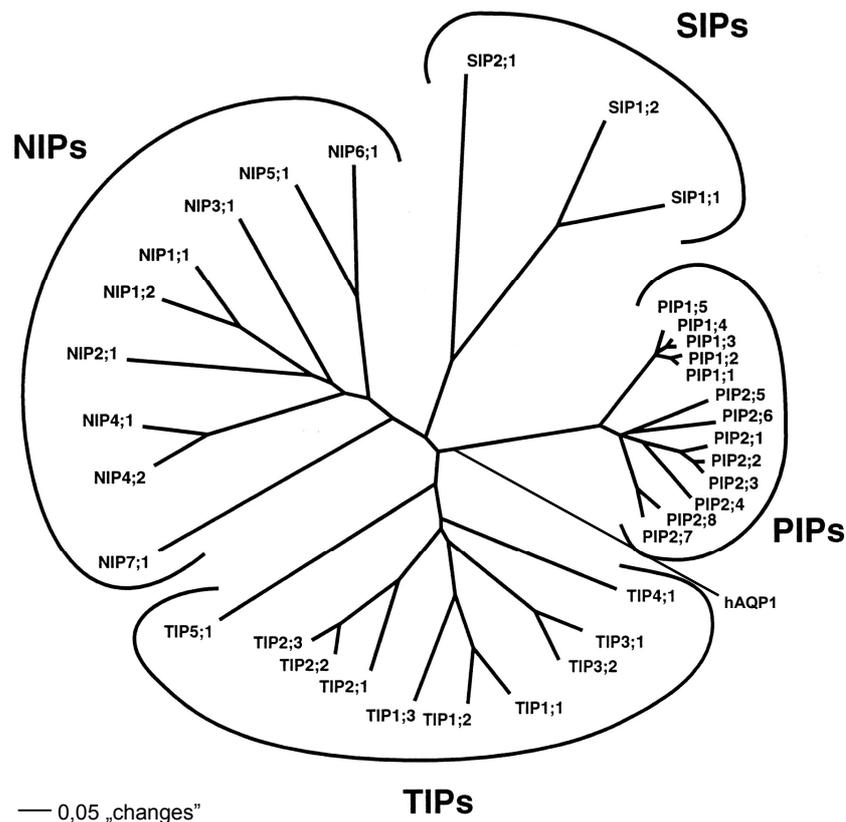


Abb. 1.1-3: Phylogenetische Gegenüberstellung der 35 unterschiedlichen MIPs aus *Arabidopsis thaliana* (aus Plant Physiology, „The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants“, Johanson et al., 2001)

MIPs werden in Pflanzen in vier Unterfamilien eingeteilt: PIPs, TIPs, NIPs und SIPs. Die erste und letzte Zahl der Proteinbezeichnung kennzeichnen die Nummer der Gruppe und die Reihenfolge in der sie entdeckt wurden. Die Maßeinheit gibt den Unterschied von 0,05 Aminosäuren innerhalb der Sequenz an. Das hAQP1 wurde nach Quigley et al. (2001) eingezeichnet.

Weiterhin können MIPs aufgrund ihrer Transporteigenschaften in zwei funktionale Gruppen eingeteilt werden. Während die meisten getesteten MIPs in Pflanzen als Wasserkanäle fungieren (Johansen et al., 2000; Santoni et al., 2000), gibt es einige Beispiele von MIPs, die für weitere Moleküle permeabel sind. Dabei werden MIPs, die ausschließlich Wasser transportieren als orthodoxe Aquaporine bezeichnet und solche, die auch noch für andere Moleküle durchlässig sind als Aquaglyceroporine (GLPs). Diese können kleine ungeladene teilweise polare Stoffe wie Glycerin, Harnstoff (Heymann und Engel, 1999; Zardoya, 2005;

Hara-Chikuma und Verkman, 2006), CO_2 , Polyole, Purine, Pyrimidine, NH_3 , NH_4^+ (Holm et al., 2005) und dreiwertige anorganische Formen von Arsen und Antimon (Fu et al., 2000; Liu et al., 2003; Uehlein et al., 2003; Tsukaguchi et al., 1998; Jahn et al., 2004; Loqué et al., 2005; Meng et al., 2004) transportieren.

Ausschlaggebend für den Transport durch Aquaporine sind Größe und elektrochemische Eigenschaften der Moleküle (Bienert et al., 2006) sowie zwei „constriction regions“ innerhalb der Pore, die als wichtige Selektionsfilter gelten. Eine dieser Regionen stellt das NPA-Motiv dar. Wassermoleküle wandern in Form einer, durch H-Brückenbindungen miteinander verbundenen, Kette durch den Aquaporinkanal und werden am Asparagin der NPA-Region umorientiert (Tajkhorshid et al., 2002) und auf diese Weise weiter durch die Pore geschleust.

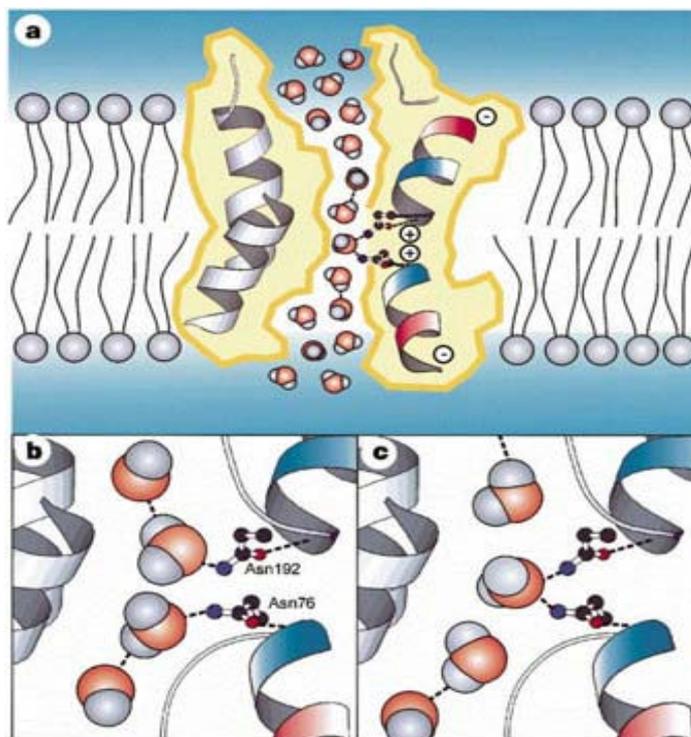


Abb. 1.1-4: Darstellung des Wassertransports durch hAQP1 (aus Nature, „Structural determinants of water permeation through aquaporin-1“, Murata et al., 2000)

(a bis c) Darstellung der Wasserstoffbindungen zwischen einem Wassermolekül und der Asparaginreste (Asn) der NPA-Motive.

Der zweite Selektionsfilter besteht aus vier Aminosäuren, darunter aromatische Aminosäuren (ar) und ein Argininrest (R). Diese ar/R „constriction region“ befindet sich an der extrazytoplasmatischen Öffnung der Pore. Aufgrund der sterischen Eigenschaft und des Argininrestes dient dieser Bereich der elektrostatischen Abstoßung von Protonen (Fujiyoshi et al., 2002).

1.2 Programmierter Zelltod

Programmierter Zelltod (PCD) ist ein wichtiger Prozess in der Entwicklung und Pathogenabwehr von Pflanzen und Tieren. Dieser aktive genetisch regulierte Prozess läuft während der Entwicklung ab um kranke oder nicht mehr benötigte Zellen sauber aus einem Gewebe zu entfernen ohne dabei die Nachbarzellen zu schädigen (Ellis et al., 1991). Die Differenzierung der menschlichen Finger und Zehen in einem sich entwickelnden Embryo ist ein Beispiel für PCD. Ebenso wie die ständige Erneuerung von Haut- (Nataraj et al., 1994) und Blutzellen oder die Bildung des Xylems in Pflanzen (Fukuda, 1996; Groover et al., 1997). Der Begriff „Apoptose“ wurde 1972 von Kerr und seinen Mitarbeitern eingeführt um solche natürlich vorkommenden Zelltodereignisse während der Entwicklung von der Nekrose zu unterscheiden. Die aus dem Griechischen stammende Bezeichnung „Apoptose“ (apo = von; ptosis = fallen) bedeutet „von etwas abfallen“. Dabei waren eigentlich Blätter, die im Herbst von einem Baum fallen, gemeint (Stephan et al., 2000).

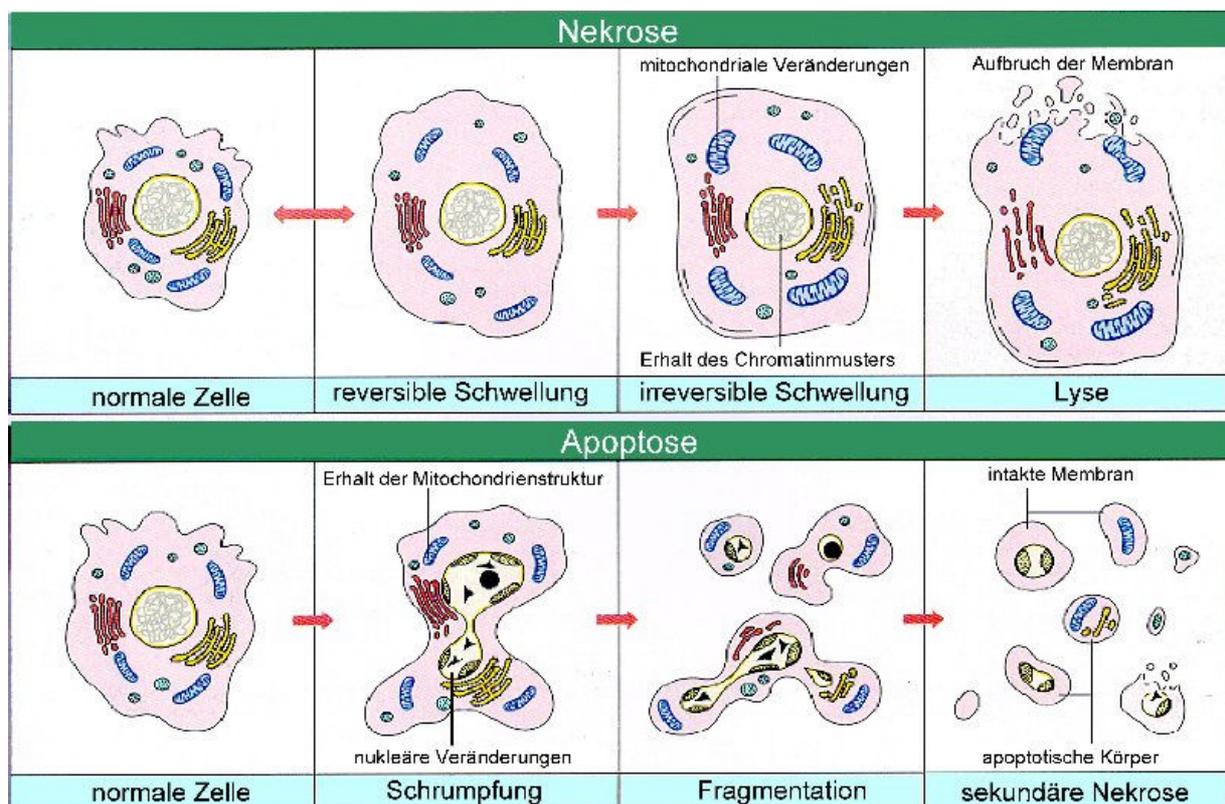


Abb. 1.1-5: Morphologische Merkmale des nekrotischen und apoptotischen Zelltods (aus Boehringer Mannheim Apoptosis Guide; Trauth und Keeseey, 1995)

Während die Apoptose ein körpereigener Abwehrmechanismus ist um den Organismus selbst zu schützen (Kerr et al., 1995), zeichnet sich die Nekrose dagegen in schweren Verletzungen des Gewebes durch physikalische oder chemische Effekte, wie Verbrennung, Vergiftung oder mechanische Beschädigung aus und stellt keine Gen-abhängige Form von

Zelltod dar. Weiterhin unterscheiden sich nekrotische und apoptotische Zellen auch morphologisch voneinander. Durch die Schädigung der Plasmamembran nekrotischer Zellen strömt Wasser in die Zellen ein (Duvall und Wyllie, 1986). Es kommt zu einem irreversiblen Anschwellen was letztendlich zum Platzen der Zellen führt (Duvall und Wyllie, 1986). Durch die Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile wird meist eine Entzündungsreaktion ausgelöst (Savill, 1997). Zu den Kennzeichen der Apoptose dagegen gehören das Schrumpfen von Zelle und Zellkern, die Bläschenbildung der Plasmamembran an der Zelloberfläche („membrane blebbing“), Kondensation des Chromatins im Zellkern sowie die Degeneration und Fragmentierung der DNA (Earnshaw, 1995; Martins und Earnshaw, 1997). Dabei entstehen 180-200 bp kleine Zellbruchstücke, sogenannte „apoptotic bodies“, die von einer Membran umhüllt sind und entweder von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert werden können (White, 1996; Vaux und Strasser, 1996). Anders als bei der Nekrose wird so eine Entzündungsreaktion vermieden. Erfolgt keine Entfernung der „apoptotic bodies“ durch Phagozyten kommt es zu einer sekundären Nekrose (Leist et al., 1995; Leist und Nicotera, 1997).

Zusätzlich reguliert die Apoptose zusammen mit der Proliferation die Anzahl der Zellen in einem Gewebe. Eine entscheidende Rolle spielen dabei pro- und anti-apoptotische Proteine, da zu viele neugebildete Zellen und zu wenig sterbende Zellen zu Krebs führen können.

In *C. elegans* wurde 1983 die erste ced-Mutante (ced = „cell death abnormal“) entdeckt und zwei Jahre später das erste Protein (Bcl-2) (Tsujiimoto et al., 1985), welches für die Apoptose wichtig ist (Vaux et al., 1988). Seitdem wird zunehmend mehr Forschung auf diesem Gebiet betrieben, wodurch auch entdeckt wurde, dass das ced-Gen durch das homologe *bcl-2* Gen des Menschen in *Caenorhabditis elegans* ersetzt werden kann und zur Verhinderung von Zelltod während der Entwicklung führt. Weitere Untersuchungen an diesem Nematoden, der Fruchtfliege *Drosophila* sowie der Maus führten zu der Schlussfolgerung, dass die Apoptose bei *C. elegans* auf Säuger übertragbar und der molekulare Mechanismus der Apoptose in der Evolution in allen Metazoen konserviert ist (Renehan et al., 2001).

1.2.1 Apoptose in Säugern

Im Prinzip kann jede Zelle eines mehrzelligen Organismus Selbstmord (Apoptose) begehen, da gesunde Zellen hierfür ständig Proteine produzieren. Die Entscheidung, ob eine Zelle sterben soll oder nicht, hängt von vielen Komponenten innerhalb und außerhalb der Zelle ab, die in einem komplexen Prozess rund um die Apoptose involviert sind.

Bisher wurden zwei Apoptose-auslösende Signalwege relativ gut beschrieben. Der extrinsische Signalweg beginnt damit, dass ein Signal (Ligand, z. B. FasL, TNF oder CD95L), welches von einer anderen Zelle sezerniert wurde, an sogenannte Todes-Rezeptoren (z. B. Fas, TNFR1 oder CD95) auf der Zelloberfläche bindet. Diese lagern sich

zu Trimeren zusammen und lösen einen Zelltod-induzierenden Signalweg aus. Dadurch werden auf der zytoplasmatischen Seite Adaptormoleküle wie z. B. FADD („Fas-associated death domain protein“; Dixit et al., 1995; Boldin et al., 1995) oder CRADD (Caspase und RIP-Adaptor mit „death domain“; Ahmad et al., 1997; Duan und Dixit, 1997) rekrutiert und binden ihrerseits an Caspasen. Caspasen sind Proteasen, die alle ein Cystein im aktiven Zentrum besitzen und andere Proteine nach einer Asparaginsäure spalten, weshalb sie Caspasen genannt werden. Durch diese Autoaktivierung der Caspasen, die wiederum andere Caspasen aktivieren, wird eine Caspasen-Kaskade in Gang gesetzt. Die Aktivierung von Effektor-Caspasen führt schließlich zur Zerlegung von Zellbestandteilen und zum Tod der Zelle (Apoptose).

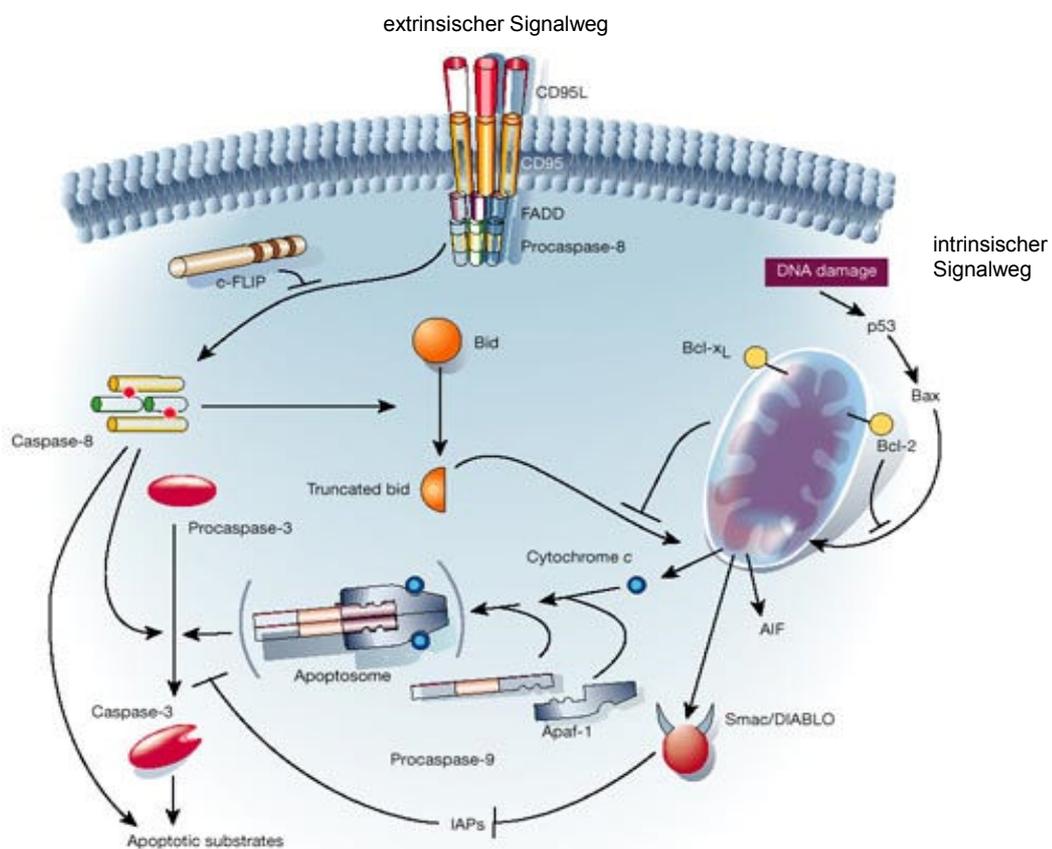


Abb. 1.1-6: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs in Säugern (aus Nature, „The biochemistry of apoptosis“, Hengartner, 2000)

Der extrinsische Signalweg führt über einen Ligand-gebundenen Todesrezeptorkomplex zur Aktivierung von Caspasen, wodurch eine Caspasen-Kaskade in Gang gesetzt wird. Beim intrinsischen Signalweg kommt es durch DNA-Schäden zur Aktivierung von Bcl-2 Proteinen, die die Freilassung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma veranlassen. Durch die Bildung des Apoptosoms (Cytochrom c, Apaf-1 und Procaspase 9) werden weitere Caspasen aktiviert, die ebenfalls eine Caspasen-Kaskade auslösen. Beide Signalwege führen zum Tod der Zelle (Apoptose).

Der intrinsische Signalweg dagegen wird z. B. durch die Schädigung der DNA durch UV- oder γ -Strahlung ausgelöst. Hierbei regulieren pro- und anti-apoptische Proteine der Bcl-2

Familie die Freilassung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Die Bcl-2 Proteine liegen im Zytoplasma als Homo- und Heterodimere vor (Reed, 1997; Antonsson und Martinou, 2000), die durch zuvor genannte Apoptosestimuli gespalten und aktiviert werden. Sie lagern sich in die äußere Mitochondrienmembran ein und veranlassen die Freilassung von Cytochrom c ins Zytoplasma. Die Elektronentransportkette wird inaktiviert und es entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS; Blackstone und Green, 1999). Freigesetztes Cytochrom c verbindet sich mit Apaf-1 („apoptotic protease-activating factor-1“) und Procaspase 9. Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet und setzt ebenfalls eine Caspasen-Kaskade in Gang wodurch es zur Apoptose kommt. Beide Signalwege sind miteinander verbunden (Green, 1998; Adrain und Martin, 2001; Kaufmann und Hengartner, 2001).

Eine Fehlregulierung von Todes- und Überlebenssignalen verursacht beim Menschen viele Krankheiten (Thompson, 1995) wie z. B. Autoimmunkrankheiten, Krebs, Alzheimer, Parkinson (Thompson, 1995; Strasser et al., 1997), Diabetes oder Multiple Sklerose.

1.2.2 Proteine der Bcl-2 Familie

Die Familie der Bcl-2 Proteine besteht aus 20 kleinen Proteinen (Renehan et al., 2001), die ein Molekulargewicht zwischen 20 und 25 kDa haben. Bcl-2, nach dem die Familie benannt ist, wurde 1988 als erstes Protein, das für die Apoptose wichtig ist, identifiziert (Vaux et al., 1988). Es ist an der Bildung von B-Zell Lymphomen in Säugern beteiligt (Vaux et al., 1988) und führt in Bcl-2 transfizierten B-Zellen zur Resistenz gegen Apoptose, die normalerweise durch den Rückgang von Interleukin-3 (IL-3) in B-Zellen induziert wird. Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass nicht nur die Fähigkeit das Wachstum zu umgehen, sondern auch Apoptose zu verhindern für die Tumorbildung von Bedeutung ist.

Man unterscheidet zwischen anti-apoptotischen Proteinen wie z. B. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, Ced-9 und BHRF1, die Apoptose inhibieren und pro-apoptotischen Proteinen (Bad, Bak, Bax, Bid und Bik), die Apoptose fördern (Gajewski und Thompson, 1996; Reed et al., 1997; Gross et al., 1999).

Bcl-2 Proteine besitzen die für diese Familie charakteristischen hochkonservierten Aminosäuresequenzen, die sogenannten Bcl-2 Homologiedomänen (BH1-BH4; Adams und Cory, 1998) und werden aufgrund dessen in drei Unterfamilien eingeteilt. Zur Bcl-2 Unterfamilie gehören die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 und BHRF1. Diese Proteine weisen Homologien in BH1 bis BH4 auf. Bax, Bak und Bok sind Vertreter der Bax-Unterfamilie, wirken pro-apoptotisch und teilen nur in BH1 bis BH3 Homologien. Proteine wie Bad, Bid, Bik, Blk, Hrk und BimL, die ausschließlich die BH3-Domäne besitzen, sind in die BH3-only Unterfamilie eingestuft und fördern Apoptose.

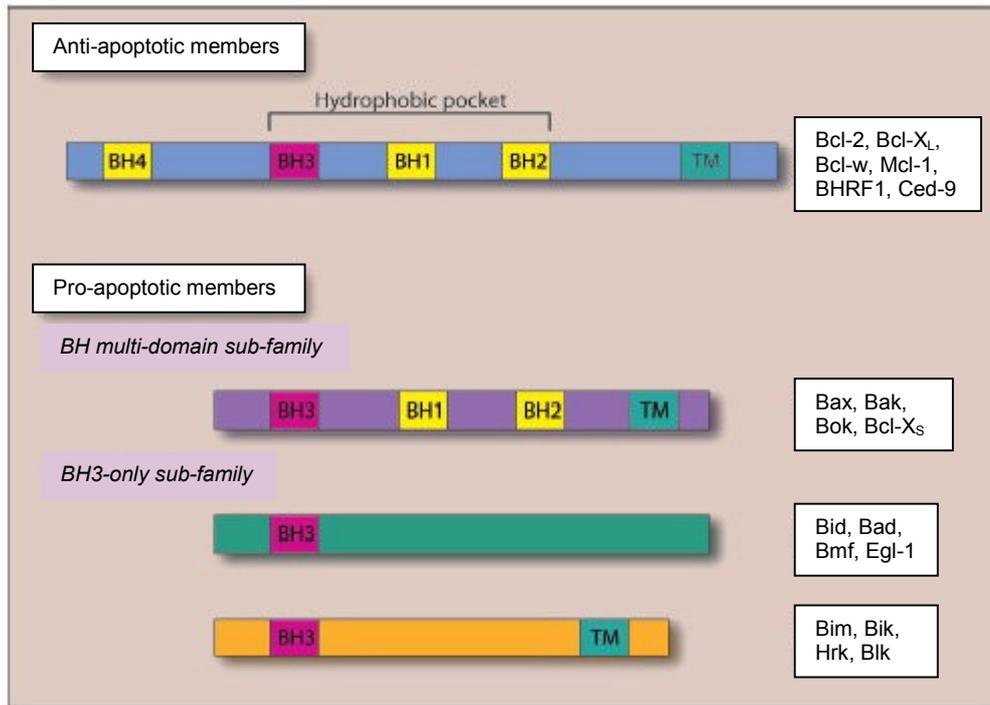


Abb. 1.1-7: Auflistung der anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie (teilweise aus Biochemistry, „Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying“, Bras et al., 2005)

Während die BH3-Domäne Zelltod induziert (Flemington et al., 1995; Hunter und Parslow, 1996) und außerdem für die Homo- und Heterodimerisierung, die für die Aktivierung bzw. Reprimierung notwendig ist, sorgt (Oltvai et al., 1993; Reed et al., 1996), sind BH1 und BH2 eher für die anti-apoptotische Wirkung der Proteine verantwortlich. Einige der Bcl-2 Proteine besitzen einen hydrophoben C-Terminus mit dem sie sich z. B. in der äußeren Mitochondrienmembran, der Kernhülle oder in Teilen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankern können (Krajewski et al., 1993; Lithgow et al., 1994) um Poren oder Ionenkanäle zu bilden (Reed et al., 1993; Thompson, 1995), wodurch möglicherweise die Ionenpermeabilität zustande kommt.

1.2.3 BHRF1, ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie

BHRF1 („*Bam*HI fragment H rightward open reading frame no. 1“) ist ein anti-apoptotisch wirkendes Mitglied der Bcl-2 Familie. Es wurde im Epstein-Barr Virus, einem lymphotropen γ -Herpesvirus gefunden und besitzt ein Molekulargewicht von 17 kDa. BHRF1 und das ebenfalls anti-apoptotische Bcl-2 des Menschen teilen eine 38 % Sequenzhomologie, die den hochkonservierten BH1-, BH2- und BH3-Domänen entspricht, die für Proteine der Bcl-2 Familie charakteristisch sind (Adams und Cory, 1998). Diese Homologie macht es nicht verwunderlich, dass BHRF1 ebenso wie Bcl-2 eine schützende Wirkung gegen Apoptose

besitzt, die sich in Bezug auf die Abhängigkeit von Zelltyp und Apoptosestimuli ähnelt (Foghsgaard und Jäättelä, 1997).

Ähnlich wie Bcl-2, enthält die Sequenz von BHRF1 eine Reihe hydrophober Aminosäuren am C-Terminus, der für die Lokalisation zu intrazellulären Membranen in transfizierten Zellen verantwortlich ist (Huang et al., 2003). Trotz der Ähnlichkeit in der Struktur zu anderen Bcl-2 Mitgliedern weist BHRF1 keine deutlich erkennbare hydrophobe Furche auf, die für die Bindung mit pro-apoptotischen Proteinen wie Bak, Bad, Bik und Bax notwendig ist (Huang et al., 2003).

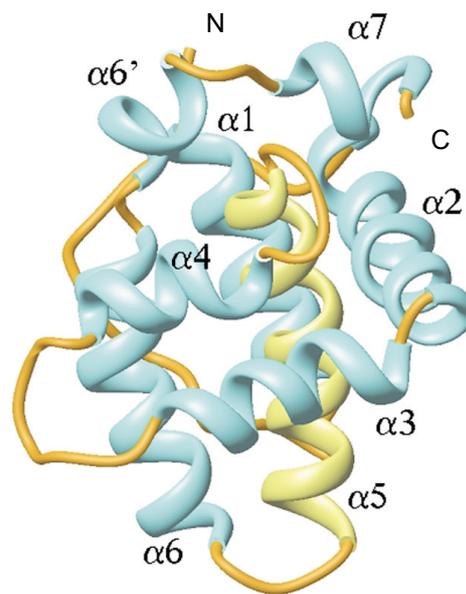


Abb. 1.1-8: Struktur von BHRF1 (aus Journal of Molecular Biology, „Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr Virus, a homolog of human Bcl-2“, Huang et al., 2003)

Die zentrale hydrophobe α -Helix 5 ist gelb markiert.

Die Arbeit mit transgenen Pflanzen wirft allerdings den Gedanken auf, dass BHRF1 in Pflanzen eine pro-apoptotische Wirkung besitzen könnte (Roth, 1999; Mast, 2000). Da Pflanzen, die BHRF1 exprimieren starke spontan auftretende Nekrosen ausbilden, die ebenfalls durch verschiedene Stressreize ausgelöst werden können. Durch die Interaktion von BHRF1 mit einer Tabak cDNA-Bank konnten mehrere Aquaporine identifiziert werden.

1.2.4 Pathogenabwehr und Zelltod in Pflanzen

Lebewesen wie Pflanzen und Tiere sind im Laufe ihres Lebens einer Vielzahl von Pathogenen wie Viren, Bakterien und Pilzen ausgesetzt. Um sich davor zu schützen, haben Tiere im Laufe der Evolution ein Immunsystem entwickelt. Durch die Bildung von T-Zellen, die Pathogene erkennen und eliminieren, wird so das Eindringen in den gesamten Organismus verhindert.

Pflanzen besitzen kein Immunsystem, können sich aber dennoch vor schädlichen Eindringlingen schützen. Die Hypersensitive Reaktion (HR) sowie die systemisch erworbene Resistenz („systemic acquired resistance“ SAR) verhindern eine Ausbreitung des Pathogens innerhalb der Pflanze. Durch gezieltes Töten von infizierten Pflanzenzellen wird eine systemische Ausbreitung des Pathogens auf benachbarte Zellen bzw. innerhalb des gesamten Organismus unterbunden.

Pflanzen besitzen sogenannte *R*-Gene (Resistenzgene), die als Rezeptoren für die vom Pathogen stammenden Elicitoren oder Avirulenzgene (*Avr*-Gene) dienen. Diese Elicitoren können aber auch von der Pflanze selbst aufgrund der Infektion produziert werden. Dabei können Proteine, Peptide, Glykoproteine, Lipide oder Oligosaccharide als Elicitoren fungieren (Nürnberger, 1999). Infolge der Interaktion von *R*-Genen und Elicitoren, also der Erkennung des Pathogens durch die Pflanze, wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Bildung einer HR an der Infektionsstelle führt. Diesem Mechanismus liegt das Rezeptor-Elicitor-Modell (Keen, 1990) zugrunde, das auf der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1942) basiert.

Die Produktion und Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Auflagerung von Callose, die Verstärkung der Zellwand und die Synthese und Akkumulation von PR-Proteinen („pathogen-related proteins“) (Hammond-Kosack und Jones, 1996) führt zum lokalen Absterben der infizierten Pflanzenzellen. Diese Abwehrmechanismen laufen innerhalb von Minuten bis Tage nach der Infektion ab. Als letzter Schritt der Verteidigung setzt die Nekrose ungefähr 8 bis 12 Stunden nach dem ersten Kontakt mit dem Pathogen ein und schafft eine räumliche Barriere zwischen Wirt und Pathogen.

Die Aktivierung der *PR*-Gene führt zur Ausbildung der SAR. Hierbei entwickelt die Pflanze eine unspezifische Resistenz gegen ein breites Spektrum phytopathogener Viren, Bakterien und Pilzen in entfernt, nicht infizierten Teilen der Pflanze (Ryals et al., 1996). Dieser Abwehrmechanismus wird in Tabakpflanzen gegenüber dem Tabakmosaikvirus (TMV) durch Salicylsäure (SA) ausgelöst. Neben SA sind an der Induktion und Koordination dieser systemisch erworbenen Resistenz noch Methyljasmonat, Ethylen und ROS beteiligt.

Mehrere Untersuchungen haben ergeben, dass es sich bei der Hypersensitiven Reaktion in Pflanzen und der Apoptose in Tieren um Prozesse des Programmierten Zelltods (PCD) handelt, da beide Ereignisse morphologische und biochemische Ähnlichkeiten aufweisen (Greenberg, 1996; Levine et al., 1996; Wang et al., 1996). Die Frage ob beide Mechanismen miteinander verwandt sind, ist dennoch unklar. In beiden Formen des PCD gibt es gemeinsame Komponenten, die zu ähnlichen zellulären Ereignissen führen (Lam und del Pozo, 1998) wie z. B. dem Schrumpfen des Zytoplasmas, der Kondensation des Zellkerns, dem sogenannten „membrane blebbing“ (Earnshaw, 1995; Martins und Earnshaw, 1997), der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Danon et al., 2000; Balk und

Leaver, 2001; Lam et al., 2001; Hoeberichts und Woltering, 2003), dem Einstrom von Calcium in die Zelle, der Freisetzung von Phosphatidylserin, der Aktivierung von spezifischen Proteasen sowie der DNA-Fragmentierung (McConkey und Orrenius, 1994; Stewart, 1994; Wang et al., 1996; O'Brien et al., 1998). Allerdings konnte bis jetzt die Existenz von *Bcl-2* homologen Genen in Pflanzen, trotz der vollständigen Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms, nicht gezeigt werden. Dennoch kann eine transgene Expression solcher Gene in Pflanzen Einfluss auf den PCD nehmen (Lacomme und Cruz, 1999; Mitsuhara et al., 1999). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein *Bax-Inhibitor 1* homologes Gen als Antwort auf Verletzung und Pathogenbefall in Pflanzen vermehrt produziert wird (Sanchez et al., 2000). Auch die Existenz einer Metacaspase-Familie, die mit Caspase-ähnlichen Proteinen entfernt verwandt ist, wurde in *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Uren et al., 2000). Chichkova und Mitarbeiter (2004) konnten zeigen, dass Caspasen in Pflanzen existieren und ähnliche Eigenschaften wie tierische Caspasen an den Tag legen, sich aber möglicherweise in ihrer Struktur (Chichkova et al., 2004) oder Substratspezifität (Vercammen et al., 2004) von den tierischen unterscheiden.

Nicht nur bei der Pathogenabwehr sondern auch bei der Entwicklung einer Pflanze spielt programmierter Zelltod eine wichtige Rolle. Die Differenzierung der Xylem-Leitbündel (Xylogenesen) stellt so einen Fall dar (Greenberg, 1996). Durch eine hohe H_2O_2 -Konzentration werden Abläufe in Gang gesetzt, die zur Verholzung (Lignifizierung) und Bildung einer sekundären Zellwand sowie PCD in den sich differenzierenden Xylemzellen führen (Fukuda, 1996). Ein weiteres Beispiel ist die Bildung von Seitenwurzeln. Auch hier sterben Zellen im differenzierten Gewebe um das Durchdringen der Seitenwurzeln zu ermöglichen (Mergemann und Sauter, 2000; Steffens und Sauter, 2009).

1.2.5 ROS („reactive oxygen species“)

Sauerstoff ist für aerobe Organismen lebensnotwendig. Durch die Aufnahme von Sauerstoff aus der Luft und dessen Reduktion zu Wasser entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Hierzu gehören freie Radikale wie $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , RO_2^{\cdot} , RO^{\cdot} , aber auch stabile molekulare Oxidantien (H_2O_2 , $ROOH$, O_3 , OCI^{\cdot} und O_2). Die Entstehung von ROS als toxisches Nebenprodukt des normalen zellulären Metabolismus findet in allen multizellulären Organismen statt (Thannickal und Fanburg, 2000) und kann durch Schädigung von Lipiden, Proteinen und DNA (Freeman und Crapo, 1982) zum Zelltod führen (Bienert et al., 2006). Um sich davor zu schützen, besitzen Zellen antioxidante Enzyme wie Superoxiddismutasen (reduziert $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2), Katalasen und Glutathionperoxidasen (reduziert H_2O_2 zu H_2O), die die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser katalysieren und so die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies abbauen.

Diese Antioxidantien sorgen dafür, dass überschüssiges ROS abgebaut und die Zelle davor

geschützt wird. Ist allerdings die Menge der produzierten Oxidantien höher, z. B. aufgrund von Verletzungen, UV-Strahlung oder eines Pathogenbefalls, als die verfügbaren Antioxidantien bewältigen können, entsteht oxidativer Stress. Trotzdem sind nicht alle ROS schädlich, sondern stellen wichtige Komponenten der Regulation und Signaltransduktion einer Zelle dar (Finkel, 1998; Rhee, 1999).

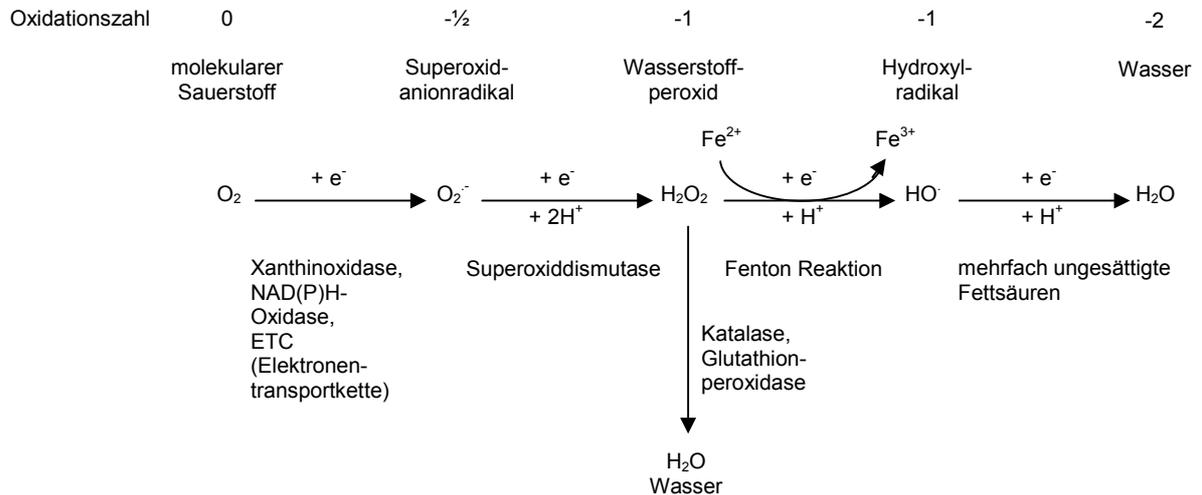


Abb. 1.1-9: Ablauf der Reduktion von Sauerstoff (O₂) zu Wasser (H₂O) (teilweise aus Biochimica et Biophysica Acta, „Membrane transport of hydrogen peroxide“, Bienert et al., 2006)

H₂O₂ fungiert in Pflanzen als besonders wichtige Signalsubstanz bei der Abwehr gegen Pathogene. Durch H₂O₂-induziertes lokales Absterben der infizierten Zellen wird eine Ausbreitung der Eindringlinge verhindert (Levine et al., 1994). H₂O₂ entsteht durch den Elektronentransport in den Mitochondrien (Møller, 2001), der Mehler-Reaktion in den Chloroplasten und der Photorespiration in den Peroxisomen. Bei der Mehler-Reaktion, auch pseudozyklischer Elektronentransport genannt, werden bei zu wenig NADP die Elektronen von reduziertem Ferredoxin (Fd) nicht an NADP abgegeben, sondern direkt an Sauerstoff (O₂ + Fd (red.) → O₂^{·-} + Fd (ox.)). Durch eine weitere Redoxreaktion wird H₂O₂ gebildet (Mehler, 1951). Zusätzlich steigern abiotischer und biotischer Stress durch plasmamembranlokalisierte NADPH-Oxidasen (RBOH = „respiratory burst oxidase homolog“; Sagi und Fluhr, 2001; Torres et al., 2002) oder Zellwandperoxidasen (Bolwell et al., 2002) die H₂O₂-Produktion.

Aufgrund des permanenten Dipolmoments von 2,26 x 10⁻¹⁸ elektrostatische Einheiten (Ardon und Benjamin, 1965) ist eine Diffusion von H₂O₂ durch die Membran wenig wahrscheinlich (Bienert et al., 2006). Deshalb wird H₂O₂ vermutlich mittels Peroxiporinmembrankanäle (Henzler und Steudle, 2000) oder Aquaporine (Bienert, 2006) transportiert. Weiterhin wird die Menge des zellulären H₂O₂ durch Produktion und Metabolismus mittels Enzyme wie Katalase und des allgegenwärtigen Ascorbat-Glutathion Zyklus (A-G Zyklus; Noctor und Foyer, 1998),

der die Beteiligung der Enzyme Ascorbatperoxidase (APX), Dehydroascorbatreduktase (DHAR) und Glutathionreduktase (GR) mit einschließt, bestimmt. Zusätzlich reagiert H_2O_2 mit reduziertem Glutathion (GSH) zu dessen oxidierten Form (GSSG).

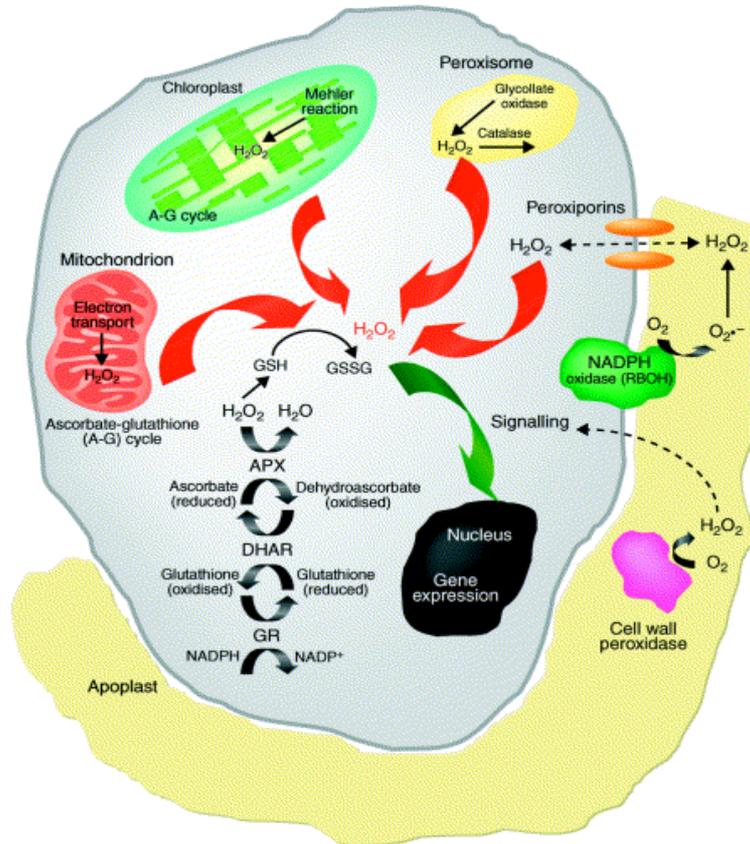


Abb. 1.1-10: Entstehung von H_2O_2 in Pflanzen (aus Current Opinion in Plant Biology, „Hydrogen peroxide signalling“, Neill et al., 2002)

Da im Apoplasten nur wenig Antioxidantien vorhanden sind, wird dort gebildetes H_2O_2 schnell in die Zelle geschleust und abgebaut. Da die Durchlässigkeit von Membranen für H_2O_2 stark begrenzt ist (siehe permanentes Dipolmoment), postulierten Bienert und sein Team (Bienert et al., 2006), dass es entweder zu einer Veränderung in der Membranzusammensetzung kommen muss oder dass Kanalproteine für den Transport von H_2O_2 verantwortlich sind. Die Fähigkeit von Aquaporinen Wasser und andere kleine Moleküle transportieren zu können, hängt von der Größe und den elektrochemischen Eigenschaften dieser Moleküle ab. H_2O_2 besitzt ein ähnliches Dipolmoment sowie weitere dielektrische Eigenschaften und die Kapazität H-Brückenbindungen zu bilden wie H_2O (permanentes Dipolmoment von H_2O beträgt $1,85 \times 10^{-18}$ elektrostatische Einheiten) (Bienert et al., 2006). Mit einem Durchmesser von 0,25-0,28 nm passt es perfekt durch die Aquaporinkanäle (\varnothing 0,3 nm; Agre et al., 2000). Weitere Veröffentlichungen zeigen, dass Aquaporine in der Alge *Chara corallina* (Henzler und Steudle, 2000) sowie einige tierische und pflanzliche Aquaporine in Hefe H_2O_2 transportieren können (Bienert et al., 2006).

1.3 Zielsetzung

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Roth, 1999; Mast, 2000) wurden transgene Tabakpflanzen hergestellt, welche verschiedene Gene aus dem humanen Epstein-Barr Virus (*bhrf1*, *balf1*) bzw. aus dem humanen Genom (*bax*, *bik*) tragen. Diese Gene gehören zur Bcl-2 Familie. Mit diesen Pflanzen wurde untersucht, ob eine Verbindung zwischen Apoptose und PCD in Pflanzen besteht. Neben der erwarteten Nekrosenbildung von Pflanzen, die das pro-apoptotische *bax*-Gen exprimieren, zeigten auch BHRF1-transgene Pflanzen unerwartet starke Nekrosenbildung, die durch endogene Reize wie HR und Stress ausgelöst werden konnte. Diese Spontannekrosen bilden unregelmäßige Formen und es kommt, anders als bei einer HR aufgrund eines Pathogenbefalls (z. B. durch das Tabakmosaikvirus), zu keiner Akkumulation von Salicylat. Um die Ursache der Bildung dieser Spontannekrosen herauszufinden, wurde mit Hilfe des Hefezweihybridsystems eine Tabak cDNA-Bank auf mögliche Interaktionspartner des BHRF1-Proteins durchgeführt (Maile, 2001). Dabei konnten hauptsächlich mehrere Klone für zwei verschiedene Aquaporine identifiziert werden.

In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise auf Aktivitäten der Aquaporine, die über die klassische Funktion als Wasserkanal hinausgehen und zum ersten Mal eine logische Verknüpfung zwischen Zelltod und Aquaporinen zulassen. Henzler und Steudle zeigten 2000, wie schon erwähnt, dass in der Alge *Chara corallina* H_2O_2 von Aquaporinen transportiert werden kann. Weitere Arbeiten von Bienert und seiner Arbeitsgruppe (2006) zeigten, dass auch einige pflanzliche und tierische Aquaporine als H_2O_2 -Kanäle fungieren können. Da reaktive Sauerstoffspezies und H_2O_2 schon lange als wichtige Signalsubstanzen im Rahmen der Pathogenabwehr in Pflanzen bekannt sind, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den, im Hefezweihybridscreen, gefundenen Aquaporinen um solche H_2O_2 -Transporter handelt. Die zelltodfördernde Wirkung von BHRF1 in Pflanzen ist möglicherweise auf eine Inhibierung dieser H_2O_2 -Kanäle zurückzuführen. Deshalb sollte in Hefezellen diese Funktion der isolierten Aquaporine untersucht werden. Parallel wurde diese zelltodfördernde Funktion der Aquaporine in transienter Expression in *Nicotiana benthamiana* überprüft. Außerdem sollte die Interaktion zwischen mehreren Aquaporinen und verschiedenen BHRF1-Proteinen in einem speziell für Membranproteine entwickelten Hefezweihybridsystem (Split Ubiquitin System) untersucht werden. Durch gezielte Deletionen der Proteine sollte die erforderliche Bindungsdomäne für die Interaktion zwischen Aquaporin und BHRF1 genauer identifiziert werden. Zusätzlich sollte mit diesem speziellen Hefezweihybridsystem nach zellulären Interaktionspartnern und damit möglichen Regulatoren gesucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Enzyme

Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) bezogen. Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme stammten von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (NEB) in Schwalbach. Davon abweichende Bezugsquellen sind gesondert im Text vermerkt.

Alle Lösungen wurden soweit nicht anders angegeben mit Reinstwasser (18,3 MΩ/cm), welches über eine Herco-Filtrationsanlage gereinigt wurde (Herco, Freiberg), angesetzt.

2.2 Biologische Materialien

2.2.1 Pflanzen

Nicotiana tabacum L. cv. Samsun NN (N/N)

Nicotiana benthamiana L. (-/-)

Herkunft aus dem „Tabacco Institute“, North Carolina, USA und von Prof. K.-W. Mundry, Universität Stuttgart

2.2.2 Pflanzenviren

TMV Gelbstamm, „yellow strain“, „common strain“ (Tabakmosaikvirus)

Herkunft aus dem Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim

2.2.3 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5α

Herkunft aus Laborbestand (Hanahan, 1983)

Genotyp: F'Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*
(*r_k⁻, m_k⁺*) *phoA supE44λ⁻ thi-1; recA1; gyrA96 relA1*

Escherichia coli XL1-blue

Herkunft aus dem Laborbestand von Prof. Dr. Anne Spang, Universität Basel

Genotyp: F'::Tn10 (Tet^r) *proA⁺B⁺ lacI^f Δ(lacZ)M15 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r)*
thi-1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁻) glnV44 relA1 lac

Escherichia coli BL21

Herkunft: Novagen, Darmstadt

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻) gal dcm* (DE3)

Agrobacterium tumefaciens LBA4404

Herkunft aus Laborbestand (Hoekema *et al.*, 1983)

Genotyp: Ach5 pTiAch5ΔT

Agrobacterium tumefaciens GV3101

Herkunft aus Laborbestand (Koncz und Schell, 1986)

Genotyp: pMP90RK, GM^R, Rif^R

2.2.4 Hefestämme*Saccharomyces cerevisiae* NMY51

Herkunft: Dualsystems Biotech AG, Zürich, Schweiz

Genotyp: MATa, *his3delta200*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ade2*, LYS2:::(lexAop)₄-HIS3, *ura3:::(lexAop)₈-lacZ (lexAop)₈-ADE2 GAL4*

Saccharomyces cerevisiae Cen.PK2

Herkunft: EUROSCARF, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Genotyp: MATa/MATα *ura3-52/ura3-52*, *trp1-289/trp1-289*, *leu2-3, 112/leu2-3, 112*, *his3-Δ1/his3-Δ1*; MAL2-8^c/MAL2-8^c; SUC2/SUC2

Saccharomyces cerevisiae BY4741

Herkunft: EUROSCARF, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Genotyp: MATa, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*

Saccharomyces cerevisiae YML007w

Herkunft: EUROSCARF, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Genotyp: BY4741; MATa, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*; YML007w::kanMX4

Saccharomyces cerevisiae YHR206w

Herkunft: EUROSCARF, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Genotyp: BY4741; MATa, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*; YHR206w::kanMX4

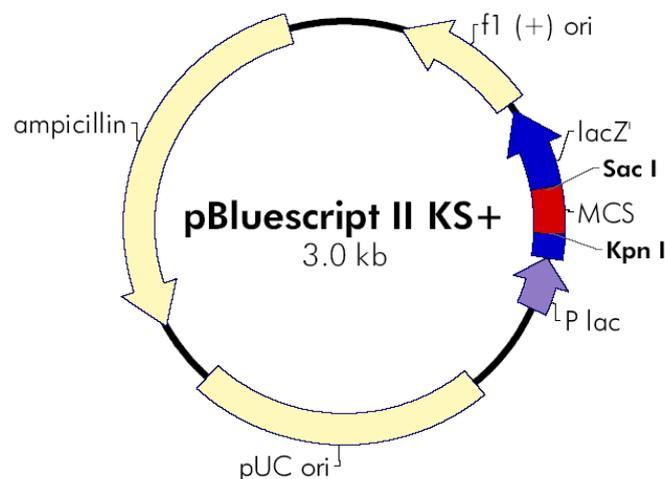
2.3 Vektoren**2.3.1 pBluescript II KS(+) (pBS)**

Abb. 2.3-1: Vektorkarte von pBluescript II KS (+), (www.stratagene.com)

Der pBluescript Vektor (Stratagene, USA) hat eine Größe von 2961 bp und enthält den Ursprung (ori) der DNA-Replikation des Bakteriophagen M13 eingebaut in ein pUC-Plasmid, welches über T3 und T7 Bakteriophagen-Promotoren verfügt. Das Plasmid trägt ein Ampicillinresistenzgen und erlaubt die Selektion auf β -Galaktosidaseaktivität durch eine Δ M15 Komplementation.

2.3.2 pBluescript/T-Vektor

Der T-Vektor wurde von B. Roth (Universität Hohenheim, Institut für Genetik, FG Allgemeine Virologie) hergestellt, indem das Plasmid pBluescript II KS (+) (Stratagene, USA) mit EcoRV (EcoRV) linearisiert und mit terminaler Desoxynucleotidyl Transferase (TDT) in Gegenwart von ddTTP behandelt wurde. In dieser Reaktion werden dTs an die 3'-OH Enden des glatt geschnittenen Doppelstranges angehängt. Dieser Vektor ist dadurch besonders gut zum Klonieren von PCR-Produkten geeignet, da viele *Taq*-Polymerasen dazu tendieren, ein zusätzliches Nukleotid anzufügen, wobei es sich in der Regel um Adenosin handelt.

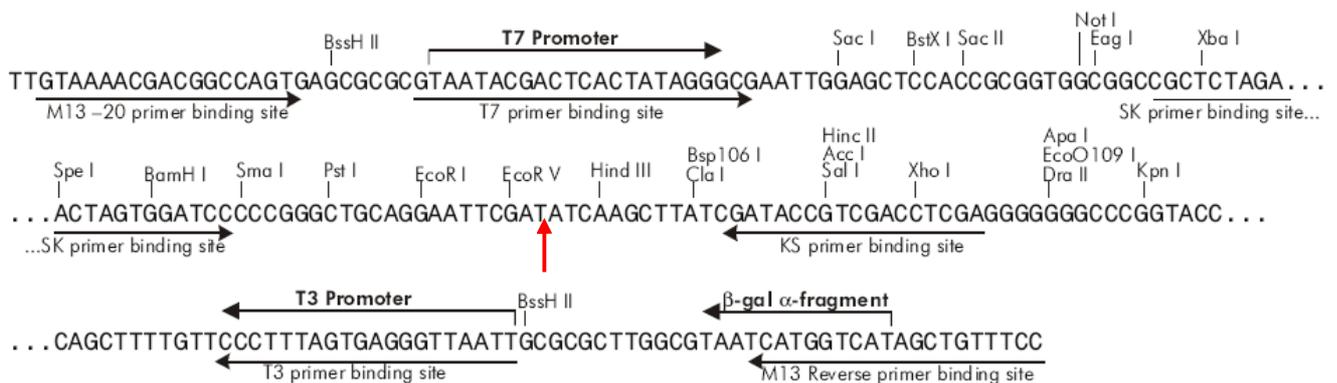


Abb. 2.3-2: Die „Multiple Cloning Site“ (MCS) von pBluescript II KS(+), (www.stratagene.com)

Der Pfeil markiert die Stelle, an der die T-Überhänge angefügt sind.

2.3.3 pUC18/19

Das Plasmid wurde von Yanisch-Perron et al. (1985) entwickelt. Es handelt sich um einen kleinen (2686 bp), mit hoher Kopienzahl replizierenden *E. coli*-Plasmidvektor. pUC18 bzw. pUC19 trägt eine Ampicillinresistenz (*bla*-Gen), ermöglicht Insertionen von DNA-Fragmenten in eine multiple Klonierungsstelle (MCS) und erlaubt die Identifizierung rekombinanter Bakterienklone durch Blau-Weiß-Selektion, welche durch die α -Komplementation des *lacZ*-Gens z. B. in *E. coli* DH5 α ermöglicht wird. pUC18 und pUC19 sind identisch. Sie unterscheiden sich lediglich in der Orientierung ihrer MCS.

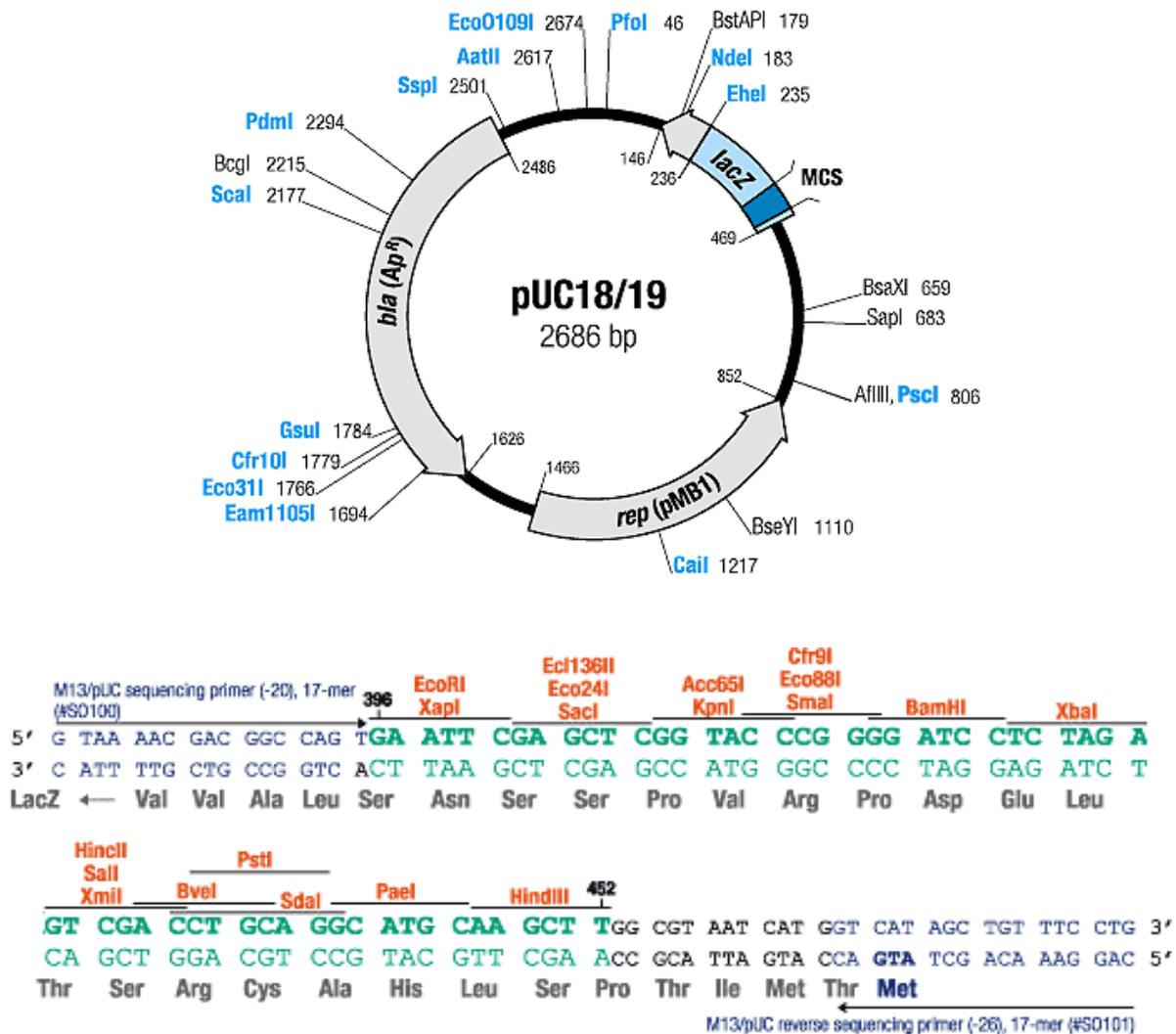


Abb. 2.3-3: Vektorkarte und „Multiple Cloning Site“ (MCS) von pUC18/19, (www.fermentas.com)

2.3.4 pGAD424

Der 6,6 kb große Vektor pGAD424 (Clontech, Heidelberg) dient der Durchführung von Untersuchungen im Hefezweihybridensystem. Er repliziert selbständig sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae*. pGAD424 trägt eine Ampicillinresistenz und den *LEU2*-Marker, der Hefezellen, die das Plasmid besitzen, erlaubt auf Minimalmedium ohne Leucin zu wachsen. Der Vektor besitzt einen konstitutiven *ADH1*-Promotor sowie eine multiple Klonierungsstelle (MCS) am 3'-Ende des offenen Leserahmens für die GAL4_(AS768-AS881)-Transkriptions-Aktivierungsdomäne. Das Gen, welches für das zu untersuchende Protein kodiert, wird in die MCS kloniert. Dies muss in der richtigen Orientierung und im korrekten Leserahmen erfolgen, so dass ein Fusionsprotein aus GAL4-Aktivierungsdomäne und dem gewünschten Protein gebildet werden kann.

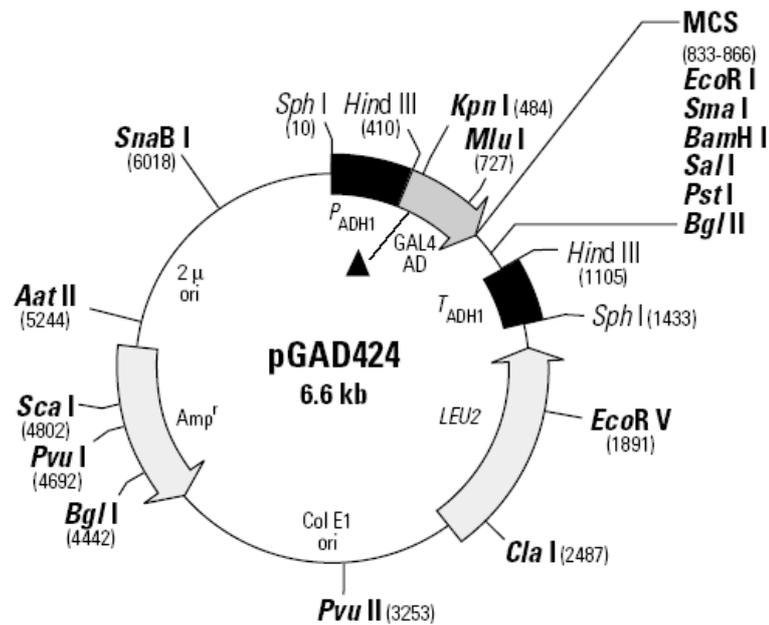


Abb. 2.3-4: Vektorkarte von pGAD424, (www.clontech.com)

2.3.4.1 pGAD Δ

Hierzu wurde der Vektor pGAD424 mit HindIII verdaut und ohne das kleinere HindIII-Fragment, welches die multiple Klonierungsstelle und die GAL4-Aktivierungsdomäne beinhaltet, wieder zusammen ligiert. In diese HindIII-Schnittstelle wurden die zu untersuchenden Proteine in der richtigen Orientierung kloniert.

2.3.5 pYEGFP

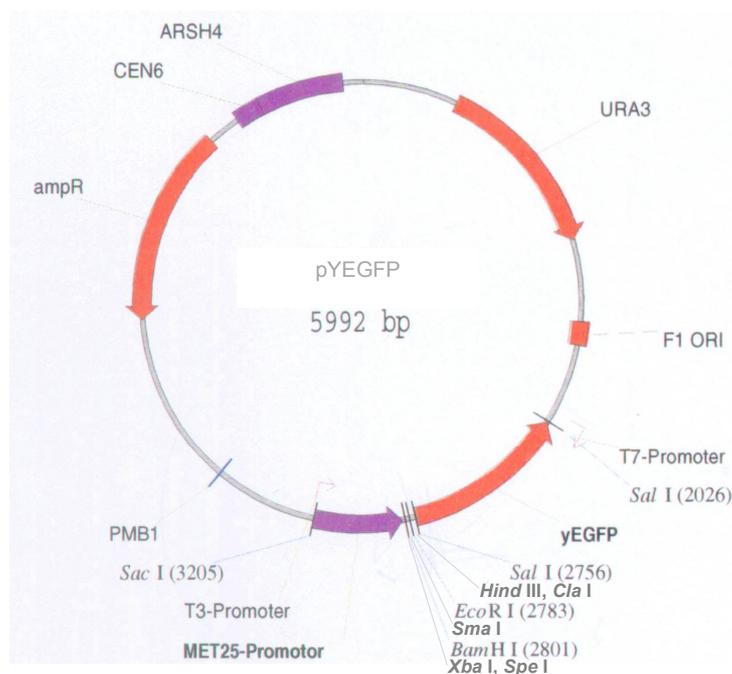


Abb. 2.3-5: Vektorkarte von pYEGFP

Der 5992 bp große Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz für die Selektion in *E. coli* und ein Gen, das für ein Enzym in der Uracil-Biosynthese kodiert, wodurch es Hefen ermöglicht wird auf Minimalmedium ohne Uracil zu wachsen. Darüber hinaus trägt er ein für Hefe kodonoptimiertes GFP (yEGFP = „yeast enhanced green fluorescent protein“). Die Expression von yEGFP durch den starken MET25-Promotor kann durch Zugabe der Aminosäure Methionin ins Medium inhibiert werden.

2.3.5.1 „Green fluorescent protein“ (GFP)

Das „green fluorescent protein“ wurde in den sechziger Jahren aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* isoliert (Shimomura, 1962). Es ist das einzige bisher bekannte fluoreszierende Protein, dessen Chromophor ein direkter Teil der Peptidkette des Proteins ist. Es werden keine Co-Faktoren für die Fluoreszenz benötigt. GFP besitzt zwei Absorptionsmaxima (395 nm und 470 nm), aber nur ein Emissionsmaximum (500 nm). Aufgrund seiner kompakten Struktur ist es äußerst stabil und resistent gegenüber den meisten Proteasen. Verstärkt wird seine Stabilität durch seine hohe Toleranz in pH-Bereichen von 5 bis 12, wobei die Emissionsintensität im basischen pH sogar noch leicht erhöht werden kann (Haupts, 1998).

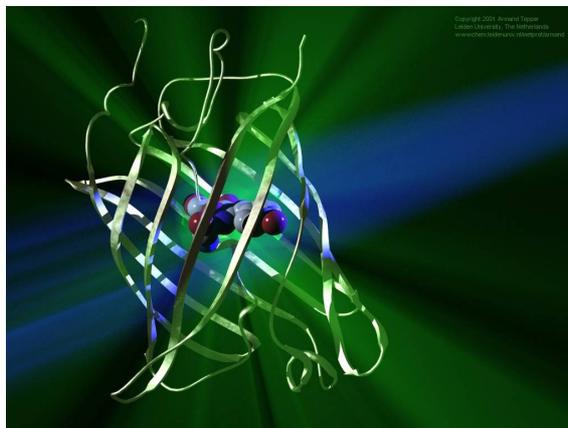


Abb. 2.3-6: Tertiärstruktur des „green fluorescent protein“ (GFP)

Die elf β -Faltblätter bilden zusammen mit den α -Helices eine zylinderförmige Struktur aus, die das Fluorophor im Inneren schützt. Diese Struktur sorgt dafür, dass das Protein sehr stabil ist und die Fluoreszenz durch die geschützte Lage des Fluorophors lange erhalten bleibt. (Leiden Universität, The Netherlands)

2.3.6 pBT3-C

Das Plasmid pBT3-C hat eine Größe von 7605 bp und gehört zu den Vektoren des Split Ubiquitin Systems (4.4) für Interaktionsexperimente in Hefe (NMY51). Der Vektor wurde von der Firma Dualsystems Biotech AG, Zürich (CH) bezogen. Er besitzt ein Gen, das einen Defekt in der Biosynthese der Aminosäure Leucin komplementiert und ermöglicht somit das Wachstum von Hefen, die dieses Plasmid tragen, auf Minimalmedium ohne Leucin. Das

Plasmid kodiert für die C-terminale Hälfte eines Hefe-Ubiquitins (Cub) und für den Transkriptionsfaktor LexA-VP16, wobei LexA die DNA-Bindungsdomäne und VP16 die Aktivierungsdomäne darstellt, die sich am 3'-Ende der multiplen Klonierungsstelle (MCS) befinden. Das zu untersuchende Protein wird in die MCS ligiert. Nach der Expression entsteht ein Fusionsprotein aus dem zu untersuchendem Protein, Cub und LexA-VP16. Zur Selektion in *E. coli* trägt das Plasmid eine Kanamycinresistenz.

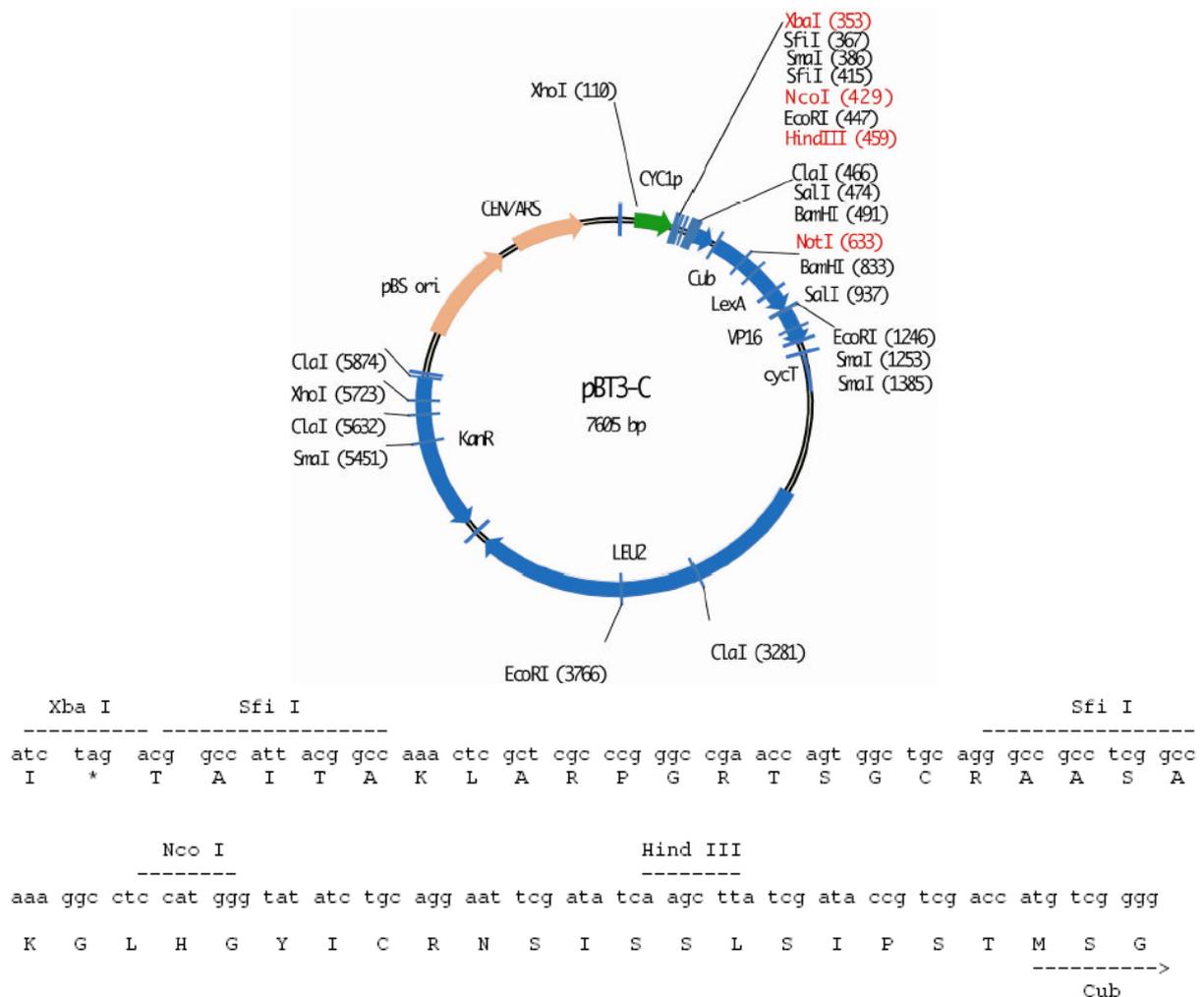


Abb. 2.3-7: Vektorkarte und „Multiple Cloning Site“ von pBT3-C, (www.dualsystems.com)

2.3.7 pBT3-N

Dieses 7614 bp große Plasmid wurde ebenfalls von Dualsystems Biotech AG, Zürich (CH) bezogen und für Interaktionsexperimente (4.4) in Hefe (NMY51) verwendet. pBT3-N besitzt ein Gen, welches für ein Enzym in der Biosynthese der Aminosäure Leucin kodiert, das in NMY51 fehlt, und daher nur Hefen, die diesen Vektor tragen, erlaubt auf Minimalmedium ohne Leucin zu wachsen. Der Vektor kodiert für den Transkriptionsfaktor LexA-VP16, wobei LexA die DNA-Bindungsdomäne und VP16 die Aktivierungsdomäne liefert, sowie für die C-terminale Hälfte eines Hefe-Ubiquitins (Cub), welche sich am 5'-Ende der multiplen

Klonierungsstelle (MCS) befinden. Nach der Expression entsteht ein Fusionsprotein aus LexA-VP16, Cub und dem zu untersuchenden Protein, das in die MCS kloniert wurde. Zur Selektion in *E. coli* trägt das Plasmid ein Kanamycinresistenzgen.

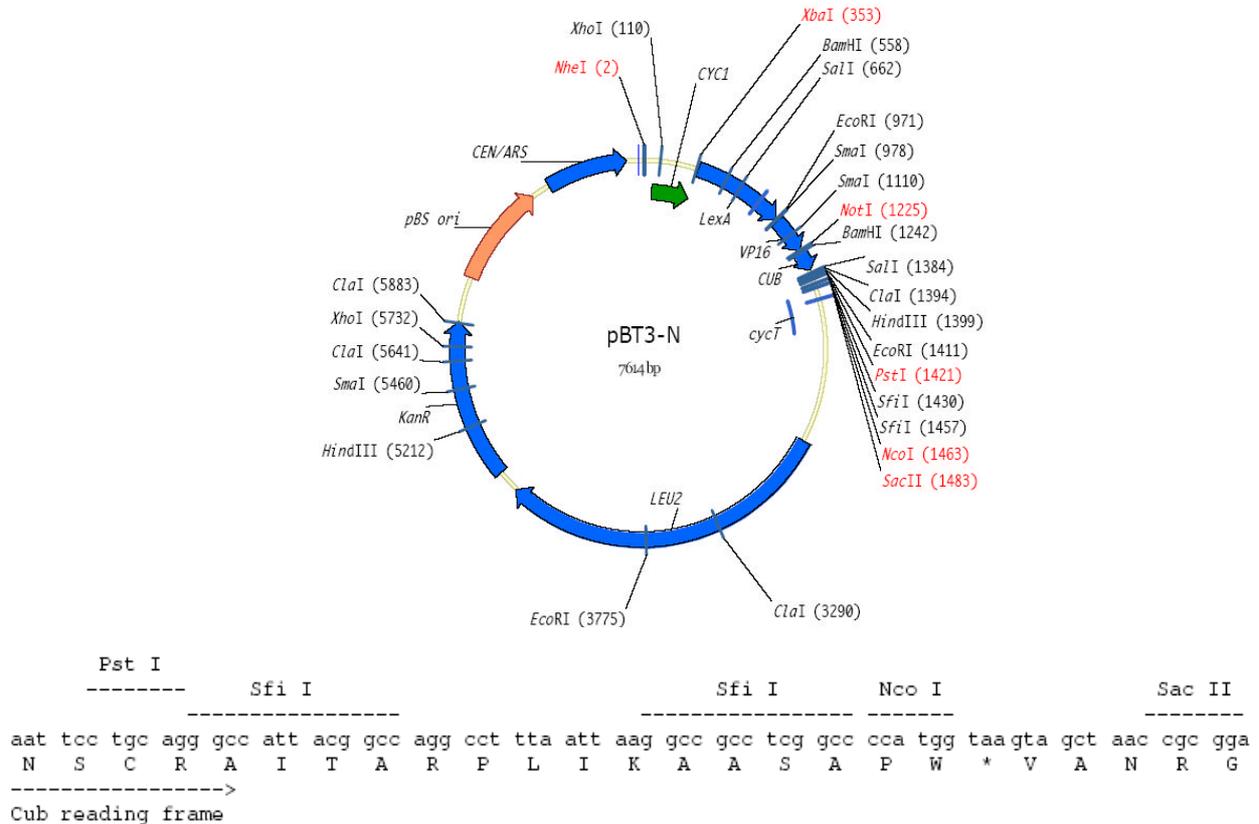


Abb. 2.3-8: Vektorkarte und „Multiple Cloning Site“ von pBT3-N, (www.dualsystems.com)

2.3.8 pPR3-N

Dieses Plasmid wurde ebenfalls von der Firma Dualsystems Biotech AG, Zürich (CH) bezogen. Es hat eine Größe von 6204 bp und wurde für Interaktionsexperimente im Split Ubiquitin System (4.4) in Hefe (NMY51) eingesetzt. Dazu besitzt der Vektor ein Gen, das für ein Enzym in der Tryptophan-Biosynthese kodiert, welches bei NMY51 mutiert ist, um zu gewährleisten, dass auf Minimalmedium ohne diese Aminosäure nur Hefen, die den Vektor pPR3-N enthalten, wachsen können. Die kodierende Sequenz für das zu untersuchende Protein wird in die multiple Klonierungsstelle (MCS) kloniert. Am 5'-Ende der MCS liegt ein ORF der N-terminalen Hälfte eines durch Mutation veränderten Hefe-Ubiquitins (NubG), welches bei der Expression eine N-terminale Fusion mit dem zu untersuchenden Protein bildet. Zur Selektion in *E. coli* trägt das Plasmid eine Ampicillinresistenz.

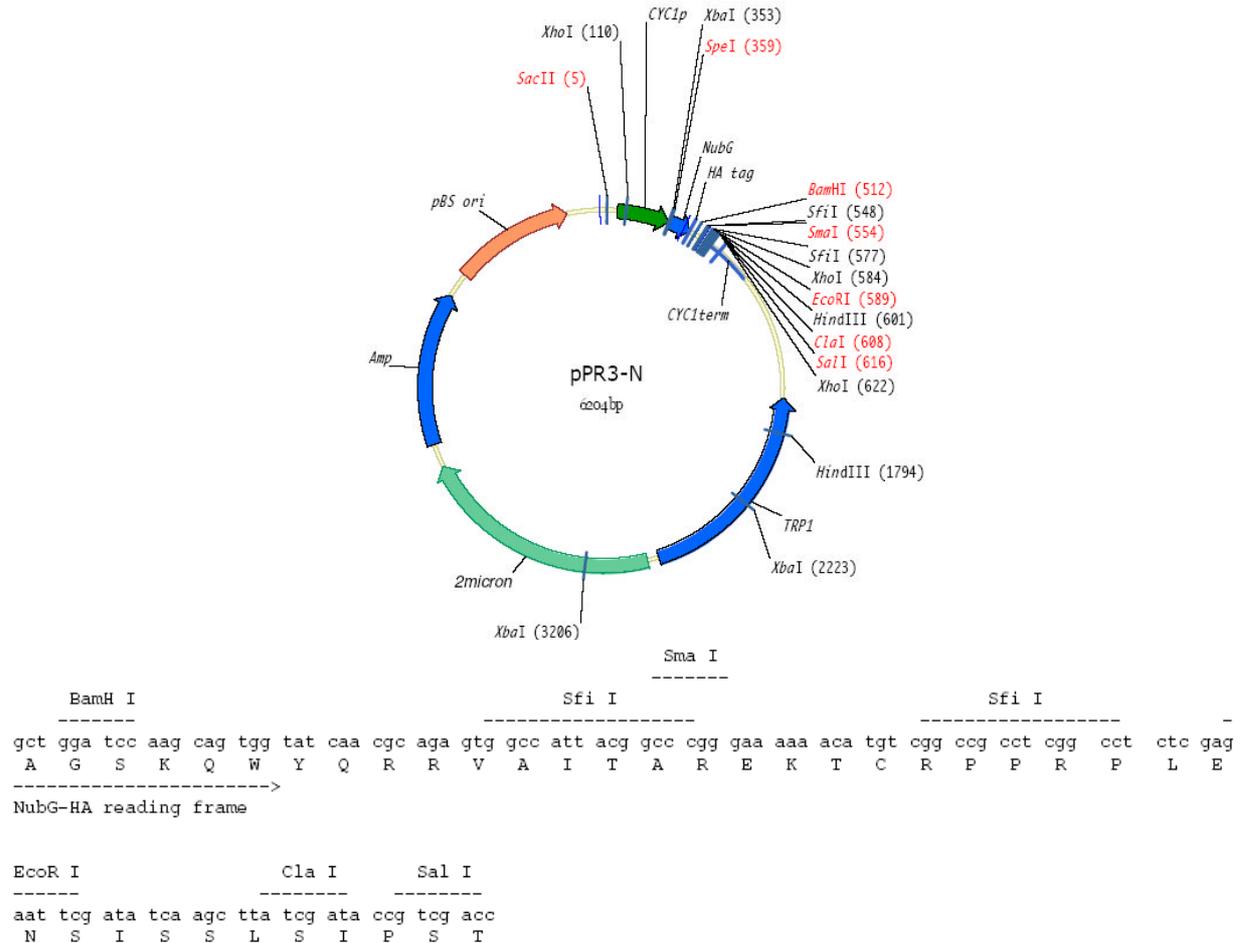


Abb. 2.3-9: Vektorkarte und „Multiple Cloning Site“ von pPR3-N, (www.dualsystems.com)

2.3.9 pDSL-Nx

Der Vektor pDSL-Nx wurde von der Firma Dualsystems Biotech AG, Zürich (CH) bezogen. Dieses 6336 bp große Plasmid wurde mit einer *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bank geliefert, welche als C-terminale Fusion an die N-terminale Hälfte eines durch Mutation veränderten Hefe-Ubiquitins (NubG) kloniert ist, um die cDNA-Bank in einem Hefezweihybridscreen nach möglichen Interaktionspartnern untersuchen zu können. Hierfür besitzt pDSL-Nx ein Gen, das für ein Enzym in der Tryptophan-Biosynthese kodiert, welches bei NMY51 mutiert ist, um zu gewährleisten, dass auf Minimalmedium ohne diese Aminosäure nur Hefen wachsen, welche das Plasmid pDSL-Nx enthalten. Zur Selektion in *E. coli* trägt das Plasmid eine Ampicillinresistenz.

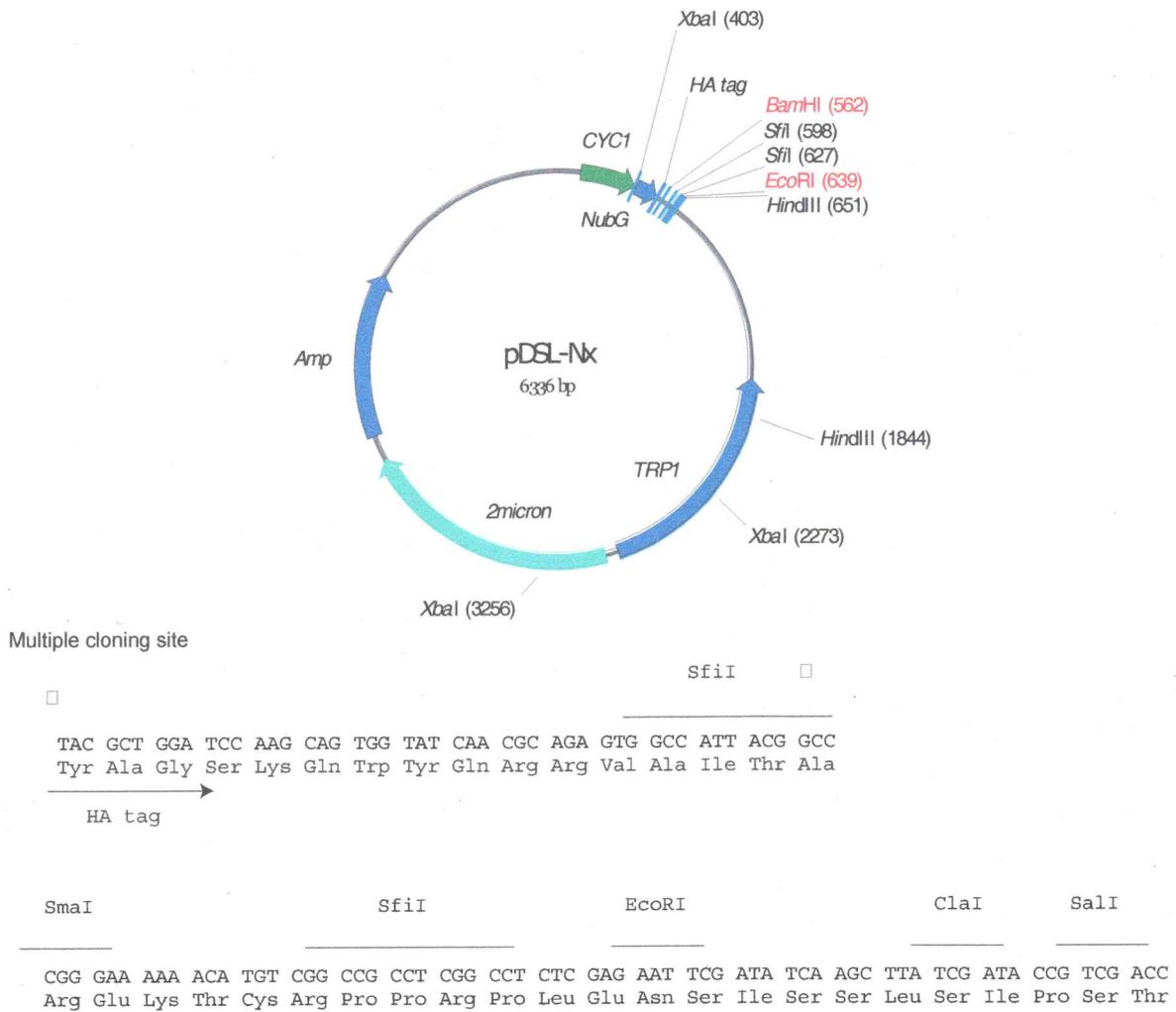


Abb. 2.3-10: Vektorkarte und „Multiple Cloning Site“ von pDSL-Nx, (www.dualsystems.com)

2.3.10 pGEX-3X

Dieses Plasmid ist ca. 4900 bp groß und trägt für die Selektion in *E. coli* eine Ampicillinresistenz. Unter Verwendung des pGEX-3X-Expressionsvektors werden Zielproteine als Fusionen mit N-terminalem Glutathion-S-Transferase (GST)-Affinitätsepitop hergestellt. Für die chemisch induzierte Überexpression des Fusionsproteins wird ein starker *tac*-Promotor verwendet. Dieser besteht aus der -35 Region des *trp*-Promotors und der -10 Region des *lacUV5*-Promotors. Er wird über ein internes *lacI^q*-Gen reguliert und durch Zugabe von IPTG induziert. Um das Fusionsprotein leicht abspalten zu können, ist zwischen dem GST-Affinitätsepitop und dem Zielprotein die Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa vorhanden.

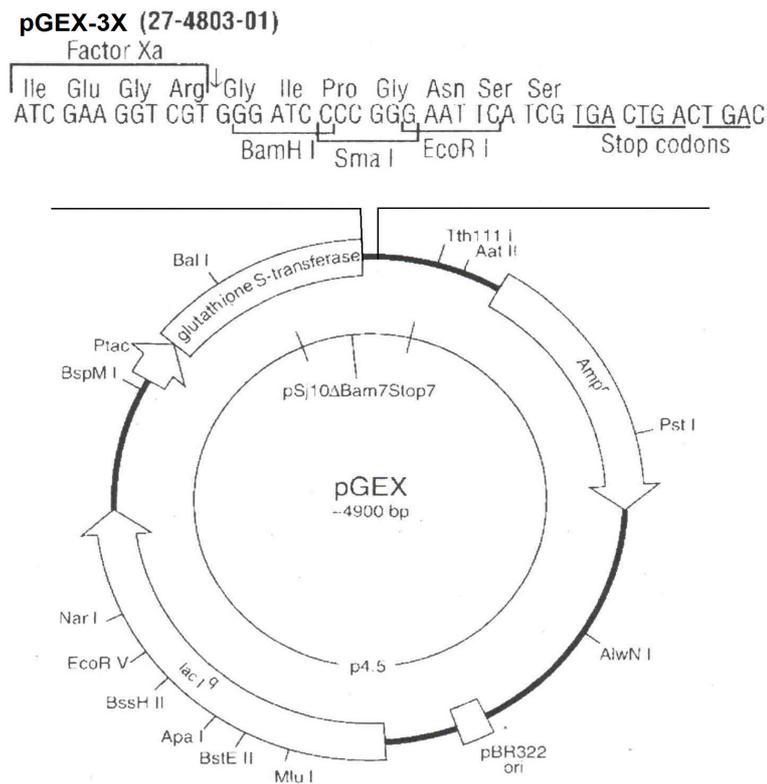


Abb. 2.3-11: Vektorkarte und „Multiple Cloning Site“ von pGEX-3X, (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

2.3.11 GFP-Vektoren (pK7WGF2N und pK7FWG2C)

Bei diesen beiden Plasmiden handelt es sich um „Gateway-Vektoren“ zur Expression von GFP-Fusionen in transgenen Pflanzen. Sie haben eine Größe von 11876 bp bzw. 11880 bp und besitzen einen 35S-Promotor sowie die zur Rekombination notwendigen „attR-sites“ (attR1 und attR2). Die Vektoren tragen jeweils ein Spectinomycinresistenzgen für die Selektion in Bakterien sowie ein Kanamycinresistenzgen zur positiven Selektion bei der Transformation von Pflanzen. Das pK7FWG2C Plasmid exprimiert ein Fusionsprotein mit einer C-terminalen Egfp-Fusion, das pK7WGF2N Plasmid ein Fusionsprotein mit einer N-terminalen Egfp-Fusion. Dadurch werden sie mittels UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt.

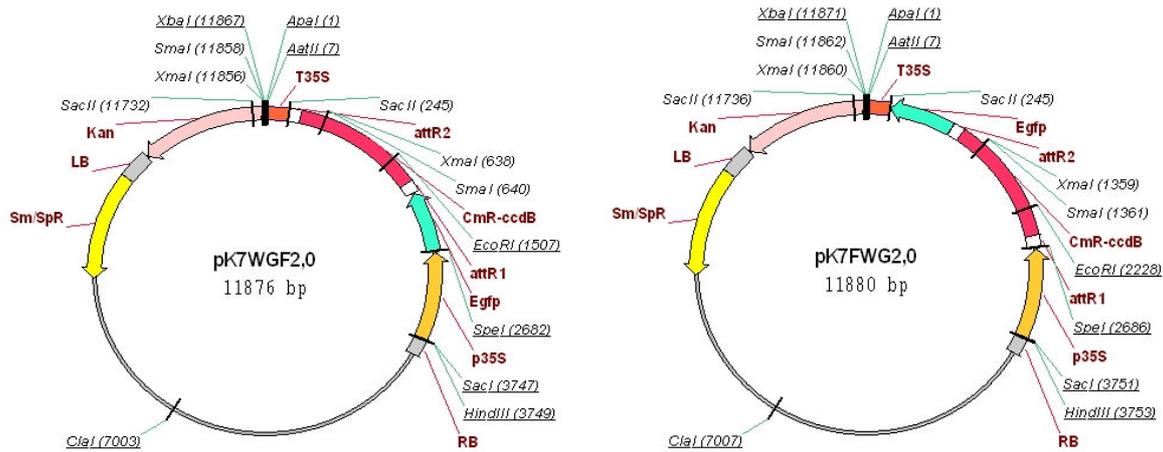


Abb. 2.3-12: Vektorkarte von pK7WGF2C und pK7FWG2N

2.3.12 pBin19 35S

Das Plasmid pBin19 35S ist ca.12 kb groß, basiert auf der Grundlage des binären Vektors pBin19 (Bevan, 1984) und wird zur Transformation von Pflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt. Dieser Vektor enthält eine aus dem Ti-Plasmid von *A. tumefaciens* stammende modifizierte T-DNA, die sich zwischen „left border“ (LB) und „right border“ (RB) befindet und bei einer Transformation ins Pflanzengenom integriert. Innerhalb der zwei Grenzen (LB, RB) befindet sich der 35S RNA-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV), anschließend die „Multiple Cloning Site“ und schließlich das Poly-A Signal des Nopalinsynthasegens (NOS). Außerhalb der T-DNA ist ein Kanamycinresistenzgen zur Selektion in Bakterien vorhanden.

2.3.13 pTAK35Scah

Das Plasmid pTAK35S (Beilmann et al., 1991) basiert auf dem Ursprungsvektor pBIN19 (Bevan, 1984) und wird ebenfalls zur Transformation von Pflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt. Anstelle der „Multiple Cloning Site“ befindet sich hier das *cah*-Gen, welches für eine Cyanamidhydratase kodiert.

2.3.14 pRK2013

Das Helferplasmid pRK2013 (Figurski und Helsinki, 1979) liefert die zur Konjugation zwischen drei Bakterienstämmen („Triparental Mating“) notwendigen Genprodukte. Dadurch ist die Übertragung des binären Vektorplasmids aus dem *E. coli*-Stamm DH5α in die Agrobakterien möglich.

2.4 „Kits“

2.4.1 Plasmid Mini- und Maxi-Präparationen

Maxi DNA Präparation

QIAfilter Maxi Kit, (Qiagen, Hilden)

Dieses Kit diente zur Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Übernachtskulturen über Säulen, um größere Mengen reiner Vektor-DNA zu erhalten.

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Dieses Kit diente zur Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Übernachtskulturen über Säulen, um besonders reine Plasmid-DNA z. B. zur Sequenzierung zu erhalten.

2.4.2 DNA-Eluierung aus Agarosegelen

E.Z.N.A.™ Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Inc., Norcross)

Dieses Kit diente zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.

2.5 Protein-Molekulargewichtsstandard

2.5.1 „Prestained“ Proteinmarker

Für Proteingele, die nach der Elektrophorese auf Nitrocellulose übertragen und anschließend in eine Immundetektion eingesetzt wurden, wurden Größenstandards mit vorgefärbten Proteinen verwendet, die an einen blauen Farbstoff gekoppelt sind.

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671, MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

170 kDa / 130 kDa / 95 kDa / 72 kDa / 55 kDa / 43 kDa / 34 kDa / 26 kDa / 17 kDa / 10 kDa

Die Referenzproteine bei 72 kDa und 10 kDa sind mit einem roten bzw. grünem Farbstoff gekoppelt.

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#SM1811, MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

250 kDa / 130 kDa / 100 kDa / 70 kDa / 55 kDa / 35 kDa / 27 kDa / 15 kDa / 10 kDa

Die Referenzproteine bei 70 kDa, 27 kDa und 10 kDa sind mit einem roten bzw. grünem Farbstoff gekoppelt.

Prestained Protein Molecular Weight Marker (#SM0441, MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

120 kDa (β -Galactosidase) / 86 kDa (Rinderserumalbumin) / 47 kDa (Ovalbumin) / 34 kDa (Carboanhydrase) / 26 kDa (β -Lactoglobulin) / 20 kDa (Lysozym)

2.5.2 „Unstained“ Proteinmarker

Für „Coomassie“-gefärbte Proteingele diente folgender Marker:

PageRuler™ Unstained Protein Ladder (#SM0661, MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

200 kDa / 150 kDa / 120 kDa / 100 kDa / 85 kDa / 70 kDa / 60 kDa / **50 kDa** / 40 kDa
/ 30 kDa / 25 kDa / 20 kDa / 15 kDa / 10 kDa

Dieser Marker hat zur direkten Identifizierung der Proteingröße eine dicke Referenzbande bei 50 kDa.

2.6 Antiseren

2.6.1 Detektion von GFP („green fluorescent protein“)

Die in den GFP-Vektoren N- und C-terminal enthaltenen GFP-Domänen wurden mittels des primären „GFP (FL) rabbit polyclonal IgG“ Antikörpers (200 µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology), in einer 1:3000-Verdünnung in Blockierungslösung verwendet, nachgewiesen.

Für die Detektion des primären Antikörpers wurde ein „anti-rabbit“ Antikörper eingesetzt, welcher an Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt war („α-rabbit IgG-HRP“, Rockland). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockierungslösung verwendet.

2.6.2 Detektion von BHRF1

Zur Detektion des viralen Proteins BHRF1 wurde der monoklonale Antikörper „EBV Bcl-2“ ((0235): sc-58120, 100 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) in einer 1:1000-Verdünnung in Blockierungslösung verwendet.

Für die Detektion des primären Antikörpers wurde ein „anti-mouse“ Antikörper eingesetzt, welcher an Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt war („α-mouse IgG-HRP“, Rockland). Dieser wurde in einer 1:10000-Verdünnung in Blockierungslösung verwendet.

2.6.3 Detektion des humanen Aquaporin 1

Das hAQP1 des Menschen konnte mit dem polyklonalen Antikörper AQP1 ((H-55): sc-20810, 200 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) in einer 1:1000-Verdünnung in Blockierungslösung nachgewiesen werden.

Für die Detektion des primären Antikörpers wurde ein „anti-rabbit“ Antikörper eingesetzt, welcher an Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt war („α-rabbit IgG-HRP“, Rockland). Dieser wurde in einer 1:10000-Verdünnung in Blockierungslösung verwendet.

2.6.4 Detektion von GST (Glutathion-S-Transferase)

Die Detektion der Glutathion-S-Transferase bzw. GST-Fusionsproteinen konnte mit dem polyklonalen Antikörper „Rabbit anti-GST“ (71-7500, 250 µg/ml, Invitrogen) in einer 1:1000-Verdünnung in Blockierungslösung bestimmt werden.

Für die Detektion des primären Antikörpers wurde ein „anti-rabbit“ Antikörper eingesetzt, welcher an Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt war („α-rabbit IgG-HRP“, Rockland). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockierungslösung verwendet.

2.6.5 Detektion der Aminoacylase

Für die Detektion der Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* wurde der „ACY1 polyclonal antibody“ (A01, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH) in einer 1:3000-Verdünnung in Blockierungslösung verwendet.

Für die Detektion des primären Antikörpers wurde ein „anti-mouse“ Antikörper eingesetzt, welcher an Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt war („α-mouse IgG-HRP“, Rockland). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockierungslösung verwendet.

2.7 Oligonukleotide (Primer)

2.7.1 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe oder MWG Biotech, Ebersberg bezogen. Restriktionsschnittstellen innerhalb der Oligonukleotide sind unterstrichen. In Klammer ist die „Annealing“-Temperatur für die PCR angegeben.

Isolierung von Deletionen des Aquaporins NtPIP2.2b aus *Nicotiana tabacum*

Klonierung in pBT3-C und pBT3-N (58 °C):

PIP-Sfi5	A <u>ATC TAG AGG GCC ATT ACG GCC</u> AAA ATG ACT AAA GAA GTA GA
PIP-Sfi3	A <u>AGG AAT TCC GGC CGA GGC GGC CCT</u> GGC ATT GCT CCT GAA GG
loopB-5	<u>TTG GCC ATT ACG GCC</u> AAA ATG TTG GCA AGG AAA GTA TCA TT
loopB-5+NPA	<u>AAG GCC ATT ACG GCC</u> AAA ATG TCC GGA GGA CAC ATA AAC CCA
loopD-5	<u>TTG GCC ATT ACG GCC</u> AAA ATG AAT GCT AGA GAC TCC CAT
loopB-3	AA <u>GGC CGA GGC GGC CGA</u> GAT ACC GGC GGT GCA GTA AAC A

loopB-3+NPA	TT <u>GGC CGA GGC GGC CAG</u> CCC AAA TGT CAC TGC TGG GTT
loopD-3	AA <u>GGC CGA GGC GGC CGC</u> ATT TCT CTT AGG GTC AGT GGC A

Isolierung des Aquaporins NtTIP1.1a aus *Nicotiana tabacum* und dessen Deletionen

Klonierung in pBT3-C und pBT3-N (60 °C):

TIP-Sfi5	A <u>ATC TAG AGG GCC ATT ACG GCC</u> AAA ATG CCG ATC CAC CAA AT
TIP-Sfi3	AA <u>GGA ATT CCG GCC GAG GCG GCC</u> CTA AAA TCT CCA CTG GGG A
15loopB-3+NPA	TT <u>GGC CGA GGC GGC CGC</u> ACC GAA GGT AAC GGC GGG ATT
15loopB-5	TTG <u>GCC ATT ACG GCC</u> AAA ATG GGT GCT TTC GTT GGT GGA

Klonierung in pYEGFP (55 °C):

15/5bgl5	GGA <u>GAT CTA</u> AAA ATG CCG ATC CAC CAA ATT
15/5bgl3	CC <u>AGA TCT</u> AAA ATC TCC ACT GGG GAG TGG C

Isolierung der Aminoacylase und deren Deletionen aus einer Tabak cDNA-Bank

Klonierung in pPR3-N, pGEX-3X und pTAK35Scah (60 °C):

N.t.-AAC 5	GG <u>AAT TCA GGA TCC</u> AAA ATG AGT TTT TGC GGC GGT AGG CGA G
N.t.-AAC 3	GG <u>AAT TCG AGA TCT</u> CAA TTC TTC CCT CGA AGC CTC ATC TCT T

Klonierung in pPR3-N (60 °C):

N.t.-AACdPWW3	T <u>AGA TCT</u> CTC CCC ATA GAA TGC ACG ATA GTT TTC GGT GGG AGA
N.t.-AACdVWW3	T <u>AGA TCT</u> ACT GTC AAC AGC TGT AAT GGC TGG CCT TCC AAA CTT

Isolierung des Aquaporin AtTIP1.1 aus einer *Arabidopsis* cDNA-Bank

Klonierung in pBT3-C und pBT3-N (60 °C):

AtTIP1.1-Sfi-5	CCG <u>GCC ATT ACG GCC</u> AAA ATG CGG ATC AGA AAC ATC
AtTIP1.1-Sfi-3	AA <u>GGC CGA GGC GGC CCA</u> GTA GTC TGT GGT TGG GA

Klonierung in pYEGFP (61 °C):

AtTIP1.1-5	GG <u>TCT AGA</u> AAA ATG CCG ATC AGA AAC ATC G
AtTIP1.1-3	CC <u>GGA TCC</u> GTA GTC TGT GGT TGG GAG C

Isolierung des Aquaporin AtPIP2.2 aus einer *Arabidopsis* cDNA-Bank

Klonierung in pBT3-C und pBT3-N (60 °C):

AtPIP2.2-Sfi-5	AAG <u>GCC ATT ACG GCC</u> AAA ATG GCC AAA GAC GTG GAA
AtPIP2.2-Sfi-3	CC <u>GGC CGA GGC GGC CCA</u> AAC GTT GGC TGC ACT TC

Klonierung in pYEGFP (61 °C):

AtPIP2.2-5	GG <u>TCT AGA</u> AAA ATG GCC AAA GAC GTG GAA G
AraPIP2.2-3	GG <u>CCC GGG</u> AAC GTT GGC TGC ACT TCT G

Isolierung des humanen Aquaporin 1 aus pYEGFP

Klonierung in pBT3-C und pBT3-N (60 °C):

Aq1-Sfi5'	GG <u>GCC ATT ACG GCC CGG GAT CCA</u> AAA ATG GCC AGC GAG TTC AAG AAG
Aq1-Sfi3'	AGG <u>CCG AGG CCG CCG GGA TCC</u> TTT GGG CTT CAT CTC CAC CCT GGA

Isolierung des Aquaporin 8 der Ratte aus pYEGFP

Klonierung in pBT3-C und pBT3-N (60 °C):

rAQP8-Sfi5	A <u>ATC TAG AGG GCC ATT ACG GCC</u> AAA ATG TCT GGG GAG CAG AC
rAQP8-Sfi3	AA <u>GGA ATT CCG GCC GAG GCG GCC</u> CCT CGA CTT TAG AAT CAG G

2.7.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Plasmid-DNA wurde zum Sequenzieren zur Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg geschickt. Hierfür wurden folgende Primer verwendet:

M13 uni (-21)	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 rev (-29)	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
M13 uni (-43)	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Angaben der Hersteller (Enzymreaktionen und „Kits“) und nach Sambrook und Mitarbeiter (1989) durchgeführt. Davon abweichende und neue Methoden werden nachfolgend beschrieben.

3.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Alle Medien und Stammlösungen zur Anzucht und Bearbeitung von Bakterien wurden nach Sambrook und Mitarbeitern (1989) hergestellt.

- **LB Medium**
 - 10 g Pepton
 - 5 g Hefeextrakt
 - 10 g NaCl
 - ad 1 l H₂O
 - pH 7,5 (mit NaOH)
 - autoklavieren

- **Agarplatten**
 - LB-Medium
 - + 1,5 % Agar vor dem Autoklavieren zugeben

- **Antibiotika-Konzentrationen in Flüssigmedium und Agarplatten**

Ampicillin:	Stammlösung: 50 mg/ml in H ₂ O 100 µg/ml (f. c.) in Flüssigmedium 50 µg/ml (f. c.) in Agarplatten
Kanamycin:	Stammlösung: 100 mg/ml in H ₂ O 100 µg/ml (f. c.) in Flüssigmedium 50 µg/ml (f. c.) in Agarplatten

- **Zusätze in Agarplatten zur Blau-Weiß-Selektion**

IPTG	Stammlösung: 100 mM in H ₂ O 10 µg/ml (f. c.)
X-Gal	Stammlösung: 20 mg/ml in DMFA 40 µg/ml (f. c.)

3.1.2 Transformation von *Escherichia coli* nach Inoue und Mitarbeiter (1990)

3.1.2.1 Herstellung der kompetenten Bakterienzellen DH5 α , XL1-blue, BL21

Von einer Gefrierkultur des gewünschten Bakterienstammes wurde ein Aliquot auf eine LB-Platte, welche das eventuell für den Bakterienstamm entsprechende Selektionsantibiotikum enthält, ausgestrichen und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit einer der gewachsenen Kolonien wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die gesamte Übernachtkultur in einen 1 l Kolben mit 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überimpft und bis zu einem OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Der Kolben wurde auf Eis gestellt. Alle weiteren Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Die Bakterien wurden für 10 Minuten bei 6000 UpM und 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Der Bakterienniederschlag wurde 2 x in 40 ml Tfb I suspendiert, für 5 Minuten auf Eis inkubiert und erneut für 10 Minuten bei 6000 UpM und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 8 ml Tfb II suspendiert und in 100 μ l Aliquots durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -70 °C gelagert und waren ca. 6 Monate haltbar. Alle verwendeten Lösungen, Zentrifugenbecher und Pipetten müssen steril und kalt sein.

- **Tfb I**

- 30 mM KOAc
- 50 mM MnCl₂
- 100 mM KCl
- 10 mM CaCl₂
- 15 % Glycerin (w/v)
- mit 0,2 μ m Sterilfiltrieren

- **Tfb II**

- 10 mM Na-MOPS pH 7
- 75 mM CaCl₂
- 10 mM KCl
- 15 % Glycerin (w/v)
- autoklavieren

3.1.2.2 Transformation der Bakterienzellen DH5 α , XL1-blue, BL21

100 μ l der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterienzellen wurden mit 5-10 μ l Ligationsansatz oder 1 ng DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30-45 Sekunden bei 37-42 °C. Der Transformationsansatz wurde sofort auf Eis transferiert und für weitere 2 Minuten inkubiert. Es wurde pro Ansatz 900 μ l LB-Medium

zugegeben und bei 37 °C und 250 UpM für 60 Minuten geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden abzentrifugiert, der Überstand abgekippt, die Zellen im Restüberstand suspendiert und unverdünnt bzw. 1:10 in LB-Medium verdünnt jeweils 100 µl auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Gewachsene Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gepickt und zur Plasmidpräparation in einer 5 ml Flüssigkultur hochgezogen.

3.1.3 Plasmidpräparation aus Bakterien

- **Lösung I**
 - 50 mM Tris/HCl pH 8,0
 - 10 mM EDTA/NaOH pH 8,0
 - 100 µg/ml RNase A (Roth, #7156.1) aus Rinderpankreas (90 E/mg)

- **Lösung II**
 - 200 mM NaOH
 - 1 % SDS

- **Lösung III**
 - 3 M Na-Acetat pH 5,5 (Eisessig) in 1 x TE

- **1 x TE**
 - 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 - 1 mM EDTA pH 8,0

Von einer 5 ml Übernachtskultur des zu untersuchenden Bakterienklons wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden durch 2-minütiges Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge geerntet, der Überstand wurde verworfen und der Zelleniederschlag in 100 µl Lösung I suspendiert. Es wurden 200 µl Lösung II dazugegeben, vorsichtig durch Invertieren gemischt und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl kühl-schrankkalter Lösung III wurde der Ansatz wieder vorsichtig gemischt und für mindestens 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine und genomische *E. coli*-DNA wurden bei 11000 UpM im Trommelrotor HTA 13.8 (Heraeus Biofuge 15 R) für 10 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen ohne Proteinreste mitzunehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl RT warmen Isopropanol versetzt und sofort wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und der DNA-

Niederschlag mit 400 µl 70 % Ethanol p. a. durch „Vortexen“ und nochmaliges Zentrifugieren gewaschen. Der DNA-Niederschlag wurde 10 Minuten luftgetrocknet und je nach Menge in 50-100 µl 1 x TE aufgenommen.

3.1.4 Phenolextraktion und Ethanolfällung von DNA

Zur Reinigung einer Nukleinsäurelösung durch Entfernen noch vorhandener Proteine wurden diese mit Phenol extrahiert. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung (20 µl), 70 µl H₂O, 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 50 µl Phenol in ein Reaktionsgefäß gegeben und durch „Vortexen“ gut gemischt. Zur Trennung der wässrigen von der organischen Phase wurde das Gemisch 1 Minute in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die DNA-enhaltende wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) überschichtet und durch erneutes „Vortexen“ gemischt. Anschließend wurde das Gemisch wie oben beschrieben zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl 96 % Ethanol p.a. für 20-30 Minuten bei -20 °C gefällt. Danach wurde 10 Minuten bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert und das DNA-Sediment mit 50 µl 70 % Ethanol p. a. (kalt) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen, die DNA 15 Minuten luftgetrocknet und dann in 10 µl 1 x TE aufgenommen.

3.1.5 Sequenzspezifische Restriktion von DNA

Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers mit den empfohlenen Puffern verdaut. 0,2 bis 2 µg Plasmid-DNA wurden in einem Endvolumen von 20 µl mit jeweils 5 Units Enzym für mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

3.1.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in einem 1 % Agarosegel. Dazu wurde eine entsprechende Menge Agarose (Biozym, Oldendorf) in 1 x TAE-Puffer gegeben und aufgeköcht. Zur Sichtbarmachung der DNA durch UV-Detektierung wurden 10 µg/ml Ethidiumbromid zu der bis auf etwa 55 °C abgekühlten Agarosegellösung gegeben. Die aufzutrennenden Proben wurden 1:6 mit 6 x orange Loading Dye oder 6 x Loading Dye versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 60 bis 100 Volt. Um die Fragmentgrößen der DNA-Banden abschätzen zu können, wurde ein Größenstandard bei jedem Lauf mit auf das Agarosegel geladen.

- **50 x TAE-Puffer**
 - 242 g Tris
 - 100 ml 500 mM EDTA pH 8,0
 - 57,1 ml 100 % Essigsäure
 - ad 1 l H₂O
- **6 x orange Loading Dye bzw. 6 x Loading Dye**
 - 10 mM Tris
 - 0,15 % Orange G bzw. 0,03 % Bromphenolblau
 - 0,03 % Xylencyanol FF
 - 60 % Glycerin
 - 60 mM EDTA/NaOH pH 7,6

3.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um reine DNA-Fragmente einer definierten Länge für Klonierzwecke zu erhalten, wurde ein Verdau mit 10 bis 20 µg DNA angesetzt. Nach dem Verdau wurde der Ansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Isolierung des gewünschten DNA-Fragments erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Norcross) nach den Angaben des Herstellers.

3.1.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Religation von geschnittenen DNA-Fragmenten (z. B. Vektor-DNA) kann durch die Abspaltung ihrer terminalen Phosphatgruppen (Dephosphorylierung) verhindert werden. Diese Reaktion wird durch das Enzym alkalische Phosphatase (CIAP) katalysiert.

Reaktionsansatz:

- 20 µl DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau
- 3 µl 10 x CIAP-Puffer
- 1 µl CIAP (1u/µl)
- 6 µl H₂O

Der Reaktionsansatz wurde für 20-30 Minuten bei 37°C inkubiert.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten („Inserts“) mit Vektor-DNA erfolgte mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase, welches die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxylende in doppelsträngigen DNA-Molekülen katalysiert. In die

Ligationsansätze wurde ein 5-10 facher molarer Überschuss an Insert-DNA gegenüber Vektor-DNA eingesetzt.

Ligationsansatz:

- 2-3 µl Vektor-DNA
- 5-6 µl Insert-DNA
- 1 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer
- 1 µl T4-DNA-Ligase

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die T4-DNA-Ligase 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert. Der Ligationsansatz wurde direkt in die *E. coli* Transformation (3.1.2.2) eingesetzt.

3.1.10 „Colony screen“ mittels PCR

Um positive Klone direkt von den Bakterienplatten zu sichten, vor allem bei schwierigen Klonierungen oder solchen, bei denen viele Kolonien auf Transpositionereignisse überprüft werden sollten, wurde ein „Colony screen“ mittels PCR durchgeführt.

In ein 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß wurden 10 µl Wasser vorgelegt. Mit einer sterilen gelben Spitze wurde eine Einzelkolonie gepickt, auf einer neuen Selektivagarplatte eine Tochterkolonie angeimpft, die Bakterien an der Spitze wurden im Wasser des Reaktionsgefäßes suspendiert und zum Animpfen einer Flüssigkultur zur DNA-Minipräparation in ein Röhrchen mit 5 ml Selektivflüssigmedium abgeworfen. Die Agarplatte mit den Tochterkolonien wurde wie die ursprüngliche Kulturplatte inkubiert, die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37 °C (*E. coli*) geschüttelt. Die Bakterienzellen im Reaktionsgefäß wurden mit folgendem Programm im PCR-Thermocycler aufgeschlossen:

„Knacken“ der Bakterienzellen:

5 Min.	96 °C
90 Sek.	50 °C
90 Sek.	96 °C
1 Min.	45 °C
1 Min.	96 °C
1 Min.	40 °C
∞	8 °C

Die aufgeschlossene Bakteriensuspension wurde als „template“-DNA in einen Standard PCR-Ansatz eingesetzt. Als Primerpaar wurden Oligonukleotide aus dem Bereich des Insert-Fragments oder des Vektors (z. B. Promotor) oder ein Primer aus dem Insert-Fragment und einer aus dem Vektor verwendet.

PCR-Ansatz:

2 µl 10 x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂
 0,4 µl 2 mM dNTPs
 0,5 µl 10 µM Primer 5'
 0,5 µl 10 µM Primer 3'
 0,1 µl Haustaq
 6,5 µl H₂O

Programm:

	2 Min.	94 °C	Denaturierung der „template“-DNA

28 Zyklen:	30 Sek.	94 °C	Denaturierung der „template“-DNA
	30 Sek.	var. °C	Anlagerung der Primer („annealing“)
	2 Min.	72 °C	Polymerisation (Synthese des Zweitstranges)

	∞	8 °C	Kühlung des PCR-Produkts bis zur Weiterverarbeitung

Die PCR-Ansätze wurden nach der Reaktion auf einem Agarosegel (3.1.6) aufgetrennt. Von Proben, die eine positive Bande aufwiesen, wurde aus der Übernachtflüssigkultur DNA isoliert (3.1.3).

3.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung definierter DNA-Sequenzen wurde die „polymerase chain reaction“ (PCR) nach dem Protokoll von Saiki und Mitarbeitern (1988) und Bej und Mitarbeitern (1991) angewandt. Mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen (z. B. High Fidelity PCR Enzyme Mix) und synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (Primern) können bestimmte DNA-Fragmente so stark amplifiziert werden, dass sie im Agarosegel detektierbar sind. Durch Variation der Anlagerungstemperatur der Primer („annealing“) oder der Mg²⁺-Ionenkonzentration ist eine Beeinflussung der Spezifität der Reaktion möglich.

Alle Ansätze wurden auf Eis in dünnwandigen 0,5 ml Reaktionsgefäßen von Corning Costar, Bodenheim (#6530) pipettiert.

Die Reaktionen wurden im programmierbaren Thermoblock mit Peltier-Element und beheizbarem Deckel (Mastercycler der Firma Eppendorf, Hamburg) mit nachfolgend beschriebenen Programm (3.1.11.1) durchgeführt.

Die Amplifizierungsprodukte der PCRs wurden zur Überprüfung auf ihre Richtigkeit über eine Agarosegelelektrophorese (3.1.6) aufgetrennt und eventuell für eine anschließende Klonierung aus der Gelmatrix eluiert (3.1.7).

3.1.11.1 High Fidelity PCR

Um DNA-Sequenzen für Klonierungen zu amplifizieren, wurden alle PCR-Reaktionen mit dem High Fidelity PCR Enzyme Mix durchgeführt. Dieser Polymerase-Mix besteht aus einer *Taq* DNA-Polymerase und einer *Pfu* DNA-Polymerase, welche eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität besitzt, um Mutationen in den PCR-Produkten zu minimieren. Mit äußerster Genauigkeit der DNA-Synthese erhöht es die Länge und Ausbeute der zu amplifizierenden Produkte. Der High Fidelity PCR Enzyme Mix amplifiziert Genome bis zu 10 kb. Die Genauigkeit dieses Mix ($5,2 \times 10^{-6}$ Fehler pro Nukleotid pro Zyklus) ist 4 Mal höher als die der *Taq* DNA Polymerase ($2,2 \times 10^{-5}$ Fehler pro Nukleotid pro Zyklus) allein.

Reaktionsansatz:

- 1-100 ng „template“-DNA
- 5 µl 10 x High Fidelity PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂
- 1 µl 2 mM dNTPs
- 2 µl 10 µM Primer 5'
- 2 µl 10 µM Primer 3'
- 0,5 µl High Fidelity PCR Enzyme Mix (5u/µl)
- 38,5 µl H₂O

Programm:

	2 Min.	94°C	Denaturierung der „template“-DNA

36 Zyklen:	30 Sek.	94°C	Denaturierung der „template“-DNA
	59 Sek.	var.°C	Anlagerung der Primer („annealing“)
	2 Min.	72°C	Polymerisation (Synthese des Zweitstranges)

	∞	8°C	Kühlung des PCR-Produktes bis zur Weiterverarbeitung

Die variablen (var.) Angaben für die Temperatur der Primeranlagerung bzw. für die Dauer der Zweitstrangsynthese sind abhängig von der optimalen Anlagerungstemperatur des Primerpaares (TaOpt) bzw. der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes (60 Sek. pro 1000 Basen).

3.1.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die über Säulen gereinigte DNA in die Sequenzierreaktionen einsetzen zu können, musste zunächst ihre Konzentration bestimmt werden. Dazu wurden 2 µl der DNA-Lösung in 48 µl H₂O gelöst und in eine UVette[®] (Eppendorf, Hamburg) überführt. Als Referenz diente eine Küvette mit 50 µl H₂O. Zur Messung wurde ein Ultraspec 3000 Spektrophotometer von Pharmacia Biotech, Cambridge verwendet.

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung wird nach folgender Formel berechnet:

Konzentration	=	$[(\text{Absorption } \lambda \text{ 260 nm}) - (\text{Absorption } \lambda \text{ 320 nm})] \cdot F \cdot V^{-1}$
$\lambda \text{ 320nm}$	=	Hintergrundwellenlänge
F [µg/ml]	=	Faktor: 50 für DNA
V	=	Verdünnung; 1:25

3.1.13 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der DNA-Sequenzen erfolgte nach dem von Sanger und Mitarbeitern beschriebenen Didesoxy-Kettenabbruch-Verfahren unter Verwendung von DNA, die über Säulen (2.4.1) gereinigt worden war (Sanger et al., 1977).

Die Proben wurden zur auswärtigen Bearbeitung an die Firma AGOWA GmbH DNA sequencing service (<http://www.agowa.de>, 800 ng gereinigte und luftgetrocknete Plasmid-DNA in 10 µl Aqua bidest.) oder an die Firma MWG Biotech AG (<http://www.mwg-biotech.com>, 1-1,5 µg luftgetrocknete DNA) gesendet.

3.1.14 Herstellung von Bakterien- und Hefestammkulturen

Um Bakterien- bzw. Hefekulturen längere Zeit lagern zu können, wurden 800 µl einer frisch angezogenen Übernachtflüssigkultur mit 200 µl sterilem Glycerin vermischt und in einem verschraubbaren Reaktionsgefäß bei -70 °C eingefroren.

3.1.15 Überexpression von GST-Fusionsproteinen

3.1.15.1 Überexpression zur Analyse von unabhängigen Kolonien

Nach Transformation (3.1.2.2) des entsprechenden pGEX-3X-Expressionsplasmids (2.3.10) in einen *E. coli*-Expressionsstamm (2.2.3) wurden jeweils 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 UpM inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese in 500 ml Rich-Medium, ebenfalls mit 100 µg/ml Ampicillin überimpft und bis zu einem OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Nach Entnahme einer 1 ml Probe aus der uninduzierten Kultur wurde die Überexpression des Fusionsproteins durch die Zugabe von 500 µl 1 M IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (30, 60, 120 und 180 Minuten) wurden weitere 1 ml Proben entnommen. Alle Proben wurden für 2 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und die Zellen bis zum

weiteren Gebrauch (3.2.6 und 3.2.7) bei -20 °C gelagert. Zur Analyse dieser Proben mittels SDS-PAGE (3.2.5) wurden diese aufgetaut und in 125 µl denaturiertem Lysepuffer suspendiert. Nach Zugabe der gleichen Menge 1 x SDS Loading Buffer und 2 M DTT wurden die Ansätze gemischt und für 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation konnte der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen werden. Die restliche Kultur wurde für 10 Minuten bei 4000 x g abzentrifugiert und das Gewicht des Zelniederschlags bestimmt. Die Zellen wurden nun in 25 ml 1 x PBS mit PMSF suspendiert und durch Ultraschallbehandlung (3.1.16.1) und Behandlung mit Lysozym (3.1.16.2) aufgeschlossen.

- **Rich-Medium**

- 10 g Trypton

- 5 g Hefeextrakt

- 5 g NaCl

- 2 g Glucose

- ad 1 l H₂O und 2 ml Ampicillin (50 mg/ml)

- **denaturierter Lysepuffer**

- 8 M Harnstoff

- 100 mM NaH₂PO₄

- 10 mM Tris

- ad 50 ml H₂O

- pH 8,0 einstellen

3.1.16 Reinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli*

3.1.16.1 Aufschluss der *E. coli*-Zellen durch Ultraschallbehandlung

Zum Aufschluss der Bakterien mit dem überexprimierten Fusionsprotein wurde die Zellsuspension für je 30 Sekunden in einem Ultraschallbad behandelt und anschließend auf Eis inkubiert. Dies wurde insgesamt 3 x durchgeführt.

3.1.16.2 Aufschluss der *E. coli*-Zellen durch Lysozymbehandlung

Zum weiteren Aufschluss der Bakterien mit dem überexprimierten Fusionsprotein wurde die mit Ultraschall behandelte Zellsuspension für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 80 µl Lysozym (10 mg/ml) pro Gramm Zellen inkubiert. Anschließend wurde die DNA ebenfalls für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 20 µl DNase I pro Gramm Zellen verdaut. Durch die Zugabe von DNase I in die Zellsuspension werden störende DNA-Reste abgebaut.

3.1.17 Reinigung von Fusionsproteinen mit GST-Affinitätsepitop unter nativen Bedingungen

3.1.17.1 Reinigung durch Elution des Fusionsproteins

Der Gewicht des Zelniederschlags einer 500 ml Expressionskultur (3.1.15.1) wurde bestimmt und in 25 ml 1 x PBS suspendiert. Durch Zugabe von 250 µl 100 mM PMSF (Endkonzentration 1 mM) wurden Proteasen inhibiert. Nach Aufbrechen der Zellen durch Ultraschall (3.1.16.1) und Lysozymbehandlung (3.1.16.2) wurden 1,5 ml 20 % Triton X-100 zugegeben. Um die Proteine besser in Lösung zu bekommen, wurde die Zellsuspension anschließend für 30 Minuten bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C konnte der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C unter leichtem Schütteln erfolgte nach Zugabe von 2 ml GST-Affinitätsmatrix „Glutathion Sepharose 4B“ (2.8), um das GST-Fusionsprotein an die Affinitätsmatrix zu binden. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 500 x g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig von der beladenen Matrix abgehoben. Die beladene Matrix wurde in 20 ml 1 x PBS, das 20 mM EDTA und 1 mM PMSF enthielt, aufgenommen und in eine Chromatographiesäule (2.10) überführt.

Nachdem die Lösung abgelaufen war, wurde die Matrix zweimal mit 20 ml 1 x PBS, das 20 mM EDTA und 1 mM PMSF enthielt, gewaschen. Anschließend wurde der Ablauf der Säule verschlossen, 1 ml GST-Elutionspuffer, der reduziertes Glutathion enthielt, zur beladenen Matrix gegeben und vorsichtig suspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurde das Eluat aufgefangen und die Elution weitere viermal wiederholt. Die Eluate konnten bei 4 °C gelagert werden.

Um proteolytische Spaltungen im Verlauf der Reinigung zu vermeiden, wurde zusätzlich in allen Eluaten 5 µl Proteaseinhibitorlösung pro ml Puffer eingesetzt.

- **1 x PBS**
 - 140 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 1,8 mM KH₂PO₄
 - ad 1 l H₂O
 - pH 7,3 (mit HCl)
 - mit 0,45 µm sterilfiltrieren

- **GST-Elutionspuffer**
 - 10 mM Glutathion
 - 50 mM Tris/HCl pH 8,0

- **100 mM PMSF-Stammlösung**
 - 174 mg Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) in 10 ml Isopropanol
 - in 1 ml aliquotieren und bei -20 °C lagern

- **Proteaseinhibitorlösung**
 - 8 mg Benzamidin
 - 5 mg Aprotinin
 - 5 mg Leupeptin
 - 5 mg Phenanthrolin
 - lösen in 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 - 130 mM NaCl
 - 1 % Triton X-100
 - + 100 µl 100 mM PMSF in Isopropanol

Zur Auswertung der Proben wurden diese in 1 x SDS Loading Buffer mit 2 M DTT gekocht, abzentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel (3.2.5) aufgetragen.

3.1.17.2 Reinigung durch Spaltung des GST-Fusionsproteins mit Faktor Xa

Das lösliche GST-Fusionsprotein einer 500 ml Expressionskultur (3.1.15.1) wurde wie unter 3.1.17.1 beschrieben an die GST-Affinitätsmatrix (2.8) gebunden und in eine Chromatographiesäule (2.10) überführt. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 20 ml 1 x PBS, das 20 mM EDTA und 1 mM PMSF enthielt, wurde GST-Elutionspuffer auf die beladene Matrix gegeben und das GST-Fusionsprotein eluiert (3.1.17.1). Anschließend wurden 200 µl des Eluats mit 6 µl 5 M NaCl (Endkonzentration 150 mM), 2 µl 100 mM CaCl₂ (Endkonzentration 1 mM) und 2 µl Faktor Xa (2.9) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.1.18 Aminoacylase-Funktionsassay

Hierfür wurde das zu testende Enzym (Aminoacylase) mit verschiedenen Substratlösungen (N-Acetyl-L-Methionin, N-Acetyl-L-Alanin oder Hippursäure in einer Endkonzentration von 100 mM) und 50 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Abstopfung der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) bis zu einer Endkonzentration von 5 %. Nach kurzem „Vortexen“ und einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Ansätze bei 12000 x g für 5 Minuten

abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit weiteren 450 μl 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und 37,5 μl Fluorescaminlösung (10 mg/33 ml Aceton) versetzt, gemischt und nochmals 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun konnten die Ansätze bei einer Wellenlänge von 365 nm oder unter UV-Licht betrachtet werden. Die quantitative Messung erfolgte im SpectraFluor bei einer Excitation von 390 nm und einer Emission von 510 nm.

Durch die Aktivität der Aminoacylase werden N-acetylierte Aminosäuren unter Abspaltung der Acetylgruppe zu freien Aminosäuren hydrolysiert. Fluorescamin reagiert dabei mit diesen deacetylierten Aminogruppen zu einem stark fluoreszierenden Addukt (Udenfriend et al., 1972; Pushkin et al., 2004).

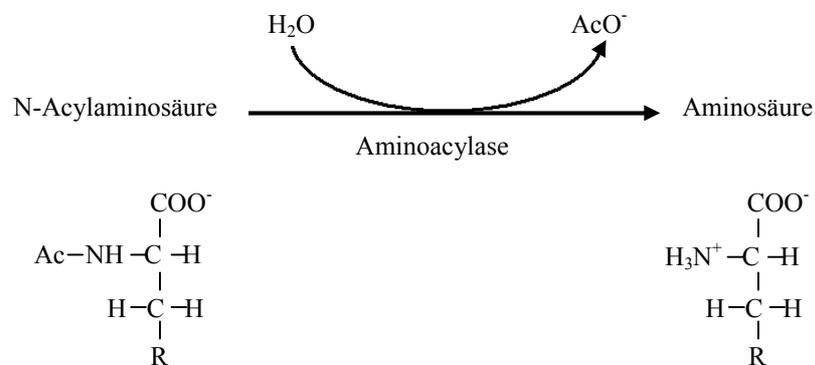


Abb. 3.1-1: Deacetylierung von N-acetylierten Aminosäuren durch Aminoacylasen

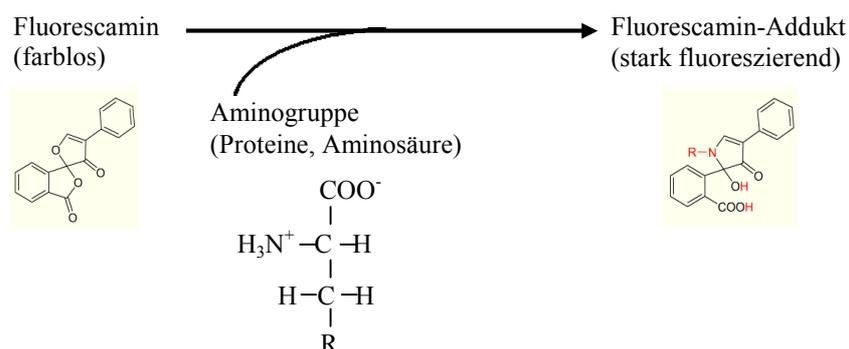


Abb. 3.1-2: Nachweis von freien Aminogruppen durch Fluorescamin

3.2 Arbeiten mit Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Ein Großteil der in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Methoden ist im Hefe-Protokoll-Handbuch von Clontech, Heidelberg ausführlich beschrieben.

3.2.1 Hefemedien

3.2.1.1 YPAD-Medium

Die verwendeten Hefestämme (2.2.4) wurden in diesem Medium angezogen. Adenin wurde zusätzlich beigefügt, weil reines YPD arm an dieser essentiellen Base ist.

- **YPAD-Medium**

- 20 g Pepton
- 5 g Hefeextrakt
- 40 mg Adenin
- ad 950 ml H₂O
- pH 6,0 (mit H₂SO₄)
- autoklavieren

Für Festmedium wurden 15 g Agar auf einen Liter Medium gegeben. Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml einer sterilen 40 % Glucose-Lösung zugegeben.

3.2.1.2 SD-Medium

Dieses Minimalmedium, versetzt mit der geeigneten Drop-in-Lösung und Glucose, wurde zur Selektion auf Plasmide in Hefen benutzt.

- **SD-Medium**

- 1,7 g Hefegrundmedium ohne (NH₄)₂SO₄ und Aminosäuren
- 5 g (NH₄)₂SO₄
- ad 850 ml H₂O
- pH 5,9 (mit NaOH)
- autoklavieren

Für Festmedium wurden 15-20 g Agar auf einen Liter Medium gegeben.

Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml der entsprechenden 100 x Drop-in-Lösung, die nur die essentiellen Aminosäuren enthielt sowie 50 ml sterile 40 % Glukose-Lösung zugegeben.

häufig verwendete SD/Drop-in-Medien:

<u>SD-Medium</u>	<u>Verwendung</u>
SD-U	Selektion auf pYEGFP
SD-LU	Selektion auf pGAD Δ und pYEGFP
SD-LT	Selektion auf beide Plasmide des Split Ubiquitin Systems: pBT3-C bzw. pBT3-N und pPR3-N
SD-LTH / SD-LTHA	Durchmusterung einer cDNA-Bank, Interaktionstests

Als Grundlage dieser Lösungen dienten 100-fach konzentrierte Aminosäuren, deren Kombination die Selektionskraft des Minimalmediums ausmacht. Die Konzentrationen der unterschiedlichen Stocklösungen sind nachfolgend angegeben (in Klammern: Kürzel von AS, deren Synthese durch ein Plasmid ermöglicht werden kann).

- **100 x Drop-in-Lösung**

L-Histidin/HCL Monohydrat (H)	2 g/l
L-Leucin (L)	10 g/l
L-Lysin/HCL	3 g/l
L-Methionin	2 g/l
L-Tryptophan (T)	2 g/l
L-Uracil (U)	2 g/l

Alle Drop-in-Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 μ m) und bei 4°C gelagert.

3.2.1.3 SD/3-AT-Medium bzw. SD/X-Gal-Medium

Grundlage ist das unter 3.2.1.2 beschriebene Medium. Um im Split Ubiquitin System die Interaktion zweier Proteine zu testen und zu verifizieren, wurde dem, auf 55 °C abgekühlten SD-Medium, 1 M 3-AT-Lösung (mit 0,2 μ m sterilfiltriert) zugegeben um die Endkonzentration von 0,5 mM bis 20 mM 3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazol) zu erzielen. X-Gal wurde ins abgekühlte SD-Medium gegeben, um eine Interaktion zweier Proteine durch Blaufärbung sichtbar zu machen.

3.2.2 Kultivierung von Hefezellen

Die Hefezellen wurden stets bei 30 °C kultiviert und Flüssigkulturen wurden bei 250 UpM geschüttelt. Hefestämme wurden im Vollmedium YPAD propagiert.

Die verwendeten Hefestämme Cen.PK2, BY4741, YHR206w, YML007w und NMY51 (2.2.4) sind auxotroph für bestimmte essentielle Komponenten ihres Stoffwechsels, d. h. sie können

auf Minimalmedium ohne Leucin, Uracil, Tryptophan oder Histidin (Cen.PK2) bzw. ohne Leucin, Uracil, Histidin oder Methionin (BY4741, YHR206w, YML007w) bzw. ohne Leucin, Tryptophan, Histidin, Adenin oder Uracil (NMY51) nicht wachsen. Über die Transformation von Plasmiden, welche die Auxotrophie komplementierenden Gene enthalten, lassen sich gleichzeitig Fremdgene in Hefezellen einführen. Diese Hefe-Transformanden dienen als Modellsystem um die Eigenschaften der Fremdgene und ihrer Genprodukte zu studieren. Die Komplementation von auxotrophen Markern in *Saccharomyces cerevisiae* entspricht der Selektion auf Antibiotikaresistenz in *E. coli*. Zur Selektion auf Plasmide in Hefe wurde das SD-Minimalmedium verwendet, das je nach Zugabe von entsprechender Drop-in-Lösung auf die verschiedenen Hefetypen anwendbar ist (siehe oben).

3.2.3 Transformation von Hefezellen

Um Plasmide in Hefezellen zu transformieren, wurde nach dem Protokoll von Dohmen et al. (1991) vorgegangen. Die Effizienz der Transformation war unabhängig von der Qualität der Plasmid-DNA. Es genügte daher auch DNA aus einer Präparation von geringen Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli*, die nicht weiter gereinigt wurde.

3.2.3.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

3.2.3.1.1 Cen.PK2, NMY51, BY4741, YML007w und YHR206w

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde eine 5 ml Übernachtskultur in YPAD-Medium herangezogen. Die Kultur wurde bei 3000 x g für 10 Minuten abzentrifugiert und der Zellschlag in 500 µl des Überstandes suspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurde eine 100 ml YPAD-Kultur inokuliert und bei 30 °C und 250 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 x g geerntet und in 20 ml Lösung A gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden sie in 2 ml Lösung A suspendiert und in 100 µl Aliquots schrittweise bei -70 °C in einem Styroporbehälter eingefroren und gelagert. Die Zellen können mehrere Monate gelagert werden ohne einen wesentlichen Verlust ihrer Kompetenz.

3.2.3.1.2 Transformation von Hefezellen

Zur Transformation der bei 3.2.3.1.1 beschriebenen kompetenten Hefezellen wurde 0,1-1 µg Plasmid-DNA zu 50 µg Lachssperma-DNA (10 mg/ml) gegeben und auf ein Aliquot der gefrorenen, kompetenten Hefezellen pipettiert. Nach dem Auftauen der Hefezellen bei 37 °C für drei Minuten wurde 1 ml Lösung B zugegeben, gemischt und eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 14000 UpM für 20 Sek. geerntet und in 800 µl Lösung C gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden sie in 100 µl Lösung C suspendiert und auf einer geeigneten SD/Drop-in Platte

ausplattiert. Nach etwa zwei Tagen konnte man die ersten Kolonien erkennen und nach drei Tagen konnten diese Kolonien für weitere Versuche verwendet werden.

- **Lachssperma-DNA** (Träger-DNA)
2 mg/ml

Für die Träger-DNA wurden 200 mg Lachssperma-DNA (D1626; Sigma-Aldrich, Steinheim) in 100 ml sterilem H₂O durch Auf- und Abpipettieren sowie zwei bis drei Stunden Rühren gelöst. Aliquots von je 1 ml wurden anschließend für fünf Minuten im Wasserbad gekocht, sofort in einem Eis/Wasser-Bad abgeschreckt und bei -20 °C gelagert.

- **Lösung A**
10 mM Bicine
1 M Sorbitol
3 % Ethylenglycol (v/v)
pH 8,35
- **Lösung B**
200 mM Bicine
40 % Polyethylenglycol 1000 (w/v)
pH 8,35
- **Lösung C**
10 mM Bicine
150 mM NaCl
pH 8,35

Der pH-Wert der Bicine-Puffer wurde mit KOH eingestellt. Alle Lösungen wurden autoklaviert. Nur Lösung A musste bei -20 °C gelagert werden.

3.2.4 Proteinextraktion aus Hefezellen

3.2.4.1 Methode nach Printen und Sprague (1994)

Um Proteine aus Hefezellen zu gewinnen, wurde nach Printen und Sprague (1994) vorgegangen. Die Zellen einer 10 ml Kultur in Minimalmedium wurden 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 3000 x g abzentrifugiert. Der Zellschlag wurde mit 1 ml Wasser gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt konnte er

entweder in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -70 °C eingefroren oder sofort weiter verarbeitet werden.

Zum Aufschluss der Zellen wurden sie in $95\text{ }\mu\text{l}$ 1 x SDS-Ladepuffer und $5\text{ }\mu\text{l}$ 2 M DTT suspendiert und 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Anschließend wurden sie in einer Tischzentrifuge für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte direkt zur gelelektrophoretischen Analyse verwendet werden.

- **5 x SDS-Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)**
313 mM Tris/HCl pH 6,8
10 % SDS
50 % Glycerin
0,05 % Bromphenolblau
- **1 x SDS Ladepuffer**
200 μl 5 x SDS Ladepuffer
800 μl H_2O
- **20 x DTT (2 M; MBI Fermentas, St. Leon-Rot)**

3.2.4.2 „Cathy’s no boil yeast extracts“

Um Proteine aus Hefezellen zu gewinnen, wurden die Zellen einer 15-20 ml Kultur in Minimalmedium für 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde mit 1 ml Wasser gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nach Zugabe von $60\text{ }\mu\text{l}$ SDS-Probenpuffer und ca. 100 mg Glasperlen (zuvor für 2 h bei 100 °C inkubiert, um eventuell vorhandene Proteasen abzutöten) bei 4 °C wurde der Zelleniederschlag sofort für 90 Sekunden auf dem „Vortex“-Schüttler aufgeschlossen. Dabei wurden sie immer wieder auf Eis gekühlt. Nach einem 2-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte nun zur gelelektrophoretischen Analyse verwendet werden.

- **5 x SDS-Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)**
313 mM Tris/HCl pH 6,8
10 % SDS
50 % Glycerin
0,05 % Bromphenolblau

- **1 x SDS-Ladepuffer**
200 µl 5 x SDS Ladepuffer
800 µl H₂O
- **SDS-Probenpuffer**
1 x SDS-Ladepuffer
5 % β-Mercaptoethanol
50 mM NaF
1 mM PMSF
- **„glass beads“ (Glasperlen), „unwashed“, 425-600 µm (Sigma-Aldrich, Steinheim)**

3.2.5 Analyse von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Gele konnten zum spezifischen Nachweis von Proteinen in eine Immundetektion eingesetzt werden. Das relative Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurde anhand eines zusätzlich aufgetragenen Größenstandards abgelesen.

- **Lösung I**
18,3 g Tris
115 µl TEMED
ad 100 ml H₂O
pH 8,9 (mit HCl)
- **Lösung III**
6,1 g Tris
230 µl TEMED
ad 100 ml H₂O
pH 6,8 (mit HCl)
- **Acrylamidlösungen (Roth, Karlsruhe)**
Gel 30

- **1 x Elektrophorese-Puffer**

- 3 g Tris
- 14,4 g Glycin
- 1 g SDS
- ad 1 l H₂O

Vor dem Gießen des Gels wurden folgende Lösungen stets frisch angesetzt:

- **Trenngel (15 %)**

- 3,5 ml Gel 30
- 1,75 ml Lösung I
- 70 µl 10 % SDS
- 1,68 ml H₂O
- 175 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat)

- **Sammelgel**

- 470 µl Gel 30
- 875 µl Lösung III
- 35 µl 10 % SDS
- 2,12 ml H₂O
- 87,5 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat)

Nach Zugabe der APS-Lösung musste das Gel sofort gegossen werden, da diese als Katalysator für die Polymerisation des Acrylamids wirkt.

Eine Glasplatte und eine Aluminiumoxidplatte, die durch Spacer der Dicke 1 mm getrennt waren und durch Metallklammern zusammengehalten wurden, wurden an der unteren Seite mit 1 % Agarose abgedichtet. Das Trenngel wurde zuerst zwischen die Platten gegossen und vorsichtig mit H₂O überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser mit Papier abgesaugt, ein Probenkamm eingefügt und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet. Der Kamm wurde nach Polymerisation des Sammelgels entfernt und das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer (Mighty Small II SE 250 der Firma Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) eingespannt und mit 1 x Elektrophorese-Puffer versetzt. Die Proteinproben wurden mit Ladepuffer verdünnt, mit DTT (1 µl in 20 µl Probe) versetzt und 5 Minuten im Wasserbad gekocht (3.2.4.1) bzw. mit SDS-Probenpuffer verdünnt und mit 100 mg Glasperlen auf dem „Vortex“-Schüttler aufgeschlossen (3.2.4.2). Das Gel wurde mit je 20 µl Probe beladen. Der Gellauf erfolgte bei ca. 120 V für 1-2 Stunden.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Gele zur Sichtbarmachung der Proteine entweder mit „Coomassie“-Färbelösung angefärbt (3.2.6) oder in eine Immundetektion (3.2.7) eingesetzt.

3.2.6 Anfärbung von Proteingelen („Coomassie“-Färbung)

Nach der SDS-PAGE (3.2.5) wurde das Sammelgel vollständig abgetrennt und das Trenngel für mindestens 20 Minuten bis über Nacht in der „Coomassie“-Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 1 Stunde in Schnellentfärber teilweise entfärbt. Die vollständige Entfärbung fand in 5 % Essigsäure statt. Zur Dokumentation des Gels wurde dieses am Computer eingescannt.

- **„Coomassie“-Färbelösung**
 - 450 ml Wasser
 - 450 ml Methanol
 - 100 ml Eisessig (Essigsäure)
 - 2,5 g Coomassie Brilliant Blue (R-250; Serva, Heidelberg)

- **Schnellentfärber**
 - 430 ml Wasser
 - 500 ml Methanol
 - 70 ml Eisessig (Essigsäure)

3.2.7 Immundetektion von Proteinen („Western-Blotting“)

3.2.7.1 Proteintransfer

- **„Western Blot“-Puffer**
 - 5,45 g Tris
 - 25,9 g Glycin
 - ad 1620 ml H₂O
 - + 180 ml Methanol

Um Proteine spezifisch nachweisen zu können, wurden diese nach Auftrennung mittels SDS-PAGE (3.2.5) auf eine Nitrocellulosemembran (BioTrace[®] NT, Pall Corporation, Pensacola, USA) transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert, wobei das sekundäre Antiserum mit HRP (Meerrettich Peroxidase) gekoppelt war. Der Protein-Antikörper-Komplex konnte somit durch Nachweis der Peroxidaseaktivität mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen werden.

Nach der SDS-PAGE (3.2.5) wurde das Sammelgel vollständig abgetrennt. Mit dem Trenngel und der Nitrocellulosemembran wurde in einer Schale, gefüllt mit „Western Blot“-Puffer, folgende Anordnung aufgebaut:

Lochplatte am (-)-Pol (schwarz)
Schwammtuch
2 Schichten Whatman® Chromatography paper
Polyacrylamidgel (Trenngel)
Nitrocellulosemembran
2 Schichten Whatman® Chromatography paper
Schwammtuch
Lochplatte am (+)-Pol (rot)

Diese Anordnung wurde in einen Criterion™ Blotter (Bio-Rad, München) gegeben und dieser mit „Western Blot“-Puffer aufgefüllt. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 1 A für 30-40 Minuten auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

3.2.7.2 Immundetektion

- **TBS**
20 mM Tris/HCl pH 7,5
500 mM NaCl
- **TTBS**
0,5 ml Tween 20
auf 1 l TBS
- **Blockierungslösung**
5 % Magermilchpulver (Fluka, CH)
in TTBS
- **Solution A**
200 ml 0,1M Tris/HCl pH 8,6
50 mg Luminol
- **Solution B**
11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO

- **ECL-Detektionsreagenz (für eine 13 x 7 cm große Membran)**

4 ml Solution A

1,2 µl 30 % H₂O₂

400 µl Solution B

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht in Blockierungslösung bei 4 °C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz mit TTBS abgespült und danach mit 5-6 ml Antikörperlösung eingeschweißt und für 1-3 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde dreimal für 10 Minuten mit TTBS und einmal für 10 Minuten mit TBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran mit „anti-rabbit“ bzw. „anti-mouse“ HRP Conjugate für 1-2 Stunden und ein erneutes Waschen, dreimal 10 Minuten mit TTBS und einmal 10 Minuten mit TBS. Der Nachweis der Antikörper mit der gebundenen Peroxidase erfolgte in einer auf Luminol basierenden Chemilumineszenzreaktion mit ECL-Detektionsreagenz. Dazu wurde die Membran in der ECL-Detektionsreagenz für 2 Minuten inkubiert. Danach wurde sie in Klarsichtfolie verpackt und ein Autoradiographie-Film (Fuji Super RX, Fuji, Düsseldorf) aufgelegt. Der Röntgenfilm wurde je nach Stärke der Reaktion zwischen wenigen Sekunden und 2 Stunden exponiert und anschließend entwickelt.

3.2.8 Vorbereitung der Vektoren

Die von Mo Bi Tec in Göttingen bezogenen Plasmide pBT3-C, pBT3-N und pPR3-N (2.3.6, 2.3.7 und 2.3.8), die selbsthergestellten pYEGFP (2.3.5) und pGADΔ (2.3.4.1), der Expressionsvektor pGEX-3X (2.3.10) und der binäre Vektor pTAK35Scah (2.3.13) wurden wie unter 3.1.2.2 beschrieben in *E. coli* DH5α transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin (pPR3-N, pYEGFP, pGADΔ und pGEX-3X) bzw. Kanamycin (pBT3-N, pBT3-C und pTAK35Scah) ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden in Flüssigkulturen angeimpft (LB-Medium mit Ampicillin bzw. Kanamycin), um die Plasmide wie unter 3.1.3 beschrieben aus den Bakterien zu präparieren. Nach einem Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym BamHI (pPR3-N, pBT3-N, pBT3-C und pYEGFP) bzw. Sall/EcoRI und Sall/XbaI (pYEGFP) bzw. EcoRI (pGEX-3X) bzw. BamHI/SacI (pTAK35Scah) und anschließender Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem 1 % Agarosegel (3.1.6), konnte festgestellt werden, dass die richtigen Plasmide in *E. coli* DH5α transformiert wurden. Um möglichst viel DNA zu bekommen, wurden neue Flüssigkulturen (LB-Medium mit Ampicillin bzw. Kanamycin) angeimpft und die Präparation der Vektoren pPR3-N, pBT3-C, pBT3-N und pYEGFP aus den Bakterien mittels QIAfilter Maxi Kit (Qiagen, Hilden; 2.4.1) durchgeführt. Der DNA-Gehalt wurde im Photometer gemessen (3.1.12).

pGADΔ, pGEX-3X und pTAK35Scah wurden aus einer Gefrierkultur in Flüssigmedium (LB-Medium mit Ampicillin bzw. Kanamycin) angeimpft, um mittels Perfectprep® Plasmid Mini (Eppendorf, Hamburg; 2.4.1) reine DNA zu bekommen. Da diese Vektoren nur für die Klonierung der BHRF1-Proteine (pGADΔ) bzw. der Aminoacylase aus Tabak (pGEX-3X und pTAK35Scah) vorgesehen waren, wurde davon nicht so viel DNA benötigt wie von den anderen Vektoren.

Alle verwendeten Vektoren wurden nach Verdau (3.1.5) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen durch Phenolextraktion und Ethanolfällung (3.1.4) gereinigt.

pYEGFP und pTAK35Scah (nach BamHI-Verdau), pPR3-N (nach SmaI- bzw. BamHI-Verdau), pBT3-C und pBT3-N (nach SfiI-Verdau) und pGEX-3X (nach EcoRI-Verdau) wurden zusätzlich dephosphoryliert (3.1.8), um die Religation des Vektors zu verhindern.

3.2.9 Quantitativer Test einer Protein-Protein-Interaktion im Hefezweihybridsystem

Mit den in 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Methoden lässt sich eine Protein-Protein-Interaktion qualitativ bestimmen. Das *lacZ*-Reportergen kann, ergänzend dazu, für einen quantitativen Test der Interaktion zweier Proteine verwendet werden, da die β -Galaktosidase-Aktivität proportional zur Affinität der interagierenden Proteine ist. Die Verbindung O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) dient dabei als Substrat der β -Galaktosidase. Für den quantitativen Interaktionstest wurde eine 5 ml Übernachtskultur der Co-Transformanten in Minimalmedium bis zu einer OD_{600} von 1,0-1,5 kultiviert. Mit 1000 μ l dieser Kultur wurde zunächst die OD_{600} bestimmt. 700 μ l von den 1000 μ l wurden anschließend zum Aufschluss der Hefezellen verwendet. Die Zellen wurden für 5 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Zellniederschlag in 100 μ l Z-Puffer suspendiert und 1 Minute in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Zellen anschließend im Wasserbad bei 37 °C wieder aufzutauen (das Einfrieren und Auftauen wurde dreimal wiederholt). Anschließend wurden 700 μ l Z-Puffer/ β -Mercaptoethanol zugegeben. Ein Ansatz ohne Zellen wurde parallel als Nullprobe angesetzt. Nach Zugabe von 160 μ l ONPG-Lösung wurde eine Stoppuhr gestartet und die Reaktionsansätze bei 30 °C und 250 UpM inkubiert. Die Farbreaktion, in der bei Expression des *lacZ*-Reportergens, das Substrat ONPG durch die β -Galaktosidase in ein gelbes Endprodukt umgesetzt wird, kann nach wenigen Minuten bis zwei Stunden mit 400 μ l 1 M Na_2CO_3 -Lösung abgestoppt werden. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation wurde von einem Aliquot des Überstands die OD_{420} bestimmt. Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase berechnet sich wie folgt (Miller, 1972):

$$\begin{aligned} \text{relative } \beta\text{-Galaktosidase Einheiten} &= 1000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600}) \\ t &= \text{Zeit der Inkubation (in Minuten)} \\ V &= 0,7 \text{ ml (Volumen der Zellsuspension)} \\ \text{OD}_{600} &= \text{Zelldichte der Übernachtskultur} \end{aligned}$$

- **Z-Puffer (/Mercaptoethanol)**

60 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O

40 mM Na₂HPO₄ x H₂O

10 mM KCl

1 mM MgSO₄

pH 7,0 (mit NaOH)

autoklavieren

(2,7 ml β -Mercaptoethanol in 1 l Z-Puffer)

- **ONPG-Lösung**

4 mg/ml in Z-Puffer

wird frisch hergestellt

3.2.10 Transformation und Durchmusterung einer cDNA-Bank im Split Ubiquitin System

Für die Durchmusterung der cDNA-Bank aus *Arabidopsis thaliana* wurde das Aquaporin AtTIP1.1 aus *Arabidopsis* in pBT3-N (pBT3-N:AtTIP1.1) verwendet, da dieses Aquaporin unter den *Arabidopsis* aquaporinen am stärksten mit BHRF1 interagiert. Eine Kolonie des Hefestamms NMY51, welcher mit pBT3-N:AtTIP1.1 transformiert war, wurde in 10 ml SD-Flüssigmedium ohne die Aminosäure Leucin über Nacht bei 30 °C angezogen und anschließend in 100 ml des gleichen Mediums (SD-Medium ohne Leucin) überimpft. Am nächsten Tag wurde der OD₅₄₆-Wert gemessen und die Menge, welche für einen OD₅₄₆-Wert von 0,15 benötigt wird, berechnet. Diese Menge wurde bei 700 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und dann in 200 ml auf 30 °C vorgewärmtes 2 x YPAD-Medium mit 22 ml 40 % Glucose überimpft. Die Zellen konnten bei 30 °C unter Schütteln bis zu einem OD₅₄₆-Wert von 0,6 wachsen. Anschließend wurde die Kultur in vier 50 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 700 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Jeder der vier Zelniederschläge wurde mit 30 ml sterilem H₂O gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Zelniederschlag konnte nun in je 1 ml LiOAc/TE Master Mix suspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen nochmals in je 600 μ l LiOAc/TE Master Mix suspendiert und in vier 50 ml Reaktionsgefäße gegeben. In jeden der vier Ansätze wurden je 7 μ g der *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bank, 100 μ l Lachssperma-DNA

(2 mg/ml) und je 2,5 ml PEG/LiOAc Mix pipettiert. Nach einer Minute auf dem „Vortex“-Schüttler wurden die Ansätze für 45 Minuten bei 30 °C inkubiert, wobei sie alle 15 Minuten gemischt wurden. Nach Zugabe von je 160 µl DMSO und sofortigem Schütteln erfolgte eine 20-minütige Inkubation im Wasserbad bei 42 °C. Die Zellen wurden bei 700 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und in je 3 ml 2 x YPAD suspendiert, um sie schließlich alle zusammenzumischen. Nachdem die Zellen für 90 Minuten bei 30 °C geschüttelt wurden, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Der Zellschlag wurde in 4,8 ml 0,9 % NaCl suspendiert und je 300 µl wurden auf großen SD-Platten (ø 150 mm) ohne die Aminosäuren Leucin (Selektion für pBT3-N), Tryptophan (Selektion für pDSL-Nx) und Histidin (Selektion für die Interaktion), aber mit einer Endkonzentration von 5 mM 3-AT (Selektion für die Interaktion) ausplattiert. Zusätzlich wurden eine 1:100, 1:1000 und 1:10000 Verdünnung in 0,9 % NaCl angesetzt und je 100 µl auf SD-Platten (ø 100 mm) ohne Leucin und Tryptophan ausplattiert, um die Transformationseffizienz berechnen zu können. Aus der Anzahl der gewachsenen Kolonien ergab sich die Anzahl an unabhängigen Transformanden:

1:100 Verdünnung → 75 Kolonien → 360.000 Transformanden

1:1000 Verdünnung → 3 Kolonien → 144.000 Transformanden

1:10000 Verdünnung → 1 Kolonie → 480.000 Transformanden

Mittelwert der Verdünnungen → 328.000 Transformanden

„gesamte Anzahl der Transformanden“ = Anzahl der Kolonien auf den SD-Leu-Trp Platten *
Verdünnungsfaktor * 10 * 4,8

Menge der eingesetzten Plasmid-DNA der cDNA-Bank: 28 µg

$$\text{Transformationseffizienz (Klone/µg DNA)} = \frac{\text{„gesamte Anzahl der Transformanden“}}{\text{Menge der eingesetzten Plasmid-DNA der cDNA-Bank in µg}}$$

Transformationseffizienz = 11714,285 Klone/µg DNA

Die gesamte Anzahl der Transformanden sollte größer als 2×10^6 sein.

Nach 3-4 Tagen konnten die Kolonien der großen SD-Platten mittels „Colony“-PCR (3.1.10) und Plasmidpräparation aus Hefezellen (3.2.11) analysiert werden. Hierfür wurde je eine Hälfte einer einzelnen Kolonie für die „Colony“-PCR verwendet, aus der anderen Hälfte dieser Kolonie wurde die DNA isoliert.

Die „Colony“-PCR wurde mit den Primern pPR3-N rev (pDSL-Nx rev) und pPR3-N fwd (pDSL-Nx fwd) bei einer optimalen „Annealing“-Temperatur von 51,3 °C durchgeführt.

Anschließend wurden die Proben auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt (3.1.6). Die zweite Kolonienhälfte der positiven Proben wurde nun in SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin angezogen und die DNA aus den Hefezellen präpariert (3.2.11). Da diese DNA nur für PCR und Transformation in *E. coli* geeignet ist, wurden die Bakterien mit dieser aus Hefe isolierten DNA transformiert (3.1.2.2). Nach der Regenerierung der Bakterienzellen wurde die Transformation auf LB-Medium mit Ampicillin ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden in Flüssigmedium (LB mit Ampicillin) angezogen und die Plasmid-DNA isoliert (3.1.3). Es wurde ausschließlich Ampicillin ins Medium gegeben, damit gewährleistet werden konnte, dass nur Bakterien mit pDSL-Nx:cDNA-Bank wachsen konnten. Da die DNA der möglichen Klone in den SfiI-Schnittstellen von pDSL-Nx ligiert ist, wurde die Plasmid-DNA einem Restriktionsverdau mit diesem Enzym unterzogen und auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt (3.1.6). Aus den Flüssigkulturen die ein positives Ergebnis lieferten, wurden Gefrierkulturen angelegt (3.1.14). Mit dieser wurden neue Flüssigkulturen angeimpft, um mittels GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, 2.4.1) besonders reine Plasmid-DNA für die anschließende Sequenzierung zu erhalten. Der DNA-Gehalt wurde im Spektralphotometer gemessen (3.1.12).

- **2 x YPAD-Medium**

- 4 % Pepton

- 2 % Hefeextrakt

- 0,004 % Adenin

- autoklavieren

Nach dem Autoklavieren wurden 22 ml einer sterilen 40 % Glucose-Lösung zu 200 ml Medium (Endkonzentration 4 %) zugegeben.

- **LiOAc/TE Master Mix**

- 1,1 ml 1 M LiOAc

- 1,1 ml 10 x TE pH 7,5

- ad 10 ml H₂O

- **PEG/LiOAc Master Mix**

- 1,5 ml 1 M LiOAc

- 1,5 ml 10 x TE pH 7,5

- 12 ml 50 % PEG

3.2.11 Plasmidpräparation aus Hefezellen

Zur Plasmidpräparation aus Hefe wurde eine 5 ml Kultur in entsprechendem Minimalmedium für 2 Tage bei 30°C im Wärmeluftschüttler angezogen. Die Kultur wurde bei 3000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert, der Zelniederschlag mit 1 ml sterilem H₂O gewaschen und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl frisch angesetztem SCE-Suspensionspuffer suspendiert und dann für 40 Minuten unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach wurden 200 µl SDS-Lysepuffer dazugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 5 M Kaliumacetat wurde der Ansatz für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 10000 x g für 10 Minuten um ausgefallene Proteine sowie genomische DNA zu entfernen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5 Volumenanteilen 96 % Ethanol p. a. versetzt. Dann wurde nochmals wie oben zentrifugiert, der Ethanol entfernt und der DNA-Niederschlag für 10-15 Minuten luftgetrocknet und in 50 µl 1 x TE gelöst. Die isolierte DNA ist nur für PCR und Transformation in *E. coli* geeignet.

- **SCE-Lösung**
 - 1,2 M Sorbit
 - 0,1 M Natriumcitrat
 - 10 mM EDTA pH 8,0
 - pH 7,0 (mit HCl)

- **SCE-Suspensionspuffer**
 - 10 ml SCE-Lösung
 - 200 U Lyticase-Enzym
 - 80 µl β-Mercaptoethanol
 - wird frisch hergestellt

- **SDS-Lysepuffer**
 - 2 % SDS
 - 50 mM Tris/HCl pH 8,0
 - 10 mM EDTA pH8,0

- **5 M KAc-Lösung**
 - 49,27 g Kaliumacetat
 - ad 100 ml H₂O

3.2.12 Anfärbung von H_2O_2 mittels 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) in transgenen Hefen (Schopfer et al., 2001)

Die transformierten Hefen wurden in selektivem SD-Flüssigmedium bei 30°C angezogen und nach 2-3 Tagen in neues SD-Medium überimpft. Dieses wurde zusätzlich mit H_2O_2 versetzt, um eine Endkonzentration von 0,05 mM zu erhalten. Nach einer 2-tägigen Inkubation der Hefen bei 30° im Schüttler wurden die Flüssigkulturen für 5 Minuten bei 3000 x g abzentrifugiert und 2 x mit H_2O gewaschen um im Medium noch vorhandenes H_2O_2 zu entfernen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Zelleniederschlag in 1 ml 1 x PBS gelöst, mit 1 μl 1 mM 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA, in DMSO) angefärbt und für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nun konnten die Hefen unter dem Fluoreszenzumkehrmikroskop angeschaut und Aufnahmen gemacht werden.



Abb. 3.2-1: Deacetylierung und Oxidation von 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat

In Zellen diffundiert DCFH-DA durch die Zellmembran und wird enzymatisch durch endogene Esterasen zum hydrophileren nichtfluoreszierenden Leukofarbstoff (leuko = farblos) DCFH deacetyliert. In der Gegenwart von reaktiven Sauerstoffspezies wie H_2O_2 wird DCFH schnell zum fluoreszierenden DCF oxidiert.

3.3 Arbeiten mit Pflanzen

3.3.1 Aufzucht und Kultur im Gewächshaus

Die Aufzucht von Tabak erfolgte unter Gewächshausbedingungen mit mindestens 16 Stunden natürlicher und/oder künstlicher Belichtung pro Tag bei Temperaturen zwischen 22 °C und 28 °C. Die Samen wurden auf MSO-Medium mit Kanamycin in Pikierschalen ausgelegt und zur Keimung sofort ins Licht gestellt. Nach dem Auskeimen wurden die Pflänzchen von den Pikierschalen in Einzeltöpfe mit gedämpfter Erde umgetopft.

- **MSO-Medium**
 - 4,6 g Murashige & Skoog Salze (Duchefa, NL, # M0221)
 - 30 g Saccharose
 - ad 1 l H₂O
 - pH 5,7 (mit KOH)
 - autoklavieren
 - 10 ml 100 x B₅-Vitamine
 - 4 ml Kanamycin (100 mg/ml; Selektion auf transgene Samen mit BHRF1 in pTAK35S)

- **100 x B₅-Vitamine**
 - 10 mg Nicotinsäure
 - 100 mg Thiaminiumchlorid
 - 10 mg Pyridoxolhydrochlorid
 - 1 g myo-Inosit
 - ad 100 ml H₂O
 - sterilfiltrieren (0,2 µm)

3.3.2 Inokulierung von Pflanzen mit TMV

Das Tabakmosaikvirus (TMV) ist ein mechanisch übertragbares Virus. Das bedeutet, dass das Virus über verletzte Epidermiszellen in die Pflanze eindringen kann. Es ist daher möglich Pflanzen durch das Aufreiben einer Virussuspension zu inokulieren, die mit einer feinkörnigen Substanz wie Carborund versetzt ist, um die Pflanzenoberfläche zu verletzen. Für eine systemische (oder eine HR-auslösende) Infektion von Tabakpflanzen wurden pro Blatt jeweils 50 µl eines 1:100 100 mM NaCl verdünnten virushaltigen Pflanzenextrakts auf junge Blätter der Pflanze gegeben. Nach ca. 4-6 Tagen konnten die durch TMV verursachten Nekrosen ausgezählt und statistisch ausgewertet werden.

3.3.3 Isolierung von Proteinen aus Blattmaterial

Zur Proteinextraktion wurden 100 mg Blattmaterial gesammelt. Das Blattmaterial wurde mit der gleichen Menge (in µl) an 1 x SDS-Ladepuffer mit 2 M DTT, bezogen auf das Eigengewicht, mit einem „Destroy“-Stick und Akkubohrer zerkleinert. Das so behandelte Pflanzenmaterial wurde dann für 5 Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend für weitere 5 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte direkt zur gelelektrophoretischen Analyse verwendet werden (3.2.5).

3.3.4 Isolierung von Proteinen aus Blattmaterial und Durchführung eines Cyanamidhydratase-Enzymassays

Hierfür wurden 100 mg Blattmaterial in der 2-fachen Menge 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 auf Eis homogenisiert. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 11000 x g und 4 °C konnte der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Davon wurden je 100 µl in den folgenden Cyanamidhydratase-Enzymassay (3.3.4.1) eingesetzt.

3.3.4.1 Cyanamidhydratase-Enzymassay

100 µl des unter 3.3.4 hergestellten Pflanzenextraktes wurden mit 2 µl 1 M Cyanamid (Substrat) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 12 Stunden konnte das durch die Cyanamidhydratase umgesetzte Cyanamid quantitativ bestimmt werden. Hierfür wurden 60 µl des Ansatzes in folgende Reaktion eingesetzt:

400 µl 0,2 M Na₂CO₃

540 µl H₂O

50 µl 4 % Pentacyanoamineferroat (Eastern Chemical, Smithtown, NY)

Die Reaktion erfolgte für 10 Minuten bei RT und im Dunkeln. Anschließend wurde die Absorption bei 530 nm im Photometer gemessen. Als Nullwert diente der gleiche Ansatz ohne Pflanzenextrakt.

Pflanzenextrakte, die zuvor gekocht wurden, können als Negativkontrolle fungieren.

3.3.5 DAB- bzw. Evans Blue-Färbung

Es wurden Blattscheiben mit dem Korkbohrer ausgestanzt und mit 3,3'-Diaminobenzidinlösung (20 mg DAB in 20 ml 10 mM MES-Puffer pH 6,5 lösen) oder mit 0,3 % Evans Blue-Lösung (in Wasser) in einer 60 ml Spritze inkubiert. Ohne die Blattscheiben zu verletzen, wurde 3 x ein leichter Unterdruck erzeugt. Die Blattscheiben wurden dann entweder 30 Minuten im Sonnenlicht oder 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Die mit DAB behandelten Blattscheiben wurden mit Ethanol/Aceton (4:1) mit 0,15 % TCA entfärbt, jene die mit Evans Blue angefärbt wurden, wurden in Leitungswasser entfärbt. Schließlich konnten die Blattscheiben in 100 % Ethanol fixiert werden.

3.3.6 In vivo Detektion von ROS (H₂O₂) in Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen mit Hilfe von 2',7'-Dichlorofluorescindiacetat (DCFH-DA) (Schopfer et al., 2001)

Die zu testenden Pflanzen wurden für 2 Stunden bei 25°C im Dunkeln inkubiert, um einen möglichst niedrigen Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie H₂O₂ zu erhalten.

DCFH gelangt als verestertes DCFH-DA in Zellen, wo es durch endogene Esterasen deacetyliert wird und als nichtfluoreszierende Komponente gefangen bleibt. Um die Zunahme von extrazellulären ROS zu messen, wurde die Methode von Schopfer et al. (2001) verwendet. Bei dieser Methode wird DCFH-DA zum Membran-impermeablen DCFH deacetyliert bevor es zu Blattstücken der zu untersuchenden Pflanzen in Phosphatpuffer gegeben wird. Auf diese Weise wird die ROS- bzw. H_2O_2 -abhängige Oxidation von DCFH zum fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) vermittelt. Dieser extrazelluläre oxidative Burst kann durch die Zunahme der DCF-Fluoreszenz im flüssigen Inkubationsmedium mit den Blattstücken gemessen werden.

Eine 10 mM DCFH-DA Lösung in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6 wurde für 40 Minuten im Dunkeln bei 25 °C mit 2 mg/ml Esterase (aus Schweineleber) für die Deacetylierung inkubiert. Bevor der Assay durchgeführt werden konnte, wurden je 20 ausgestanzte Blattstücke mit je 1 Nekrose bzw. von der mit H_2O -inokulierten Blatthälfte, für eine Stunde in Petrischalen mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6 inkubiert, um die bis dahin gebildeten ROS zu entfernen. Der Assay wurde anschließend durchgeführt, indem die 20 Blattstücke in je 6 ml 100 μ M deacetyliertem DCFH in Kaliumphosphatpuffer bei 25 °C im Dunkeln geschüttelt wurden. 15 Minuten nach der Zugabe von DCFH wurde eine 300 μ l Probe aus der Lösung entnommen und die Zunahme der Fluoreszenz (Excitation: 485 nm, Emission: 510 nm), welche die ROS-abhängige Oxidation von DCFH zu DCF anzeigt, in einem Fluoreszenz-Spektralphotometer gemessen. Durch Zugabe von 200 μ g/ μ l Katalase konnte die genaue H_2O_2 -Menge berechnet werden.

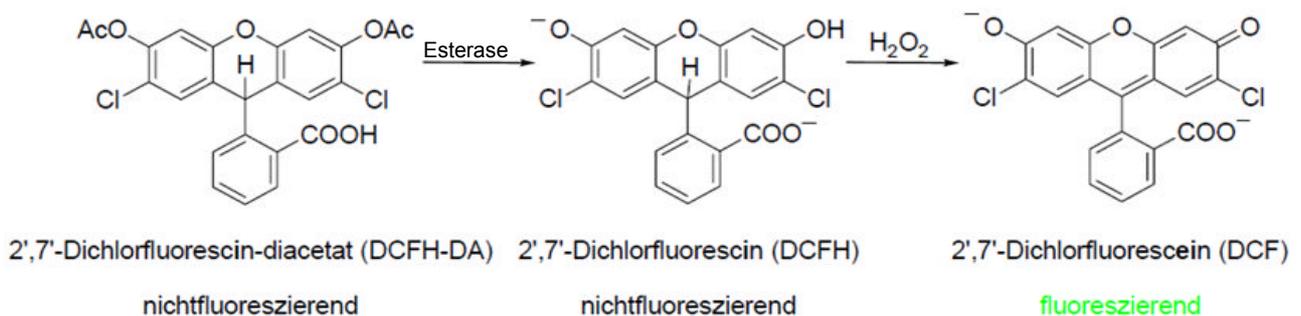


Abb. 3.3-1: Deacetylierung und Oxidation von 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat

3.3.7 Quantitative Detektion von ROS bzw. H_2O_2 mit Hilfe von Xylenol Orange (FOX-Assay)

Zum Nachweis von ROS bzw. H_2O_2 in Pflanzen wurde nach dem Protokoll von Gay und Mitarbeiter (1999) und Bindschedler et al. (2001/2006) vorgegangen. Das Xylenol Orange Reagenz wurde frisch angesetzt und war für 6-8 Stunden stabil. 10 μ l Lösung A wurden zu 1

ml Lösung B gegeben. Blattstücke mit einem Durchmesser von 1,8 cm wurden mit dem Korkbohrer ausgestanzt und in 500 µl H₂O (bidest.) mit einem Pistill homogenisiert. Weitere 500 µl H₂O wurden dazugegeben und gemischt. Nach einer Entnahme von 200 µl wurden diese für 15 Sekunden bei 12000 x g abzentrifugiert und 100 µl des Überstandes sofort zu 1 ml Xylenol Orange Reagenz gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm gegen 1 ml Xylenol Orange Reagenz, das 100 µl H₂O enthält, gemessen. Die Anwesenheit von ROS bzw. H₂O₂ wird durch die Oxidation von Fe²⁺-Ionen zu Fe³⁺-Ionen quantifiziert. Durch Zugabe von 200 µg/µl Katalase konnte die genaue H₂O₂-Menge berechnet werden.

- **Lösung A**

25 mM FeSO₄

25 mM (NH₄)₂SO₄

lösen in 2,5 M H₂SO₄

- **Lösung B**

125 µM Xylenol Orange

100 mM Sorbitol (Katalysator)

- **Xylenol Orange Reagenz**

10 µl Lösung A

1 ml Lösung B

3.3.8 Nachweis von Salicylat in Pflanzen (Gil und Martinez-Merino, 2007)

Zum Nachweis von Salicylat in Pflanzen wurden Blattscheiben mit Spontannekrosen bzw. TMV-Nekrosen bzw. ohne Nekrosen in 1 ml H₂O homogenisiert und für 1 Minute abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden zu 1 ml 0,1 % FeCl₃ gegeben. Die in den Blattproben vorhandene freie Salicylsäure reagiert dabei mit FeCl₃ zu einem Farbkomplex. Die Konzentration der Salicylsäure kann nun im Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden.

3.3.9 Behandlung von Pflanzen mit Pelargonsäure

Pelargonsäure dient als umweltfreundliches Herbizid. Die Fettsäure dringt in die Membran der Pflanzenzellen ein und zerstört diese. Einige Blätter von Tabakpflanzen wurden mit je 20 µl einer 1:6 Verdünnung (Pelargonsäure (Finalsan):H₂O) eingerieben und nach 5 bzw. 9 Tagen ausgewertet.

3.4 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *Nicotiana benthamiana* bzw. *Nicotiana tabacum*

Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation wurde verwendet, um verschiedene Gene stabil in das Genom von *Nicotiana benthamiana* zu integrieren. Für die Transformation der Agrobakterien mit den binären Vektoren wurden folgende Methoden angewandt.

- **5 x MinA-Salze**

52,5 g K_2HPO_4
22,5 g KH_2PO_4
5 g $(NH_4)_2SO_4$
2,5 g Natriumcitrat x 2 H_2O
ad 1 l H_2O
autoklavieren

- **MinA-Medium**

1 ml 5 x MinA-Salze
4 ml H_2O (autoklaviert)
5 μ l 20 % $MgSO_4$ (mit 0,2 μ m sterilfiltriert)
50 μ l 20 % Glucose (mit 0,4 μ m sterilfiltriert)

- **MinA-Platten**

MinA-Medium
+ 1,5 % Agar vor dem Autoklavieren zugeben
 $MgSO_4$, Glucose und Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren zugegeben.

- **Antibiotika-Konzentrationen in MinA-Flüssigmedium und MinA-Platten**

Rifampicin:	Stammlösung: 50 mg/ml in DMSO 100 μ g/ml (f. c.) in Flüssigmedium und Agarplatten
Gentamycin:	Stammlösung: 50 mg/ml in H_2O 50 μ g/ml (f. c.) in Flüssigmedium und Agarplatten
Kanamycin:	Stammlösung: 100 mg/ml in H_2O 50 μ g/ml (f. c.) in Flüssigmedium und Agarplatten

3.4.1 Konjugativer Transfer des binären Vektors pTAK35S aus *E. coli* in *Agrobacterium tumefaciens* („Triparental Mating“)

Das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt des binären Vektors pTAK35ScAh:NtACY wurde via Konjugation aus *E. coli* in *A. tumefaciens* transferiert (Bevan, 1984). Der

Agrobakterienstamm GV3101 (2.2.3) wurde aus einer Stammkultur in 5 ml MinA-Medium (100 µg/ml Rifampicin und 50 µg/ml Gentamycin) überimpft und 2 Tage bei 30°C und 225 UpM im Wärmeluftschüttler angezogen. Einen Tag nach Animpfen der Agrobakterien wurde der *E. coli*-Stamm DH5α mit dem Helferplasmid pRK2013 (2.3.14) und die *E. coli*-Stämme mit den jeweiligen binären Vektoren, die die Sequenz des zu transformierenden Proteins (pTAK35Scah:NtACY) beinhalten in 5 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) angeimpft und über Nacht angezogen. Nach Abzentrifugieren der Bakterien bei 5000 x g für 5 Minuten wurden die *E. coli*-Stämme in 5 ml 10 mM MgSO₄ (sterilfiltriert) und die Agrobakterien in 1 ml 10 mM MgSO₄ (sterilfiltriert) suspendiert. Für den konjugativen Transfer wurden je 50 µl der drei Bakteriensuspensionen zusammen auf eine LB-Platte (ohne Antibiotika) ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Bakterienrasen abgekratzt, in 1 ml LB-Medium suspendiert und mit LB-Medium 1:100 verdünnt. 10 µl dieser Verdünnung wurden auf selektiven MinA-Platten (100 µg/ml Rifampicin, 50 µg/ml Gentamycin und 50 µg/ml Kanamycin (für pTAK35Scah)) ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Als Kontrolle wurden auch Konjugationsansätze von jeweils nur zwei Bakterienstämmen ausplattiert.

Zur Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA aus den erhaltenen Agrobakterienklonen wurden einzelne Kolonien in 5 ml MinA-Medium (100 µg/ml Rifampicin, 50 µg/ml Gentamycin und 50 µg/ml Kanamycin) bei 30°C und 225 UpM für 2 Tage angezogen. Aus 3 ml Kultur wurde nach 3.1.3 eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die Plasmid-DNA der zweiten Fällung wurde in 40 µl 1 x TE aufgenommen und einige Stunden bei 4°C stehen gelassen. Anschließend konnte ein Restriktionsverdau (3.1.5) durchgeführt werden.

3.4.2 Transformation von *A. tumefaciens* durch Elektroporation

3.4.2.1 Herstellung der elektrokompetenten Zellen

Mit einer Gefrierkultur von Agrobakterien wurden 50 ml MinA-Medium (100 µg/ml Rifampicin) in einem 2 l Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 30 °C und 225 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 3000 x g und 4 °C geerntet. Der Zelleniederschlag wurde in 100 ml eiskaltem Waschpuffer suspendiert, anschließend wurde nochmals für 15 Minuten bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgekippt und der Waschschrift wiederholt. Nach erneutem Abkippen des Puffers wurde der Agrobakterienniederschlag im Restüberstand suspendiert und sofort verwendet oder in vorgekühlten Reaktionsgefäßen aliquotiert und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die elektrokompetenten Zellen wurden bei -70 °C gelagert.

- **Waschpuffer**
10 % Glycerin
autoklavieren

3.4.2.2 Elektroporation

Die Elektroporation wurde mit einem Gene Pulser™ und Pulse Controller der Firma Bio-Rad, München nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

40 µl elektrokompente Zellen wurden zusammen mit 1-2 µl DNA in eine eiskalte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm; Bio-Rad, München) gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2,0 kV mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Zeitkonstante von 4-5 Millisekunden. Unmittelbar nach dem elektrischen Impuls wurde 1 ml eiskaltes MinA-Medium in die Küvette gegeben und die Zellen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Regeneration der Zellen erfolgte für 1 Stunde im Schüttler bei 30 °C und 225 UpM. Anschließend wurden 10 % bzw. 90 % der transformierten Zellen auf Selektivagarplatten ausplattiert und im Wärmeschrank bei 30 °C für zwei bis drei Tage inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden über einen „Colony screen“ (3.1.10) auf die Anwesenheit des binären Vektors überprüft.

3.4.3 Agrobacterium-vermittelte Infiltration von *Nicotiana benthamiana*

Die Agrobakterienstämme LBA4404 und GV3101 mit den entsprechenden Plasmiden wurden aus einer Stammkultur in 10 ml selektivem MinA-Medium für 2-3 Tage bei 30°C angezogen. Mit 1000 µl dieser Kultur wurde zunächst die OD₆₀₀ bestimmt. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 x g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Zelleniederschlag mit Infiltrationspuffer (10 mM MgCl₂) auf eine OD₆₀₀ von 0,5-2 eingestellt und Acetosyringon (Endkonzentration von 10-100 µM), welches die vir-Gene aktiviert, zugegeben. Nachdem der Ansatz mit abgeschnittener Spitze suspendiert wurde, erfolgte eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Dann wurde die Blattunterseite einer *N. benthamiana* Pflanze mit einer Kanüle kurz angeritzt, die Spritze im rechten Winkel aufgesetzt und mit dem Finger einen leichten Gegendruck erzeugt, um die Lösung ohne Luftblasen vorsichtig durch die Spaltöffnungen infiltrieren zu können.

Pflanzen 1 Tag vor Infiltration nicht gießen!

- **10 mM MgCl₂-Lösung**
2,168 g MgCl₂
ad 500 ml H₂O
autoklavieren

- **100 mM Acetosyringon (1000x)**

20 mg Acetosyringon

ad 1 ml 70% Ethanol p. a.

bei -20 °C lagern

- **Infiltrationspuffer**

10 mM MgCl₂

100 μM Acetosyringon

MES (optional)

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung transgener Pflanzen

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Roth, 1999; Mast 2000) wurden transgene Tabakpflanzen hergestellt, welche verschiedene Gene aus dem humanen Epstein-Barr Virus (BHRF1, BALF1) bzw. aus dem humanen Genom (Bax, Bik) tragen. Diese Gene gehören zur Bcl-2 Familie. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe BHRF1-transgener Pflanzen untersucht, ob eine Verbindung zwischen Apoptose und PCD in Pflanzen besteht.

4.1.1 Charakterisierung der Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen

Pflanzen, die das anti-apoptotische Protein BHRF1 exprimieren, entwickelten sich zunächst normal, zeigten aber im Verlauf ihrer Entwicklung eine unerwartet starke Nekrosenbildung.

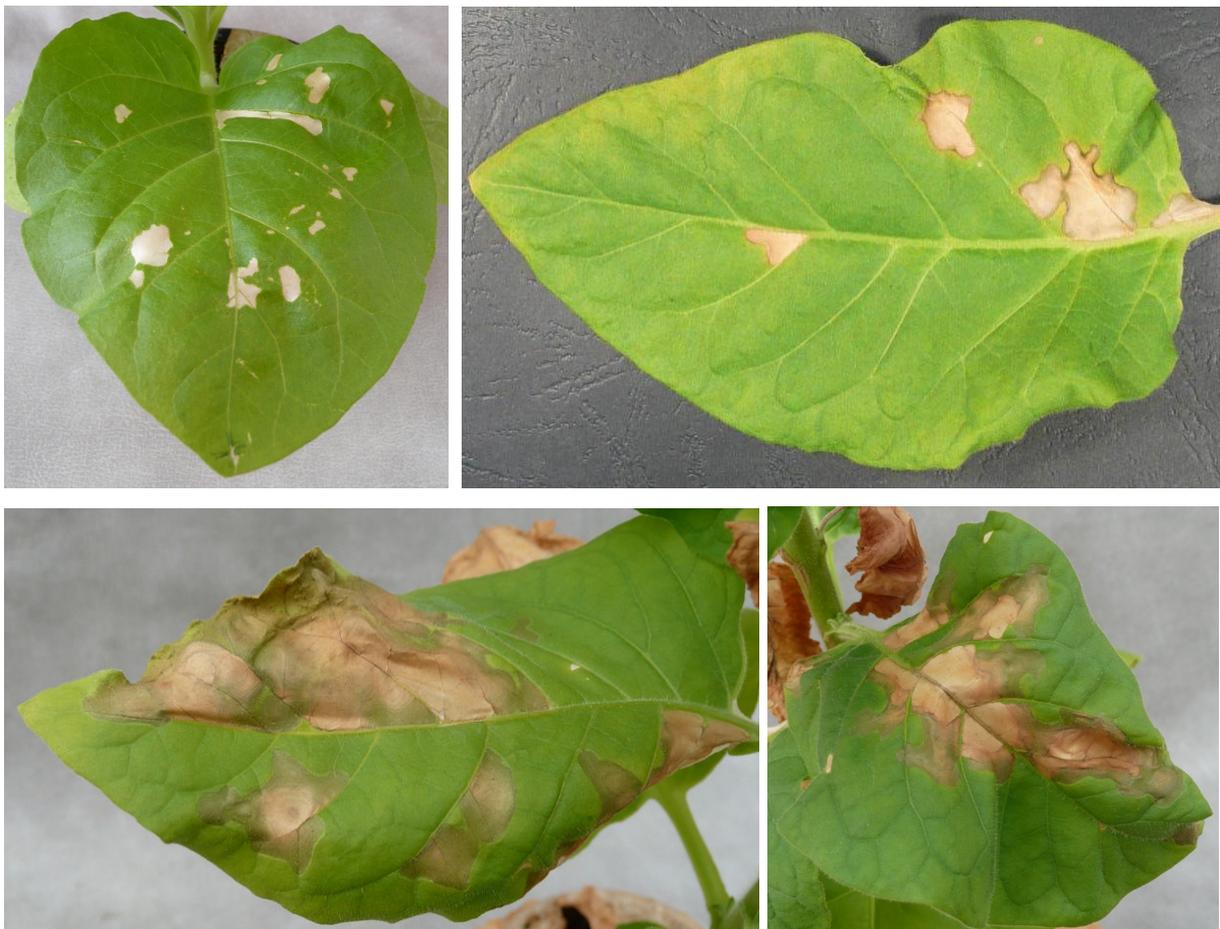


Abb. 4.1-1: Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen

Die vier Fotos zeigen Blätter BHRF1-transgener Tabakpflanzen. Die nekrotischen Bereiche entstanden spontan und zeigten keine geregelte Form.

Diese Nekrosen entstanden spontan und ohne äußere Einwirkungen. Sie zeigten keine geregelte Form und konnten sich über das ganze Blatt ausbreiten. Im Gegensatz zu Nekrosen, die aufgrund einer Hypersensitiven Reaktion (HR), z. B. aufgrund eines Virusbefalles, entstehen, wurde hier kein Salicylat akkumuliert (Roth, 1999; 4.1.3). H_2O_2 wiederum kann in HR-Nekrosen (4.1.2.1 bis 4.1.2.3) sowie in diesen Spontannekrosen nachgewiesen werden (4.1.1.1 bis 4.1.1.3).

4.1.1.1 Nachweis von H_2O_2 im Bereich der Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen

H_2O_2 lässt sich durch DAB (3,3'-Diaminobenzidin) nachweisen, indem es durch dieses reaktive Sauerstoffintermediat (ROI) zu einem braunen Farbstoff oxidiert wird. Einzelne Blattscheiben mit Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen wurden ausgestanzt und mit einer DAB-Lösung infiltriert. Nach einer mindestens 30-minütigen Inkubation und der Entfernung des Chlorophylls ist diese Braunfärbung zu erkennen (3.3.5).

Evans Blue dagegen färbt totes Gewebe an, d. h. Zellen, deren Zellwände löchrig sind und deshalb den blauen Farbstoff durchlassen. Die Anfärbung erfolgte mit einer 0,3 % Evans Blue Lösung. Entfärbt wurde in Leitungswasser.

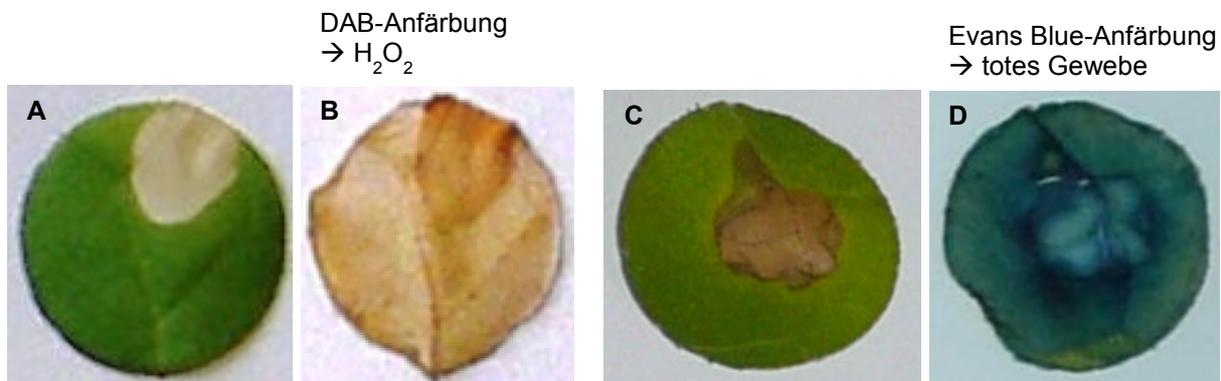


Abb. 4.1-2: DAB- bzw. Evans Blue-Anfärbung von Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen

A und C zeigen eine unbehandelte Blattscheibe mit einer Spontannekrose BHRF1-transgener Pflanzen. Die Aufnahmen der Blattscheiben wurden nach dem Anfärben mit DAB (B) bzw. mit Evans Blue (D) gemacht.

Nach Entfernen des Chlorophylls aus den mit DAB behandelten Blattscheiben wurde die durch H_2O_2 entstandene Braunfärbung im Bereich der Spontannekrose sichtbar (B). Diese zeigt, dass in den Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen H_2O_2 akkumuliert wurde. Durch das Anfärben mit Evans Blue wird totes Blattgewebe blau markiert. Dies ist vor allem um die Spontannekrose deutlich zu erkennen (D). Bei den blau angefärbten Bereichen handelt es sich also um abgestorbene Pflanzenzellen.

4.1.1.2 Quantitative Bestimmung von H_2O_2 mittels Xylenol Orange (FOX-Assay)

Um den H_2O_2 -Gehalt von Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen quantitativ ermitteln zu können, wurden zwei Nachweismethoden angewandt. Zum einen der Nachweis mit Hilfe des Xylenol Orange Reagenz innerhalb des FOX-Assays (3.3.7), zum anderen die Methode mittels 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat (DCFH-DA, 3.3.6).

Dafür wurden aus Blättern mit Spontannekrosenbildung je 2 Blattscheiben ausgestanzt. Eins davon mit Spontannekrosen, das andere ohne Nekrosen. Nachdem die Blattscheiben in H_2O homogenisiert waren, wurde das Blattmaterial vom Überstand getrennt und dieser sofort in den FOX-Assay eingesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation in Xylenol Orange bei RT wurde die Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Die Anwesenheit von H_2O_2 wird durch die Oxidation von Fe^{2+} -Ionen zu Fe^{3+} -Ionen durch H_2O_2 quantifiziert. Xylenol Orange reagiert mit Fe^{3+} -Ionen zu einem Farbkomplex.

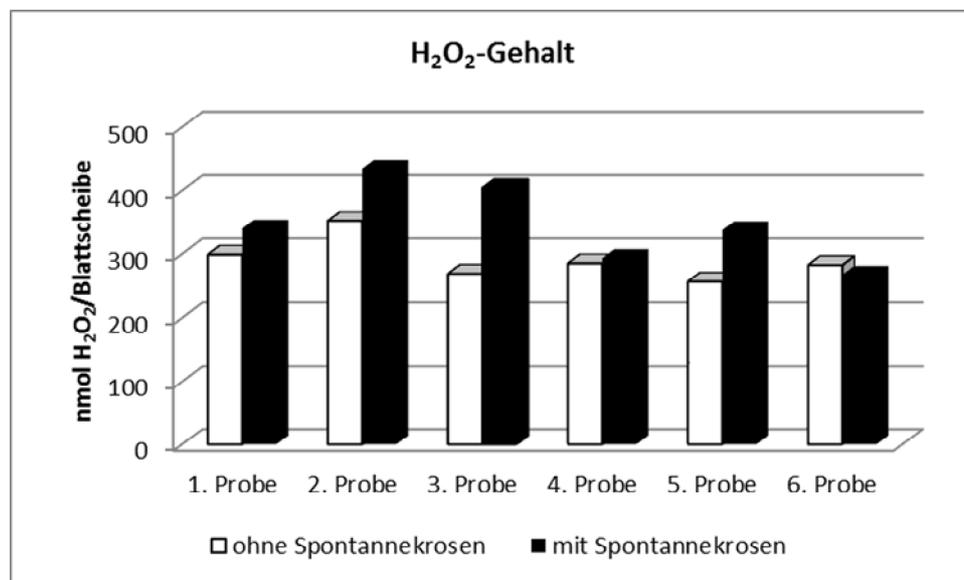


Abb. 4.1-3: Darstellung der H_2O_2 -Menge von Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen

Dargestellt ist die Menge an H_2O_2 in nmol pro Blattscheibe. Die weißen Balken stellen die Werte von Blattproben ohne Spontannekrosen dar, die schwarzen Balken jene mit Spontannekrosen.

Fast alle Blattproben mit Spontannekrosen (schwarze Balken) weisen einen höheren Wert auf als die jeweiligen Kontrollproben (ohne Spontannekrosen, weiße Balken). Es konnten also in den Proben mit Spontannekrosen mehr dreiwertige Eisenionen durch die H_2O_2 -vermittelte Oxidation produziert werden und anschließend mit Xylenol Orange zu einem messbaren Farbkomplex reagieren. Das heißt, je mehr H_2O_2 in den Proben vorhanden war, desto mehr Fe^{3+} -Ionen entstanden, die mit Xylenol Orange zu einem Farbkomplex reagierten und somit zu einer höheren Absorption bei 560 nm führten. Die Tatsache, dass bei den Blattproben ohne Spontannekrosen auch eine Absorption gemessen wurde, beruht darauf,

dass während des normalen Zellmetabolismus H_2O_2 produziert wird und somit immer ein gewisses Grundlevel an Wasserstoffperoxid in den Zellen vorhanden ist.

4.1.1.3 Quantitative Bestimmung von H_2O_2 mittels 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA)

Eine weitere Methode zur Bestimmung von H_2O_2 in Pflanzen stellt die Reaktion von 2',7'-Dichlorfluorescin (DCFH) zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) dar. Dabei gelangt DCFH als verestertes 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) in die Zellen, wo es durch endogene Esterasen deacetyliert wird und als nichtfluoreszierende Komponente gefangen bleibt. Auf diese Weise wird die H_2O_2 -abhängige Oxidation von DCFH zum fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) vermittelt. Dieser extrazelluläre oxidative Burst kann durch die Zunahme der DCF-Fluoreszenz gemessen werden.

BHRF1-transgene Pflanzen mit bzw. ohne Spontannekrosen wurden für 2 Stunden bei 25°C im Dunkeln inkubiert, um ein möglichst niedriges Level an H_2O_2 zu erhalten. Von je 20 ausgestanzten Blattscheiben mit einer Spontanekrose bzw. ohne Spontanekrose wurde das bis dahin gebildete H_2O_2 entfernt und anschließend mit deacetyliertem DCFH im Dunkeln inkubiert. Die Zunahme der Fluoreszenz (Excitation: 485 nm, Emission: 510 nm), welche die H_2O_2 -abhängige Oxidation von DCFH zu DCF anzeigt, wurde in einem Fluoreszenz-Spektralphotometer gemessen.

Als Nullwert diente der gleiche Ansatz ohne Blattmaterial.

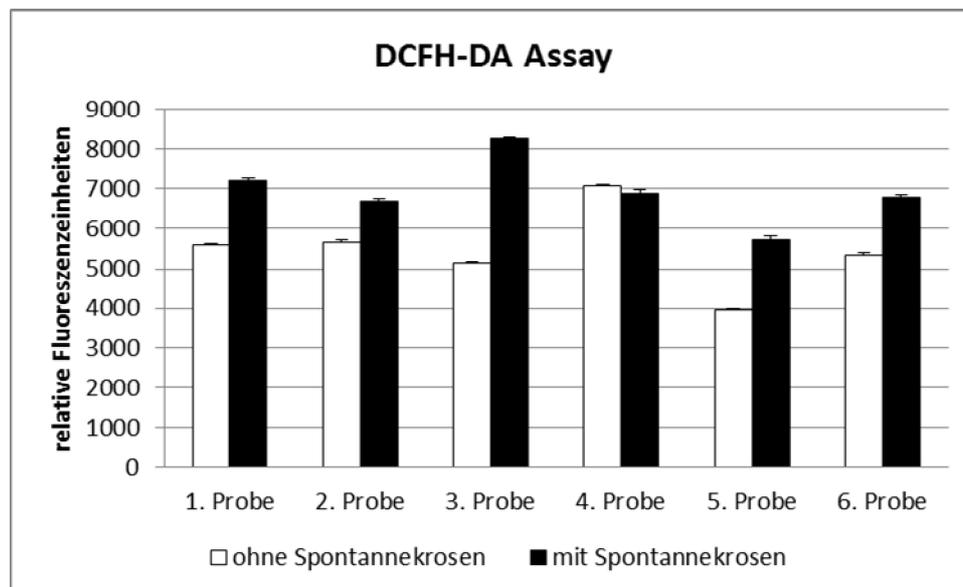


Abb. 4.1-4: Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs)

Die weißen Balken geben die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) der Proben ohne Spontannekrosen an, die schwarzen Balken die der Proben mit Spontannekrosen.

Fast alle BHRF1-transgenen Pflanzen haben mit Spontannekrosen (schwarze Balken) einen höheren messbaren Wert als ohne (weiße Balken). Die Werte geben die Menge des durch H_2O_2 umgewandelten DCF in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) wieder, die aufgrund der Bildung von Spontannekrosen entstanden ist. Auch hier gilt, je mehr H_2O_2 in den Proben vorhanden war, desto größer ist die H_2O_2 -vermittelte Oxidation von DCFH zu DCF. Die Werte der weißen Balken geben das H_2O_2 an, welches während des normalen Zellmetabolismus in der Pflanze entstanden ist.

4.1.2 Infektionsversuche von BHRF1-transgenen Pflanzen mit dem Tabakmosaikvirus (TMV)

Werden Tabakpflanzen mit dem Tabakmosaikvirus (TMV) infiziert, bilden sich im Rahmen der Hypersensitiven Reaktion (HR) an der Viruseintrittsstelle Nekrosen. Um mögliche Auswirkungen von BHRF1 auf die Abwehrreaktion der Pflanzen gegen einen Virusbefall untersuchen zu können, wurden Blätter BHRF1-transgener Pflanzen mit dem Tabakmosaikvirus (TMV) infiziert und nach 5 bzw. 9 Tagen ausgewertet.

Im Verlauf der Hypersensitiven Reaktion (HR), ausgelöst durch die Infektion mit dem Tabakmosaikvirus (TMV) entstanden nach einigen Tagen bei Wildtyp-Pflanzen kreisrunde Lokalläsionen (I und J). Die Bildung dieser HR-typischen Nekrosen fand zunächst auch bei BHRF1-transgenen Pflanzen statt (A, B, E und G). Allerdings kam es zu einer Veränderung der Nekrosen BHRF1-transgener Pflanzen. Diese Nekrosen breiteten sich aus und nahmen eine unregelmäßige Form an (C, D, F und H, Pfeile).

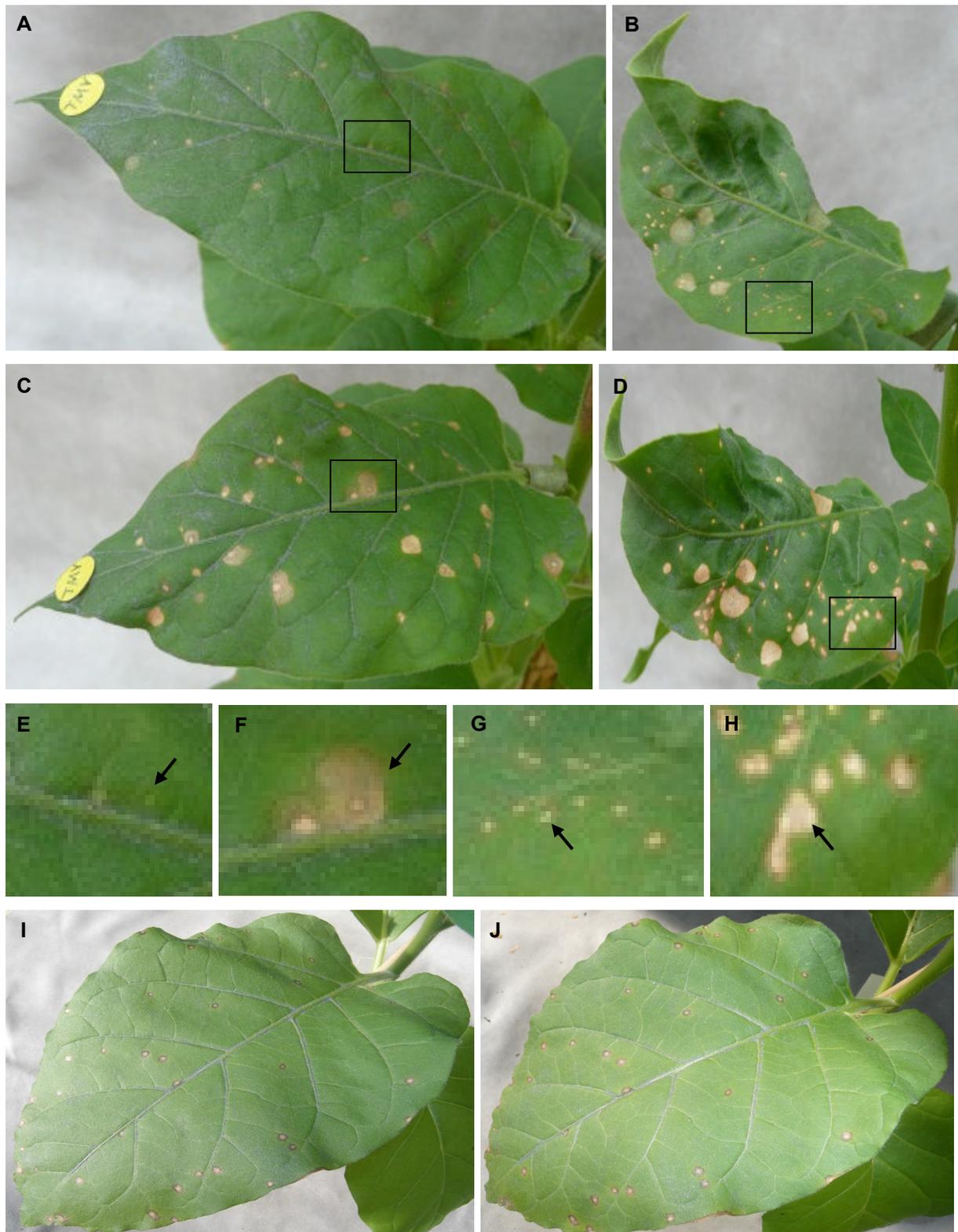


Abb. 4.1-5: Nekrosen einer BHRF1-transgenen Pflanze (A bis H) bzw. einer 35S[GUS]49-5₂ Pflanze (I und J)

TMV-infizierte Blätter BHRF1-transgener Pflanzen 5 Tage (A und B) bzw. 9 Tage (C und D) nach der Virusinfektion. Ausschnitte einzelner Nekrosen 5 Tage p. i. (E und G) bzw. 9 Tage p. i. (F und H). TMV-infizierte 35S[GUS]49-5₂ Pflanze (Kontrollpflanze) 5 Tage (I) bzw. 9 Tage (J) nach der Infektion mit TMV.

4.1.2.1 Nachweis von H_2O_2 in TMV-Nekrosen von BHRF1-transgenen Pflanzen

Werden Tabakpflanzen mit dem Tabakmosaikvirus (TMV) infiziert, bilden sich im Rahmen der HR an der Viruseintrittsstelle Nekrosen. Im Bereich dieser Lokalläsionen akkumulieren Salicylat und H_2O_2 . Um H_2O_2 sichtbar zu machen, wurden einige Nekrosen aus den infizierten Blättern ausgestanzt und mit DAB bzw. Evans Blue behandelt (3.3.5).

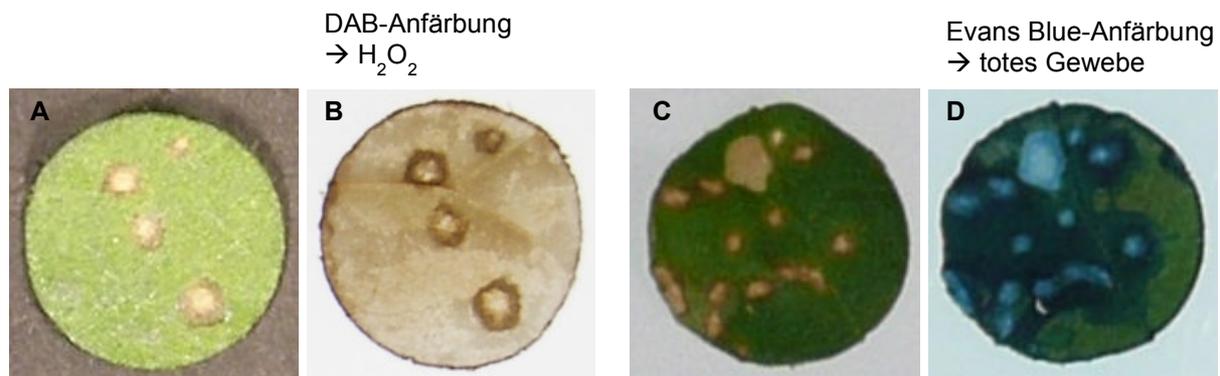


Abb. 4.1-6: DAB- bzw. Evans Blue-Anfärbung von TMV-Nekrosen BHRF1-transgener Pflanzen

Unbehandelte Blattscheiben mit TMV-Nekrosen einer BHRF1-transgenen Pflanze (A und C). Blattscheibe nach Anfärben mit DAB (B) bzw. mit Evans Blue (D).

Deutlich ist die Braunfärbung der mit DAB behandelten Blattscheibe, vor allem am Rand der Nekrosen, zu erkennen (B). Das im Bereich der TMV-Nekrosen gebildete H_2O_2 reagierte mit DAB zu einem braunen Farbstoff. H_2O_2 akkumulierte am Rand der Nekrosen, die durch TMV verursacht wurden.

Die Anfärbung von toten Pflanzenzellen mit Evans Blue ist hauptsächlich an der Peripherie der Nekrosen durch die Blaufärbung zu erkennen (D).

4.1.2.2 Quantitative Bestimmung von H_2O_2 mittels Xylenol Orange (FOX-Assay)

Um auch in TMV-Nekrosen H_2O_2 quantitativ bestimmen zu können, wurde wie unter 3.3.7 beschrieben, vorgegangen.

Hierfür wurden Blätter BHRF1-transgener Pflanzen mit dem Tabakmosaikvirus infiziert. Die daraus entstandenen Nekrosen wurden ausgestanzt, in H_2O homogenisiert und anschließend mit Xylenol Orange versetzt. Ansätze mit Blattscheiben ohne Nekrosen wurden als Kontrolle mitgeführt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten konnte die Absorption und somit die Menge der durch H_2O_2 umgesetzten Fe^{3+} -Ionen im Photometer bei 560 nm gemessen werden.

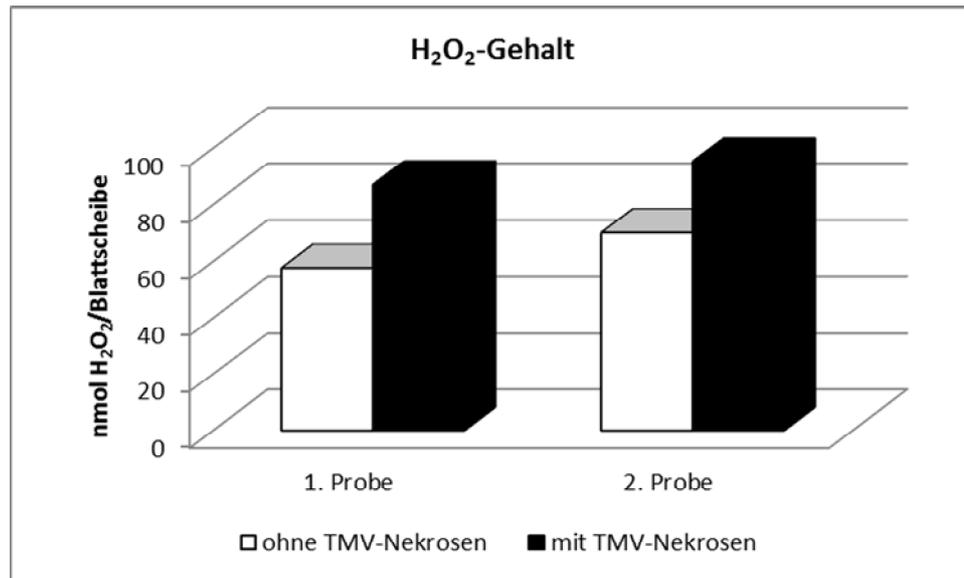


Abb. 4.1-7: Darstellung der H₂O₂-Menge von TMV-Nekrosen BHRF1-transgener Pflanzen

Dargestellt ist die Menge an H₂O₂ in nmol pro Blattscheibe. Die weißen Balken stellen die Werte von Blattproben ohne TMV-Nekrosen dar, die schwarzen Balken jene mit TMV-Nekrosen.

Die Proben der Blattscheiben mit TMV-Nekrosen (schwarze Balken) haben einen höheren Wert als Proben von Blattscheiben ohne TMV-Nekrosen (weiße Balken). Wasserstoffperoxid akkumulierte im Bereich der Nekrosen als Folge der HR aufgrund einer TMV-Infektion. Durch das angehäuften H₂O₂ werden Fe²⁺-Ionen zu Fe³⁺-Ionen oxidiert. Das dreiwertige Eisen kann von Xylenol Orange gebunden werden und bildet dabei einen Farbkomplex, der im Photometer bei 560 nm gemessen werden kann.

4.1.2.3 Quantitative Bestimmung von H₂O₂ mittels 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat (DCFH-DA)

Blätter von BHRF1-transgenen Pflanzen wurden auf einer Blatthälfte mit dem Tabakmosaikvirus (TMV) infiziert, auf der anderen erfolgte die gleiche Behandlung mit Wasser. Nach 3 Tagen wurden die Pflanzen für 2 Stunden ins Dunkle gestellt, um ein möglichst niedriges Level an H₂O₂ zu erhalten.

Blattscheiben mit TMV-Nekrosen bzw. von der mit H₂O inokulierten Blatthälfte (Kontrolle) wurden ausgestanzt und bereits gebildetes H₂O₂ entfernt. Anschließend wurden die Proben mit deacetyliertem DCFH behandelt. Die Zunahme der Fluoreszenz (Excitation: 485 nm, Emission: 510 nm), welche die H₂O₂-abhängige Oxidation von DCFH zu DCF anzeigt, wurde in einem Fluoreszenz-Spektralphotometer gemessen.

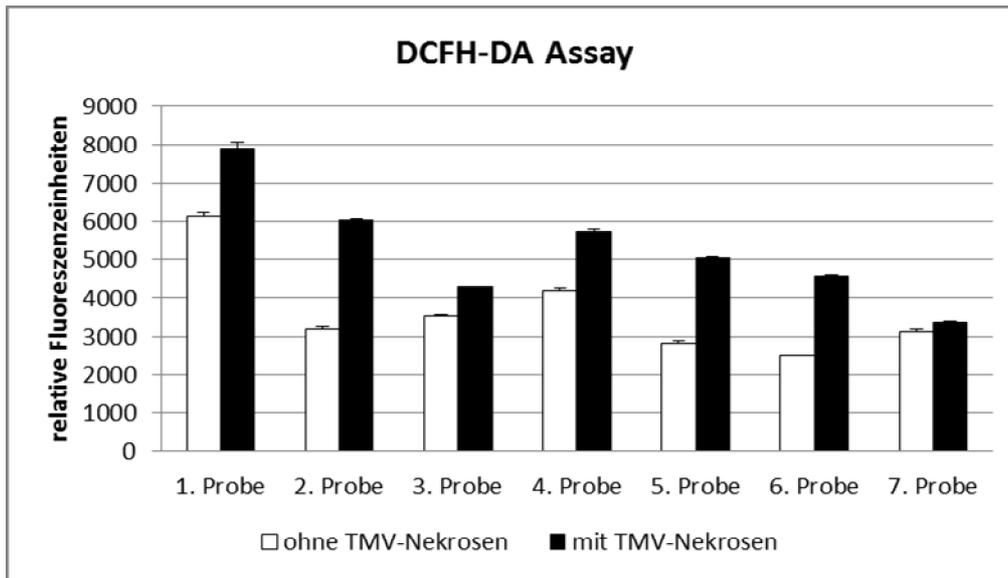


Abb. 4.1-8: Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs)

Die Balken geben die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) an, die durch die H_2O_2 -vermittelte Oxidation von DCFH zu DCF entstanden sind. Die weißen Balken geben die Werte der Proben ohne TMV-Nekrosen an, die schwarzen Balken die der Proben mit TMV-Nekrosen.

Die Proben mit TMV-Nekrosen haben einen höheren RFU-Wert (schwarze Balken) als jene ohne Nekrosen (weiße Balken). Dies weist auf eine vermehrte Bildung von H_2O_2 in den durch TMV verursachten Lokalläsionen BHRF1-transgener Pflanzen hin. Das in den Nekrosen vorhandene H_2O_2 reagiert mit DCFH zum grünfluoreszierenden DCF, dessen Zunahme bei einer Absorption von 560 nm gemessen werden kann. Die weißen Balken geben die RFU-Werte von DCF an, welches durch H_2O_2 , das innerhalb des normalen Zellmetabolismus entsteht, umgewandelt wurde.

4.1.3 Nachweis der Akkumulation von Salicylat in BHRF1-transgenen Pflanzen

Wie schon erwähnt, kommt es im Zuge der HR, z. B. aufgrund eines Pathogenbefalls zur Akkumulation von H_2O_2 und Salicylat. Bei der Bildung von Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen dagegen kann nur H_2O_2 nachgewiesen werden (Roth, 1999).

Um diesen Befund bestätigen zu können, wurden Blattscheiben mit Spontannekrosen bzw. TMV-Nekrosen in H_2O homogenisiert, das Blattmaterial entfernt und mit $FeCl_3$ versetzt. Die in den Blattproben vorhandene freie Salicylsäure reagiert dabei mit $FeCl_3$ zu einem Farbkomplex. Die Absorption kann nun im Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden (Gil und Martinez-Merino, 2007; 3.3.8).

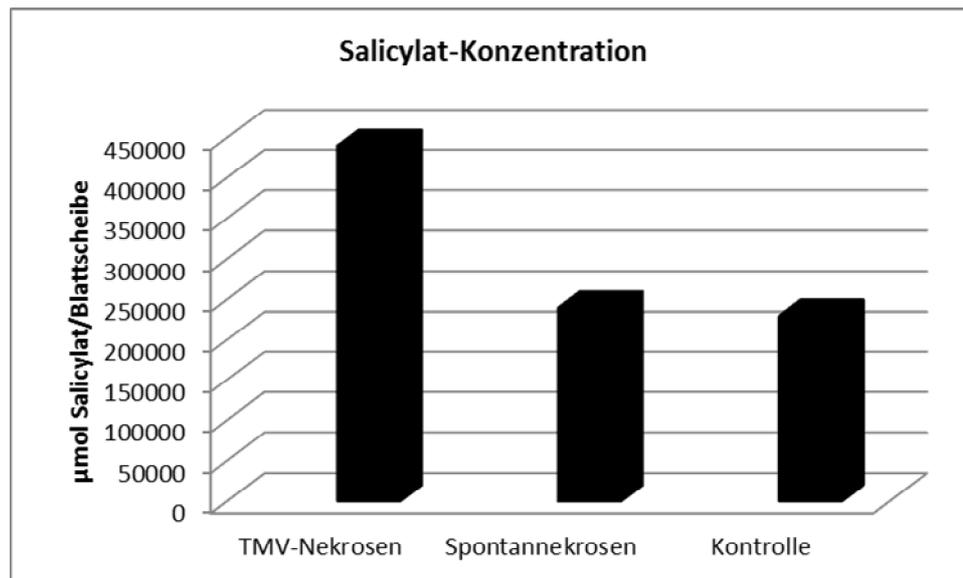


Abb. 4.1-9: Dargestellt ist die Konzentration der freien Salicylsäure

Die Balken geben die Werte in μmol pro Blattscheibe an.

Der Wert der Probe aus Blattmaterial mit TMV-Nekrosen (erster Balken) ist ungefähr doppelt so groß wie jener der Blattprobe mit Spontannekrosen (zweiter Balken) bzw. der Kontroll-Blattprobe (dritter Balken). Ist Salicylat in den Blattproben vorhanden, reagiert dies mit FeCl_3 zu einem Farbkomplex. Je mehr Salicylat infolge der HR akkumuliert, desto größer ist die messbare Absorption. Die Tatsache, dass die Werte mit Spontannekrosen und der Kontrolle fast gleich groß sind, beweist, dass im Bereich von Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen keine Akkumulation von Salicylat stattfand. Mit dieser Methode wird allerdings nur freie Salicylsäure und nicht das Glykosid nachgewiesen.

Während eine vermehrte Produktion von H_2O_2 im Bereich von Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen nachgewiesen werden konnte (4.1.3.1 bis 4.1.3.3), kam es zu keiner Akkumulation von Salicylat. In HR-Nekrosen dagegen wird H_2O_2 (4.1.4) und Salicylat vermehrt gebildet.

4.1.4 Weitere Unterschiede zwischen TMV-Nekrosen und Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen

In Tabakpflanzen, die mit TMV infiziert werden und die das N-Resistenzgen besitzen, kommt es zur Auslösung der HR. Dabei entstehen an der Viruseintrittsstelle nekrotische Lokalläsionen. Die Zellen, die diese Nekrosen umgeben, sterben nicht, sondern produzieren verstärkt Abwehrproteine und Phytoalexine. Die Anhäufung dieser Phenylpropanoide wird unter UV-Licht als blaue Fluoreszenz sichtbar (Dorey et al., 1997; Chong et al., 1999). Dabei wird die meiste Fluoreszenz mit Scopolin und Scopoletin assoziiert (Costet et al., 2002).

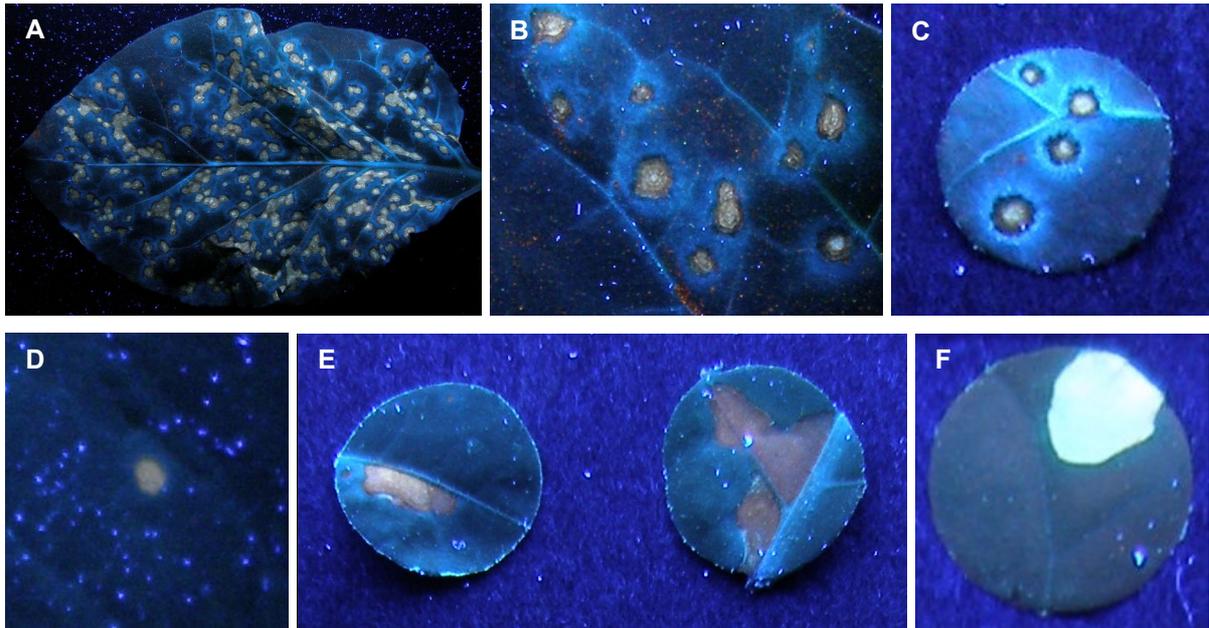


Abb. 4.1-10: Darstellung von TMV-Nekrosen (A bis C) und Spontannekrosen (D bis F) BHRF1-transgener Pflanzen unter UV-Licht

Die Fotos zeigen Blätter bzw. Blattscheiben BHRF1-transgener Pflanzen, die mit UV-Licht (365 nm) beleuchtet wurden. In Abbildung A und B sind Blätter mit TMV-Nekrosen bzw. in Abbildung C ist eine Blattscheibe mit TMV-Nekrosen zu sehen. Abbildung D zeigt ein Ausschnitt eines Blattes mit einer Spontannekrose, E und F zeigen Blattscheiben mit Spontannekrosen.

Werden Blätter BHRF1-transgener Pflanzen mit Spontannekrosen bzw. TMV-Nekrosen unter UV-Licht (365 nm) betrachtet, sind die TMV-Nekrosen von einem blauen Leuchten umgeben (A bis C), die Spontannekrosen jedoch nicht (D bis F). Dies ist auf die Bildung von Scopolin und Scopoletin in TMV-inokulierten Pflanzen zurückzuführen. Infolge eines Pathogenbefalls kommt es zur Auslösung der HR und somit zur Bildung von Nekrosen. In den angrenzenden Zellen um die Nekrosen kommt es zur Akkumulation von Phenylpropanoiden, wie Scopolin und Scopoletin, die unter UV-Licht blaufluoreszieren (Dorey et al., 1997; Chong et al., 1999; Costet et al., 2002). Bei der Bildung von Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen kommt es zu keiner verstärkten Produktion von phenolischen Substanzen, wodurch auch keine blaue Fluoreszenz erkennbar ist.

Die Tatsache, dass bei der Bildung von Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen keine Akkumulation von Salicylat und anderen phenolischen Substanzen stattfindet, deutet auf völlig andere Vorgänge als bei der Hypersensitiven Reaktion ablaufen, hin.

4.1.5 Behandlung von Blättern BHRF1-transgener Pflanzen mit Pelargonsäure

Pelargonsäure dient als umweltfreundliches Herbizid. Die Fettsäure dringt in die Membran der Pflanzenzellen ein und zerstört diese. Um mögliche Auswirkungen der Säure auf

BHRF1-exprimierende Pflanzen und Unterschiede zu Kontrollpflanzen untersuchen zu können, wurden einige Blätter mit je 20 µl einer 1:6 Verdünnung (Pelargonsäure (Finalsan):H₂O) eingerieben (3.3.9).

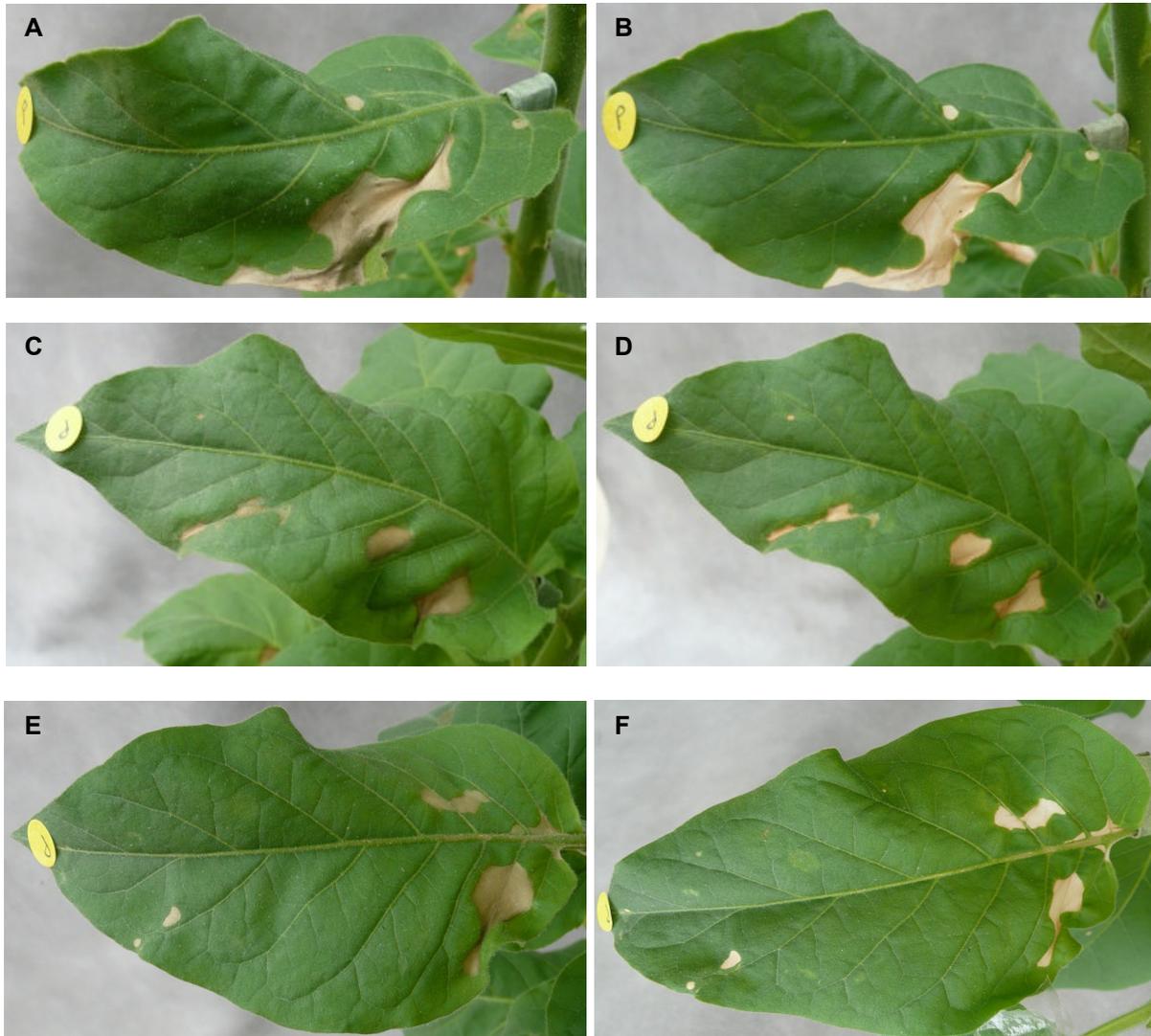


Abb. 4.1-11: Dargestellt sind Blätter BHRF1-transgener Pflanzen, die mit Pelargonsäure behandelt wurden. Abbildung A bis D zeigen BHRF1-transgene Pflanzen, Abbildung E und F zeigen eine Kontrollpflanze (35S[GUS]49-5₂). Abgebildet sind Blätter 5 Tage nach der Behandlung (A, C und E) bzw. 9 Tage nach der Behandlung (B, D und F) mit Pelargonsäure.

Die durch Pelargonsäure entstandenen nekrotischen Bereiche waren zunächst braun gefärbt und wurden dann heller. Die Form und Anzahl dieser abgestorbenen Bereiche veränderte sich nicht. Zudem konnte kein Unterschied zu Kontrollpflanzen beobachtet werden.

Werden Tabakpflanzen von einem Pathogen, wie z. B. dem Tabakmosaikvirus befallen, löst dies eine Abwehrreaktion, die sogenannte Hypersensitive Reaktion (HR) an der Eintrittsstelle des Pathogens aus. Im Verlauf dieser HR kommt es zum PCD der infizierten Zellen.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie H_2O_2 , und Salicylat werden vermehrt produziert. Aber auch Phenylpropane wie Scopolin und Scopoletin akkumulieren um die Eintrittsstelle. Dies führt unter UV-Licht zu einem blaufluoreszierenden Ring um die Nekrosen.

Pflanzen, die mit dem anti-apoptotischen BHRF1 transformiert sind, bilden im Verlauf ihrer Entwicklung spontan Nekrosen aus. Genauere Untersuchungen dieser Spontannekrosen bestätigten die Akkumulation von H_2O_2 . Allerdings findet im Bereich dieser Spontannekrosen weder eine verstärkte Produktion von Salicylat noch von Scopolin und Scopoletin statt. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass innerhalb der Spontannekrosenbildung BHRF1-transgener Pflanzen völlig andere Abläufe stattfinden als bei der Hypersensitiven Reaktion.

4.2 Untersuchung zur Expression und Funktion von Aquaporinen in transgenen Hefen

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente zur Funktion von Aquaporinen im Rahmen des Zelltods in Pflanzen wurden aus der Vielzahl der vorhandenen Klone folgende ausgewählt, die sich in geringen Bereichen unterscheiden:

- TIP15/5 und TIP2/2

Hierbei handelt es sich um zwei identische Klone, die mit dem von Weig, Sonnewald und Chrispeels publizierten Aquaporin 1 („Accessionnummer“: Y08161, NCBI) identisch sind. Laut Computeranalyse handelt es sich bei dieser Sequenz um ein Tonoplast assoziiertes Aquaporin (γ -TIP) mit der höchsten Homologie zum *Arabidopsis*protein AtTIP1.1. Die Klone TIP15/5 und TIP2/2 werden im Folgenden mit NtTIP1.1a bezeichnet.

- PIP6/3 und PIP14/4

Hierbei handelt es sich um zwei Klone, die mit dem von Wang et al. (2000) publizierten Protein PR16 identisch sind. PIP6/3 unterscheidet sich allerdings durch einen Aminosäureaustausch (Thr \rightarrow Ala) von PIP14/4 und PR16. Es könnte sich dabei um Allele handeln, da beide Klone mehrmals isoliert wurden. Laut Computeranalyse handelt es sich bei diesen Sequenzen um Plasmodesmata assoziierte Aquaporine (PIP) mit der höchsten Homologie zum *Arabidopsis*protein AtPIP2.2. PIP6/3 und PIP14/4 werden in dieser Arbeit mit NtPIP2.2b bzw. NtPIP2.2a benannt.

Für die Untersuchung in Hefen wurden GFP-Fusionen der verwendeten Aquaporine hergestellt, um die Lokalisation und Expression der Proteine nachweisen zu können. Hierfür wurden die zu untersuchenden Aquaporine mittels PCR (3.1.11) amplifiziert und in geeignete Vektoren kloniert, um sie anschließend in *Saccharomyces cerevisiae* transformieren (3.2.3.1.2) zu können. Zusätzlich zu den Tabakaquaporinen wurden als Vergleich die entsprechenden *Arabidopsis*proteine (AtTIP1.1 und AtPIP2.2) verwendet.

4.2.1 Herstellung der Konstrukte zur Untersuchung der Lokalisation und Funktion von Aquaporinen

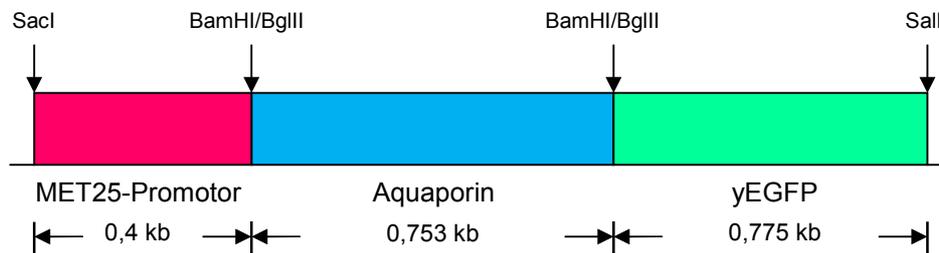
4.2.1.1 Klonierung der Aquaporine NtTIP1.1a, AtTIP1.1 und AtPIP2.2

Die cDNA des Aquaporins NtTIP1.1a aus *Nicotiana tabacum* lag als klonierte DNA in pUC19 (Hoch, 2006) vor. Die cDNA der Aquaporine aus *Arabidopsis* in pDSL-Nx (2.3.9). Für die Amplifikation der Aquaporine wurde die DNA 1:100 verdünnt und mittels PCR (3.1.11) amplifiziert. Die verwendeten Primer sind unter 2.7.1 aufgelistet. Es wurden DNA-Fragmente mit einer Länge von 774 bp (NtTIP1.1a), 772 bp (AtTIP1.1) und 874 bp (AtPIP2.2) erwartet. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt (3.1.6) und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (3.1.5) und in pUC19 (2.3.3, zur Sequenzierung) und/oder in pYEGFP (2.3.5, zur eigentlichen

Versuchsdurchführung) kloniert. Die Konstrukte konnten nun einzeln in kompetente *E. coli* DH5 α transformiert werden (3.1.2.2). Nach der Präparation der klonierten Plasmide aus *E. coli* (3.1.3) wurden mit Hilfe weiterer Restriktionsverdau (3.1.5) die erfolgreiche Klonierung sowie die richtige Orientierung der DNA in pUC19 und pYEGFP überprüft. Aus den Flüssigkulturen, die ein positives Ergebnis lieferten, wurden Gefrierkulturen (3.1.14) angelegt und die DNA zum Sequenzieren geschickt (3.1.13). Nach Erhalt der Sequenzen wurde diese mit Hilfe des Blast-Programmes (Altschul et al., 1990) mit der Datenbank von NCBI verglichen. Dabei konnte bestätigt werden, dass es sich um die gewünschten Aquaporine handelt. Die DNA des Aquaporins AtPIP2.2 wies allerdings im Gegensatz zur veröffentlichten Sequenz einen Aminosäureaustausch von Alanin nach Valin an Position 186 auf (mAtPIP2.2). Deshalb wurde aus einem weiteren Klon die Plasmid-DNA isoliert (3.1.1) und ebenfalls zum Sequenzieren geschickt. Aber auch diese Sequenz entsprach nicht zu 100 % der in der Datenbank von NCBI veröffentlichten Sequenz des Aquaporins AtPIP2.2 aus *Arabidopsis*. In dieser Sequenz befand sich an Position 262 ebenfalls ein Aminosäureaustausch von Alanin nach Valin (AtPIP2.2m). Da es sich in beiden Fällen um einen Austausch von konservativen Aminosäuren handelt und auch weitere Amplifikationen nur diese beiden Sequenztypen erbrachten, wurde davon ausgegangen, dass es sich um natürliche Varianten handelt und mit beiden Klonen weiter gearbeitet.

Zur deutlicheren Darstellung der Konstrukte wurde die folgende Abbildung erstellt:

pYEGFP:NtTIP1.1a



pYEGFP:AtTIP1.1, pYEGFP:mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m

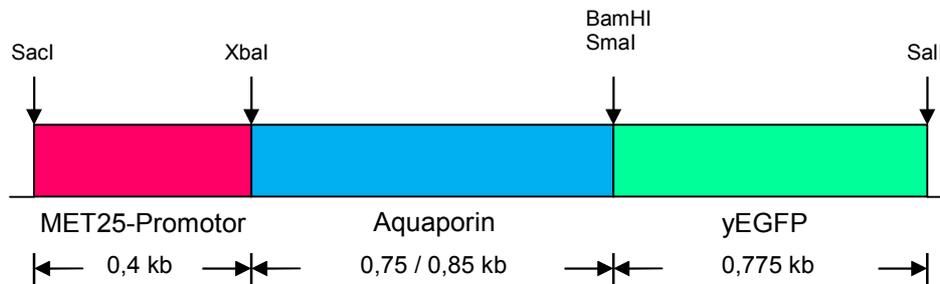


Abb. 4.2-1: Schematische Darstellung der Klonierung von NtTIP1.1a (BamHI/BglIII), AtTIP1.1 (Xbal/BamHI) bzw. mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m (Xbal/SmaI) in pYEGFP

Durch die Klonierung der Aquaporine in pYEGFP entsteht ein Fusionsprotein aus Aquaporin und GFP, wobei GFP an den C-Terminus des Aquaporins fusioniert wird.

Ebenfalls verwendete Konstrukte (pYEGFP:hAQP1, pYEGFP:rAQP8) wurden freundlicherweise von Julia Köber (Köber, 2008) zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden Konstrukte (pYEGFP:NtPIP2.2b, pYEGFP:NtPIP2.2a) verwendet, welche während meiner Diplomarbeit (Hoch, 2006) hergestellt wurden.

Aquaporine in pYEGFP (pYEGFP:Aquaporin)

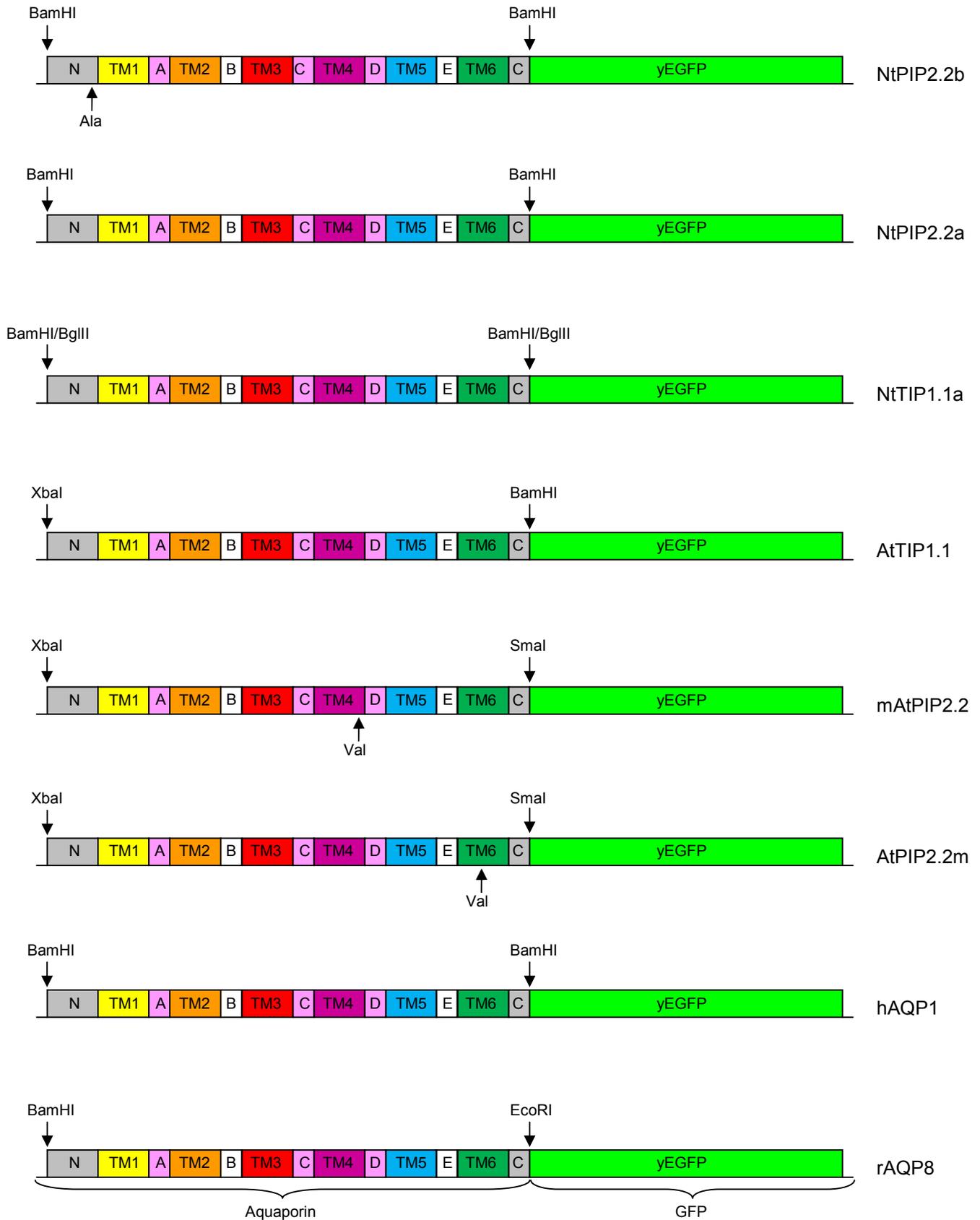


Abb. 4.2-2: Schematische Darstellung der verwendeten Aquaporin-GFP-Fusionsproteine

Die sechs Transmembrandomänen der Aquaporine sind mit TM1 bis TM6 beschriftet. N- und C-Termini der Aquaporine sind mit N bzw. C bezeichnet. „Loop“ B und E kennzeichnen die Schleifen, die das hochkonservierte NPA-Motiv enthalten. „Loop“ A, C und D bezeichnen die übrigen Schleifen. Bei yEGFP handelt es sich um das „yeast enhanced green fluorescent protein“, ein für Hefe kodonoptimiertes GFP.

Die beiden Tabakaquaporine NtPIP2.2b und NtPIP2.2a unterscheiden sich nur in einer einzelnen Aminosäure voneinander. NtPIP2.2b besitzt an Position 35 (kurz vor TM1) die Aminosäure Alanin, während sich bei NtPIP2.2a an dieser Stelle ein Threonin befindet.

Die beiden *Arabidopsis* aquaporine mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m unterscheiden sich durch einen Aminosäureaustausch an Position 186 (TM4) und 261 (TM6). Bei mAtPIP2.2 wurde an Position 186 innerhalb der vierten Transmembrandomäne das Alanin durch Valin ersetzt. AtPIP2.2m besitzt an Position 261 innerhalb der sechsten Transmembrandomäne ebenfalls einen Austausch von Alanin nach Valin. Die veröffentlichte Sequenz von AtPIP2.2 besitzt an beiden Positionen ein Alanin.

Bei allen hier aufgelisteten Aquaporinen ist der N-Terminus länger als der C-Terminus.

Weiterhin wurden Konstrukte mit dem anti-apoptotischen BHRF1 in pGADΔ verwendet (pGADΔ:BHRF1wt, pGADΔ:BHRF1ΔTMwt, pGADΔ:mBHRF1 und pGADΔ:mBHRF1ΔTM; Köber, 2008).

BHRF1 in pGADΔ (pGADΔ:BHRF1)

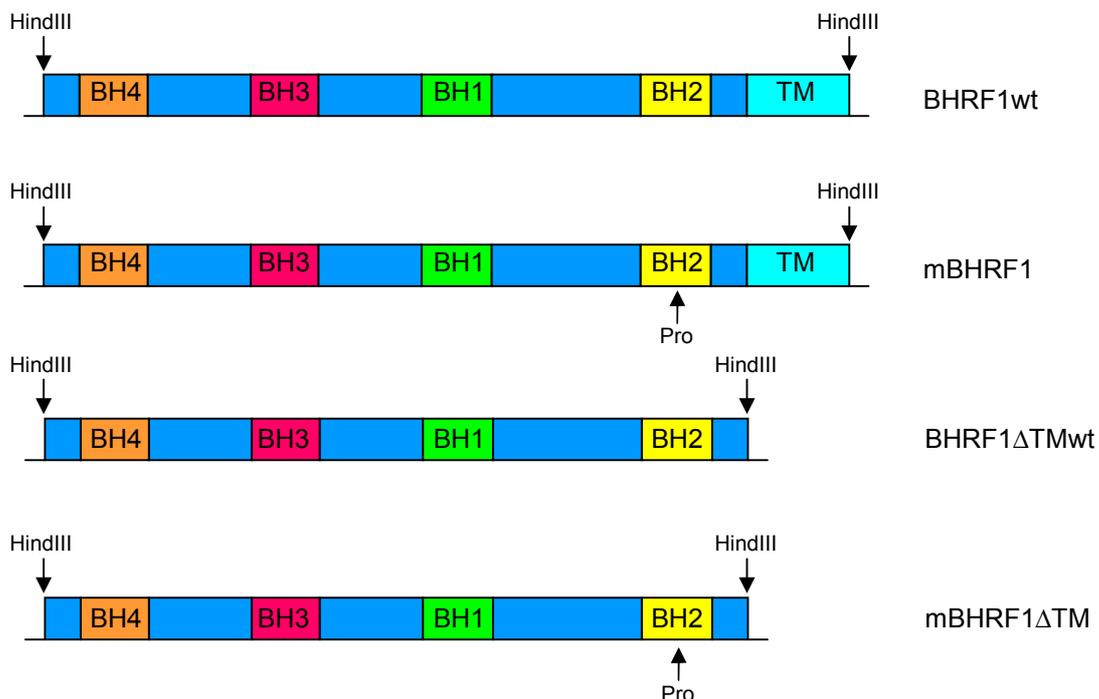


Abb. 4.2-3: Schematische Darstellung der verwendeten BHRF1-Proteine

BH1 bis BH4 kennzeichnen die vier BH-Domänen der Bcl-2 Familienmitglieder. TM bezeichnet die Transmembrandomäne mit der sich das Protein in der Membran verankert. BHRF1wt ist das wildtypische Volllängenprotein. mBHRF1 unterscheidet sich von diesem an Position 158 in der BH2-Domäne durch einen Aminosäureaustausch von Serin nach Prolin. BHRF1ΔTMwt und mBHRF1ΔTM entsprechen in ihrer Sequenz den beiden Volllängenproteinen mit deletierter Transmembrandomäne.

Die korrekte Plasmid-DNA konnte nun in geeignete Hefen transformiert werden.

4.2.1.2 Transformation von pYEGFP:NtPIP2.2b, pYEGFP:NtPIP2.2a, pYEGFP:NtTIP1.1a, pYEGFP:AtTIP1.1, pYEGFP:mAtPIP2.2, pYEGFP:AtPIP2.2m, pYEGFP:hAQP1, pYEGFP:rAQP8, pGADΔ:BHRF1wt, pGADΔ:BHRF1ΔTMwt, pGADΔ:mBHRF1 und pGADΔ:mBHRF1ΔTM in *S. cerevisiae* Cen.PK2, BY4741, YHR206w und YML007w

Als geeignete Hefestämme für die Transformation dieser Konstrukte sollten *S. cerevisiae* Cen.PK2, BY4741, YHR206w und YML007w (2.2.4) verwendet werden.

Cen.PK2 ist ein diploider Wildtyp-Hefestamm, der für seine hohe Expressionsrate und stabilere Proteinsynthese bekannt ist (Lohaus, 2002). Er eignet sich deshalb besonders gut für den Nachweis der Proteinexpression.

Bei BY4741 handelt es sich ebenfalls um einen Wildtyp-Hefestamm allerdings mit haploidem Chromosomensatz und anderem genetischen Hintergrund. Die beiden Deletionsmutanten YML007w und YHR206w haben den gleichen genetischen Hintergrund wie BY4741. YHR206w besitzt eine Mutation im *skn7* Gen, YML007w weist eine Deletion im *yap1* Gen auf. Beide Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die die Expression vieler Gene für die Antwort auf oxidativen Stress regulieren (Godon et al., 1998/1999). Diese Transkriptionsfaktoren aktivieren die Expression von Genen, wie z. B. Enzyme wie Katalasen, Superoxiddismutasen, Alkylhydroperoxidreduktasen, Thioredoxine, Thiolperoxidasen, Cytochrom c Peroxidasen und Hitzeschockproteine, die den Schaden durch oxidativen Stress reduzieren (Bienert et al., 2006). Deshalb sind die beiden Stämme YML007w und YHR206w besonders empfindlich gegen oxidativen Stress bzw. die Behandlung mit H₂O₂.

Die Transformation erfolgte wie unter 3.2.3.1.2 beschrieben. Anschließend wurden die Transformationen auf SD-Platten ohne Uracil (pYEGFP:NtPIP2.2b, pYEGFP:NtPIP2.2a, pYEGFP:NtTIP1.1a, pYEGFP:AtTIP1.1, pYEGFP:mAtPIP2.2, pYEGFP:AtPIP2.2m, pYEGFP:hAQP1, pYEGFP:rAQP8) bzw. ohne Leucin (pGADΔ:BHRF1wt, pGADΔ:BHRF1ΔTMwt, pGADΔ:mBHRF1 und pGADΔ:mBHRF1ΔTM) bzw. ohne diese beiden Aminosäuren (für Hefen, die mit jeweils einem Aquaporin-Konstrukt und einem BHRF1-Konstrukt transformiert wurden) ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden in Flüssigkulturen angezogen. Für spätere Versuche wurden Gefrierkulturen (3.1.14) angelegt.

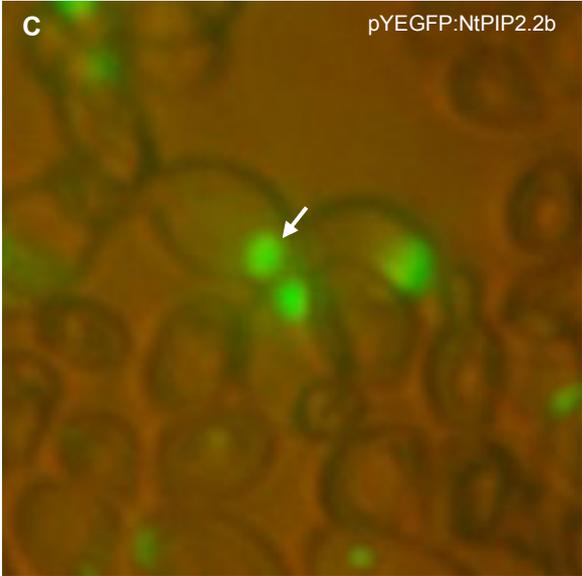
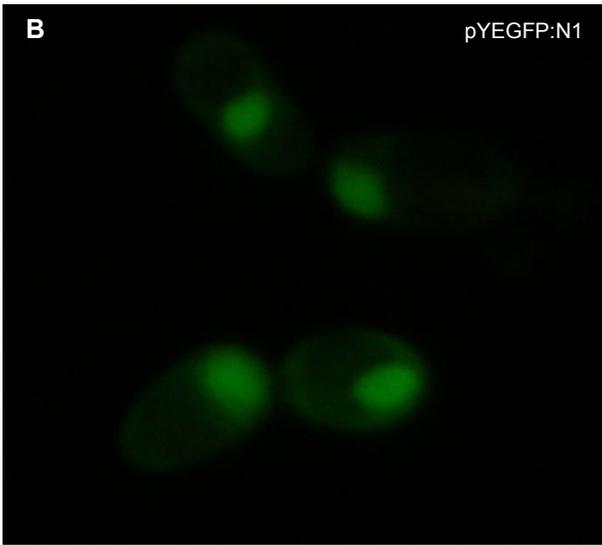
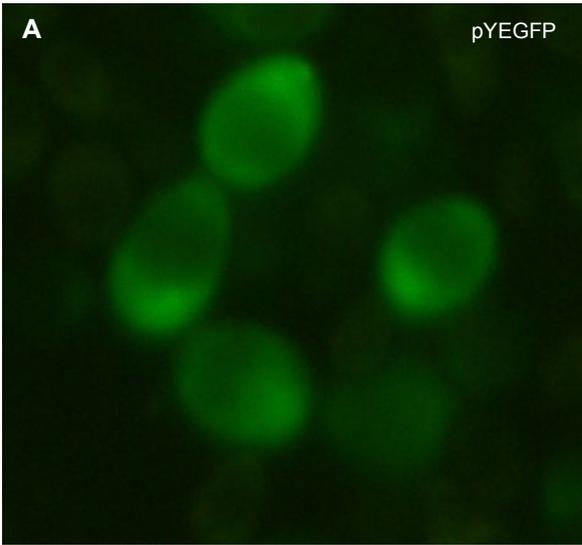
4.2.2 Untersuchung der Lokalisation von Aquaporinen in transgenen Hefen

Um die Lokalisation der in pYEGFP klonierten Aquaporine bestimmen zu können, wurden Flüssigkulturen mit SD-Medium (für nicht transformierte Hefen) bzw. ohne Uracil angezogen.

Dadurch wurde gewährleistet, dass nur solche Hefen wachsen können, welche das Plasmid pYEGFP und somit auch das Aquaporin exprimieren. Die transgenen Hefen des Stammes Cen.PK2 und YML007w konnten nach 2-3 Tagen am Fluoreszenzumkehrmikroskop „ECLIPSE TS 100“ der Firma Nikon, Düsseldorf untersucht werden. Hierfür wurden einige Tropfen der Flüssigkultur auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und unter dem Mikroskop betrachtet.

Durch die Ligation der Aquaporine NtPIP2.2b, NtPIP2.2a und NtTIP1.1a aus *Nicotiana tabacum*, AtTIP1.1, mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m aus *Arabidopsis thaliana*, hAQP1 des Menschen und rAQP8 der Ratte in den Vektor pYEGFP entsteht ein Aquaporin-GFP-Fusionsprotein. Hierbei ist das Aquaporin an den N-Terminus des GFP fusioniert. Durch die grüne Fluoreszenz des GFP ist es möglich die Aquaporine im Fluoreszenzumkehrmikroskop sichtbar zu machen. Als Kontrolle dienten nicht transformierte Cen.PK2, YML007w bzw. Hefen dieser Stämme, welche nur den leeren pYEGFP Vektor bzw. Cen.PK2, die pYEGFP:N1 exprimierten. N1 ist ein Nimin-Protein, welches die Eigenschaft hat sich im Kern zu lokalisieren. Hefen, die nur GFP exprimieren (pYEGFP) zeigen dagegen im Zytoplasma und im Kern eine grüne Fluoreszenz.

4.2.2.1 Lokalisation von GFP und Aquaporin-GFP-Fusionen im Hefestamm Cen.PK2



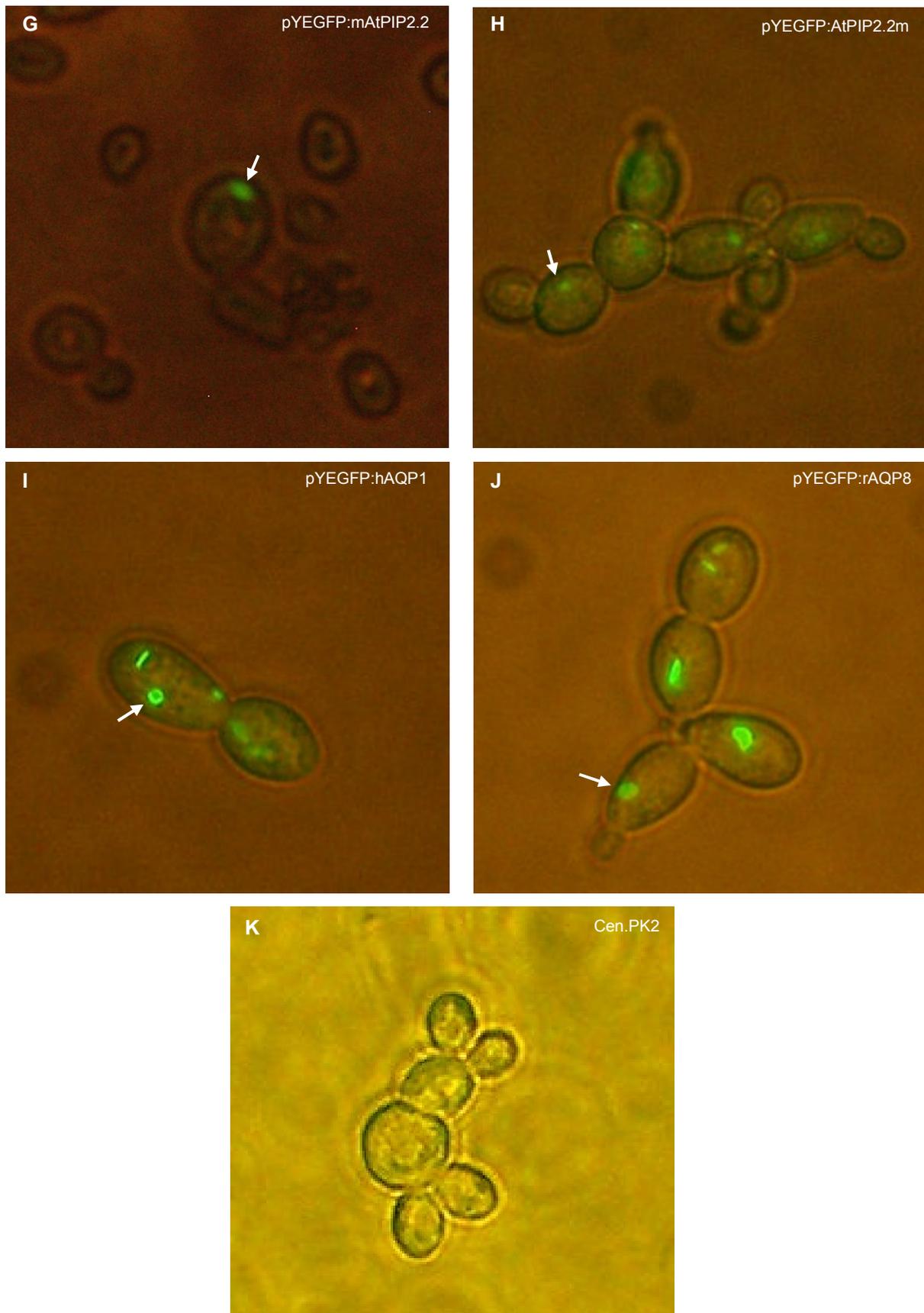
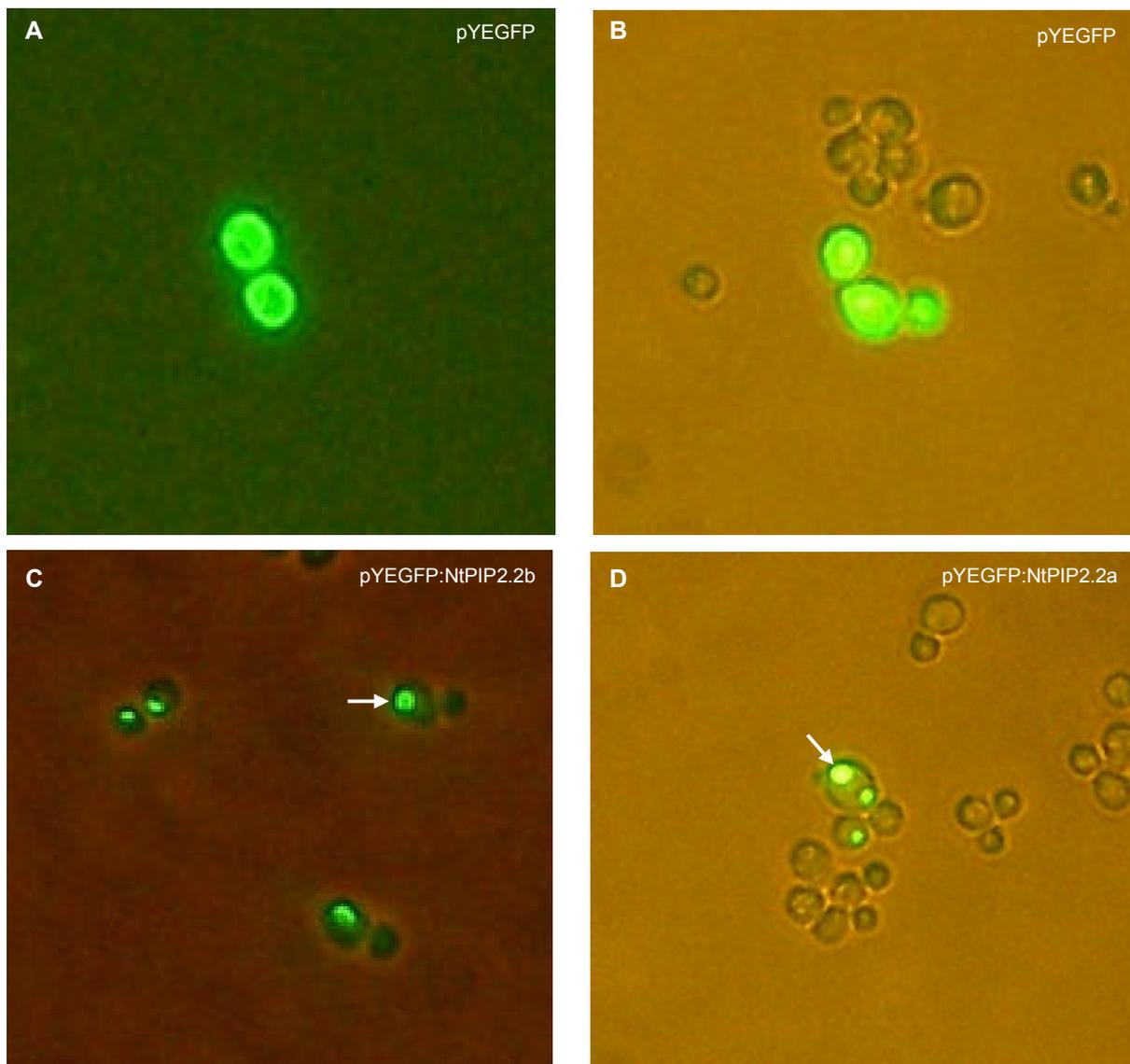


Abb. 4.2-4: Aufnahmen von Cen.PK2 + pYEGFP (A), Cen.PK2 + pYEGFP:N1 (B), Cen.PK2 + pYEGFP:NtPIP2.2b (C), Cen.PK2 + pYEGFP:NtPIP2.2a (D), Cen.PK2 + pYEGFP:NtTIP1.1a (E), Cen.PK2 + pYEGFP:AtTIP1.1 (F), Cen.PK2 + pYEGFP:mAtPIP2.2 (G), Cen.PK2 + pYEGFP:AtPIP2.2m (H), Cen.PK2 + pYEGFP:hAQP1 (I), Cen.PK2 + pYEGFP:rAQP8 (J) und Cen.PK2 (K); 40-fache Vergrößerung

Die Lokalisation des „yeast enhanced“ GFP (YEGFP) aus dem Plasmid pYEGFP (A) ist im Zytoplasma und im Kern gut zu erkennen. Die Anreicherung des Nimin-GFP-Fusionsproteins ist ausschließlich im Kern vorhanden (B). Die Aquaporin-GFP-Fusionsproteine (C bis J) sind in den Hefezellen als punktförmige grüne Fluoreszenz sichtbar. Dies könnte auf eine Vakuolenlokalisierung deuten, da die fluoreszierenden Bereiche teilweise stark abgerundet sind (Pfeile). Zusätzlich könnte es durch Überexpression der Aquaporin-GFP-Fusionsproteine durch den starken MET25-Promotor während der Translation zur Akkumulation dieser Proteine innerhalb des ER (Endoplasmatischen Retikulum) kommen. Bei nicht transformierten Hefen des Stammes Cen.PK2 ist keine Fluoreszenz zu erkennen (K).

4.2.2.2 Lokalisation von GFP und Aquaporin-GFP-Fusionen im Hefestamm YML007w



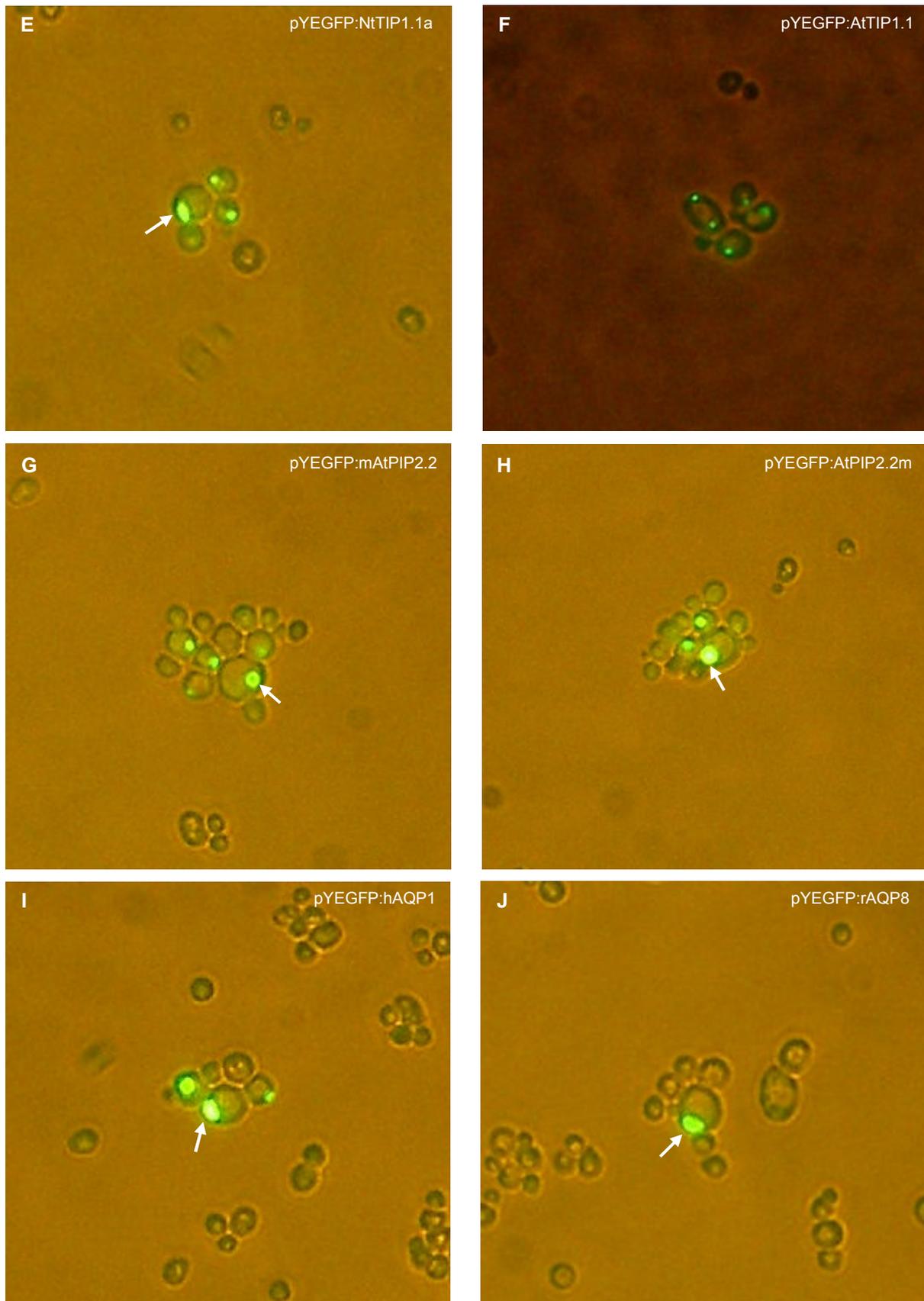


Abb. 4.2-5: Aufnahmen von YML007w + pYEGFP (A und B), YML007w + pYEGFP:NtPIP2.2b (C), YML007w + pYEGFP:NtPIP2.2a (D), YML007w + pYEGFP:NtTIP1.1a (E), YML007w + pYEGFP:AtTIP1.1 (F), YML007w + pYEGFP:mAtPIP2.2 (G), YML007w + pYEGFP:AtPIP2.2m (H), YML007w + pYEGFP:hAQP1 (I) und YML007w + pYEGFP:rAQP8 (J); 40-fache Vergrößerung

Auch die Expression des YEGFP im Hefestamm YML007w lässt erkennen, dass sich die Fluoreszenz des GFP über das gesamte Zytoplasma und im Kern der Hefezellen verteilt (A und B). Die Aquaporin-GFP-Fusionsproteine zeigen eine punktförmige grüne Fluoreszenz, die auf eine Lokalisation der Fusionsproteine im Tonoplasten (Vakuolenmembran) schließen lässt (C bis J). Auch hier sind die fluoreszierenden Bereiche stark abgerundet (Pfeile).

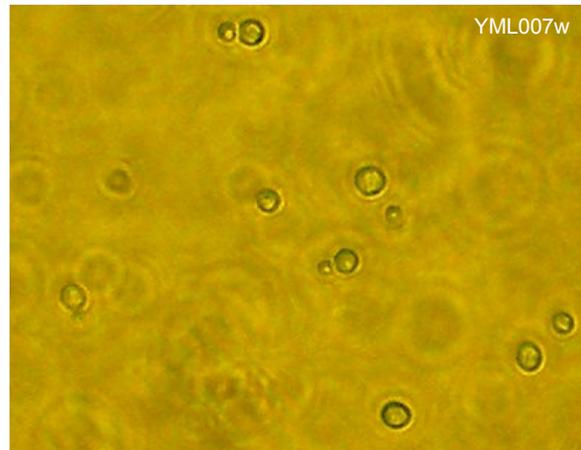


Abb. 4.2-6: Aufnahmen von YML007w; 40-fache Vergrößerung

Die nicht transformierten Hefen des Stammes YML007w zeigen keinerlei Fluoreszenz.

Hefezellen des haploiden Stammes YML007w besitzen eine geringere Größe als die des diploiden Stammes Cen.PK2. Diese Eigenschaft verleiht den Hefen des Stammes Cen.PK2 die Fähigkeit doppelt so viel Protein zu synthetisieren, da sie physiologisch aktiver sind (Lohaus, 2002).

4.2.3 Nachweis der Expression von Proteinen im Hefestamm Cen.PK2

Der Hefestamm Cen.PK2 ist für die Expression von Proteinen besonders geeignet, da er eine stabilere Proteinsynthese erlaubt (Lohaus, 2002). Um zeigen zu können, dass die in Cen.PK2 transformierten Aquaporin-GFP-Fusionsproteine bzw. BHRF1 auch tatsächlich exprimiert werden, wurden diese aus den Hefen extrahiert, auf einem SDS-Polyacrylamidgel (3.2.5) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, dann mittels „Western Blot“ (3.2.7.1) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern detektiert (3.2.7.2).

Hierfür wurden für die Proben 1 bis 13 Flüssigkulturen (SD-Medium ohne die Aminosäure Uracil für Cen.PK2, die nur mit den Aquaporinen in pYEGFP transformiert wurden bzw. ohne Uracil und Leucin für Hefen mit beiden Plasmiden pYEGFP und pGAD Δ) der transgenen Cen.PK2 angezogen, nach 2 Tagen abzentrifugiert und wie unter 3.2.4.1 beschrieben, bearbeitet. Als Positivkontrolle wurden Cen.PK2, welche nur das leere Plasmid pYEGFP

tragen, verwendet. Nicht transformierte Cen.PK2 oder jene, die nur den leeren pGAD Δ tragen, dienten als negative Kontrolle.

Die gewaschenen Zelniederschläge der Proben 14 bis 21 wurden nach der Methode „Cathy's no boil yeast extracts“ (3.2.4.2.) verarbeitet.

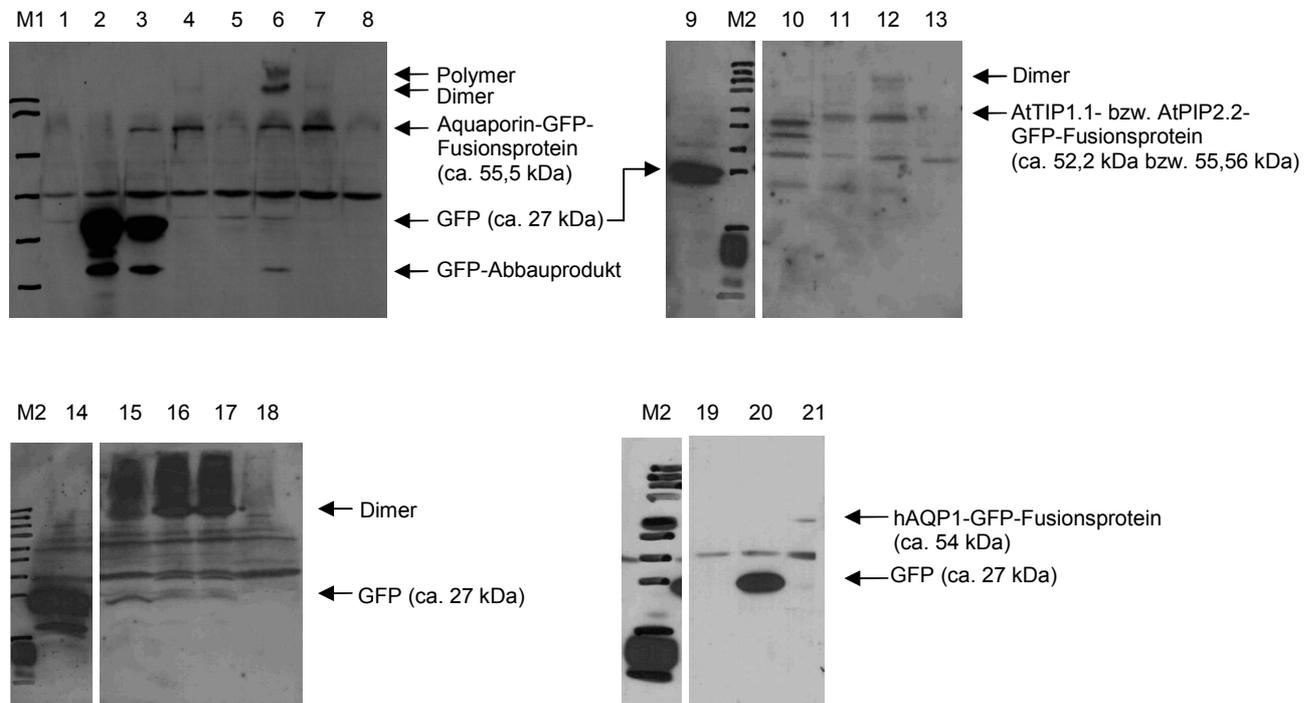


Abb. 4.2-7: Immundetektion der aus transgenen *S. cerevisiae* Cen.PK2 isolierten Proteine

Zur Detektion von GFP bzw. GFP-Fusionsproteinen wurde als 1. Antikörper „GFP (FL) rabbit polyclonal IgG“ (1:3000) eingesetzt. „Anti-rabbit/HRP“ (1:10000) wurde als 2. Antikörper verwendet.

Spur M1: Prestained Protein Molecular Weight Marker (#SM0441, MBI Fermentas): 120 kDa, 86 kDa, 47 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 20 kDa

Spur 1: Cen.PK2 (Negativkontrolle)

Spur 2: Cen.PK2 + pYEGFP (Positivkontrolle)

Spur 3: Cen.PK2 + pYEGFP:NtPIP2.2b

Spur 4: Cen.PK2 + pYEGFP:NtPIP2.2a

Spur 5: Cen.PK2 + pYEGFP:NtTIP1.1a

Spur 6: Cen.PK2 + pYEGFP:NtPIP2.2b::pGAD Δ :BHRF1wt

Spur 7: Cen.PK2 + pYEGFP:NtPIP2.2a::pDAG Δ :BHRF1wt

Spur 8: Cen.PK2 + pYEGFP:NtTIP1.1a::pGAD Δ :BHRF1wt

Spur 9: Cen.PK2 + pYEGFP (Positivkontrolle)

Spur M2: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671, MBI Fermentas): 170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 10 kDa

Spur 10: Cen.PK2 + pYEGFP:AtTIP1.1

Spur 11: Cen.PK2 + pYEGFP:mAtPIP2.2

Spur 12: Cen.PK2 + pYEGFP:AtPIP2.2m

Spur 13: Cen.PK2 + pGAD Δ (Negativkontrolle)

Spur 14: Cen.PK2 + pYEGFP (Positivkontrolle)

Spur 15: Cen.PK2 + pYEGFP:AtTIP1.1

Spur 16: Cen.PK2 + pYEGFP:mAtPIP2.2
Spur 17: Cen.PK2 + pYEGFP:AtPIP2.2m
Spur 18: Cen.PK2 + pGAD Δ (Negativkontrolle)
Spur 19: Cen.PK2 (Negativkontrolle)
Spur 20: Cen.PK2 + pYEGFP (Positivkontrolle)
Spur 21: Cen.PK2 + pYEGFP:hAQP1

In Spur 2, 3, 9, 14 und 20 ist jeweils eine dicke Bande in der Größenordnung von ungefähr 27 kDa zu sehen, welche das „green fluorescent protein“ (GFP) detektiert. Diese Bande ist bei genauerer Betrachtung ebenfalls in Spur 5, 6 und 21 schwach, in Spur 10 bis 12 und 15 bis 17 gut zu erkennen. Ein Aquaporin-GFP-Fusionsprotein konnte in den Proben von Spur 3, 4, 6 und 7 mit einem Molekulargewicht von ca. 55,5 kDa (NtPIP2.2b bzw. NtPIP2.2a = 28,5 kDa; GFP = 27 kDa) nachgewiesen werden, in Spur 10 mit einem Molekulargewicht von ca. 52,2 kDa (AtTIP1.1 = 25,2 kDa), in Spur 11 und 12 bei einer Größenordnung von ca. 55,56 kDa (AtPIP2.2 = 28,56 kDa) und in Spur 21 bei einer Größe von ungefähr 54 kDa (hAQP1 = 27 kDa). Zusätzlich sind in Spur 6 zwei größere Banden sichtbar, bei denen es sich um dimere bzw. polymere Verbindungen von GFP und Aquaporin NtPIP2.2b handeln sollte. Die kleinere dieser beiden Banden ist auch in Spur 4 und 7 vertreten, wodurch mindestens ein dimeres Fusionsprotein aus GFP und NtPIP2.2a nachgewiesen werden konnte. In den Proben von Spur 12, 15, 16 und 17 sind ebenfalls Banden zu erkennen, deren Größe auf dimere Aquaporin-GFP-Verbindungen schließen lässt. Die Tatsache, dass in den Proben von Spur 5 und 8 keine dieser Banden auftauchen, beruht vermutlich darauf, dass das Aquaporin NtTIP1.1a wesentlich schwächer exprimiert wird als die beiden PIPs aus *Nicotiana tabacum* (NtPIP2.2b und NtPIP2.2a). Bei den kleinen Banden in Spur 2, 3 und 6 handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte des GFP. Die in allen Spuren vorkommende Bande ist vermutlich ein Hefeprotein, welches mit den Antikörpern kreuzreagiert, da sie auch in der Negativkontrolle (ohne GFP) vorkommt.

Die Proben für den Nachweis der Expression von BHRF1 wurden ebenfalls in Flüssigmedium (SD-Medium ohne Leucin) angezogen und wie unter 3.2.4.2 beschrieben, verarbeitet.

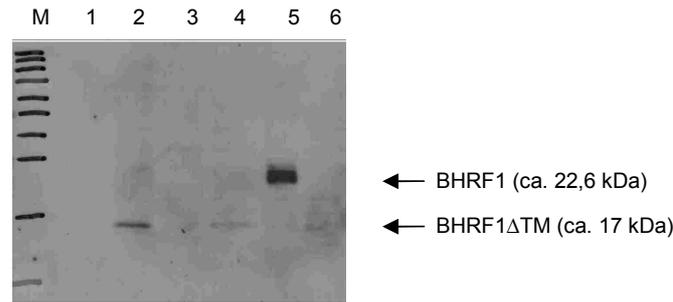


Abb. 4.2.8: Immundetektion der aus transgenen *S. cerevisiae* Cen.PK2 isolierten Proteine

Zur Detektion von BHRF1 wurde als 1. Antikörper „EBV Bcl-2“ (1:1000) eingesetzt. „Anti-mouse/HRP“ (1:10000) wurde als 2. Antikörper verwendet.

Spur M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671, MBI Fermentas): 170 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 10 kDa

Spur 1: Cen.PK2 + pGADΔ:BHRF1wt

Spur 2: Cen.PK2 + pGADΔ:BHRF1ΔTMwt

Spur 3: Cen.PK2 + pGADΔ:mBHRF1

Spur 4: Cen.PK2 + pGADΔ:mBHRF1ΔTM

Spur 5: BL21 + pET-DEST42:BHRF1 (Positivkontrolle)

Spur 6: Cen.PK2 + pGADΔ (Negativkontrolle)

In Spur 5 wurde die Positivkontrolle für BHRF1 mit einem Molekulargewicht von 22,6 kDa aufgetragen. In Spur 2 und 4 ist jeweils eine Bande mit einer Größe von ungefähr 17 kDa zu sehen. Hierbei handelt es sich um die beiden deletierten BHRF1-Proteine, denen die Transmembrandomäne fehlt (BHRF1ΔTMwt und mBHRF1ΔTM). Die beiden Vollängen-BHRF1 (Spur 1 und 3) konnten nicht nachgewiesen werden. Da BHRF1ΔTMwt und mBHRF1ΔTM keine Membranverankerung mehr haben, können diese löslichen Proteine vermutlich leichter aus Hefen isoliert werden als die beiden Vollängenproteine (BHRF1wt und mBHRF1), die in der Membran fest verankert sind.

4.2.4 Transportfähigkeit von Wasserstoffperoxid durch Aquaporine in Hefe

Da für die analysierten Aquaporine eine mögliche Funktion bei der Regulation von Zelltodvorgängen vermutet wurde, war es besonders wichtig eine potentielle Bedeutung als H₂O₂-Kanal zu überprüfen, da dieses Molekül als Zelltodsignal von Bedeutung ist.

Hierzu wurden spezielle Hefestämme ausgewählt. Der diploide Wildtyp-Hefestamm Cen.PK2 besitzt eine hohe Expressionsrate sowie eine stabile Proteinsynthese (Lohaus, 2002). Weiterhin wurden Hefen des Stammes BY4741 verwendet, bei dem es sich ebenfalls um einen Wildtyp-Hefestamm handelt. Dieser unterscheidet sich allerdings von Cen.PK2 durch einen anderen genetischen Hintergrund und besitzt einen haploiden Chromosomensatz. Die dazugehörigen Deletionsmutanten YML007w und YHR206w besitzen eine Deletion im *yap1* bzw. *skn7* Gen, die beide für Transkriptionsfaktoren kodieren, welche die Expression von Genen für die Antwort auf oxidativen Stress regulieren (Godon et al., 1998/1999). Aus

diesem Grund besitzen die beiden Stämme eine besonders hohe Empfindlichkeit gegen oxidativen Stress bzw. die Behandlung mit H_2O_2 .

Die verschiedenen Hefestämme wurden mit der DNA eines Aquaporins in pYEGFP in Kombination mit dem leeren Plasmid pGAD Δ bzw. mit der DNA von BHRF1wt bzw. BHRF1 Δ TMwt in pGAD Δ transformiert. Um den Einfluss von Wasserstoffperoxid auf Hefen, welche Aquaporine exprimieren, untersuchen zu können, wurden einige der entstandenen Kolonien in Flüssigmedium angezogen. Die Kulturen wurden mit autoklaviertem Wasser auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,1 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden je 3 μ l auf SD-Platten, welche verschiedene Konzentrationen von H_2O_2 enthielten, aber ohne die Aminosäuren Leucin und Uracil, aufgetropft. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für 6 Tage bei 30°C inkubiert.

4.2.4.1 Cen.PK2, ein diploider Wildtyp-Hefestamm

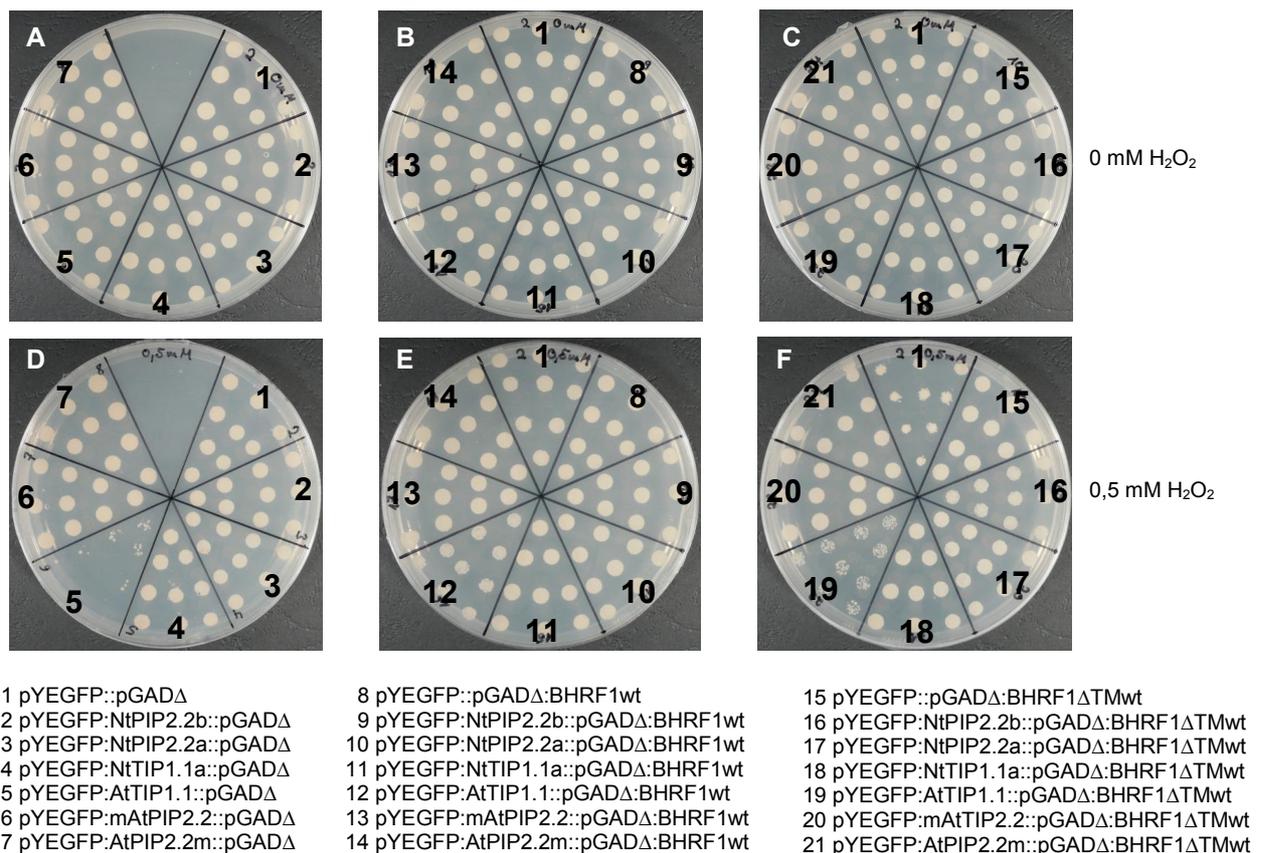


Abb. 4.2.-9: Einfluss von H_2O_2 auf das Wachstum von Hefen (Cen.PK2), die Aquaporine exprimieren

Die Platten enthalten selektives SD-Medium ohne die Aminosäuren Leucin und Uracil mit einer Konzentration von 0 mM (A bis C) bzw. 0,5 mM H_2O_2 (D bis F). A und D zeigen Hefezellen, die nur Aquaporine exprimieren. B und E zeigen Hefen, die mit Aquaporinen und dem Wildtyp-BHRF1 (BHRF1wt) transformiert sind. C und F zeigen das Wachstum von Aquaporin und BHRF1 Δ TMwt exprimierenden Hefen.

Die Fotos A bis C zeigen die Wachstumskontrolle ohne Wasserstoffperoxid an. Hier wachsen alle Hefezellen ohne Einschränkung. Eine Wasserstoffperoxid-Konzentration von 0,5 mM jedoch wirkt sich negativ auf das Wachstum von Hefen aus, welche das Aquaporin AtTIP1.1 von *Arabidopsis thaliana* exprimieren (D, Sektor 5). Wie auch schon von Bienert et al. (2006) veröffentlicht wurde, gilt dieses Aquaporin als Kanal für H₂O₂. Dabei kann die Aquaporin AtTIP1.1 vermittelte Aufnahme von H₂O₂ durch die Ko-Expression von BHRF1 beeinflusst werden. Hefezellen, die BHRF1wt und AtTIP1.1 exprimieren, können in Anwesenheit von H₂O₂ ohne starke Einschränkung wachsen (E, Sektor 12). Fehlt allerdings die Transmembrandomäne von BHRF1 (BHRF1 Δ TMwt; F, Sektor 19) zeigen die Hefen ein etwas reduziertes Wachstum im Vergleich zur Ko-Expression mit dem Wildtyp-BHRF1 (BHRF1wt; E, Sektor 12). Somit hat die zusätzliche Expression von BHRF1 einen positiven Effekt auf Aquaporin AtTIP1.1 exprimierende Hefen. BHRF1 hindert vermutlich das Aquaporin AtTIP1.1 von *Arabidopsis* an der Aufnahme von Wasserstoffperoxid. Hefen, die die Aquaporine NtPIP2.2b, NtPIP2.2a, NtTIP1.1a, mAtPIP2.2, AtPIP2.2m, hAQP1 und rAQP8 exprimieren, zeigen keine Veränderung im Wachstum in Gegenwart von H₂O₂ (D, Sektor 2 bis 4, 6 und 7). Einen Einfluss von BHRF1 auf die H₂O₂-Empfindlichkeit von Aquaporin exprimierenden Hefen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (E, Sektor 9 bis 11, 13, 14 und F, Sektor 16 bis 18, 20, 21). Die Expression von BHRF1wt (E, Sektor 8) und BHRF1 Δ TMwt (F, Sektor 15) beeinflusst in Gegenwart von H₂O₂ das Wachstum der Hefen nicht.

Da sich Hefen des Stammes Cen.PK2 offensichtlich für diese Art von Experimenten nicht besonders gut eignen, wurden haploide Stämme verwendet, die eine Mutation/Deletion im *yap1* (YML007w) bzw. *skn7* (YHR206w) Gen aufweisen. Diese beiden Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Genen aktivieren, die den Schaden durch oxidativen Stress reduzieren, z. B. Enzyme wie Katalasen, Superoxiddismutasen, Alkylhydroperoxidreduktasen, Thioredoxine, Thiolperoxidasen, Cytochrom c Peroxidasen und Hitzeschockproteine (Bienert et al., 2006). Deshalb sind diese Hefestämme besonders empfindlich gegen oxidativen Stress bzw. die Behandlung mit H₂O₂. Der dazugehörige Wildtyp-Hefestamm BY4741 wurde ebenfalls eingesetzt.

4.2.4.2 BY4741, ein haploider Wildtyp-Hefestamm

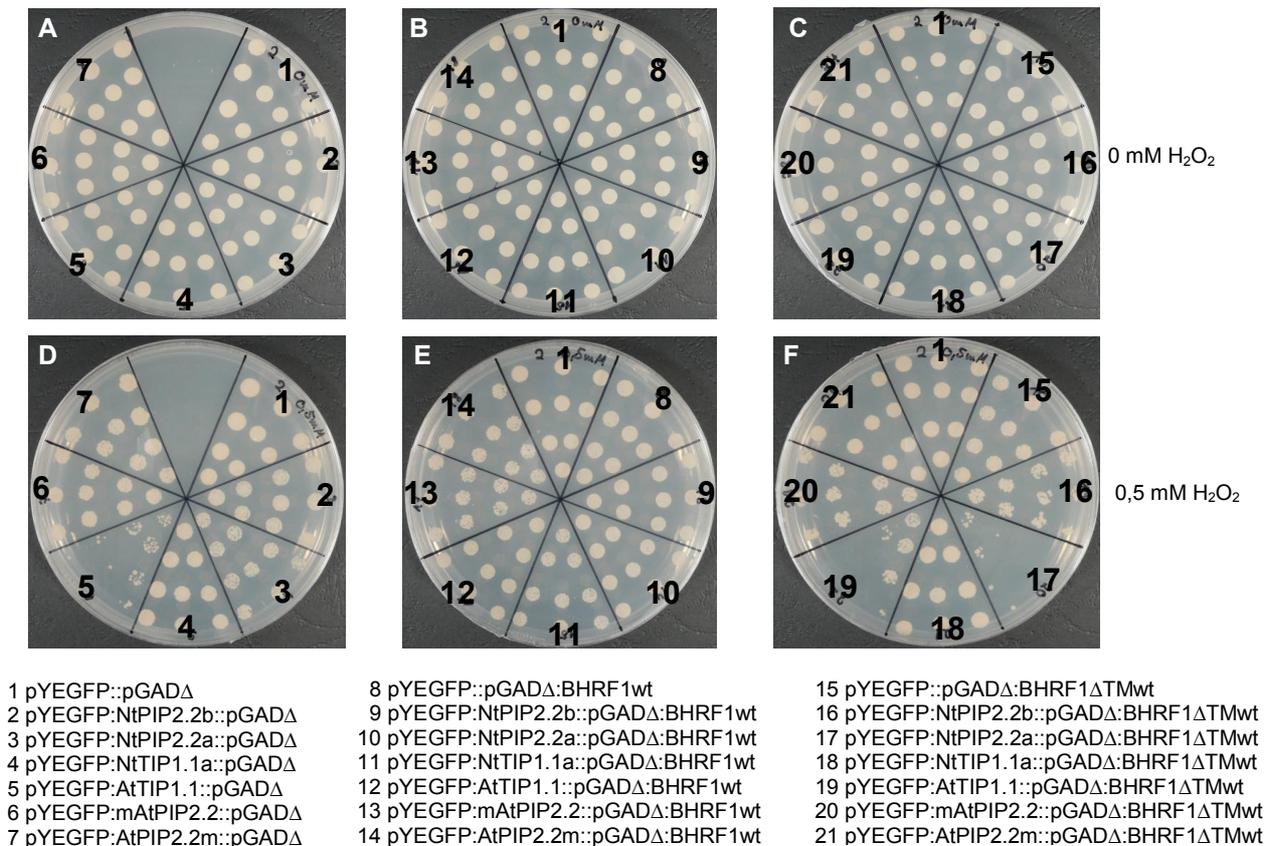


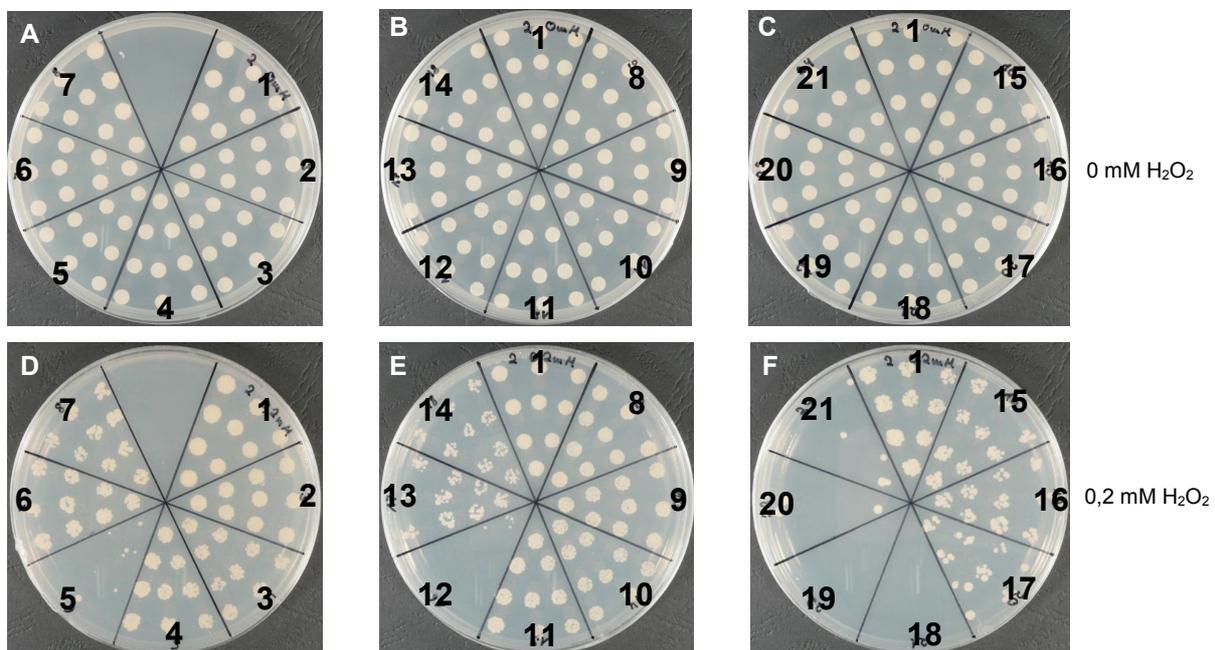
Abb. 4.2-10: Einfluss von H₂O₂ auf das Wachstum von Wildtyp-Hefen (BY4741), die Aquaporine exprimieren

Die Platten enthalten selektives SD-Medium ohne die Aminosäuren Leucin und Uracil mit einer Konzentration von 0 mM (A bis C) bzw. 0,5 mM H₂O₂ (D bis F). A und D zeigen Hefezellen, welche Aquaporine exprimieren. In Abbildung B und E werden Hefen gezeigt, die mit Aquaporinen und dem Wildtyp-BHRF1 (BHRF1wt) transformiert sind. In Abbildung C und F ist das Wachstum von Aquaporin und BHRF1ΔTMwt exprimierenden Hefen abgebildet.

Schon bei der Verwendung des Wildtypstammes BY4741 zeigen sich deutliche Unterschiede zum Hochexpressionsstamm Cen.PK2. BY4741, welche die Tabakaquaporine NtPIP2.2b bzw. NtPIP2.2a exprimieren, zeigen in Kombination mit BHRF1ΔTMwt ein verändertes Wachstum in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (F, Sektor 16 und 17). Während NtPIP2.2b und BHRF1ΔTMwt exprimierende Hefen bei Anwesenheit von H₂O₂ nur eine leichte Reduktion im Wachstum zeigen (F, Sektor 16), sind Hefezellen mit einer Ko-Expression von NtPIP2.2a und BHRF1ΔTMwt überhaupt nicht mehr fähig in Anwesenheit von H₂O₂ zu wachsen (F, Sektor 17). Ebenfalls ein reduziertes Wachstum verzeichnen BY4741 bei der Expression des *Arabidopsis* aquaporins AtTIP1.1 in Gegenwart von H₂O₂ (D, Sektor 5). Bei zusätzlicher Expression von BHRF1wt können die AtTIP1.1 exprimierenden Hefen trotz H₂O₂ im Medium wieder wachsen (E, Sektor 12). Fehlt die Transmembrandomäne von BHRF1

(BHRF1 Δ TMwt) wirkt sich das negativ auf das Wachstum der mit AtTIP1.1 transformierten Hefen aus (F, Sektor 19). Auch mAtPIP2.2 und BHRF1 Δ TMwt exprimierende BY4741 weisen ein leicht reduziertes Wachstum bei einer H₂O₂-Konzentration von 0,5 mM im Medium auf (F, Sektor 20). BY4741, die NtTIP1.1a und AtPIP2.2m exprimieren, zeigen keinen negativen Einfluss auf das Wachstum in Gegenwart von H₂O₂ (D, Sektor 4 und 7, E, Sektor 11 und 14, F, Sektor 18 und 21). BHRF1wt (E, Sektor 8) und BHRF1 Δ TMwt (F, Sektor 15) exprimierende Hefen zeigen bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid keine Veränderungen im Wachstum.

4.2.4.3 YHR206w, ein haploider Hefestamm mit einer Mutation/Deletion im *skn7* Gen



1 pYEGFP::pGAD Δ
 2 pYEGFP:NtPIP2.2b::pGAD Δ
 3 pYEGFP:NtPIP2.2a::pGAD Δ
 4 pYEGFP:NtTIP1.1a::pGAD Δ
 5 pYEGFP:AtTIP1.1::pGAD Δ
 6 pYEGFP:mAtPIP2.2::pGAD Δ
 7 pYEGFP:AtPIP2.2m::pGAD Δ

8 pYEGFP::pGAD Δ :BHRF1wt
 9 pYEGFP:NtPIP2.2b::pGAD Δ :BHRF1wt
 10 pYEGFP:NtPIP2.2a::pGAD Δ :BHRF1wt
 11 pYEGFP:NtTIP1.1a::pGAD Δ :BHRF1wt
 12 pYEGFP:AtTIP1.1::pGAD Δ :BHRF1wt
 13 pYEGFP:mAtPIP2.2::pGAD Δ :BHRF1wt
 14 pYEGFP:AtPIP2.2m::pGAD Δ :BHRF1wt

15 pYEGFP::pGAD Δ :BHRF1 Δ TMwt
 16 pYEGFP:NtPIP2.2b::pGAD Δ :BHRF1 Δ TMwt
 17 pYEGFP:NtPIP2.2a::pGAD Δ :BHRF1 Δ TMwt
 18 pYEGFP:NtTIP1.1a::pGAD Δ :BHRF1 Δ TMwt
 19 pYEGFP:AtTIP1.1::pGAD Δ :BHRF1 Δ TMwt
 20 pYEGFP:mAtPIP2.2::pGAD Δ :BHRF1 Δ TMwt
 21 pYEGFP:AtPIP2.2m::pGAD Δ :BHRF1 Δ TMwt

Abb. 4.2-11: Einfluss von H₂O₂ auf das Wachstum von Hefen (YHR206w), die Aquaporine exprimieren

Die Platten enthalten selektives SD-Medium ohne die Aminosäuren Leucin und Uracil mit einer Konzentration von 0 mM (A bis C) bzw. 0,2 mM H₂O₂ (D bis F). In Abbildung A und D sind Hefezellen dargestellt, die nur Aquaporine exprimieren. B und E zeigen Hefen, die mit Aquaporinen und dem Wildtyp-BHRF1 (BHRF1wt) transformiert sind. In Abbildng C und F ist das Wachstum von Aquaporin und BHRF1 Δ TMwt exprimierenden Hefen abgebildet.

Die Expression der Aquaporine NtPIP2.2b, NtPIP2.2a und NtTIP1.1a aus *Nicotiana tabacum* mit (E, Sektor 9 bis 11) bzw. ohne BHRF1wt (D, Sektor 2 bis 4) hat in Gegenwart von H₂O₂ keinen negativen Effekt auf das Wachstum der Hefezellen des mutierten Stammes YHR206w. Hefen, die diese drei Aquaporine in Kombination mit BHRF1 Δ TMwt und in

Anwesenheit von H_2O_2 exprimieren, zeigen allerdings nur geringes Wachstum (F, Sektor 16 und 17) bzw. im Fall von NtTIP1.1a exprimierenden Hefen keinerlei Wachstum (F, Sektor 18). Auch die Expression von BHRF1 Δ TMwt (F, Sektor 15) vermindert das Wachstum der Hefen bei Zugabe von Wasserstoffperoxid ins Medium. Hefen, die das Aquaporin AtTIP1.1 exprimieren, weisen ebenfalls kein Wachstum bei Anwesenheit von H_2O_2 auf (D, Sektor 5). Dabei macht es keinen Unterschied, ob zusätzlich BHRF1wt bzw. BHRF1 Δ TMwt exprimiert wird (E, Sektor 12 und F, Sektor 19). Die Expression der beiden *Arabidopsis* aquaporine mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m führt zu einer sehr geringen Reduktion im Wachstum der Hefezellen bei Anwesenheit von H_2O_2 (D, Sektor 6 und 7). Die zusätzliche Expression von BHRF1wt bzw. BHRF1 Δ TMwt vermindert das Wachstum dieser Hefezellen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid etwas (E, Sektor 13 und 14) bzw. völlig (F, Sektor 20 und 21). Die Expression von BHRF1wt in Gegenwart von H_2O_2 hat keinen Einfluss auf das Wachstum der Hefen.

4.2.4.4 YML007w, ein haploider Hefestamm mit einer Mutation/Deletion im *yap1* Gen

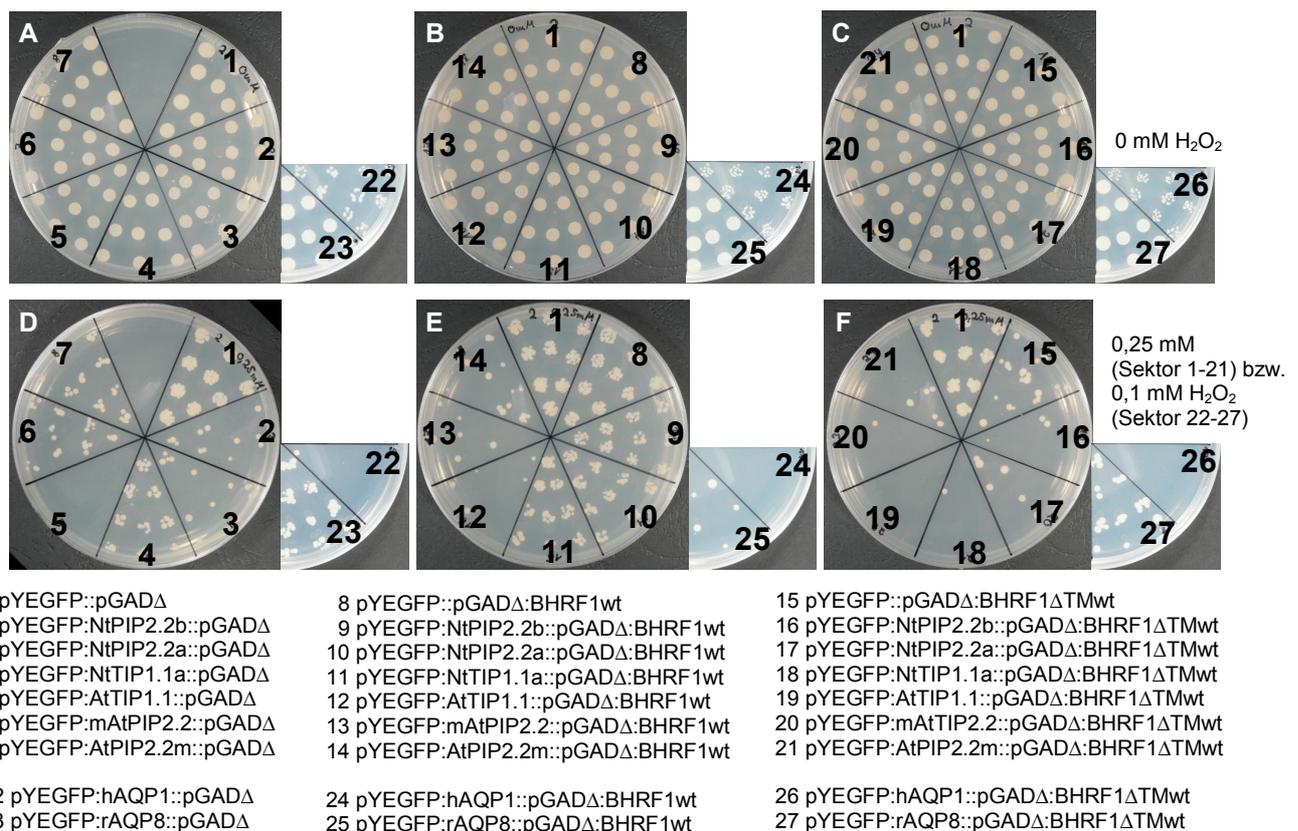


Abb. 4.2-12: Einfluss von H_2O_2 auf das Wachstum von Hefen (YML007w), die Aquaporine exprimieren

Die Platten enthalten selektives SD-Medium ohne die Aminosäuren Leucin und Uracil mit einer Konzentration von 0 mM (A bis C) bzw. 0,25 mM (D bis F, Sektor 1 bis 21) bzw. 0,1 mM H_2O_2 (D bis F, Sektor 22 bis 27). A und D zeigen Hefezellen, welche Aquaporine exprimieren. In Abbildung B und E werden Hefen gezeigt, die mit

Aquaporinen und dem Wildtyp-BHRF1 (BHRF1wt) transformiert sind. C und F zeigen das Wachstum von Aquaporin und BHRF1 Δ TMwt exprimierenden Hefen.

Offenbar sind Hefen des mutierten Stammes YML007w am empfindlichsten gegenüber H₂O₂ und zeigen den größten durch BHRF1 verursachten Effekt. Deshalb und um eine Verbindung zum tierischen Organismus zu bekommen, wurde dieser Stamm mit zwei weiteren Aquaporinen (hAQP1 bzw. rAQP8) transformiert. Bei hAQP1 handelt es sich um das Aquaporin 1 des Menschen, bei rAQP8 um das Aquaporin 8 der Ratte. Da BHRF1 ein Protein des humanen Epstein-Barr Virus ist, sollte untersucht werden, ob BHRF1 in Gegenwart von Wasserstoffperoxid ebenfalls eine Wirkung auf diese beiden Aquaporine hat.

Hefen, die Aquaporine (NtPIP2.2b, NtPIP2.2a, NtTIP1.1a, AtTIP1.1, mAtPIP2.2, AtPIP2.2m, hAQP1 und rAQP8) exprimieren, haben bei Anwesenheit von H₂O₂ im Medium sichtlich Probleme zu wachsen (D, Sektor 2 bis 7, 22 und 23). Exprimieren sie aber zusätzlich noch BHRF1wt, können jene, die die Aquaporine NtPIP2.2b, NtPIP2.2a und NtTIP1.1a aus Tabak exprimieren besser wachsen (E, Sektor 9 bis 11). Fehlt dagegen die Transmembrandomäne des BHRF1-Proteins (BHRF1 Δ TMwt) stellen diese Hefen in Gegenwart von H₂O₂ ihr Wachstum völlig ein (F, Sektor 16 bis 18). YML007w, die AtTIP1.1 bzw. hAQP1 ohne (D, Sektor 5 und 22) bzw. mit BHRF1wt (E, Sektor 12 und 24) bzw. mit BHRF1 Δ TMwt (F, Sektor 19 und 26) exprimieren, sind so empfindlich gegenüber H₂O₂, dass kein Wachstum möglich ist. Anders als von Bienert et al. (2006) beschrieben, konnte in dieser und einer weiteren Arbeit (Köber, 2008) gezeigt werden, dass auch das humane AQP1 als H₂O₂-Kanal fungiert. Bei einer Expression des rAQP8 der Ratte scheint die Ko-Expression von BHRF1wt bei Anwesenheit von H₂O₂ negative Auswirkungen auf das Wachstum der Hefen zu haben (E, Sektor 25), während die Abwesenheit der Transmembrandomäne von BHRF1 (BHRF1 Δ TMwt; F, Sektor 27) im Vergleich zum Vollängen-BHRF1 (BHRF1wt; E, Sektor 23) keinen Einfluss auf das Wachstum von rAQP8 exprimierenden Hefen hat. Auch das Wachstum der mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m exprimierenden YML007w wird durch die Anwesenheit von H₂O₂ deutlich eingeschränkt (D, Sektor 6 und 7). Die Kombination dieser beiden Aquaporine mit BHRF1 hat ein verstärktes Absterben der Hefezellen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zur Folge (E, Sektor 13, 14 und F, Sektor 20, 21). Die Expression von BHRF1 Δ TMwt (F, Sektor 15) in Anwesenheit von H₂O₂ scheint den Hefen Probleme zu machen.

Alle Aquaporine, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind zum Transport von H₂O₂ befähigt. Allerdings gibt es einige Unterschiede in der Transportrate. Während NtPIP2.2b und NtPIP2.2a ziemlich starke Wasserstoffperoxid-Kanäle sind, transportieren die

Aquaporine NtTIP1.1a, mAtPIP2.2, AtPIP2.2m und rAQP8 weniger H_2O_2 . Bei AtTIP1.1 und hAQP1 handelt es sich ebenfalls um starke Transporter von H_2O_2 .

Die Transportfähigkeit von H_2O_2 durch die verwendeten Aquaporine kann bei einigen durch die Ko-Expression des anti-apoptotischen BHRF1-Proteins des humanen Epstein-Barr Virus beeinflusst werden. Offenbar werden die Poren der Aquaporine NtPIP2.2b und NtPIP2.2a durch BHRF1 zum Teil verschlossen. Somit gelangt weniger H_2O_2 in die Zelle und die Hefen können besser wachsen. Die Porenaktivität der Aquaporine NtTIP1.1a, AtTIP1.1 und hAQP1 wird offenbar nicht durch BHRF1 beeinflusst. AtTIP1.1 und hAQP1 behalten ihre starke H_2O_2 -Transporteigenschaft bei, während die Pore von NtTIP1.1a eine schwache Beförderung von Wasserstoffperoxid zu Tage legt. Die beiden *Arabidopsis*-aquaporine mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m und das Rattenaquaporin 8 werden durch BHRF1 zu Kanälen mit leicht erhöhter H_2O_2 -Transportrate. Fehlt allerdings die Transmembrandomäne von BHRF1 (BHRF1 Δ TMwt) sind die Poren aller hier getesteten Aquaporine offen. Somit gelangt so viel H_2O_2 in die Zellen, dass diese nicht mehr in der Lage sind damit fertig zu werden und sterben. Eine Ausnahme stellt das rAQP8 dar, dessen Pore sich bei Anwesenheit von BHRF1 Δ TMwt vermutlich verschließt bzw. verstopft und somit weniger H_2O_2 in die Zelle gelangt.

4.2.5 Nachweis von H_2O_2 mit 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) in Hefe

Der nichtfluoreszierende Farbstoff 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) diffundiert durch die Zellmembran der Hefen ins Zellinnere, wo er durch endogene Esterasen zum hydrophileren Leukofarbstoff 2',7'-Dichlorfluorescin (DCFH) deacetyliert wird. In Gegenwart von H_2O_2 wird DCFH schnell zu einem grünfluoreszierenden Farbstoff (2',7'-Dichlorfluorescein (DCF)) oxidiert.

Für den Nachweis von H_2O_2 durch DCFH-DA wurden die transgenen Hefen in SD-Flüssigmedium ohne die Aminosäure Uracil angezogen und mit H_2O_2 versetzt. Nachdem die geernteten Hefezellen 2 x mit H_2O gewaschen wurden, wurden sie in 1 x PBS mit 1 μ l 1 mM 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) aufgenommen und für mindestens 1 Stunde bei RT inkubiert (3.2.12).

Nun konnten die Hefen unter dem Fluoreszenzkehrmikroskop angeschaut und Aufnahmen gemacht werden.

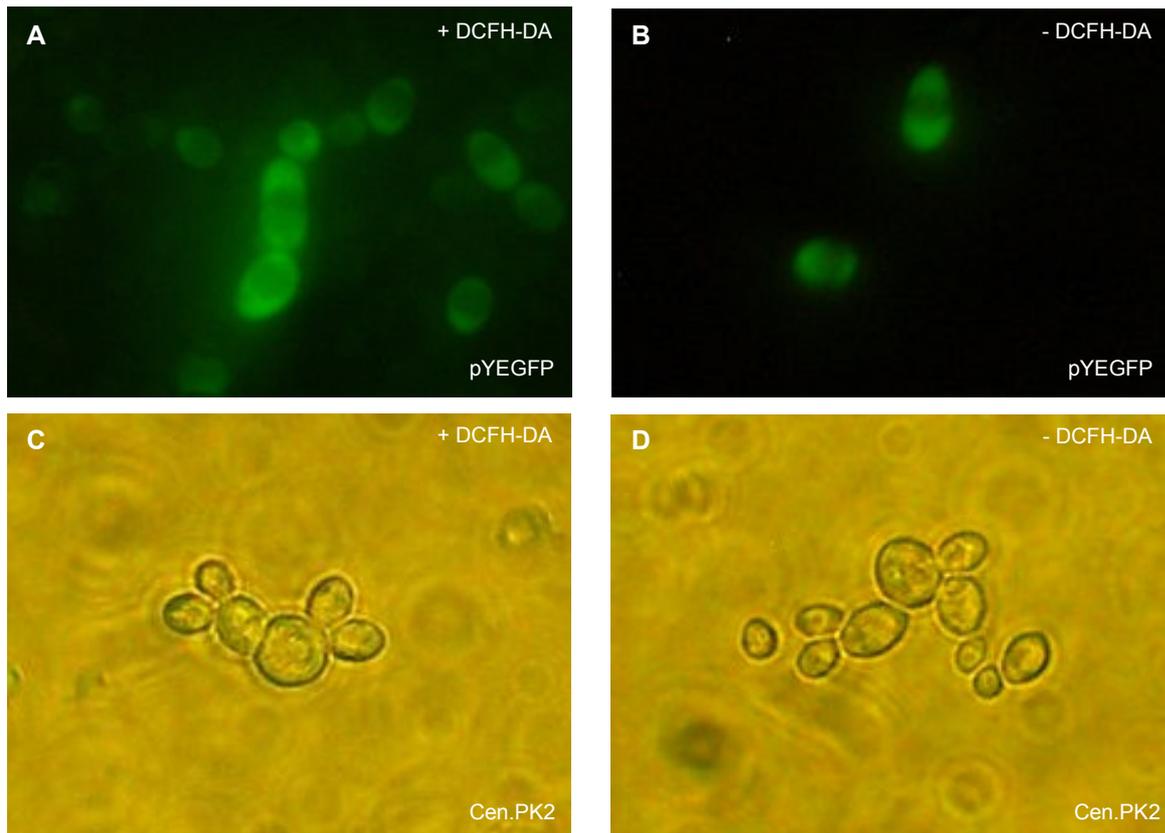
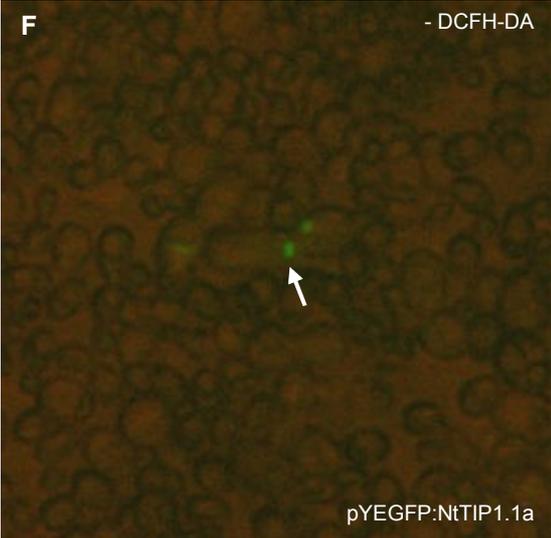
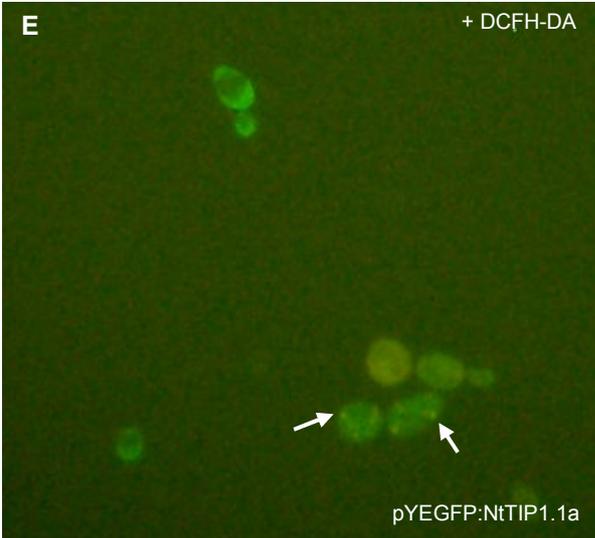
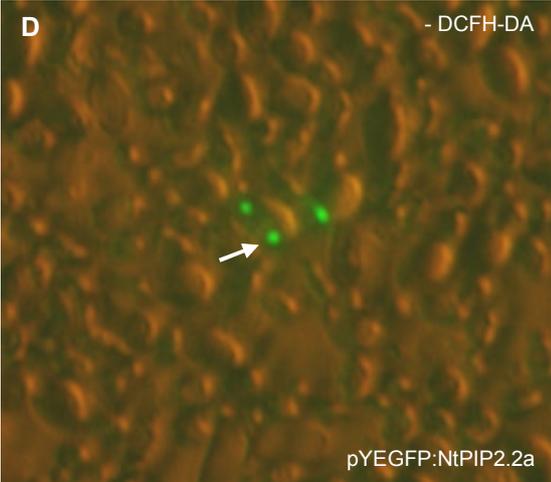
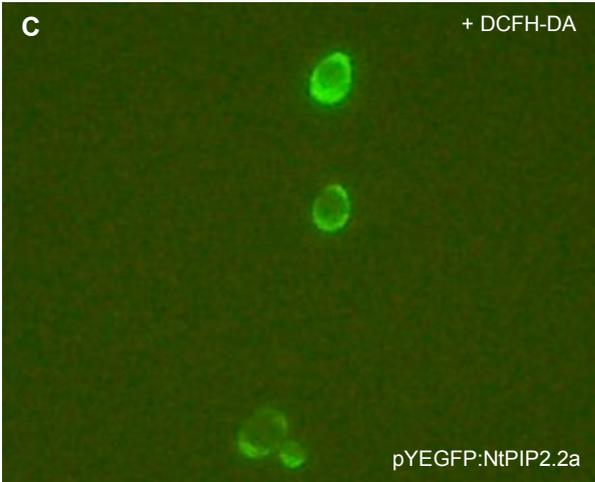
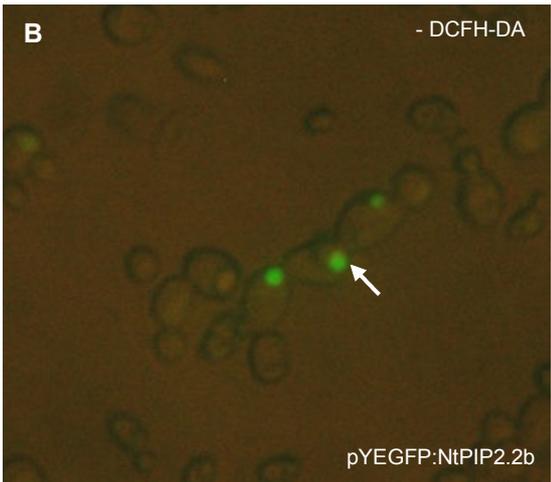
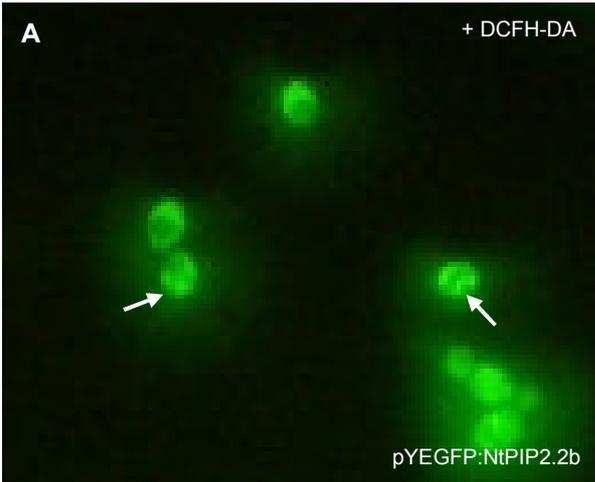
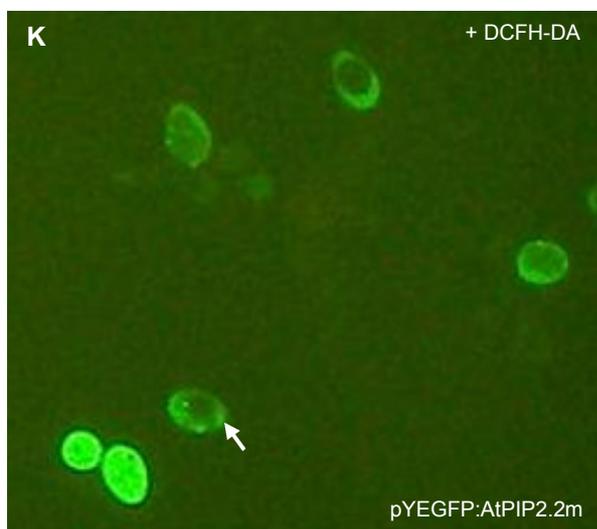
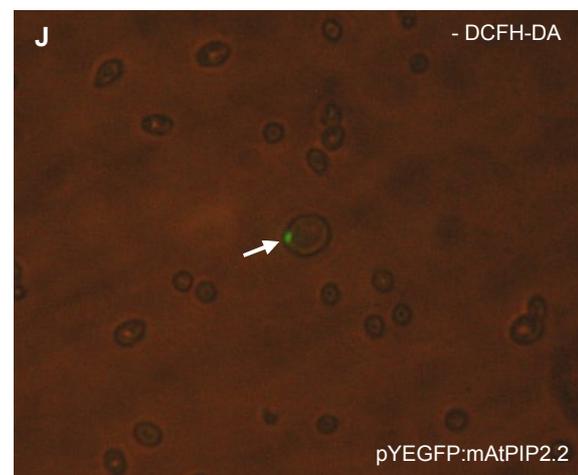
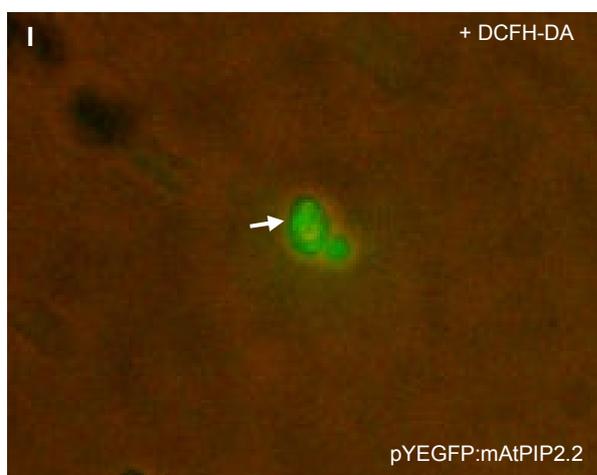
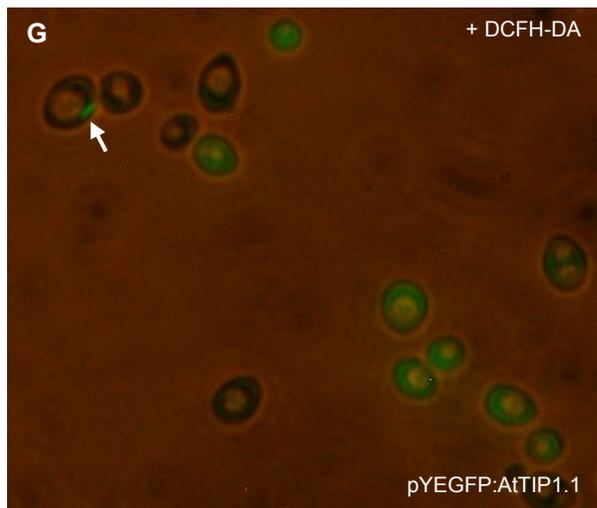


Abb. 4.2-13: Aufnahmen von Cen.PK2 + pYEGFP (A und B) und Cen.PK2 (C und D); 40-fache Vergrößerung
 A und B zeigen Cen.PK2, die mit pYEGFP transformiert sind und mit H_2O_2 behandelt wurden. In Abbildung A ist die Anfärbung von H_2O_2 mittels DCFH-DA zu sehen. B zeigt gleich behandelte Hefen, die nicht mit DCFH-DA angefärbt wurden. C und D zeigen nicht transformierte Cen.PK2, die mit H_2O_2 behandelt wurden. Die Hefen in Abbildung C wurden mit DCFH-DA behandelt, die in Abbildung D nicht.

Da der Farbstoff 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF), ebenso wie GFP, eine grüne Fluoreszenz hat, ist in Abbildung 4.2-13 nicht klar zu erkennen, ob die Grünfärbung durch GFP oder durch den H_2O_2 nachweisenden Farbstoff hervorgerufen wird. Ein Vergleich zwischen den mit (A) bzw. ohne DCFH-DA (B) behandelten Hefezellen, die nur mit dem leeren Plasmid pYEGFP transformiert wurden, zeigt keinen Unterschied in der Grünfärbung der Zellen. Dies bestätigt, dass die Ursache der grünen Fluoreszenz in den Hefezellen durch das grünfluoreszierende Protein (GFP) zustande kommt. Auch die Fotos der nicht transformierten Cen.PK2 die ebenfalls mit H_2O_2 und DCFH-DA behandelt wurden (C), weisen keinerlei Grünfärbung auf. Dies schließt die Aufnahme von H_2O_2 in die Hefezellen durch Diffusion aus.





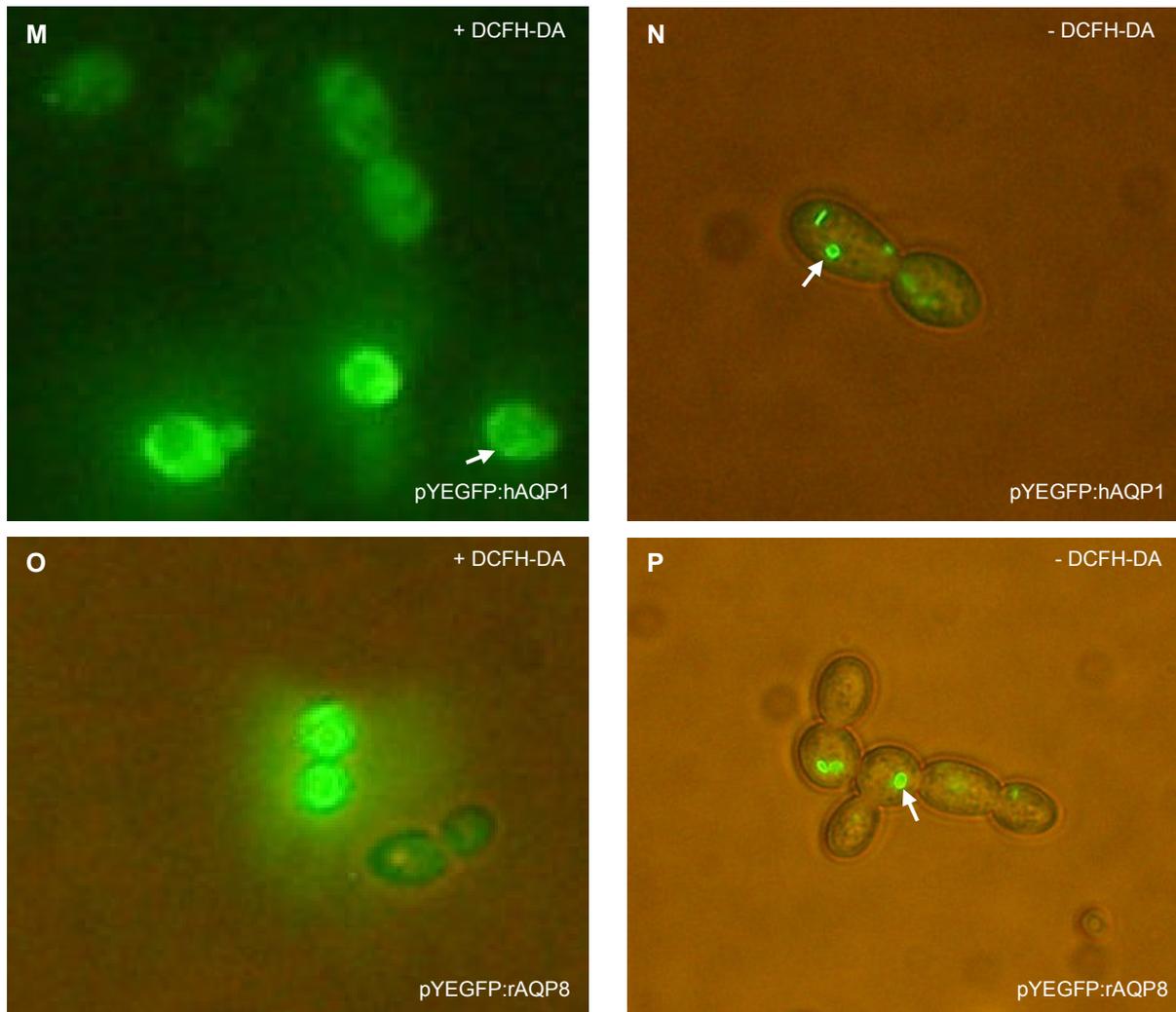


Abb. 4.2-14: Aufnahmen von Cen.PK2 + pYEGFP:NtPIP2.2b (A und B), Cen.PK2 + pYEGFP:NtPIP2.2a (C und D), Cen.PK2 + pYEGFP:NtTIP1.1a (E und F), Cen.PK2 + pYEGFP:AtTIP1.1 (G und H), Cen.PK2 + pYEGFP:mAtPIP2.2 (I und J), Cen.PK2 + pYEGFP:AtPIP2.2m (K und L), Cen.PK2 + pYEGFP:hAQP1 (M und N) und Cen.PK2 + pYEGFP:rAQP8 (O und P); 40-fache Vergrößerung

Die Fotos zeigen Cen.PK2, die Aquaporin-GFP-Fusionsproteine exprimieren und mit H_2O_2 behandelt wurden. In Abbildung A, C, E, G, I, K, M und O ist die Anfärbung von H_2O_2 mittels DCFH-DA zu sehen. B, D, F, H, J, L, N und P zeigen gleich behandelte Hefen, die nicht mit DCFH-DA angefärbt wurden.

Ein Vergleich der Hefen, die mit DCFH-DA (A, C, E, G, I, K, M und O) und jenen, die ohne DCFH-DA (B, D, F, H, J, L, N und P) behandelt wurden, zeigt den Unterschied der grünen Fluoreszenz bedingt durch die Anwesenheit von H_2O_2 (B, D, F, H, J, L, N und P) bzw. durch GFP-Fusionsproteine (A, C, E, G, I, K, M und O). In den Abbildungen B, D, F, H, J, L, N und P sind punktförmige grüne Bereiche innerhalb der Hefezellen zu erkennen. Hierbei handelt es sich um Aquaporine, die mit GFP Fusionsproteine bilden (siehe auch 4.2.2.1). Die stark abgerundete Form der Fusionsproteine deutet auf eine Vakuolenlokalisierung der Fusionsproteine hin (B, D, F, H, J, L, N und P, Pfeile). Auf den Abbildungen A, C, E, G, I, K, M und O ist die grüne Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma der Zelle verbreitet. Diese grüne Fluoreszenz weist das durch Aquaporine in die Zelle transportierte H_2O_2 nach. Das in

die Hefezellen diffundierte DCFH-DA wird dort von endogenen Esterasen deacetyliert und anschließend durch die Anwesenheit von H_2O_2 zum grünfluoreszierenden DCF oxidiert. Teilweise ist die Vakuolenlokalisierung einiger Aquaporin-GFP-Fusionsproteine in den Zellen zu erkennen (A, C, E, G, I, K, M und O, Pfeile). Auffallend ist die schwache Fluoreszenz der AtTIP1.1 exprimierenden Cen.PK2 (G). Da Hefen mit AtTIP1.1 Expression empfindlicher gegenüber H_2O_2 sind (siehe 4.2.4.1 D, Sektor 5), können vermutlich weniger Zellen, bei denen H_2O_2 nachgewiesen werden konnte, überleben.

Zusätzlich wurden Hefen, des mutierten Stammes YML007w, welche eine höhere Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 aufweisen ebenfalls mit Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) angefärbt (3.2.12).

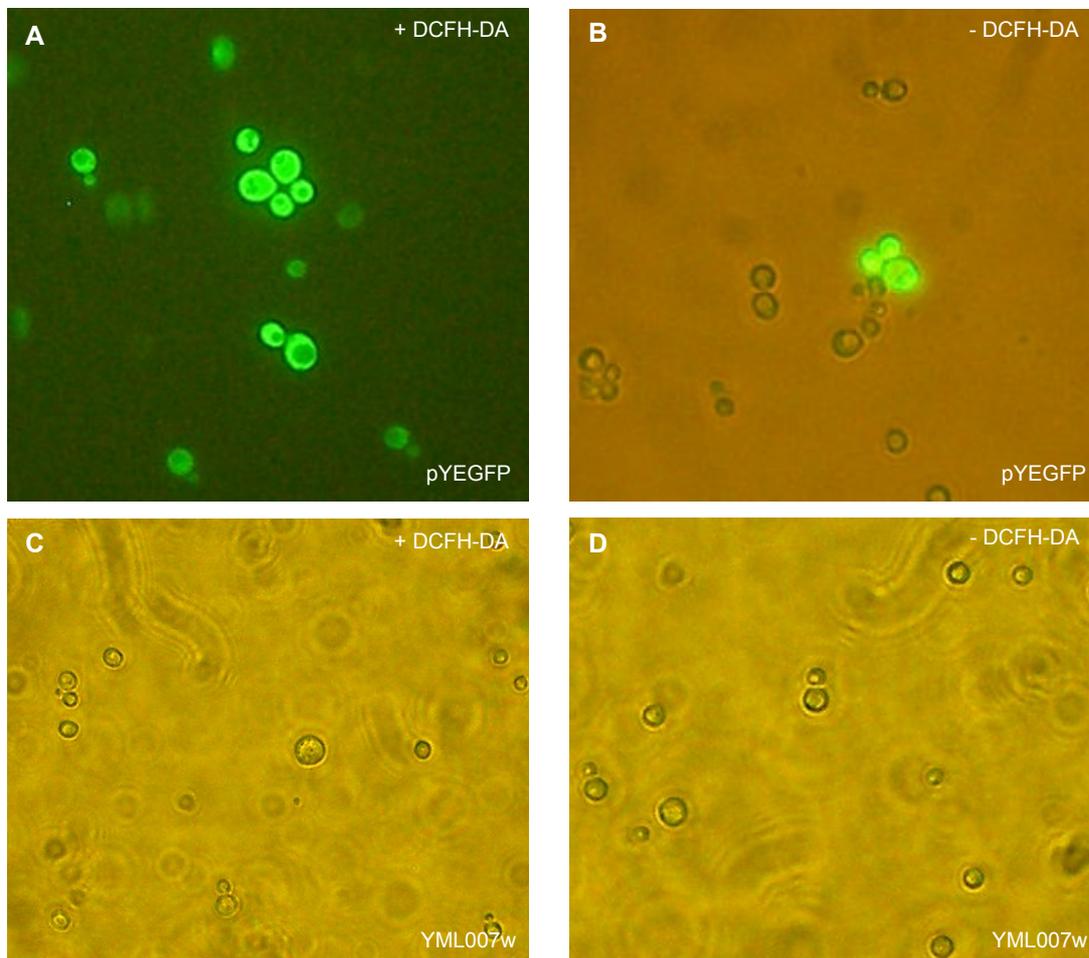
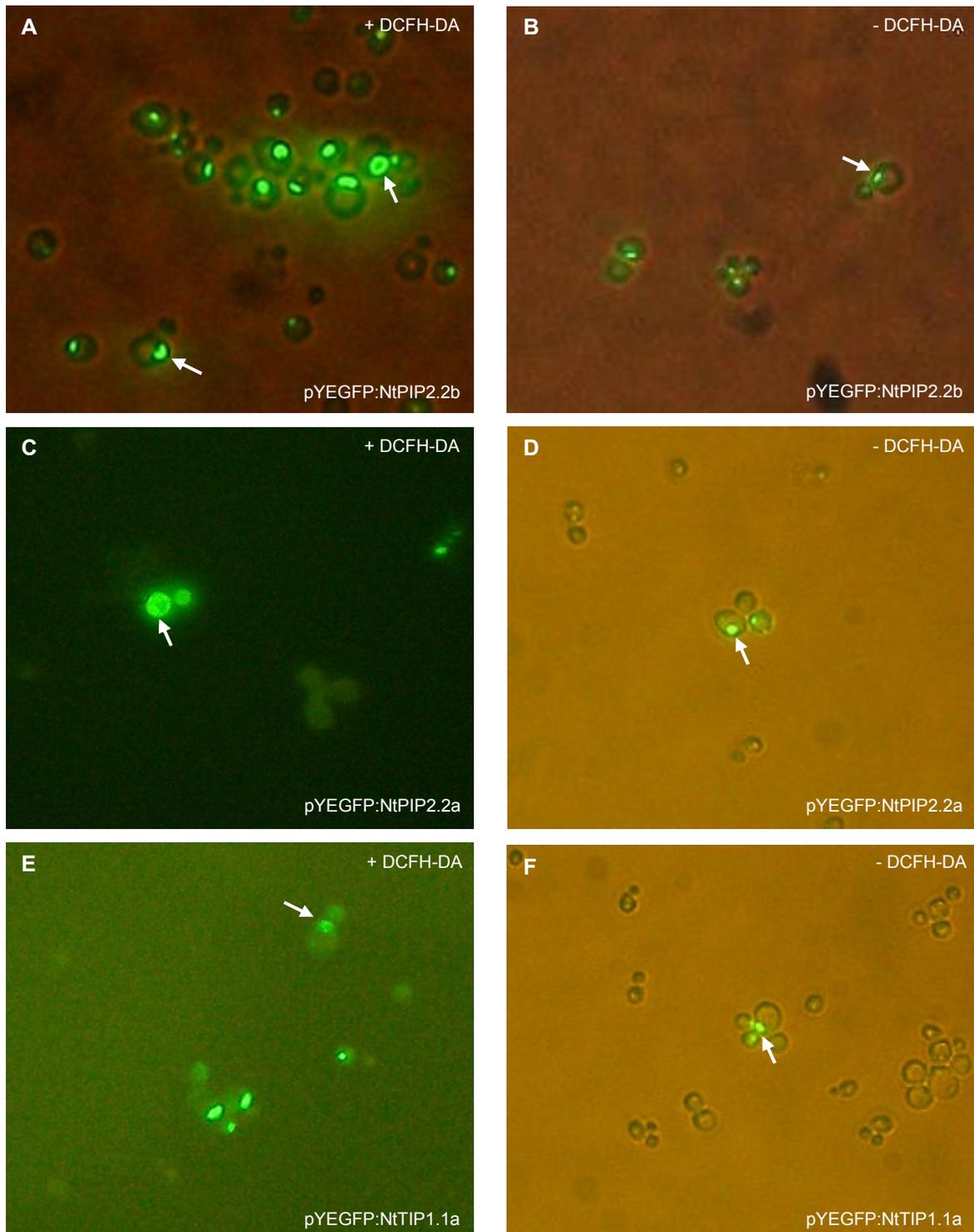
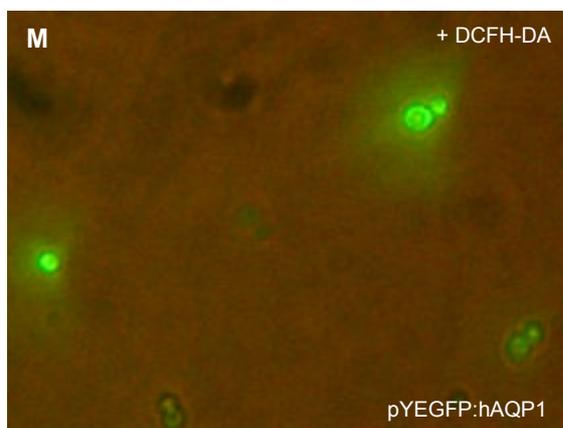
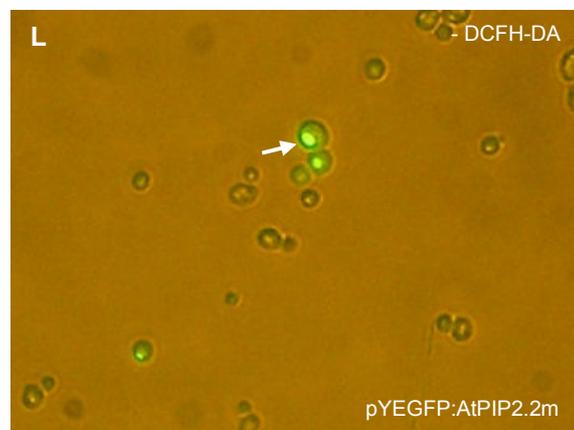
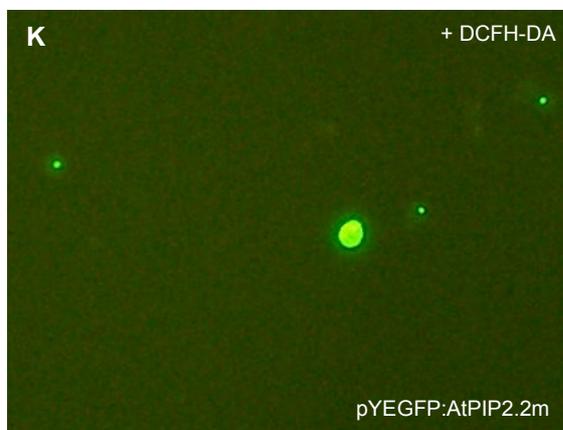
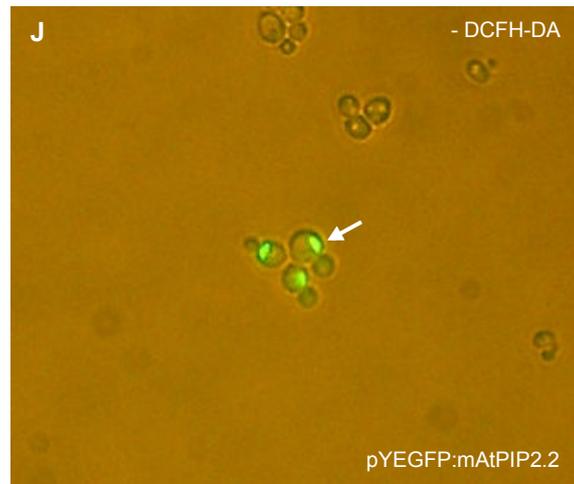
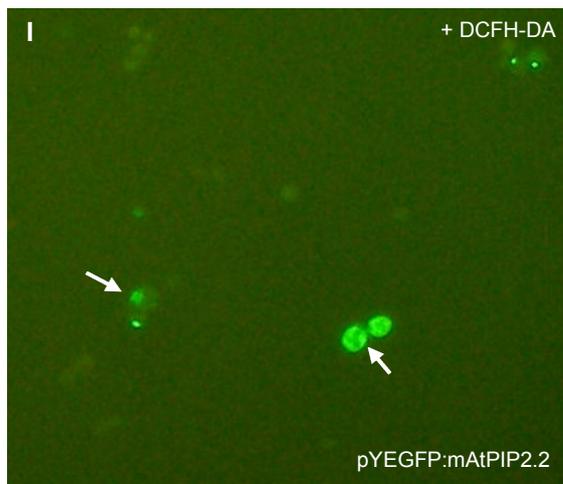
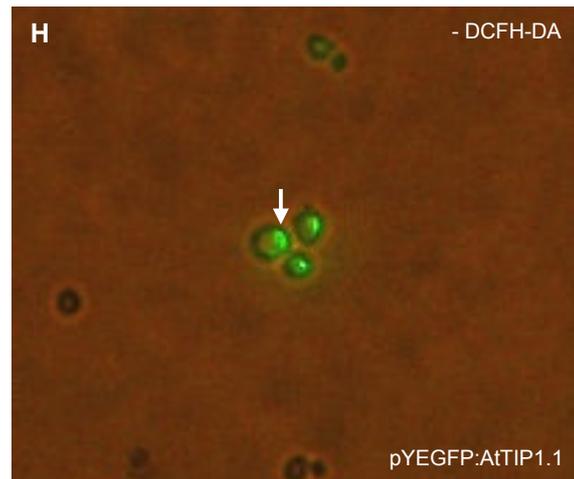
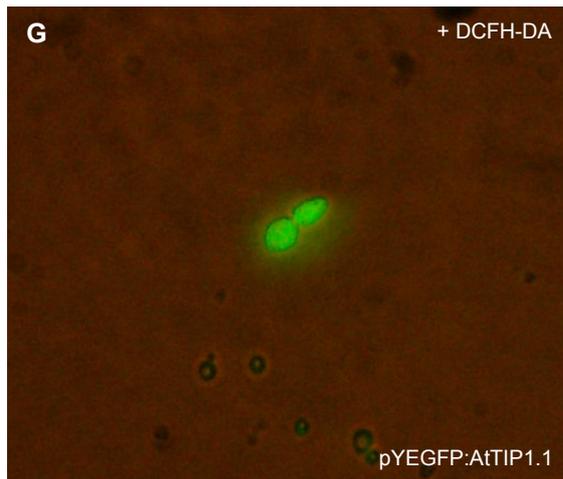


Abb. 4.2-15: Aufnahmen von YML007w + pYEGFP (A und B) und YML007w (C und D); 40-fache Vergrößerung

Die Abbildungen A und B zeigen YML007w, die mit pYEGFP transformiert sind und mit H_2O_2 behandelt wurden. In Abbildung A ist die Anfärbung von H_2O_2 mittels DCFH-DA zu sehen. B zeigt gleich behandelte Hefen, die nicht mit DCFH-DA angefärbt wurden. Die Abbildungen C und D zeigen nicht transformierte YML007w, die mit H_2O_2 behandelt wurden. Die Hefen in Abbildung C wurden mit DCFH-DA behandelt, die in Abbildung D nicht.

Auch bei Hefen des mutierten Stammes YML007w, die mit pYEGFP transformiert sind, ist kein Unterschied der grünen Fluoreszenz zwischen Zellen, die mit DCFH-DA behandelt wurden (A) und jenen ohne Behandlung mit DCFH-DA (B) zu erkennen. Auch die mit H₂O₂ behandelten nicht transformierten Hefen weisen keine Fluoreszenz auf (C), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die im gesamten Zytoplasma der Hefezellen verbreitete Grünfärbung durch die Fluoreszenz des GFP zustande kommt.





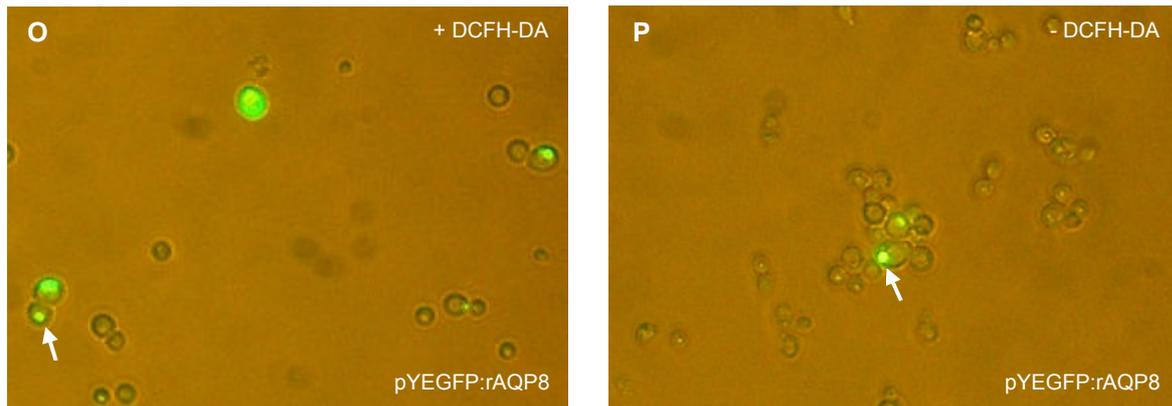


Abb. 4.2-16: Aufnahmen von YML007w + pYEGFP:NtPIP2.2b (A und B), YML007w + pYEGFP:NtPIP2.2a (C und D), YML007w + pYEGFP:NtTIP1.1a (E und F), YML007w + pYEGFP:AtTIP1.1 (G und H), YML007w + pYEGFP:mAtPIP2.2 (I und J), YML007w + pYEGFP:AtPIP2.2m (K und L), YML007w + pYEGFP:hAQP1 (M und N) und YML007w + pYEGFP:rAQP8 (O und P); 40-fache Vergrößerung

Die Fotos zeigen YML007w, die Aquaporin-GFP-Fusionsproteine exprimieren und mit H_2O_2 behandelt wurden. In den Abbildungen A, C, E, G, I, K, M und O ist die Anfärbung von H_2O_2 mittels DCFH-DA zu sehen. B, D, F, H, J, L, N und P zeigen gleich behandelte Hefen, die nicht mit DCFH-DA angefärbt wurden.

Bei den Hefezellen des Stammes YML007w konnten hauptsächlich bei der Expression von NtPIP2.2a (C), AtTIP1.1 (G), mAtPIP2.2 (I), AtPIP2.2m (K), hAQP1 (M) und rAQP8 (O) vereinzelt Zellen erkannt werden, die im gesamten Zytoplasma der Zelle eine grüne Fluoreszenz zeigten. Bei NtPIP2.2b (A, Pfeil) und NtTIP1.1a (E, Pfeil) exprimierenden Hefen ist nur die grüne Fluoreszenz der Aquaporin-GFP-Fusionsproteine sichtbar. Da dieser Hefestamm durch seine Mutation im *yap1* Gen empfindlicher gegenüber Wasserstoffperoxid ist, können vermutlich viele der Aquaporin exprimierenden Zellen nicht überleben, da zu viel H_2O_2 durch Aquaporine in die Zellen transportiert wird. In Abbildung B, D, F, H, J, L, N und P lässt sich die grüne Fluoreszenz der Fusionsproteine im Bereich der Vakuolen gut erkennen.

4.3 Transiente Expression von GFP-Fusionsproteinen in Pflanzen

Um einen möglichen Effekt der Überexpression von Aquaporinen in Pflanzen untersuchen zu können, wurden *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit Aquaporin exprimierenden Agrobakterien infiltriert und analysiert.

4.3.1 Beschreibung der GFP-Fusionskonstrukte

Die hierfür verwendete cDNA von NtTIP1.1a und NtPIP2.2b lag als C-terminale Fusion in pK7FWG2 (NtTIP1.1a-C → NtTIP1.1a-GFP und NtPIP2.2b-C → NtPIP2.2b-GFP) und als N-terminale Fusion in pK7WGF2 (NtTIP1.1a-N → GFP-NtTIP1.1a und NtPIP2.2b-N → GFP-NtPIP2.2b) transformiert in *Agrobacterium tumefaciens* des Stammes LBA4404 vor. Durch die Klonierung der Aquaporine in pK7FWG2 entsteht bei der Expression ein Fusionsprotein mit einer C-terminalen Egfp-Fusion (NtTIP1.1a-C und NtPIP2.2b-C). Bei der Klonierung in pK7WGF2 wiederum entsteht ein Fusionsprotein mit einer N-terminalen Egfp-Fusion (NtTIP1.1a-N und NtPIP2.2b-N). Diese werden mittels UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Als Positivkontrolle wurde GFP in pBin19 (pBin35SGFP5) verwendet. Das Konstrukt wird im gleichen Agrobakterienstamm (LBA4404) exprimiert. Zur Verstärkung der Expression diente der „silencing suppressor“ P19 in pTAK35S im Agrobakterienstamm GV3101.

Zur deutlicheren Darstellung der Konstrukte wurden die folgenden Abbildungen (Abb. 4.3-1 und 4.3-2) erstellt:

pK7FWG2:NtTIP1.1a-C, pK7FWG2:NtPIP2.2b-C



Abb. 4.3-1: Schematische Darstellung von NtTIP1.1a-C bzw. NtPIP2.2b-C in pK7FWG2

Durch die Klonierung der Aquaporine NtTIP1.1a bzw. NtPIP2.2b in pK7FWG2 entsteht ein Fusionsprotein aus einem Aquaporin an dessen C-Terminus das „green fluorescent protein“ (GFP) fusioniert ist.

pK7WGF2:NtTIP1.1a-N, pK7WGF2:NtPIP2.2b-N



Abb. 4.3-2: Schematische Darstellung von NtTIP1.1a-N bzw. NtPIP2.2b-N in pK7WGF2

Durch die Klonierung der Aquaporine NtTIP1.1a bzw. NtPIP2.2b in pK7WGF2 entsteht ein Fusionsprotein aus einem Aquaporin an dessen N-Terminus GFP fusioniert ist.

4.3.2 Untersuchung des Blattgewebes von infiltrierten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen

Mehrere kleine *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden mit einer Agrobaktériensuspension infiltriert. Diese Agrobakterien exprimieren entweder eins der Aquaporine mit dem „green fluorescent protein“ (GFP) als Fusion (NtTIP1.1a-C bzw. NtPIP2.2b-C in pK7FWG2, NtTIP1.1a-N bzw. NtPIP2.2b-N in pK7WGF2) oder das GFP in pBin19 als Positivkontrolle. Zur Verstärkung der Expression diente der „silencing suppressor“ P19 in pTAK35S.

Nach drei Tagen konnten die infiltrierten Blätter unter UV-Licht (365 nm) oder mittels Fluoreszenzumkehrmikroskop betrachtet und Aufnahmen gemacht werden.

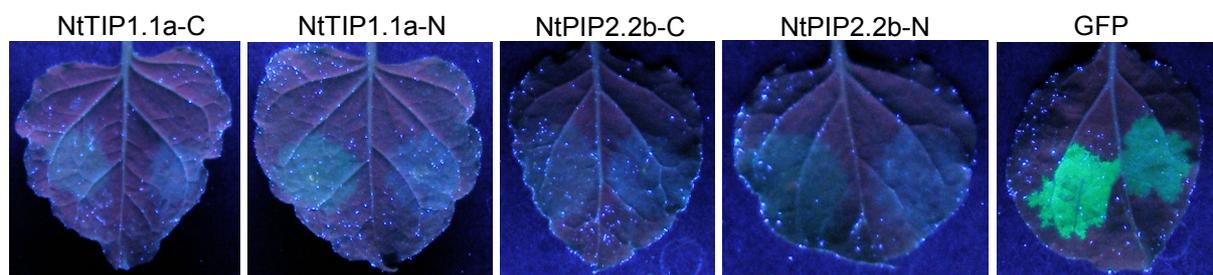


Abb. 4.3-3: Fluoreszenzaufnahmen von infiltrierten Blättern einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze

Zu sehen ist die Unterseite der infiltrierten Blätter einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze. Auf der linken Blattseite wurden Agrobakterien, welche eins der Aquaporine bzw. GFP exprimieren in Kombination mit dem „silencing suppressor“ P19 infiltriert, während auf der rechten Blattseite Agrobakterien infiltriert wurden, die nur eins der Aquaporine bzw. GFP exprimieren.

Pflanzen erkennen Fremd-RNA und bauen diese ab. Durch die Ko-Infiltration des „silencing suppressors“ P19 soll dies verhindert und somit die Expression bzw. die grüne Fluoreszenz der GFP-Fusionsproteine verstärkt werden. Dies konnte vor allem in den GFP exprimierenden Pflanzen beobachtet werden, die eine starke Fluoreszenz zeigten. Bei transienter Expression der N-terminalen Fusionen (NtTIP1.1a-N und NtPIP2.2b-N) konnte eine leichte Verstärkung der Fluoreszenz durch die Ko-Infiltration von P19 festgestellt werden. Jedoch kam es bei der Expression der C-terminalen Fusionen (NtTIP1.1a-C und NtPIP2.2b-C) zu keiner Verstärkung der Fluoreszenz durch P19.

Weiterhin wurden Schnitte der unteren Epidermis des infiltrierten Blattgewebes angefertigt und unter dem Fluoreszenzumkehrmikroskop „ECLIPSE TS 100“ der Firma Nikon in Düsseldorf betrachtet. Hierfür wurde die unterste Zellschicht (Epidermis) der infiltrierten Blattunterseite mit einem Tropfen Wasser auf einen Objektträger mit Deckglas präpariert und fixiert.

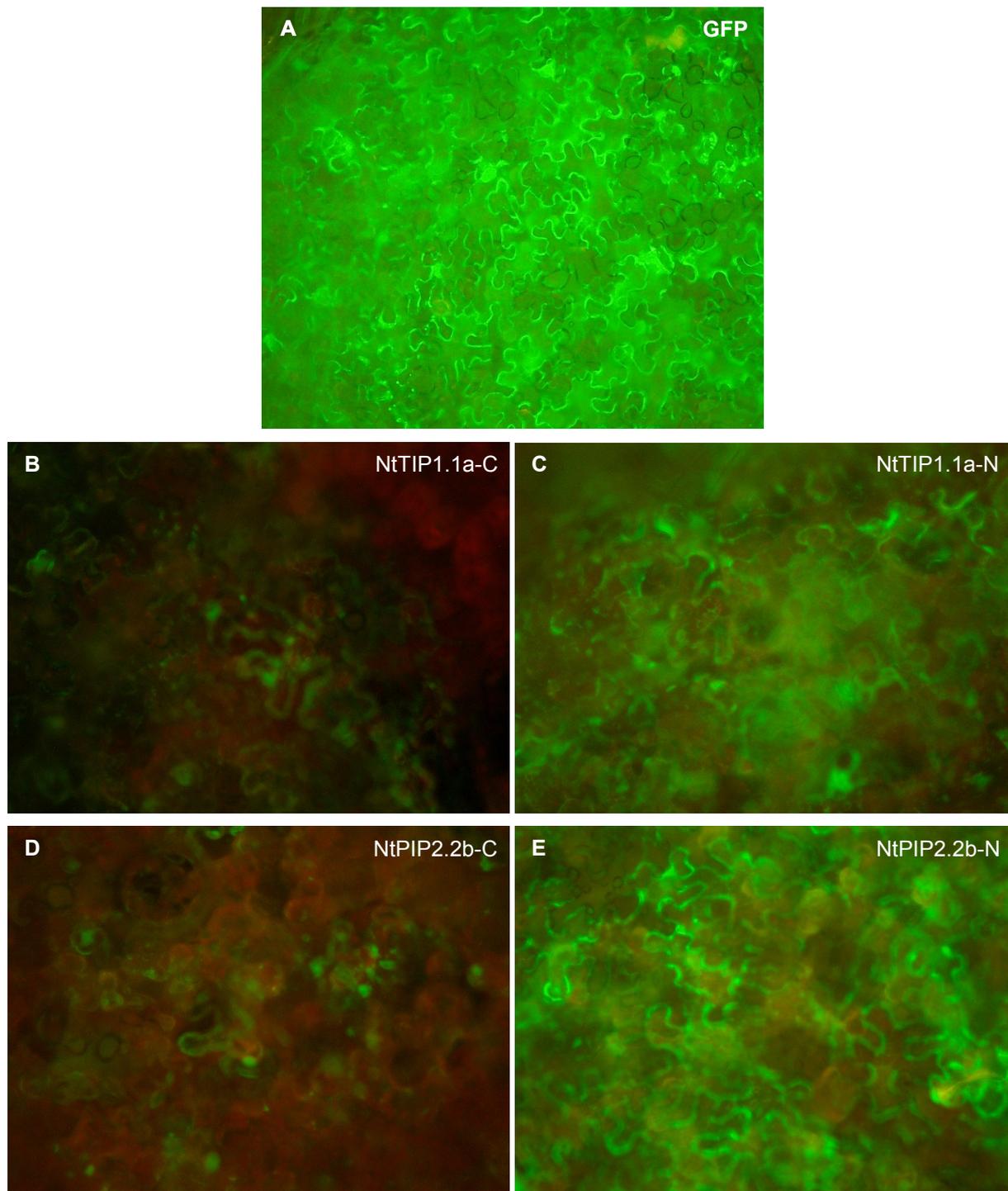


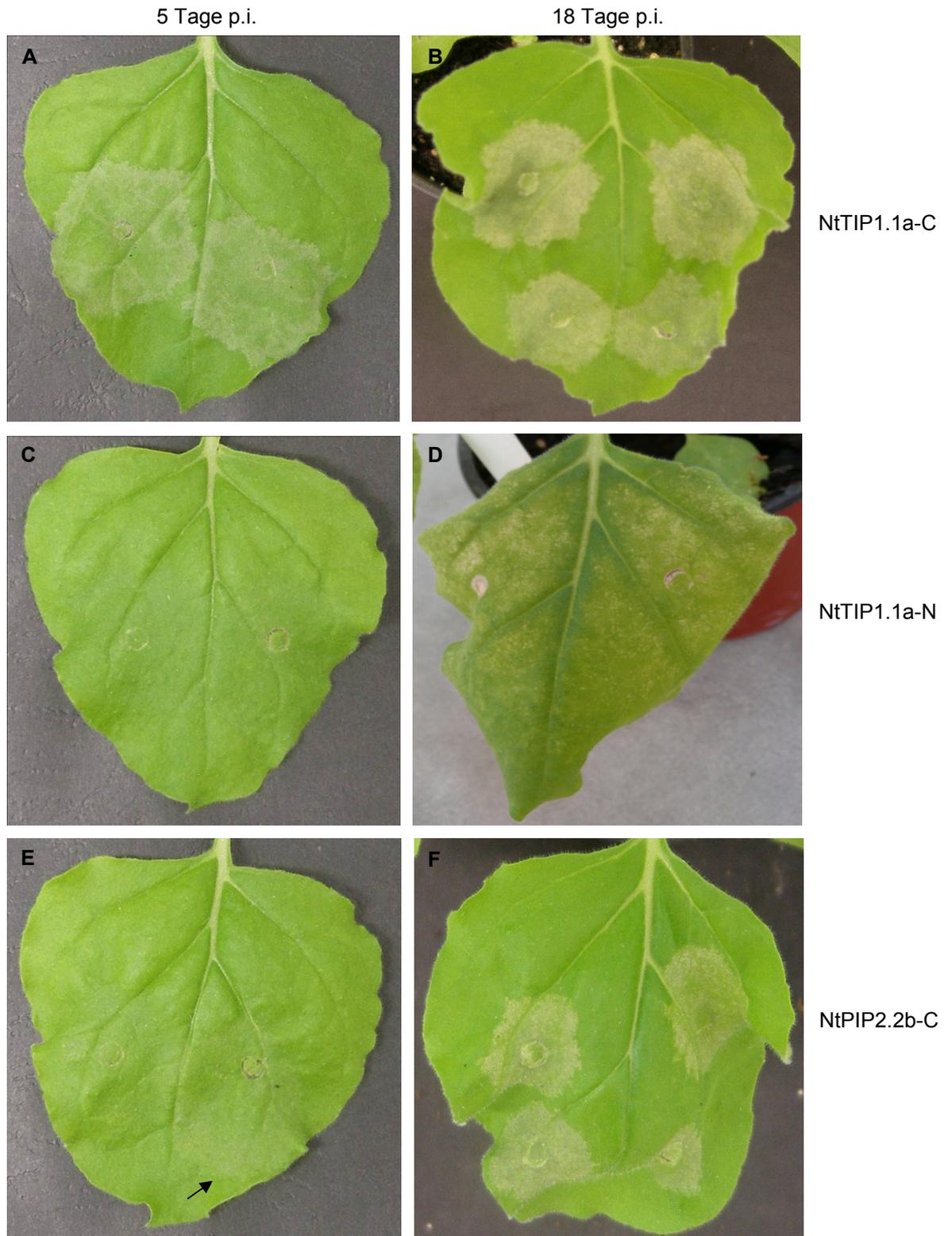
Abb. 4.3-4: Mikroskopische Aufnahmen der Epidermis von infiltriertem Pflanzengewebe; 40-fache Vergrößerung

Die Aufnahmen zeigen die Epidermiszellen der Blattunterseite der infiltrierten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen. Die grüne Fluoreszenz des GFP-Proteins (A) und der GFP-Fusionsproteine NtTIP1.1a-C (B), NtTIP1.1a-N (C), NtPIP2.2b-C (D) und NtPIP2.2b-N (E) sind gut zu erkennen. Das Chlorophyll in den Chloroplasten hat eine rote Fluoreszenz.

Wie erwartet verteilt sich GFP (A) im Gegensatz zu den Aquaporin-GFP-Fusionsproteinen (B bis E) im gesamten Zytoplasma der Zellen. Durch die grüne Fluoreszenz des GFPs lässt sich gut erkennen, dass die Fusionsproteine an oder in der Membran der Pflanzenzelle

lokalisiert sind. Offensichtlich werden die N-terminalen Aquaporin-GFP-Fusionsproteine (NtTIP1.1a-N und NtPIP2.2b-N) stärker exprimiert als die C-terminalen Fusionsproteine (NtTIP1.1a-C und NtPIP2.2b-C).

Nach ungefähr 4-5 Tagen bildeten sich erste nekrotische Bereiche an den mit Agrobakterien infiltrierten Blattstellen.



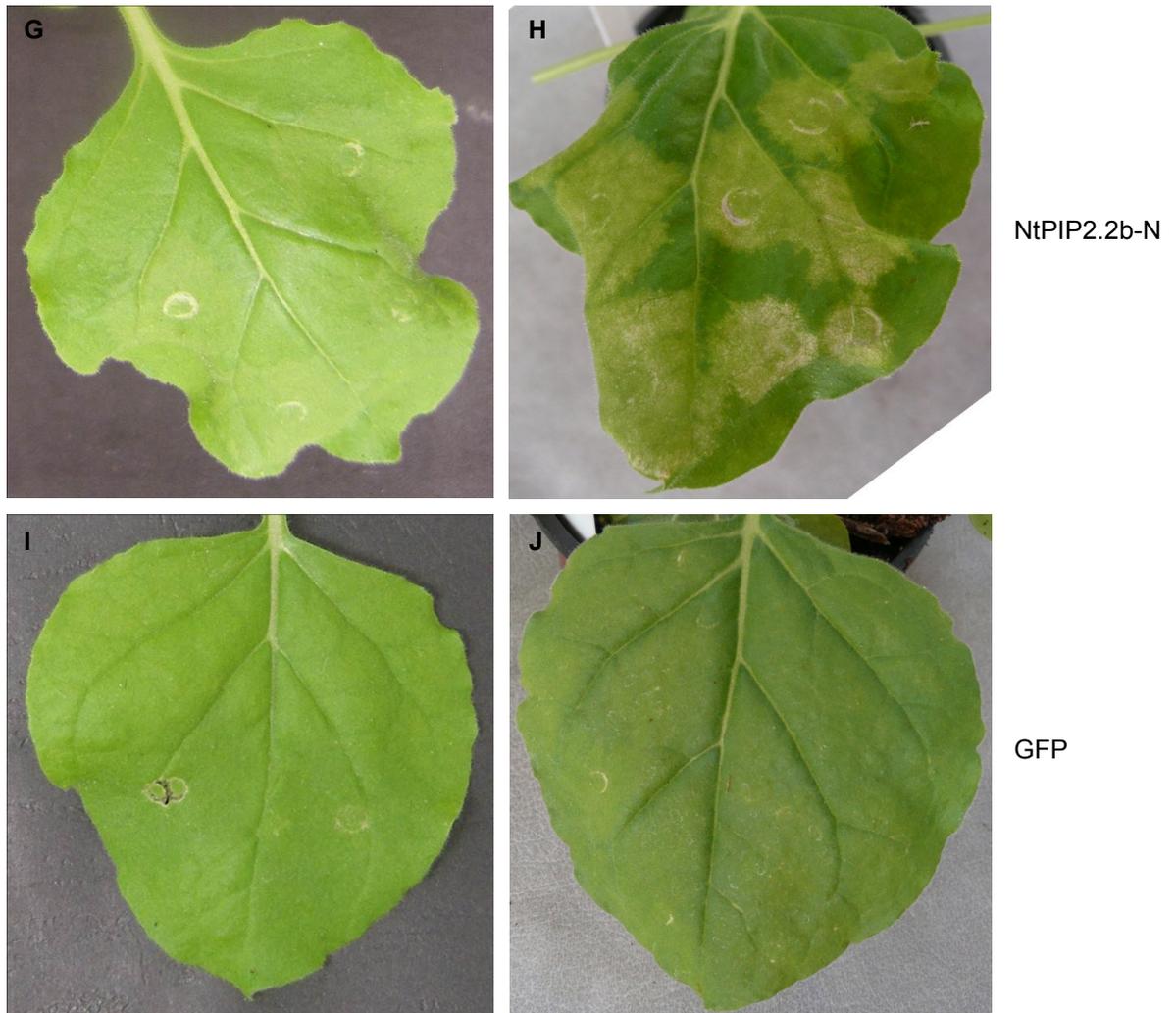


Abb. 4.3-5: Aufnahmen von infiltrierten Blättern einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze

Die Aufnahmen der Blätter wurden 5 Tage (A, C, E, G, I) bzw. 18 Tage (B, D, F, H, J) nach der Infiltration von Aquaporin-GFP-Fusionskonstrukten mittels Agrobakterien gemacht. Auf der linken Blatthälfte wurde ohne den „silencing suppressor“ P19, auf der rechten Blatthälfte mit P19 infiltriert. A und B zeigen die Infiltration mit NtTIP1.1a-C. C und D zeigen die Infiltration mit NtTIP1.1a-N. E und F zeigen die Infiltration mit NtPIP2.2b-C. G und H zeigen die Infiltration mit NtTIP1.1a-N. I und J zeigen die Infiltration mit GFP.

Das Blatt, welches mit Agrobakterien infiltriert wurde, die das Aquaporin NtTIP1.1a als C-terminale Egfp-Fusion (NtTIP1.1a-C, A und B) exprimieren, weist deutliche nekrotische Symptome im Bereich der Infiltrationsstelle auf, dabei macht es keinen Unterschied, ob der „silencing suppressor“ P19 zusätzlich exprimiert wird oder nicht. Ebenfalls können bei genauerer Betrachtung des Blattes, welches mit Agrobakterien infiltriert wurde, die NtPIP2.2b als C-terminale Egfp-Fusion (NtPIP2.2b-C, E, Pfeil) und P19 exprimieren, leichte Anzeichen von Zelltod am Infiltrationsbereich erkannt werden. Die übrigen infiltrierten Blätter (NtTIP1.1a-N (C), NtPIP2.2b-N (G) und GFP (I und H)) weisen keinerlei totes Gewebe auf. Nach 18 Tagen kommt es allerdings an allen Stellen, die mit Aquaporin exprimierenden Agrobakterien infiltriert wurden zu Zelltod (B, D, F, H). Die Blätter mit transientser GFP-Expression weisen keinerlei Symptome auf (I und J).

Um festzustellen ob es wie bei den BHRF1-transgenen Pflanzen zu einer Akkumulation von H_2O_2 an der Infiltrationsstelle kommt, wurden die infiltrierten Bereiche (Abb. 4.3-5, A, C, E, G, I) mit einem Korkbohrer ausgestanzt und mit DAB behandelt (3.3.5). DAB wird in Gegenwart von H_2O_2 zu einem braunen Farbstoff oxidiert und kann nach Entfernen des Chlorophylls als solcher erkannt werden.

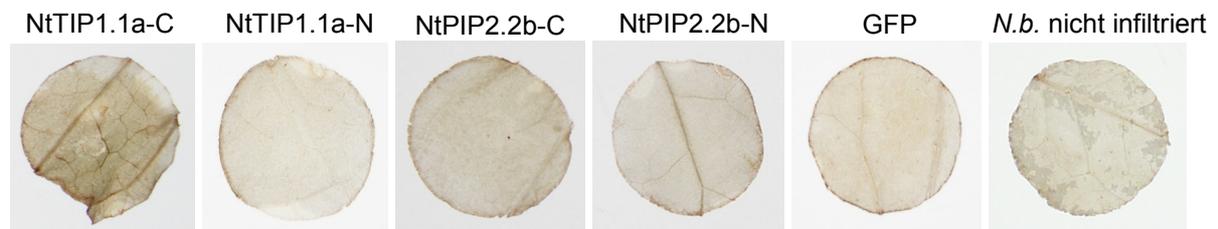


Abb. 4.3-6: DAB-Anfärbung von Blattscheiben, die mit Agrobakterien infiltriert wurden

Dargestellt sind ausgestanzte und mit DAB behandelte Blattscheiben, die mit Aquaporin exprimierenden Agrobakterien infiltriert wurden. Die ausgestanzte Blattscheibe einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze, die nicht mit Agrobakterien infiltriert wurde, diente als Negativkontrolle (*N.b.* nicht infiltriert). Die Blätter wurden 5 Tage nach der Infiltration mit Agrobakterien mit DAB behandelt.

Die Blattscheibe des mit NtTIP1.1a-C exprimierenden Agrobakterien infiltrierten Blattes weist tatsächlich nach der Anfärbung mit DAB eine starke Braunfärbung auf, was die Anwesenheit von H_2O_2 bestätigt. Auch die Blattscheibe, die mit NtPIP2.2b-C exprimierenden Agrobakterien infiltriert wurde, zeigt eine ganz leichte Braunfärbung. Die übrigen Blattscheiben unterscheiden sich nicht von der mit transienter GFP-Expression bzw. der nicht infiltrierten Blattscheibe (Negativkontrolle).

4.3.3 Quantitativer Nachweis von H_2O_2 in infiltriertem Blattgewebe

Um das in den infiltrierten Blättern vorhandene H_2O_2 quantitativ bestimmen zu können, wurde der sogenannte FOX-Assay (3.3.7) angewendet.

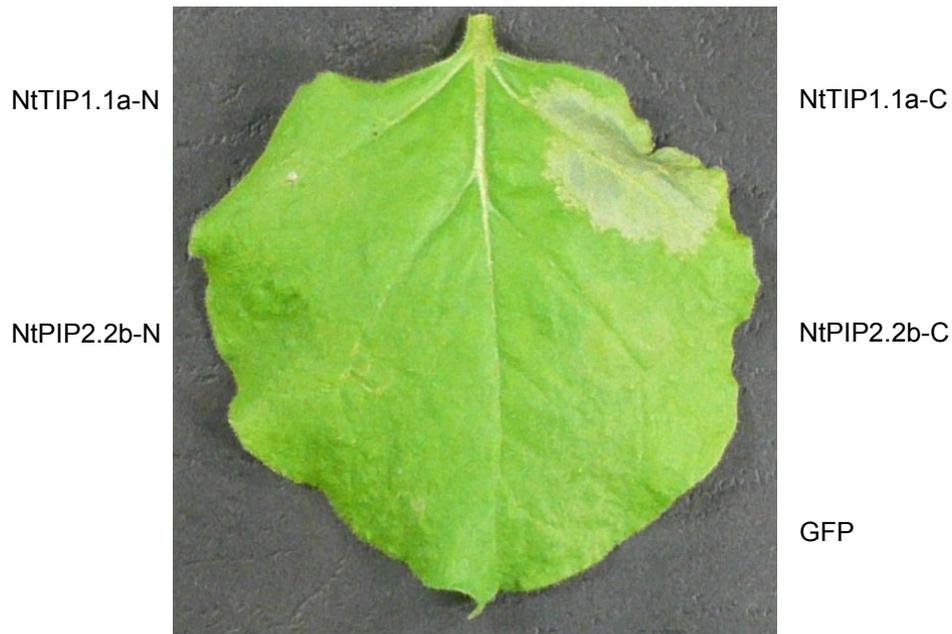


Abb. 4.3-7: Aufnahme eines mit Agrobakterien infiltrierten Blattes

Auf der linken Blattseite oben bzw. in der Mitte wurden Agrobakterien infiltriert, die die Aquaporine NtTIP1.1a bzw. NtPIP2.2b als N-terminale Egfp-Fusion (NtTIP1.1a-N bzw. NtPIP2.2b-N) exprimieren. Auf der rechten Seite oben und in der Mitte wurden die mit Aquaporin NtTIP1.1a (NtTIP1.1a-C) bzw. NtPIP2.2b (NtPIP2.2b-C) exprimierenden Agrobakterien infiltriert. Rechts unten ist die transiente Expression von GFP zu sehen.

Während es an der Infiltrationsstelle der transienten Expression von NtTIP1.1a-C zu Zelltod kommt, sehen die Blattbereiche der übrigen Infiltrationsstellen (NtTIP1.1a-N, NtPIP2.2b-N, GFP) noch gesund aus. An der mit Aquaporin NtPIP2.2b (NtPIP2.2b-C) infiltrierten Stelle ist eine sehr schwache Irritation des Blattgewebes zu erkennen.

Die infiltrierten Blattbereiche wurden mit dem Korkbohrer ausgestanzt, in H₂O homogenisiert und mit Xylenol Orange versetzt. Während einer Inkubation von 30 Minuten erfolgte die durch H₂O₂ vermittelte Oxidation von Fe²⁺-Ionen zu Fe³⁺-Ionen. Xylenol Orange bindet letzteres und bildet dabei einen Farbkomplex, der anschließend im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 560 nm quantifiziert werden kann.

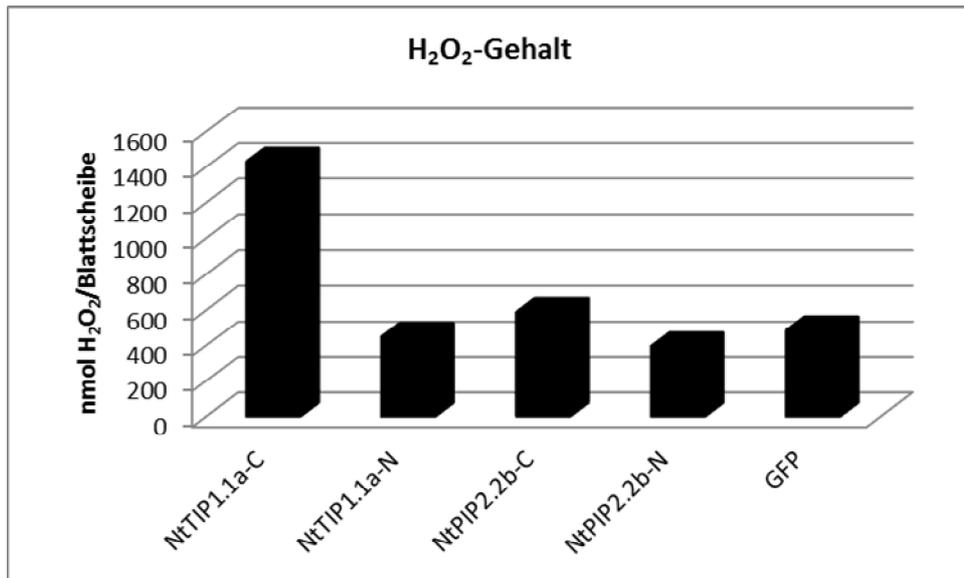


Abb. 4.3-8: Darstellung der H₂O₂-Menge

Die Balken stellen die Werte in nmol H₂O₂ pro Blattscheibe dar.

Wie durch die Nekrosenbildung (Abb. 4.3-7) bzw. Anfärbung mit DAB (Abb. 4.3-6) erwartet wurde, konnte bei der Probe des Blattes, welches mit NtTIP1.1a-C exprimierenden Agrobakterien infiltriert wurde der höchste Wert gemessen werden. Der Wert, der transienten Expression von NtPIP2.2b-C ist nur unbedeutend höher als die der Blattproben, welche mit NtTIP1.1a-N, NtPIP2.2b-N bzw. GFP exprimierenden Agrobakterien infiltriert wurden. Dies bedeutet, dass durch die Expression des Aquaporins NtTIP1.1a als C-terminale Egfp-Fusion (NtTIP1.1a-C) vermehrt H₂O₂ im Bereich der Expression (Infiltrationsstelle) produziert wird. Da während des normalen Zellmetabolismus ständig H₂O₂ entsteht, sind die Werte der Proben mit transienter NtTIP1.1a-N, NtPIP2.2b-C, NtPIP2.2b-N bzw. GFP Expression hierauf zurückzuführen.

4.3.4 Nachweis der Proteinexpression infiltrierter *Nicotiana benthamiana* Pflanzen

Um zu zeigen, dass die mittels Agrobakterien infiltrierten Proteine in *Nicotiana benthamiana* exprimiert werden, wurden die infiltrierten Blattbereiche nach 3 bis 4 Tagen ausgestanzt und in 1 x SDS Loading Buffer mit 2 M DTT homogenisiert. Das Pflanzenextrakt wurde für 5-10 Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend abzentrifugiert. Es wurden 15 µl des Überstandes bzw. des Pflanzenextraktes auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.2.5). Danach wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (3.2.7.1) und mittels GFP-Antikörper sichtbar gemacht (3.2.7.2).

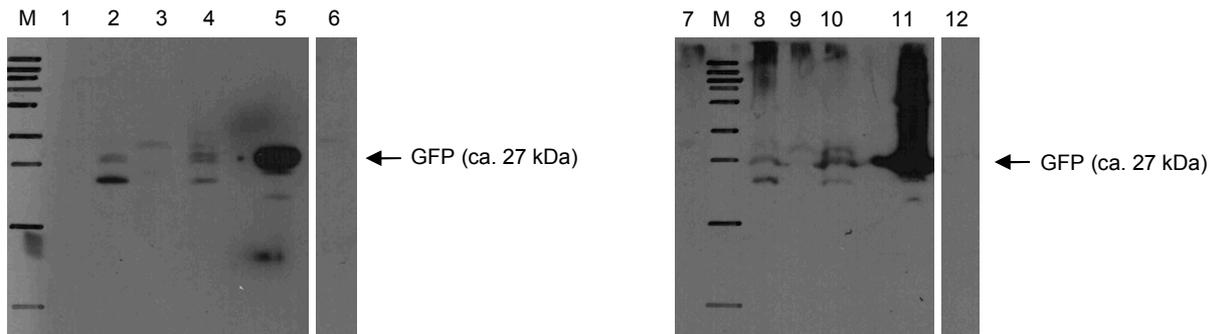


Abb. 4.3-9: Immundetektion der Proben aus *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die mit Agrobakterien infiltriert wurden

Aufgetragen sind die Überstände (linkes Gel) und die Pflanzenextrakte (rechtes Gel) der Blattproben von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die mit Agrobakterien infiltriert wurden. Zur Detektion von GFP und GFP-Fusionsproteinen wurde als 1. Antikörper „GFP (FL) rabbit polyclonal IgG“ (1:3000) eingesetzt. Als 2. Antikörper wurde „anti-rabbit/HRP“ (1:10000) verwendet.

Spur M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#SM1811, MBI Fermentas): 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 27 kDa, 15 kDa, 10 kDa

Spur 1 und 7: *N.b.* infiltriert mit NtTIP1.1a-C

Spur 2 und 8: *N.b.* infiltriert mit NtTIP1.1a-N

Spur 3 und 9: *N.b.* infiltriert mit NtPIP2.2b-C

Spur 4 und 10: *N.b.* infiltriert mit NtPIP2.2b-N

Spur 5 und 11: *N.b.* infiltriert mit GFP (Positivkontrolle)

Spur 6 und 12: *N.b.* nicht infiltriert (Negativkontrolle)

In Spur 5 und 11 ist jeweils eine dicke Bande in der Größenordnung von ungefähr 27 kDa zu sehen, die das „green fluorescent protein“ (GFP) nachweisen. Auch in Spur 2 und 4 (Überstand von Pflanzenproben, die mit NtTIP1.1a-N bzw. NtPIP2.2b-N infiltriert wurden) und Spur 8 und 10 (Pflanzenextrakt von *Nicotiana benthamiana*, die mit NtTIP1.1a-N bzw. NtPIP2.2b-N infiltriert wurden) konnte GFP mit einem Molekulargewicht von ungefähr 27 kDa detektiert werden. Bei den etwas kleineren Banden dieser Proben handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte des GFP. Die unspezifischen Banden zwischen 30 und 35 kDa in Spur 3, 4, 9 und 10 konnten auch in den Negativkontrollen detektiert werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um Pflanzenproteine, die mit dem Antikörper kreuzreagieren. Ein Nachweis der Aquaporin-GFP-Fusionsproteine war nicht möglich.

Da die Expression von GFP und den GFP-Fusionsproteinen in Kombination mit dem „silencing suppressor“ P19 teilweise verstärkt werden konnte (Abb. 4.3-3), wurden *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit Agrobakterien, die je eins der GFP-Fusionproteine (NtTIP1.1a-C, NtTIP1.1a-N, NtPIP2.2b-C bzw. NtPIP2.2b-N) bzw. GFP und zusätzlich P19 exprimieren, infiltriert. Die infiltrierten Bereiche wurden ausgestanzt und wie unter 3.3.3 beschrieben, weiterverarbeitet. Der Überstand wurde auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.2.5).

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (3.2.7.1) erfolgte die Detektion mittels Antikörper (3.2.7.2).

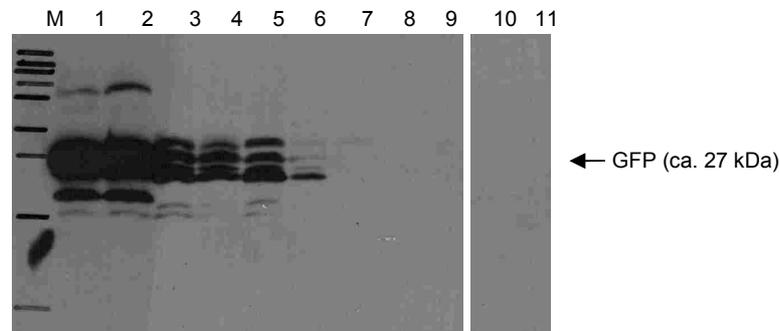


Abb. 4.3-10: Immundetektion der Proben aus *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die mit Agrobakterien infiltriert wurden

Aufgetragen sind die Überstände der Blattproben von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die mit Agrobakterien infiltriert wurden. Die Detektion von GFP und GFP-Fusionsproteinen erfolgte mit „GFP (FL) rabbit polyclonal IgG“ (1:3000) als 1. Antikörper und „anti-rabbit/HRP“ (1:10000) als 2. Antikörper.

Spur M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#SM1811, MBI Fermentas): 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 27 kDa, 15 kDa, 10 kDa

Spur 1: *N.b.* infiltriert mit GFP und P19

Spur 2: *N.b.* infiltriert mit GFP

Spur 3: *N.b.* infiltriert mit NtPIP2.2b-N und P19

Spur 4: *N.b.* infiltriert mit NtPIP2.2b-N

Spur 5: *N.b.* infiltriert mit NtTIP1.1a-N und P19

Spur 6: *N.b.* infiltriert mit NtTIP1.1a-N

Spur 7: *N.b.* infiltriert mit NtPIP2.2b-C und P19

Spur 8: *N.b.* infiltriert mit NtPIP2.2b-C

Spur 9: *N.b.* infiltriert mit NtTIP1.1a-C und P19

Spur 10: *N.b.* infiltriert mit NtTIP1.1a-C

Spur 11: *N.b.* nicht infiltriert (Negativkontrolle)

Banden mit einem Molekulargewicht von ungefähr 27 kDa, die GFP nachweisen, konnten in Spur 1 bis 5 (GFP ± P19, NtPIP2.2b-N ± P19, NtTIP1.1a-N mit P19) und schwach in Spur 6 (NtTIP1.1a-N) detektiert werden. Eine verstärkte Expression durch P19 wurde nur in Spur 5 (NtTIP1.1a-N mit P19) sichtbar.

4.3.5 Weitere Infiltrationsexperimente zur Untersuchung der Überexpression von Aquaporinen

Ein weiterer „silencing suppressor“ stellt das Hüllprotein CarCP des Carnation Mottle Virus (CarMV) dar. Es wird wie P19 in pTAK35S im Agrobakterienstamm GV3101 exprimiert. Mehrere *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden mit Agrobakterien infiltriert, die eins der Aquaporine bzw. GFP in Kombination mit dem „silencing suppressor“ CarCP exprimieren.

Nach drei Tagen konnten die infiltrierten Blätter unter dem UV-Licht (365 nm) betrachtet werden.

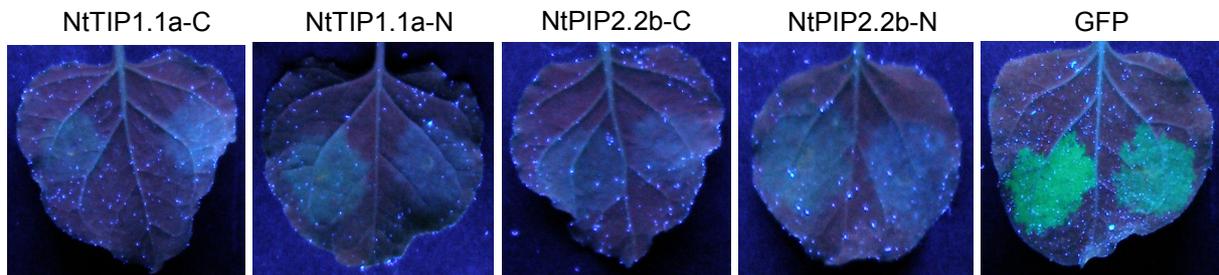


Abb. 4.3-11: Fluoreszenzaufnahmen von infiltrierten Blättern einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze

Zu sehen ist die Unterseite der infiltrierten Blätter einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze. Auf der linken Blattseite wurden Agrobakterien, welche eins der Aquaporine bzw. GFP exprimieren in Kombination mit dem „silencing suppressor“ CarCP infiltriert, während auf der rechten Blattseite Agrobakterien infiltriert wurden, die nur eins der Aquaporine bzw. GFP exprimieren.

Eine Verbesserung der Fluoreszenz durch den „silencing suppressor“ CarCP ist vor allem bei der transienten Expression von GFP zu erkennen. Die zusätzliche Expression von CarCP zeigt bei transienter Expression der N-terminalen Fusionsproteine (NtTIP1.1a-N und NtPIP2.2b-N) nur eine leichte Verstärkung. Die transiente Expression der Aquaporine NtTIP1.1a bzw. NtPIP2.2b als C-terminale Egfp-Fusion konnte nicht bestätigt werden.

Auch hier wurde der Einfluss durch die zusätzliche Expression des „silencing suppressors“ CarCP auf die Nekrosenbildung infiltrierter Pflanzen beobachtet.

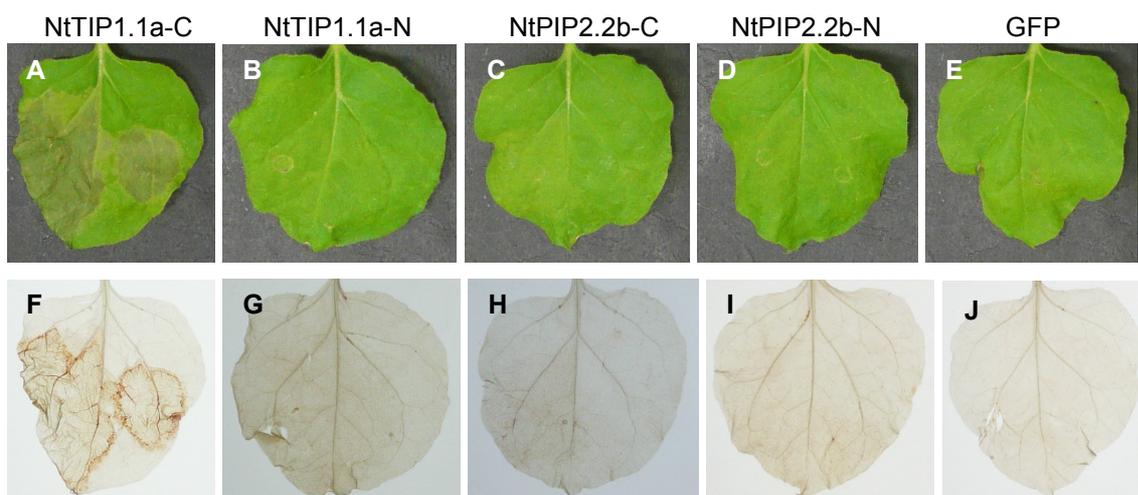


Abb. 4.3-12: Aufnahmen von infiltrierten Blättern einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze vor (A bis E) und nach der Anfärbung mit DAB (F bis J)

Die Aufnahmen der Blätter wurden fünf Tage nach der Infiltration von Aquaporin-GFP-Fusionskonstrukten mittels Agrobakterien gemacht. In die linke Blatthälfte wurde zusätzlich der „silencing suppressor“ CarCP infiltriert.

Nur bei Blättern, die mit Agrobakterien infiltriert wurden, die NtTIP1.1a-C exprimieren, kam es zur Apoptose an der Infiltrationsstelle (A). In diesem Fall hat die zusätzliche Expression von CarCP keinen Einfluss auf die Nekrosenbildung. Bei den übrigen mit Agrobakterien infiltrierten Blättern (NtTIP1.1a-N, NtPIP2.2b-C, NtPIP2.2b-N bzw. GFP) kam es auch durch eine Ko-Infiltration von CarCP zu keiner sichtbaren Veränderung (B, C, D). Die Anfärbung der infiltrierten Blätter mit DAB zeigte das gleiche Ergebnis (F bis J). Eine durch H₂O₂ verursachte Braunfärbung konnte nur in Blättern, die mit NtTIP1.1a-C (mit und ohne CarCP) exprimierenden Agrobakterien infiltriert wurden, nachgewiesen werden (F).

Zusätzlich wurden Infiltrationsexperimente mit weiteren Konstrukten durchgeführt, die in Agrobakterien des Stammes LBA4404 transformiert wurden und Tm-2 bzw. PT30 in pTAK35S exprimieren. *Tm-2* ist ein gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) gerichtetes Resistenzgen, welches ursprünglich aus *Lycopersicon hirsutum* und *Lycopersicon peruvianum* (Wildtomate) stammt. Bei PT30 handelt es sich um das 30 kDa-Movementprotein von ToMV. Dieses lagert sich in die Plasmodesmata der Pflanzenzellen und wird durch die *tm-2* Resistenzgene erkannt. Die zusätzliche Expression eines „silencing suppressors“ (CarCP bzw. P19) löst die Hypersensitive Reaktion (HR) in der Pflanze aus. Deshalb führt eine gemeinsame transiente Expression durch Infiltration von Tm-2, PT30 und einem „silencing suppressor“ (CarCP oder P19) zu nekrotischen Symptomen auf der Blattoberfläche von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen. Da es bei transienter Expression der C-terminalen Egfp-Fusionen (NtTIP1.1a-C bzw. NtPIP2.2b-C) ebenfalls zu nekrotischen Symptomen kommt, sollte beobachtet werden, ob die zusätzliche Expression der drei Proteine durch eins der Aquaporine beeinflusst wird.

Hierfür wurden die folgenden Kombinationen der Protein exprimierenden Agrobakterien hergestellt: Tm-2, CarCP, PT30 und eins der Aquaporine (1); CarCP und eins der Aquaporine (2); Tm-2, CarCP und PT30 (3); Tm-2, CarCP und eins der Aquaporine (4); CarCP (5).

Die Gemische wurden in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen infiltriert.

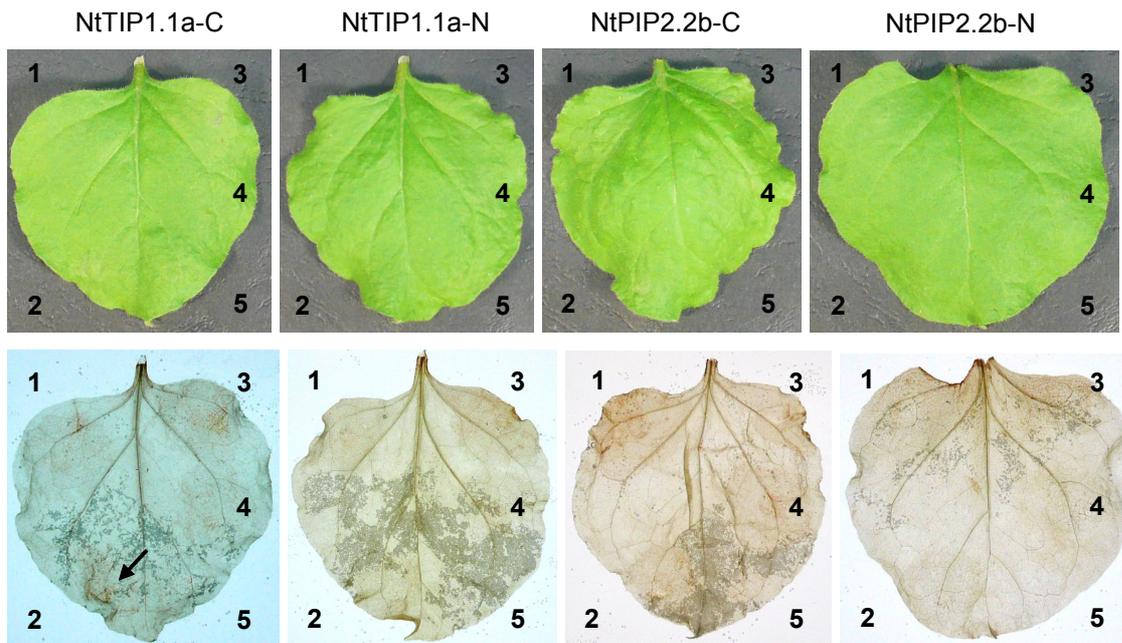


Abb. 4.3-13: Symptome einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze nach Infiltration mit Agrobakterien

Die Blätter wurden vier Tage nach der Infiltration mit Agrobakterien fotografiert (oben) und anschließend mit DAB angefärbt (unten). Die Blätter wurden mit den Mischungen 1 bis 5 infiltriert. Bei der Infiltration des ersten bzw. dritten Blattes wurde NtTIP1.1a als C-terminale Egfp-Fusion (NtTIP1.1a-C) bzw. als N-terminale Egfp-Fusion (NtTIP1.1a-N) verwendet. Das zweite bzw. vierte Blatt wurde mit Aquaporin NtPIP2.2b als C-terminale Egfp-Fusion (NtPIP2.2b-C) bzw. als N-terminale Egfp-Fusion (NtPIP2.2b-N) infiltriert.

1 Tm-2, CarCP, PT30, Aquaporin

2 CarCP, Aquaporin

3 Tm-2, CarCP, PT30

4 Tm-2, CarCP, Aquaporin

5 CarCP

Obwohl vier Tage nach der Infiltration mit Agrobakterien noch keine deutlichen Symptome an den Blättern zu erkennen waren, konnte H_2O_2 mittels DAB-Anfärbung hauptsächlich an Infiltrationsstelle 1 (Tm-2, CarCP, PT30, Aquaporin) und 3 (Tm-2, CarCP, PT30) nachgewiesen werden. Eine leichte Braunfärbung ist auch an Infiltrationsstelle 2 (CarCP, NtTIP1.1a-C) des linken Blattes, wo die transiente Expression des Aquaporins NtTIP1.1a als C-terminale Egfp-Fusion (NtTIP1.1a-C) in Kombination mit dem „silencing suppressor“ CarCP stattfindet, zu erkennen.

Ungefähr eine Woche nach der Infiltration kam es auch hier zu Zelltodereignissen an den Infiltrationsstellen. Zum Vergleich wurden Blätter von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit den gleichen Infiltrationsgemischen infiltriert. Anstelle des „silencing suppressors“ CarCP wurde P19 verwendet.

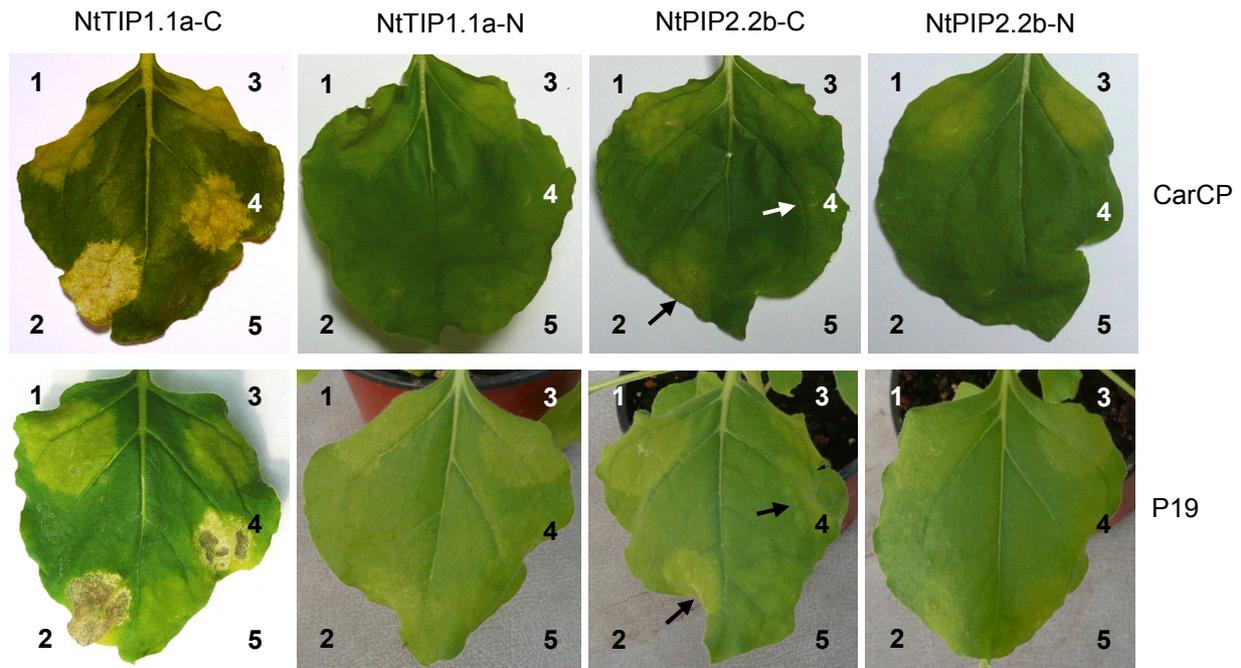


Abb. 4.3-14: Symptome einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze nach der Infiltration mit Agrobakterien

Die Blätter wurden mit den Mischungen 1 bis 5 infiltriert. In der oberen Reihe wurde der „silencing suppressor“ CarCP verwendet, in der unteren Reihe P19. Bei der Infiltration des ersten bzw. dritten Blattes wurde NtTIP1.1a als C-terminale Egfp-Fusion (NtTIP1.1a-C) bzw. als N-terminale Egfp-Fusion (NtTIP1.1a-N) verwendet. Das zweite bzw. vierte Blatt wurde mit Aquaporin NtPIP2.2b als C-terminale Egfp-Fusion (NtPIP2.2b-C) bzw. als N-terminale Egfp-Fusion (NtPIP2.2b-N) infiltriert.

- 1 Tm-2, „silencing suppressor“, PT30, Aquaporin
- 2 „silencing suppressor“, Aquaporin
- 3 Tm-2, „silencing suppressor“, PT30
- 4 Tm-2, „silencing suppressor“, Aquaporin
- 5 „silencing suppressor“

An der Stelle, an der Agrobakterien, die Tm-2, einen „silencing suppressor“ und PT30 (3) exprimieren, infiltriert wurden, bildeten sich bei allen Pflanzen leicht nekrotische Bereiche. Bei transienter Expression von allen vier Proteinen (Tm-2, „silencing suppressor“, PT30 und Aquaporin; 1) kam es ebenfalls bei allen Blättern zum Absterben der Zellen. Dies ist auf das HR auslösende Zusammenspiel von Tm-2 und PT30 zurückzuführen. Allerdings konnte kein Einfluss der Aquaporine auf die Zelltodförderung dieser Proteine beobachtet werden. Die stärksten Zelltodereignisse konnten bei einer Expression von Aquaporin NtTIP1.1a als C-terminale Egfp-Fusion in Kombination mit einem „silencing suppressor“ (Infiltrationsstelle 2) bzw. in Kombination mit Tm-2 und einem „silencing suppressor“ (Infiltrationsstelle 4) beobachtet werden. Weiteres Absterben der Pflanzenzellen erfolgte minimal bei transienter Expression von Aquaporin NtPIP2.2b als C-terminale Egfp-Fusion (NtPIP2.2b-C) zusammen mit einem „silencing suppressor“ (Infiltrationsstelle 2) und noch geringer an Infiltrationsstelle 4 (Tm-2, „silencing suppressor“ und NtPIP2.2b-C; drittes Foto, obere und untere Reihe). Die alleinige Expression von CarCP (Fotos der oberen Reihe, Infiltrationsstelle 5) bzw. P19

(Fotos der unteren Reihe, Infiltrationsstelle 5) führte bei keiner Pflanze zum Absterben von Zellen. Offensichtlich haben Aquaporine auch in Pflanzen eine zelltodfördernde Wirkung. Diese Wirkung kann allerdings bei transienter Expression der Aquaporine in Kombination mit Tm-2, PT30 und P19 bzw. CarCP nicht ausgelöst werden (Infiltrationsstelle 1).

4.3.6 Einfluss von BHRF1 auf die transiente Aquaporin-Expression in *Nicotiana benthamiana*

Da eine Interaktion zwischen Aquaporinen und BHRF1 bekannt ist, wurden beide Proteine gemeinsam in *Nicotiana benthamiana* transient exprimiert. Hierbei sollte ein möglicher Einfluss von BHRF1 auf die Aquaporin-Expression untersucht werden.

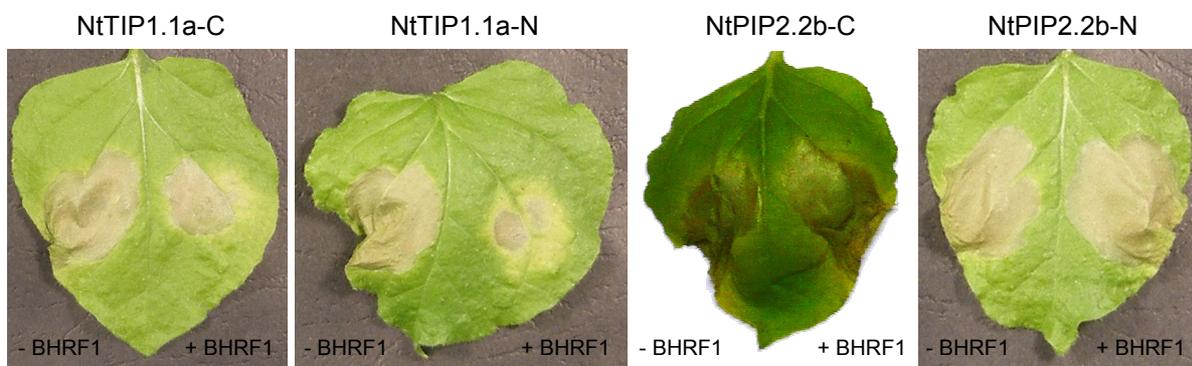


Abb. 4.3-15: Aufnahmen von infiltrierten Blättern einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze

Die linke Blatthälfte wurde mit Agrobakterien infiltriert, die eins der Aquaporine exprimieren, während die rechte Blatthälfte mit einer Kombination aus einem Aquaporin und zusätzlich BHRF1 infiltriert wurde.

Werden *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit Agrobakterien infiltriert, die Aquaporine exprimieren, kommt es im Bereich der Infiltrationsstelle zum Absterben von Pflanzenzellen (linke Blatthälfte). Bei einer Ko-Infiltration von Aquaporin und BHRF1 entstehen ebenfalls nekrotische Bereiche an der Infiltrationsstelle (rechte Blatthälfte). Diese sind teilweise bei transientser Expression von NtTIP1.1a und BHRF1 etwas schwächer als ohne die Expression des anti-apoptischen Proteins (erstes und zweites Foto, rechte Blatthälfte).

4.4 Untersuchung der Interaktion von Aquaporinen mit BHRF1 im Split Ubiquitin System

Die Aquaporine NtPIP2.2b, NtPIP2.2a und NtTIP1.1a wurden in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Maile, 2001) dadurch isoliert, dass sie mit BHRF1 im klassischen Hefezweihybridsystem interagierten. Da dieses System aber einen Kerntransport der Interaktionspartner erfordert und Aquaporine Membranproteine sind, kann nicht davon ausgegangen werden, dass sie während der Interaktion richtig gefaltet waren. Es war deshalb unklar, ob sie in ihrer natürlichen Umgebung, d. h. in der Plasma- oder Vakuolenmembran von Zellen, ebenfalls mit BHRF1 interagieren würden. Deshalb wurden in dieser Arbeit und während meiner Diplomarbeit (Hoch, 2006) sämtliche Interaktionsstudien in einem für Membranproteine besser geeigneten Hefezweihybridsystem (Split Ubiquitin System) durchgeführt.

Das Split Ubiquitin System (Johnsson und Varshavsky, 1994) ist ein speziell für Membran-integrierte bzw. Membran-assoziierte Proteine entwickeltes Hefezweihybridsystem. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass Fusionen von Ubiquitin mit einem Reporterprotein von Ubiquitin-spezifischen Proteasen (UBPs) erkannt und abgespalten werden. Anders als viele andere Proteasen, erkennen UBPs keine spezifische Polypeptidsequenz sondern das gefaltete Ubiquitin (Abb. 4.4-1).

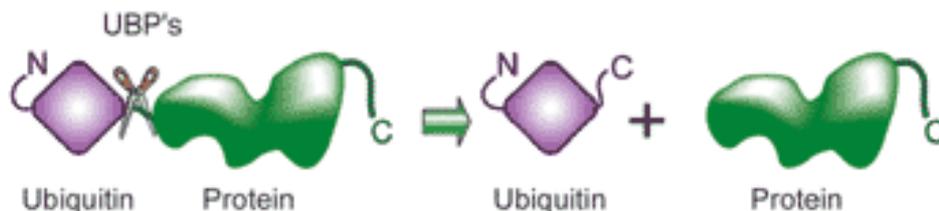


Abb. 4.4-1: Abspaltung durch Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs), (www.dualsystems.com)

Ubiquitin ist ein kleines hochkonserviertes Protein, das sich an andere Proteine anheftet und so deren Transport zum 26S Proteasom und deren Abbau bewirkt (Hershko, 2005; Mayer, 2000). Ubiquitin kann in Hefe sowohl als N-terminale (Nub) wie auch als C-terminale Hälfte (Cub) exprimiert werden. Dabei behalten beide Ubiquitinhälften ihre Bindungsaffinität füreinander und können sich spontan zum sogenannten Split-Ubiquitin zusammenlagern (Abb. 4.4-2).

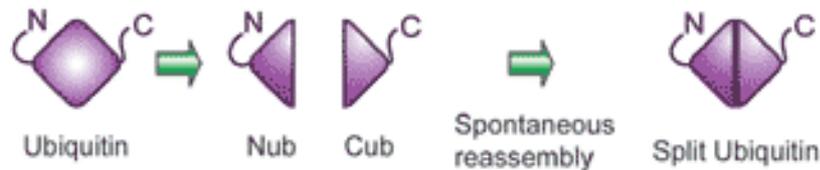


Abb. 4.4-2: Bildung des Split-Ubiquitins, (www.dualsystems.com)

Die starke Bindungsaffinität zwischen dem Wildtyp-Nub und -Cub kann durch einen Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Glycin aufgehoben werden. Durch diese Punktmutation in der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (NubG) wird die Bindungsaffinität der beiden Hälften füreinander zerstört. Die einzelnen Hälften werden nicht durch UBPs erkannt und es kommt auch zu keiner Abspaltung eines fusionierten Reporterproteins (Abb. 4.4-4).

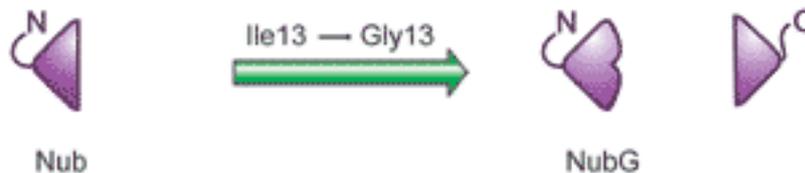


Abb. 4.4-3: Punktmutation der N-terminalen Ubiquitinhälfte, (www.dualsystems.com)

Für die Interaktion zweier Proteine wird eins der beiden zu testenden Proteine (Bait- oder Köderprotein, rot) mit der C-terminalen Hälfte von Ubiquitin (Cub), welche ihrerseits mit dem Transkriptionsfaktor verbunden ist, fusioniert. Das andere der zu untersuchenden Proteine (Prey- oder Beuteprotein, grün) wird mit der durch Mutation veränderten N-terminalen Hälfte von Ubiquitin (NubG) verbunden. Dabei sollte aber darauf geachtet werden, dass beide, Cub und NubG, auf der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert sind. Interagieren Bait- und Prey-Protein miteinander, gelangen die beiden Ubiquitinhälften nahe genug aneinander, um das Split-Ubiquitin zu bilden. Dies führt dazu, dass Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) dies erkennen und den Transkriptionsfaktor von der C-terminalen Ubiquitinhälfte abspalten (Abb. 4.4-5). Der Transkriptionsfaktor besteht aus einer LexA DNA-Bindungsdomäne (BD) und einer Herpes Simplex VP16 Aktivierungsdomäne (AD).

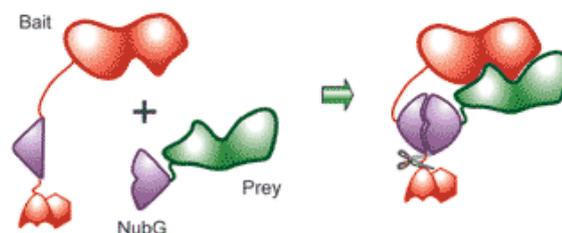


Abb. 4.4-4: Interaktion von Bait- und Prey-Protein, (www.dualsystems.com)

Der Transkriptionsfaktor ist frei und wandert in den Kern. Dort bindet er an den LexA Operator und aktiviert die Transkription des *HIS3*-Reportergens. Die hier verwendeten Reportergene sind zwei auxotrophe Wachstumsmarker *HIS3* und *ADE2*. Dessen Aktivierung befähigt die Hefen auf selektivem Minimalmedium ohne Histidin oder Adenin zu wachsen. Da der Stamm NMY51 das *lacZ*-Reportergen enthält, kann durch Zugabe des Substrats X-Gal ins Medium eine Blaufärbung hervorgerufen werden. Das Reportergen *lacZ* kodiert für das Enzym β -Galaktosidase, welches das Substrat spaltet. Dadurch färben sich diese Zellen blau (Abb. 4.4-6, rechts).

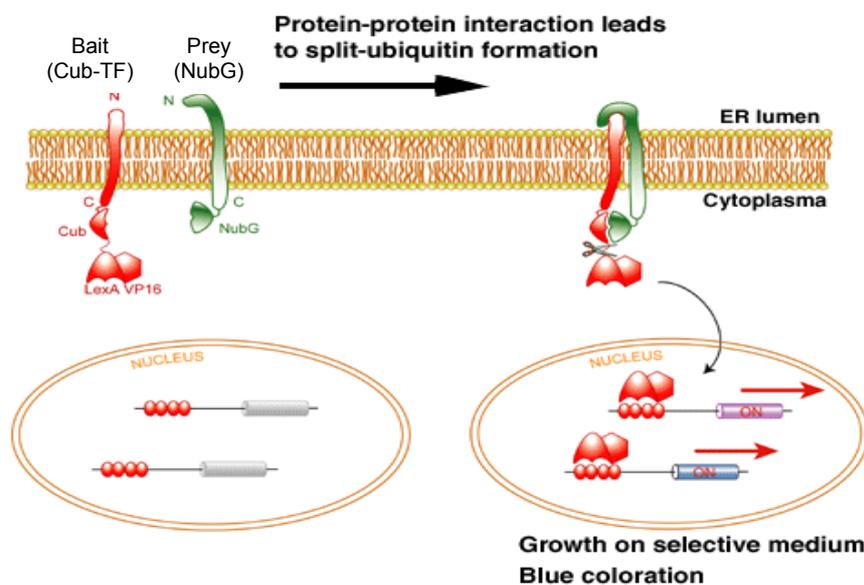


Abb. 4.4-5: Schematische Darstellung einer Interaktion zwischen einem Bait- und einem Prey-Protein und die daraus folgende Aktivierung der Reportergene, (www.dualsystems.com)

Der N-Terminus der in dieser Arbeit verwendeten Prey-Proteine ist an NubG fusioniert und ist ebenfalls auf der zytoplasmatischen Seite der Zelle lokalisiert.

Für die Verwendung des Split Ubiquitin Systems mussten die zu testenden Proteine in geeignete Vektoren ohne Kernlokalisierungssignal (NLS) kloniert werden. Die verwendeten Vektoren (pPR3-N, pBT3-C und pBT3-N) sind unter 2.3.6 bis 2.3.8 beschrieben.

4.4.1 Herstellung der Konstrukte für Interaktionsstudien im Split Ubiquitin System

4.4.1.1 Klonierung der Aquaporine NtTIP1.1a, AtTIP1.1, mAtTIP1.1, mAtPIP2.2, AtPIP2.2m, hAQP1, rAQP8 sowie Deletionen der *Nicotiana tabacum* Aquaporinklone NtPIP2.2b und NtTIP1.1a in pBT3-C bzw. pBT3-N

Zusätzlich zur Klonierung der Volllängeaquaporine (NtPIP2.2b, NtPIP2.2a, NtTIP1.1a, AtTIP1.1, mAtTIP1.1, mAtPIP2.2, AtPIP2.2m, hAQP1 und rAQP8) sollten einige NtPIP2.2b- bzw. NtTIP1.1a-Deletionen zur Charakterisierung der Bindungsstelle für BHRF1 hergestellt werden. Mit diesen Deletionen sollte herausgefunden werden an welche Domäne der Aquaporine das anti-apoptotische BHRF1 bevorzugt bindet. Da N- und C-Termini aller Aquaporine auf der zytoplasmatischen Seite der Zelle lokalisiert sind, sollten die Deletionen ebenfalls so gewählt werden. Somit konnte gewährleistet werden, dass durch die Klonierung der Sequenz in beide Vektoren (pBT3-C und pBT3-N) der Transkriptionsfaktor (LexA-VP16) und die Ubiquitinhälften sich beide im Zytoplasma befinden. Auf diese Weise konnten folgende Deletionen von NtPIP2.2b konstruiert werden:

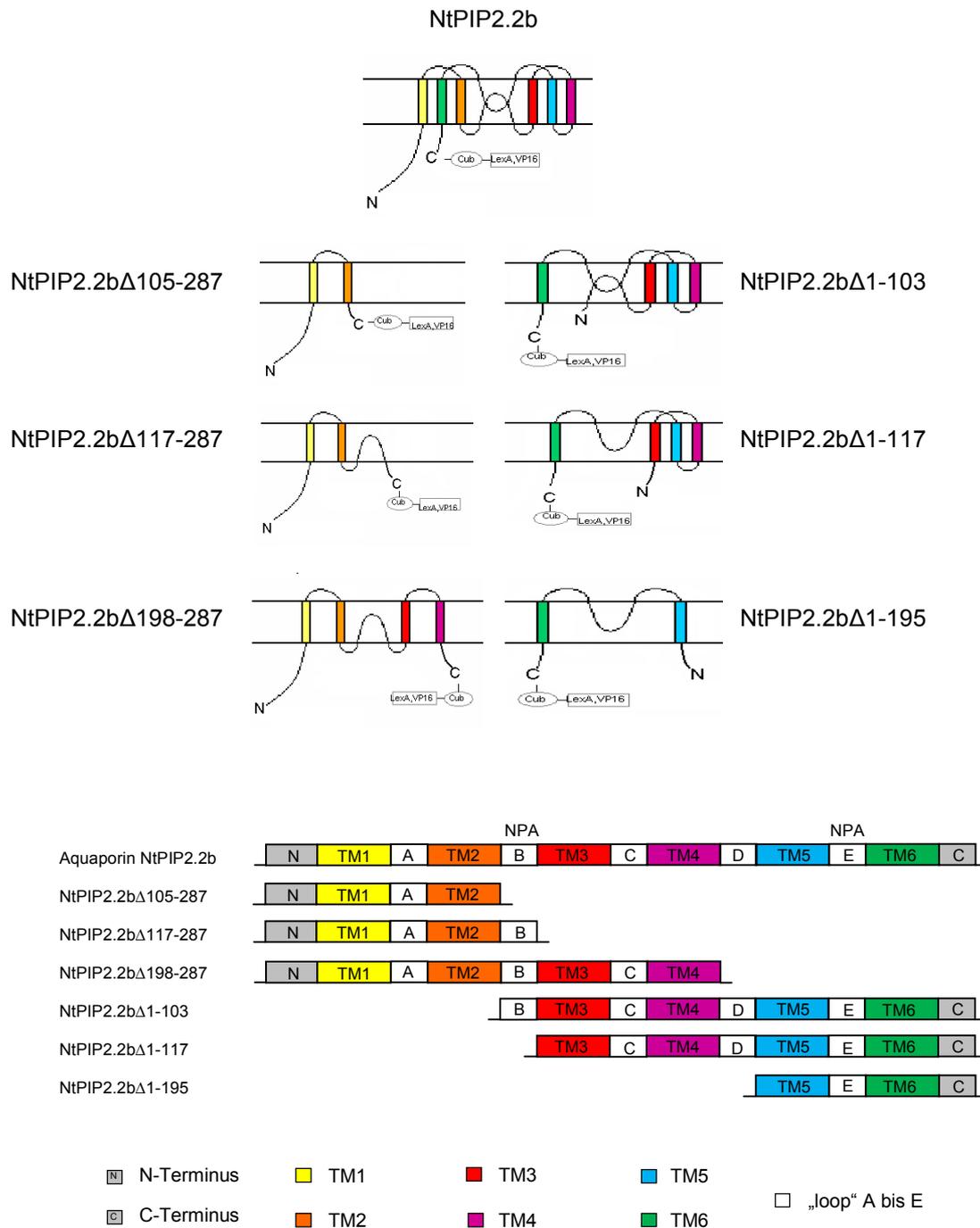


Abb. 4.4-6: Schematische Darstellung des Vollängenproteins NtPIP2.2b und dessen Deletionen

Dargestellt sind die Proteine als Expression in pBT3-C. Für die Expression in pBT3-N sind Cub, LexA und VP16 an den N-Terminus fusioniert. N- und C-Termini der Deletionen sind jeweils mit „N“ bzw. „C“ gekennzeichnet. Die hochkonservierten NPA-Motive befinden sich in „loop“ B (1. NPA-Motiv) und E (2. NPA-Motiv). Die C-terminale Deletion NtPIP2.2bΔ105-287 besteht aus den Aminosäuren AS₁-AS₁₀₄ und den Transmembrandomänen (TM) 1 und 2; NtPIP2.2bΔ117-287 besteht aus AS₁-AS₁₁₆ und TM 1 und 2 sowie dem 1. NPA-Motiv („loop“ B); NtPIP2.2bΔ198-287 besteht aus AS₁-AS₁₉₇, TM 1, 2, 3 und 4 sowie dem 1. NPA-Motiv („loop“ B); die N-terminale Deletion NtPIP2.2bΔ1-103 besteht aus den Aminosäuren AS₁₀₄-AS₂₈₇, TM 3, 4, 5 und 6 sowie dem 1. und 2. NPA-Motiv („loop“ B und E); NtPIP2.2bΔ1-117 besteht aus AS₁₁₈-AS₂₈₇, TM 3, 4, 5 und 6 sowie dem 2. NPA-Motiv („loop“ E); NtPIP2.2bΔ1-195 besteht aus AS₁₉₆-AS₂₈₇, TM 5 und 6 sowie dem 2. NPA-Motiv („loop“ E).

Um überprüfen zu können, ob die Interaktionsbereiche bei PIP und TIP ähnlich sind, wurden zwei weitere Deletionen von Aquaporin NtTIP1.1a nach dem gleichen Prinzip hergestellt.

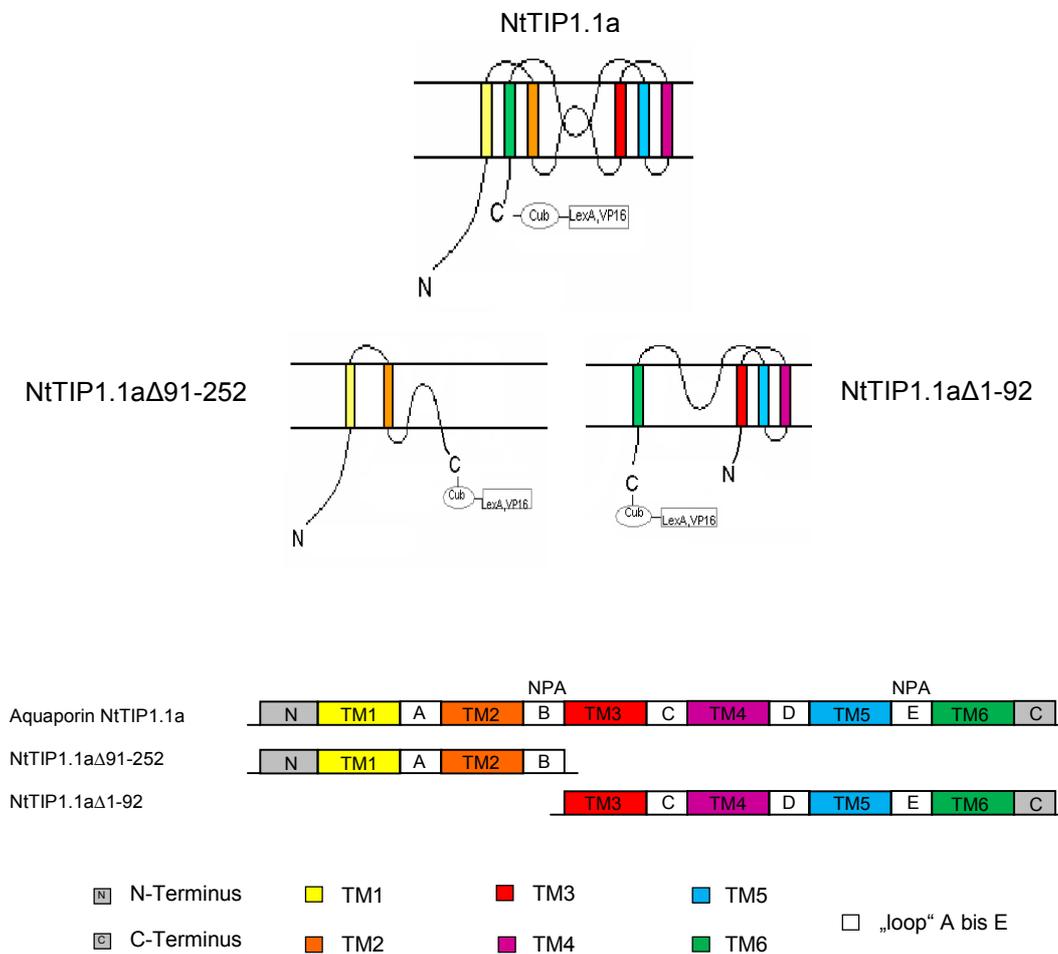


Abb. 4.4-7: Schematische Darstellung des Vollängenproteins NtTIP1.1a und dessen Deletionen

Dargestellt sind die NtTIP1.1a-Deletionen als Expression in pBT3-C. Für die Expression in pBT3-N sind Cub, LexA und VP16 an den N-Terminus fusioniert. N- und C-Termini der Deletionen sind jeweils mit „N“ bzw. „C“ gekennzeichnet. Die hochkonservierten NPA-Motive befinden sich in „loop“ B (1. NPA-Motiv) und E (2. NPA-Motiv). Die C-terminale Deletion NtTIP1.1a Δ 91-252 besteht aus den Aminosäuren AS₁-AS₉₀ und den Transmembrandomänen (TM) 1 und 2, sowie dem 1. NPA-Motiv („loop“ B). Die N-terminale Deletion NtTIP1.1a Δ 1-92 besteht aus AS₉₃-AS₂₅₂, den TM 3, 4, 5 und 6, sowie dem 2. NPA-Motiv („loop“ E).

Die cDNA der Aquaporine NtTIP1.1a, AtTIP1.1, mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m (4.2.1.1) bzw. rAQP8 und hAQP1 (Köber, 2008) sowie der sechs Deletionen des Aquaporins NtPIP2.2b (NtPIP2.2b Δ 105-287, NtPIP2.2b Δ 117-287, NtPIP2.2b Δ 198-287, NtPIP2.2b Δ 1-103, NtPIP2.2b Δ 1-117 und NtPIP2.2b Δ 1-195; Hoch, 2006) und der Deletionen des Aquaporins NtTIP1.1a (NtTIP1.1a Δ 93-252 und NtTIP1.1a Δ 1-90; Hoch, 2006) lag als klonierte DNA in pYEGFP vor. Die DNAs wurden 1:100 bzw. 1:1000 verdünnt und mittels PCR (3.1.11) amplifiziert. Die Länge der erwarteten DNA-Fragmente ergab 787 bp (AtTIP1.1), 890 bp (mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m), 837 bp (rAQP8), 854 bp (hAQP1), 351 bp (NtPIP2.2b Δ 105-

287), 388 bp (NtPIP2.2b Δ 117-287), 631 bp (NtPIP2.2b Δ 198-287), 598 bp (NtPIP2.2b Δ 1-103), 556 bp (NtPIP2.2b Δ 1-117), 322 bp (NtPIP2.2b Δ 1-195), 316 bp (NtTIP1.1a Δ 93-252) bzw. 532 bp (NtTIP1.1a Δ 1-90). Die hierfür verwendeten Primer sind unter 2.7.1 aufgelistet und besitzen alle eine SfiI-Schnittstelle für die Klonierung dieser Aquaporine und Deletionen in die beiden Vektoren pBT3-C bzw. pBT3-N, die ebenfalls eine SfiI-Schnittstelle besitzen. Anschließend wurden die entstandenen PCR-Produkte auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt (3.1.6), mit dem Restriktionsenzym SfiI verdaut und in den ebenfalls mit SfiI geschnittenen pBT3-C bzw. pBT3-N ligiert (3.1.9). Klonierungen mit diesem Restriktionsenzym müssen nicht auf ihre richtige Orientierung kontrolliert werden, da die Schnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende unterschiedlich sind und somit die Insert-DNA nur in einer Orientierung in das Plasmid eingebaut werden kann. Die Konstrukte konnten nun einzeln in *E. coli* DH5 α bzw. XL1-Blue transformiert werden (3.1.2.2). Die Sequenzierung (3.1.13) für die Aquaporine und Aquaporindeletionen erfolgte mit den Primern pBT3-C fwd für Klonierungen in pBT3-C bzw. pBT3-N rev für Klonierungen in pBT3-N (2.7.2). Nach Erhalt der Sequenzen wurde diese mit Hilfe des Blast-Programmes (Altschul et al., 1990) mit der Datenbank von NCBI verglichen. Dabei konnte bestätigt werden, dass es sich um die gewünschten Aquaporine handelt. Die Sequenzen der Aquaporindeletionen wurden mit den Vollängenproteinen im Programm Vector NTI von Invitrogen „aligned“. Die DNA des Aquaporins AtTIP1.1 wies im Gegensatz zur veröffentlichten Sequenz einen Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Threonin an Position 6 auf (mAtTIP1.1). Deshalb wurde aus einem weiteren Klon die Plasmid-DNA isoliert (3.1.3) und ebenfalls zum sequenzieren geschickt. Diese Sequenz entsprach zu 100 % der in der Datenbank von NCBI veröffentlichten Sequenz des Aquaporins AtTIP1.1 aus *Arabidopsis*. Es wurde mit beiden Klonen weitergearbeitet.

Ebenfalls verwendete Aquaporinkonstrukte (pBT3-C:NtPIP2.2b, pBT3-N:NtPIP2.2b, pBT3-N:NtPIP2.2a, pBT3-C:NtTIP1.1a) wurden während meiner Diplomarbeit (Hoch, 2006) hergestellt.

Zur deutlicheren Darstellung der Konstrukte wurden die folgenden Tabellen und Abbildungen (Abb. 4.4-8 und 4.4.-9) erstellt:

	Aquaporine in pBT3-C bzw. pBT3-N
Tabakaquaporine	NtPIP2.2a (nur in pBT3-N)
	NtPIP2.2b
- Deletionen von NtPIP2.2b	- NtPIP2.2b Δ 105-287
	- NtPIP2.2b Δ 117-287
	- NtPIP2.2b Δ 198-287
	- NtPIP2.2b Δ 1-103
	- NtPIP2.2b Δ 1-117
	- NtPIP2.2b Δ 1-195
	NtTIP1.1a
- Deletionen von NtTIP1.1a	- NtTIP1.1a Δ 91-252
	- NtTIP1.1a Δ 1-92
Arabidopsisaquaporine	AtTIP1.1
	mAtTIP1.1
	mAtPIP2.2
	AtPIP2.2m
humanes Aquaporin	hAQP1
Rattenaquaporin	rAQP8

pBT3-C:Aquaporin

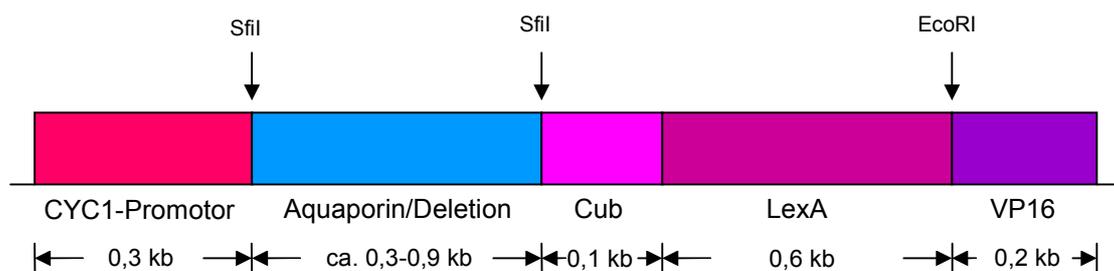


Abb. 4.4-8: Schematische Darstellung der Klonierung der Aquaporine NtPIP2.2b, NtTIP1.1a, AtTIP1.1, AtPIP2.2, hAQP1, rAQP8 und der NtPIP2.2b- bzw. NtTIP1.1a-Deletionen in pBT3-C

Durch die Klonierung der Aquaporine bzw. der Deletionen von NtPIP2.2b und NtTIP1.1a in pBT3-C entsteht ein Fusionsprotein aus dem jeweiligen Aquaporin an dessen C-Terminus die C-terminale Hälfte des Ubiquitins (Cub) und anschließend der Transkriptionsfaktor bestehend aus LexA und VP16 fusioniert sind.

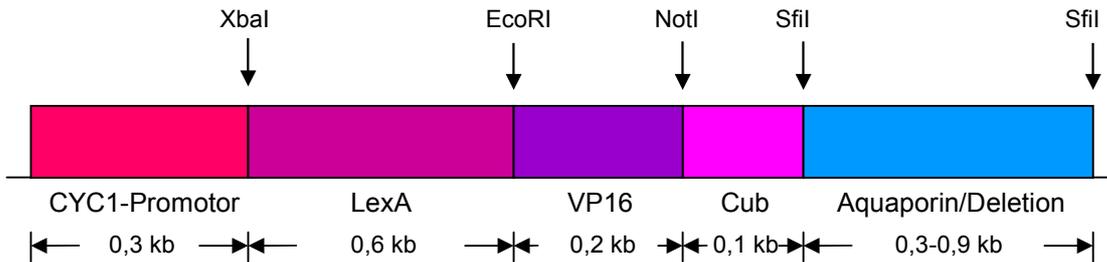
pBT3-N:Aquaporin

Abb. 4.4-9: Schematische Darstellung der Klonierung der Aquaporine NtPIP2.2b, NtPIP2.2a, NtTIP1.1a, AtTIP1.1, AtPIP2.2, hAQP1, rAQP8 und der NtPIP2.2b- bzw. NtTIP1.1a-Deletionen in pBT3-N

Durch die Klonierung der Aquaporine bzw. der Deletionen von NtPIP2.2b und NtTIP1.1a in pBT3-N entsteht ein Fusionsprotein aus dem jeweiligen Aquaporin an dessen N-Terminus die C-terminale Hälfte des Ubiquitins (Cub) und anschließend der Transkriptionsfaktor (LexA und VP16) fusioniert sind.

4.4.1.2 Klonierung von BHRF1wt, BHRF1 Δ TMwt, mBHRF1 und mBHRF1 Δ TM in pPR3-N

Aus Deletionsexperimenten ist bekannt, dass der funktionale Bereich von BHRF1 am N-Terminus lokalisiert ist (Li et al., 2001/2006). Um zu testen, ob dies auch für die Interaktion mit pflanzlichen und tierischen Aquaporinen gilt, wurde die Transmembrandomäne deletiert. Die Mutation von mBHRF1 in der BH2-Domäne (Ser \rightarrow Pro) entstand zufällig. Da es durch Prolin zu einer Unterbrechung in der α -Helix-Struktur kommt, wurde dieser Klon ebenfalls weiterverwendet, um mögliche Auswirkungen des Aminosäureaustausches auf die Interaktion zu untersuchen.

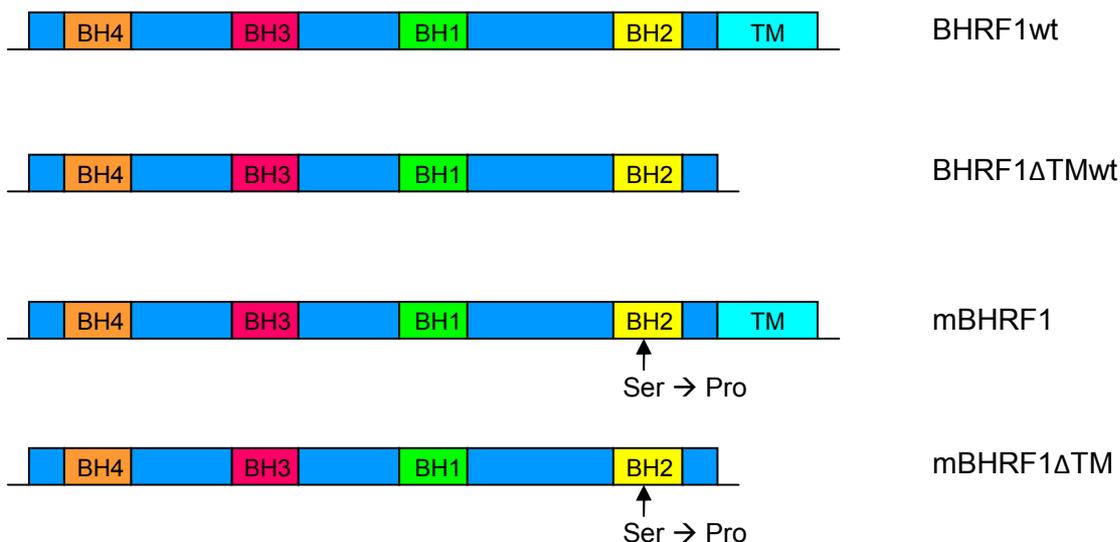


Abb. 4.4-10: Schematische Darstellung von BHRF1

BHRF1wt und mBHRF1 sind die beiden Vollängenproteine (AS₁-AS₁₉₁). Bei BHRF1 Δ TMwt und mBHRF1 Δ TM (AS₁-AS₁₆₃) wurde jeweils die Transmembrandomäne (TM) am C-Terminus deletiert. BH1 bis BH4 stellen die Bcl-2 Homologie Domänen dar, welche für die Mitglieder der Bcl-2 Familie charakteristisch sind. mBHRF1 und mBHRF1 Δ TM weisen einen Aminosäureaustausch von Serin nach Prolin an Position 151 in der BH2-Domäne auf.

Die cDNA der anti-apoptotischen Proteine BHRF1wt, BHRF1 Δ TMwt, mBHRF1 und mBHRF1 Δ TM des Epstein-Barr Virus lag als klonierte DNA in pGAD Δ (pGAD Δ :BHRF1; Köber, 2008) vor. Alle vier BHRF1-Proteine besitzen am N-Terminus einen His-tag (6 x His). Mit dem Restriktionsenzym HindIII wurden die Sequenzen von BHRF1 aus diesem Vektor herausgeschnitten und die 5'-Überhänge der entstandenen Schnittstellen mit Hilfe von dNTPs und T4-Polymerase „blunt“ (glatt) aufgefüllt. Nun konnte die eluierte DNA der BHRF1-Proteine in den mit SmaI geschnittenen pPR3-N kloniert werden. Anschließend wurden die vier Konstrukte einzeln in *E. coli* XL1-Blue transformiert (3.1.2.2).

Aus den Flüssigkulturen, die ein positives Ergebnis lieferten, wurden Gefrierkulturen (3.1.14) angelegt und besonders reine Plasmid-DNA (2.4.1) zum Sequenzieren (3.1.13) geschickt (sollte bei „blunt“-Auffüllen oder -Abknabbern immer gemacht werden). Die Sequenzierung von BHRF1 in pPR3-N erfolgte mittels pPR3-N rev Primer (2.7.2).

Ebenfalls verwendete BHRF1-Konstrukte (pPR3-N:BHRF1 Δ BH1, pPR3-N:BHRF1 Δ BH2, pPR3-N:BHRF1 Δ BH3, pPR3-N:BHRF1 Δ BH4, pPR3-N:Bcl-X_L) wurden freundlicherweise von Stephanie Beltz (Beltz, 2011) zur Verfügung gestellt. Diese Konstrukte wurden verwendet, um herauszufinden welche der vier BH-Domänen für die Interaktion mit Aquaporinen zuständig ist.

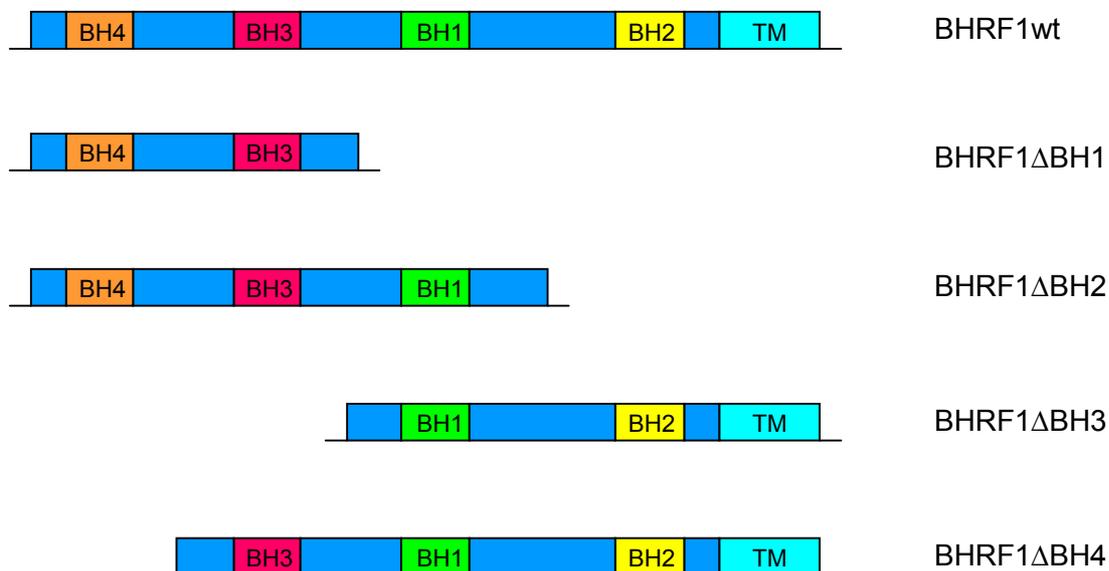


Abb. 4.4-11: Schematische Darstellung der BHRF1-Deletionsmutanten

Dargestellt ist das Volllängenprotein BHRF1wt (AS₁-AS₁₉₁) und weitere Deletionen. Die C-terminale Deletion BHRF1 Δ BH1 besteht aus den Aminosäuren AS₁-AS₇₈ und besitzt die Sequenzen für die BH-Domänen 3 und 4. Die C-terminale Deletion BHRF1 Δ BH2 (AS₁-AS₁₂₈) besteht aus den Domänen BH1, BH3 und BH4. Die N-terminale Deletion BHRF1 Δ BH3 (AS₆₁-AS₁₉₁) trägt die Sequenzen für die BH1 und BH2 Domänen. Die N-terminale Deletion BHRF1 Δ BH4 besteht aus den Aminosäuren AS₂₇-AS₁₉₁ und besitzt die BH-Domänen BH1, BH2 und BH3.

Die Sequenzen der Aquaporine und von BHRF1 sind im Anhang aufgelistet.

Zur deutlicheren Darstellung der Konstrukte wurden folgende Tabelle und Abbildung (Abb. 4.4-12) erstellt:

	BHRF1 in pPR3-N
Wildtyp-BHRF1	BHRF1wt
- Deletionen von BHRF1wt	- BHRF1 Δ TMwt
	- BHRF1 Δ BH1
	- BHRF1 Δ BH2
	- BHRF1 Δ BH3
	- BHRF1 Δ BH4
mutiertes BHRF1	mBHRF1
- Deletionen von mBHRF1	- mBHRF1 Δ TM
Bcl-X_L	Bcl-X_L

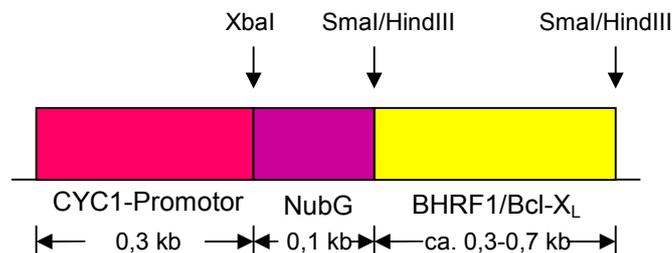


Abb. 4.4.-12: Schematische Darstellung der Klonierung von BHRF1wt, BHRF1 Δ TMwt, mBHRF1 und mBHRF1 Δ TM, BHRF1 Δ BH1, BHRF1 Δ BH2, BHRF1 Δ BH3, BHRF1 Δ BH4 und Bcl-X_L in pPR3-N

Durch die Klonierung von BHRF1 und dessen Deletionen bzw. Bcl-X_L in pPR3-N entsteht ein Fusionsprotein aus BHRF1 an dessen N-Terminus die N-terminale Hälfte des mutierten Ubiquitins (NubG) fusioniert ist.

BHRF1 wurde ausschließlich in pPR3-N verwendet. Da die Transmembrandomäne von BHRF1 am C-Terminus lokalisiert ist und der N-Terminus sich auf der zytoplasmatischen Seite der Zelle befindet, konnte BHRF1 nur in einen Vektor mit N-terminaler Fusion kloniert werden. Dabei musste zusätzlich beachtet werden, dass bei einigen der BHRF1-Deletionen die Domäne für die Verankerung in der Membran (Transmembrandomäne) fehlt. Da das Vollängen-BHRF1 (19,1 kDa) und alle weiteren Deletionskonstrukte kleiner als 50 kDa sind, könnten diese Proteine problemlos in den Kern gelangen sobald die Transmembrandomäne deletiert ist. Die Fusion einiger BHRF1-Deletionen mit dem Transkriptionsfaktor LexA-VP16 wie es in pBT3-N der Fall wäre, würde zu einer Expression der Reportergene führen und somit zu falschen positiven Ergebnissen. Durch die Klonierung in pPR3-N allerdings entsteht

lediglich ein Fusionsprotein aus der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (NubG) und BHRF1.

Die korrekte Plasmid-DNA konnte nun in geeignete Hefen transformiert werden (3.2.3.1.2).

4.4.2 Transformation der Aquaporine, der NtPIP2.2b- und NtTIP1.1a-Deletionen sowie BHRF1 in *S. cerevisiae* NMY51

Nun konnten die Vektoren mit Insert (Kombination aus je einem Konstrukt in pBT3-C/pBT3-N und einem Konstrukt in pPR3-N) in Hefe transformiert werden (3.2.3.1.2). Als geeigneter Hefestamm diente *Saccharomyces cerevisiae* NMY51 (2.2.4). Im Genom dieser Hefezellen befinden sich zwei auxotrophe Wachstumsmarker (*HIS3* und *ADE2*), deren Aktivierung Hefen befähigt auf Minimalmedium ohne Histidin oder Adenin zu wachsen. Als weiteres Reportergen steht *lacZ*, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert, zur Verfügung. Durch die Interaktion zweier Proteine können NMY51 auf selektivem Medium wachsen und es kommt zur Blaufärbung in einem β -Galaktosidase Assay.

Die Transformation wurde wie unter 3.2.3.1.2 beschrieben, durchgeführt und anschließend auf SD-Platten ohne die Aminosäuren Leucin (pBT3-C bzw. pBT3-N) und Tryptophan (pPR3-N) ausplattiert. So konnte gewährleistet werden, dass nur jene Hefen wachsen können, die beide Plasmide exprimieren. Die gewachsenen Kolonien wurden in Flüssigkulturen angezogen und für weitere Versuche wurden Gefrierkulturen (3.1.14) angelegt.

4.4.3 Nachweis der Expression von Proteinen im Hefestamm NMY51

Um sicher zu gehen, dass die in Hefe transformierten Gene tatsächlich exprimiert werden, wurden die Proteine aus den Hefen isoliert (3.2.4.2), auf einem SDS-Polyacrylamidgel (3.2.5) aufgetrennt und anschließend in eine Immundetektion mittels Antikörper (3.2.7.2) eingesetzt.

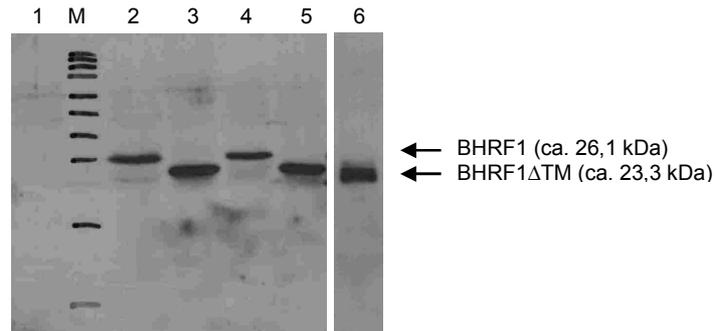


Abb. 4.4-13: Immundetektion der aus den transgenen *S. cerevisiae* NMY51 isolierten Proteine

Zur Detektion von BHRF1 wurde als 1. Antikörper „EBV Bcl-2“ (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) eingesetzt. „Anti-mouse/HRP“ (1:10000) wurde als 2. Antikörper verwendet.

Spur 1: NMY51 + pPR3-N (Negativkontrolle)

Spur M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671, MBI Fermentas): 170 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 10 kDa

Spur 2: NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt

Spur 3: NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt

Spur 4: NMY51 + pPR3-N:mBHRF1

Spur 5: NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM

Spur 6: BL21 + pET-DEST42:BHRF1 (Positivkontrolle)

In Spur 2 (BHRF1wt) und 4 (mBHRF1) sind die Proben der beiden Vollängenproteine von BHRF1 aufgetragen. Sie haben jeweils ein Molekulargewicht von 26,1 kDa (BHRF1 mit His-tag = 19,8 kDa (Köber, 2008), NubG/HA-tag = ca. 6,3 kDa). Die beiden BHRF1-Proteine ohne Transmembrandomäne (BHRF1ΔTMwt in Spur 3 und mBHRF1ΔTM in Spur 5) haben ein Molekulargewicht von 23,3 kDa (BHRF1ΔTM mit His-tag = 17 kDa (Köber, 2008), NubG/HA-tag = ca. 6,3 kDa). In Spur 6 ist die Positivkontrolle aus *E. coli*, die ebenfalls BHRF1 (22,6 kDa) exprimieren, und in Spur 1 ist die Negativkontrolle mit dem leeren Vektor aufgetragen.

4.4.4 Interaktionstests mittels Split Ubiquitin System

4.4.4.1 Interaktionsstudien im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens

Die Aquaporine NtPIP2.2b, NtPIP2.2a und NtTIP1.1a wurden dadurch identifiziert, dass sie mit Hilfe des Hefezeihybridsystems in einer cDNA-Bank von *Nicotiana tabacum* mit BHRF1 interagieren (Maile, 2001).

Aus Deletionsexperimenten ist bekannt, dass die für die Funktion wichtige Domäne von BHRF1 an dessen N-Terminus lokalisiert ist (Li et al., 2001/2006). Um zu testen, ob dies auch für die Interaktion mit pflanzlichen und tierischen Aquaporinen gilt, wurde die Transmembrandomäne deletiert. Bei der Amplifikation von BHRF1 entstand eine Punktmutation in der Aminosäuresequenz, die zu einem Austausch von Serin nach Prolin in

der BH2-Domäne führte. Da Prolin einen Ring beinhaltet, führt dies zur Unterbrechung in der α -Helix-Struktur. Um mögliche Auswirkungen dieser Mutation auf die Interaktion mit Aquaporinen untersuchen zu können, wurde die Sequenz des mutierten BHRF1 (mBHRF1) ebenfalls verwendet. Wie beim Wildtyp-BHRF1 (BHRF1wt) wurde auch bei mBHRF1 die Transmembrandomäne deletiert.

Wie bereits unter 4.4.1.2 erwähnt, wurde die Sequenz von BHRF1 für die Interaktion im Split Ubiquitin System in pPR3-N (2.3.8) kloniert. Bei der Expression entsteht ein Fusionsprotein aus der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (NubG), das an den N-Terminus von BHRF1 fusioniert ist.

Die Sequenzen der hier verwendeten Aquaporine wurden einzeln in pBT3-C (2.3.6) bzw. pBT3-N (2.3.7) kloniert. Hierbei entstehen ebenfalls Fusionsproteine, die aus einem Aquaporin, dem Transkriptionsfaktor (LexA, VP16) und der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins (Cub) bestehen. Bei der Expression in pBT3-C ist allerdings der Transkriptionsfaktor und Cub an den C-Terminus des Aquaporins fusioniert, während bei der Expression in pBT3-N der Transkriptionsfaktor und Cub N-terminal an das Aquaporin fusioniert sind.

Der N-Terminus von BHRF1 und beide Termini der Aquaporine befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite der Zelle. Somit sind auch die beiden Hälften des Ubiquitins (NubG und Cub) und der Transkriptionsfaktor (LexA, VP16) im Zytoplasma lokalisiert. Interagiert BHRF1 mit einem Aquaporin kommen NubG und Cub nahe genug zusammen um das Split-Ubiquitin zu bilden. Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) erkennen dies und schneiden den Transkriptionsfaktor ab. Dieser wandert in den Kern und aktiviert die Expression des Reportergens (*HIS3*). Auf diese Weise können Hefen auf selektivem SD-Medium wachsen, wenn diese, zwei miteinander interagierende Proteine, exprimieren.

Für eine bessere Vorstellung der Struktur von BHRF1 bzw. Bcl-X_L und Aquaporin dienen die folgenden Abbildungen (Abb. 4.4-14 bis 4.4-16).

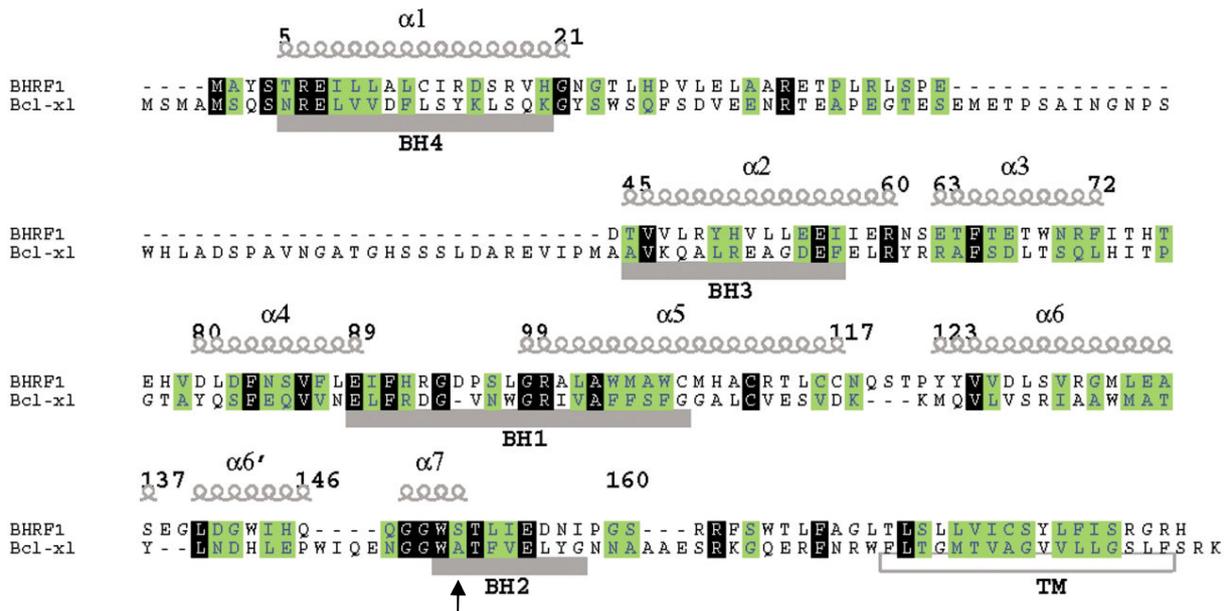


Abb. 4.4-14: „Alignment“ der Sekundärstruktur von BHRF1 und BCL-X_L (aus Journal of Molecular Biology, „Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr Virus, a homolog of human Bcl-2“, Huang et al., 2003) BH1 bis BH4 sowie die 8 α-Helices sind eingezeichnet. Die Transmembrandomäne (TM) befindet sich am C-Terminus (Huang et al., 2003). Der Pfeil kennzeichnet den Aminosäureaustausch (Ser → Pro) in der BH2-Domäne von mBHRF1 bzw. mBHRF1ΔTM.

BHRF1 besitzt wie Bcl-X_L die für Proteine der Bcl-2 Familie charakteristischen BH-Domänen (BH1 bis BH4).

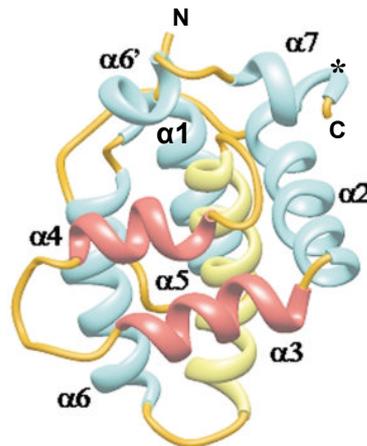


Abb. 4.4-15: Struktur von BHRF1 (aus Journal of Molecular Biology, „Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr Virus, a homolog of human Bcl-2“, Huang et al., 2003) Die zentrale, hydrophobe α5-Helix ist gelb markiert. Die beiden Helices α3 und α4 (rot) bilden einen Teil der BH3-Peptidbindungsstelle. N- und C-Terminus sind mit „N“ bzw. „C“ gekennzeichnet. Die Helices α1 bzw. α2 entsprechen ungefähr der BH4- bzw. BH3-Domäne. Die BH1-Domäne befindet sich in der Schleife zwischen den Helices α4 und α5 und der ersten Hälfte von α5. Am Ende von Helix α7 ist die BH2-Domäne lokalisiert. Der Aminosäureaustausch (Ser → Pro) in der BH2-Domäne von mBHRF1 bzw. mBHRF1ΔTM befindet sich am Ende der α7-Helix (Stern). Die Transmembrandomäne am C-Terminus von BHRF1 ist nicht abgebildet.

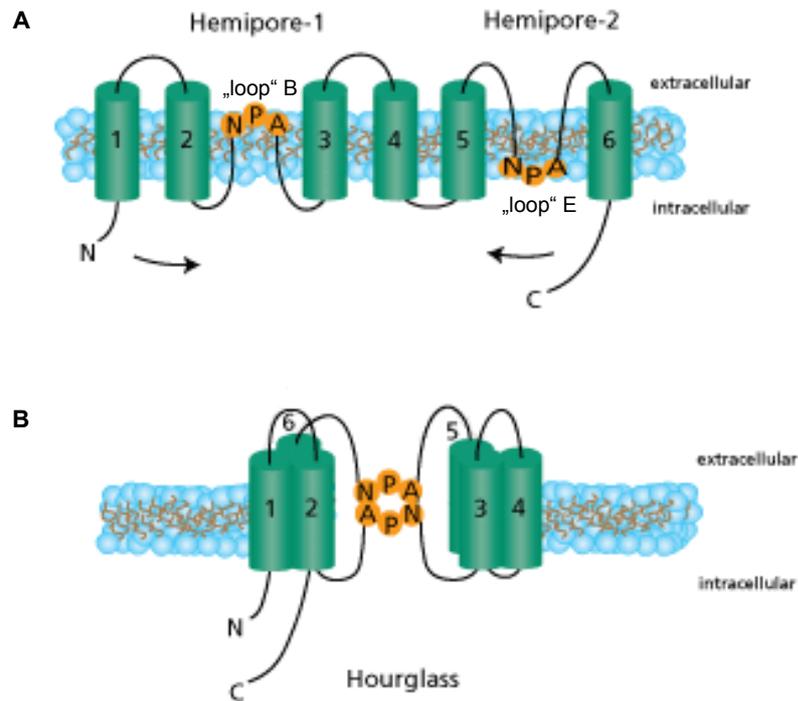


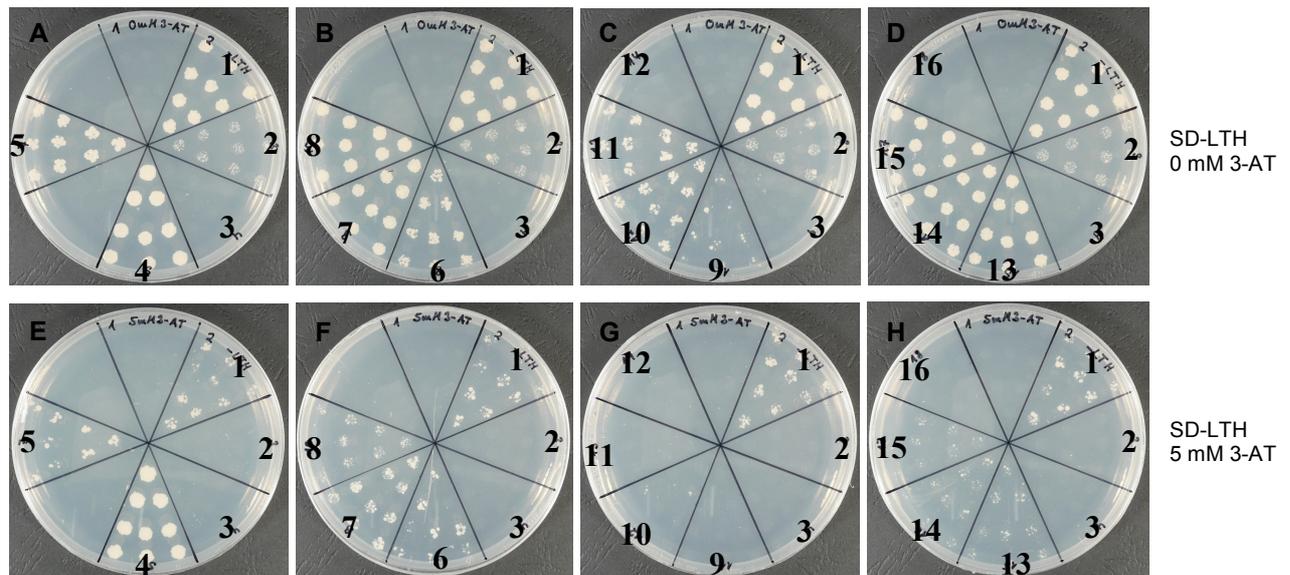
Abb. 4.4-16: „Hourglass“ Modell eines Aquaporins, (www.sigmaaldrich.com)

(A) Dargestellt ist die aufgeklappte Struktur eines Aquaporins, das aus sechs Transmembrandomänen (TM1 bis TM6) besteht, die durch Schleifen („loop“ A bis „loop“ E) miteinander verbunden sind. „Loop“ B und E beinhalten die konservierten Motive, bestehend aus den Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin (NPA), welche die eigentliche Pore bilden. N- und C-Termini sind auf der zytosomatischen Seite der Zelle lokalisiert.

(B) Durch Zusammenlagerung der Transmembrandomänen entsteht das sogenannte „Hourglass“ Modell. Vier dieser asymmetrischen Untereinheiten bilden ein Tetramer.

Für die Interaktionsexperimente wurden Kolonien mit den unter 4.4.1 hergestellten Konstrukten in Flüssigmedium angezogen. Die Kulturen wurden auf einen OD_{600} -Wert von 0,1 mit sterilem H_2O verdünnt und je 3 μl auf SD-Platten ohne die Aminosäuren Leucin, Tryptophan und Histidin aufgetropft. Die Platten enthielten zusätzlich verschiedene Konzentrationen von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT). 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor des *HIS3*-Genprodukts und erhöht den Selektionsdruck auf die Interaktion. Nach einer 4-tägigen Inkubation der Platten bei 30 °C konnte das Wachstum und somit die Interaktionsstärke ausgewertet werden.

4.4.4.1.1 Interaktion zwischen BHRF1wt und pflanzlichen Aquaporinen



1 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:Bik (Positivkontrolle)
 2 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C (Negativkontrolle)
 3 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N Δ (Negativkontrolle)

4 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2b
 5 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtTIP1.1a
 6 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:NtPIP2.2b
 7 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:NtPIP2.2a
 8 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:NtTIP1.1a

9 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:AtTIP1.1
 10 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:mAtTIP1.1
 11 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:mAtPIP2.2
 12 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:AtPIP2.2m
 13 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:AtTIP1.1
 14 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:mAtTIP1.1
 15 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:mAtPIP2.2
 16 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:AtPIP2.2m

Abb. 4.4-17: Interaktion von BHRF1wt und verschiedenen Tabak- bzw. *Arabidopsis* aquaporinen im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM (A bis D) und 5 mM 3-AT (E bis H)

In Sektor 1 wurde pPR3-N:BHRF1wt in Kombination mit pBT3-N:Bik aufgetragen und diente als Positivkontrolle, da aus der Literatur bekannt ist, dass BHRF1 mit Bik interagiert (Theodorakis et al., 1996; Nava et al., 1997). Die Interaktion der beiden Proteine scheint aber nicht sonderlich stark zu sein, da die mit diesen Konstrukten transformierten Hefen schon bei einer Zugabe von 5 mM 3-AT in den Platten in ihrem Wachstum beeinträchtigt sind. In Sektor 2 und 3 sollte kein Wachstum möglich sein, da ein mit BHRF1-interagierendes Protein fehlt. Sektor 2 zeigt ein wenig Hintergrund.

Das Volllängen-BHRF1 und NtPIP2.2b in pBT3-C (Sektor 4) zeigen auch bei einer Konzentration von 5 mM 3-AT die stärkste Interaktion. In pBT3-N dagegen interagiert NtPIP2.2b (Sektor 6) wesentlich schwächer mit BHRF1wt. NtTIP1.1a interagiert in beiden Vektoren ungefähr gleich stark mit BHRF1wt (Sektor 5 und 8). Aquaporin NtPIP2.2a unterscheidet sich in einer Aminosäure von NtPIP2.2b und interagiert in pBT3-N auch bei 5 mM 3-AT mit BHRF1wt (Sektor 7) stärker als NtPIP2.2b (Sektor 6). Die *Arabidopsis* aquaporine scheinen allgemein schwächer mit BHRF1wt zu interagieren (Wachstum nur bei 0 mM 3-AT) als die Aquaporine aus Tabak. Dabei wachsen nur die

Hefen, die AtTIP1.1 (Sektor 13), mAtTIP1.1 (Sektor 14) und mAtPIP2.2 (Sektor 15) in pBT3-N und in Kombination mit BHRF1wt bei 0 mM 3-AT exprimieren. Die Kombination von mAtTIP1.1 und mAtPIP2.2 in pBT3-C mit BHRF1wt (Sektor 10 und 11) lässt schwaches Wachstum bei 0 mM 3-AT zu. Aquaporin AtPIP2.2m und BHRF1wt (Sektor 12 und 16) zeigen keinerlei Interaktion.

4.4.4.1.2 Interaktion zwischen BHRF1 Δ TMwt und pflanzlichen Aquaporinen

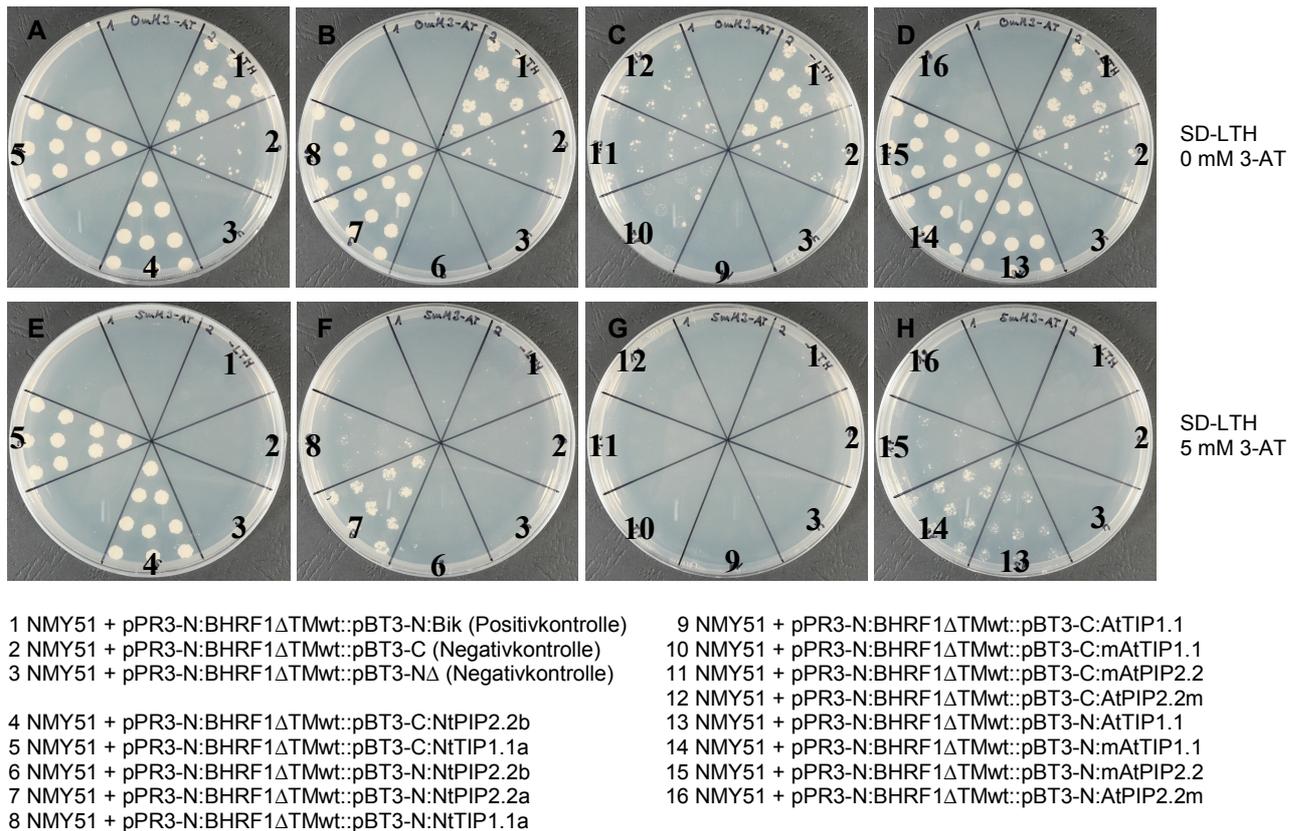


Abb. 4.4-18: Interaktion von BHRF1 Δ TMwt und verschiedenen Tabak- bzw. *Arabidopsis* aquaporinen im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM (A bis D) und 5 mM 3-AT (E bis H)

In Sektor 1 wurde pPR3-N:BHRF1 Δ TMwt in Kombination mit pBT3-N:Bik aufgetragen und diente als Positivkontrolle. In Sektor 2 und 3 sollte kein Wachstum möglich sein, da ein mit BHRF1 Δ TMwt-interagierendes Protein fehlt. Sektor 2 zeigt ein wenig Hintergrund.

BHRF1 ohne die Transmembrandomäne (BHRF1 Δ TMwt) und NtPIP2.2b bzw. NtTIP1.1a in pBT3-C (Sektor 4 und 5) zeigen auch bei einer Konzentration von 5 mM 3-AT die stärkste Interaktion. In pBT3-N dagegen interagiert NtPIP2.2b (Sektor 6) überhaupt nicht mehr und NtTIP1.1a (Sektor 8) wesentlich schwächer mit BHRF1 Δ TMwt. Aquaporin NtPIP2.2a interagiert in pBT3-N auch bei 5 mM 3-AT mit BHRF1 ohne Transmembrandomäne (Sektor 7). Die *Arabidopsis* aquaporine scheinen auch mit BHRF1 Δ TMwt schwächer zu interagieren

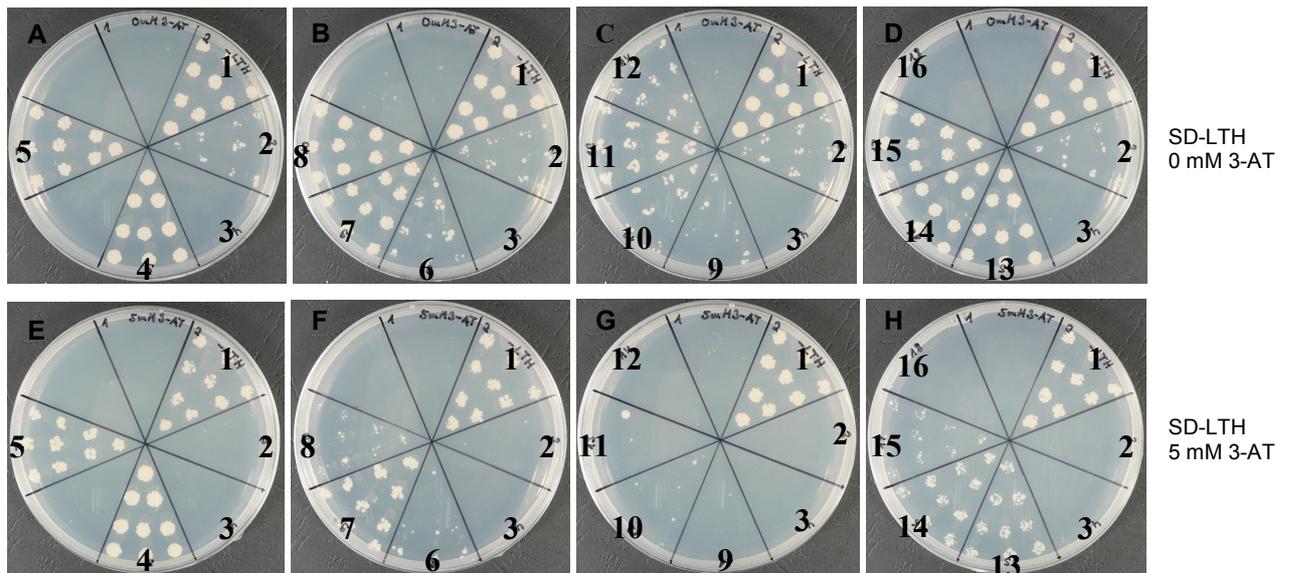
als die Tabakaquaporine. Es wachsen nur die Hefen, die AtTIP1.1 (Sektor 13), mAtTIP1.1 (Sektor 14) und mAtPIP2.2 (Sektor 15) in pBT3-N und in Kombination mit BHRF1 Δ TMwt bei 0 mM 3-AT exprimieren. Aquaporin AtPIP2.2m zeigt so gut wie keine Interaktion mit BHRF1 Δ TMwt (Sektor 12 und 16).

Im Vergleich zur Interaktion mit dem Volllängen-BHRF1 (BHRF1wt) gibt es keinen wesentlichen Unterschied bei der Interaktion der Aquaporine mit dem BHRF1, dessen Transmembrandomäne deletiert wurde (BHRF1 Δ TMwt). Die Aquaporine interagieren auch noch mit BHRF1, wenn dessen Transmembrandomäne fehlt (BHRF1 Δ TMwt). Tatsächlich kann sogar eine Verstärkung der Interaktion des Tabakaquaporins NtTIP1.1a in pBT3-C mit dem deletierten BHRF1 (BHRF1 Δ TMwt) beobachtet werden (Sektor 5). Allerdings wird die schwache Interaktion zwischen NtPIP2.2b in pBT3-N und BHRF1wt durch das Fehlen der Transmembrandomäne von BHRF1 völlig unterdrückt (BHRF1 Δ TMwt, Sektor 6).

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Interaktion von BHRF1 mit Aquaporinen die Transmembrandomäne von BHRF1 nicht notwendig ist. Der funktionale Bereich von BHRF1 befindet sich auch für pflanzliche Aquaporine N-terminal gelegen. Die Tatsache, dass NtPIP2.2b in pBT3-N keine Interaktion mit BHRF1 Δ TMwt zeigt (Sektor 6), liegt vermutlich am Aquaporin selbst, da die Interaktion mit BHRF1wt ebenfalls nicht sehr stark ist.

4.4.4.1.3 Interaktion zwischen mBHRF1 und pflanzlichen Aquaporinen

Dieses BHRF1-Protein (mBHRF1) hat einen Aminosäureaustausch von Serin nach Prolin. Die Punktmutation befindet sich an Position 158 in der BH2-Domäne. Da Prolin einen Ring besitzt, wird die Sekundärstruktur der α -Helix an dieser Stelle unterbrochen. Aufgrund der nahe am C-Terminus gelegenen Position dieser Aminosäure hat dies möglicherweise keine allzu großen Auswirkungen auf die Funktion bzw. Interaktion des BHRF1-Proteins (mBHRF1).



- 1 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:Bik (Positivkontrolle)
- 2 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C (Negativkontrolle)
- 3 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N Δ (Negativkontrolle)
- 4 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:NtPIP2.2b
- 5 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:NtTIP1.1a
- 6 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:NtPIP2.2b
- 7 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:NtPIP2.2a
- 8 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:NtTIP1.1a

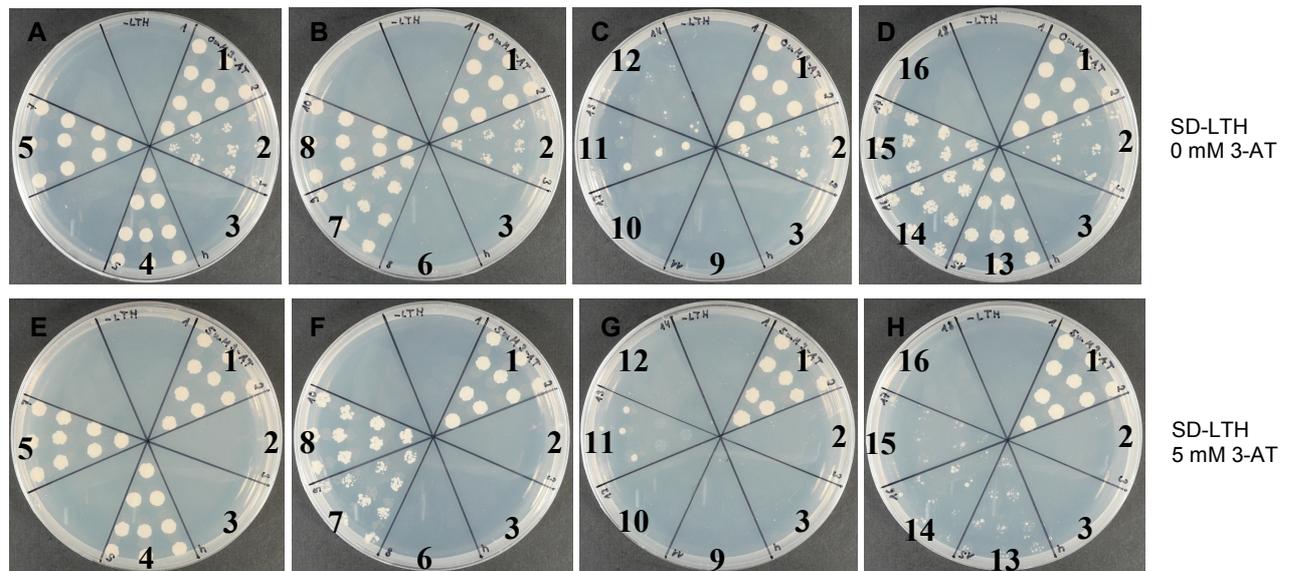
- 9 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:AtTIP1.1
- 10 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:mAtTIP1.1
- 11 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:mAtPIP2.2
- 12 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:AtPIP2.2m
- 13 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:AtTIP1.1
- 14 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:mAtTIP1.1
- 15 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:mAtPIP2.2
- 16 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:AtPIP2.2m

Abb. 4.4-19: Interaktion von mBHRF1 und verschiedenen Tabak- bzw. *Arabidopsis* aquaporinen im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM (A bis D) und 5 mM 3-AT (E bis H)

In Sektor 1 wurde pPR3-N:mBHRF1 in Kombination mit pBT3-N:Bik aufgetragen und diente als Positivkontrolle. In Sektor 2 und 3 sollte kein Wachstum möglich sein, da ein mit mBHRF1-interagierendes Protein fehlt. Sektor 2 zeigt ein wenig Hintergrund.

mBHRF1 und NtPIP2.2b bzw. NtTIP1.1a in pBT3-C (Sektor 4 und 5) zeigen auch bei einer Konzentration von 5 mM 3-AT die stärkste Interaktion, wobei aber NtTIP1.1a ein wenig schwächer interagiert. In pBT3-N dagegen zeigt NtPIP2.2b (Sektor 6) so gut wie kein Wachstum, NtTIP1.1a (Sektor 8) nur bei 0 mM 3-AT. Aquaporin NtPIP2.2a interagiert in pBT3-N auch bei 5 mM 3-AT mit mBHRF1 (Sektor 7). Die *Arabidopsis* aquaporine AtTIP1.1, mAtTIP1.1 und mAtPIP2.2 interagieren auch mit mBHRF1 hauptsächlich in pBT3-N (Sektor 13, 14 und 15). Während Aquaporin AtPIP2.2m mit BHRF1wt gar nicht interagiert hat, kommt es mit mBHRF1 (Sektor 12) zu einer allerdings nur sehr schwachen Interaktion. In pBT3-N interagiert AtPIP2.2m ebenfalls nicht mit mBHRF1 (Sektor 16). Lediglich die schwache Interaktion von mBHRF1 mit AtPIP2.2m in pBT3-C lässt einige wenige Kolonien wachsen (Sektor 12) im Gegensatz zur Interaktion mit BHRF1wt. Die Mutation in der BH2-Domäne von mBHRF1 hat offensichtlich keine allzu großen Auswirkungen auf die Interaktion mit pflanzlichen Aquaporinen.

4.4.4.1.4 Interaktion zwischen mBHRF1 Δ TM und pflanzlichen Aquaporinen



1 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:Bik (Positivkontrolle)
 2 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-C (Negativkontrolle)
 3 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N Δ (Negativkontrolle)

4 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-C:NtPIP2.2b
 5 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-C:NtTIP1.1a
 6 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:NtPIP2.2b
 7 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:NtPIP2.2a
 8 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:NtTIP1.1a

9 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-C:AtTIP1.1
 10 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-C:mAtTIP1.1
 11 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-C:mAtPIP2.2
 12 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-C:AtPIP2.2m
 13 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:AtTIP1.1
 14 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:mAtTIP1.1
 15 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:mAtPIP2.2
 16 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:AtPIP2.2m

Abb. 4.4-20: Interaktion von mBHRF1 Δ TM und verschiedenen Tabak- bzw. *Arabidopsis* aquaporinen im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM (A bis D) und 5 mM 3-AT (E bis H)

In Sektor 1 wurde pPR3-N:mBHRF1 Δ TM in Kombination mit pBT3-N:Bik aufgetragen und diente als Positivkontrolle. In Sektor 2 und 3 sollte kein Wachstum stattfinden, da ein mit mBHRF1 Δ TM-interagierendes Protein fehlt. Sektor 2 zeigt ein wenig Hintergrund.

mBHRF1 Δ TM und NtPIP2.2b bzw. NtTIP1.1a in pBT3-C (Sektor 4 und 5) zeigen wie mit BHRF1 Δ TMwt die stärkste Interaktion. In pBT3-N dagegen zeigt NtPIP2.2b (Sektor 6) keinerlei Wachstum während NtTIP1.1a (Sektor 8) fast genauso stark wie in pBT3-C interagiert. Aquaporin NtPIP2.2a interagiert in pBT3-N auch bei 5 mM 3-AT mit mBHRF1 ohne Transmembrandomäne (Sektor 7). Die *Arabidopsis* aquaporine AtTIP1.1, mAtTIP1.1 und mAtPIP2.2 interagieren mit mBHRF1 Δ TM nur in pBT3-N (Sektor 13, 14 und 15). Aquaporin AtPIP2.2m wächst weder als Expression in pBT3-C noch in pBT3-N (Sektor 12 und 16).

Auch der Vergleich zwischen der Interaktion der Aquaporine mit dem mutierten Volllängen-BHRF1 (mBHRF1) und dem mutierten BHRF1, dessen Transmembrandomäne deletiert wurde (mBHRF1 Δ TM), lässt keinen deutlichen Unterschied zu. NtTIP1.1a interagiert in pBT3-C minimal stärker und in pBT3-N stärker mit mBHRF1 ohne Transmembrandomäne

(mBHRF1 Δ TM) als mit dem mutierten Volllängen-BHRF1 (mBHRF1). Die sehr schwache Interaktion von NtPIP2.2b in pBT3-N mit mBHRF1 bleibt mit dem deletierten mBHRF1 (mBHRF1 Δ TM) völlig aus. Während die Aquaporine mAtTIP1.1, mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m in pBT3-C mit mBHRF1 wenigstens bei 0 mM 3-AT eine leichte Interaktion zeigen, bleibt diese mit dem deletierten mBHRF1 (mBHRF1 Δ TM) völlig auf der Strecke. Die Interaktion von AtTIP1.1 (Sektor 13) und mAtTIP1.1 (Sektor 14) in pBT3-N findet bei einer Konzentration von 5 mM 3-AT mit mBHRF1 nicht mehr statt, wenn die Transmembrandomäne fehlt (mBHRF1 Δ TM).

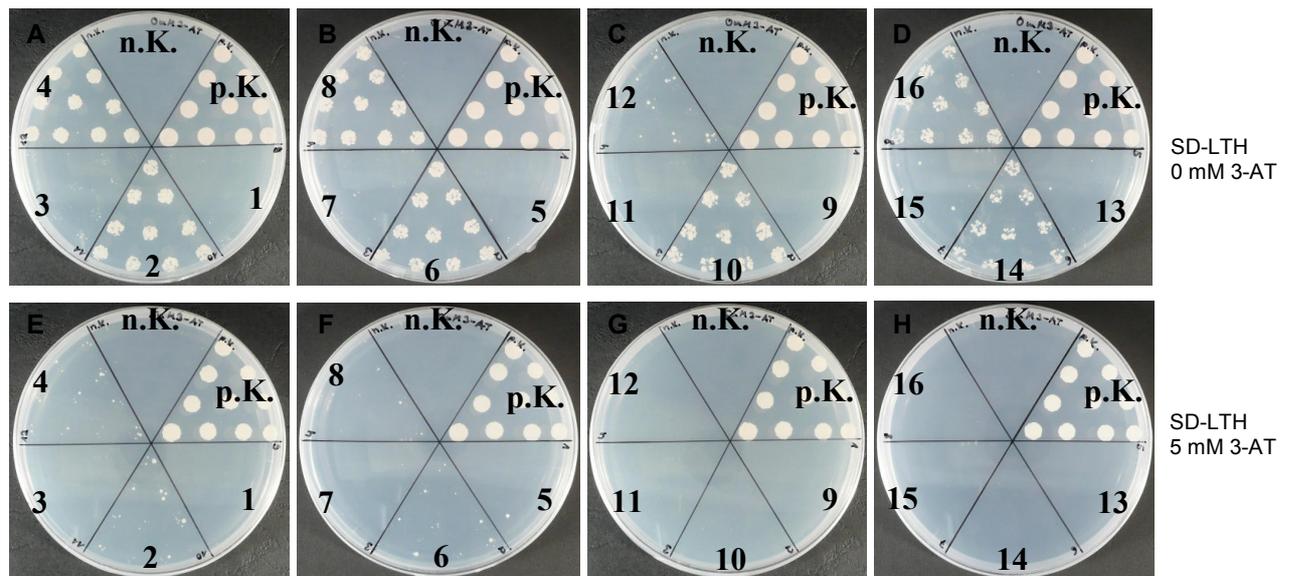
Die *Arabidopsis* aquaporine AtTIP1.1, mAtTIP1.1 (bei 5 mM 3-AT) und AtPIP2.2m (bei 0 mM 3-AT) interagieren sogar mit dem mutierten BHRF1 (mBHRF1) stärker als mit dem Wildtyp-BHRF1 (BHRF1wt). Auch die Interaktion mit Bik (Positivkontrolle) zeigt sich mit mBHRF1 und mBHRF1 Δ TM stärker als mit BHRF1wt.

Im Gegensatz zur Interaktion von NtTIP1.1a in pBT3-N mit mBHRF1 Δ TM, die auch noch bei einer Konzentration von 5 mM 3-AT stattfindet, kommt es mit BHRF1 Δ TMwt (Abb. 4.4-18) zu keiner Interaktion mehr.

Wie auch schon aus den vorangegangenen Interaktionsexperimenten deutlich wird, ist die Transmembrandomäne von BHRF1 nicht für die Interaktion notwendig. Auch der Abbruch in der α -Helix durch den Aminosäureaustausch (Ser \rightarrow Pro) in der BH2-Domäne von BHRF1 beeinflusst die Interaktion mit pflanzlichen Aquaporinen nicht allzu sehr. Dies könnte bedeuten, dass der funktionale Bereich von BHRF1 auch für die Interaktion mit Aquaporinen weiter N-terminal liegt.

4.4.4.1.5 Interaktion zwischen BHRF1 und tierischen Aquaporinen

Da es sich bei BHRF1 um ein Protein des humanen Epstein-Barr Virus handelt, war das Interesse groß, ob auch tierische Aquaporine mit diesem anti-apoptotischen Protein interagieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass tierische Aquaporine mit BHRF1 in Kontakt kommen, ist zudem wesentlich größer als für pflanzliche Aquaporine. Deshalb wurde zum einen das Aquaporin 1 (hAQP1) des Menschen als Vertreter der humanen Aquaporine und zum anderen das Aquaporin 8 der Ratte (rAQP8) als Vertreter der tierischen Aquaporine für weitere Interaktionsversuche verwendet.



n.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C (Negativkontrolle)

p.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2b (Positivkontrolle)

1 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:hAQP1

2 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:hAQP1

3 NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt::pBT3-C:hAQP1

4 NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt::pBT3-N:hAQP1

5 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:hAQP1

6 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:hAQP1

7 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM::pBT3-C:hAQP1

8 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM::pBT3-N:hAQP1

9 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:rAQP8

10 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:rAQP8

11 NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt::pBT3-C:rAQP8

12 NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt::pBT3-N:rAQP8

13 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:rAQP8

14 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:rAQP8

15 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM::pBT3-C:rAQP8

16 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM::pBT3-N:rAQP8

Abb. 4.4-21: Interaktion von BHRF1 und hAQP1 bzw. rAQP8 im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM (A bis D) und 5 mM 3-AT (E bis H)

In Sektor n.K. wurde BHRF1wt und der leere pBT3-C als Negativkontrolle verwendet. Sektor p.K. zeigt als Positivkontrolle die Interaktion von BHRF1wt und NtPIP2.2b in pBT3-C, da diese Kombination die stärkste Interaktion in den vorangegangenen Versuchen zeigte.

Offensichtlich interagiert das humane Aquaporin 1 (hAQP1) ausschließlich in pBT3-N mit allen vier BHRF1-Proteinen (Sektor 2, 4, 6, 8). Das Rattenaquaporin 8 (rAQP8) interagiert ebenfalls nur in pBT3-N mit den beiden Vollängen BHRF1-Proteinen (Sektor 10, 14) und mit mBHRF1 ohne Transmembrandomäne (mBHRF1ΔTM, Sektor 16).

Erstaunlicherweise interagieren die beiden tierischen Aquaporine wesentlich schwächer mit BHRF1 als einige der pflanzlichen Aquaporine (NtPIP2.2b in pBT3-C mit allen vier BHRF1-Proteinen; NtPIP2.2a in pBT3-N mit allen vier BHRF1-Proteinen; NtTIP1.1a in pBT3-C mit BHRF1ΔTMwt, mBHRF1 und mBHRF1ΔTM; NtTIP1.1a in pBT3-N mit mBHRF1ΔTM; AtTIP1.1 und mAtTIP1.1 in pBT3-N mit mBHRF1). Dennoch zeigt die Interaktion tierischer und pflanzlicher Aquaporine mit BHRF1, dass durchaus eine Verbindung zwischen Zelltodereignissen in Pflanzen und Tieren bestehen könnte, da sie mit den gleichen Proteinen interagieren.

4.4.4.1.6 Interaktion zwischen BHRF1 und NtPIP2.2b-Deletionen

Um den Bereich, der für die Interaktion der Aquaporine verantwortlich ist, identifizieren zu können, wurden sechs unterschiedliche Deletionen von NtPIP2.2b konstruiert.

Zur besseren Vorstellung sind die Deletionen in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt:

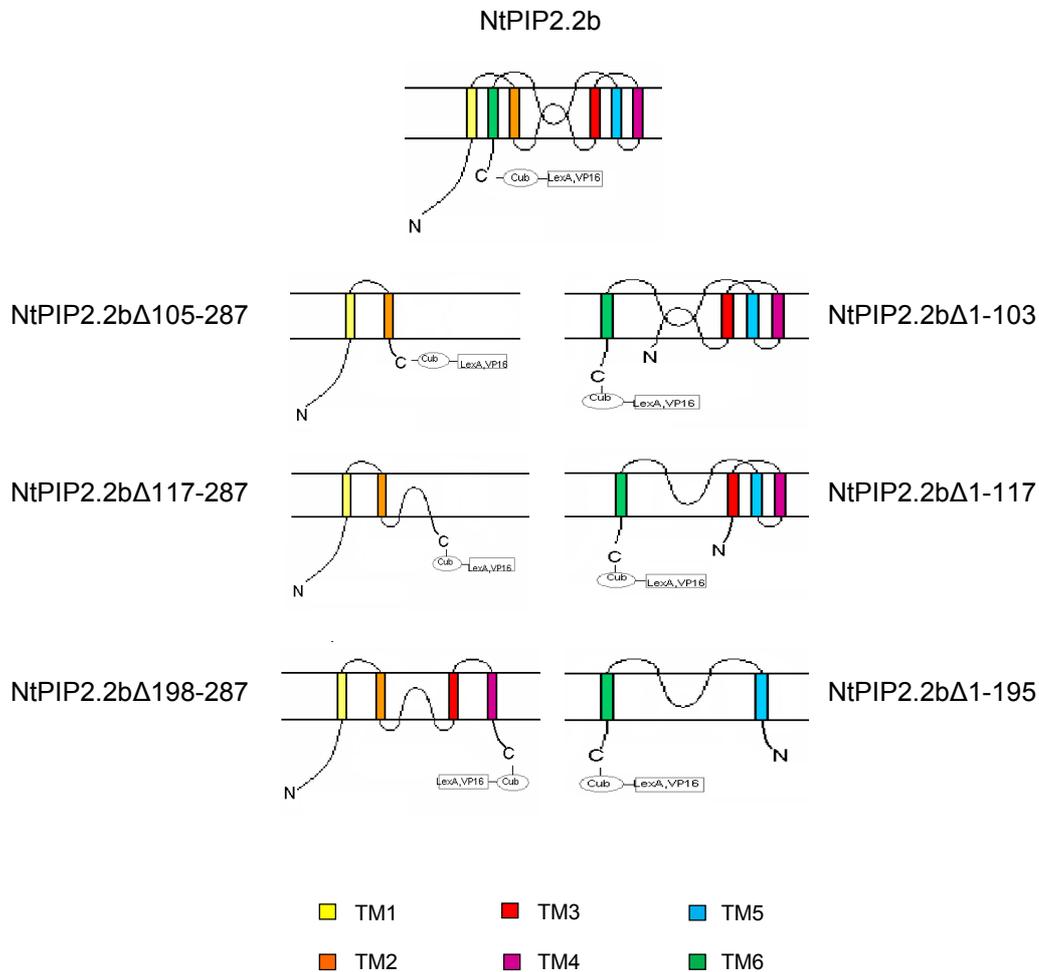
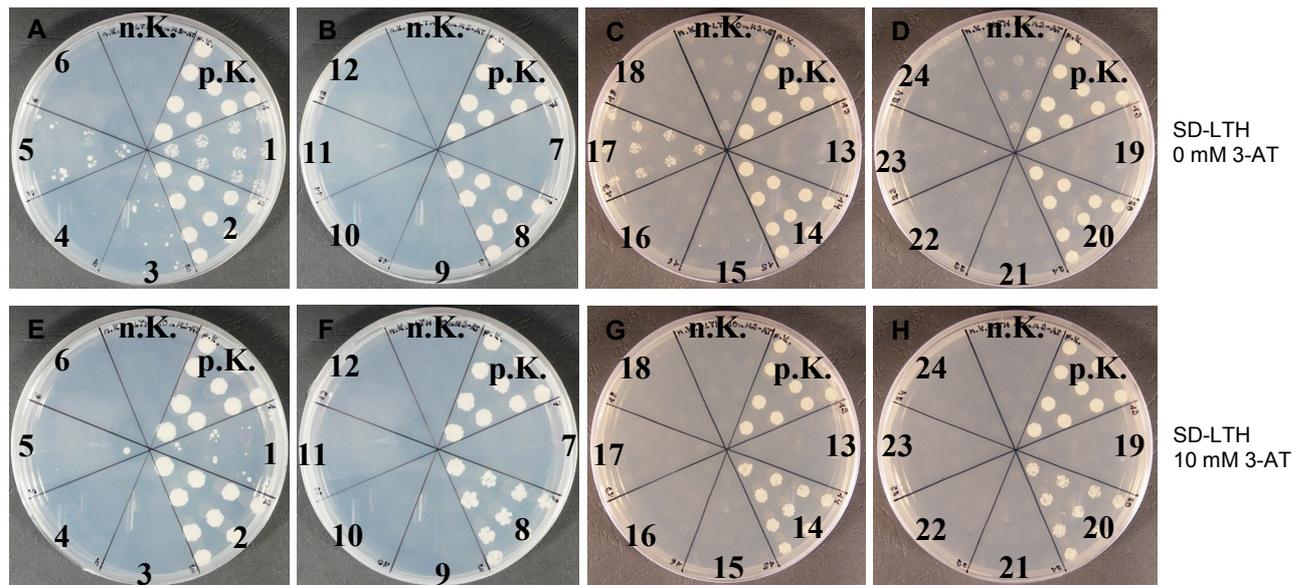


Abb. 4.4-22: Schematische Darstellung des Volllängeproteins NtPIP2.2b und dessen Deletionen

Dargestellt sind die Proteine als Expression in pBT3-C. Für die Expression in pBT3-N sind Cub, LexA und VP16 an den N-Terminus der NtPIP2.2b-Deletionen fusioniert. Die sechs Transmembrandomänen (TM1 bis TM6) sind durch Schleifen („loop“ A bis E) miteinander verbunden. In „loop“ B (zwischen TM2 und TM3) sowie in „loop“ E (zwischen TM5 und TM6) sind die beiden hochkonservierten NPA-Motive lokalisiert. Die C-terminale Deletion NtPIP2.2bΔ105-287 besteht aus den Aminosäuren AS₁-AS₁₀₄, NtPIP2.2bΔ117-287 aus AS₁-AS₁₁₆ und NtPIP2.2bΔ198-287 aus AS₁-AS₁₉₇. Die N-terminale Deletion NtPIP2.2bΔ1-103 besteht aus den Aminosäuren AS₁₀₄-AS₂₈₇, NtPIP2.2bΔ1-117 aus den AS₁₁₈-AS₂₈₇ und NtPIP2.2bΔ1-195 aus den AS₁₉₆-AS₂₈₇.

Da die Interaktion zwischen BHRF1 und dem Volllängeaquaporin NtPIP2.2b in pBT3-C ziemlich stark ist, wurden die konstruierten NtPIP2.2b-Deletionen zuerst in pBT3-C auf die Interaktion mit BHRF1 getestet.



n.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C (Negativkontrolle)
 p.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2b (Positivkontrolle)

- 1 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ105-287
- 2 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ117-287
- 3 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ198-287
- 4 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-103
- 5 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-117
- 6 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-195
- 7 NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ105-287
- 8 NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ117-287
- 9 NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ198-287
- 10 NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-103
- 11 NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-117
- 12 NMY51 + pPR3-N:BHRF1ΔTMwt::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-195

- 13 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ105-287
- 14 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ117-287
- 15 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ198-287
- 16 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-103
- 17 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-117
- 18 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-195

- 19 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ105-287
- 20 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ117-287
- 21 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ198-287
- 22 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-103
- 23 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-117
- 24 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1ΔTM::pBT3-C:NtPIP2.2bΔ1-195

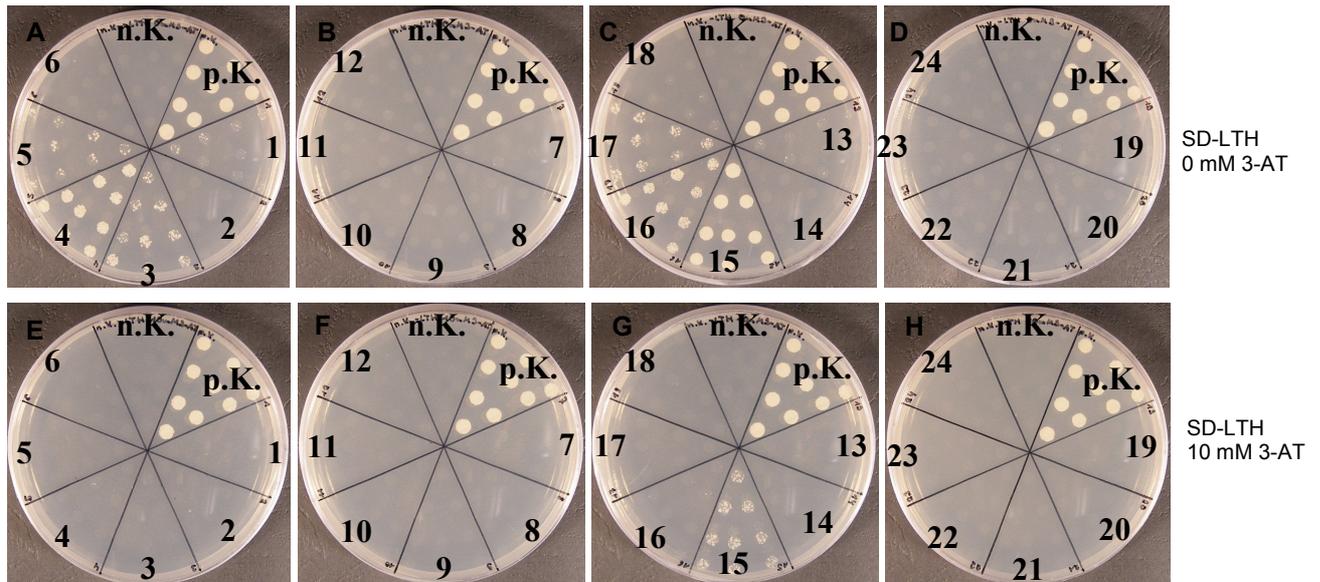
Abb. 4.4-23: Interaktion von BHRF1 und den NtPIP2.2b-Deletionen in pBT3-C im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM (A bis D) und 10 mM 3-AT (E bis H)

Als Positivkontrolle wurde die Interaktion von BHRF1wt und NtPIP2.2b in pBT3-C verwendet (Sektor p.K.). BHRF1wt und der leere pBT3-C dienten als Negativkontrolle (Sektor n.K.). Die Deletion NtPIP2.2bΔ117-287 in pBT3-C interagiert mit allen vier BHRF1-Proteinen (Sektor 2, 8, 14 und 20) auch noch bei einer Konzentration von 10 mM 3-AT. Fehlt dem deletierten Aquaporin das 1. konservierte NPA-Motiv (NtPIP2.2bΔ105-287 in pBT3-C) findet eine schwache Interaktion nur noch mit dem Wildtyp-BHRF1 (BHRF1wt, Sektor 1) statt. Ebenfalls eine schwache Interaktion ist zwischen der Deletion NtPIP2.2bΔ1-117 in pBT3-C und dem mutierten Vollängen-BHRF1 (mBHRF1, Sektor 17) bzw. sehr schwach mit BHRF1wt (Sektor 5) zu beobachten.

Die Tatsache, dass ausschließlich die C-terminale Deletion NtPIP2.2bΔ117-287 in pBT3-C mit allen vier BHRF1-Proteinen auch noch bei einer Konzentration von 10 mM 3-AT interagiert, lässt daraus schließen, dass der Interaktionsbereich von Aquaporinen am N-Terminus lokalisiert ist. Bei den für die Interaktion mit BHRF1 verantwortlichen Domänen

handelt es sich vor allem um „loop“ B, welches das hochkonservierte NPA-Motiv beinhaltet. Aber auch die 1. und 2. Transmembrandomäne (TM1, TM2) oder die übriggebliebenen Reste von „loop“ B tragen vermutlich ihren Teil dazu bei (Interaktion von NtPIP2.2b Δ 105-287 in pBT3-C mit BHRF1wt (Sektor 1) bzw. NtPIP2.2b Δ 1-117 mit mBHRF1 (Sektor 17)).

Auch die Interaktion zwischen den NtPIP2.2b-Deletionen in pBT3-N und den vier BHRF1-Proteinen wurde getestet.



n.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C (Negativkontrolle)
p.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2b (Positivkontrolle)

- 1 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 105-287
- 2 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 117-287
- 3 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 198-287
- 4 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-103
- 5 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-117
- 6 NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-195
- 7 NMY51 + pPR3-N:BHRF1 Δ TMwt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 105-287
- 8 NMY51 + pPR3-N:BHRF1 Δ TMwt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 117-287
- 9 NMY51 + pPR3-N:BHRF1 Δ TMwt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 198-287
- 10 NMY51 + pPR3-N:BHRF1 Δ TMwt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-103
- 11 NMY51 + pPR3-N:BHRF1 Δ TMwt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-117
- 12 NMY51 + pPR3-N:BHRF1 Δ TMwt::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-195

- 13 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 105-287
- 14 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 117-287
- 15 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 198-287
- 16 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-103
- 17 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-117
- 18 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-195

- 19 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 105-287
- 20 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 117-287
- 21 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 198-287
- 22 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-103
- 23 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-117
- 24 NMY51 + pPR3-N:mBHRF1 Δ TM::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-195

Abb. 4.4-24: Interaktion von BHRF1 und den NtPIP2.2b-Deletionen in pBT3-N im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM (A bis D) und 10 mM 3-AT (E bis H)

Auch hier diente die Interaktion zwischen BHRF1wt und NtPIP2.2b in pBT3-C als Positivkontrolle (Sektor p.K.). BHRF1wt und pBT3-C wurden als Negativkontrolle verwendet (Sektor n.K.). Befinden sich die NtPIP2.2b-Deletionen in pBT3-N interagieren NtPIP2.2b Δ 198-287 und NtPIP2.2b Δ 1-103 mit den beiden Vollängen-BHRF1 (BHRF1wt, Sektor 3 und 4 bzw. mBHRF1, Sektor 15 und 16). Fehlt allerdings die

Transmembrandomäne von BHRF1 (BHRF1 Δ TMwt, Sektor 9 und 10 bzw. mBHRF1 Δ TM, Sektor 21 und 22) kommt es zu keinerlei Interaktionen zwischen diesen beiden NtPIP2.2b-Deletionen und BHRF1 Δ TM. Zwischen der Deletion NtPIP2.2b Δ 1-117 und BHRF1wt (Sektor 5) bzw. mBHRF1 (Sektor 17) kommt es zu einer sehr schwachen Interaktion.

Die Tatsache, dass einige Deletionen in pBT3-C mit BHRF1 interagieren, aber in pBT3-N nicht mehr und umgekehrt, deutet darauf hin, dass es offensichtlich einen Unterschied macht, ob der Transkriptionsfaktor und die Ubiquitinhälfte am C- (pBT3-C) oder N-Terminus (pBT3-N) der Aquaporine fusioniert ist. Dies wird auch durch die Ergebnisse der Interaktion der Volllängeaquaporine mit BHRF1 deutlich. Vermutlich blockiert der Transkriptionsfaktor bzw. die Ubiquitinhälfte den Zugang zum Interaktionsbereich bei einigen Deletionen. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Proteine der NtPIP2.2b-Deletionen nach der Expression richtig falten bzw. wie das Volllängeaquaporin NtPIP2.2b. Allerdings ist zu bemerken, dass alle NtPIP2.2b-Deletionen, die mit BHRF1 interagieren, entweder „loop“ B mit dem 1. NPA-Motiv (NtPIP2.2b Δ 117-287, NtPIP2.2b Δ 198-287, NtPIP2.2b Δ 1-103) oder noch einen Rest dieses „loops“ (NtPIP2.2b Δ 105-287, NtPIP2.2b Δ 1-117) bzw. die 3. Transmembrandomäne (TM3; NtPIP2.2b Δ 117-287, NtPIP2.2b Δ 198-287, NtPIP2.2b Δ 1-103, NtPIP2.2b Δ 1-117) besitzen. Dagegen wird das 2. NPA-Motiv innerhalb von „loop“ E nicht für die Interaktion benötigt (NtPIP2.2b Δ 1-195).

4.4.4.1.7 Interaktion zwischen BHRF1 und NtTIP1.1a-Deletionen

Zur Überprüfung ob die Interaktionsbereiche bei PIP und TIP ähnlich sind, wurden zwei Deletionen von NtTIP1.1a hergestellt. Zur besseren Vorstellung sind die Deletionen schematisch dargestellt:

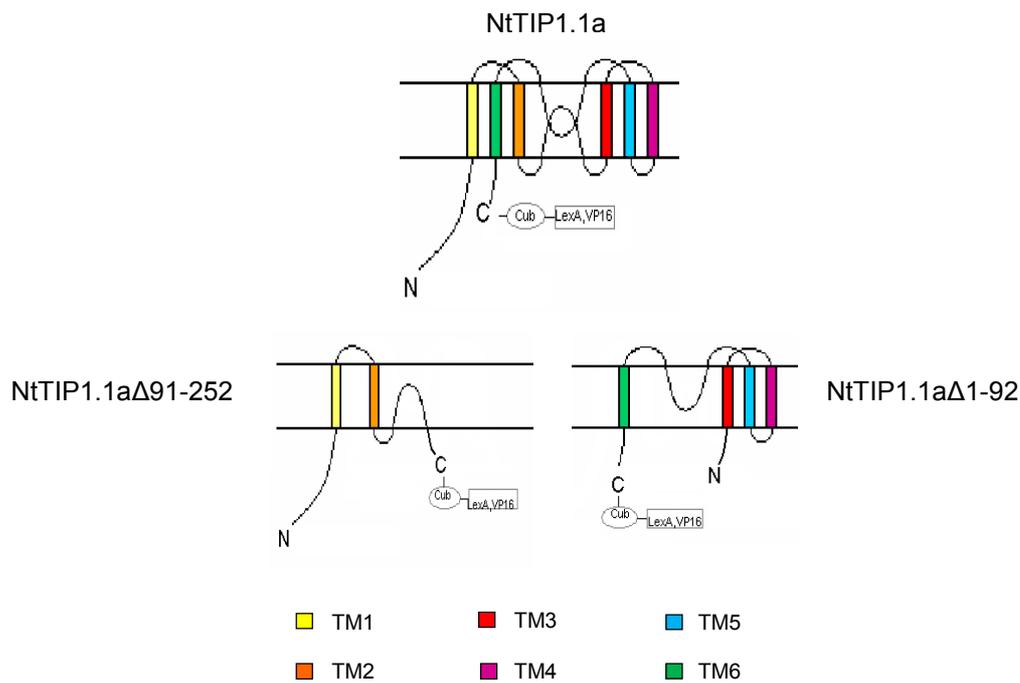
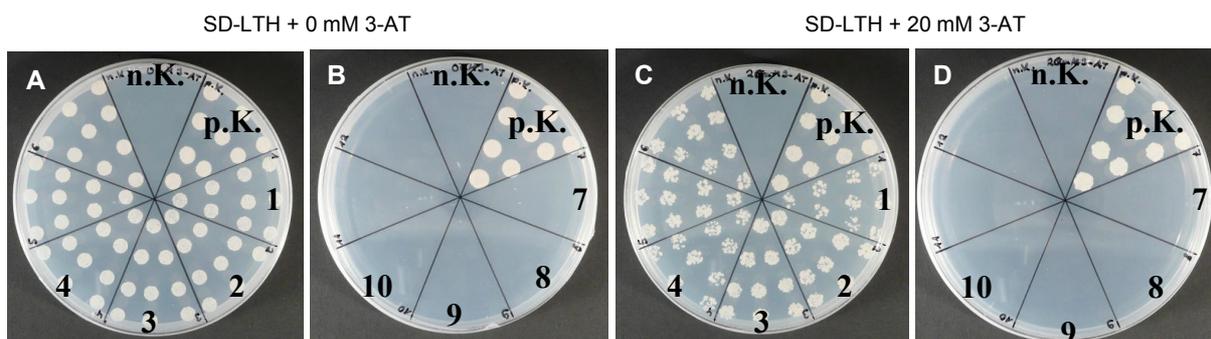


Abb. 4.4-25: Schematische Darstellung des Volllänge-Proteins NtTIP1.1a und dessen Deletionen

Dargestellt sind die Proteine als Expression in pBT3-C. Für die Expression in pBT3-N sind Cub, LexA und VP16 an den N-Terminus der NtTIP1.1a-Deletionen fusioniert. Die sechs Transmembrandomänen (TM1 bis TM6) sind durch Schleifen („loop“ A bis E) miteinander verbunden. In „loop“ B (zwischen TM2 und TM3) sowie in „loop“ E (zwischen TM5 und TM6) sind die beiden hochkonservierten NPA-Motive lokalisiert. Die C-terminale Deletion NtTIP1.1aΔ91-252 besteht aus den Aminosäuren AS₁-AS₉₀. Die N-terminale Deletion NtTIP1.1aΔ1-92 besteht aus den AS₉₃-AS₂₅₂.



n.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C (Negativkontrolle)
p.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtTIP2.2b (Positivkontrolle)

1 NMY51 + pBT3-C:NtTIP1.1aΔ91-252::pPR3-N:BHRF1wt
2 NMY51 + pBT3-C:NtTIP1.1aΔ91-252::pPR3-N:BHRF1ΔTMwt
3 NMY51 + pBT3-C:NtTIP1.1aΔ91-252::pPR3-N:mBHRF1
4 NMY51 + pBT3-C:NtTIP1.1aΔ91-252::pPR3-N:mBHRF1ΔTM

7 NMY51 + pBT3-N:NtTIP1.1aΔ91-252::pPR3-N:BHRF1wt
8 NMY51 + pBT3-N:NtTIP1.1aΔ91-252::pPR3-N:BHRF1ΔTMwt
9 NMY51 + pBT3-N:NtTIP1.1aΔ91-252::pPR3-N:mBHRF1
10 NMY51 + pBT3-N:NtTIP1.1aΔ91-252::pPR3-N:mBHRF1ΔTM

Abb. 4.4-26: Interaktion von BHRF1 und der Deletion NtTIP1.1aΔ91-252 im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM (A und B) und 20 mM 3-AT (C und D)

Die Interaktion von BHRF1wt mit NtPIP2.2b in pBT3-C wurde als Positivkontrolle verwendet (Sektor p.K.). BHRF1wt und pBT3-C dienten als Negativkontrolle (Sektor n.K.). Die Deletion NtTIP1.1a Δ 91-252 (N-terminaler Teil von NtTIP1.1a) interagiert nur in pBT3-C mit allen vier BHRF1-Proteinen (Sektor 1-4). In pBT3-N (Sektor 7-10) erfolgt keine Interaktion. Das bedeutet, es kann nur zu einer Interaktion mit BHRF1 kommen, wenn der Transkriptionsfaktor und die Ubiquitinhälfte am C-Terminus der NtTIP1.1a-Deletionen (NtTIP1.1a Δ 91-252 in pBT3-C) fusioniert sind.

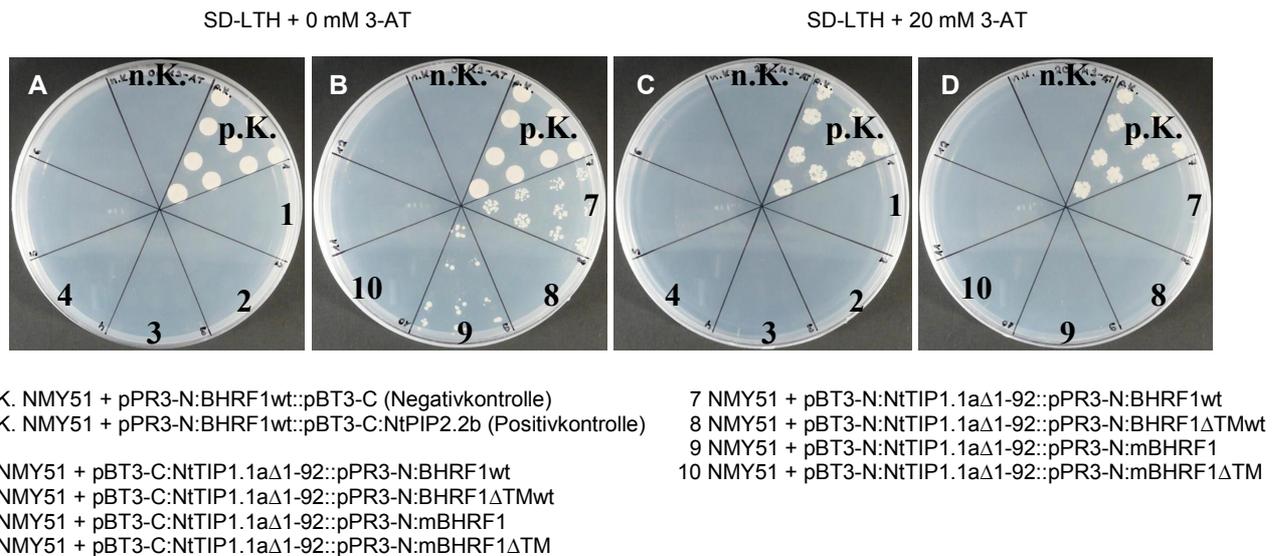


Abb. 4.4-27: Interaktion von BHRF1 und der Deletion NtTIP1.1a Δ 1-92 im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM (A und B) und 20 mM 3-AT (C und D)

Auch hier diene BHRF1wt und NtPIP2.2b in pBT3-C als Positivkontrolle (Sektor p.K.) und BHRF1wt und pBT3-C als Negativkontrolle (Sektor n.K.). Die Deletion NtTIP1.1a Δ 1-92 interagiert nur in pBT3-N sehr schwach mit BHRF1wt (Sektor 7) und mBHRF1 (Sektor 9). Ansonsten findet keinerlei Interaktion statt.

Auch beim TIP liegt der Interaktionsbereich am N-Terminus und besteht hauptsächlich aus „loop“ B, der das 1. NPA-Motiv enthält. Die Tatsache, dass die Deletion NtTIP1.1a Δ 1-92 in pBT3-N ebenfalls mit den beiden Vollängen-BHRF1 interagiert, deutet auf eine Beteiligung von „loop“ B bzw. der 3. Transmembrandomäne (TM3) bei der Interaktion mit BHRF1 hin. Folglich befinden sich die für die Interaktion von Aquaporinen benötigten Bereiche am N-Terminus der Proteine. Dabei ist vor allem „loop“ B mit dem hochkonservierten 1. NPA-Motiv, das nahezu alle bekannten Aquaporine teilen, von Bedeutung. Ein mögliches Mitwirken der 1., 2. und 3. Transmembrandomäne (TM1, TM2, TM3) ist nicht völlig auszuschließen.

Interaktionsstudien im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*- und *ADE2*-Reportergens wurden ebenfalls durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen den Erwartungen. Die Interaktionen waren etwas schwächer, da auf zwei Reportergene selektiert wurde.

4.4.4.2 Quantitativer Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *lacZ*-Reportergens

4.4.4.2.1 Interaktion zwischen BHRF1 und Aquaporine

Um die vorherigen Interaktionstests (4.4.4.1) quantitativ erfassen zu können, wurden folgende Interaktionen im Flüssigttest durchgeführt.

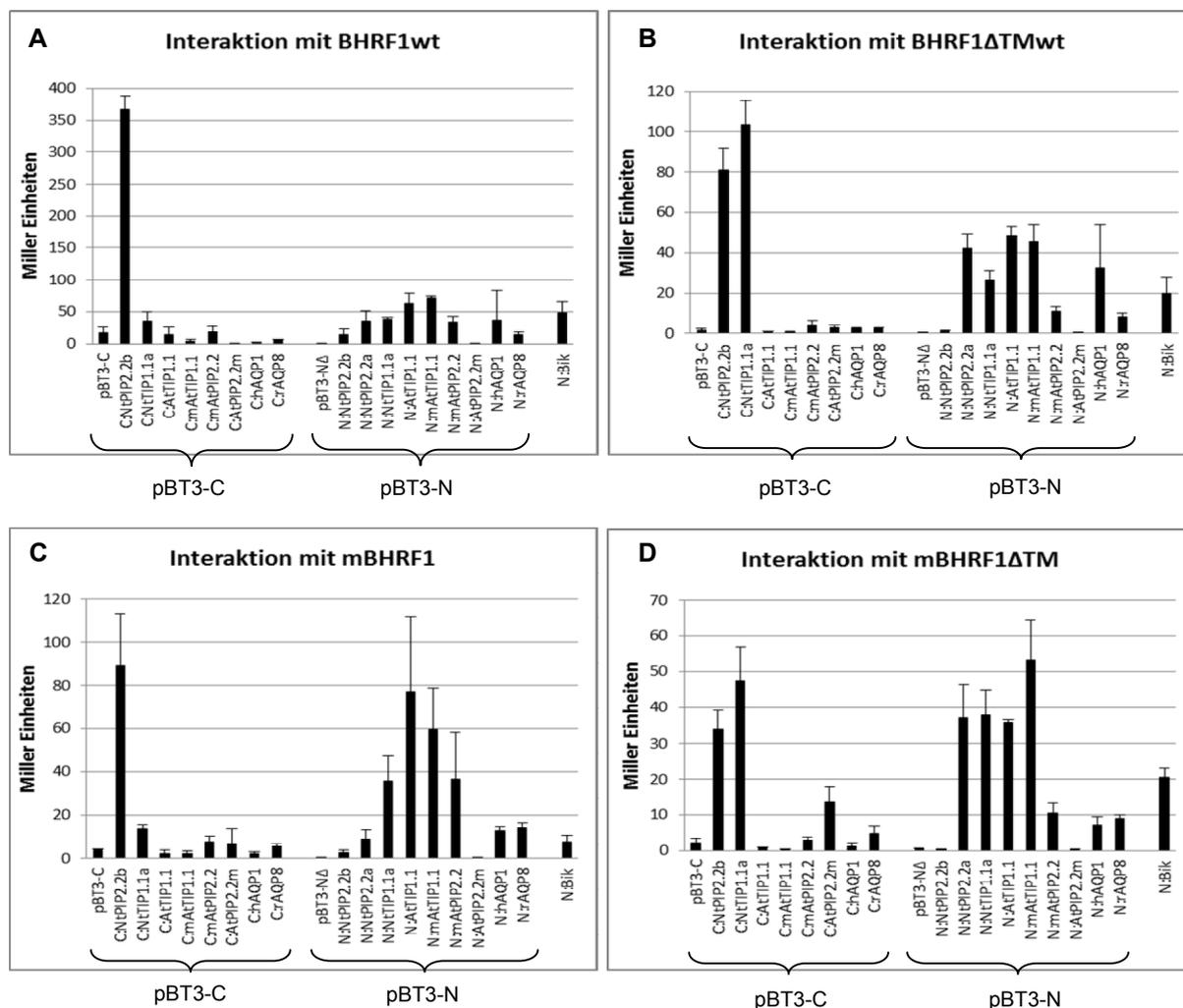


Abb. 4.4-28: Darstellung der Interaktionsstärke von BHRF1 mit den verschiedenen Aquaporinen

Die Interaktion von BHRF1wt und Bik in pBT3-N (letzter Balken) dient als positive Kontrolle. Die leeren Vektoren pBT3-C bzw. pBT3-NΔ in Kombination mit BHRF1 in pPR3-N dienen als Negativkontrolle. Das „C“ bzw. „N“ vor einem Aquaporin bedeutet, dass es sich in pBT3-C bzw. pBT3-N befindet.

Das Tabakaquaporin NtPIP2.2b interagiert in pBT3-C mit allen vier BHRF1-Proteinen ziemlich stark, wobei sich die stärkste Interaktion zwischen NtPIP2.2b in pBT3-C und

BHRF1wt abspielt. In pBT3-N interagiert NtPIP2.2b allerdings kaum noch mit einem der vier BHRF1-Proteine. Obwohl sich die beiden Tabakaquaporine NtPIP2.2b und NtPIP2.2a in nur einer Aminosäure an Position 35 unterscheiden (NtPIP2.2b → Alanin, NtPIP2.2a → Threonin), interagiert letzteres in pBT3-N mit BHRF1. Bedauerlicherweise ist es nicht gelungen NtPIP2.2a in pBT3-C zu klonieren, deshalb kann keine Aussage darüber gemacht werden wie sich dieses Aquaporin in pBT3-C verhalten würde. NtTIP1.1a interagiert in beiden Vektoren (pBT3-C und pBT3-N) mit allen vier BHRF1-Proteinen. Die schwächste davon kommt allerdings mit mBHRF1 zustande (NtTIP1.1a in pBT3-C). Offensichtlich interagieren die *Arabidopsis* aquaporine AtTIP1.1, mAtTIP1.1, mAtPIP2.2, das humane Aquaporin 1 und das Rattenaquaporin 8 in pBT3-N stärker mit den vier BHRF1-Proteinen als in pBT3-C. Allerdings interagiert AtPIP2.2m in pBT3-N so gut wie gar nicht mit BHRF1. Dafür kommt es aber zu einer leichten Interaktion zwischen Aquaporin AtPIP2.2m in pBT3-C und den beiden mutierten BHRF1-Proteinen (mBHRF1 und mBHRF1 Δ TM).

4.4.4.2 Interaktion zwischen Bcl-X_L und Aquaporine

Bcl-X_L ist ebenfalls ein anti-apoptotisches Protein der Bcl-2 Familie. Die Aminosäuresequenzen von BHRF1 und Bcl-X_L sind nur zu 16,7 % identisch, trotzdem ist die Interaktion mit den Aquaporinen ähnlich.

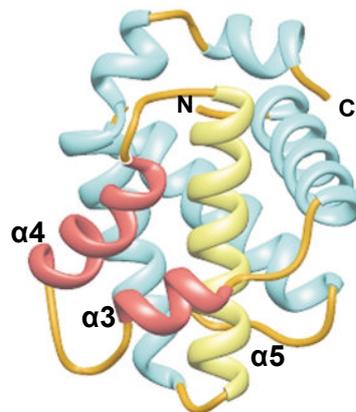


Abb. 4.4-29: Struktur von Bcl-X_L (aus Journal of Molecular Biology, „Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr Virus, a homolog of human Bcl-2“, Huang et al., 2003)

Die zentrale, hydrophobe α 5-Helix ist gelb markiert. Die beiden Helices α 3 und α 4 (rot) bilden einen Teil der BH3-Peptidbindungsstelle. N- und C-Terminus sind mit „N“ bzw. „C“ gekennzeichnet. Die Transmembrandomäne am C-Terminus von Bcl-X_L ist nicht abgebildet.

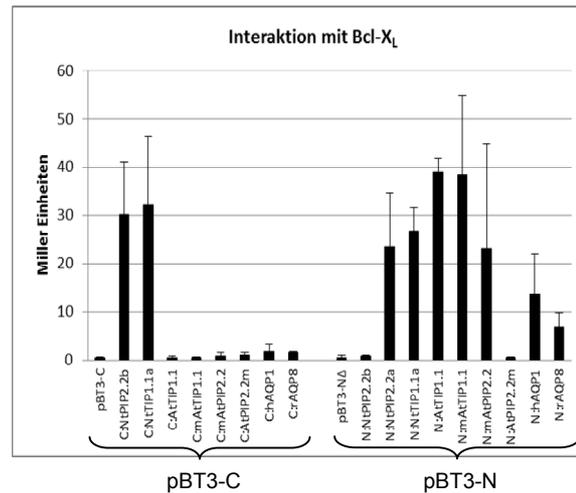


Abb. 4.4-30: Darstellung der Interaktionsstärke von Bcl-X_L mit den verschiedenen Aquaporinen

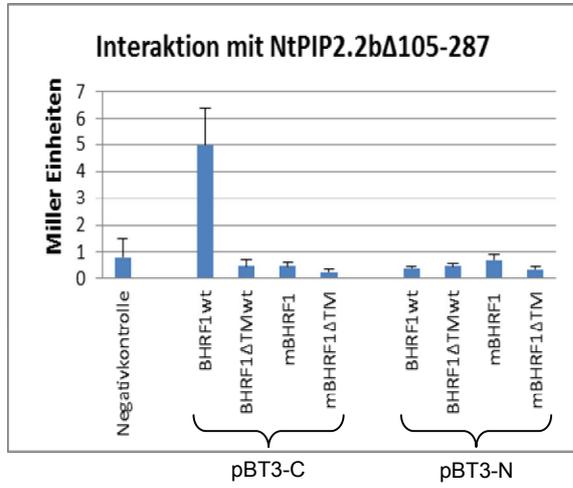
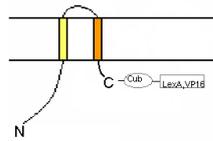
Das „C“ bzw. „N“ vor einem Aquaporin bedeutet, dass es sich in pBT3-C bzw. pBT3-N befindet. Die leeren Vektoren pBT3-C bzw. pBT3-NΔ in Kombination mit Bcl-X_L in pPR3-N dienen als Negativkontrolle.

Auch bei der Interaktion mit Bcl-X_L interagiert NtPIP2.2b nur in pBT3-C mit diesem Protein. NtPIP2.2a in pBT3-N interagiert dagegen auch mit Bcl-X_L. Für die Interaktion mit NtTIP1.1a spielt es keine Rolle in welchem Vektor das Aquaporin exprimiert wird, denn es interagiert in beiden Vektoren mit Bcl-X_L. Die *Arabidopsis* aquaporine AtTIP1.1, mAtTIP1.1 und mAtPIP2.2 und die tierischen Aquaporine (hAQP1 und rAQP8) interagieren mit Bcl-X_L ausschließlich in pBT3-N. Wie auch schon mit BHRF1wt und BHRF1ΔTMwt zeigt AtPIP2.2m weder in pBT3-C noch in pBT3-N mit Bcl-X_L eine Interaktion.

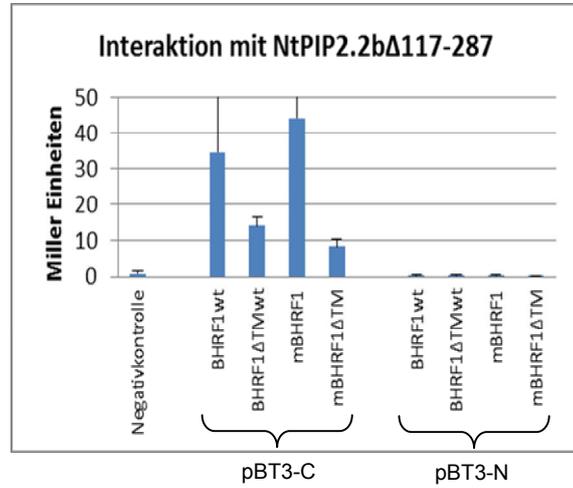
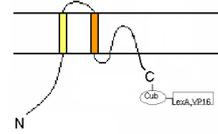
4.4.4.2.3 Interaktion zwischen BHRF1 und NtPIP2.2b-Deletionen

Für die Charakterisierung der Interaktionsdomäne von Aquaporinen wurden sechs unterschiedliche Deletionen des Aquaporins NtPIP2.2b verwendet. Aufgrund der Interaktionsfähigkeit der einzelnen Deletionen mit den vier BHRF1-Proteinen (BHRF1wt, mBHRF1, BHRF1ΔTMwt und mBHRF1ΔTM) sollte die Bindungsdomäne von Aquaporinen lokalisiert und die Interaktionsstärke quantitativ erfasst werden.

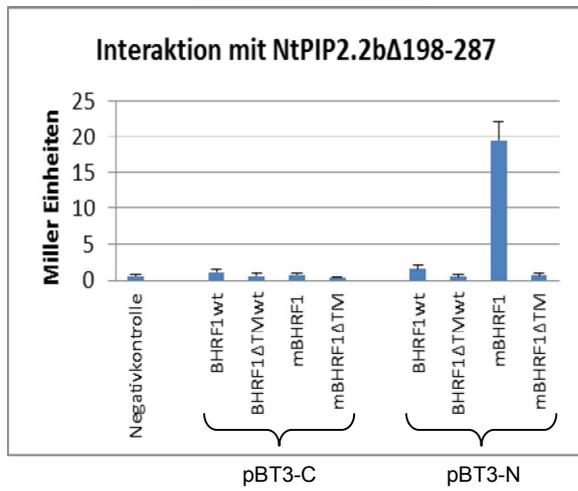
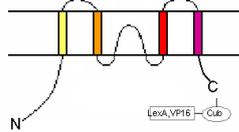
A



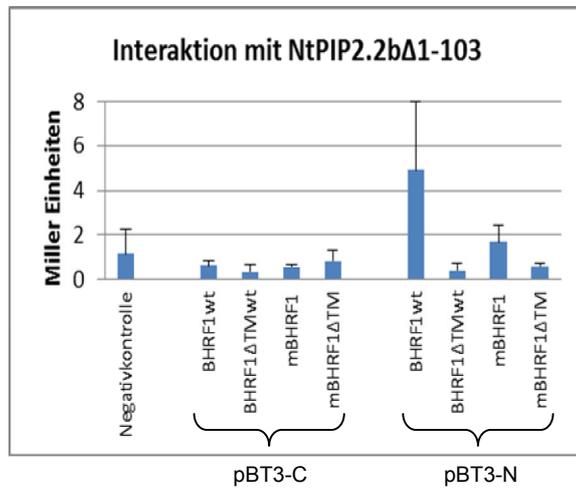
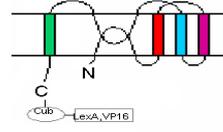
B



C



D



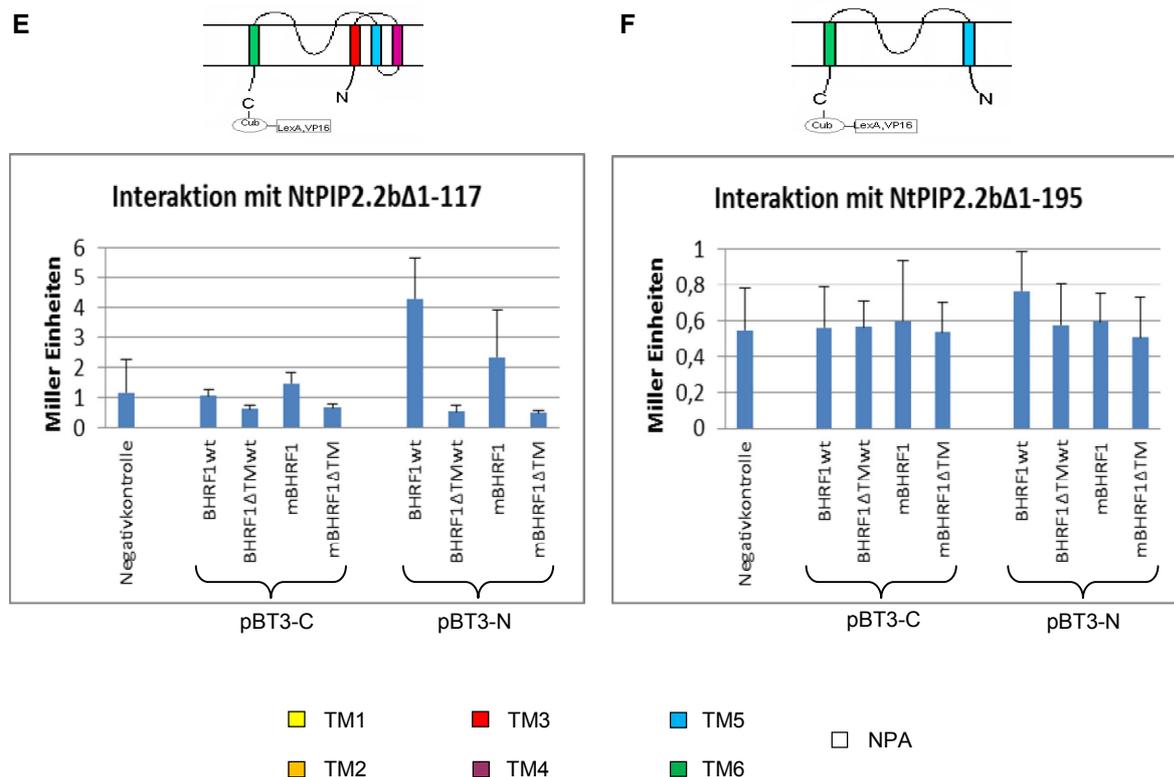


Abb. 4.4-31: Darstellung der Interaktionsstärke von BHRF1 mit den NtPIP2.2b-Deletionen

Als Positivkontrolle wurde die Interaktion von BHRF1wt mit NtPIP2.2b in pBT3-C verwendet. Beim Erstellen der Diagramme wurde sie aber aufgrund der sehr hohen Werte (200 bis 300 Miller Einheiten) weggelassen. Als Negativkontrolle diente BHRF1wt und pBT3-NΔ.

Die Deletion NtPIP2.2bΔ117-287 interagiert in pBT3-C als einziges mit allen vier BHRF1-Proteinen (B), wobei jene mit den Vollängen-BHRF1 (BHRF1wt und mBHRF1) viel stärker ist als mit den deletierten BHRF1-Proteinen. Fehlt jedoch „loop“ B mit dem 1. NPA-Motiv an der Deletion (NtPIP2.2bΔ105-287) kommt es nur noch zur Interaktion mit BHRF1wt (A). In pBT3-N interagieren die Deletionen NtPIP2.2bΔ1-103 (D) und NtPIP2.2bΔ1-117 (E) mit dem Wildtyp-BHRF1 (BHRF1wt). NtPIP2.2bΔ198-287 in pBT3-N (C) interagiert mit dem mutierten Vollängen-BHRF1 (mBHRF1). Zwischen BHRF1 und dem C-Terminus von NtPIP2.2b (NtPIP2.2bΔ1-195, F) findet keinerlei Interaktion statt.

Aus diesen sechs Diagrammen und den qualitativen Interaktionstests auf Platten (4.4.4.1) geht hervor, dass der Interaktionsbereich von NtPIP2.2b am N-Terminus liegt, wobei „loop“ B mit dem 1. NPA-Motiv eine bedeutende Rolle spielt. Fehlt allerdings das hochkonservierte 1. NPA-Motiv interagiert die Deletion NtPIP2.2bΔ105-287 nur noch schwach mit BHRF1wt. Das 2. NPA-Motiv scheint allerdings keine wesentliche Rolle bei der Interaktion mit BHRF1 zu spielen. Dies wird durch die Interaktion von BHRF1 mit der Deletion NtPIP2.2bΔ1-195 deutlich.

4.4.4.2.4 Interaktion zwischen BHRF1 und NtTIP1.1a-Deletionen

Zur Überprüfung ob sich der Interaktionsbereich von TIPs ebenfalls am N-Terminus befindet, wurde die Interaktion der NtTIP1.1a-Deletionen mit BHRF1 getestet.

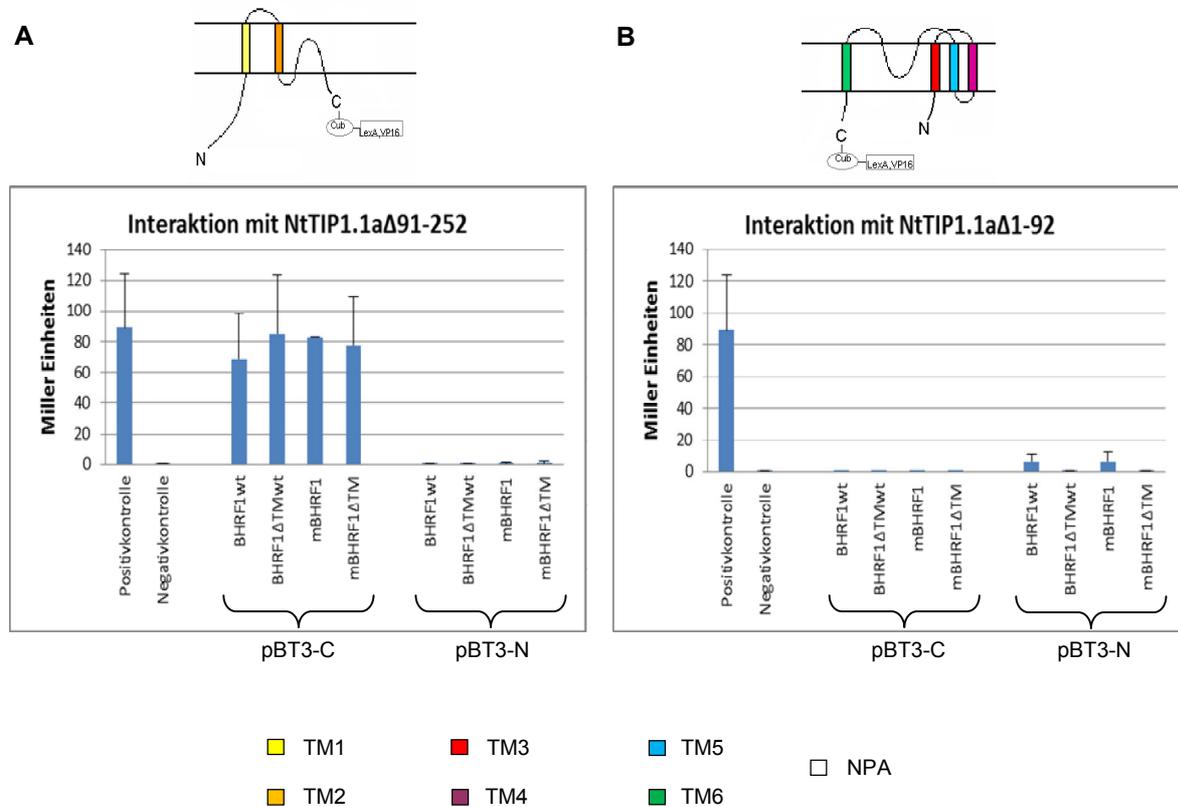


Abb. 4.4-32: Darstellung der Interaktionsstärke von BHRF1 mit den NtTIP1.1a-Deletionen

Als Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle wurde BHRF1wt und pBT3-N:Bik bzw. BHRF1wt und pBT3-C verwendet.

Der N-Terminus von NtTIP1.1a (NtTIP1.1aΔ91-252, A) interagiert nur in pBT3-C mit allen vier BHRF1-Proteinen. Eine relativ schwache Interaktion kann zwischen der Deletion NtTIP1.1aΔ1-92 in pBT3-N (B) und den beiden Vollängen-BHRF1 (BHRF1wt und mBHRF1) beobachtet werden. Offenbar reicht auch bei den TIPs „loop“ B mit dem 1. NPA-Motiv und eventuell die Transmembrandomänen 1 und 2 bzw. 3 für die Interaktion mit BHRF1 aus.

Die Domäne für die Interaktion der Aquaporine mit BHRF1 ist für PIPs und TIPs am N-Terminus lokalisiert. Hierbei ist vor allem „loop“ B, der TM2 und TM3 miteinander verbindet und das hochkonservierte 1. NPA-Motiv beinhaltet von zentraler Bedeutung.

4.4.4.2.5 Interaktion zwischen BHRF1-Deletionen und Aquaporine

BHRF1 besitzt vier Bcl-2 Homologie Domänen, die sogenannten BH-Domänen (BH1, BH2, BH3 und BH4; Adams und Cory, 1998) sowie eine Transmembrandomäne am C-Terminus. Seine ziemlich kompakte Struktur ähnelt denen anderer Bcl-2 Proteine.

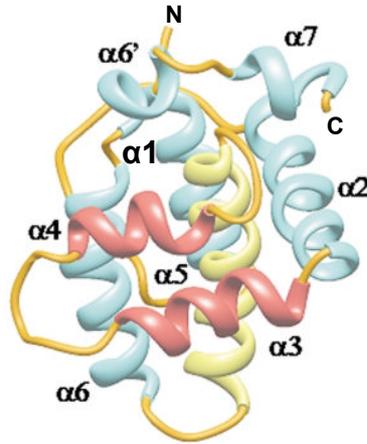


Abb. 4.4-33: Proteinstruktur von BHRF1 (aus Journal of Molecular Biology, „Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr Virus, a homolog of human Bcl-2“, Huang et al., 2003)

Die zentrale hydrophobe $\alpha 5$ -Helix ist gelb markiert. Die Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ sind rot gekennzeichnet. N- und C-Terminus sind mit „N“ bzw. „C“ gekennzeichnet. Die Helices $\alpha 1$ bzw. $\alpha 2$ entsprechen ungefähr der BH4- bzw. BH3-Domäne. Die BH1-Domäne befindet sich in der Schleife zwischen den Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ und der ersten Hälfte von $\alpha 5$. Am Ende von Helix $\alpha 7$ ist die BH2-Domäne lokalisiert. Die Transmembrandomäne am C-Terminus von BHRF1 ist nicht abgebildet.

Um herauszufinden welche dieser BH-Domänen von BHRF1 für die Interaktion mit den Aquaporinen verantwortlich ist, wurde der quantitative *lacZ*-Flüssigkeitest (3.2.9) zusätzlich mit verschiedenen Deletionen des BHRF1-Proteins (Beltz, 2011) durchgeführt.

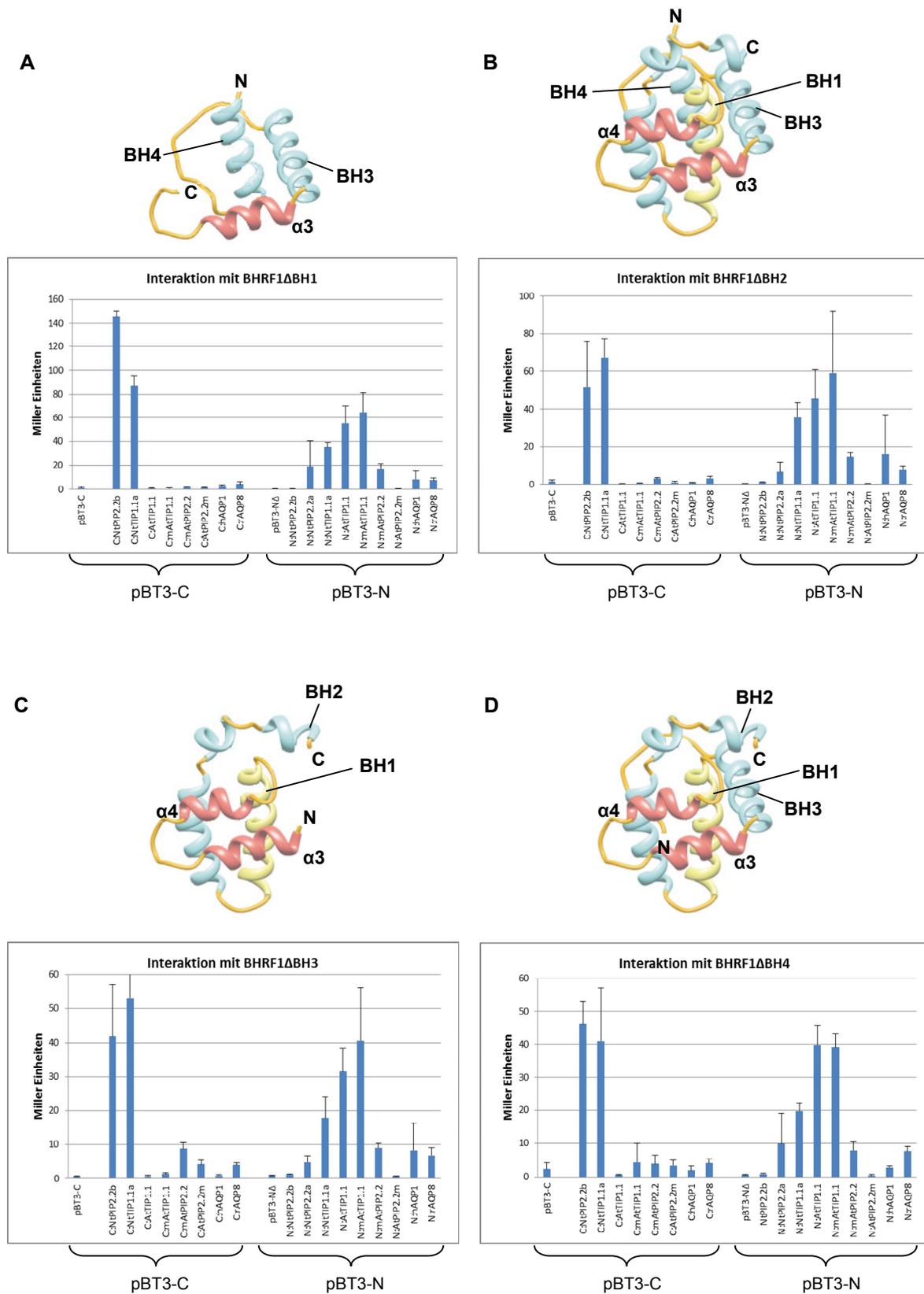


Abb. 4.4-34: Darstellung der Interaktionsstärke der BHRF1-Deletionen mit den verschiedenen Aquaporinen

Das „C“ bzw. „N“ vor einem Aquaporin bedeutet, dass es sich in pBT3-C bzw. pBT3-N befindet. N- und C-Termini sind mit „N“ bzw. „C“ beschriftet. Die zentrale hydrophobe Domäne (BH1) ist gelb markiert. Die Helices $\alpha3$ und $\alpha4$ sind rot gekennzeichnet und bilden einen Teil der BH3-Peptidbindungsstelle (Huang et al., 2003).

Werden die Tabakaquaporine NtPIP2.2b, NtTIP1.1a in pBT3-C exprimiert, ist die Interaktion mit den BHRF1-Deletionen stärker als bei einer Expression dieser Aquaporine in pBT3-N. NtPIP2.2a interagiert relativ schwach in pBT3-N mit den BHRF1-Deletionen. Die *Arabidopsis* aquaporine AtTIP1.1, mAtTIP1.1, mAtPIP2.2 sowie hAQP1 und rAQP8 dagegen interagieren in pBT3-N wesentlich stärker mit den BHRF1-Deletionen als in pBT3-C. AtPIP2.2m interagiert in pBT3-N überhaupt nicht, dagegen aber in pBT3-C ganz schwach mit BHRF1 Δ BH3 und BHRF1 Δ BH4.

Offensichtlich benötigen Aquaporine keine der vier BH-Domänen von BHRF1 um mit diesem anti-apoptotischen Protein interagieren zu können. Der tatsächliche Bindungsbereich besteht vermutlich aus α 3, da diese Helix in allen vier Mutanten vorhanden ist. Sie ist zwischen der BH3- und BH1-Domäne lokalisiert. α 3 und α 4 stellen in anderen Bcl-2 Proteinen die hydrophobe Spalte dar, welche mit der BH3-Domäne von pro-apoptotischen Proteinen interagiert (Hinds et al., 2003; Huang et al., 2003; Denisov et al., 2003). BHRF1 besitzt keine solche hydrophobe Spalte, da α 3 und α 4 parallel zueinander verlaufen (Huang et al., 2003). Dennoch könnte die α 3-Helix für die Interaktion verantwortlich sein.

4.5 Durchmusterung einer *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bank im Vektor pDSL-Nx

Da BHRF1 ein Protein des humanen Epstein-Barr Virus ist und normalerweise nicht in Pflanzen vorkommt, muss es pflanzliche Interaktionspartner geben, die dem BHRF1 funktionell ähnlich sind. Deshalb war das Interesse groß auch pflanzliche Interaktionspartner der Aquaporine zu identifizieren. Für die Isolierung möglicher Interaktionspartner von Aquaporinen aus Pflanzen wurde eine *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bank (*Arabidopsis thaliana* NubG-x cDNA library, P02210 Dualsystems Biotech AG, Zürich) bezogen. Diese cDNA-Bank befindet sich zwischen zwei SfiI-Schnittstellen in pDSL-Nx (2.3.9) und ist an NubG C-terminal fusioniert.

Für die Durchmusterung der cDNA-Bank aus *Arabidopsis thaliana* wurde das Aquaporin AtTIP1.1 in pBT3-N (pBT3-N:AtTIP1.1) verwendet, da dieses Aquaporin unter den *Arabidopsis* aquaporinen am stärksten mit BHRF1 interagiert (4.4.4).

Aus den theoretisch 327.992 rekombinanten Hefezellen konnte eine Kolonie isoliert werden, die auf SD-Medium ohne die Aminosäuren Leucin, Tryptophan und Histidin (SD-LTH) wuchs, also einen potentiellen Interaktionspartner darstellte. Hefe-DNA wurde isoliert wie unter 3.2.11 beschrieben und in *E. coli* transformiert (3.1.2.2). Ein Restriktionsverdau (3.1.5) zeigte, dass die isolierten Plasmide ein Insert von ca. 1000 bp hatten. Unter Verwendung des Primers pPR3-N fwd (2.7.2) wurde das Plasmid sequenziert (3.1.13).

Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe des Blast-Programmes (Altschul et al., 1990) mit der Datenbank von NCBI verglichen. Dabei konnte ein Klon mit einer Größe von 1008 bp (336 AS) identifiziert werden.

Zur deutlicheren Darstellung des isolierten Klons (in pDSL-Nx) wurde die folgende Abbildung erstellt:

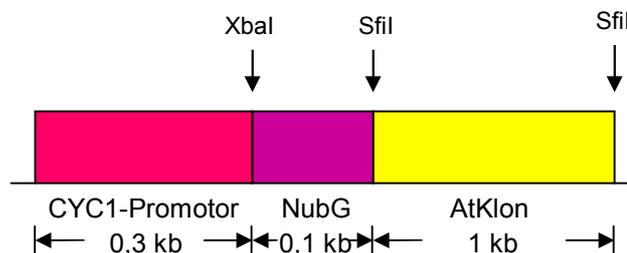


Abb. 4.5-1: Schematische Darstellung des isolierten Klons in pDSL-Nx

Die Klonierung in pDSL-Nx lässt ein Fusionsprotein aus der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (NubG) und den Sequenzen einer *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bank entstehen.

Die Aminosäuresequenz des isolierten Klons weist eine Identität von 97 % zur Aminoacylase von *Arabidopsis thaliana* auf. Aminoacylasen gehören zur Familie der M20-

Metallopeptidasen (Rawlings und Barrett, 1995). Ihnen wird die Funktion der Deacetylierung von Aminosäuren im Aminosäure-Metabolismus zugeschrieben (Palm und Röhm, 1995).

4.5.1 Klonierung und Expression der Volllängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum*

4.5.1.1 Amplifikation der Volllängenaminoacylase

Da der Aminosäuresequenz des isolierten Klon im Vergleich zum Volllängenprotein die ersten 94 Aminosäuren am N-Terminus fehlen (AtACY Δ 1-94), sollte die Volllängenaminoacylase kloniert werden. Da alle physiologischen Experimente in Tabak durchgeführt worden waren, wurde für weitere Experimente die Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* verwendet.

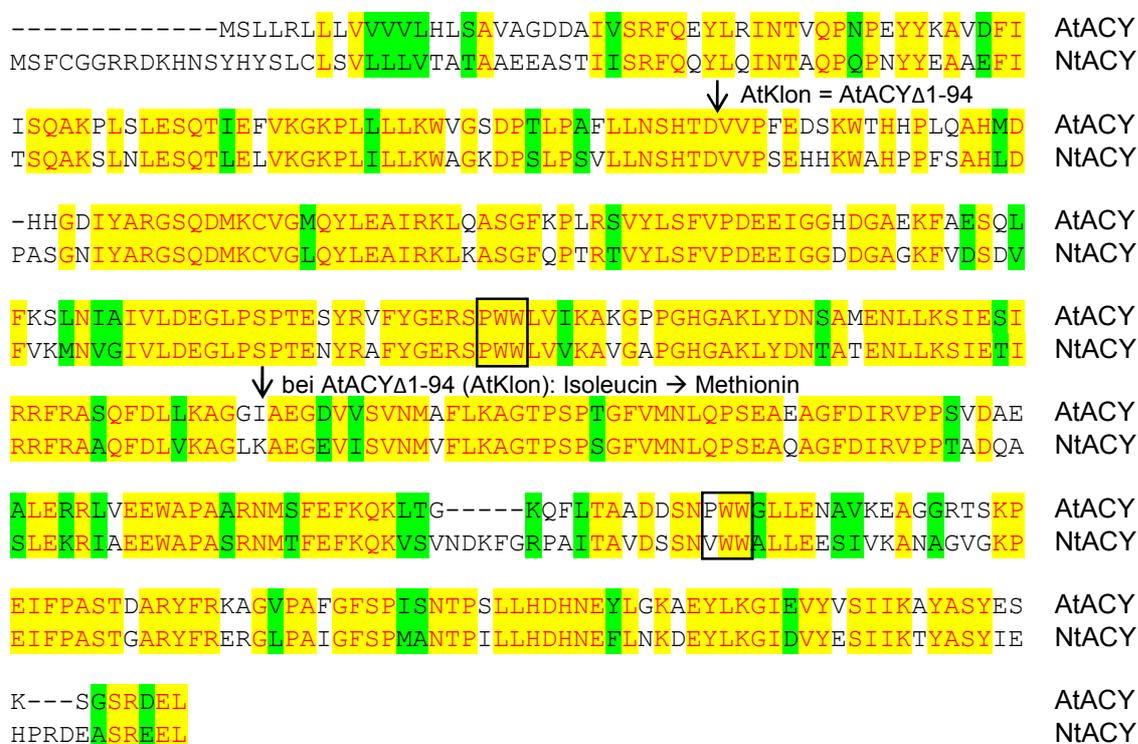


Abb. 4.5-2: „Alignment“ der Aminosäuresequenz der Aminoacylase aus *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*

Die beiden Aminosäuresequenzen sind zu 65,1 % identisch. Die Aminoacylase aus *Arabidopsis* besteht aus 430 Aminosäuren, die aus Tabak aus 452 Aminosäuren. Beide Sequenzen besitzen die zwei PWW-Motive, welche den peripheren Kontakt zur zytosolischen Seite der Membran vermitteln können (Jakob, 1992; Palm und Röhm, 1995). Das zweite PWW-Motiv ist allerdings bei der Aminoacylase aus Tabak in VWW umgewandelt. Dem aus der *Arabidopsis* cDNA-Bank gefischte Klon fehlen im Vergleich zum Volllängenprotein 94 Aminosäuren am N-Terminus. Der AtKlon wird deshalb im Folgenden als AtACY Δ 1-94 bezeichnet. Während die Volllängenaminoacylase aus *Arabidopsis* an Position 254 die Aminosäure Isoleucin besitzt, hat die Aminosäuresequenz von AtACY Δ 1-94 dort ein Methionin.

Die cDNA der Volllängenaminoacylase wurde aus einer 1:100 Verdünnung aus einer Tabak cDNA-Bank in pAD-GAL4-2.1 amplifiziert (3.1.11). Die erwartete Länge des DNA-Fragments betrug 1356 bp. Die verwendeten Primer sind unter 2.7.1 aufgelistet. Das entstandene PCR-Produkt wurde auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt (3.1.6) und zum Sequenzieren geschickt (3.1.13). Nach Erhalt der Sequenz wurde diese mit Hilfe des Blast-Programmes (Altschul et al., 1990) mit der Datenbank von NCBI verglichen. Dabei konnte bestätigt werden, dass es sich um die gewünschte Aminoacylase handelt. Nach einem Verdau mit EcoRI bzw. BamHI/BglII (3.1.5) wurde die Aminoacylase in den Expressionsvektor pGEX-3X (2.3.10) zur Funktionsanalyse (4.5.4) bzw. in pPR3-N (2.3.8) für Interaktionsstudien im Split Ubiquitin System (4.5.3) sowie in pTAK35Scah (2.3.13) zur transienten Expression in *Nicotiana benthamiana* (4.5.5) kloniert (3.1.9).

4.5.1.2 Amplifikation der Aminoacylasedeleitionen NtACY Δ PWW und NtACY Δ VWW

Weiterhin wurden zwei Deletionen der Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* hergestellt, um auch hier Aufschluss über die Bindungsdomäne zu bekommen, die für eine mögliche Interaktion mit Aquaporinen verantwortlich ist.

Die Amplifikation der Deletionen fand wie unter 3.1.11 beschrieben statt. Die verwendeten Primer sind unter 2.7.1 aufgelistet. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt (3.1.6), es wurden DNA-Fragmente mit einer Länge von 654 bp (NtACY Δ PWW) und 1068 bp (NtACY Δ VWW) erwartet, und zum Sequenzieren geschickt (3.1.13). Die korrekten DNA-Fragmente wurden mit BamHI/BglII verdaut und in pPR3-N (2.3.8) für Interaktionsstudien (4.5.3.2.4) ligiert (3.1.9).

Zur besseren Vorstellung sind AtACY Δ 1-94 aus *Arabidopsis*, die Volllängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum* und die beiden Deletionen NtACY Δ PWW und NtACY Δ VWW in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt:

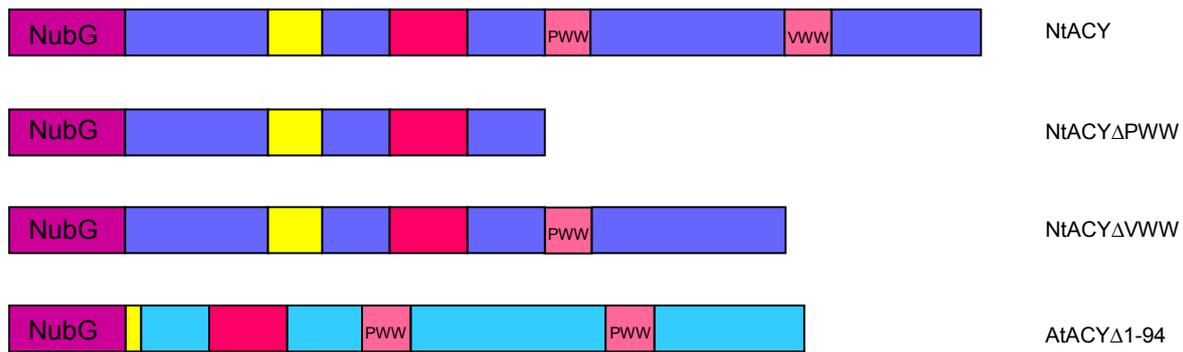


Abb. 4.5-6: Schematische Darstellung von NtACY, NtACY Δ PWW, NtACY Δ VWW und AtACY Δ 1-94 in pPR3-N

Durch die Klonierung der Aminoacylase und der Aminoacylasedeleitionen in pPR3-N entsteht ein Fusionsprotein. Dabei ist an den N-Terminus der Proteine die N-terminale Hälfte des mutierten Ubiquitins (NubG) fusioniert. Während die Vollängenaminoacylase (NtACY) die beiden Motive PWW (AS₂₁₉-AS₂₂₁) und VWW (AS₃₅₉-AS₃₆₁) besitzt, sind diese bei NtACY Δ PWW ab der Aminosäure Prolin an Position 219 deletiert. NtACY Δ VWW besitzt nur noch das PWW-Motiv, da auch hier die Sequenz ab Position 359 deletiert ist. AtACY Δ 1-94 ist türkisfarben gekennzeichnet, da die Aminosäuresequenz sich zu der von Tabak unterscheidet. Weiterhin fehlen AtACY Δ 1-94 im Vergleich zur Vollängenaminoacylase aus *Arabidopsis* 94 Aminosäuren am N-Terminus. Die für Mitglieder der M20-Peptidase Familie charakteristischen Sequenz-Homologien (AS₁₀₀-AS₁₀₉ VLLNSHTDVV und AS₁₃₇-AS₁₇₆ SQDMKCVGLQYLEAIRKCLKASGFQPTRTVYLSFVPDEEIG, NtACY) sind gelb bzw. rot gekennzeichnet (Mitta et al., 1992). Bei AtACY Δ 1-94 ist erstere nur mit zwei Valin-Resten vertreten.

Die korrekte Plasmid-DNA konnte nun in geeignete Hefen transformiert werden (3.2.3).

4.5.1.3 Transformation von pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94, pPR3-N:NtACY, pPR3-N:NtACY Δ PWW und pPR3-N:NtACY Δ VWW in *S. cerevisiae* NMY51

Als geeigneter Hefestamm für die Transformation dieser vier Konstrukte sollte *S. cerevisiae* NMY51 (2.2.4) verwendet werden. Die Transformation erfolgte wie unter (3.2.3.1.2) beschrieben. Anschließend wurden die Transformationen auf SD-Platten ohne Tryptophan und Leucin (AtACY Δ 1-94 in pDSL-Nx bzw. NtACY, NtACY Δ PWW und NtACY Δ VWW in pPR3-N in Kombination mit je einem Aquaporin bzw. einer NtPIP2.2b- oder NtTIP1.1a-Deletion in pBT3-C bzw. pBT3-N) ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden in Flüssigkulturen (SD-Medium ohne Tryptophan und Leucin) angezogen und für spätere Versuche wurden Gefrierkulturen (3.1.14) angelegt.

4.5.2 Nachweis der Expression von AtACY Δ 1-94 und *Nicotiana tabacum* Aminoacylase in *S. cerevisiae* NMY51

Um zeigen zu können, dass die transformierten Hefen NMY51 AtACY Δ 1-94 aus der *Arabidopsis* cDNA-Bank bzw. die Vollängenaminoacylase (NtACY) aus Tabak tatsächlich exprimieren, wurden die Proteine aus den Hefen extrahiert (3.2.4.1 bzw. 3.2.4.2) und auf

einem SDS-Polyacrylamidgel (3.2.5) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Mittels „Western Blot“ (3.2.7.1) konnten die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern (3.2.7.2) detektiert werden.

Hierfür wurden für die Proben 1 bis 3 Flüssigkulturen (SD-Medium ohne Aminosäure Leucin und Tryptophan) angezogen und nach 3.2.4.1 bearbeitet. Die Proben 4 bis 6 dagegen wurden wie unter 3.2.4.2 beschrieben, verarbeitet. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden *E. coli* BL21 + pGEX-3X:NtACY uninduziert bzw. für 1 h induziert (4.5.4.1.2), aufgetragen.

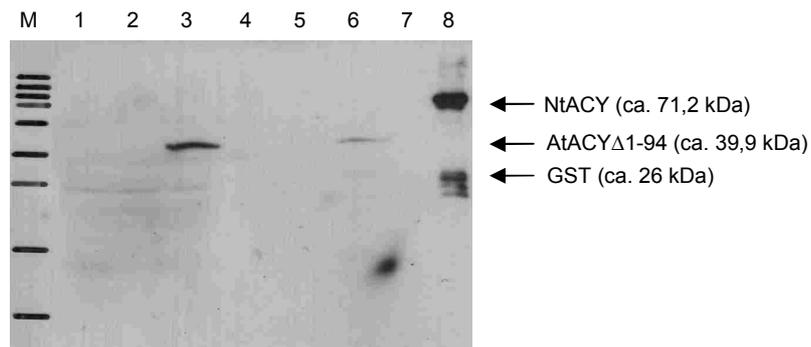


Abb. 4.5-7: Immundetektion der aus transgenen *S. cerevisiae* NMY51 isolierten Proteine

Zur Detektion von AtACY Δ 1-94 bzw. der Tabakaminoacylase (NtACY) wurde als 1. Antikörper „ACY1 full-length recombinant protein with GST tag“ (1:3000) eingesetzt. „Anti-mouse/HRP“ (1:10000) wurde als 2. Antikörper verwendet.

Spur M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#SM1811, MBI Fermentas): 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa

Spur 1: NMY51 (Negativkontrolle)

Spur 2: NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N Δ

Spur 3: NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N Δ

Spur 4: NMY51 (Negativkontrolle)

Spur 5: NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N Δ

Spur 6: NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N Δ

Spur 7: *E. coli* BL21 + pGEX-3X:NtACY (uninduziert) (Negativkontrolle)

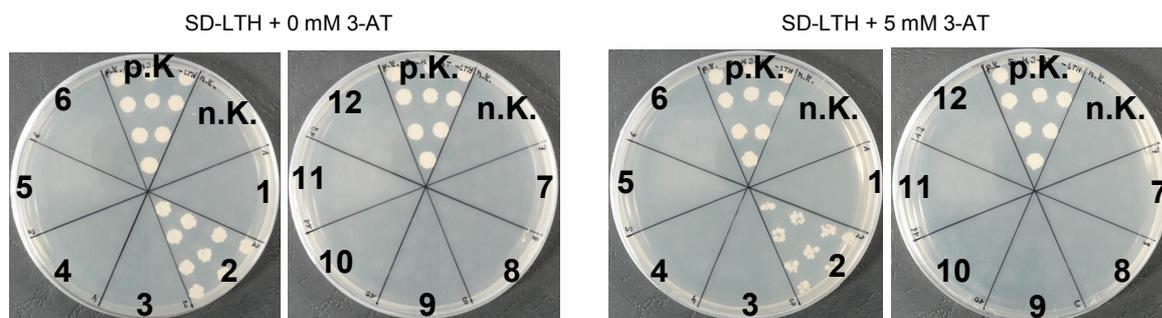
Spur 8: *E. coli* BL21 + pGEX-3X:NtACY (1 h induziert) (Positivkontrolle)

In Spur 3 und 6 konnte AtACY Δ 1-94 aus *Arabidopsis* mit einem Molekulargewicht von 39,9 kDa (AtACY Δ 1-94 = 33,6 kDa und NubG/HA-tag = ca. 6,3 kDa) nachgewiesen werden. Das Volllängenprotein der Aminoacylase aus Tabak (Spur 2 und 5) konnte allerdings nicht detektiert werden. Als Positivkontrolle (Spur 8) diente ein Isolat aus *E. coli* BL21, die mit dem Expressionsvektor pGEX-3X und NtACY transformiert und durch IPTG zur Expression induziert wurden. Die obere Bande in Spur 8 entspricht einem Molekulargewicht von 71,2 kDa (Fusionsprotein aus NtACY = 45,2 kDa und GST 26 kDa). Die untere Bande in Spur 8 detektiert das GST (26 kDa), das auch durch den ACY1-Antikörper nachgewiesen werden kann.

Als Positivkontrolle (Sektor 1) wurde die Interaktion von BHRF1wt und NtPIP2.2b in pBT3-C verwendet. In Sektor 2 ist die Interaktion von BHRF1wt und AtTIP1.1 aus *Arabidopsis thaliana* aufgetragen, da mit diesem Aquaporin der Klon, d. h. AtACY Δ 1-94 aus der cDNA-Bank von *Arabidopsis* isoliert wurde. NMY51-Zellen, die mit BHRF1wt und dem leeren pBT3-C (Sektor 3) transformiert wurden, stellen die Negativkontrolle dar. Erstaunlicherweise interagieren die beiden Tabakaquaporine NtPIP2.2b und NtTIP1.1a in pBT3-C (Sektor 4 und 5) am stärksten mit AtACY Δ 1-94 aus *Arabidopsis thaliana*. Wie auch schon bei vorherigen Interaktionstests mit BHRF1 (4.4.4) beobachtet werden konnte, interagiert NtPIP2.2b in pBT3-N (Sektor 6) auch mit AtACY Δ 1-94 nicht. Eine Interaktion von NtPIP2.2a und NtTIP1.1a in pBT3-N (Sektor 7 und 8) mit AtACY Δ 1-94 findet jedoch statt. Die *Arabidopsis* aquaporine AtTIP1.1 und mAtPIP2.2 interagieren ausschließlich in pBT3-N und ohne Zugabe von 3-AT mit AtACY Δ 1-94 (Sektor 12 und 13). Wobei AtPIP2.2m (Sektor 11 und 14) keinerlei Interaktion zeigt. Auch das humane Aquaporin 1 und das Rattenaquaporin 8 interagieren weder in pBT3-C (Sektor 15 und 17) noch in pBT3-N (Sektor 16 und 18) mit AtACY Δ 1-94.

4.5.3.1.2 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 und Aquaporindeletionen

Da die Interaktionsstärke bzw. das Interaktionsmuster zumindest der pflanzlichen Aquaporine mit AtACY Δ 1-94 in etwa dem von BHRF1 entspricht, wurde anhand der vorhandenen Deletionen von NtPIP2.2b getestet, ob BHRF1 und AtACY Δ 1-94 ähnliche Bindungsstellen haben.



p.K. NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N:AtTIP1.1 (Positivkontrolle)
n.K. NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-C (Negativkontrolle)

1 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 105-287
2 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 117-287
3 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 198-287
4 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 1-103
5 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 1-117
6 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 1-195

p.K. NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N:AtTIP1.1 (Positivkontrolle)
n.K. NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N Δ (Negativkontrolle)

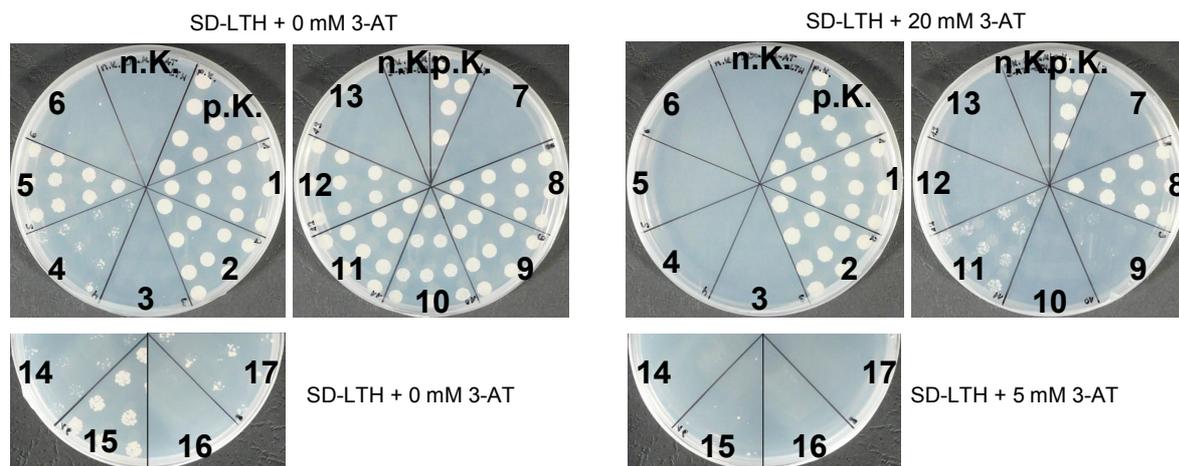
7 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 105-287
8 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 117-287
9 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 198-287
10 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-103
11 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-117
12 NMY51 + pDSL-Nx:AtACY Δ 1-94::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-195

Abb. 4.5-9: Interaktion von AtACY Δ 1-94 und NtPIP2.2b-Deletionen im Split Ubiquitin System unter Verwendung des HIS3-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM und 5 mM 3-AT

Die Interaktion von AtACY Δ 1-94 und AtTIP1.1 aus *Arabidopsis* in pBT3-N (Sektor p.K.) wurde als Positivkontrolle verwendet, da mit diesem Aquaporin AtACY Δ 1-94 aus der cDNA-Bank isoliert worden war. Als Negativkontrolle wurden NMY51, die mit AtACY Δ 1-94 und dem leeren pBT3-C bzw. pBT3-N Δ (Sektor n.K.) transformiert sind, verwendet. Auch bei der Interaktion von AtACY Δ 1-94 mit den NtPIP2.2b-Deletionen interagiert offensichtlich nur der N-Terminus von NtPIP2.2b (NtPIP2.2b Δ 117-287) in pBT3-C (Sektor 2). Dies war auch schon bei der Interaktion der NtPIP2.2b-Deletionen und BHRF1 mit bzw. ohne Transmembrandomäne der Fall (4.4.4.1.6 und 4.4.4.2.3). Da NtPIP2.2b Δ 117-287 aus der 1. und 2. Transmembrandomäne sowie „loop“ B mit dem 1. konservierten NPA-Motiv besteht, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Bereich der Aquaporine für die Interaktion notwendig ist.

4.5.3.1.3 Interaktion zwischen NtACY und Aquaporinen

Weiterhin wurde die Interaktion der Tabakaminoacylase mit den Aquaporinen getestet.



n.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C (Negativkontrolle)
p.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2b (Positivkontrolle)

1 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:NtPIP2.2b
2 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:NtTIP1.1a
3 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:AtTIP1.1
4 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:mAtTIP1.1
5 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:mAtPIP2.2
6 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:AtPIP2.2m

7 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:NtPIP2.2b
8 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:NtPIP2.2a
9 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:NtTIP1.1a
10 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:AtTIP1.1
11 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:mAtTIP1.1
12 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:mAtPIP2.2
13 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:AtPIP2.2m

14 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:hAQP1
15 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:hAQP1
16 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:rAQP8
17 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:rAQP8

Abb. 4.5-10: Interaktion von NtACY und Aquaporinen im Split Ubiquitin System unter Verwendung des HIS3-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM und 20 mM bzw. 5 mM 3-AT

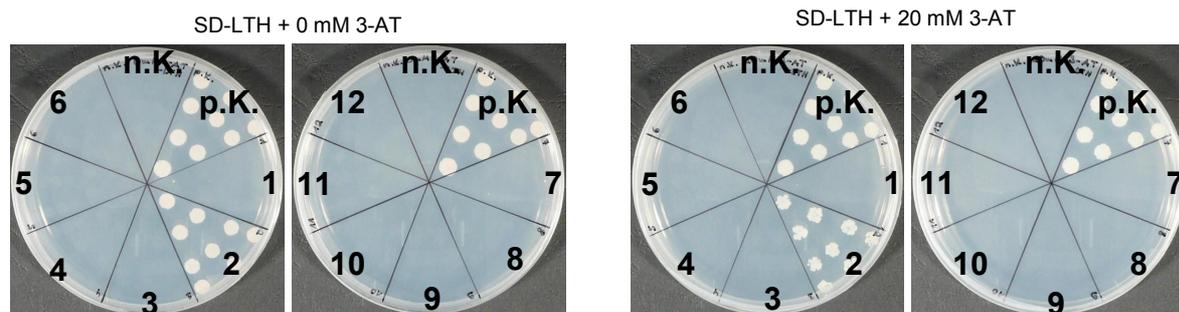
Als Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden NMY51, die mit BHRF1wt und pBT3-C (Sektor n.K.) bzw. NtPIP2.2b in pBT3-C (Sektor p.K.) transformiert wurden, verwendet. Auch hier interagieren die Tabakaquaporine stärker mit der Aminoacylase aus Tabak als die

Arabidopsis aquaporine. Die Aquaporine NtPIP2.2b und NtTIP1.1a in pBT3-C (Sektor 1 und 2) und NtPIP2.2a in pBT3-N (Sektor 8) interagieren auch noch bei 20 mM 3-AT mit der Aminoacylase aus Tabak. Während NtPIP2.2b in pBT3-N mit NtACY (Sektor 7) keine Interaktion zeigt, kommt es bei NtTIP1.1a in pBT3-N (Sektor 9) zu einer leichten Interaktion. Bei den *Arabidopsis* aquaporinen AtTIP1.1 und mAtTIP1.1 in pBT3-C (Sektor 3 und 4) und AtPIP2.2m in pBT3-C (Sektor 6) und pBT3-N (Sektor 13) kommt es zu keiner Interaktion mit der Tabakaminoacylase. Eine leichte Interaktion findet zwischen *Arabidopsis* mAtPIP2.2 in pBT3-C und pBT3-N (Sektor 5 und 12) sowie AtTIP1.1 in pBT3-N (Sektor 10) mit NtACY statt. Das humane Aquaporin 1 interagiert nur in pBT3-N und ohne Zugabe von 3-AT im Medium mit der Aminoacylase aus Tabak (Sektor 15). Das rAQP8 zeigt eine sehr schwache Interaktion in pBT3-N (Sektor 17).

Während NtPIP2.2a in pBT3-N viel stärker mit der Vollängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum* als mit AtACY Δ 1-94 interagiert, kommt es zwischen mAtPIP2.2 in pBT3-C bzw. hAQP1 in pBT3-N zu einer leichten Verstärkung der Interaktion mit NtACY im Vergleich zur Interaktion mit AtACY Δ 1-94. Die übrigen der getesteten Aquaporine zeigen keinerlei Unterschied zwischen der Interaktion mit AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY.

4.5.3.1.4 Interaktion zwischen NtACY und den Deletionen von NtPIP2.2b

Auch hier sollte untersucht werden, welcher Bereich der Aquaporine für die Interaktion mit NtACY verantwortlich ist.



n.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C (Negativkontrolle)

p.K. NMY51 + pPR3-N:BHRF1wt::pBT3-C:NtPIP2.2b (Positivkontrolle)

1 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 105-287

2 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 117-287

3 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 198-287

4 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 1-103

5 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 1-117

6 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-C:NtPIP2.2b Δ 1-195

7 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 105-287

8 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 117-287

9 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 198-287

10 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-103

11 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-117

12 NMY51 + pPR3-N:NtACY::pBT3-N:NtPIP2.2b Δ 1-195

Abb. 4.5-11: Interaktion von NtACY und NtPIP2.2b-Deletionen im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM und 20 mM 3-AT

Als Positivkontrolle wurde die Interaktion von NtPIP2.2b in pBT3-C und BHRF1wt (Sektor p.K.) verwendet. BHRF1wt und der leere pBT3-C (Sektor n.K.) dienten als Negativkontrolle. Genau wie AtACY Δ 1-94 interagiert auch die Aminoacylase aus Tabak (NtACY) nur mit der NtPIP2.2b Δ 117-287 Deletion in pBT3-C (Sektor 2). Die noch vorhandenen Transmembrandomänen 1 und 2 sowie das 1. NPA-Motiv in „loop“ B sorgen für die Interaktion mit anderen Proteinen.

4.5.3.1.5 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY und den NtTIP1.1a-Deletionen

Die Untersuchungen zur Bindedomäne von Aquaporinen für die Aminoacylase waren mit Deletionen von NtPIP2.2b durchgeführt worden. Um sicher zu gehen, dass NtTIP dieselben Interaktionsdomänen aufweist, wurden exemplarisch einige Konstrukte auf der Basis von NtTIP1.1a erzeugt. Die Interaktion mit den Deletionen des Aquaporins NtTIP1.1a sollte Aufschluss darüber geben, ob hier die Interaktionsdomäne ebenfalls am N-Terminus liegt.

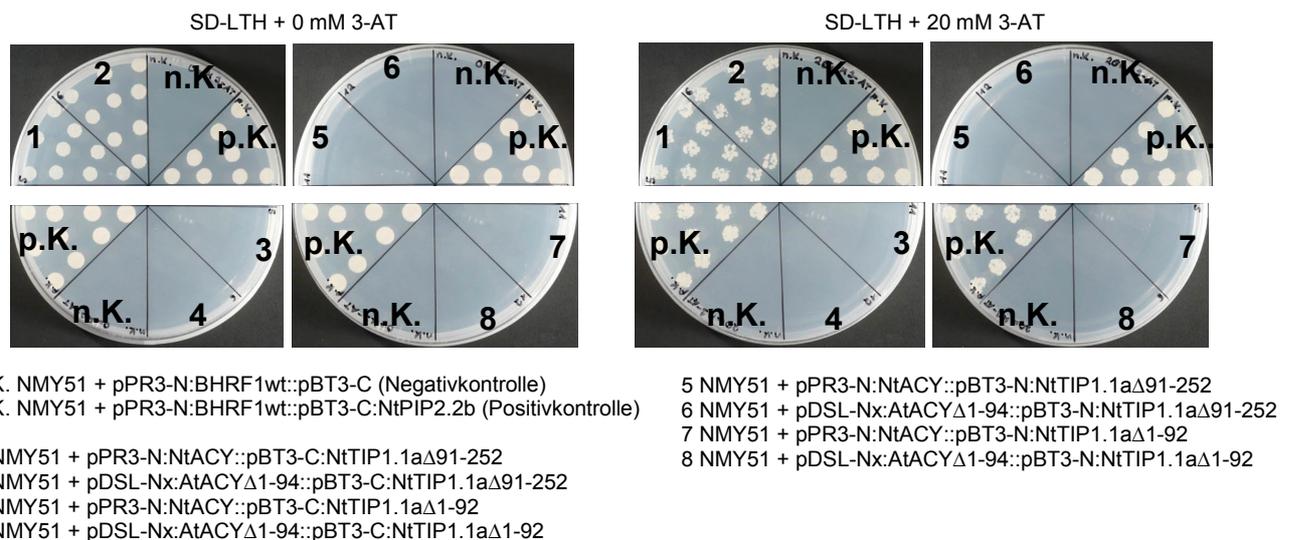


Abb. 4.5-12: Interaktion von AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY und NtTIP1.1a-Deletionen im Split Ubiquitin System unter Verwendung des HIS3-Reportergens bei einer Konzentration von 0 mM und 20 mM 3-AT

Als Positivkontrolle wurde auch hier die Interaktion von BHRF1wt und NtPIP2.2b in pBT3-C (Sektor p.K.) verwendet. Als Negativkontrolle diente dabei BHRF1wt und pBT3-C (Sektor n.K.). Die Volllängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum* und die *Arabidopsis*aminoacylase (AtACY Δ 1-94) interagieren auch hier nur mit dem N-Terminus von NtTIP1.1a (NtTIP1.1a Δ 91-252) in pBT3-C (Sektor 1 und 2) auch bei 20 mM 3-AT. Weder die Deletion NtTIP1.1a Δ 91-252 in pBT3-N (Sektor 5 und 6) noch NtTIP1.1a Δ 1-92 in pBT3-C (Sektor 3 und 4) und pBT3-N (Sektor 7 und 8) interagieren mit der Tabakaminoacylase oder der *Arabidopsis*aminoacylase (AtACY Δ 1-94).

Durch Interaktionsstudien der verschiedenen Aquaporindeletionen (NtPIP2.2b-Deletionen, NtTIP1.1a-Deletionen) mit den BHRF1-Proteinen (BHRF1wt, BHRF1 Δ TMwt, mBHRF1, mBHRF1 Δ TM), der deletierten Aminoacylase aus *Arabidopsis thaliana* (AtACY Δ 1-94) und der Volllängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum* (NtACY) konnte der Interaktionsbereich, bestehend aus Transmembrandomäne 1 und 2 sowie „loop“ B (1. NPA-Motiv), identifiziert werden.

4.5.3.2 Quantitativer Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion zwischen *Arabidopsis*aminoacylase bzw. Tabakaminoacylase und Aquaporine im Split Ubiquitin System unter Verwendung des *lacZ*-Reportergens

4.5.3.2.1 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY und Aquaporine

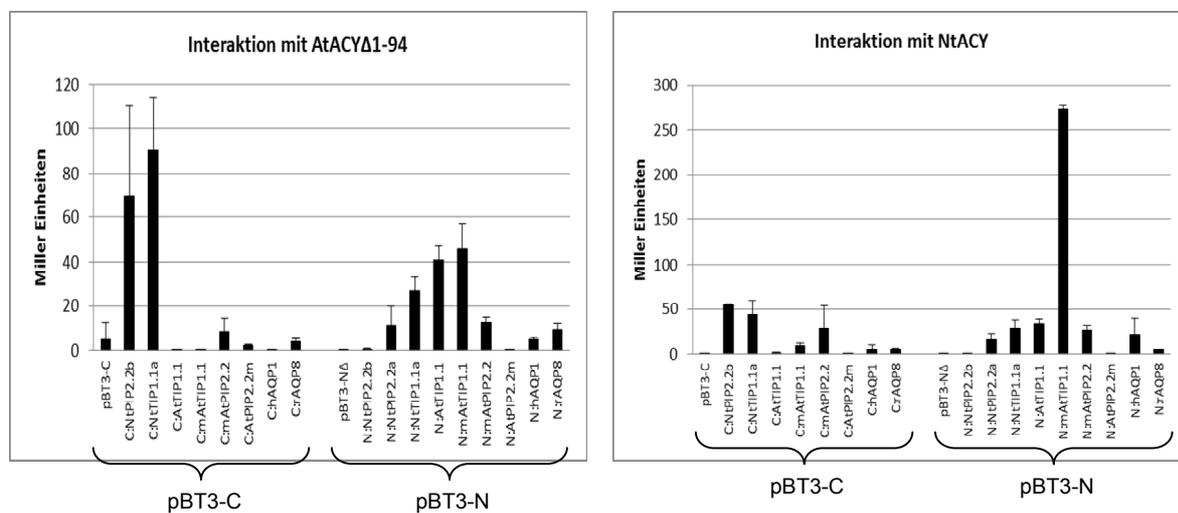


Abb. 4.5-13: Das „C“ bzw. „N“ vor einem Aquaporin bedeutet, dass es sich in pBT3-C bzw. pBT3-N befindet.

Die stärkste Interaktion findet zwischen der Volllängenaminoacylase aus Tabak und dem mutierten AtTIP1.1 aus *Arabidopsis* (mAtTIP1.1) statt. Ansonsten ähneln die Interaktionen zwischen den Aquaporinen und AtACY Δ 1-94 bzw. der Tabakaminoacylase denen von BHRF1 mit den Aquaporinen. Auch hier interagieren NtPIP2.2b und NtTIP1.1a in pBT3-C am stärksten mit AtACY Δ 1-94 bzw. Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* (NtACY). Wird NtPIP2.2b in pBT3-N exprimiert, kommt es zu keiner Interaktion weder mit AtACY Δ 1-94 noch mit NtACY. Die *Arabidopsis*aquaporine interagieren hauptsächlich in pBT3-N mit AtACY Δ 1-94 aus *Arabidopsis* bzw. der Volllängenaminoacylase. Das humane Aquaporin 1 und das Rattenaquaporin 8 interagieren schwach in pBT3-N.

4.5.3.2 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY und NtPIP2.2b-Deletionen

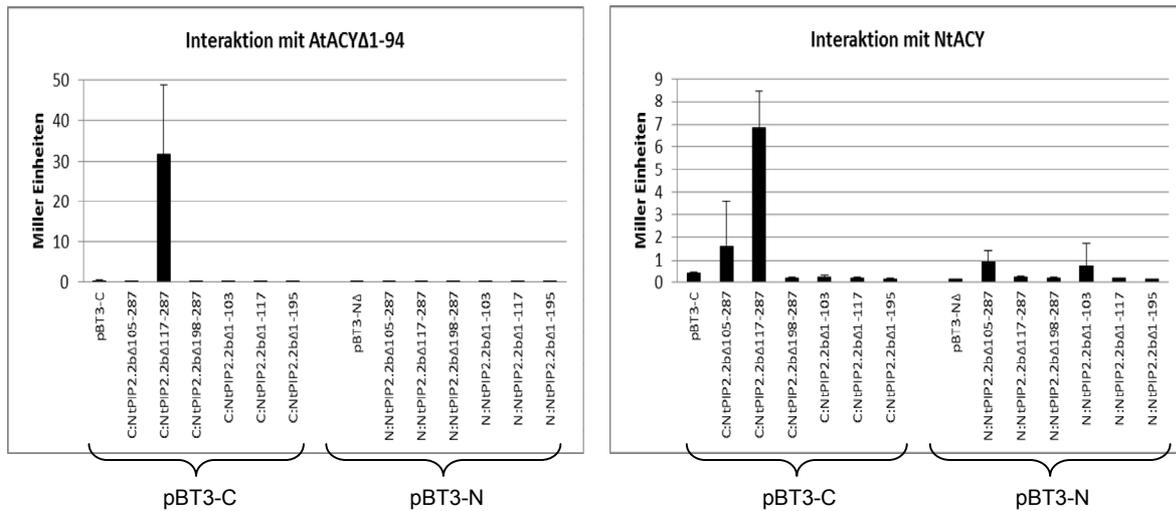


Abb. 4.5-14: Das „C“ bzw. „N“ vor der Deletion bedeutet, dass es sich in pBT3-C bzw. pBT3-N befindet.

Die Interaktion der NtPIP2.2b-Deletionen mit AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY findet nur noch mit dem N-Terminus von NtPIP2.2b (NtPIP2.2b Δ 117-287) in pBT3-C statt. Erstaunlicherweise interagiert NtPIP2.2b Δ 117-287 in pBT3-C mit der deletierten Aminoacylase aus *Arabidopsis thaliana* (AtACY Δ 1-94) viel stärker als mit der Volllängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum*. Die übrigen Deletionen zeigen keinerlei Interaktion mit AtACY Δ 1-94 aus *Arabidopsis* bzw. mit der Volllängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum*.

4.5.3.2.3 Interaktion zwischen AtACY Δ 1-94 bzw. NtACY und NtTIP1.1a-Deletionen

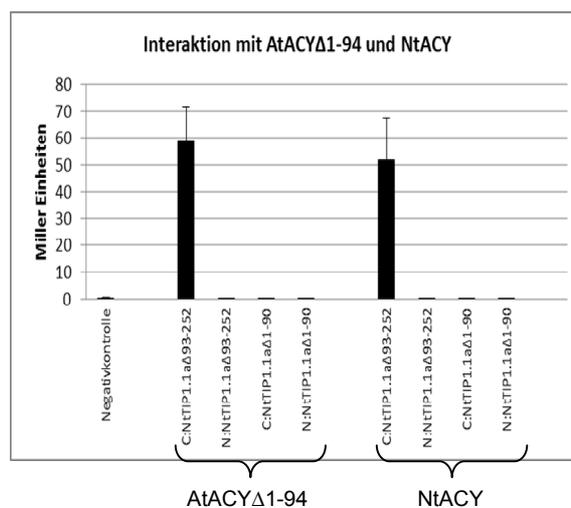


Abb. 4.5-15: Die Negativkontrolle stellt BHRF1wt und pBT3-C dar. Das „C“ bzw. „N“ vor einer Deletion bedeutet, dass es sich in pBT3-C bzw. pBT3-N befindet.

Auch bei den NtTIP1.1a-Deletionen interagiert nur der N-Terminus von NtTIP1.1a (NtTIP1.1a Δ 91-252) in pBT3-C mit dem AtACY Δ 1-94 bzw. mit der Aminoacylase aus Tabak.

4.5.3.2.4 Interaktion zwischen NtACY Δ PWW bzw. NtACY Δ VWW und Aquaporine

Durch die Interaktion von AtACY Δ 1-94 mit den Aquaporinen bzw. mit den Aquaporindeletionen wurde klar, dass die ersten 94 Aminosäuren, d. h. der N-Terminus der Aminoacylase nicht für die Interaktion benötigt werden, da diese bei AtACY Δ 1-94 fehlen. Um den Interaktionsbereich lokalisieren zu können, wurden zwei Deletionen der Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* hergestellt und ebenfalls auf Interaktion mit den Aquaporinen und deren Deletionen getestet.

Zur besseren Vorstellung sind die Deletionen in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt:

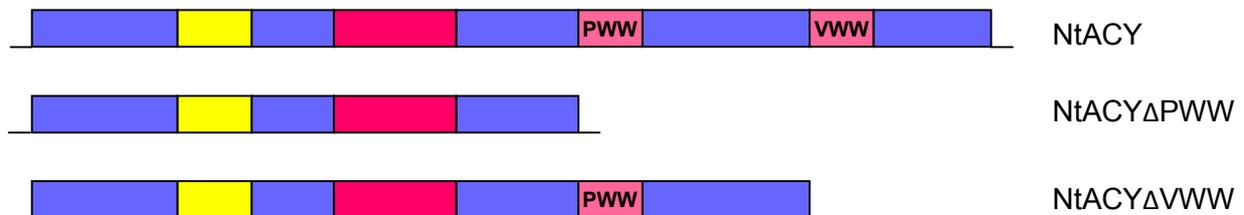


Abb. 4.5-16: Schematische Darstellung der Aminoacylase und deren Deletionen

Die Vollängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum* (NtACY) besitzt wie fast alle Aminoacylasen zwei konservierte PWW-Motive. Während das erste PWW-Motiv aus einem Prolin- und zwei Tryptophan-Resten besteht, erfährt das zweite Motiv einen Aminosäureaustausch von Prolin nach Valin. Die Deletion NtACY Δ PWW besteht aus AS₁-AS₂₁₈ und besitzt keins dieser beiden Motive. Bei der Deletion NtACY Δ VWW (AS₁-AS₃₅₆) wurde nur das VWW-Motiv deletiert. Die für Mitglieder der M20-Peptidase Familie charakteristischen Sequenz-Homologien AS₁₀₀-AS₁₀₉ VLLNSHTDVV und AS₁₃₇-AS₁₇₆ SQDMKCVGLQYLEAIRKCLKASGFQPTRTVYLSFV PDEEIG (NtACY) sind gelb bzw. rot gekennzeichnet (Mitta et al., 1992).

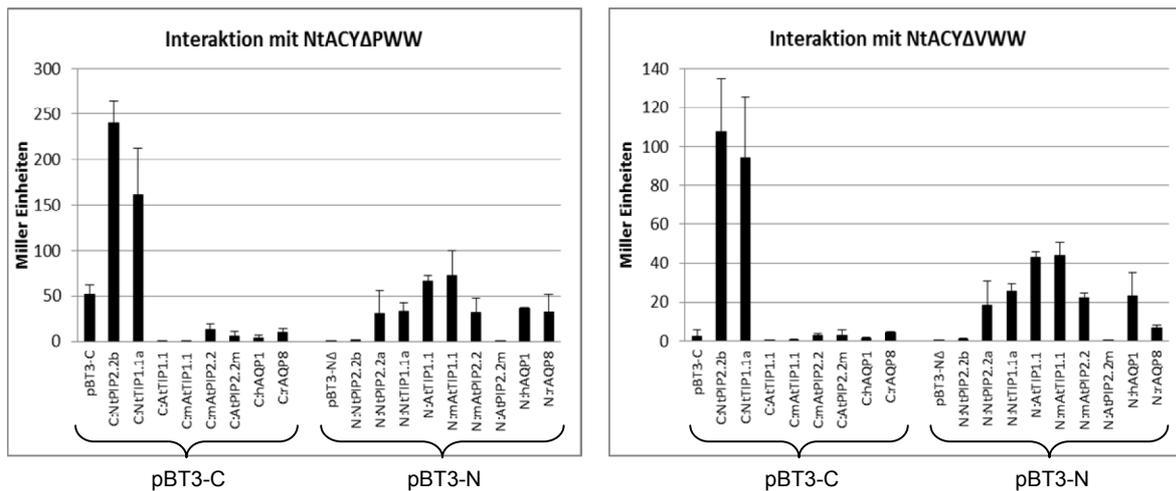


Abb. 4.5-17: Das „C“ bzw. „N“ vor einem Aquaporin bedeutet, dass es sich in pBT3-C bzw. pBT3-N befindet.

Offensichtlich werden die beiden Motive PWW und VWW nicht für die Interaktion mit den Aquaporinen benötigt.

Die Interaktionsergebnisse zwischen der am N-Terminus deletierten Aminoacylase aus *Arabidopsis thaliana* (AtACYΔ1-94) und den Aquaporinen bestätigt, dass die ersten 94 AS für die Interaktion nicht benötigt werden. Die Interaktionstests der beiden Aminoacylasedelektionen aus *Nicotiana tabacum* (NtACYΔPWW und NtACYΔVWW) führen zu der Schlussfolgerung, dass auch der deletierte Bereich für die Interaktion mit Aquaporinen nicht relevant ist. Das bedeutet weder der N- (AS₁-AS₁₀₇) noch der C-Terminus (AS₂₁₇-AS₄₅₂) der Tabakaminoacylase ist für die Interaktion mit Aquaporinen verantwortlich. Demnach könnte die Bindungsdomäne zwischen Aminosäure 108 und 216 lokalisiert sein.

4.5.4 Überexpression der Vollängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum* als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli*

Für die Herstellung und Isolierung großer Mengen eines Zielproteins wird die Expression und Reinigung mit der Glutathion-S-Transferase (GST) als Affinitätssepitop als geeignetes System verwendet. Dabei wird die entsprechende DNA-Sequenz eines Zielproteins unter die Kontrolle eines regulierbaren Promotors gebracht. Dieses Konstrukt wird in einen Expressionswirt transformiert, der unter den gewünschten Bedingungen zur Expression des rekombinanten Zielproteins gebracht wird. Der am häufigsten verwendete Expressionswirt ist *E. coli*, da er leicht zu kultivieren ist und eine starke Überexpression von rekombinanten Proteinen ermöglicht. Neben BL21, der in dieser Arbeit verwendet wurde, stehen noch eine Reihe weiterer *E. coli*-Expressionsstämme zur Verfügung. Um eine einfache Reinigung von rekombinanten Proteinen aus Expressionskulturen zu ermöglichen, wird die Gensequenz des gewünschten Zielproteins als Fusionsprotein mit Affinitätssepitop exprimiert.

Affinitätsepitope, wie z. B. Glutathion-S-Transferase (GST) sind Proteindomänen, die mit einem Substrat, welches an eine Matrix gebunden ist, wechselwirken und auf diese Weise das rekombinante Fusionsprotein von anderen zellulären Proteinen, die nicht an die Matrix binden können, trennen. Der Erhalt eines reinen und stark angereicherten Fusionsproteins erfolgt durch mehrmaliges Waschen der beladenen Matrix und anschließender Eluierung. Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wird eine Matrix (2.8) verwendet, die Sepharose als Trägermaterial enthält. Glutathion, das Substrat der Glutathion-S-Transferase, bindet an dieses Trägermaterial. Die Eluierung des gebundenen Fusionsproteins von der Matrix wird durch reduziertes Glutathion (10 mM) hervorgerufen. Zusätzlich bietet das GST-System die Möglichkeit, das Zielprotein von dem GST-Affinitätsepitop zu trennen. Dafür besitzen die pGEX-Expressionsvektoren im Fusionsprotein zwischen dem GST-Affinitätsepitop und dem Zielprotein eine Aminosäuresequenz, die von der Protease Faktor Xa (2.9) spezifisch erkannt und gespalten wird. Ein modifizierter *lacZ*-Promotor, der durch das Substratanalog Isopropylthiogalaktosid (IPTG) induziert werden kann, dient der gesteuerten Expression des Fusionsproteins.

4.5.4.1 Klonierung und Expression der Vollängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum*

Die Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* wurde wie unter 4.5.1.1 beschrieben, amplifiziert (3.1.11) und in den *E. coli*-Expressionsvektor pGEX-3X (2.3.10) kloniert.

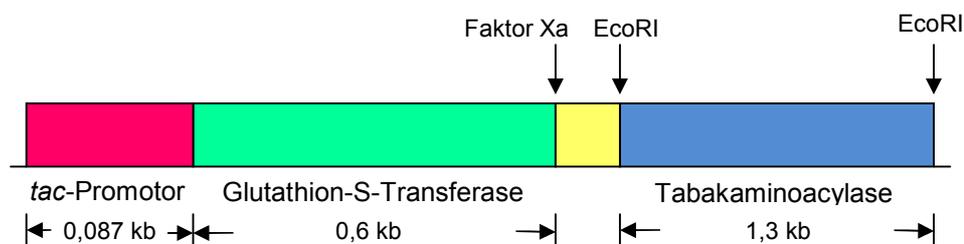


Abb. 4.5-19: Schematische Darstellung von pGEX-3X:NtACY

Durch die Klonierung in den *E. coli*-Expressionsvektor entsteht ein Fusionsprotein aus der Tabakaminoacylase an deren N-Terminus die Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert ist.

4.5.4.1.1 Überexpression des GST-Aminoacylase-Fusionsproteins

Für die Überexpression des GST-Aminoacylase-Fusionsproteins im *E. coli*-Expressionstamm BL21 wurden die Bakterien mit dem leeren Vektor pGEX-3X bzw. mit dem Konstrukt pGEX-3X:NtACY transformiert (3.1.2.2) und nach 3.1.15 weiterverarbeitet. Um die Ergebnisse der einzelnen Schritte auswerten zu können, wurden die uninduzierte Probe (Spur 1 und 15) und die mit IPTG induzierten Proben (Spur 2 bis 5 und Spur 16 bis 19) sowie die restlichen Proben (Spur 6 bis 14 und 20 bis 28) auf einem SDS-Polyacrylamidgel (3.2.5) aufgetrennt.

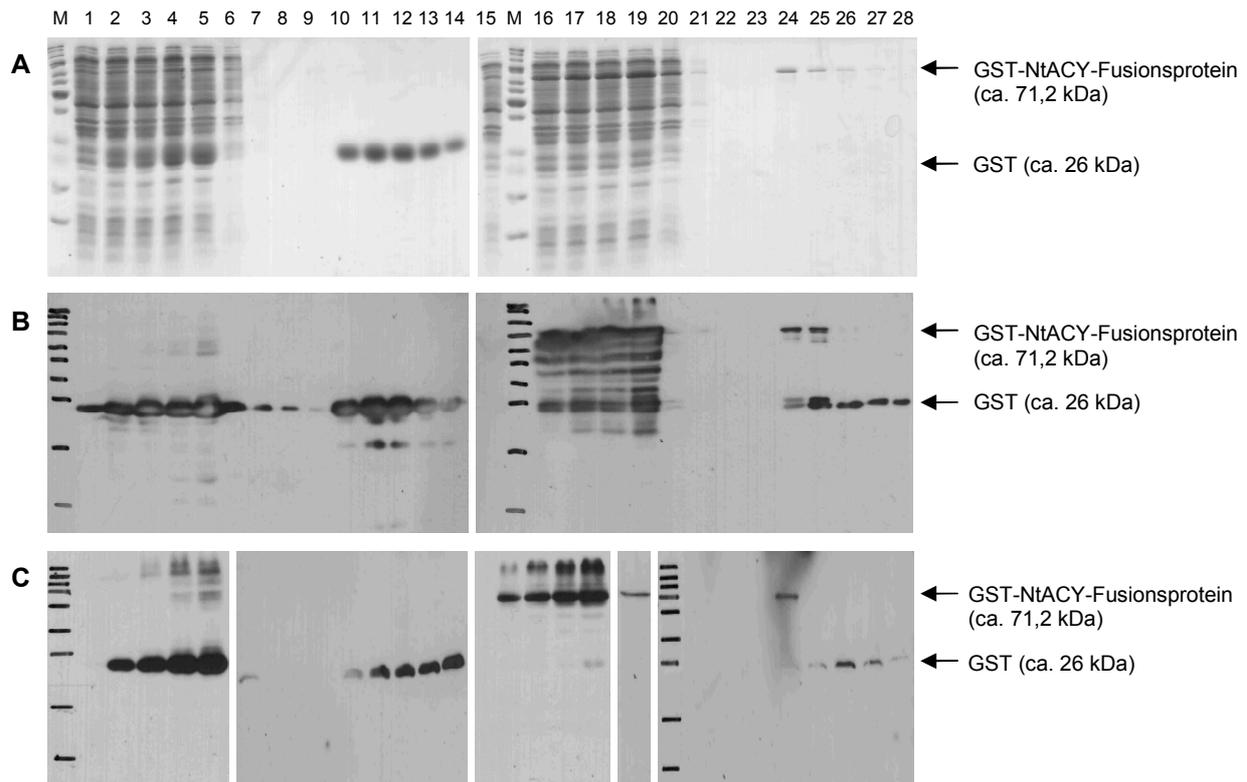


Abb. 4.5-20: Proben der Überexpression von GST bzw. GST-NtACY-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 mittels „Coomassie-Blue“ angefärbt (A), Immundetektion mittels „Rabbit anti-GST“ (B), Immundetektion mittels „ACY1 polyclonal antibody“ (C)

Aufgetragen sind die uninduzierten bzw. induzierten Proben aus *E. coli*, sowie die Waschfraktionen und Eluate. Proben aus BL21 + pGEX-3X (Spur 1 bis 14) sind links und BL21 + pGEX-3X:NtACY (Spur 15 bis 28) sind rechts aufgetragen.

A: Spur M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (#SM0661, MBI Fermentas): 200 kDa, 150 kDa, 120 kDa, 100 kDa, 85 kDa, 70 kDa, 60 kDa, **50 kDa**, 40 kDa, 30 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 10 kDa

B: „Rabbit anti-GST“ (1:1000) wurde als 1. Antikörper für die Detektion von GST und GST-Fusionsproteinen verwendet. Als 2. Antikörper diente „anti-rabbit/HRP“ (1:10000). Spur M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#SM1811, MBI Fermentas): 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, **70 kDa**, 55 kDa, 35 kDa, **27 kDa**, 15 kDa, **10 kDa**

C: Zur Detektion der Aminoacylase sowie GST wurde „ACY1 polyclonal antibody“ (1:3000) als 1. Antikörper verwendet. „Anti-mouse/HRP“ (1:10000) diente als 2. Antikörper. Spur M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#SM1811, MBI Fermentas): 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, **70 kDa**, 55 kDa, 35 kDa, **27 kDa**, 15 kDa, 10 kDa

BL21 + pGEX-3X

Spur 1: uninduziert
 Spur 2: 30 Minuten induziert
 Spur 3: 60 Minuten induziert
 Spur 4: 120 Minuten induziert
 Spur 5: 180 Minuten induziert
 Spur 6: Überstand nach Zugabe der GST-Affinitätsmatrix
 Spur 7: 1. Lösung, die durch die Chromatographiesäule fließt
 Spur 8: 1. Waschfraktion der Matrix
 Spur 9: 2. Waschfraktion der Matrix
 Spur 10: Eluat 1
 Spur 11: Eluat 2
 Spur 12: Eluat 3
 Spur 13: Eluat 4
 Spur 14: Eluat 5

BL21 + pGEX-3X:NtACY

Spur 15: uninduziert
 Spur 16: 30 Minuten induziert
 Spur 17: 60 Minuten induziert
 Spur 18: 120 Minuten induziert
 Spur 19: 180 Minuten induziert
 Spur 20: Überstand nach Zugabe der GST-Affinitätsmatrix
 Spur 21: 1. Lösung, die durch die Chromatographiesäule fließt
 Spur 22: 1. Waschfraktion der Matrix
 Spur 23: 2. Waschfraktion der Matrix
 Spur 24: Eluat 1
 Spur 25: Eluat 2
 Spur 26: Eluat 3
 Spur 27: Eluat 4
 Spur 28: Eluat 5

Nach der Induktion der Expression von GST (26 kDa) bzw. des GST-NtACY-Fusionsproteins (71,2 kDa) mit IPTG wird die entsprechende Bande immer deutlicher. Die Waschfraktionen enthalten zumindest bei der Expression des GST-Aminoacylase-Fusionsproteins kein Protein. In den Waschfraktionen der GST-Expression (Spur 8 und 9) konnte mittels „Rabbit anti-GST“ Antikörper GST-Protein nachgewiesen werden. Vermutlich war ein Überschuss an GST vorhanden, so dass nicht alles an die Matrix binden konnte und deshalb gewaschen wurde. Die Tatsache, dass GST in den Waschfraktionen nur mittels „Rabbit anti-GST“ detektiert werden konnte, ist auf eine etwas geringere Affinität des ACY1-Antikörpers für GST zurückzuführen. Offensichtlich wurde bei Eluat 1 bis 5 (Abb. 4.5-20, B und C, Spur 24 bis 28) nicht nur das GST-Aminoacylase-Fusionsprotein sondern auch GST (26 kDa) eluiert. Da „ACY1 polyclonal antibody“ auch GST nachweist, konnten in Abbildung 4.5-20 (C, Spur 24 bis 28) Banden bei 26 kDa detektiert werden.

Damit der GST-Fusionsanteil die funktionelle Aktivität der Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* für weiterführende Versuche nicht beeinträchtigt, wurde diese mit Hilfe der Protease Faktor Xa (2.9) abgespalten. Hierfür wurde das Eluat 1 zusammen mit 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ und Faktor Xa bei 4 °C über Nacht inkubiert und anschließend auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.2.5).

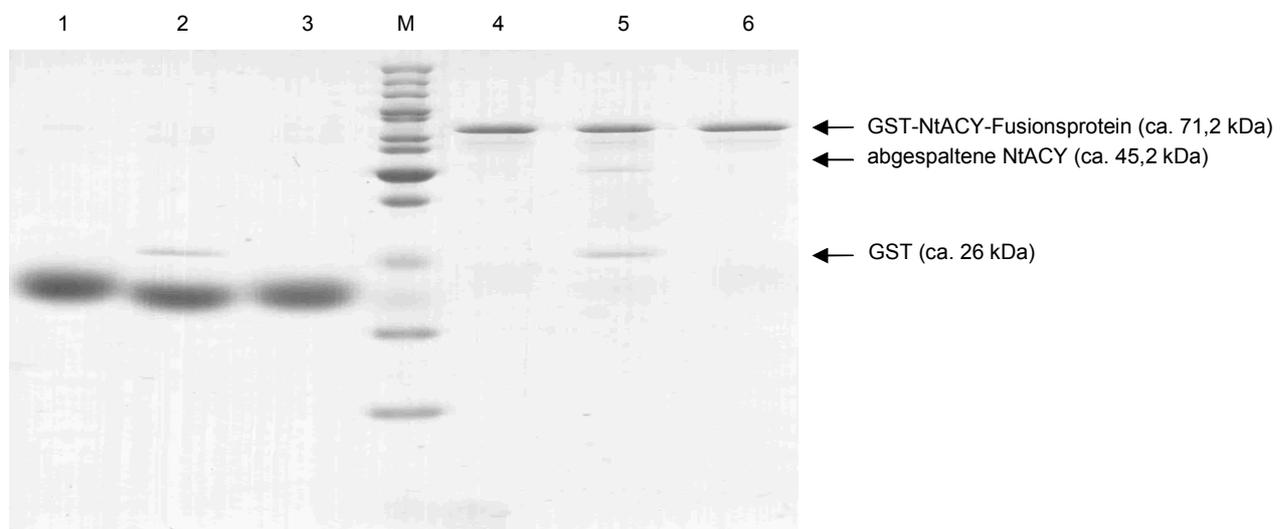


Abb. 4.5-21: Spaltung mit Faktor Xa (NEB, Schwalbach)

Spur 1: BL21 + pGEX-3X (Eluat 1)

Spur 2: BL21 + pGEX-3X (Eluat 1) Spaltung mit Faktor Xa

Spur 3: BL21 + pGEX-3X (Eluat 1) Spaltung ohne Faktor Xa

Spur M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (#SM0661, MBI Fermentas): 200 kDa, 150 kDa, 120 kDa, 100 kDa, 85 kDa, 70 kDa, 60 kDa, **50 kDa**, 40 kDa, 30 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 10 kDa

Spur 4: BL21 + pGEX-3X:NtACY (Eluat 1)

Spur 5: BL21 + pGEX-3X:NtACY (Eluat 1) Spaltung mit Faktor Xa

Spur 6: BL21 + pGEX-3X:NtACY (Eluat 1) Spaltung ohne Faktor Xa

In Spur 5 deutet die Bande bei ca. 71,2 kDa, welche das GST-NtACY-Fusionsprotein nachweist, daraufhin, dass die Spaltung mit Faktor Xa unvollständig verlief. Weiterhin konnte die abgespaltene Aminoacylase mit einer Größe von ungefähr 45,2 kDa (Spur 5) detektiert werden. Die kleinste Bande in Spur 5 ist vermutlich ein Degradationsprodukt, da diese Bande nur in den mit Faktor Xa behandelten Proben (Spur 2 und 5) vorkommt.

4.5.4.1.2 Funktionsanalyse der Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* in vitro

Aus Veröffentlichungen ist bekannt, dass die Funktion der Acylase 1 (Acy1) in der Hydrolyse von neutralen aliphatischen N-Acylaminosäuren unter Abspaltung der Acetatgruppe (Deacetylierung) zur freien Aminosäure liegt (Kordel und Schneider, 1976/1977; Endo, 1980; Gade und Brown, 1981; Heese et al., 1988; Anders und Dekant, 1994; Giardina et al., 1997). Demzufolge wurde die aus Tabak isolierte Aminoacylase in einen Fluoreszenz-Assay eingesetzt, um die Funktion zu testen. Als Substrate dienten N-Acetyl-L-Methionin, N-Acetyl-L-Alanin oder Hippursäure Natriumsalz.

Hierfür wurden wie unter 3.1.18 beschrieben vorgegangen. Die zuvor aus BL21 eluierte Aminoacylase (4.5.4.1.2) wurde einzeln mit verschiedenen Substratlösungen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Trichloressigsäure (TCA) wurde eine Fluorescaminlösung zugegeben, um die Aktivität der Aminoacylase sichtbar zu machen. Die Ansätze wurden unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm qualitativ ausgewertet. Die quantitative Messung erfolgte im SpectraFluor bei einer Excitation von 390 nm und einer Emission von 510 nm.

Fluorescamin reagiert mit deacetylierten Aminogruppen von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen zu einem stark fluoreszierenden Addukt (Udenfriend et al., 1972 und Pushkin et al., 2003).

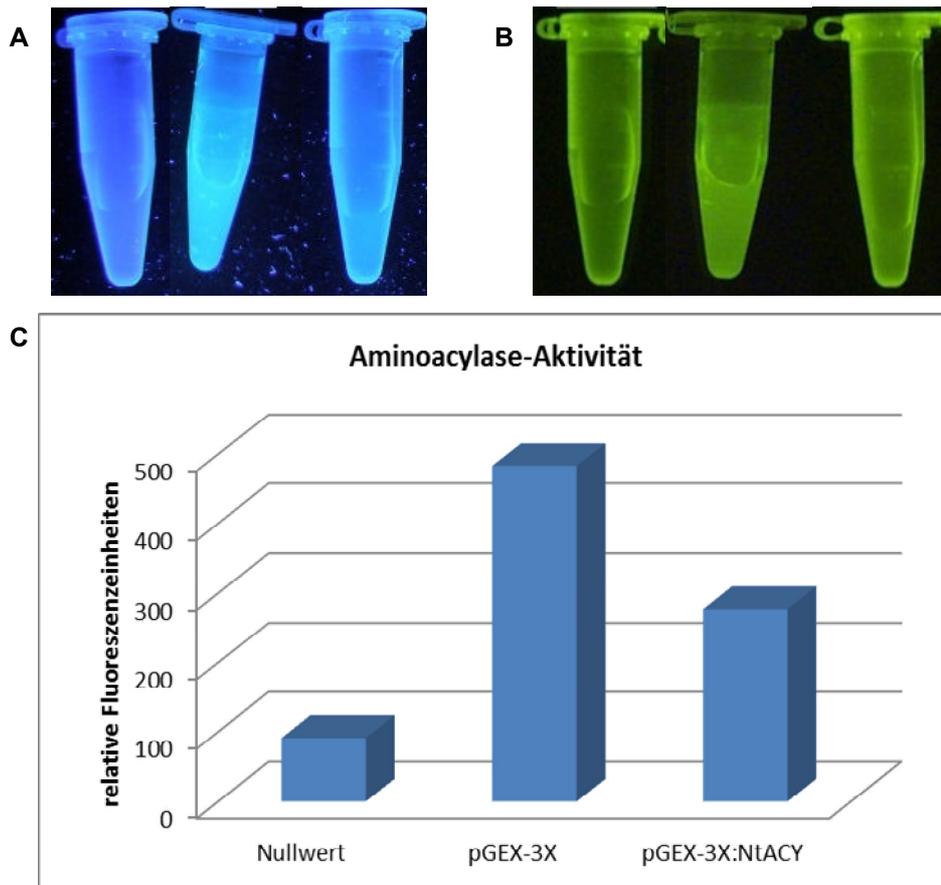


Abb. 4.5-22: Darstellung der Aminoacylase-Aktivität

Die Reaktionsansätze wurden mit einer Wellenlänge von 365 nm (A) bzw. mit UV-Licht (B) beleuchtet. Das Diagramm (C) gibt die gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) an. Links ist jeweils der Ansatz ohne Aminoacylase (Nullwert) abgebildet, in der Mitte der Ansatz mit dem leeren Vektor (pGEX-3X) und rechts der Ansatz mit der Aminoacylase (pGEX-3X:NtACY). Als Substrat diente N-Acetyl-L-Methionin.

Bei einer Wellenlänge von 365 nm und unter UV-Licht kann ein Leuchten der Ansätze mit dem leeren pGEX-3X bzw. mit pGEX-3X:NtACY erkannt werden. Dabei ist auffallend, dass der Ansatz mit dem pGEX-3X eine etwas stärkere Fluoreszenz zeigt als jener mit NtACY. Die RFU-Werte bestätigen dies. Auch würde man bei einer Inkubation über Nacht eine weitaus höhere Aktivität erwarten.

Die Ergebnisse mit N-Acetyl-L-Alanin und Hippursäure als Substrat waren ähnlich und lassen mehrere Schlussfolgerungen zu. Möglicherweise wurde das Enzym bei der Reinigung und Eluierung funktionell inaktiv oder es ist *in vitro* nicht funktionsfähig. Da die Funktion als Aminoacylase lediglich auf Sequenzhomologien durch die Vorhersage von PC-Programmen beruht, kann es durchaus sein, dass dieses Protein (NtACY) eine völlig andere Funktion besitzt.

Auch die Verwendung von BSA (Rinderserumalbumin) zur Stabilisierung des Enzyms zeigte keine verstärkte Aktivität, die auf eine Funktion als Protease schließen lassen würde.

Um dennoch die Aktivität der Aminoacylase *in vivo* zu testen, wurden Infiltrationsexperimente in *Nicotiana benthamiana* durchgeführt.

4.5.5 Transiente Expression der Aminoacylase in *Nicotiana benthamiana*

Weitere Versuche zur Funktion der Aminoacylase wurden in Pflanzen durchgeführt. Als geeignete Pflanzen dienten wildtypische *Nicotiana benthamiana*, die mit einer Agrobaktériensuspension infiltriert und nach einigen Tagen ausgewertet wurden.

4.5.5.1 Klonierung und Expression der Vollängenaminoacylase aus *Nicotiana tabacum*

Die Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* wurde wie unter 4.5.1.1 beschrieben, amplifiziert (3.1.11) und in pTAK35Scah (2.3.13) kloniert.

Zur deutlicheren Darstellung wurde folgende Abbildung erstellt:

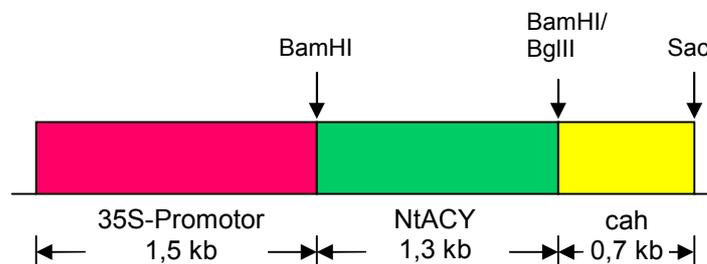


Abb. 4.5-24: Schematische Darstellung der Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* in pTAK35Scah

Durch die Ligation in pTAK35Scah entsteht ein Fusionsprotein aus Aminoacylase an deren C-Terminus sich eine Cyanamidhydratase (cah) befindet.

Durch die Fusion von Aminoacylase und Cyanamidhydratase kann später die Funktionalität des Proteins über einen Cyanamidhydratase-Assay getestet werden.

Nun konnte dieses Konstrukt in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert werden (3.4.1).

4.5.5.2 Infiltrationsexperimente von *Nicotiana benthamiana* mittels Agrobakterien

Mehrere Kolonien des Agrobakterienstammes GV3101, die mit pTAK35Scah:NtACY bzw. pTAK35S:P19 bzw. pTAK35S:CarCP transformiert sind, wurden in MinA-Medium (mit Gentamycin, Rifampicin, Kanamycin) angezogen. Nach Bestimmung der optischen Dichte der Agrobakterienkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde die Kultur abzentrifugiert und die Zellen anschließend mit 10 mM MgCl₂ auf einen OD₆₀₀-Wert zwischen 0,5 und 2 verdünnt. Nachdem die Agrobaktériensuspensionen, die mit pTAK35Scah:NtACY transformiert sind, mit GV3101 + pTAK35S:P19 bzw. pTAK35S:CarCP 1:1 gemischt waren, konnten durch Zugabe von 100 mM Acetosyringon (Endkonzentration zwischen 10 und 100 µM) und einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln die *vir*-Gene aktiviert

werden. Die Infiltration erfolgte mittels 10 ml Omnifix Spritze (ohne Kanüle) auf der Blattunterseite von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen.

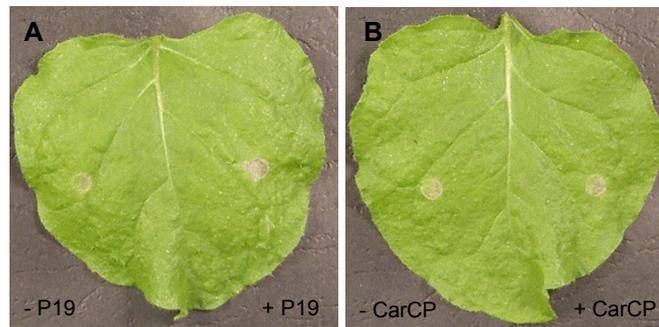


Abb. 4.5-25: Symptome einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze nach der Infiltration mit Agrobakterien

Die Aufnahmen wurden 18 Tage nach der Infiltration gemacht. Auf der jeweils linken Blatthälfte wurde eine Agrobaktériensuspension, die mit pTAK35ScAh:NtACY transformiert sind, infiltriert, auf der rechten Blatthälfte wurde zusätzlich der „silencing suppressor“ P19 (A) bzw. CarCP (B) infiltriert.

Auch 18 Tage nach der Infiltration mit Agrobakterien sind keine Symptome auf den Blättern zu erkennen. Lediglich an der Infiltrationsstelle kommt es zum Absterben von Zellen. Weiterhin ist kein Einfluss durch die zusätzliche Infiltration des „silencing suppressors“ P19 bzw. CarCP zu beobachten.

Zusätzlich wurden Infiltrationsexperimente mit weiteren Konstrukten durchgeführt, die in Agrobakterien des Stammes LBA4404 transformiert sind und Tm-2 bzw. PT30 in pTAK35S exprimieren. *Tm-2* ist ein gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) gerichtetes Resistenzgen, welches ursprünglich aus *Lycopersicon hirsutum* und *L. peruvianum* (Wildtomate) stammt. Bei PT30 handelt es sich um das 30 kDa-Movementprotein von ToMV. Dieses lagert sich in die Plasmodesmata der Pflanzenzellen und wird durch die *tm-2* Resistenzgene erkannt. Die zusätzliche Expression von CarCP löst eine Hypersensitive Reaktion (HR) in der Pflanze aus.

Deshalb führt eine gemeinsame transiente Expression durch Infiltration von Tm-2, CarCP und PT30 zu nekrotischen Symptomen auf der Blattoberfläche von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen. Da es bei transienter Expression der Aminoacylase zu keinen Symptomen kommt, sollte beobachtet werden, ob die zusätzliche Expression der drei Proteine durch die Aminoacylase beeinflusst wird.

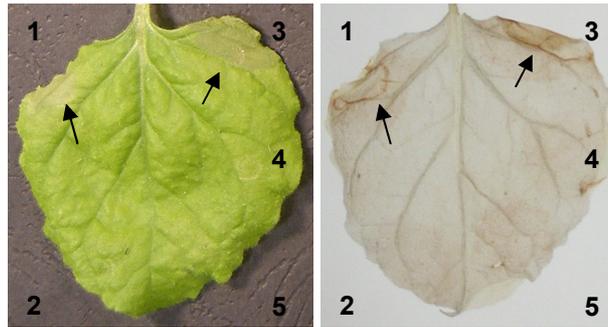


Abb. 4.5-26: Symptome einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze nach der Infiltration mit Agrobakterien

Das Blatt einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze wurde fünf Tage nach der Infiltration mit Agrobakterien fotografiert (links) und anschließend mit DAB angefärbt (rechts).

1 Tm-2, CarCP, PT30, NtACY

2 CarCP, NtACY

3 Tm-2, CarCP, PT30

4 Tm-2, CarCP, NtACY

5 CarCP

Nur an den Infiltrationsstellen 1 (Tm-2, CarCP, PT30 und NtACY) und 3 (Tm-2, CarCP und PT30) kommt es zur Bildung von Apoptose. In diesen Bereichen kann durch eine Anfärbung mit DAB die Anwesenheit von H_2O_2 bestätigt werden. Das Absterben der Zellen an Infiltrationsstelle 1 (Tm-2, CarCP, PT30 und NtACY) und 3 (Tm-2, CarCP und PT30) ist vermutlich auf den Einfluss von Tm-2, CarCP und PT30 (4.3.5) zurückzuführen, wodurch es zur Auslösung der HR kommt.

Um die transiente Expression der Aminoacylase in den Pflanzen nachweisen zu können, wurden je 100 mg Blattmaterial der mit Agrobakterien infiltrierten Bereiche wie unter 3.3.3 beschrieben, verarbeitet und anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt (3.2.5). Das Pflanzenextrakt (Spur 2, 5, 6) wurde nochmals in 1 x SDS Loading Buffer mit DTT aufgenommen und ebenfalls auf dem Gel aufgetrennt (3.2.5). Anschließend wurden die Proben auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (3.2.7.1) und konnten schließlich mit Antikörpern nachgewiesen werden (3.2.7.2).

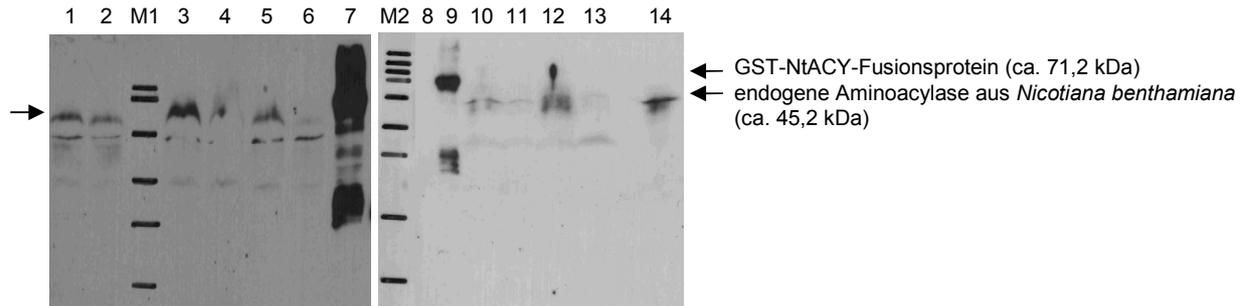


Abb. 4.5-27: Immundetektion von Proteinen aus *Nicotiana benthamiana*, die mit Agrobakterien infiltriert wurden

Aufgetragen sind die Überstände (Spur 1, 3, 4, 10 bis 14) bzw. das Pflanzenextrakt (Spur 2, 5, 6) infiltrierter Pflanzenproben. Als 1. Antikörper gegen die Aminoacylase wurde „ACY1 polyclonal antibody“ (1:3000) verwendet. Dieser wurde mit dem 2. Antikörper „anti-mouse/HRP“ (1:10000) detektiert.

Spur M1: Prestained Protein Molecular Weight Marker (#SM0441, MBI Fermentas): 120 kDa, 86 kDa, 47 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 20 kDa

Spur M2: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#SM1811, MBI Fermentas): 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 27 kDa, 15 kDa, 10 kDa

Spur 1: *N.b.* nicht infiltriert (Überstand)

Spur 2: *N.b.* nicht infiltriert (Blattextrakt)

Spur 3: *N.b.* infiltriert mit NtACY (Überstand)

Spur 4: *N.b.* infiltriert mit NtACY, P19 (Überstand)

Spur 5: *N.b.* infiltriert mit NtACY (Blattextrakt)

Spur 6: *N.b.* infiltriert mit NtACY, P19 (Blattextrakt)

Spur 7: BL21 + pGEX-3X:NtACY (60 Minuten induziert, Positivkontrolle)

Spur 8: BL21 + pGEX-3X:NtACY (uninduziert, Negativkontrolle)

Spur 9: BL21 + pGEX-3X:NtACY (60 Minuten induziert, Positivkontrolle)

Spur 10: *N.b.* infiltriert mit NtACY

Spur 11: *N.b.* infiltriert mit NtACY, CarCP

Spur 12: *N.b.* infiltriert mit NtACY, Tm-2, CarCP, PT30

Spur 13: *N.b.* infiltriert mit NtACY, Tm-2, CarCP

Spur 14: *N.b.* nicht infiltriert

In Spur 7 und 9 konnten bei einer Größe von 71,2 kDa je eine starke Bande nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um das GST-NtACY-Fusionsprotein, dessen Expression durch IPTG induziert wurde (4.5.4.1.2). Bei der kleineren Bande dieser beiden Proben konnte mit einem Molekulargewicht von 26 kDa die Glutathion-S-Transferase (GST) detektiert werden. Da die Größe der endogenen Aminoacylase von *Nicotiana tabacum* 45,2 kDa beträgt und die Aminosäuresequenz zu der von *Nicotiana benthamiana* bis auf einige Aminosäureaustausche fast identisch ist, könnte es sich möglicherweise bei der mittleren Bande in Spur 3 bis 6 und bei der oberen Bande in Spur 10 bis 13 um das endogene Protein der Aminoacylase aus *Nicotiana benthamiana* (Pfeil) handeln, da es auch in den nicht infiltrierten Pflanzen (Spur 1, 2 und 14) detektiert wird. Leider ist nicht eindeutig zu erkennen, ob die obere Bande der Proben in Spur 3, 4 und 5 der Größe des NtACY-cah-

Fusionsproteins (NtACY = 45,2 kDa, cah = 24,4 kDa) entspricht oder ob es sich hierbei um die gleichen Banden wie in Spur 1 und 2 handelt. Letztere sind vermutlich Pflanzenproteine, die mit dem Antikörper kreuzreagieren und somit zu unspezifischen Banden führen.

4.5.5.3 Funktionsanalyse der Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* in vivo

Für eine Funktionsanalyse der Aminoacylase in vivo wurden *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit Agrobakterien, die mit pTAK35Scah bzw. pTAK35Scah:NtACY transformiert sind, infiltriert. Nach drei Tagen konnten die infiltrierten und exprimierten Proteine aus dem Blattmaterial isoliert (3.3.3) und in einen Assay zur Funktionsbestimmung eingesetzt werden. Hierfür wurde wie unter 3.1.18 beschrieben, vorgegangen. Die aus den infiltrierten *Nicotiana benthamiana* isolierten Proteine wurden mit verschiedenen Substratlösungen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Trichloressigsäure (TCA) wurde eine Fluorescaminlösung zugegeben, um die Aktivität der Aminoacylase sichtbar zu machen. Die Ansätze wurden unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm qualitativ ausgewertet. Die quantitative Messung erfolgte im SpectraFluor bei einer Excitation von 390 nm und einer Emission von 510 nm.

Fluorescamin reagiert mit deacetylierten Aminogruppen von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen zu einem stark fluoreszierenden Addukt (Udenfriend et al., 1972; Pushkin et al., 2003).

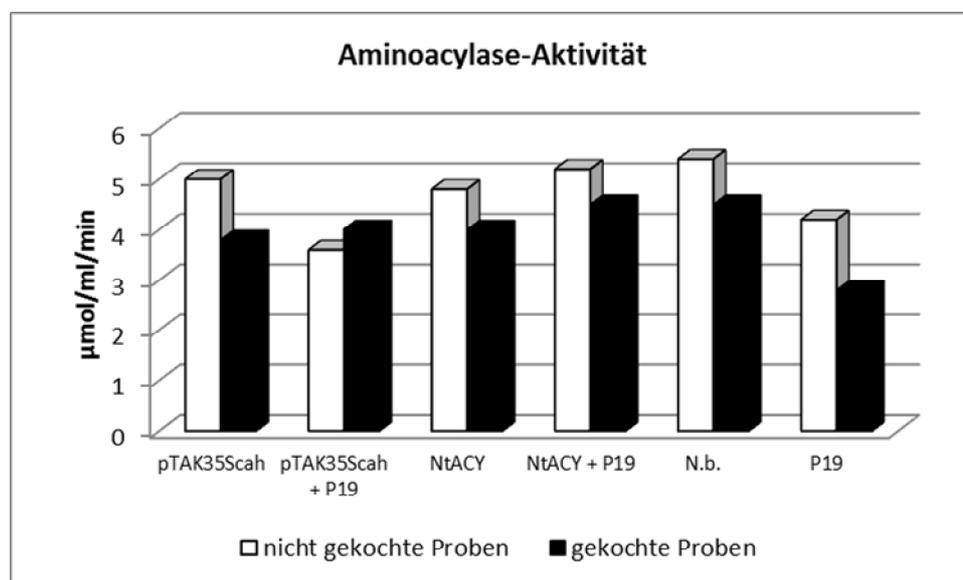


Abb. 4.5-28: Dargestellt ist die Aktivität der Aminoacylase

Die Balken stellen die Werte der Aminoacylase-Aktivität in $\mu\text{mol pro ml pro Minute}$ dar. Die weißen Balken sind Werte von Proben infiltrierter *Nicotiana benthamiana* Pflanzen. Die schwarzen Balken geben die Werte von gekochtem Pflanzenmaterial infiltrierter *Nicotiana benthamiana* Pflanzen an.

Die Werte der Pflanzenproben, die mit pTAK35Scah bzw. pTAK35Scah:NtACY mit und ohne P19 infiltriert wurden und die Probe der nicht infiltrierten Pflanze sind ungefähr gleich hoch. Das bedeutet es konnte keine Aminoacylase-Aktivität der infiltrierten exogenen Tabakaminoacylase gemessen werden. Die Vermutung, dass die gemessene Aktivität durch die endogene Aminoacylase aus *Nicotiana benthamiana* selbst entstanden sein könnte, wird durch die nur gering niedrigeren Werte der abgekochten Proben widerlegt, da hier die Proteine und Enzyme denaturiert und somit inaktiv sein sollten. Somit konnte auch in vivo keine Aminoacylase-Aktivität festgestellt werden.

4.5.5.4 Bestimmung der Cyanamidhydratase-Aktivität

Durch die Klonierung von NtACY in pTAK35Scah entsteht ein Fusionsprotein aus Aminoacylase und Cyanamidhydratase (cah). Die Funktionsfähigkeit der Cyanamidhydratase (und somit des Fusionsproteins aus NtACY und cah) kann durch Abbau des Substrates Cyanamid bestimmt werden. Auf diese Weise kann geklärt werden, ob die Aminoacylase intakt ist.

Hierfür wurden *Nicotiana benthamiana* mit Agrobakterien (pTAK35Scah bzw. pTAK35Scah:NtACY) infiltriert (3.4.3). Drei Tage später konnten die infiltrierten und exprimierten Proteine aus dem Blattmaterial isoliert und in einen Cyanamidhydratase-Enzymassay eingesetzt werden (3.3.4).

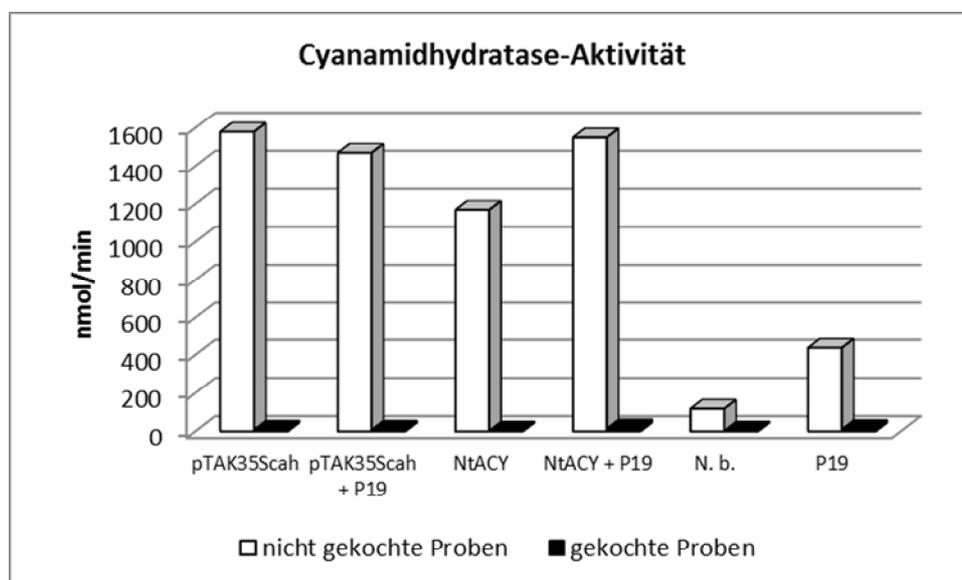


Abb. 4.5-29: Dargestellt ist die Cyanamidhydratase-Aktivität infiltrierter *Nicotiana benthamiana* Pflanzen

Die Balken stellen die Menge (nmol pro Minute) des abgebauten Cyanamids durch die Cyanamidhydratase dar. Die weißen Balken geben die Werte von nicht gekochtem Pflanzenmaterial an, die schwarzen Balken jene von gekochtem Pflanzenmaterial.

Das *cah*-Gen kodiert für das Enzym Cyanamidhydratase, welches die Hydratisierung der Nitrilgruppe von Cyanamid zu Harnstoff katalysiert.

In allen Werten der Proben, welche die Cyanamidhydratase enthalten (pTAK35Scah bzw. pTAK35Scah:NtACY mit bzw. ohne pTAK35S:P19), wurde Cyanamid abgebaut und somit eine Enzymaktivität nachgewiesen (erste vier weiße Balken). Die nicht infiltrierte Probe und jene, die nur mit P19 (pTAK35S:P19) infiltrierte wurde, weisen dagegen keine Aktivität auf. Proteine bzw. Enzyme wie die Cyanamidhydratase werden durch kochen denaturiert und sind somit nicht mehr funktionsfähig (schwarze Balken).

Da in den entsprechenden Proben eine Cyanamidhydratase-Aktivität gemessen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass das Fusionsprotein und somit die Aminoacylase funktionsfähig ist. Die als Aminoacylase postulierte Sequenz besitzt offenbar weder *in vitro* noch *in vivo* eine Aminoacylasefunktion.

4.5.5.5 Untersuchungen möglicher Auswirkungen der Aminoacylase auf Aquaporine

Um dennoch eine Idee über die Funktion bzw. Auswirkungen der Aminoacylase zu bekommen, wurden Blätter einiger *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit Agrobakterien infiltrierte, welche je eins der Aquaporine in Kombination mit der Aminoacylase (NtACY) exprimieren. Da eine Interaktion zwischen NtACY und Aquaporinen in Hefe besteht (4.5.3.1.3), konnte ein möglicher Effekt der Aminoacylase auf die Expression von Aquaporinen in Pflanzen vermutet werden.

Hierfür wurde wie unter 3.4.3 beschrieben, vorgegangen. Damit ein Vergleich zwischen der Expression von Aquaporinen mit bzw. ohne Aminoacylase getroffen werden kann, wurden die infiltrierte Blätter 2 Wochen beobachtet.

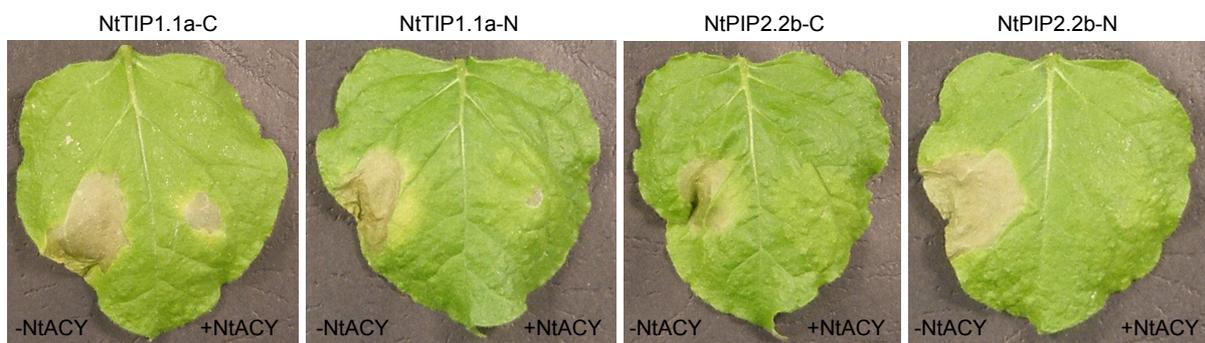


Abb. 4.5-30: Einfluss der Aminoacylase auf die Nekrosenbildung durch Aquaporine

Die linke Blatthälfte wurde jeweils mit Agrobakterien infiltrierte, die eins der Aquaporine exprimieren. Auf der rechten Blatthälfte sind die Auswirkungen der kombinierte Expression von Aminoacylase und Aquaporin zu erkennen.

Erste Anzeichen von Zelltodereignissen traten auf der linken Blatthälfte auf, die mit Agrobakterien, welche mit NtTIP1.1a-C transformiert sind, infiltriert wurde. Einige Tage später bildeten sich auch bei anderen Blättern, die mit Aquaporin exprimierenden Agrobakterien infiltriert wurden Nekrosen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Expression der Aminoacylase einen zelltodinhibierenden Effekt auf die Blätter hat. Apoptose findet ausschließlich auf der mit Aquaporin infiltrierten Seite statt. Allerdings ist die stark zelltodfördernde Wirkung von NtTIP1.1a-C trotz kombinierter Aminoacylase-Expression nicht völlig zu unterdrücken (erstes Foto, rechte Blatthälfte).

Die durch Computer-Programme und NCBI postulierte Funktion einer Acylase für die als Aminoacylase identifizierte Sequenz konnte nicht bestätigt werden. Durch die Fusion mit einer Cyanamidhydratase konnte gezeigt werden, dass die Aminoacylase intakt ist. Dennoch konnte weder *in vitro* noch *in vivo* eine Aminoacylase-Aktivität gemessen werden. Möglicherweise handelt es sich bei der Sequenz nicht um eine Aminoacylase, sondern um eine Protease oder Peptidase.

Eine Interaktion der Aminoacylase mit Aquaporinen in Hefe besteht allerdings. Die Übertragung dieser Funktion in Pflanzen führt zur Unterdrückung der Zelltodinduktion durch Aquaporine *in vivo*.

5 Diskussion

5.1 Identifizierung von Aquaporinen und ihre Bedeutung bzw. Funktion für den PCD in Pflanzen

5.1.1 Untersuchung und Charakterisierung BHRF1-transgener Pflanzen

Zur Überprüfung, ob eine Verbindung zwischen Apoptose in Tieren und PCD in Pflanzen besteht, wurden transgene *Nicotiana tabacum* Pflanzen hergestellt, die BHRF1 exprimieren (Roth, 1999). BHRF1 ist ein Protein des humanen Epstein-Barr Virus und spielt eine Rolle bei der Apoptose. Obwohl BHRF1 ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie ist, kam es zur Bildung von Nekrosen in BHRF1-transgenen Pflanzen. Allerdings wiesen diese Nekrosen Unterschiede zu den typischerweise in der Pathogenabwehr auftretenden Nekrosen auf. Neben der unregelmäßigen Form und stetigen Vergrößerung dieser spontan auftretenden nekrotischen Bereiche konnten noch weitere Unterschiede zu HR-Nekrosen beobachtet werden. Während als Folge der Hypersensitiven Reaktion (HR) aufgrund eines Pathogenbefalls wie z. B. dem Tabakmosaikvirus (TMV) bei Tabakpflanzen mit dem N-Resistenzgen kreisrunde Lokalläsionen entstehen und die Akkumulation von Wasserstoffperoxid und Salicylsäure nachgewiesen werden kann, wurde im Bereich der Spontannekrosen ausschließlich H₂O₂ akkumuliert. Weiterhin wurde unter UV-Licht (365 nm) eine blaue Fluoreszenz an der Peripherie von HR-Nekrosen sichtbar. Sofort nach Einsetzen der Hypersensitiven Reaktion steigt die Salicylsäurekonzentration an, wodurch zwei Tabak-Gene (TOGT1 und TOGT2; Horvath und Chua, 1996; Fraissinet-Tachet et al., 1998), die für Glukosyltransferasen kodieren, induziert werden. Diese Glukosyltransferasen glykosylieren Scopoletin (Fraissinet et al., 1998) und es entsteht Scopolin. Beide (Scopoletin und Scopolin) werden neben weiteren Phenylpropanoiden mit dem größten Teil dieser blauen Fluoreszenz assoziiert (Costet et al., 2002). Da im Fall der Spontannekrosenbildung der Anstieg an Salicylsäure ausblieb, wurde Scopoletin nicht glykosyliert und es entstand kein Scopolin. Folglich kam es zu keiner peripheren Fluoreszenz an den Spontannekrosen.

Allerdings besteht eine Beziehung zwischen den BHRF1 induzierten Spontannekrosen und der HR. Eine Infektion BHRF1-exprimierender Pflanzen mit dem Tabakmosaikvirus führte zunächst zur Bildung HR-typischer Nekrosen. Einige dieser Nekrosen entwickelten eine unregelmäßige Form und breiteten sich aus. Möglicherweise gingen aus diesen HR-Nekrosen Spontannekrosen hervor, denn bei einigen dieser nekrotischen Bereiche konnte im Innern des toten Blattgewebes der Umriss der HR-Nekrose noch erkannt werden. Ob diese Veränderung der Nekrosen durch das Virus ausgelöst wurde oder ob es an diesen Stellen sowieso zur Bildung von Spontannekrosen gekommen wäre, ist unklar. Vermutlich wird aber durch die TMV-induzierte HR die Bildung der Spontannekrosen verstärkt ausgelöst.

Die Behandlung mit Pelargonsäure hatte dagegen auf BHRF1-transgene Pflanzen keine anderen Auswirkungen als auf Kontrollpflanzen. Pflanzen, die mit dieser Fettsäure behandelt wurden, entwickelten ein bis mehrere nekrotische Bereiche, welche zunächst braun gefärbt waren und später heller wurden. Dabei konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen BHRF1-transgenen Pflanzen und Kontrollpflanzen beobachtet werden. Weiterhin kam es zu keiner Veränderung in der Form und Anzahl dieser nekrotischen Bereiche. Bei der Behandlung von Pflanzen mit Pelargonsäure dringt dieses umweltfreundliche Herbizid in die Membran der Pflanzenzelle ein und zerstört diese. Als Folge davon entwickeln die Pflanzen nekrotische Bereiche, die die abgestorbenen Zellen kennzeichnen.

Da die Akkumulation von Salicylsäure und Phenylpropanoiden bei Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen nicht beobachtet werden konnte, muss es hierfür eine andere Erklärung geben. Demnach laufen bei der Bildung von Spontannekrosen BHRF1-transgener Pflanzen andere Prozesse ab als bei der Hypersensitiven Reaktion.

Um diesem Sachverhalt auf den Grund zu gehen, wurde eine Tabak cDNA-Bank nach möglichen Interaktionspartnern für BHRF1 durchsucht (Maile, 2001). Hierbei wurden unter anderem cDNA-Klone für zwei unterschiedliche Aquaporine identifiziert.

5.1.2 Analyse der Funktion und Interaktion von Aquaporinen

Die Durchsuchung einer Tabak cDNA-Bank brachte zwei unterschiedliche Aquaporine als Interaktionspartner für BHRF1 zu Tage.

5.1.2.1 Sequenzanalyse der Aquaporinkonstrukte

Die Sequenzen der Aquaporin exprimierenden Hefekonstrukte wurden untersucht und analysiert. Anschließend wurden die Sequenzen der Aquaporine mit dem Programm Vector NTI (Invitrogen) translatiert und mit Hilfe des Blast-Programmes (Altschul et al., 1990) mit verschiedenen Datenbanken (NCBI und Arabidopsis.org) verglichen.

Die beiden Klone, die sich als PIPs („plasmamembrane intrinsic proteins“) herausstellten, wurden mit NtPIP2.2a und NtPIP2.2b benannt. Die Sequenz beider Proteine unterscheidet sich in nur einer Aminosäure (Threonin → Alanin) voneinander. Während NtPIP2.2a zum Wurzelprotein PR16 aus *Nicotiana tabacum* (Wang et al., 2000) identisch ist, trägt NtPIP2.2b an Position 35 ein Alanin. Beide Tabakaquaporine (NtPIP2.2a und NtPIP2.2b) weisen auf Aminosäureebene eine 92 % Identität zu MIP2-like von *Solanum tuberosum* auf und sind zu 84 % identisch zu AtPIP2.2 aus *Arabidopsis thaliana*.

MTKEVEVATEQPTEFSAKDYTDPPPAPLVDFFEELTCWSLYRAVIAEFTIAT	PR16 <i>N. tabacum</i>
MTKEVEVATEQPTEFSAKDYTDPPPAPLVDFFEELTCWSLYRAVIAEFTIAT	NtPIP2.2a <i>N. tabacum</i>
MTKEVEVATEQPTEFSAKDYTDPPPAPLVDFFEELTCWSLYRAVIAEFTIAT	NtPIP2.2b <i>N. tabacum</i>
MTKEVEAVHEQAAEYSAKDYTDPPPAPLIDFFEELTKWSLYRAVIAEFTIAT	MIP2-like <i>S. tuberosum</i>
MAKDVEG----PEGFQTRDYE DP PPPTFFDADELTKWSLYRAVIAEFTIAT	AtPIP2.2 <i>A. thaliana</i>
MTKEVEVATEQPTEFSAKDYTDPPPAPLVDFFEELTCWSLYRAVIAEFTIAT	Consensus
LLFLYITVLTIVIGYKQSDVKA DG DI CG GVGILGIAWAFGGMIFILVYCT	PR16 <i>N. tabacum</i>
LLFLYITVLTIVIGYKQSDVKA DG DI CG GVGILGIAWAFGGMIFILVYCT	NtPIP2.2a <i>N. tabacum</i>
LLFLYITVLTIVIGYKQSDVKA DG DI CG GVGILGIAWAFGGMIFILVYCT	NtPIP2.2b <i>N. tabacum</i>
LLFLYITVLTIVIGYKHQADV DAG GDV CG GVGILGIAWAFGGMIFILVYCT	MIP2-like <i>S. tuberosum</i>
LLFLYITVLTIVIGYKIQSDTKAGGV D CGGVGILGIAWAFGGMIFILVYCT	AtPIP2.2 <i>A. thaliana</i>
LLFLYITVLTIVIGYKQSDVKA DG DI CG GVGILGIAWAFGGMIFILVYCT	Consensus
AGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVGFVKAFQS	PR16 <i>N. tabacum</i>
AGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVGFVKAFQS	NtPIP2.2a <i>N. tabacum</i>
AGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVGFVKAFQS	NtPIP2.2b <i>N. tabacum</i>
AGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVGFVKAFQS	MIP2-like <i>S. tuberosum</i>
AGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVGFVKAFQS	AtPIP2.2 <i>A. thaliana</i>
AGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVGFVKAFQS	Consensus
AYYVRYGGGANVMAPGHTKGVGLAAEIIIGTFVLVYTVFSATDPKRNARDS	PR16 <i>N. tabacum</i>
AYYVRYGGGANVMAPGHTKGVGLAAEIIIGTFVLVYTVFSATDPKRNARDS	NtPIP2.2a <i>N. tabacum</i>
AYYVRYGGGANVMAPGHTKGVGLAAEIIIGTFVLVYTVFSATDPKRNARDS	NtPIP2.2b <i>N. tabacum</i>
AYYNRYGGGVNMAPGHTKGVGLAAEIIIGTFVLVYTVFSATDPKRNARDS	MIP2-like <i>S. tuberosum</i>
SYD R RYGGGANSLADGYN T GTGLAAEIIIGTFVLVYTVFSATDPKRNARDS	AtPIP2.2 <i>A. thaliana</i>
AYYVRYGGGANVMAPGHTKGVGLAAEIIIGTFVLVYTVFSATDPKRNARDS	Consensus
HVPVLAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNHDKAWDEH	PR16 <i>N. tabacum</i>
HVPVLAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNHDKAWDEH	NtPIP2.2a <i>N. tabacum</i>
HVPVLAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNHDKAWDEH	NtPIP2.2b <i>N. tabacum</i>
HVPVLAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVFN GD KAWDEH	MIP2-like <i>S. tuberosum</i>
HVPVLAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYN KSK PWDLH	AtPIP2.2 <i>A. thaliana</i>
HVPVLAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNHDKAWDEH	Consensus
WIFWVGPFIGAF AAAVYHQ FILRAGAIKALGSFRSNA	PR16 <i>N. tabacum</i>
WIFWVGPFIGAF AAAVYHQ FILRAGAIKALGSFRSNA	NtPIP2.2a <i>N. tabacum</i>
WIFWVGPFIGAF AAAVYHQ FILRAGAIKALGSFRSNA	NtPIP2.2b <i>N. tabacum</i>
WIFWVGPFIGAF IAAVYHQY ILRAGAIKALGSFRSNA	MIP2-like <i>S. tuberosum</i>
WIFWVGPFIGAA IAAFYHQFVLR ASGSKSLGSFRSAA	AtPIP2.2 <i>A. thaliana</i>
WIFWVGPFIGAFIAAVYHQFILRAGAIKALGSFRSNA	Consensus

Abb. 5.1-1: Vergleich der Aminosäuresequenzen von PR16, NtPIP2.2a, NtPIP2.2b, MIP2-like und AtPIP2.2

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen des Wurzelproteins PR16 und der zwei Aquaporine NtPIP2.2a und NtPIP2.2b aus *Nicotiana tabacum* sowie MIP2-like aus *Solanum tuberosum* und Aquaporin AtPIP2.2 aus *Arabidopsis thaliana*. Die gelb markierten Aminosäuren weisen auf konservierte Bereiche in allen fünf Sequenzen hin. Bei den blau hinterlegten Aminosäuren handelt es sich um Aminosäuren, die in mindestens zwei Sequenzen identisch sind. Grün markierte Aminosäuren stellen konservative AS-Austausche dar. Consensus benennt die Aminosäuren, die bei mindestens zwei der fünf Proteine identisch sind. Die beiden hochkonservierten NPA-Motive (Asparagin-Prolin-Alanin), die nahezu alle Mitglieder der MIP-Familie enthalten, sind unterstrichen.

Die Sequenz, die als TIP („tonoplast intrinsic protein“) identifiziert und mit NtTIP1.1a betitelt wurde, stimmt zu 100 % mit jener des Aquaporin 1 aus *Nicotiana tabacum* (NtAQP1; Weig, Sonnewald, Chrispeels, Accessionnummer: Y08161, NCBI) überein. Zur Sequenz von

AtTIP1.1, das übrigens mit dem γ -TIP aus *Arabidopsis thaliana* (gamma-TIP; Maurel et al., 1993) übereinstimmt, besteht eine 77 % Identität auf Aminosäureebene.

MPIHQIAVGSHEELRQSGTLKAALAEFICTLIFFVFAQQSGMAFNKLSAD	Aquaporin 1 <i>N. tabacum</i>
MPIHQIAVGSHEELRQSGTLKAALAEFICTLIFFVFAQQSGMAFNKLSAD	NtTIP1.1a <i>N. tabacum</i>
MPIRNIAIGRPDEATRDPDLKAALAEFIS ^Y TLIFVFAQS ^Y GSGMAFNKLSAD ^Y EN	AtTIP1.1 <i>A. thaliana</i>
MPIHQIAVGSHEELRQSGTLKAALAEFICTLIFFVFAQQSGMAFNKLSAD	Consensus
GTATPAGLISASIAHAFGLFVAVSVGANISGGHVNPVTFGAFVGGNITL	Aquaporin 1 <i>N. tabacum</i>
GTATPAGLISASIAHAFGLFVAVSVGANISGGHVNPVTFGAFVGGNITL	NtTIP1.1a <i>N. tabacum</i>
GATTPSGLVAAVAHAFGLFVAVSVGANISGGHVNPVTFGAFVGGNITL	AtTIP1.1 <i>A. thaliana</i>
GTATPAGLISASIAHAFGLFVAVSVGANISGGHVNPVTFGAFVGGNITL	Consensus
FRGILYIVAQLLGSTVACFLLEFATGGMSTGAFALSAGVSVWNAFVFEIV	Aquaporin 1 <i>N. tabacum</i>
FRGILYIVAQLLGSTVACFLLEFATGGMSTGAFALSAGVSVWNAFVFEIV	NtTIP1.1a <i>N. tabacum</i>
LRGILYWIAQLLGSVVA ^Y CLL ^Y LFATGGLA ^Y VPAFGLSAGVGV ^Y LNAFVFEIV	AtTIP1.1 <i>A. thaliana</i>
FRGILYIVAQLLGSTVACFLLEFATGGMSTGAFALSAGVSVWNAFVFEIV	Consensus
MTFGLVYTVYATAVDPKKGDLGVIAPIAIGFIVGANILAGGAFTGASMNP	Aquaporin 1 <i>N. tabacum</i>
MTFGLVYTVYATAVDPKKGDLGVIAPIAIGFIVGANILAGGAFTGASMNP	NtTIP1.1a <i>N. tabacum</i>
MTFGLVYTVYATAIDPKNGSLGTIAPIAIGFIVGANILAGGAFTGASMNP	AtTIP1.1 <i>A. thaliana</i>
MTFGLVYTVYATAVDPKKGDLGVIAPIAIGFIVGANILAGGAFTGASMNP	Consensus
AVSFGPALVSWTWT ^Y HQWVYWAGPLVGGGIAGV ^Y VYELIFINHSHEFLPSGD	Aquaporin 1 <i>N. tabacum</i>
AVSFGPALVSWTWT ^Y HQWVYWAGPLVGGGIAGV ^Y VYELIFINHSHEFLPSGD	NtTIP1.1a <i>N. tabacum</i>
AVAFGPAVSVSWTWTNH ^Y WVYWAGPLVGGGIAGL ^Y IYEVFFINTTHEQLPTD	AtTIP1.1 <i>A. thaliana</i>
AVSFGPALVSWTWT ^Y HQWVYWAGPLVGGGIAGV ^Y VYELIFINHSHEFLPSGD	Consensus

F Aquaporin 1 *N. tabacum*
F NtTIP1.1a *N. tabacum*
Y AtTIP1.1 *A. thaliana*
F Consensus

Abb. 5.1-2: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Aquaporin 1 (NtAQP1), NtTIP1.1a und AtTIP1.1

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Aquaporine NtAQP1 und NtTIP1.1 aus *Nicotiana tabacum* und AtTIP1.1 jenem aus *Arabidopsis thaliana*. Bei den gelb hinterlegten Aminosäuren handelt es sich um konservierte Bereiche in allen drei Sequenzen. Blau markierte Aminosäuren kommen in mindestens zwei Sequenzen vor. Die grün gekennzeichneten Aminosäuren stellen konservative AS-Austausche dar. Consensus benennt die Aminosäuren, die bei mindestens zwei der drei Aquaporine identisch sind. Die beiden hochkonservierten NPA-Motive (Asparagin-Prolin-Alanin), die in nahezu allen „major intrinsic proteins“ (MIPs) vorkommen, sind unterstrichen.

Da der Vergleich der Aminosäuresequenzen mit den beiden Datenbanken (NCBI und Arabidopsis.org) zu Proteinen mit unterschiedlichen Homologien führte, wurden die beiden Aquaporine NtPIP2.2b und NtTIP1.1a ebenfalls mit Hilfe des Vector NTI Programmes miteinander verglichen. Die Sequenzen der beiden Proteine weisen zueinander eine 37 % Identität auf Aminosäureebene auf.

Weiterhin wurden die Sequenzen des humanen Aquaporin 1 (hAQP1) und die des Rattenaquaporin 8 (rAQP8) isoliert (Köber, 2008), um zusätzliche Informationen über mögliche Verbindungen zwischen Apoptose in Tieren und PCD in Pflanzen zu bekommen. Das humane Aquaporin 1 wurde ebenfalls in den Aminosäurevergleich mit einbezogen. Es

dennoch zu unterschiedlichen Ergebnissen kam, könnte möglicherweise auf die Position dieser Punktmutation, die sich 10 Aminosäuren „upstream“ des konservierten AEF-Motivs befindet, zurückzuführen sein. Wie aus einer Veröffentlichung von Zardoya und Villalba (2001) hervor geht, sind Aminosäuren, welche an die konservierten Motive angrenzen innerhalb einzelner Gruppen konserviert und wahrscheinlich für die unterschiedliche Funktion innerhalb dieser Gruppe verantwortlich. Zudem sind pflanzliche PIPs untereinander viel homologer als Aquaporine anderer Gruppen.

Alle dargestellten Sequenzen besitzen die für Proteine der MIP-Familie charakteristischen konservierten Bereiche. Die AEF-Box (Alanin-Glutaminsäure-Phenylalanin) befindet sich in der N-terminalen Hälfte des Aquaporins innerhalb der ersten Transmembrandomäne (TM1) (Zardoya und Villalba, 2001). Die beiden hochkonservierten NPA-Motive (Asparagin-Prolin-Alanin; Reizer et al., 1993; Chrispeels und Agre, 1994; Park und Saier, 1996) kommen in nahezu allen Aquaporinen zweimal vor und befinden sich in „loop“ B und „loop“ E (Cheng et al., 1997; Li et al., 1997; Walz et al., 1997; Mitsuoka et al., 1999; Scheuring et al., 1999). Beide NPA-Motive dieser „loops“ stellen die eigentliche Pore dar und sind in der Lipiddoppelschicht lokalisiert. Während „loop“ B sich zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne (TM2 und TM3) befindet, verbindet „loop“ E die Transmembrandomänen 5 und 6. Durch diese Anordnung entsteht ein „tandem-repeat“ aus TM1, TM2, „loop“ B, TM3 (erste Wiederholung) und TM4, TM5, „loop“ E, TM6 (zweite Wiederholung). Dabei sind die beiden „repeats“ um 180° zueinander gedreht. Dies ermöglicht einen bidirektionalen Transport (Preston und Agre, 1991) von Wasser und anderen kleinen Molekülen durch die Poren der Aquaporine.

Die Aquaporine NtPIP2.2a, NtPIP2.2b und NtTIP1.1a wurden aus einer Tabak cDNA-Bank isoliert, indem sie in einem Hefezweihybridsystem mit BHRF1 interagierten. Deshalb sollten diese Aquaporine eine gemeinsame Bindungsdomäne für die Interaktion mit BHRF1 besitzen, obwohl es sich hierbei um unterschiedliche Proteine handelt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von NtPIP2.2b und NtTIP1.1a identifizierte mehrere konservierte Bereiche. Neben dem starkkonservierten Aminosäurebereich AS₁₀₃-AS₁₁₅ ISGGHINPAVTFG (NtPIP2.2b), der das 1. konservierte NPA-Motiv enthält, konnten noch zwei weitere homologe Aminosäureabfolgen entdeckt werden: AS₁₂₆-AS₁₃₄ RAVLYMVAQ und AS₁₈₃-AS₁₈₉ LVYTVFS (NtPIP2.2b). Die Bedeutung dieser Homologien für die Interaktion wird unter 5.1.2.5 geklärt.

5.1.2.2 Lokalisation und Expression der Aquaporin-GFP-Fusionsproteine in transgenen Hefen

Durch die Herstellung von Aquaporin-GFP-Fusionsproteinen ist es möglich mittels grüner Fluoreszenz von GFP die Lokalisation der Aquaporine im Fluoreszenzumkehrmikroskop zu

bestimmen. Hefezellen, die ausschließlich GFP exprimierten, wiesen im gesamten Zytoplasma der Zelle und im Zellkern eine grüne Fluoreszenz auf. Diese gleichmäßige Fluoreszenz von nichtfusioniertem GFP wurde ebenfalls von Rubino (Rubino, 2000) beschrieben. Das kleine nur 27 kDa große GFP gelangt vermutlich mittels Diffusion durch die Kernporen ins Nukleoplasma. Da GFP keine Signalsequenz für eine Vakuolenlokalisierung besitzt, bleibt eine Akkumulation innerhalb dieser Zellkompartimente aus (Banta et al., 1988). Eine Expression des NIMIN-GFP-Fusionsproteins führte dagegen zu einer grünen Kernfluoreszenz, da es sich hierbei um ein Protein mit Kernlokalisierungssignal (NLS) handelt (Weigel et al., 2001). Aquaporin-GFP-Fusionsproteine bildeten wiederum hauptsächlich kreisrunde grüne Bereiche, die auf eine Lokalisation innerhalb der Vakuolenmembran deuten. Auch die tierischen Aquaporine hAQP1 und rAQP8 zeigten diese Form der Fluoreszenz. Die postulierte Trennung der pflanzlichen Aquaporine in TIPs („tonoplast intrinsic proteins“) und PIPs („plasmamembrane intrinsic proteins“) aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation innerhalb der Pflanzenzelle konnte nicht bestätigt werden. Allerdings wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass MIPs in mehr als nur einer Membran oder Zellkompartiment vorkommen (Barkla et al., 1999; Liu et al., 2003). TIPs wurden z. B. neben der Lokalisation in der Vakuolenmembran (Tonoplast) auch in anderen intrazellulären Membranen gefunden (Liu et al., 2003), ebenso wie PIPs, die nicht alle in der Plasmamembran verankert sind (Barkla et al., 1999). Die Tatsache, dass sich teilweise mehr als ein grünfluoreszierender Bereich in den Hefezellen befand, könnte zum einen auf mehrere Vakuolen innerhalb einer Hefezelle schließen (Wickner, 2002). Zum anderen könnten durch eine Überexpression der Aquaporin-GFP-Fusionsproteine durch den starken MET25-Promotor (2.3.5) während der Translation diese Proteine innerhalb des ER (Endoplasmatisches Retikulum) akkumulieren (Nakatsukasa et al., 2008). Die Tatsache, dass keinerlei Fluoreszenz an der Plasmamembran sichtbar war, könnte dadurch erklärt werden, dass es sich bei den verwendeten Aquaporinen ausschließlich um Tonoplast assoziierte Proteine handeln könnte. Da dies aber aufgrund der Sequenzhomologie eher unwahrscheinlich ist, wird vermutet, dass die Einlagerung dieser MIPs an der Plasmamembran weniger dicht ist als an der Vakuolenmembran. Die geringe Größe einer Hefevakuole führt durch die Integration gleichvieler GFP-Membranproteine zu einer deutlich stärkeren Fluoreszenz an der Vakuolenmembran als an der flächenmäßig größeren Plasmamembran.

Bei der Immundetektion von Aquaporin-GFP-Fusionsproteinen (4.2.3) konnten für die Aquaporine NtPIP2.2b, NtPIP2.2a, AtTIP1.1, mAtPIP2.2, AtPIP2.2m und hAQP1 jeweils eine Bande in der Größenordnung einer monomeren Verbindung (ein AQP-Monomer = 25,2 bis 28,56 kDa und ein GFP = 27 kDa) zwischen Membranprotein und GFP detektiert werden. Das Aquaporin-GFP-Fusionsprotein von NtTIP1.1a konnte nur sehr schwach und jenes von

rAQP8 überhaupt nicht nachgewiesen werden. Allerdings war eine Detektion der rAQP8-GFP-Fusionsproteine mittels Fluoreszenzumkehrmikroskops möglich. Zusätzlich konnten dimere Aquaporin-GFP-Verbindungen von NtPIP2.2b, AtTIP1.1, mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m isoliert und immundetektiert werden. NtPIP2.2b konnte sogar als Polymer aus den Hefezellen isoliert werden. Wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, bilden Aquaporine tetramere Verbindungen, wobei jedes einzelne Monomer eine eigene funktionsfähige Pore besitzt. An jedes Monomer ist ein GFP fusioniert. Weiterhin war die Expression von GFP in allen GFP bzw. Aquaporin-GFP-Fusionsprotein exprimierenden Hefen detektierbar. Die Gegebenheit, dass überall auch nichtfusioniertes GFP vorhanden war, könnte an einer etwas instabilen Bindung zwischen den Aquaporinen und GFP liegen. Diese ist offenbar teilweise bei der Isolierung der Fusionsproteine aus den Hefezellen aufgebrochen, denn mittels Fluoreszenzmikroskops konnte dies nicht beobachtet werden. Außerdem wurde dieser Sachverhalt nur in sehr geringem Maß bei der Immundetektion beobachtet.

5.1.2.3 Einfluss und Detektion von H₂O₂ auf Aquaporin exprimierende Hefen

Um herauszufinden, wodurch die Bildung der Spontanekrosen BHRF1-transgener Pflanzen ausgelöst wird, wurden Aquaporin-GFP-Fusionsproteine in H₂O₂-sensitiven Hefestämmen exprimiert. Die Akkumulation von H₂O₂ im Bereich der Spontanekrosen, die Identifizierung von Aquaporinen als Interaktionspartner für BHRF1 und dessen anti-apoptotische Eigenschaft führte zu der Schlussfolgerung, dass diese MIPs möglicherweise bei der Entstehung der Spontanekrosen involviert sind.

Durch die Behandlung Aquaporin-GFP-Fusionsprotein exprimierender Hefen mit Wasserstoffperoxid konnte diese Vermutung bestätigt werden. Während die beiden Wildtyp-Hefestämme (Cen.PK2 und BY4741) relativ unempfindlich gegenüber H₂O₂ waren, zeigten sich die mutierten Stämme (YHR206w und YML007w) je nach Aquaporinexpression mehr oder weniger sensitiv in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Anders als der Hefestamm YHR206w, der eine Mutation im *skn7* Gen besitzt, wurde bei den Zellen des Stammes YML007w das *yap1* Gen deletiert. Beide Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Genen für die Antwort auf oxidativen Stress regulieren (Godon et al., 1998/1999). Deshalb besitzen die beiden Stämme eine besonders hohe Empfindlichkeit gegen oxidativen Stress bzw. die Behandlung mit H₂O₂. Hefen des Stammes YML007w zeigten deutlichere Effekte aufgrund der Aquaporinexpression und H₂O₂-Zugabe. Während die Expression von AtTIP1.1 in allen vier Hefestämmen und die Expression von hAQP1 in YML007w zu Zelltod führten, zeigten sich bei der Expression der übrigen Aquaporine Unterschiede im Wachstum und in der Empfindlichkeit gegenüber H₂O₂. YHR206w-Stämme, die die beiden AtPIP2.2 (mAtPIP2.2 und AtPIP2.2m) exprimierten, zeigten in Kombination mit BHRF1wt verringertes Wachstum. Hefen, die NtTIP1.1a, AtTIP1.1, mAtPIP2.2 und

AtPIP2.2m exprimierten, wuchsen mit zusätzlicher Expression von BHRF1 Δ TMwt gar nicht mehr. YHR206w-Linien, die mit den Aquaporinen NtPIP2.2b und NtPIP2.2a in Kombination mit dem deletierten BHRF1 (BHRF1 Δ TMwt) transformiert wurden, wiesen eine erhöhte H₂O₂-Sensitivität im Vergleich zur Expression mit BHRF1wt auf. Auch die alleinige Expression von BHRF1 Δ TMwt führte zu reduziertem Wachstum in Anwesenheit von H₂O₂. Der Hefestamm YML007w reagierte bei Aquaporinexpression noch empfindlicher auf H₂O₂. Alle YML007w-Zellen, die Aquaporine exprimierten, hatten Schwierigkeiten mit dem Wachstum, wenn sich H₂O₂ im Medium befand. Diese Sensitivität konnte durch die zusätzliche Expression von BHRF1 beeinflusst werden. Während Hefen des Stammes YML007w, welche eins der beiden Tabakaquaporine NtPIP2.2b und NtPIP2.2a exprimierten durch BHRF1wt weniger empfindlich auf H₂O₂ reagierten, zeigten jene mit NtTIP1.1a-Expression keine Veränderung im Wachstum. Durch die starke Interaktion mit NtPIP2.2b (4.4.4.1.1) befindet sich BHRF1wt vermutlich in der Pore und verschließt diese größtenteils. Da YML007w-Zellen mit NtPIP2.2a-Expression bei Anwesenheit von H₂O₂ ähnlich reagierten und sich nur in einer Aminosäure (Alanin \rightarrow Threonin) von NtPIP2.2b unterscheiden, könnten hier ähnliche Prozesse ablaufen. Allerdings konnte die Interaktion als C-terminale Fusion (pBT3-C:NtPIP2.2a) mit BHRF1wt nicht getestet werden. Weiterhin interagiert NtPIP2.2a als N-terminale Fusion (pBT3-N:NtPIP2.2a) stärker als NtPIP2.2b (pBT3-N:NtPIP2.2b) mit BHRF1wt. Da die Fusion der Aquaporine in pYEGFP jener in pBT3-C entspricht, kann ein zuverlässiger Vergleich nur mit C-terminalen Fusionen getroffen werden, da NtPIP2.2b als N-terminale Fusion (in pBT3-N) inaktiv zu sein scheint. Die Interaktion mit BHRF1wt führte zu keiner Veränderung in der H₂O₂-Sensitivität NtTIP1.1a exprimierender Hefen. Dies könnte eventuell auf die schwache H₂O₂-Transportfähigkeit zurückzuführen sein. Dagegen trat eine Verschlechterung im Wachstum bei der Ko-Expression von BHRF1wt und mAtPIP2.2, AtPIP2.2m bzw. rAQP8 auf. Während rAQP8 und AtPIP2.2m nicht mit BHRF1wt interagierten, kam es zu einer sehr schwachen Interaktion zwischen mAtPIP2.2 und BHRF1wt. Es ist deshalb unklar warum oder wodurch die erhöhte Sensitivität gegenüber H₂O₂ zustande kam. Wurde die Transmembrandomäne (TM) von BHRF1 deletiert (BHRF1 Δ TMwt), wurde das Wachstum aller Aquaporin exprimierender Hefen negativ beeinflusst. Die Hefen waren dann sensitiver gegenüber H₂O₂. Die Tatsache, dass nur NtPIP2.2b und NtTIP1.1a als C-terminale Fusion (pBT3-C:NtPIP2.2b, pBT3-C:NtTIP1.1a) mit BHRF1 Δ TMwt interagierten und Hefen, die BHRF1 Δ TMwt allein exprimierten ebenfalls reduziertes Wachstum zeigten, könnte vermuten lassen, dass die anti-apoptotische Wirkung des deletierten BHRF1 (BHRF1 Δ TMwt) gestört ist. Aus Veröffentlichungen ist bekannt, dass die Deletion der Transmembrandomäne Auswirkungen auf die Aktivität mehrerer anti-apoptotischer Proteine, insbesondere BHRF1 (Theodorakis et al., 1996), hat. Die Deletion der Transmembrandomäne von Bcl-2 führt unter bestimmten Bedingungen (Hockenbery et

al., 1990) zu einer reduzierten anti-apoptotischen Aktivität. Dies könnte auch bei BHRF1 Δ TMwt der Fall sein. Allerdings wurden Hefen, die das Rattenaquaporin 8 (rAQP8) exprimierten offensichtlich durch BHRF1 Δ TMwt positiv in ihrem Wachstum beeinflusst.

Die Expression von Aquaporinen, vor allem in H₂O₂-sensitiven Hefen (YML007w), führte zu einem reduzierten Wachstum in Gegenwart von H₂O₂ und bestätigt somit das es sich bei den verwendeten Aquaporinen um Kanäle handelt, die für H₂O₂ permeabel sind. Dabei gelten AtTIP1.1 und hAQP1 für zwei sehr starke H₂O₂-Kanäle, da Hefen mit diesen Aquaporinen große Schwierigkeiten hatten in Gegenwart von H₂O₂ zu wachsen. Während NtTIP1.1a, mAtPIP2.2, AtPIP2.2m und rAQP8 für H₂O₂ wenig permeabel sind, schleusen NtPIP2.2b und NtPIP2.2a mehr Wasserstoffperoxid durch ihre Poren. Die Aquaporine transportieren das überschüssige H₂O₂ aus der Umgebung in die Zelle, vielleicht entlang des Konzentrationsgefälles. Ist zu viel H₂O₂ vorhanden, können die Hefezellen dies nicht rechtzeitig abbauen und sterben. Die Fähigkeit H₂O₂ zu transportieren konnte für AtTIP1.1 von Bienert und seinen Mitarbeitern ebenfalls gezeigt werden (Bienert et al., 2006). Allerdings unterscheiden sich die Ergebnisse für das humane AQP1. Während das Team um Bienert keine H₂O₂-transportierenden Eigenschaften von hAQP1 bestätigen konnte (Bienert et al., 2006), wird in dieser Arbeit eine starke Permeabilität dieses Aquaporins für Wasserstoffperoxid deutlich.

Der Transport von H₂O₂ durch Aquaporine konnte auch durch die Reaktion von H₂O₂ mit deacetyliertem DCFH innerhalb der Hefezelle gezeigt werden. Das im Medium vorhandene Wasserstoffperoxid wird durch Aquaporine in die Hefezellen transportiert und reagiert dort mit deacetyliertem DCFH zum grünfluoreszierenden Farbstoff DCF, der in der gesamten Zelle verteilt ist. Hefen, die nicht mit Aquaporinen transformiert wurden, zeigten trotz der Behandlung mit H₂O₂ und DCFH keinerlei Fluoreszenz. Auch die Expression von Aquaporinen, die weniger permeabel für H₂O₂ sind, führte zu keiner verstärkten Fluoreszenz (Bienert et al., 2006). Dies schließt die Diffusion von H₂O₂ durch die Zellmembran größtenteils aus und bestätigt den Transport von Wasserstoffperoxid durch Aquaporine. Zusätzlich wird dadurch die Anwesenheit von H₂O₂-transportierenden Aquaporinen in der Plasmamembran nachgewiesen. Neben der H₂O₂-bedingten Fluoreszenz konnte teilweise die Lokalisation der Aquaporin-GFP-Fusionsproteine im Tonoplasten erkannt werden. Hefezellen des Stammes YML007w, die NtPIP2.2b und NtTIP1.1a exprimierten, zeigten eine Fluoreszenz, die ausschließlich auf die Lokalisation dieser beiden Membranproteine in der Vakuole hindeutet. Die H₂O₂-bedingte Fluoreszenz in der gesamten Zelle blieb aus. Möglicherweise könnten die Aquaporine zu viel H₂O₂ in die Hefezellen transportiert haben. Diese letale Menge Wasserstoffperoxid konnte durch die zelleigenen Mechanismen nicht ausreichend abgebaut werden bzw. nicht schnell genug in die Vakuolen transportiert werden,

sodass die Hefezellen daran zugrunde gingen. Im Fluoreszenzsumkehrmikroskop tauchten nur lebende Zellen auf, die kein oder eine nicht nachweisbare Menge an H_2O_2 aufgenommen hatten. Eine andere Erklärung könnte eine rasche Weiterleitung und Aufnahme von H_2O_2 in die Vakuolen darstellen. Aquaporine in der Plasmamembran transportieren H_2O_2 in die Hefezellen hinein. Von dort wird das H_2O_2 durch Aquaporine, die in der Vakuolenmembran sitzen in dieses Organell geschleust und beseitigt. Dies würde auch die stärkere und größer erscheinende Fluoreszenz der kreisrunden Bereiche, die eine Vakuolenlokalisierung dieser Aquaporine bestätigen, bei der Behandlung mit H_2O_2 und DCFH erklären.

Die Fähigkeit einiger Aquaporine H_2O_2 zu transportieren, wurde schon von Bienert und seinem Team (2006) beschrieben. Außerdem sprechen die ähnlichen physikalischen Eigenschaften von H_2O und H_2O_2 ebenfalls dafür, dass H_2O_2 durch Aquaporine transportiert werden kann. Das permanente Dipolmoment von Wasserstoffperoxid beträgt $2,26 \times 10^{-18}$ elektrostatische Einheiten („electrostatic units“ = esu; Ardon und Benjamin, 1965) und ist damit sogar etwas größer als das von Wasser ($1,85 \times 10^{-18}$ esu). Dies führt zu einer abgeschrägten cis-Konformation von H_2O_2 mit einer polaren Anordnung wobei beide Wasserstoffatome in dieselbe Richtung relativ zur O-O Bindung zeigen. Zusätzlich sind einzelne Elektronenpaare in die entgegengesetzte Richtung zu den Wasserstoffatomen orientiert, wodurch eine freie Rotation der einzelnen Elektronenpaare um die O-O Bindung verhindert wird und es entsteht ein permanentes Dipolmoment.

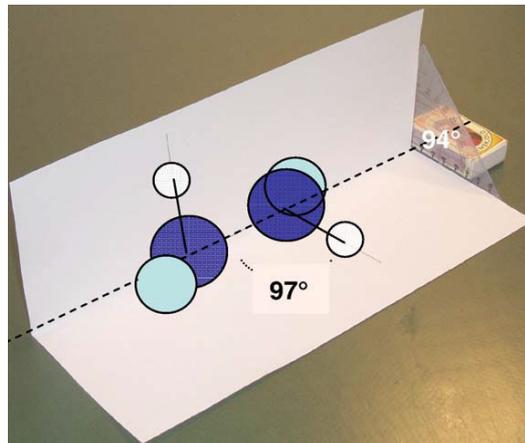


Abb. 5.1-4: Dargestellt ist die abgeschrägte cis-Konformation von H_2O_2 (aus *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA), „Membrane transport of hydrogen peroxide“, Bienert et al., 2006)

Die Sauerstoffatome (O) sind dunkelblau und die Wasserstoffatome (H) sind weiß gekennzeichnet. Die einzelnen Elektronenpaare sind hellblau markiert. Die abgeschrägte cis-Konformation von H_2O_2 führt zu einer polaren Anordnung, wobei beide H-Atome in dieselbe Richtung, ausgehend von der O-Bindung, deuten. Beide Sauerstoff-Wasserstoff-Bindungen sind um 97° zur Sauerstoffbindung angeordnet. Die beiden H-Atome sind in verschiedenen Ebenen zueinander in einem Winkel von 94° orientiert.

Dieses leicht größere Dipolmoment macht eine einfache Diffusion von H_2O_2 durch die hydrophobe Lipiddoppelschicht der Membran sogar weniger wahrscheinlich als für H_2O (Bienert et al., 2006). Obwohl H_2O_2 als reaktives Sauerstoffintermediat gilt, teilt es überraschend viele Eigenschaften mit Wasser (Bienert et al., 2006, Tabelle 1). Dabei ist das permanente Dipolmoment wahrscheinlich für die zelluläre Funktion und den Transport von H_2O_2 am bedeutendsten (Bienert et al., 2006). Aber auch der Durchmesser von 0,25-0,28 nm (Henzler und Steudle, 2000) macht den Transport von H_2O_2 durch die Poren der Aquaporine (Porendurchmesser eines wasserspezifischen Aquaporins an engster Stelle: 0,3 nm; Wu und Beitz, 2007) wahrscheinlich.



Abb. 5.1-5: Molekulare Struktur von Wasser (H_2O) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (aus Cellular and Molecular Life Sciences, „Aquaporins with selectivity for unconventional permeants“, Wu und Beitz, 2007)
Die Sauerstoffatome sind rot und die Wasserstoffatome sind grau markiert.

Allerdings scheint nicht nur die Größe der Moleküle für den Transport durch Aquaporine entscheidend zu sein. Einige Aquaglyceroporine, die einen größeren Porendurchmesser (0,4 nm; Heller et al., 1980) besitzen, sind z. B. impermeabel für H_2O , welches aber aufgrund seiner Größe zweifelsohne durch den Kanal passen würde. Hier spielen vermutlich die Eigenschaften der Aminosäuren im Aquaporinkanal eine Rolle.

5.1.2.4 Einfluss der Überexpression von Aquaporinen in Pflanzen

Um die zelltodfördernde Wirkung von Aquaporinen auch in vivo untersuchen zu können, wurden diese mittels Agrobakterien in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen transient exprimiert.

5.1.2.4.1 Lokalisation und transiente Expression von Fusionsproteinen in Pflanzen

Durch die Verwendung von GFP-Fusionsproteinen konnten Lokalisation und Expression der Aquaporine in den Pflanzenzellen bestimmt werden. Nichtfusioniertes GFP war in der ganzen Pflanzenzelle verteilt. Ebenfalls wurde in Pflanzen wie auch in Hefen durch die grüne Fluoreszenz eine Lokalisation der Aquaporin-Fusionsproteine in der Vakuolenmembran ersichtlich. Allerdings kann eine Assoziation der Membranproteine mit der Plasmamembran nicht ausgeschlossen werden. Anders als Hefen besitzen Pflanzenzellen eine große Vakuole, die unter anderem für die Aufrechterhaltung des Zellurgors verantwortlich ist.

Somit können diese Organellen in der Pflanzenzelle fast das gesamte Zellvolumen einnehmen (Taiz, 1992), wodurch eine Unterscheidung von Vakuolen- und Plasmamembran schwierig wird. Die transiente Expression fiel bei den N-terminalen Fusionsproteinen (NtTIP1.1a-N und NtPIP2.2b-N) offenbar stärker aus als bei den C-terminalen Fusionsproteinen (NtTIP1.1a-C und NtPIP2.2b-C). Außerdem ging die stärkste Fluoreszenz von nichtfusioniertem GFP aus. Die zusätzliche Expression eines „silencing suppressors“ wie P19 oder CarCP führte vor allem zu einer verstärkten Fluoreszenz von GFP. Durch die Ko-Expression eines „silencing suppressors“ wird verhindert, dass Pflanzen Fremd-RNA erkennen und diese abbauen. Somit kann eine verstärkte Expression bzw. Fluoreszenz erreicht werden. Während die Fluoreszenz der N-terminalen Fusionen (NtTIP1.1a-N und NtPIP2.2b-N) nur ganz leicht durch die Ko-Expression von P19 oder CarCP verstärkt werden konnte, kam es bei den C-terminalen Fusionen (NtTIP1.1a-C und NtPIP2.2b-C) zu keiner Veränderung. Dies konnte teilweise mit den Ergebnissen der Immundetektion korreliert werden. Wie erwartet lieferte nichtfusioniertes GFP das stärkste Signal. Dabei machte es keinen großen Unterschied ob das Protein mit oder ohne „silencing suppressor“ P19 exprimiert wurde. Während bei NtTIP1.1a-N und NtPIP2.2b-N eine Bande in der Größenordnung von 27 kDa (GFP) detektiert werden konnte, tauchte bei den Proben NtTIP1.1a-C und NtPIP2.2b-C keine auf. Durch die zusätzliche Expression von P19 konnte für NtTIP1.1a-N eine bedeutend stärkere Bande mittels Immundetektion nachgewiesen werden. Für alle Proben (GFP, NtTIP1.1a-N, NtPIP2.2b-N), die GFP im Überstand der Pflanzenproben aufwiesen, konnte auch ein positives Ergebnis aus dem Pflanzenextrakt geliefert werden. Bedauerlicherweise konnte in keiner Probe ein Fusionsprotein aus Aquaporin und GFP detektiert werden, was auf eine relativ instabile Bindung zwischen diesen beiden Proteinen hindeutet. Da es sich bei Aquaporine um Membranproteine handelt, die mit ihren sechs Transmembrandomänen fest in dieser verankert sind, kommt es vermutlich beim Aufschluss der Zellen und Herauslösen der Proteine aus der Membran zum Abbruch der Bindung zwischen Aquaporin und GFP. Offensichtlich sind die Aquaporine in Pflanzen stärker mit der Membran assoziiert als in Hefezellen, da hier die Detektion der Fusionsproteine erfolgreich war. Diese unvollständige Isolierung der Aquaporine könnte den Nachweis der Proteine sowohl im Überstand als auch im Pflanzenextrakt erklären. Der Gedanke, dass nicht alle Fusionsproteine eine Verankerung in der Membran fanden, sondern im Zytoplasma vorlagen, ist relativ unwahrscheinlich. Bei einer transienten Ko-Expression der Fusionsproteine und des „silencing suppressors“ CarCP konnten keinerlei Banden sichtbar gemacht werden.

5.1.2.4.2 Auswirkungen der transienten Expression von Aquaporin-Fusionsproteinen auf Pflanzen

Offensichtlich konnte auch in Pflanzen durch die Überexpression von Aquaporinen Zelltod ausgelöst werden. Alle Blätter der infiltrierten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die mit NtTIP1.1a-C infiltriert wurden, bildeten nach ca. fünf Tagen an der Infiltrationsstelle nekrotische Bereiche aus. Die transiente Expression der übrigen Aquaporinkonstrukte (NtTIP1.1a-N, NtPIP2.2b-C, NtPIP2.2b-N) führte erst nach mehr als zwei Wochen zum Zelltod, wobei die beiden C-terminalen Fusionen (NtTIP1.1a-C und NtPIP2.2b-C) wesentlich stärkere Symptome lieferten. Dabei schien es keine Rolle zu spielen, ob die Membranproteine alleine oder in Kombination mit dem „silencing suppressor“ P19 oder CarCP exprimiert wurden. Blätter, die ausschließlich mit nichtfusioniertem GFP infiltriert wurden, zeigten auch nach 18 Tagen kein Absterben von Pflanzenzellen. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Zelltodereignisse durch die Expression der Aquaporine hervorgerufen wurden. Die Bestimmung des H₂O₂-Gehalts in den infiltrierten Bereichen führte bei transienter Expression von NtTIP1.1a-C schon nach einer Woche zu einer erhöhten Konzentration von Wasserstoffperoxid. Die Menge an H₂O₂ durch transiente Expression von NtTIP1.1a-N, NtPIP2.2b-C, NtPIP2.2b-N war ungefähr gleich hoch wie durch die Expression von GFP. Auch die Behandlung der infiltrierten Blätter mit Diaminobenzidin (DAB) zeigte ausschließlich bei der Expression von NtTIP1.1a-C eine Braunfärbung, die auf die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid hinwies. Allerdings wurde die Analyse schon nach einer Woche durchgeführt als die Expression von NtTIP1.1a-N, NtPIP2.2b-C und NtPIP2.2b-N noch keine Nekrosen aufwiesen.

Infiltrationsexperimente mit Tm-2, PT30 und einem der beiden „silencing suppressors“ (P19 oder CarCP) führten zur Ausbildung einer leichten Hypersensitiven Reaktion (HR). Hierbei lagert sich das 30 kDa-Movementprotein (PT30) des Tomatenmosaikvirus (ToMV) an die Plasmodesmata der Pflanzenzellen und wird von den *tm-2* Resistenzgenen erkannt. Durch die zusätzliche Expression eines „silencing suppressors“ wird die HR in der Pflanze ausgelöst. Eine Ko-Infiltration von Aquaporinen führte anders als erwartet zu keiner Veränderung in der Stärke der durch Tm-2, PT30 und P19 bzw. CarCP ausgelösten HR. Die zusätzliche Expression der Aquaporine konnte weder eine Verstärkung noch eine Verminderung der HR herbeiführen. Nicht einmal das stark zelltodinduzierende Fusionsprotein NtTIP1.1a-C konnte Einfluss auf die HR nehmen. Es scheint fast so, als wäre die Expression dieser drei Proteine (Tm-2, PT30, „silencing suppressor“) in der Lage die zelltodfördernde Wirkung von NtTIP1.1a-C zu unterdrücken. Immerhin kam es bei transienter Expression von NtTIP1.1a-C in Kombination mit Tm-2 und einem „silencing suppressor“ bzw. NtTIP1.1a-C und „silencing suppressor“ zum Absterben von Pflanzenzellen. Dabei verursachten diese nekrotischen Bereiche schwerwiegendere Symptome als jene die durch

Tm-2, PT30 und dem „silencing suppressor“ verursacht wurden. Weiterhin ist eine leichte Irritation an der Infiltrationsstelle von NtPIP2.2b-C mit einem „silencing suppressor“ oder als Ko-Expression mit einem „silencing suppressor“ und Tm-2 zu erwähnen. Offensichtlich geht die zelltodfördernde Wirkung hauptsächlich von den Aquaporinen aus, an deren C-Terminus GFP fusioniert ist (pK7FWG2:AQP). Diese Anordnung entspricht auch jenen Konstrukten, die für die H₂O₂- (pYEGFP:AQP) und Interaktionstests (nur in pBT3-C) in Hefe verwendet wurden. Auch hier (pYEGFP:AQP und pBT3-C:AQP) ist GFP an den C-Terminus des Aquaporins fusioniert. Die Tatsache, dass die beiden Aquaporine NtTIP1.1a und NtPIP2.2b vor allem als C-terminale Fusion (NtTIP1.1a-C und NtPIP2.2b-C) eine stark bzw. leicht zelltodinduzierende Wirkung in Pflanzen haben, ist vermutlich damit zu erklären, dass durch eine Fusion an den N-Terminus der Aquaporine, diese weniger aktiv sind bzw. völlig funktionslos werden. Dies konnte auch bei der Interaktion mit BHRF1 bzw. Aminoacylase beobachtet werden. Während NtTIP1.1a und NtPIP2.2b als C-terminale Fusion (in pBT3-C) wesentlich stärker mit BHRF1 bzw. Aminoacylase interagierten, fiel die Interaktion als N-terminale Fusion (in pBT3-N) schwächer aus (pBT3-N:NtTIP1.1a) bzw. blieb gänzlich aus (pBT3-N:NtPIP2.2b).

Die transiente Ko-Expression von Aquaporin und BHRF1 führte ebenfalls zur Bildung von nekrotischen Bereichen in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen. Allerdings konnte kein deutlicher Einfluss des anti-apoptotischen BHRF1 auf das Sterben von Pflanzenzellen durch die Aquaporinexpression von NtPIP2.2b-C und NtPIP2.2b-N bemerkt werden. Eine minimale Reduktion der Nekrosenbildung aufgrund der Expression von NtTIP1.1a-C und NtTIP1.1a-N konnte durch BHRF1 hervorgerufen werden.

Anders als in Hefe scheint NtTIP1.1a-C in Pflanzen wesentlich stärker Zelltod zu induzieren. Bei NtPIP2.2b-C ist es umgekehrt. Da in Hefen jedes Aquaporin einzeln exprimiert wurde, könnte es möglicherweise sein, dass sich diese Membranproteine bei Anwesenheit anderer Aquaporine, wie es in Pflanzen der Fall ist, anders verhalten. Vielleicht ergänzen sich die Funktionen und Aufgaben der Aquaporine in Pflanzen, wenn mehrere exprimiert werden, sodass manche aktiver als andere sind. Damit könnte die Tatsache erklärt werden, dass NtTIP1.1a in Pflanzen viel zelltodfördernder wirkt, das heißt mehr H₂O₂ in die Zelle transportiert als in Hefe.

Offensichtlich sind Aquaporine sowohl in Pflanzen als auch in Hefen mit Zelltodereignissen assoziiert. Genauer gesagt sind diese Membranproteine permeabel für H₂O₂. Vermutlich kommt es bei einer Überexpression zur Funktionsstörung der Aquaporine, wobei zu viel H₂O₂ in die Zelle geschleust wird und die Zelle geschädigt wird.

Durch die Interaktion mit BHRF1 könnte die Regulation dieser H₂O₂-Kanäle so gestört sein, dass mehr H₂O₂ in die Zelle gelangt und diese stirbt. Die Folge könnte die Entstehung von Spontannekrosen sein.

5.1.2.5 Analyse der Interaktion und Bestimmung der Bindungsdomänen im Split Ubiquitin System

5.1.2.5.1 Analyse der Interaktion von BHRF1 mit pflanzlichen und tierischen Aquaporinen

Die Untersuchung der Interaktion von BHRF1 und Aquaporinen wurde im Split Ubiquitin System durchgeführt. Da dieses System speziell für Membran-assoziierte Proteine entwickelt wurde, kann die korrekte Faltung und eine Lokalisation der Proteine in ihrem natürlichen Zellkompartiment gewährleistet werden.

Auffallend war, dass die Tabakaquaporine viel stärker mit BHRF1 interagierten als die Aquaporine aus *Arabidopsis*. Dabei machte es zusätzlich noch einen Unterschied an welchen der beiden Termini der Aquaporine die Aktivierungs- bzw. Bindedomäne (VP16, LexA) fusioniert war. Während die Aquaporine aus *Nicotiana tabacum* hauptsächlich als C-terminale Fusion (in pBT3-C) mit BHRF1 interagierten, lieferten die *Arabidopsis* aquaporine ausschließlich als N-terminale Fusion (in pBT3-N) allerdings nur eine schwache Interaktion mit BHRF1. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die für die Interaktion verantwortliche Domäne bei den Tabakaquaporinen am N-Terminus und bei den *Arabidopsis* aquaporinen am C-Terminus befinden könnte. Die Beteiligung der Transmembrandomäne (TM) von BHRF1 konnte für die Interaktion mit Aquaporinen größtenteils ausgeschlossen werden. Ausnahmen hierfür sind die relativ schwache Interaktion von NtPIP2.2b als N-terminale Fusion mit dem Vollängen-BHRF1, die durch Deletion der Transmembrandomäne völlig unterbunden wurde. Ein sehr großer Unterschied in der Interaktion kam zwischen NtPIP2.2b und NtPIP2.2a als N-terminale Fusion (in pBT3-N) und BHRF1 zu Tage. Obwohl diese beiden Proteine bis auf einen konservativen Aminosäureaustausch identisch sind, konnte nur NtPIP2.2a mit BHRF1 interagieren. Möglicherweise ist die Position dieser Mutation, wie schon unter 5.1.2.1 beschrieben, hierfür verantwortlich. Erstaunlicherweise interagierten das humane AQP1 und das Ratten AQP8 wesentlich schwächer mit BHRF1 als die pflanzlichen Membranproteine. Da BHRF1 ein Protein des humanen Epstein-Barr Virus ist, ist die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens mit tierischen Aquaporinen wesentlich höher. Deshalb ist es umso bemerkenswerter, dass hier nur eine geringe Interaktion stattfand. Die tierischen Aquaporine interagierten ausschließlich als N-terminale Fusion (in pBT3-N) mit BHRF1. Wodurch davon ausgegangen werden könnte, dass sich auch bei diesen beiden tierischen Aquaporinen die Region für die Interaktion am C-Terminus befinden könnte. Allgemein kann davon

ausgegangen werden, dass die Transmembrandomäne von BHRF1 für die Interaktion mit Aquaporinen nicht unbedingt notwendig ist. Außerdem hat der Austausch von Serin nach Prolin in der BH2-Domäne von BHRF1 (mBHRF1, mBHRF1 Δ TM), der zu einer Unterbrechung in der α -Helix-Struktur führt, keine Auswirkungen auf die Interaktion mit Aquaporinen. Das bedeutet weder die Transmembrandomäne noch die BH2-Domäne sind für die Interaktion mit Aquaporinen erforderlich.

Zur Überprüfung, ob Aquaporine auch mit anderen Proteinen der Bcl-2 Familie interagieren, wurde das ebenfalls anti-apoptotische Bcl-X_L verwendet. Sowohl BHRF1 als auch Bcl-X_L besitzen die für Bcl-2 Mitglieder charakteristischen BH-Domänen (BH1 bis BH4). Trotzdem besteht nur eine 16,7 % Aminosäureidentität zwischen den beiden Proteinen. Dennoch scheint das Interaktionsmuster von BHRF1 und Bcl-X_L mit den Aquaporinen ähnlich zu sein. Die Tatsache, dass diese Proteine in ihrer Aminosäureabfolge so unterschiedlich sind und dennoch mit den gleichen Aquaporinen interagierten, könnte dafür sprechen, dass die Struktur der Bcl-2 Proteine für die Funktion entscheidend ist.

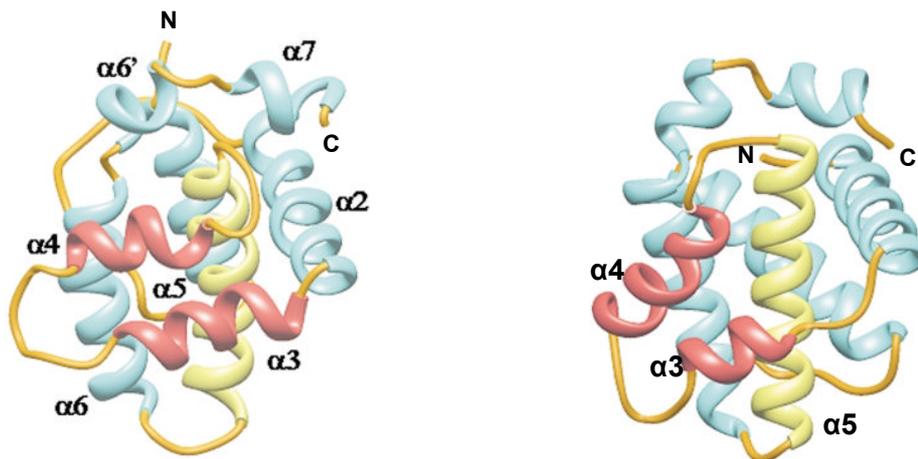


Abb. 5.1-6: Struktur von BHRF1 (links) und Bcl-X_L (rechts) (aus Journal of Molecular Biology, „Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr virus, a homolog of human Bcl-2“, Huang et al., 2003)

Die zentrale, hydrophobe α 5-Helix ist gelb markiert. Die beiden Helices α 3 und α 4 (rot) bilden einen Teil der BH3-Peptidbindungsstelle. N- und C-Terminus sind mit „N“ bzw. „C“ gekennzeichnet. Die Transmembrandomäne am C-Terminus ist nicht abgebildet.

Tatsächlich haben die Strukturen von BHRF1, Bcl-X_L und anderen Proteinen der Bcl-2 Familie große Ähnlichkeiten miteinander.

Welcher Bereich von BHRF1 tatsächlich mit den Aquaporinen interagiert, wird unter 5.1.2.5.3 besprochen.

5.1.2.5.2 Bestimmung der Bindungsdomäne von Aquaporinen bei der Interaktion mit BHRF1

Da die Proteinsequenzen der PIPs und TIPs sich deutlich voneinander unterscheiden (37 % AS-Identität), aber dennoch mit BHRF1 interagierten, wurden gezielte Deletionsmutanten der Aquaporine NtPIP2.2b und NtTIP1.1a konstruiert um die Bindungsdomäne für BHRF1 zu identifizieren. Hauptsächlich kam es zur Interaktion zwischen NtPIP2.2b Δ 117-287 als C-terminale Fusion (in pBT3-C) und allen vier BHRF1-Proteinen (BHRF1wt, BHRF1 Δ TMwt, mBHRF1, mBHRF1 Δ TM). Bei dieser Deletionsmutante (NtPIP2.2b Δ 117-287) handelt es sich um den N-Terminus des Aquaporins, genauer gesagt um die Transmembrandomänen 1 und 2 sowie „loop“ B mit dem 1. NPA-Motiv. Die zusätzliche Deletion von „loop“ B, also dem 1. NPA-Motiv (NtPIP2.2b Δ 105-287) führte ebenfalls nur als C-terminale Fusion (in pBT3-C) ausschließlich zur Interaktion mit dem wildtypischen Vollängen-BHRF1 (BHRF1wt). Die Tatsache, dass NtPIP2.2b Δ 1-195 weder als C- noch als N-terminale Fusion mit BHRF1 interagierte, führt zu dem Schluss, dass die Transmembrandomänen 5 und 6 sowie „loop“ E mit dem 2. NPA-Motiv von NtPIP2.2b für die Interaktion mit BHRF1 nicht notwendig sind. Die Ergebnisse der Interaktionstests mit den NtTIP1.1a-Deletionen korrelieren hiermit. Auch der N-Terminus von NtTIP1.1a (NtTIP1.1a Δ 93-252) bestehend aus den Transmembrandomänen 1 und 2 sowie „loop“ B mit dem 1. NPA-Motiv interagierte ebenfalls nur als C-terminale Fusion (in pBT3-C) mit allen vier BHRF1-Proteinen. Folglich könnte sich der für die Interaktion mit BHRF1 verantwortliche Bereich sowohl für PIPs als auch für TIPs am N-Terminus der Aquaporine befinden. Hierbei spielen vor allem die ersten beiden Transmembrandomänen aber auch „loop“ B mit dem 1. NPA-Motiv eine bedeutende Rolle. Allerdings fand eine Interaktion auch zwischen BHRF1 und Aquaporindeletionen statt, die weder die ersten beiden Transmembrandomänen (TM1, TM2) noch „loop“ B mit dem 1. NPA-Motiv enthalten. Ebenfalls konnte es zur Inhibierung einer Interaktion zwischen BHRF1 und Aquaporindeletionen kommen, trotz Vorhandensein von „loop“ B mit dem 1. NPA-Motiv. Demnach sollte beachtet werden, dass die Aquaporindeletionen bei der Bildung und Einlagerung in die Membran anders gefaltet sein könnten als die Vollängenaquaporine, wodurch zuvor unzugängliche Regionen für BHRF1 zugänglich werden könnten. Zusätzlich könnte die Beteiligung der an das 1. NPA-Motiv angrenzenden Aminosäuren in „loop“ B eine Rolle bei der Interaktion spielen (Zardoya und Villalba, 2001). Weiterhin könnten Domänen nicht mehr erreichbar sein und eine Interaktion mit BHRF1 schwächen oder sogar verhindern. Wie schon durch die Interaktion der Vollängenaquaporine mit BHRF1 ersichtlich wurde, spielt es zudem vor allem für NtPIP2.2b eine Rolle in welchem Vektor die Proteine exprimiert werden. Denn eine Fusion des Transkriptionsfaktors am C- oder N-Terminus der Membranproteine könnte wichtige Domänen für die Interaktion blockieren. Eine Beteiligung für die unter 5.1.2.1 erwähnten konservierten Bereiche bei der Interaktion konnte für die

AS₁₀₃-AS₁₁₅ ISGGHINPAVTFG („loop“ B mit 1. NPA-Motiv) weitestgehend bestätigt werden. Allerdings scheint dieser Bereich nicht allein für die Interaktion verantwortlich zu sein, denn wie schon erwähnt, interagiert auch NtPIP2.2b105-287 (in pBT3-C) ohne diesen Bereich mit BHRF1wt. Die Teilnahme der 1. oder 2. Transmembrandomäne bei der Interaktion ist demnach wahrscheinlich. Die beiden anderen Aminosäureabfolgen AS₁₂₆-AS₁₃₄ RAVLYMVAQ (innerhalb TM3) und AS₁₈₃-AS₁₈₉ LVYTVFS (innerhalb TM4) könnten ebenfalls an der Interaktion beteiligt sein oder die AS-Sequenz AS₁₀₃-AS₁₁₅ ISGGHINPAVTFG in ihrer Funktion teilweise ersetzen, da einige mit BHRF1-interagierenden Deletionen diese Motive enthalten, aber keine ISGGHINPAVTFG-Sequenz tragen.

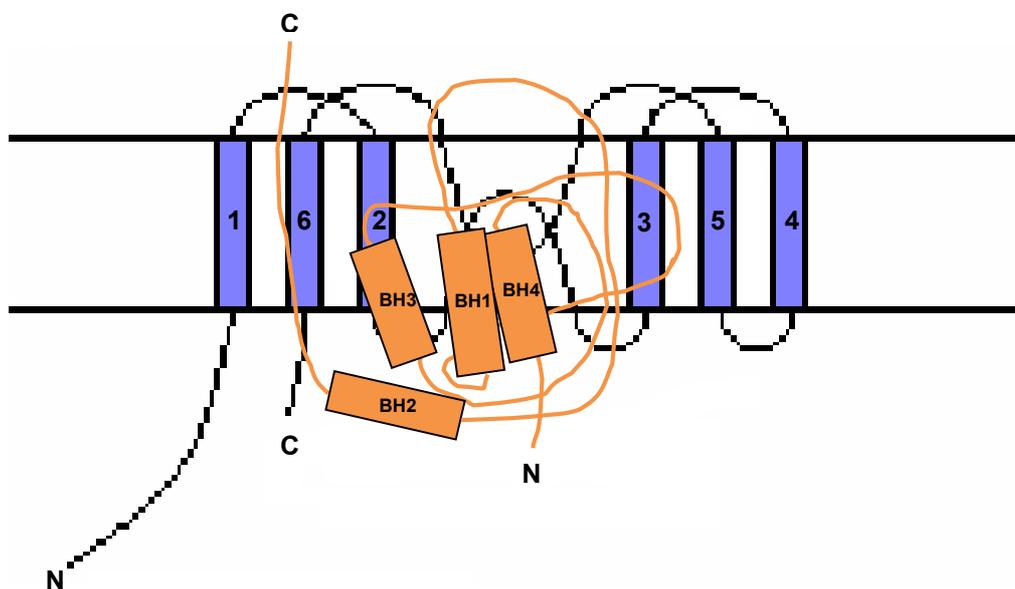


Abb. 5.1-7: Schematische Darstellung der Interaktion von BHRF1 mit Aquaporin

BHRF1 ist orangefarben dargestellt. Die BH-Domänen sind ebenfalls abgebildet und mit BH1 bis BH4 beschriftet. Die sechs Transmembrandomänen des Aquaporins sind in blau dargestellt.

5.1.2.5.3 Charakterisierung der Bindungsdomäne von BHRF1 für die Interaktion mit Aquaporinen

Um die Bindung zwischen BHRF1 und Aquaporinen weiter spezifizieren zu können, wurden die einzelnen BH-Domänen des anti-apoptotischen Proteins deletiert. Wie unter 5.1.2.5.1 beschrieben, ist die Transmembrandomäne von BHRF1 für die Interaktion mit Aquaporinen nicht von Bedeutung. Aus Veröffentlichungen von Li und seinem Team (2001/2006) geht hervor, dass der funktionale Bereich von BHRF1 am N-Terminus lokalisiert ist. Bei der Interaktion dieser BHRF1-Deletionen mit den Aquaporinen stellte sich heraus, dass weder der C-Terminus einschließlich der Transmembrandomäne noch der N-Terminus (BH4-Domäne) für die Interaktion zuständig sind. Auch die Punktmutation (Serin → Prolin) in der

BH2-Domäne von mBHRF1 und mBHRF1ΔTM hatten keinen größeren Einfluss auf die Interaktion.

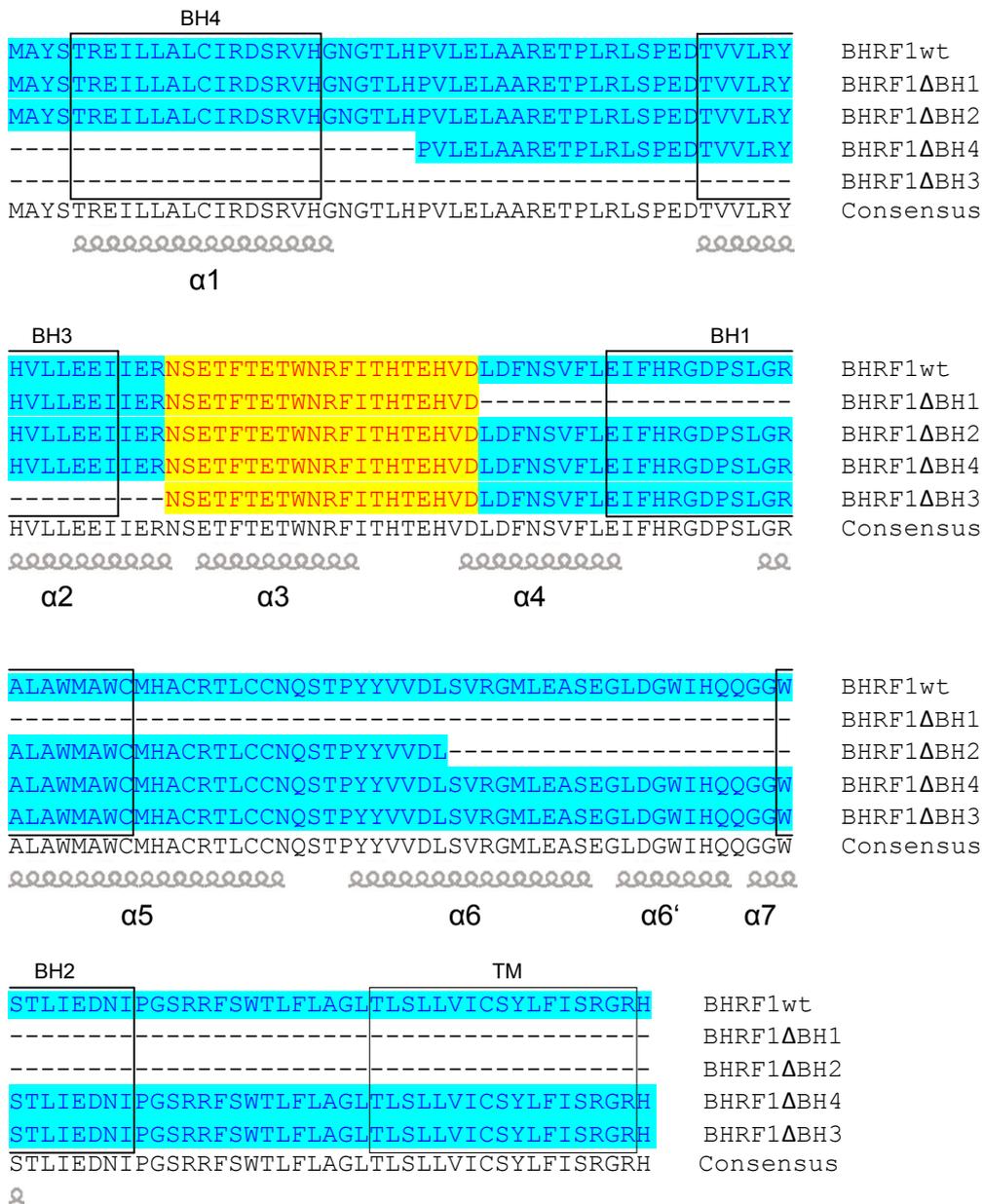


Abb. 5.1-8: „Alignment“ der Aminosäuresequenzen von BHRF1wt, BHRF1ΔBH1, BHRF1ΔBH2, BHRF1ΔBH4 und BHRF1ΔBH3

Die BH-Domänen BH1 bis BH4 sowie die Transmembrandomäne (TM) sind eingerahmt. Die α-Helices sind ebenfalls gekennzeichnet (Huang et al., 2003). Gelb hinterlegt sind Aminosäureabfolgen, die in allen fünf Sequenzen vorhanden sind. Sequenzen, die in mindestens drei der fünf Sequenzen vorkommen, sind blau markiert.

Weitere Deletionen der BH-Domänen gaben Aufschluss über die Bindedomäne von BHRF1 mit Aquaporinen. Da die Aquaporine mit allen vier BHRF1-Deletionen (BHRF1ΔBH1, BHRF1ΔBH2, BHRF1ΔBH3 und BHRF1ΔBH4) interagierten, konnte eine Beteiligung der für

Bcl-2 Proteine charakteristischen BH-Domänen für die Interaktion mit Aquaporinen ausgeschlossen werden. Auch hier interagierten hauptsächlich und am stärksten die Tabakaquaporine (pBT3-C:NtPIP2.2b, pBT3-C:NtTIP1.1a). Die tierischen Aquaporine interagierten jedoch nicht mit den BHRF1-Deletionen.

Das bedeutet keine der vier BH-Domänen (BH1, BH2, BH3 und BH4) ist für die Interaktion mit Aquaporinen notwendig. Der tatsächliche Bindungsbereich besteht vermutlich aus $\alpha 3$, da diese Helix in allen vier Mutanten vorhanden ist. Sie ist zwischen der BH3- und BH1-Domäne lokalisiert. $\alpha 3$ und $\alpha 4$ stellen in anderen Bcl-2 Proteinen die hydrophobe Spalte dar, welche mit der BH3-Domäne von pro-apoptischen Proteinen interagiert (Hinds et al., 2003; Huang et al., 2003; Denisov et al., 2003). BHRF1 besitzt keine solche hydrophobe Spalte, da $\alpha 3$ und $\alpha 4$ parallel zueinander verlaufen (Huang et al., 2003). Dennoch könnte die $\alpha 3$ -Helix für die Interaktion verantwortlich sein.

5.1.3 Analyse der Interaktion und Funktion einer Aminoacylase

5.1.3.1 Interaktion der Aminoacylase mit Aquaporinen im Split Ubiquitin System

Da BHRF1 in Pflanzen normalerweise nicht vorkommt, sollte es andere Proteine geben, die mit Aquaporinen interagieren und dadurch die Funktion der Aquaporine regulieren. Die Durchsuchung einer *Arabidopsis* cDNA-Bank mit dem Aquaporin AtTIP1.1 führte zur Identifizierung pflanzlicher Interaktionspartner. Hierbei wurde die Sequenz eines Proteins mit Aminoacylase-Homologie isoliert. Dieses Protein und die entsprechende Sequenz aus *Nicotiana tabacum* interagierten mit den Aquaporinen (NMY51). Dabei reagierten wie erwartet die Tabakaquaporine stärker mit der Aminoacylase aus Tabak (NtACY) als die *Arabidopsis* aquaporine. Da beide Interaktionspartner aus Tabak stammen und in der Natur ebenfalls gemeinsam in einer Zelle vorkommen können, wurde dies auch erwartet. Allerdings interagierten die Tabakaquaporine mit der *Arabidopsis* aminoacylase (AtACY Δ 1-94) ebenfalls stärker als die *Arabidopsis* aquaporine. Dies konnte auch bei der Interaktion der Aquaporine mit BHRF1 beobachtet werden. Weiterhin interagierten hauptsächlich die Aquaporine NtPIP2.2b und NtTIP1.1a als C-terminale Fusion (in pBT3-C) am stärksten mit den Aminoacylasen (NtACY und AtACY Δ 1-94). Die *Arabidopsis* aquaporine interagierten fast ausschließlich als N-terminale Fusion (in pBT3-N) relativ schwach mit der Vollängenaminoacylase (NtACY) bzw. der deletierten Aminoacylase (AtACY Δ 1-94). Die Tatsache, dass einige Aquaporine sowohl aus Tabak als auch aus *Arabidopsis* mit NtACY stärker interagierten als mit der deletierten Aminoacylase (AtACY Δ 1-94) könnte eventuell am Fehlen des N-Terminus von AtACY Δ 1-94 liegen. Wie erwartet, konnte keine bzw. nur eine sehr schwache Interaktion mit den tierischen Aquaporinen (hAQP1 und rAQP8) beobachtet werden.

Interaktionsexperimente mit den Aquaporindeletionen und den beiden Aminoacylasen gaben Aufschluss über die Bindungsdomäne der Aquaporine. Dabei interagierten ausschließlich NtTIP2.2b Δ 117-287 und NtTIP1.1a Δ 93-252 jeweils als C-terminale Fusion (in pBT3-C) mit NtACY und AtACY Δ 1-94. Eine Beteiligung des N-Terminus an der Interaktion konnte somit zumindest für die *Arabidopsis*aminoacylase ausgeschlossen werden. Aufgrund der 67 % AS-Identität des N-Terminus der beiden Aminoacylasen könnte geschlossen werden, dass diese 107 AS von NtACY für die Interaktion ebenfalls nicht benötigt werden.

Anders als bei der Interaktion mit BHRF1 wird hier deutlich, dass die konservierte Aminosäureabfolge AS₁₀₃-AS₁₁₅ ISGGHINPAVTFG für die Interaktion ausschlaggebend ist. Die Tatsache, dass ausschließlich NtPIP2.2b Δ 117-287 und NtTIP1.1a Δ 93-252 als C-terminale Fusion (in pBT3-C) mit den beiden Vollängenproteinen (BHRF1wt und mBHRF1) sowie den deletierten BHRF1 (BHRF1 Δ TMwt und mBHRF1 Δ TM) und mit den Aminoacylasen interagierten, spricht hauptsächlich für die Aminosäureabfolge AS₁₀₃-AS₁₁₅ ISGGHINPAVTFG („loop“ B) als Interaktionsdomäne. Zudem wird deutlich, dass BHRF1 und Aminoacylase an dieselbe Stelle in der Aquaporinsequenz binden.

5.1.3.2 Analyse der Funktion einer Aminoacylase

Aminoacylasen gehören zur M20-Familie der Metalloproteasen. Mitglieder dieser Familie bilden häufig Homodimere. Dabei besitzt jedes Monomer ein zentralgelegenes Zinkion. Aminoacylasen sind in Mikroorganismen (Gentzen et al., 1980; Sakanyan et al., 1993), Pflanzen (Lugay und Aronson, 1969) und Tieren (Mitta et al., 1993) vertreten.

Die Identifizierung der Aminoacylase als pflanzlicher Interaktionspartner von Aquaporinen stellt die Frage nach der Funktion dieses Proteins. Aus Veröffentlichungen wird für die Aminoacylase die Funktion der Deacetylierung von Aminosäuren im Aminosäure-Metabolismus beschrieben (Palm und Röhm, 1995). Da 50-80 % aller eukaryotischen Proteine N-terminal acetyliert sind (Driessen et al., 1985; Bradshaw et al., 1998), müssen diese, um abgebaut werden zu können, wieder deacetyliert werden. Die Acylase 1 (Acy1) aus Säugern spaltet N^α-blockierte Aminosäuren in die freie Aminosäure und die Acetatgruppe (Greenstein und Winitz, 1961; Bruns und Schulze, 1962; Gade und Brown, 1981; Löffler et al., 1986; Giardina et al., 1997; Pittelkow et al., 1998). Für die porcine Aminoacylase (pACY1), die 1881 als erste Aminoacylase aus der Niere von Schweinen isoliert wurde (Schmiedeberg, 1881), konnte diese Funktion getestet werden. Während über die Funktion von tierischen und humanen Aminoacylasen mehr bekannt ist, ist noch weitestgehend unklar welche Rolle dieses Protein in Pflanzen spielt. Allerdings könnte die mögliche Funktion als Protease oder Peptidase bei der Aktivierung oder Inhibierung von Proteinen während des Zelltods eine bedeutende Rolle spielen, wie es z. B. bei Caspasen, die durch die Spaltung von Proteinen zu deren Aktivierung führen, der Fall ist. Da auch noch

andere Proteasen wie Aspartat- (Chen und Foolad, 1997; Murakami et al., 2000), Metallo-, Serin- (Thorburn et al., 2003; Stenson-Cox et al., 2003; Verhagen et al., 2002) und Threoninproteasen am programmierten Zelltod beteiligt sein können, besteht ebenso die Möglichkeit, dass auch Aminoacylasen, die zu den Metalloproteasen gehören am programmierten Zelltod mitwirken könnten. Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe um Santoni, dass manche Aquaporine am Start-Methionin acetyliert sind (Santoni et al., 2006). Dies könnte ein mögliches Ziel der Aminoacylase darstellen um diese Aquaporine durch Spaltung in ihrer Funktion zu regulieren.

Die Expression und Induktion der Aminoacylase in *E. coli* lieferte keinen Aufschluss über die durch Computer-Programme vorhergesagte Funktion einer Aminoacylase. Weder in vitro noch in vivo konnte durch eine transiente Expression in *Nicotiana benthamiana* eine solche Aktivität gemessen werden. Durch die Fusion der Aminoacylase an eine Cyanamidhydratase (cah) konnte jedoch mittels Cyanamidhydratase-Assay die Funktionsfähigkeit des Proteins bestätigt werden. Das heißt, das Fusionsprotein aus Cyanamidhydratase und Aminoacylase ist funktionell aktiv und nicht beschädigt. Es besitzt allerdings keine messbare Aminoacylase-Aktivität mit Standardsubstraten. Vielleicht hat die isolierte Aminoacylase eine Funktion als Protease oder Peptidase. Zumindest führte die Ko-Infiltration der Aminoacylase und jeweils eines der Aquaporine NtTIP1.1a-C, NtTIP1.1a-N, NtPIP2.2b-C und NtPIP2.2b-N in *Nicotiana benthamiana* zu einer verminderten Nekrosenbildung im Gegensatz zur alleinigen Expression der Aquaporine. Das heißt, die Tabakaminoacylase könnte die Zelltodinduktion durch die Aquaporin-Überexpression in vivo hemmen und so das Absterben von Pflanzenzellen verhindern. Eine mögliche Funktion als regulierendes Enzym stellt eine entscheidende Bedeutung für das Überleben der Pflanzenzelle dar. Möglicherweise reguliert die Aminoacylase in Pflanzen den H₂O₂-Transport durch Aquaporine, vielleicht indem sie an diese bindet und somit die Pore schließt. Dabei interagiert die Aminoacylase mit dem 1. NPA-Motiv innerhalb von „loop“ B (N-Terminus) der Aquaporine. Andererseits könnten Aminoacylasen als Proteasen wirken und dadurch den H₂O₂-Transport durch Aquaporine beeinflussen. Dies könnte der Grund für eine geringere Nekrosenbildung bei einer Ko-Infiltration von Aminoacylase und Aquaporin sein im Gegensatz zur Infiltration ohne Aminoacylase. Wie aus einer Veröffentlichung von Maceyka et al. (2004) hervorgeht, interagiert die Aminoacylase 1 (Acy1) der Maus mit der Sphingosinkinase 1 (SphK1) und verstärkt die anti-apoptotische und zellwachstumsunterstützende Wirkung dieses Proteins. Zudem ist die Sphingosinkinase im zellulären Lipidstoffwechsel involviert. Sie katalysiert die Phosphorylierung von Sphingosin wobei Sphingosin 1-Phosphat (S1P) entsteht. Dieses Sphingolipid ist Bestandteil der Lipiddoppelschicht von zellulären Membranen. Ein erhöhter S1P-Spiegel kann das Wachstum und Überleben von Zellen fördern (Morita et al., 2000; Van Brocklyn et al., 1998) sowie die Freisetzung von Calcium regulieren (Ng et al., 2001) bzw.

die Bildung von H_2O_2 stimulieren. Sphingosin dagegen ist eine wichtige regulatorische Komponente auf Stressantworten und Apoptose (Hannun und Obeid, 2002). Deshalb ist das Gleichgewicht zwischen Sphingosin und Sphingosin 1-Phosphat für die Entscheidung, ob eine Zelle überlebt oder stirbt von großer Bedeutung (Cuvillier et al., 1996). Weiterhin entsteht während des Lipidstoffwechsels H_2O_2 , das durch Aquaporine in andere Zellkompartimente transportiert werden könnte um eine toxische Akkumulation zu verhindern und anderenorts abgebaut zu werden. Durch die Interaktion von Aminoacylase und Sphingosinkinase könnte letztere in ihrer Funktion gehemmt oder aktiviert werden um dieses Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Ebenso könnte die Aminoacylase auf die Funktion bzw. Transporteigenschaften der Aquaporine einen ähnlichen Einfluss ausüben.

5.1.3.3 Charakterisierung der Bindungsdomäne der Aminoacylase für die Interaktion mit Aquaporinen

Um mehr Informationen über die Aminoacylase zu bekommen, wurden zwei Deletionen (NtACY Δ PWW und NtACY Δ VWW) konstruiert, die Aufschluss über die Bindungsdomäne der Aminoacylase geben sollten. Wie erwartet interagierten die Tabakaquaporine auch mit den beiden Deletionen (NtACY Δ PWW und NtACY Δ VWW) stärker als die *Arabidopsis* aquaporine. Während die Bindung der Tabakaquaporine als C-terminale Fusion (in pBT3-C) stärker war, waren die *Arabidopsis* aquaporine als N-terminale Fusion (in pBT3-N) aktiver. Am stärksten interagierten die beiden Tabakaquaporine NtPIP2.2b und NtTIP1.1a als C-terminale Fusion (in pBT3-C). Auch zwischen hAQP1 bzw. rAQP8 und NtACY Δ PWW bzw. NtACY Δ VWW kam es zu einer leichten Interaktion.

Durch die große Ähnlichkeit in der AS-Sequenz der Tabak- und *Arabidopsis* aminoacylase von 75,9 % (65,1 % AS-Identität), die Interaktionsstudien mit der mutierten Aminoacylase aus *Arabidopsis* (AtACY Δ 1-94) sowie den zwei Aminoacylasedeletionen der Tabakaminoacylase (NtACY Δ PWW und NtACY Δ VWW) konnte der Interaktionsbereich für Aquaporine auf den mittleren Bereich des Proteins (AS₁₁₀-AS₂₁₆) beschränkt werden. Hier befindet sich eins der für M20-Peptidasen charakteristischen Sequenzhomologien (AS₁₃₇-AS₁₇₆). Weder N- noch C-Terminus sowie die konservierten Sequenzen AS₁₀₀-AS₁₀₉ VLLNSHTDVV, PWW und VWW sind für die Interaktion mit Aquaporinen notwendig. Auch für die Mausaminoacylase 1 (mACY1) wurde beschrieben, dass der N-Terminus (AS₁-AS₂₃₁) nicht für die Interaktion mit der Sphingosinkinase 1 (SphK1) benötigt wird (Maceyka et al., 2004).

Offensichtlich gibt es eine Verbindung zwischen Aquaporinen und Zelltodereignissen, die diese Membranproteine zu potenziellen H_2O_2 -Kanälen machen. Unter normalen Bedingungen transportieren Aquaporine das während des normalen Zellmetabolismus

entstandene Wasserstoffperoxid eventuell entlang des Konzentrationsgefälles um eine toxische Anhäufung dieser reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der Zelle zu verhindern bzw. abzubauen. Dabei könnte der Transportmechanismus der Aquaporine durch die Interaktion mit Aminoacylasen reguliert werden. Die Aminoacylasen könnten hierbei an die Pore der Aquaporine binden um diese in ihrer Transporteigenschaft zu regulieren oder sogar den Kanal zu verschließen. Zusätzlich könnten diese H_2O_2 -Kanäle durch Aminoacylasen gespalten werden um somit die Wasserstoffperoxid-transportierende Funktion zu regeln. Außerdem sorgen Enzyme wie Katalasen oder Ascorbatperoxidasen (APX) für den Abbau des in die Zelle eingeströmten bzw. gebildeten Wasserstoffperoxids. Bei einer Überexpression der Aquaporine könnte es jedoch zu einer Funktionsstörung dieses Regulationsmechanismus kommen. Die Aminoacylasen sind nicht mehr in der Lage den H_2O_2 -Transport durch Aquaporine zu regulieren. Demzufolge kommt es zu einer vermehrten Aufnahme von Wasserstoffperoxid in die Zelle bzw. zu einer starken Akkumulation, da keine ausreichende Regulierung der Aquaporine durch Aminoacylasen besteht. Die Anzahl der vorhandenen Aminoacylasen reicht nicht aus um den H_2O_2 -Transport aller Aquaporine regulieren zu können. Vielleicht werden aber auch die Zellen durch das zusätzliche H_2O_2 sensitiver gegenüber anderen Zelltodsignalen, wodurch es schließlich zum Tod der Zelle kommt.

Die zusätzliche Überexpression von Aminoacylasen inhibiert allerdings den Aquaporin-assoziierten Zelltod. In diesem Fall sind offenbar wieder genügend Aquaporin-regulierende Aminoacylasen in der Zelle vorhanden, welche für eine optimale H_2O_2 -Menge innerhalb der Zelle sorgen um das Überleben der Zelle gewährleisten zu können.

Bei einer Überexpression des anti-apoptischen BHRF1 allerdings könnte dieses Protein mit den Aminoacylasen um die Bindungsstelle der Aquaporine konkurrieren. Beide Proteine, BHRF1 und Aminoacylase, binden im Bereich der Pore an das 1. NPA-Motiv (N-Terminus) der Aquaporine und können somit einen Einfluss auf die Transporteigenschaft der Aquaporine ausüben. Gewinnt BHRF1 die Überhand könnte die Aminoacylase von ihrer Bindungsstelle am Aquaporin verdrängt werden, wodurch es zu einer Störung in der Regulation dieser H_2O_2 -Kanäle kommen könnte. BHRF1 könnte durch die Interaktion mit den Aquaporinen diese Poren verschließen oder dazu führen, dass sie ständig aktiv sind wodurch der H_2O_2 -Haushalt möglicherweise durcheinander geraten könnte. Bei einer Verstopfung der Pore könnte das gebildete H_2O_2 weder in die Zelle ein- noch ausströmen und somit zu einer letalen Akkumulation von H_2O_2 führen. Es kommt zum Zelltod, der sich in BHRF1-transgenen Pflanzen in der Bildung von Spontannekrosen äußert.

6 Zusammenfassung

Programmierter Zelltod (PCD, Apoptose) ist ein induziertes Selbstmordprogramm von Gewebezellen, das bei der Differenzierung und der Pathogenabwehr bei Pflanzen und Tieren von großer Bedeutung ist. BHRF1 („*Bam*HI fragment H rightward open reading frame no. 1“) ist ein Zelltod modulierendes Protein des Epstein-Barr Virus (EBV), einem humanen lymphotropen Herpesvirus. Die Expression von BHRF1 in transgenen Pflanzen führte zur Bildung von Nekrosen. Weitere Experimente zeigten, dass BHRF1 assoziierte Nekrosen durch Stress, Seneszenz und Pathogenabwehr induziert werden. Die Durchsuchung einer Tabak cDNA-Bank mit dem Hefezweihybridsystem brachte zwei unterschiedliche Aquaporine als Interaktionspartner für BHRF1 hervor. Aquaporine wurden als Wasserkanäle in roten Blutkörperchen identifiziert, wurden aber auch in allen anderen Organismen gefunden.

In den letzten Jahren traten vermehrt Hinweise auf, die zusätzlich zum Wassertransport der Aquaporine weitere Aktivitäten zuließen. Henzler und Steudle (2000) zeigten z. B. dass in der Alge *Chara corallina* Aquaporine als H₂O₂-Kanäle fungieren können. Weiterhin gab es Veröffentlichungen von Bienert und seinen Mitarbeitern (2006) wonach auch pflanzliche und tierische Aquaporine zum H₂O₂-Transport fähig sind. Da H₂O₂ und andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) schon lange als wichtige Signalsubstanzen im Rahmen der Pathogenabwehr in Pflanzen gelten, entstand dadurch zum ersten Mal eine logische Verknüpfung zwischen Zelltod und Aquaporinen. Deshalb war zu vermuten, dass es sich bei den im Hefezweihybridscreen identifizierten Aquaporine NtPIP2.2a, NtPIP2.2b und NtTIP1.1a um solche H₂O₂-Kanäle handelt. Es stellte sich heraus, dass diese Aquaporine in der Tat in Hefen als H₂O₂-Kanäle fungieren. Dabei konnte die H₂O₂-Sensitivität Aquaporin exprimierender Hefen durch die zusätzliche Expression von BHRF1 beeinflusst werden. BHRF1 ohne Transmembrandomäne (BHRF1 Δ TMwt) führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber H₂O₂ und somit zu verstärktem Zelltod. Auch in *Nicotiana benthamiana* konnte durch eine transiente Expression von Aquaporinen Nekrosen und somit Zelltod induziert werden.

Durch gezielte Deletionen der Aquaporine konnte eine gemeinsame Bindedomäne für die Interaktion mit BHRF1 identifiziert werden. Diese besteht aus der konservierten Region, welche das 1. NPA-Motiv („loop“ B) enthält und die eine Hälfte der Pore bildet. Weitere Interaktionsstudien zeigten, dass BHRF1 mit den verschiedensten Aquaporinen, darunter das humane Aquaporin 1 (hAQP1) sowie Aquaporin 8 aus der Ratte (rAQP8) interagiert. BHRF1 bindet hierbei wahrscheinlich mit der α 3-Helix an die konservierte NPA-Region der Aquaporine.

Auf der Suche nach pflanzlichen Interaktionspartnern von Aquaporinen wurde ein zelluläres Protein mit Homologie zu M20-Proteasen und Aminoacylasen isoliert. Auch dieses Protein bindet wie BHRF1 an die konservierte NPA-Domäne der Aquaporine. Während das zelluläre

Substrat für dieses Protein noch nicht gefunden werden konnte, wurde in *Nicotiana benthamiana* eine interessante Entdeckung gemacht. Eine Ko-Expression der isolierten Aminoacylase mit NtTIP1.1a bzw. NtPIP2.2b führte zur Inhibierung des durch die Aquaporine induzierten Zelltods in *Nicotiana benthamiana*.

6 Summary

Programmed cell death (PCD, apoptosis) is an induced cell suicide process that plays an important role during the differentiation and pathogen defense responses of plants and animals. BHRF1 („*Bam*HI fragment H rightward open reading frame no. 1“) is a cell-death modulating protein of the Epstein-Barr virus (EBV), a human lymphotropic herpes virus. The expression of BHRF1 in transgenic plants led to the formation of necrotic lesions. Further experiments showed that BHRF1 associated necrotic lesions are caused due to stress, senescence and pathogen defense responses. Yeast-two-hybrid-screening of a tobacco cDNA library identified two different aquaporins as partners for interacting with BHRF1. Aquaporins were identified as water channels/carriers within red blood cells, but are also present in all other organisms.

Over the last years, more information was gathered indicating that, apart from transporting water, aquaporins had other functional activities. E. g. Henzler and Steudle (2000) demonstrated that aquaporins can act as hydrogen peroxide channels in the algae *Chara corallina*. Furthermore, publications by Bienert et al. (2006), indicating that aquaporins in plants as well as in animals are also able to transport H₂O₂. Hydrogen peroxide and other reactive oxygen species (ROS) have long been recognized as important signal molecules during the pathogen defense response in plants, therefore establishing a logical connection between cell death and aquaporins for the first time. It was assumed that the aquaporins NtPIP2.2a, NtPIP2.2b und NtTIP1.1a identified during the yeast-two-hybrid-screen can act as H₂O₂ channels. In further experiments it could indeed be established that these aquaporins have the ability to transport H₂O₂ in yeast cells. Yeasts expressing aquaporins could be influenced in their H₂O₂ sensitivity by the expression of BHRF1. BHRF1 without transmembrane domain (BHRF1ΔTMwt) led to an enhanced H₂O₂ sensitivity and also to an increase in cell death. In addition, the transient expression of aquaporin could induce necrotic lesions and cell death in *Nicotiana benthamiana*.

Deletion experiments identified a common binding domain for interacting with BHRF1 in these aquaporins. This binding domain consists of the conserved region containing the first NPA motive („loop“ B) that is also half of one pore. Further studies showed that BHRF1 interacts with all kinds of different aquaporins from plants, animals (rAQP8) and humans

(hAQP1). BHRF1 most likely binds with the $\alpha 3$ helix to the highly conserved NPA region of aquaporins.

A cellular protein showing sequence homology to M20 proteases and aminoacylases was isolated when looking for interaction partners of aquaporins in plants. Like BHRF1, this protein binds to the conserved NPA region of the aquaporins. Although the cellular substrate for this protein has to be found yet, an interesting observation was made. Co-expression of the isolated aminoacylase with NtTIP1.1a or NtPIP2.2b in *Nicotiana benthamiana* led to the inhibition of cell death induced by these aquaporins.

Adams, J. M. und Cory, S.

The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival
Science, 1998 (281): 1322-1325

Adrain, C. und Martin, S. J.

The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas
Trends Biochem. Sci., 2001 (26): 390-397

Agre, P.; Engel, A. und Fujiyoshi, Y.

The importance of aquaporin water channel protein structures
The EMBO Journal, 2000 Jan. (19): 800-806

Ahmad, M.; Srinivasula, S. M.; Wang, L.; Talanian, R. V.; Litwack, G.; Fernandes-Alneri, T. und Alnemri, E. S.

CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP
Cancer Res., 1997 (57): 615-619

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. und Lipman, D. J.

Basic local alignment search tool
J. Mol. Biol., 1990 Okt. (215): 403-410

Anders, M. W. und Dekant, W.

Aminoacylases
Adv Pharmacol, 1994 (27): 431-448

Antonsson, B. und Martinou, J. C.

The Bcl-2 protein family
Exp. Cell Res., 2000 (256): 50-57

Ardon, M.

Oxygen: elementary forms and hydrogen peroxide
W. A. Benjamin Inc., New York, 1965: 82

Balk, J. und Leaver, C. J.

The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release
Plant Cell, 2001 (13): 1803-1818

Banta, L. M.; Robinson, J. S.; Klionsky, D. J. und Emr, S. D.

Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting
J Cell Biol, 1988 (107): 1369-1383

Barkla, B. J.; Vera-Estrella, R.; Pantoja, O.; Kirch, H. H. und Bohnert, H. J.

Aquaporin localization – how valid are the TIP and PIP labels?
Trends Plant Sci., 1999(4): 86-88

Beilmann, A.; Pfitzner, A. J. P.; Goodman, H.M. und Pfitzner, U. M.

Functional analysis of the pathogenesis-related 1a protein gene minimal promoter region: comparison of reporter gene expression in transient and in stable transfections
J. Biochem., 1991 (196): 415-421

Bej, A. K.; Mahbubani, M. H. und Atlas, R. M.

Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 1991 (26): 301-334

Beltz, S. (2011)

Analyse der Wechselwirkung von Galektin-3 mit dem Bcl-2 Protein BHRF1 des Epstein-Barr Virus in Hefe- und HEK293-Zellen
Diplomarbeit, Institut Genetik, Fachbereich Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim

Bevan, M.

Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation
Nucl. Acids. Res., 1984 (12): 8711-8721

Bienert, G. P.; Møller, A. L. B.; Kristiansen, K. A.; Schulz, A.; Møller, I. M.; Schjoerring, J. K. und Jahn, T. P.

Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes
The Journal of Biological Chemistry, 2007 (282): 1183-1192

Bienert, G. P.; Schjoerring, J. K. und Jahn, T. P.

Membrane transport of hydrogen peroxide
Biochimica et Biophysica Acta, 2006 (1758): 994-1003

Bindschedler, L. V.; Dewdney, J.; Blee, K. A.; Stone, J. M.; Asai, T.; Plotnikov, J.; Denoux, C.; Hayes, T.; Gerrish, C.; Davies, D. R.; Ausubel, F. M. und Bolwell, G. P.

Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance
Plant Journal, 2006 (47): 851-863

Bindschedler, L. V.; Minibayeva, F.; Gardber, S. L.; Gerrish, C.; Davies, D. R. und Bolwell, G. P.

Early signaling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺
New Phytol., 2001 (151): 185-194

Blackstone, N. W. und Green, D. R.

The evolution of a mechanism of cell suicide
BioEssays, 1999 (21): 84-88

Boldin, M. P.; Mett, I. L.; Varfolomeet, E. E.; Chumakov, I.; Shemer-Avin, Y.; Camonis, J. H. und Wallach, D.

Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects
J. Biol. Chem., 1995 (270): 387-391

Bolwell, G. P.; Bindschedler, L. V.; Blee, K. A.; Butt, V. S.; Davies, D. R.; Gardner, S. L.; Gerrish, C. und Minibayeva, F.

The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system
J Exp Bot, 2002 (53): 1367-1376

Bradshaw, R. A.; Brickey, W. W. und Kenneth, W. W.

N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and Na-acetyl transferase families
Trends Biochem. Sci., 1998 (23): 263-267

Bras, M.; Queenan, B. und Susin, S. A.

Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying
Biochemistry, 2005 Feb. (70): 231-239

Bruns, F. H. und Schulze, C.

Acylase I: Reindarstellung, physikalisch-chemische Eigenschaften und Identität mit „Hippurikase“
Biochem. Z., 1962 (338): 162-181

Calamita, G.

The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel
Molecular Microbiology, 2000 Juli (37): 254-262

Chaumont, F.; Barrieu, F.; Wojcik, E.; Chrispeels, M. J. und Jung, R.

Aquaporins constitutes a large and highly divergent protein family in maize
Plant Physiol, 2001 (125): 1206-1215

Chaumont, F.; Fetter, K.; Van Wilder, V. und Moshelion, M.

Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity
The Plant Cell, 2004 Jan. (16): 215-228

Chen, F. und Foolad, M. R.

Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic protease and its specific expression in nucellar cells during degeneration
Plant Mol Biol, 1997 (35): 821-831

Cheng, A.; Van Hoek, A. N.; Yeager, M.; Verkman, A. S. und Mitra, A. K.

Three-dimensional organization of a human water channel
Nature, 1997 Juni (387): 627-630

Chichkova, N. V.; Kim, S. H.; Titova, E. S.; Kalkum, M.; Morozov, V. S.; Rubtsov, Y. P.; Kalinina, N. O.; Taliansky, M. E. und Vartapetian, A. B.

A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response
The Plant Cell, 2004 Jan. (16): 157-171

Chinnaiyan, A. M.; O'Rourke, K.; Tewari, M. und Dixit, V. M.

FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis
Cell, 1995 (81): 505-512

Chong, J.; Baltz, R.; Fritig, B. und Saindrean, P.

An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalisation of phenolics and H₂O₂ metabolism
FEBS Letters, 1999 (458): 204-208

Chong, J.; Baltz, R.; Schmitt, C.; Beffa, R.; Fritig, B. und Saindrean, P.

Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance
The Plant Cell, 2002 Mai (14):1093-1107

Chrispeels, M. J. und Agre, P.

Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells
Trends Biochem Sci, 1994 (19): 421-425

Costet, L.; Fritig, B. und Kauffmann, S.

Scopoletin expression in elicitor-treated and tobacco mosaic virus infected plants
Physiol. Plant., 2002 (115): 228-235

Cuvillier, O.; Pirianov, G.; Kleuser, B.; Vanek, P. G.; Coso, O. A.; Gutkind, S. und Spiegel, S.

Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate
Nature, 1996 (381): 800-803

Danon, A.; Delorme, V.; Mailhac, N. und Gallois, P.

Plant programmed cell death: a common way to die
Plant Physiol. Biochem., 2000 (38): 647-655

Denisov, A. Y.; Madiraju, M. S. R.; Chen, G.; Khadir, A.; Beauparlant, P.; Attardo, G.; Shore, G. C. und Gehring, K.

Solution structure of human BCL-w
The Journal of Biological Chemistry, 2003 Juni (278): 21124-21128

Dohmen, R. J.; Strasser, A. W.; Höner, C. B. und Hollenberg, C. P.

An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera
Yeast, 1991 (7): 691-692

Dorey, S.; Baillieul, F.; Pierrel, M.-A.; Saindrenan, P.; Fritig, B. und Kauffmann, S.

Spatial and temporal induction of cell death, defense genes and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor
Mol. Plant-Microbe Interact., 1997 (10): 646-655

Driessen, H. P. C.; de Jong, W. W.; Tesser, G. I. und Bloemendal, H.

The mechanism of N-terminal acetylation of proteins
CRC Crit. Rev. Biochem., 1985 (18): 281-306

Duan, H. und Dixit, V. M.

RAIDD is a new "death" adaptor molecule
Nature, 1997 (385): 86-89

Duvall, E. und Wyllie, A. H.

Death and the cell
Immunology Today, 1986 April (7): 115-119

Earnshaw, W. C.

Nuclear changes in apoptosis
Curr. Opin. Cell Biol., 1995 (7): 337-343

Ellis, R. E.; Jacobson, D. M. und Horvitz, H. R.

Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*
Genetics, 1991 (129): 79-94

Endo, Y.

In vivo deacetylation of *N*-acetyl amino acids by kidney acylases in mice and rats
Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1980 (628): 13-18

Figurski, D. H. und Helsinki, D. R.

Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*
PNAS, 1979 April (76): 1648-1652

Finkel, T.

Oxygen radicals and signalling
Curr Opin Cell Biol, 1998 (10): 248-253

Flemington, C.; Chittenden, T. C.; Houghton, A. B.; Ebb, R. G.; Gallo, G. J.; Elangovan, B.; Chinnadurai, G. und Lutz, R. J.

A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions
EMBO, 1995 (14): 5589-5596

Flor, H. H.

Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*
Phytopath, 1942 (32): 653-669

Foghsgaard, L. und Jättelä, M.

The ability of BHRF1 to inhibit apoptosis is dependent on stimulus and cell type
Journal of Virology, 1997 Okt. (71): 7509-7517

Fortin, M. G.; Morrison, N. A. und Verma, D. P.

Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment
Nucleic Acids Res, 1987 (15): 813-824

Fraissinet-Tachet, L.; Baltz, R.; Chong, J.; Kauffmann, S.; Fritig, B. und Saindrenan, P.

Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid
FEBS Letters, 1998 (437): 319-323

Freeman, B. A. und Crapo, J. D.

Biology of disease: free radicals and tissue injury
Lab Invest, 1982 (47): 412-426

Fu, D.; Libson, A.; Miercke, L. J.; Weitzman, C.; Nollert, P.; Krucinski, J. und Stroud, R. M.

Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity
Science, 2000 (290): 481-486

Fujiyoshi, Y.; Mitsuoka, K.; de Groot, B. L.; Philippsen, A.; Grubmüller, H.; Agre, P. und Engel, A.

Structure and function of water channels
Curr. Opin. Struct. Biol., 2002 (12): 509-515

Fukuda, H.

Xylogenesis: Initiation, progression and cell death
Plant Physiol., 1996 (47): 299-325

Gade, W. und Brown, J. L.

Purification, characterization and possible function of α -N-acylamino acid hydrolase from bovine liver
Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1981 April (662): 86-93

Gajewski, T. F. und Thompson, C. B.

Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence
Cell, 1996 Nov. (87): 589-592

Gay, C.; Collins, J. und Gebicki, J. M.

Hydroperoxide assay with the ferricylenol orange complex
Analytical Biochemistry, 1999 (273): 149-155

Gentzen, I.; Löffler, H. G. und Schneider, F.

Aminoacylase from *Aspergillus oryzae*. Comparison with the pig kidney enzyme
Z. Naturforsch., 1980 (35): 544-550

Giardina, T.; Biagini, A.; Dalle Ore, F.; Ferre, E.; Reynier, M. und Puigserver, A.

The hog intestinal mucosa acylase I: subcellular localization, isolation, kinetic studies and biological function
Biochemie, 1997 (79): 265-273

Gil, M. J und Martinez-Merino, V.

Practical studies for medicinal chemistry, Chapter I - Physicochemical properties, Exercise I.11 - Determination of the free salicylic acid concentration in aspirin by forming Fe³⁺ complexes, 2006/2007

Godon, C.; Lagniel, G.; Lee, J.; Buhler, J.-M.; Kieffer, S.; Perroti, M.; Boucheriei, H.; Toledano, M. B. und Labarre, J.

The H₂O₂-stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*
J. Biol. Chem., 1998 (273): 22480-22489

Godon, C.; Lee, J.; Lagniel, G.; Spector, D.; Garini, J.; Labarre, J. und Toledano, M. B.

Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast
J. Biol. Chem., 1999 (274): 16040-16046

Gorin, M. B.; Yancey, S. B.; Cline, J.; Revel, J.-P. und Horwitz, J.

The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning
Cell, 1984 (39): 49-59

Green, D. R.

Apoptotic pathways: the roads to ruin
Cell, 1998 (94): 695-698

Greenberg, J. T.

Programmed cell death: a way of life for plants
Proc. Natl. Acad. Sci. (Pnas) USA, 1996 Okt. (93): 12094-12097

Greenstein, J. P. und Winitz, M.

Chemistry of the amino acids
John Wiley & Sons, Inc. (New York), 1961, pp. 1754-1767

Groover, A.; Dewitt, N.; Heidel, A. und Jones, A.

Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro
Protoplasma, 1997 (196): 197-211

Hammond-Kosack, K. E. und Jones, J. D. G.

Resistance gene-dependent plant defense responses
The Plant Cell, 1996 Okt. (8): 1773-1791

Hanahan, D.

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids
J Mol Biol, 1983 Juni (166):557-580

Hannun, Y. A. und Obeid, L. M.

The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind
J. Biol. Chem., 2002 (277): 25847-25850

Hara-Chikuma, M. und Verkman, A. S.

Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins
Cell Mol Life Sci, 2006 (63): 1386-1392

Haupts, U.; Maiti, S.; Schwille, P. und Webb, W. W.

Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy
Proc. Natl. Acad. Sci., 1998 (95): 13573-13578

Heese, D.; Löffler, H. G. und Rohm, K. H.

Further characterization of porcine kidney aminoacylase I reveals close similarity to „renal dipeptidase“
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1988 (369): 559-566

Heller, K. B.; Lin, E. C. C. und Wilson, T. H.

Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*
Journal of Bacteriology, 1980 Okt. (144): 274-278

Hengartner, M. O.

The biochemistry of apoptosis
Nature, 2000 Okt. (407): 770-776

Henzler, T. und Steudle, E.

Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels
J Exp Bot, 2000 (51): 2053-2066

Hershko, A.

The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle
Cell Death Differ., 2005 Sept. (12): 1191-1197

Heymann, J. B.; Engel, A.

Aquaporins: phylogeny, structure and physiology of water channels
News in Physiological Sciences, 1999 (14): 187-193

Hinds, M. G.; Lackmann, M.; Skea, G. L.; Harrison, P. J.; Huang, D. C. S. und Day, C. L.

The structure of BCL-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity
The EMBO Journal, 2003 (22): 1497-1507

Hoch, T. (2006)

Analyse der Funktion von Aquaporinen bei der Reaktion auf oxidativen Stress
Diplomarbeit, Institut Genetik, Fachbereich Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim

Hockenbery, D.; Nunez, G.; Milliman, C.; Schreiber, R. D. und Korsmeyer, S. J.

Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death
Nature, 1990 Nov. (348): 334-336

Hoerberichts, F. A. und Woltering, E. J.

Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators
Bioessays, 2003 (25): 47-57

Hoekema, A.; Hirsch, P. R.; Hooykaas, P. J. J. und Schilperoort, R. A.

Binary vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid
Nature, 1983 (303): 179-180

Holm, L. M.; Jahn, T. P.; Moller, A. L.; Schjoerring, J. K.; Feeri, D. et al.

NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes
Pflug Arch, 2005 (450): 415-428

Horvath, D. M. und Chua, N. H.

Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds
Plant Mol. Biol., 1996 (31): 1061-1072

Huang, Q.; Petros, A. M.; Virgin, H. W.; Fesik, S. W. und Olejniczak, E. T.

Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr virus, a homolog of human Bcl-2
J. Mol. Biol., 2003 Okt. (332): 1123-1130

Hunter, J. J.; Bond, B. L. und Parslow, T. G.

Functional dissection of the human Bcl-2 protein: sequence requirements for inhibition of apoptosis
Mol. Cell. Biol., 1996 (16): 877-883

Hunter, J. J. und Parslow, T. G.

A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis
The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 1996 April (271): 8521-8524

Inoue, H.; Nojima, H. und Okayama, H.

High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids
Gene, 1990 (96): 23-28

Ishikawa, F.; Suga, S.; Uemura, T.; Sato, M. H. und Maeshima, M.

Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*
FEBS Letters, 2005 (579): 5814-5820

Jahn, T. P.; Moller, A. L.; Zeuthen, T.; Holm, L. M.; Klaerke, D. A.; Mohsin, B.; Kuhlbrandt, W. und Schjoerring, J. K.

Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia
FEBS Lett., 2004 (574): 31-46

Jakob, M.; Miller, Y. E. und Röhm, K. H.

Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding aminoacylase 1 from porcine kidney
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1992 (373): 1227-1231

Johanson, U. und Gustavsson, S.

A new subfamily of major intrinsic proteins in plants
Molecular Biology and Evolution, 2002 April (19): 456-461

Johanson, U.; Karlsson, M.; Johansson, I.; Gustavsson, S.; Sjövall, S.; Fraysse, L.; Weig, A. R. und Kjellbom, P.

The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants
Plant Physiology, 2001 August (126): 1358-1369

Johansson, I.; Karlsson, M.; Johanson, U.; Larsson, C. und Kjellbom, P.

The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance
Biochim. Biophys. Acta, 2000 (1465): 324-342

Johansson, I.; Karlsson, M.; Shukla, V. K.; Chrispeels, M. J.; Larsson, C. und Kjellbom, P.

Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation
The Plant Cell, 1998 März (10): 451-459

Johnsson, N. und Varshavsky, A.

Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo
PNAS, 1994 Okt. (91): 10340–10344

Jung, J. S.; Preston, G. M.; Smith, B. L.; Guggino, W. B. und Agre, P.

Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP
J. Biol. Chem., 1994 Mai (269): 14648-14654

Kaufmann, S. H. und Hengartner, M. O.

Programmed cell death: alive and well in the new millennium
Trends Cell Biol., 2001 (11): 526-534

Keen, N. T.

Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions
Annu. Rev. Genet., 1990 (24): 447-463

Kerr, J. F.; Gobe, G. C.; Winterford, C. M. und Harmon, B. V.

Anatomical methods in cell death
Methods Cell Biol, 1995 (46): 1-27

Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. und Currie, A. R.

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics
Br J Cancer, 1972 (26): 239-257

Kordel, W. und Schneider, F.

Chemical investigation of pig kidney aminoacylase
Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1976 (445): 446-457

Kordel, W. und Schneider, F.

Renal aminoacylase, a zinc enzyme
Z Naturforsch, 1977 (32C): 342-344

Köber, J. (2008)

Einfluss der Expression von Aquaporinen und des anti-apoptotischen BHRF1 auf die H₂O₂-Sensitivität von Hefen
Diplomarbeit, Institut Genetik, Fachbereich Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim

Krajewski, S.; Tanaka, S.; Takayama, S.; Schibler, M. J.; Fenton, W. und Reed, J. C.

Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and the outer mitochondrial membranes
Cancer Res., 1993 (53): 4701-4714

Lacomme, C. und Cruz, S. S.

Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999 Juli (96): 7956-7961

Lam, E.; Kato, N. und Lawton, M.

Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response
Nature, 2001 Juni (411): 848-853

Lam, E. und del Pozo, O.

Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens
Current Biology, 1998 Sept. (8): 1129-1132

Laemmli, U. K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, 1970 (227): 680-685

Leist, M.; Gantner, F.; Bohlinger, I.; Tiegs, G.; Germann, P. G. und Wendel, A.

Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models
Am. J. Pathol., 1995 (146): 1220-1234

Leist, M. und Nicotera, P.

The shape of cell death
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997 (236): 1-9

Levine, A.; Pennell, R.; Alvarez, M.; Palmer, R. und Lamb, C. J.

Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response
Curr. Biol., 1996 (6): 427-437

Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R. und Lamb, C.

H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response
Cell, 1994 (79): 583-593

Li, H.; Lee, S. und Jap, K.

Molecular design of aquaporin-1 water channel as revealed by electron crystallography
Nat Struct Biol, 1997 (4): 263-265

Li, L.-Y.; Liu, M.-Y.; Shih, H.-M.; Tsai, C.-H. und Chen, J.-Y.

Human cellular protein VRK2 interacts specifically with Epstein-Barr virus BHRF1, a homologue of Bcl-2, and enhances cell survival
Journal of General Virology, 2006 Juni (87): 2869-2878

Li, L.-Y.; Shih, H.-M.; Liu, M.-Y. und Chen, J.-Y.

The cellular protein PRA1 modulates the anti-apoptotic activity of Epstein-Barr virus BHRF1, a homologue of Bcl-2, through direct interaction
The Journal of Biological Chemistry, 2001 Mai (276): 27354-27362

Liu, L. H.; Ludewig, U.; Gassert, B.; Frommer, W. B. und von Wiren, N.

Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*
Plant Physiol., 2003 (133): 1220-1228

Liu, Z.; Zhen, Z.; Zuo, Z.; Wu, Y.; Liu, A.; Yi, Q. und Li, W.

Probing the catalytic center of porcine aminoacylase 1 by site-directed mutagenese, homology modeling and substrate docking
J. Biochem., 2006 (139): 421-430

Lithgow, T.; van Driel, R.; Bertram, J. F. und Strasser, A.

The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum and the outer mitochondrial membrane
Cell Growth Differ., 1994 (3): 411-417

Löffler, H. G.; Röhm, K. H. und Schneider, F.

Studies on the metal ion dependence, kinetics and SH (S-S) groups of acylamino acid amidohydrolase
In Bertini, I.; Luchinat, C.; Maret, W.; Zeppezauer, M. (Eds.): Zinc enzymes
Birkhäuser (Boston, Basel, Stuttgart), 1986, pp. 281-288

Lohaus, R. (2002)

Simulation der Hefezelle (*Saccharomyces cerevisiae*) und ihres Lebenszyklus

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung Medizinische und Biologische Informatik, www.dkfz-heidelberg.de/de/mbi/pub/pdf/tr136.pdf

Loqué, D.; Ludewig, U.; Yuan, L. und von Wirén, N.

Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole

Plant Physiol., 2005 (137): 671-680

Lugay, J. C. und Aronson, J. N.

Palo Verde (*Parkinsonia Aculeata* L.) seed aminoacylase

Biochim. Biophys. Acta, 1969 (191): 397-414

Ma, J. F.; Tamai, K.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Konishi, S.; Katsuhara, M.; Ishiguro, M.; Murata, Y. und Yano, M.

A silicon transporter in rice

Nature, 2006 März (440): 688-691

Ma, S.; Quist, T. M.; Ulanov, A.; Joly, R. und Bohnert, H. J.

Loss of TIP1;1 aquaporin in *Arabidopsis* leads to cell and plant death

The Plant Journal, 2004 Aug. (40): 845-859

Maceyka, M.; Nava, V. E.; Milstien, S. und Spiegel, S.

Aminoacylase 1 is a sphingosine kinase 1-interacting protein

FEBS Letters, 2004 April (568): 30-34

Maier, M. (2005)

Analyse der Funktion von Aquaporinen beim programmierten Zelltod in Pflanzen

Diplomarbeit, Institut Genetik, Fachbereich Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim

Maile, T. (2001)

Charakterisierung von Apoptoseregulatoren in transgenen Pflanzen und Isolation von interagierenden Proteinen im Hefezweihybridensystem

Diplomarbeit, Institut Genetik, Fachbereich Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim

Mainiero, M. (2004)

Charakterisierung der Interaktion von pflanzlichen Aquaporinen mit dem viralen Protein BHRF1

Diplomarbeit, Institut Genetik, Fachbereich Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim

Martins, L. M. und Earnshaw, W. C.

Apoptosis: alive and kicking in

Trends Cell Biol., 1997 (7): 111-114

Mast, S. (2000)

Expression von apoptosemodulierenden Proteinen in *Nicotiana tabacum* L. und Analyse der Auswirkungen auf Physiologie und Pathogenabwehr der Pflanze

Diplomarbeit, Institut Genetik, Fachbereich Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim

Maurel, C.; Reizer, J. und Schroeder, J. I. und Chrispeels, M. J

The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes

The EMBO Journal, 1993 Juni (12): 2241-2247

Mayer, R. J.

The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis
Nat Rev Mol Cell Biol, 2000 (1): 145-148

McConkey, D. J. und Orrenius, S.

Signal transduction pathways to apoptosis
Trends Cell Biol., 1994 (4): 370-375

Mehler, A. H.

Studies on the reactions of illuminated chloroplasts. I Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents
Arch Biochem Biophys, 1951 (33): 65-77

Meng, Y. L.; Liu, Z. und Rosen, B. P.

As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*
J. Biol. Chem., 2004 (279): 18334-18341

Mergemann, H. und Sauter, M.

Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice
Plant Physiol., 2000 Okt. (124): 609-614

Miller, J. H.

Experiments in molecular genetics
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972

Mitsuhar, I.; Malik, K. A.; Miura, M. und Ohashi, Y.

Animal cell death suppressors Bcl-x(L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants
Curr. Biol., 1999 (9): 775-778

Mitsuoka, K.; Murata, K.; Walz, T.; Hirai, T.; Agre, P.; Heymann, J. B.; Engel, A. und Fujiyoshi, Y.

The structure of aquaporin-1 at 4,5-Å resolution reveals short α -helices in the center of the monomer
J Struct Biol, 1999 (128): 34-43

Mitta, M.; Kato, I. und Tsunasawa, S.

The nucleotide sequence of human aminoacylase-1
Biochim. Biophys. Acta, 1993 (1174): 201-203

Mitta, M.; Ohnogi, H.; Yamamoto, A.; Kato, I.; Sakiyama, F. und Tsunasawa, S.

The primary structure of porcine aminoacylase 1 deduced from cDNA sequence
J. Biochem., 1992 (112): 737-742

Mizutani, M.; Watanabe, S.; Nakagawa, T. und Maeshima, M.

Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*
Plant Cell Physiol., 2006 (47): 1420-1426

Møller, I. M.

Plant mitochondrial and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2001 (52): 561-591

Morita, Y.; Perez, G. I.; Paris, F.; Miranda, S. R.; Ehleiter, D.; Haimovitz-Friedman, A.; Fuks, Z.; Xie, Z.; Reed, J. C.; Schuchman, E. H.; Kolesnick, R. N. und Tilly, J. L.

Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy
Nat. Med., 2000 (6): 1109-1114

Murakami, S.; Kondo, Y.; Nakano, T. und Sato, F.

Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells
FEBS Lett, 2000 (468): 15–18

Murata, K.; Mitsuoka, K.; Hirai, T.; Walz, T.; Agre, P.; Heymann, J. B.; Engel, A. und Fujiyoshi, Y.

Structural determinants of water permeation through aquaporin-1
Nature, 2000 (407): 599-605

Nakatsukasa, K.; Huyer, G.; Michaelis, S. und Brodsky, J. L.

Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein
Cell, 2008 Jan. (132): 101-112

Nataraj, A.; Pathak, S.; Hopwood, V.; McDonnell, T. und Ananthaswamy, H.

Bcl-2 oncogene blocks differentiation and extends viability but does not immortalize normal human keratinocytes
Int. J. Oncology, 1994 (4): 1211-1218

Nava, V. E.; Cheng, E. H.-Y.; Veliuona, M.; Zou, S.; Clem, R. J.; Mayer, M. L. und Hardwick, J. M.

Herpesvirus saimiri encodes a functional homolog of the human bcl-2 oncogene
J. Virol., 1997 Mai (71): 4118-4122

Neill, S.; Desikan, R. und Hancock, J.

Hydrogen peroxide signalling
Current Opinion in Plant Biology, 2002 Juli (5): 388-395

Nelson, S.

Aquaporin-1: the original water channel
Biochemistry and Molecular Biophysics, The University of Arizona, 2007

Ng, C. K.; Carr, K.; McAinsh, M. R.; Powell, B. und Hetherington, A. M.

Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate
Nature, 2001 (410): 596-599

Noctor, G. und Foyer, C. H.

Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control
Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998 (49): 249-279

Nürnberg, T.

Signal perception in plant pathogen defense
Cell Mol Life Sci, 1999 (55): 167-182

O'Brien, I. D. W.; Baguley, B. C.; Murray, B. G.; Morris, B. A. M. und Ferguson, I. B.

Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible
Plant J., 1998 (13): 803-814

Oltvai, Z. N.; Milliman, C. L. und Korsmeyer, S. J.

Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death
Cell, 1993 (74): 609-619

Paganelli, C. G. und Solomon, A. K.

The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane
J. gen. Physiol., 1957 (41): 259-278

Palm, G. J. und Röhm, K. H.

Aminoacylase I from porcine kidney: identification and characterization of two major protein domains
J. Protein Chem., 1995 Mai (14): 233-240

Park, J. H. und Saier, M. H.

Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins
J. Membr. Biol., 1996 (153): 171-180

Pittelkow, S.; Lindner, H. und Röhm, K. H.

Human and porcine aminoacylase I overproduced in a baculovirus expression vector system. Evidence for structural and functional identity with enzymes isolated from kidney
Protein Expression and Purification, 1998 (12): 269-276

Preston, G. M. und Agre, P.

Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991 Dez. (88): 11110-11114

Printen, J. A. und Sprague, G. F. Jr.

Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade
Genetics, 1994 Nov. (138): 609-619

Pushkin, A.; Carpenito, G.; Abuladze, N.; Newman, D.; Tsuprun, V.; Ryazantsev, S.; Motemoturu, S.; Sassani, P.; Solovieva, N.; Dukkipati, R. und Kurtz, I.

Structural characterization, tissue distribution and functional expression of murine aminoacylase III
Am J Physiol Cell Physiol, 2004 (286): 848-856

Quigley, F.; Rosenberg, J. M.; Shachar-Hill, Y. und Bohnert, H. J.

From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins
Genome Biology, 2001 (3): 0001,1-0001,17

Rawlings, N. D. und Barrett, A. J.

Evolutionary families of metallopeptidases
Methods Enzymol., 1995 (248): 183-228

Reed, J. C.

Double identity for proteins of the Bcl-2 family
Nature, 1997 (387): 773-776

Reed, J. C.; Miyashita, S.; Takayama, H. G.; Wang, T.; Sato, S.; Krajewski, C.; Aime-Sempe, S.; Bodrug, S.; Kitada, S. und Hanada, M.

Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy
J Cell Biochem, 1996 (60): 23-32

Reed, J. C.; Schendel, S. L.; Xie, Z.; Montal, M. O.; Matsuyama, S. und Montal, M.

Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2
Cell Biology, 1997 Mai (94): 5113-5118

Reizer, J.; Reizer, A. und Saier, M. H.

The MIP family of integral membrane channel proteins – sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution and proposed functional-differentiation of the 2 repeated halves of the proteins
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 1993 (28): 235-257

Rehman, A. G.; Booth, C. und Potten, C. S.

What is apoptosis, and why is it important?

BMJ, 2001 Juni (322): 1536-1538

Rhee, S. G.

Redox signalling: hydrogen peroxide as intracellular messenger

Exp Mol Med, 1999 (31): 53-59

Roth, B. (2003)

Induktion von programmiertem Zelltod in *Nicotiana tabacum* L. durch virale oder humane Bcl-2 Proteine und Identifizierung pflanzlicher Interaktionsproteine

Dissertation, Institut Genetik, Fachbereich Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim

Rubino, L.; Di Franco, A. und Rosso, M.

Expression of a plant virus non-structural protein in *Saccharomyces cerevisiae* causes membrane proliferation and altered mitochondrial morphology

J. General Virology, 2000 (81): 279-286

Ryals, J. A.; Neuenschwander, U. H.; Willits, M. G.; Molina, A.; Steiner, H.-Y. und Hunt, M. D.

Systemic acquired resistance

The Plant Cell, 1996 Okt. (8): 1809-1819

Sagi, M. und Fluhr, R.

Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection

Plant Physiol, 2001 (126): 1281-1290

Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B. und Erlich, H. A.

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase

Science, 1988 (239): 487-491

Sakanya, V.; Desmarez, L.; Legrain, C.; Charlier, D.; Mett, I.; Kochikyan, A.; Savchenko, A.; Boyen, A.; Falmagne, P. und Pierard, A.

Gene cloning, sequence analysis, purification and characterization of a thermostable aminoacylase from *Bacillus stearothermophilus*

Appl. Environ. Microbiol., 1993 (59): 3878-3888

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T.

Molecular cloning: a laboratory manual

2. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, NY, USA, 1998

Sanchez, P.; de Torres Zabala, M. und Grant, M.

AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge

Plant J., 2000 (21): 393-399

Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R.

DNA sequencing with chain terminating inhibitors

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1977 (74): 5463-5467

Sansom, M. S. P. und Law, R. J.

Membrane proteins: aquaporins – channels without ions
Current Biology, 2001 Jan. (11): R71-R73

Santoni, V.; Gerbeau, P.; Javot, H. und Maurel, C.

The high diversity of aquaporins reveals novel facets of plant membrane functions
Curr. Opin. Plant Biol, 2000 (3): 476-481

Santoni, V.; Verdoucq, L.; Sommerer, N.; Pflieger, D. und Maurel, C.

Methylation of aquaporins in plant plasma membrane
Biochem. J., 2006 (400): 189-197

Savill, J.

Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis
British Medical Bulletin, 1997 (53): 491-508

Scheuring, S.; Ringler, P.; Borgnia, M.; Stahlberg, H.; Müller, D. J.; Agre, P. und Engel, A.

High resolution AFM topographs of the *Escherichia coli* water channel aquaporin Z
EMBO J, 1999 (18): 4981-4987

Schmiedeberg, O.

Über Spaltungen und Synthesen im Tierkörper
Naunym-Schmiedeberg's Archiv Exp. Pathol. Pharmacol., 1881 (19): 379-392

Schopfer, P.; Plachy, C. und Frahry, G.

Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid
Plant Physiology, 2001 April (125): 1591-1602

Shimomura, O.; Johnson, F. H. und Saiga, Y.

Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan
Aequorin J. Cell Comp. Physiol., 1962 (59): 223-239

Steffens, B. und Sauter, M.

Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H₂O₂ through an autoamplified signal pathway
Plant Cell, 2009 Jan. (21): 184-196

Stenson-Cox, C.; Fitzgerald, U. und Samali, A.

In the cut and thrust of apoptosis, serine proteases come of age
Biochem Pharmacol, 2003 (66): 1469-1474

Stephan, H.; Polzar, B. und Mannherz, H. G.

Sein oder nicht sein?
Naturwissenschaftliche Rundschau, 2000 (624): 273-281

Stewart, B. W.

Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular indicators
J. Natl. Cancer Inst., 1994 (86): 1286-1296

Strasser, A.; Huang, D. C. S. und Vaux, D. L.

The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy

Biochim. Biophys. Acta, 1997 Okt. (1333): F151-F178

Tajikhorshid, E.; Nollert, P.; Jensen, M.; Miercke, L.; O'Connell, J.; Stroud, R. und Schulten, K.

Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning

Science, 2002 (296): 525-530

Taiz, L.

The plant vacuole

J Exper. Biol., 1992 (172): 113-122

Takano, J.; Wadw, M.; Ludewig, U.; Schaaf, G.; von Wiren, N. und Fujiwara, T.

The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation

Plant Cell, 2006 (18): 1498-1509

Thannickal, V. J. und Fanburg, B. L.

Reactive oxygen species in cell signaling

Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 2000 Dez. (279): 1005-1028

Theodorakis, P.; D'Sa-Eipper, C.; Subramanian, T. und Chinnadurai, G.

Unmasking of a proliferation-restraining activity of the anti-apoptosis protein EBV BHRF1

Oncogene, 1996 April (12): 1707-1713

Thompson, C. B.

Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease

Science, 1995 (267): 1456-1462

Thorburn, J.; Bender, L. M. und Throburn, A.

Caspase- and serine protease-dependent apoptosis by the death domain of FADD in normal epithelia cells

Mol Biol Cell, 2003 (14): 67-77

Torres, M. A.; Dangl, J. L. und Jones, J. D. G.

Arabidopsis gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response

Proc Natl Acad Sci USA, 2002 (99): 517-522

Tsujimoto, Y.; Cossman, J.; Jaffe, E. und Croce, C. M.

Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma

Science, 1985 (228): 1440-1443

Tsukaguchi, H.; Shayakul, C.; Berger, U. V.; Mackenzie, B.; Devidas, S.; Guggino, W. B.; van Hoek, A. N. und Hedinger, M. A.

Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel

J. Biol. Chem., 1998 (273): 24737-24743

Udenfriend, S.; Stein, S.; Bohlen, P.; Dairman, W.; Leimgruber, W. und Weigele, M.

Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomole range

Science, 1972 (178): 871-872

Uehlein, N.; Lovisolo, G.; Siefritz, F. und Kaldenhoff, R.

The tobacco aquaporin NTAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions
Nature, 2003 (425): 734-737

Uren, A. G.; O'Rourke, K.; Aravind, L. A.; Pisabarro, M. T.; Seshagiri, S.; Koonin, E. V. und Dixit, V. M.

Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma
Mol. Cell, 2000 (6): 961-967

van Brocklyn, J. R.; Lee, M. J.; Menzeleev, R.; Olivera, A.; Edsall, L.; Cuvillier, O.; Thomas, D. M.; Coopman, P. J. P.; Thangada, S.; Hla, T. und Spiegel, S.

Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival
J. Cell Biol., 1998 (142): 229-240

Vaux, D. L.; Cory, S. und Adams, J. M.

Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells
Nature, 1988 (335): 440-442

Vaux, D. L. und Strasser, A.

The molecular biology of apoptosis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996 März (93): 2239-2244

Vercammen, D.; van de Cotte, B.; De Jaeger, G.; Eeckhout, D.; Casteels, P.; Vandepoele, K.; Vandenberghe, I.; Van Beeumen, J.; Inzé, D. und Van Breusegem, F.

Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine
J Biol Chem, 2004 Okt. (279): 45329-45336

Verhagen, A. M.; Silke, J.; Ekert, P. G.; Pakusch, M.; Kaufmann, H.; Connolly, L. M.; Day, C. L.; Tikoo, A.; Burke, R.; Wrobel, C.; Moritz, R. L.; Simpson, R. J. und Vaux, D. L.

HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins
J Biol Chem, 2002 (277):445-454

Wallace, I. S.; Choi, W. G. und Roberts, D. M.

The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins
Acta, 2006 (1758): 1165-1175

Walz, T.; Hirai, T.; Murata, K.; Heymann, J. B.; Mitsuoka, K.; Fujiyoshi, Y.; Smith, B. L.; Agre, P. und Engel, A.

The 6Å three-dimensional structure of aquaporin-1
Nature, 1997 Juni (387): 624-627

Wang, H.; Li, J.; Bostock, R. M. und Gilchrist, D. G.

Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development
The Plant Cell, 1996 März (8): 375-391

Wang, J.; Sheehan, M.; Brookman, H. und Timko, M. P.

Characterization of cDNAs differentially expressed in roots of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv Burley 21) during the early stages of alkaloid biosynthesis
Plant Sci., 2000 Sept. (158): 19-32

Wang, K.; Wei, M. C.; Gross, A.; Yin, X.-M.; Jockel, J.; Milliman, C.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P. und Korsmeyer S. J.

Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-X_L prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death

J. Biol. Chem., 1999 Jan. (274): 1156-1163

Weigel, R. (2000)

Identifizierung und Charakterisierung von NIMIN-1, NIMIN-2 und NIMIN-3, Mitgliedern einer neuen Familie von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., die mit NPR1/NIM1, einem Schlüsselprotein in der systemisch aktivierten Resistenz, interagieren

Dissertation, Institut Genetik, Fachbereich Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim

Weigel, R. R.; Bäuscher, C.; Pfitzner, A. J. P. und Pfitzner, U. M.

NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants

Plant Molecular Biology, 2001 (46): 143-160

White, E.

Life, death and the pursuits of apoptosis

Genes Dev., 1996 (10): 1-15

Wickner, W.

Yeast vacuoles and membrane fusion pathways

The EMBO Journal, 2002 Jan. (21): 1241-1247

Wu, B. und Beitz, E.

Aquaporins with selectivity for unconventional permeants

Cell. Mol. Life Sci., 2007 (64): 2413-2421

Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. und Messing, J.

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors

Gene, 1985 (33): 103-119

Zardoya, R.

Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family

Biology of the Cell, 2005 (97): 397-414

Zardoya, R. und Villalba, S.

A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes

J Mol Evol, 2001 (52): 391-404

8 Abkürzungsverzeichnis

3'-	am Carboxyterminus einer DNA bzw. RNA
5'-	am Aminoterminus einer DNA bzw. RNA
A	Adenin (Nukleotid)
A	Ampère
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AB	Antikörper („antibody“)
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Avr</i> -Gen	Avirulenzgen
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“
BD	Bindungsdomäne
BHRF1	„ <i>Bam</i> HI fragment H rightward open reading frame no. 1“
<i>bla</i> -Gen	kodiert für das Enzym β -Laktamase, das Ampicillin inaktiviert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumine“)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (Nukleotid)
°C	Grad Celsius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cah	Cyanamidhydratase
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus („Cauliflower Mosaic Virus“)
CarMV	Nelkenschekungsvirus („Carnation Mottle Virus“)
C:I	Chloroform:Isoamylalkohol
CIAP	„Calf Intestine Alkaline Phosphatase“
cm	Zentimeter
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
C-terminal	am Carboxyterminus eines Proteins
C-Terminus	der Carboxyterminus eines Proteins

Cub	C-terminale Hälfte von Ubiquitin
cv.	cultivar
d	Tag(e) („days“)
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCF	2',7'-Dichlorfluorescein
DCFH	2',7'-Dichlorfluorescin
DCFH-DA	2',7'-Dichlorfluorescindiacetat
ddTTP	Didesoxythymintrisphosphat
d. h.	das heißt
DMFA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dTs	Desoxythymidine
dpi	Tage nach Inokulierung („days post infection“)
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f. c.	Endkonzentration („final concentration“)
FeCl ₃	Eisenchlorid
FeSO ₄	Eisensulfat
FL	„full length“
fwd	„forward“, 5' → 3'
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
G	Guanin (Nukleotid)
GFP	grün fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“)
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)

H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HR	Hypersensitive Reaktion
HRP	Meerrettich Peroxidase („Horse Radish Peroxidase“)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOAc	Kaliumacetat
KOH	Kaliumhydroxid
konz.	konzentriert(e)
kV	Kilovolt
l	Liter
L	Leucin
L.	Nomenklatur nach Linné (Carl von Linné)
LB	„left border“
LB	Luria Bertani Medium
LiOAc	Lithiumacetat
m	Meter
M	molar
MCS	multiple Klonierungsstelle („multiple cloning site“)
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min.	Minute(n)
MIP	„major intrinsic protein“
ml	Milliliter
mM	milli Molar
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
MS	Mineralsalze nach Murashige & Skoog
mol	Mol
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure

MΩ	Megaohm
mRNA	„messenger“ (= Boten) Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaF	Natriumfluorid
NaHSO ₃	Natriumhydrogensulfit, Natriumbisulfit
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
nm	Nanometer
NOS	Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthasegens
N-terminal	am Aminoterminus eines Proteins
N-Terminus	der Aminoterminus eines Proteins
Nub	N-terminale Hälfte von Ubiquitin
NubG	N-terminale Hälfte von Ubiquitin mit Aminosäureaustausch Ile → Gly
OD _{xyz}	optische Dichte bei xyz nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
ori	Replikationsursprung („origin of replication“)
p. a.	für analytische Zwecke = höchster Reinheitsgrad („pro analysi“)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pBS	pBluescript Vektor
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCD	Programmierter Zelltod („programmed cell death“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (p = negativer Potenzexponent)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i> DNA-Polymerase
p.i.	nach der Infektion/Infiltration („post infection/infiltration“)
PIP	Plasmamembranprotein („plasma membrane intrinsic protein“)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	mit der Pathogenese assoziiert („pathogenesis related“)

PT30	30 kDa Movementprotein von ToMV
pv.	pathovar
RB	„right border“
rev	„reverse“, 3' → 5'
RFUs	relative Fluoreszenzeinheiten („relative fluorescent units“)
R-Gene	Resistenzgene
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROI	reaktives Sauerstoffintermediat
ROS	reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SA	Salicylsäure („salicylic acid“)
SAR	systemisch erworbene Resistenz („systemic acquired resistance“)
SD	Synthetic dropout Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
Sek.	Sekunde(n)
sog.	sogenannte(n)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
T	Thymin (Nukleotid)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TaOpt	optimale Anlagerungstemperatur eines Primerpaares
Taq-Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TB	Tris Borat Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	„Transfer“-DNA aus dem Ti-Plasmid von <i>A. tumefaciens</i>
TDT	Desoxynucleotidyl Transferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TIP	Tonoplastenprotein („tonoplast intrinsic protein“)
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid („tumor inducing plasmid“)
TM	Transmembrandomäne
TMV	Tabakmosaikvirus („Tobacco Mosaic Virus“)
ToMV	Tomatenmosaikvirus („Tomato Mosaic Virus“)

Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TTBS	Tris-gepufferte Saline mit Tween-20
U	Enzymeinheiten („Units“), 1 U = 1/60 μ kat
U	Uracil (Nukleotid)
u. a.	unter anderem
UBP	Ubiquitin-spezifische Protease
uni	„universe“, 5' \rightarrow 3'
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
var.	variabel
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
x	„mal“
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
Y2H	Hefezweihybrid („Yeast Two Hybrid“)
yEGFP	„yeast enhanced green fluorescent protein“
YPAD	„yeast extract-peptone-dextrose medium + adenine“
z. B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
Ω	Ohm, Maßeinheit für den elektrischen Widerstand
∞	unendlich
\emptyset	Durchmesser
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol

Größeneinheiten:

M	10^6 , Mega-
k	10^3 , kilo-
c	10^{-2} , centi-
m	10^{-3} , milli-
μ	10^{-6} , micro-
n	10^{-9} , nano-
p	10^{-12} , pico
f	10^{-15} , femto-

Aminosäuren:

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

Sequenzen

Aquaporin NtPIP2.2b aus *Nicotiana tabacum*

ATGACTAAAGAAGTAGAGGTAGCAACAGAGCAACCAACAGAGTTTTTCAGCAAAAGACTATACTGACCC
 TCCACCAGCTCCTTTAGTAGACTTTGAGGAGCTGGCACAATGGTCACTTTACAGAGCTGTTATTGCTG
 AGTTCATTGCCACTTTGCTTTTTCTTTATGTTACTGTTTTGACTGTGATTGGGTATAAGGTCCAGTCA
 GATGTCAAAGCCGACGGTGATATCTGTGGCGGCGTTGGTATTCTTGGTATTGCTTGGGCTTTTGGTGG
 CATGATTTTCATTCTTGTTTACTGCACCGCCGGTATCTCCGGAGGACACATAAACCCAGCAGTGACAT
 TTGGGCTGTTTTTGGCAAGGAAAGTATCATTGATCAGAGCAGTATTGTACATGGTGGCACAGTGTTTTG
 GGTGCAATCTGTGGTGTGGGTTTTGTGAAGGCATTCCAGAGTGCTTATTATGTTAGGTATGGTGGAGG
 TGCTAATGTCATGGCTCCTGGCCATACCAAAGGTGTTGGATTAGCTGCTGAAATTATTGGTACTTTTTG
 TTTTGGTTTACACTGTCTTCTCTGCCACTGACCCTAAGAGAAATGCTAGAGACTCCCATGTCCCTGTG
 TTGGCACCACCTCCAATTGGATTTGCTGTGTTTCATGGTTCACTTAGCCACCATAACCAATTACTGGAAC
 TGGCATCAATCCTGCTAGAAGTTTTGGTGCAGCAGTATTTACAATCATGACAAAGCTTGGGATGAAC
 ACTGGATTTTCTGGGTGGGTCCCTTCATCGGAGCCTTTCGCCGCCGCGTCTACCACCAGTTCATCCTC
 CGTGCTGGTGCCATCAAAGCTCTTGGTTCCTTCAGGAGCAATGCCAGG

Aquaporin NtPIP2.2a aus *Nicotiana tabacum*

ATGACTAAAGAAGTAGAGGTAGCAACAGAGCAACCAACAGAGTTTTTCAGCAAAAGACTATACTGACCC
 TCCACCAGCTCCTTTAGTAGACTTTGAGGAGCTGACACAATGGTCACTTTACAGAGCTGTTATTGCTG
 AGTTCATTGCCACTTTGCTTTTTCTTTATGTTACTGTTTTGACTGTGATTGGGTATAAGGTCCAGTCA
 GATGTCAAAGCCGACGGTGATATCTGTGGCGGCGTTGGTATTCTTGGTATTGCTTGGGCTTTTGGTGG
 CATGATTTTCATTCTTGTTTACTGCACCGCCGGTATCTCCGGAGGACACATAAACCCAGCAGTGACAT
 TTGGGCTGTTTTTGGCAAGGAAAGTATCATTGATCAGAGCAGTATTGTACATGGTGGCACAGTGTTTTG
 GGTGCAATCTGTGGTGTGGGTTTTGTGAAGGCATTCCAGAGTGCTTATTATGTTAGGTATGGTGGAGG
 TGCTAATGTCATGGCTCCTGGCCATACCAAAGGTGTTGGATTAGCTGCTGAAATTATTGGTACTTTTTG
 TTTTGGTTTACACTGTCTTCTCTGCCACTGACCCTAAGAGAAATGCTAGAGACTCCCATGTCCCTGTG
 TTGGCACCACCTCCAATTGGATTTGCTGTGTTTCATGGTTCACTTAGCCACCATAACCAATTACTGGAAC
 TGGCATCAATCCTGCTAGAAGTTTTGGTGCAGCAGTATTTACAATCATGACAAAGCTTGGGATGAAC
 ACTGGATTTTCTGGGTGGGTCCCTTCATCGGAGCCTTTCGCCGCCGCGTCTACCACCAGTTCATCCTC
 CGTGCTGGTGCCATCAAAGCTCTTGGTTCCTTCAGGAGCAATGCCAGG

Aquaporin NtTIP1.1a aus *Nicotiana tabacum*

ATGCCGATCCACCAAATTGCTGTTGGAAGCCATGAGGAACTCCGCCAATCAGGGACGCTCAAGGCGGC
 CTTGGCGGAGTTCATCTGTACCCTGATCTTCGTTTTTCGCAGGTCAGGGTTCTGGCATGGCTTTCAACA
 AGCTATCAGCTGACGGTACCCTACTCCCGCCGGCCTCATCTCTGCCTCTATAGCGCATGCCTTCGGG
 CTGTTTGTGGCCGTCTCCGTCCGGTGCTAACATCTCCGGCGGCCATGTTAATCCCGCCGTTACCTTCGG
 TGCTTTCGTTGGTGGAAACATCACTTTGTTCCGTGGCATTCTCTACATTGTGCGCACAGTTGCTTGGAT

CCACTGTTGCTTGCTTCCTCCTTGAATTTGCCACTGGTGGCATGAGCACAGGAGCATTGCTTTGTCA
GCTGGTGTATCAGTATGGAATGCATTTGTCTTTGAAATAGTGATGACTTTTGGACTTGTTTACTACTGT
GTATGCCACTGCTGTTGACCCAAAGAAGGGAGACTTGGGTGTAATTGCACCAATTGCCATTGGTTTTA
TTGTTGGTGCCAACATTTTAGCTGGTGGGGCCTTTACTGGAGCTTCAATGAACCCTGCTGTCTCATT
GGGCCAGCTTTGGTTAGCTGGACCTGGACCCACCAATGGGTCTACTGGGCTGGACCCCTTGTTGGTGG
TGGGATTGCTGGTGTGTCTATGAACTCATCTTCATCAACCACTCCCATGAGCCACTCCCCAGTGGAG
ATTTT

Aquaporin AtTIP1.1 aus *Arabidopsis thaliana*

ATGCCGATCAGAAACATCGCCATTGGCCGTCCAGATGAAGCCACCCGTCCCGATGCCTTAAAGGCGGC
GTTGGCTGAGTTCATTTCAACTTTGATCTTTGTCGTCGCCGGTTCAGGCTCTGGCATGGCTTTCAACA
AGCTCACTGAAAACGGAGCCACCCTCCTTCTGGTCTCGTAGCTGCTGCAGTGGCTCATGCCTTTGGA
CTCTTCGTCGCTGTCTCAGTTGGTGCCAACATCTCTGGTGGACACGTTAACCCTGCCGTCACTTTCCG
TGCTTTCATTGGTGGTAACATCACTCTCCTCCGTGGTATCCTCTACTGGATTGCTCAGCTTCTCGGCT
CCGTTCGTCGCTTGCCATCCTTAAATTCGCCACCGGTGGCTTGGCTGTGCCGGCTTTTGGTCTCTCT
GCTGGAGTAGGAGTGTGAACGCTTTTCGTTTTTCGAGATCGTGATGACATTCGGGCTTGTTTACACCGT
CTACGCTACAGCCATTGACCCCAAAAACGGGAGTCTTGAACAATTGCTCCCATCGCAATCGGTTTCA
TTGTTGGAGCCAACATCTTAGCTGGAGGAGCTTTCTCTGGAGCCTCCATGAATCCCGCCGTGGCTTTC
GGACCAGCGGTGGTGGAGCTGGACATGGACCAACCACTGGGTCTACTGGGCCGGACCTCTCGTCGGCGG
TGGAATCGCTGGACTCATCTACGAAGTTTTCTTCATCAACACCACACACGAGCAGCTCCCAACCACAG
ACTAC

Aquaporin mAtTIP1.1 aus *Arabidopsis thaliana*

ATGCCGATCAGAAACACCGCCATTGGCCGTCCAGATGAAGCCACCCGTCCCGATGCCTTAAAGGCGGC
GTTGGCTGAGTTCATTTCAACTTTGATCTTTGTCGTCGCCGGTTCAGGCTCTGGCATGGCTTTCAACA
AGCTCACTGAAAACGGAGCCACCCTCCTTCTGGTCTCGTAGCTGCTGCAGTGGCTCATGCCTTTGGA
CTCTTCGTCGCTGTCTCAGTTGGTGCCAACATCTCTGGTGGACACGTTAACCCTGCCGTCACTTTCCG
TGCTTTCATTGGTGGTAACATCACTCTCCTCCGTGGTATCCTCTACTGGATTGCTCAGCTTCTCGGCT
CCGTTCGTCGCTTGCCATCCTTAAATTCGCCACCGGTGGCTTGGCTGTGCCGGCTTTTGGTCTCTCT
GCTGGAGTAGGAGTGTGAACGCTTTTCGTTTTTCGAGATCGTGATGACATTCGGGCTTGTTTACACCGT
CTACGCTACAGCCATTGACCCCAAAAACGGGAGTCTTGAACAATTGCTCCCATCGCAATCGGTTTCA
TTGTTGGAGCCAACATCTTAGCTGGAGGAGCTTTCTCTGGAGCCTCCATGAATCCCGCCGTGGCTTTC
GGACCAGCGGTGGTGGAGCTGGACATGGACCAACCACTGGGTCTACTGGGCCGGACCTCTCGTCGGCGG
TGGAATCGCTGGACTCATCTACGAAGTTTTCTTCATCAACACCACACACGAGCAGCTCCCAACCACAG
ACTACTGG

Aquaporin mAtPIP2.2 aus *Arabidopsis thaliana*

ATGGCCAAAGACGTGGAAGGACCTGAGGGATTTTCAGACAAGAGACTACGAAGATCCGCCACCAACTCC
 GTTTTTCGATGCGGACGAGCTTACCAAGTGGTCTTTATACAGAGCCGTCATTGCCGAGTTCGTAGCCA
 CTCTCCTCTTCTTGTACATCACCGTTTTAACTGTCATCGGTTACAAGATTCAGTCCGACACAAAAGCC
 GGTGGAGTTGACTGCGGCGGCGTCGGAATCCTTGGCATCGCGTGGGCTTTTGGTGGCATGATCTTCAT
 CCTTGTCTACTGCACCGCCGGTATCTCAGGTGGTCACATAAAACCCTGCGGTGACGTTTGGTTTGTCT
 TAGCCCGGAAGGTATCGCTGATTAGGGCGGTGCTTTACATGGTGGCTCAGTGTGGGTGCTATTTGT
 GGAGTTGGTTTTCGTCAAAGCCTTTCAAAGCTCTTACTATGATCGTTACGGTGGAGGAGCCAACTCTCT
 AGCAGACGGCTACAACACAGGCACCGGACTAGCCGCAGAGATCATTGGAACATTCGTTCTCGTCTACA
 CAGTCTTCTCCGTTACTGATCCCAAACGTAACGCTAGAGACTCCACGTTCCGGTTTTGGCGCCACTT
 CCGATTGGGTTTTGCGGTGTTTATGGTACATTTGGCCACTATTCCGATCACCGGAACCGGCATCAACCC
 GGCTAGGAGTTTCGGAGCTGCCGTAATCTATAACAAGAGCAAGCCATGGGATGACCACTGGATATTCT
 GGGTGGGACCATTCAATTGGAGCTGCGATAGCTGCATTTTATCACCAATTTGTCCTAAGGGCTTCAGGT
 TCCAAGTCACTTGGATCCTTCAGAAGTGCAGCCAACGTT

Aquaporin AtPIP2.2m aus *Arabidopsis thaliana*

ATGGCCAAAGACGTGGAAGGACCTGAGGGATTTTCAGACAAGAGACTACGAAGATCCGCCACCAACTCC
 GTTTTTCGATGCGGACGAGCTTACCAAGTGGTCTTTATACAGAGCCGTCATTGCCGAGTTCGTAGCCA
 CTCTCCTCTTCTTGTACATCACCGTTTTAACTGTCATCGGTTACAAGATTCAGTCCGACACAAAAGCC
 GGTGGAGTTGACTGCGGCGGCGTCGGAATCCTTGGCATCGCGTGGGCTTTTGGTGGCATGATCTTCAT
 CCTTGTCTACTGCACCGCCGGTATCTCAGGTGGTCACATAAAACCCTGCGGTGACGTTTGGTTTGTCT
 TAGCCCGGAAGGTATCGCTGATTAGGGCGGTGCTTTACATGGTGGCTCAGTGTGGGTGCTATTTGT
 GGAGTTGGTTTTCGTCAAAGCCTTTCAAAGCTCTTACTATGATCGTTACGGTGGAGGAGCCAACTCTCT
 AGCAGACGGCTACAACACAGGCACCGGACTAGCCGCAGAGATCATTGGAACATTCGTTCTCGTCTACA
 CAGTCTTCTCCGTTACTGATCCCAAACGTAACGCTAGAGACTCCACGTTCCGGTTTTGGCGCCACTT
 CCGATTGGGTTTTGCGGTGTTTATGGTACATTTGGCCACTATTCCGATCACCGGAACCGGCATCAACCC
 GGCTAGGAGTTTCGGAGCTGCCGTAATCTATAACAAGAGCAAGCCATGGGATGACCACTGGATATTCT
 GGGTGGGACCATTCAATTGGAGCTGCGATAGCTGTATTTTATCACCAATTTGTCCTAAGGGCTTCAGGT
 TCCAAGTCACTTGGATCCTTCAGAAGTGCAGCCAACGTT

humanes Aquaporin 1 (hAQP1)

ATGGCCAGCGAGTTCAAGAAGAAGCTCTTCTGGAGGGCAGTGGTGGCCGAGTTCCTGGCCACGACCCT
 CTTTGTCTTCATCAGCATCGGTTCTGCCCTGGGCTTCAAATACCCGGTGGGGAACAACCAGACGGCGG
 TCCAGGACAACGTGAAGGTGTCGCTGGCCTTCGGGCTGAGCATGCCACGCTGGCGCAGAGTGTGGGC
 CACATCAGCGGGGCCACCTCAACCCGGCTGTCACACTGGGGCTGCTGCTCAGCTGCCAGATCAGCAT
 CTTCCGTGCCCTCATGTACATCATCGCCAGTGCCTGGGGGCCATCGTCGCCACCGCCATCCTCTCAG
 GCATCACCTCCTCCCTGACTGGGAACCTGCTTGGCCGCAATGACCTGGCTGATGGTGTGAACTCGGGC
 CAGGGCCTGGGCATCGAGATCATCGGGACCCTCCAGCTGGTGCTATGCGTGCTGGCTACTACCGACCG

GAGGCGCCGTGACCTTGGTGGCTCAGCCCCCTTGCCATCGGCCTCTCTGTAGCCCTTGGACACCTCC
TGGCTATTGACTACACTGGCTGTGGGATTAACCCTGCTCGGTCCCTTGGCTCCGCGGTGATCACACAC
AACTTCAGCAACCCTGGATTTTCTGGGTGGGGCCATTCATCGGGGGAGCCCTGGCTGTACTCATCTA
CGACTTCATCCTGGCCCCACGCAGCAGTGACCTCACAGACCGCGTGAAGGTGTGGACCAGCGGCCAGG
TGGAGGAGTATGACCTGGATGCCGACGACATCAACTCCAGGGTGGAGATGAAGCCCAAATAG

Rattenaquaporin 8 (rAQP8)

ATGTCTGGGGAGCAGACGCCGATGTGTAGTATGGACCTACGTGAGATCAAGGGGAAGGAGACCAACAT
GGCTGACAGTTACCATGGCATGTCCTGGTATGAGCAGTACATAACAACCGTGTGTGGTGGAACTTTTGG
GCTCCGCTCTCTTCATCTTCATTGGGTGTCTATCGGTTCATCGAGAACAGTCCAAATACTGGGCTCCTG
CAGCCTGCCCTGGCTCATGGGCTGGCCTTGGGGCTCATCATTGCTACCTTGGGGAACATCAGCGGTGG
ACACTTCAACCCTGCTGTGTGCTGGCAGTCACACTGGTTGGAGGCCTCAAGACCATGCTGCTAATTC
CCTACTGGGTCTCCCAGCTGTTTGGGGGAATGATCGGAGCTGCCCTGGCTAAGGTGGTGGTCCAGAG
GAAAGGTTCTGGAATGCGTCTGGGGCAGCCTTTGCCATAGTCCAGGAGCAGGAGCAGGTGGCAGAAGC
CCTGGGGGTAGAGATCGTTATGACGATGCTGTTGGTATTGGCTGTGTGTATGGGTGCCGTCAATGAGA
AGACAATGGGTCCCCTAGCCCCATTCTCCATTGGTTTCTCTGTCATTGTGGATATCCTGGCAGGTGGT
GGGATCTCTGGAGCCTGCATGAACCCTGCTCGTGCCTTTGGACCTGCTGTGATGGCTGGCTACTGGGA
CTTCCATTGGATCTACTGGCTGGGCCACTCCTGGCTGGCCTCTTTGTGGGACTGCTCATTAGGCTCT
TCATTGGAGATGAGAAAACCCGCTGATTCTAAAGTCGAGG

AtACY1-94 aus *Arabidopsis thaliana*

GTCGTTCCCTTCGAGGACTCCAAGTGGACTCACCATCCGCTCCAAGCTCACATGGACCACCATGGCGA
CATCTATGCCAGGGGTCCCAGGACATGAAGTGCCTCGGGATGCAGTACCTCGAGGCCATACGCAAGC
TCCAGGCTTCTGGCTTCAAGCCACTCCGATCCGTCTATCTCTCCTTCGTCCCCGATGAAGAGATTGGC
GGCCACGATGGCGCAGAGAAGTTTGTGAATCCCAATTATTCAAGAGCTTGAACATCGCAATCGTGCT
CGACGAAGGCCTGCCATCGCCTACTGAGAGTTACAGAGTATTCTATGGAGAGAGGAGTCCCTGGTGGC
TGGTGATTAAGGCTAAAGGTCCACCTGGCCACGGTGCCAAGCTCTATGACAACCTCTGCCATGGAGAAT
CTGCTCAAAGCATTGAGAGTATTCGCAGATTCAGAGCTTCTCAGTTCGATCTTCTCAAAGCTGGTGG
GATGGCTGAAGGCGATGTTGTCTCTGTGAACATGGCCTTCCCTCAAGGCTGGCACACCTTCTCCAACCTG
GTTTCGTAATGAATCTGCAACCATCTGAGGCAGAAGCTGGTTTCGACATTCGTGTTCCACCCAGCGTT
GATGCTGAAGCACTCGAAAGACGTTTAGTGGAGGAATGGGCTCCAGCAGCACGAAACATGTCCTTTGA
GTTCAAGCAGAAGCTTACGGGAAGCAATTCCCTTACAGCAGCAGATGATTCAAATCCTTGGTGGGGGC
TCTTGAAAATGCTGTTAAGGAAGCCGGAGGTAGGACCAGTAAGCCTGAGATTTTCCCTGCATCAACG
GATGCTCGCTACTTTCGCAAGGCTGGCGTGCCTGCCTTTGGGTCTCTCCCATATCAAACACCCCGAG
TCTGCTTCATGACCACAATGAGTATTTGGGTAAAGCTGAGTACTTGAAAGGCATTGAGGTGTATGTTT
CAATCATCAAAGCTTATGCATCATATGAAAGCAAAAGTGGTTCACGAGATGAGTTATGA

Aminoacylase aus *Nicotiana tabacum* (NtACY)

ATGAGTTTTTGC GGCGGTAGGCGAGACAAGCACA ACTCTTATCATTACTCTCTGTGTCTGT CCGTCTT
GTTGTTGGTCACAGCGACGGCCGGAAGAAGCGTCGACAATCATATCAAGATTTCCAACAGTACCTTC
AGATCAATACAGCCCAACCTCAGCCCACTACTATGAAGCCGCCGAGTTTATAACCTCACAGGCGAAG
TCGCTAAACCTCGAATCCCAGACCCTGGAGCTGGTGAAGGGCAAGCCTTTAATTCTCCTGAAATGGGC
AGGCAAGGACCCCAGCCTCCCTTCCGTCCTACTCAACTCACATACCGACGTTGTCCCTTCCGAGCATC
ACAAGTGGGCCACCCACCTTTCTCCGCCACTTAGATCCCGCTAGCGGCAACATCTACGCCCGGGGT
TCTCAGGACATGAAGTGC GTGGCTTGCAGTACCTGGAGGCCATTCGCAAGCTCAAGGCTTCTGGCTT
CCAACCAACGCGCACTGTCTACCTCTCCTTCGTCCCCGACGAGGAAATCGGCGGAGACGATGGTGCCG
GAAAGTTTTGTGCATTC CGATGTCTTCGTGAAGATGAATGTTGGGATTGTACTTGACGAGGGCTTGCCT
TCTCCCACCGAAA ACTATCGTGCATTTCTATGGGGAGAGGTCCCCCTGGTGGCTGGTCGTTAAAGCTGT
AGGTGCTCCTGGACACGGGGCTAAGCTCTATGATAATACTGCCACGGAGAATCTACTTAAAAGCATCG
AAACTATAAGGAGATTCAGGGCTGCGCAGTTCGATTTAGTTAAGGCGGGATTGAAAGCTGAAGGCGAG
GTCATTTCTGTTAATATGGTCTTCTTGAAAGCTGGCACCCCTTCTCCCTCTGGTTTTGTCATGAACCT
GCAGCCATCTGAAGCCCAAGCAGGATTTGACATCAGAGTACCGCCA ACTGCAGATCAAGCATCCTTGG
AGAAGAGAATAGCTGAGGAATGGGCACCTGCTTCACGAAACATGACTTTT GAGTTCAAGCAGAAGGTG
TCTGTGAATGACAAGTTTGG AAGGCCAGCCATTACAGCTGTTGACAGTTCCAATGTTTGGTGGGCACT
GTTAGAAGAATCTATCGTCAAAGCTAATGCCGGAGTTGGAAAACCAGAAATATTTCTGCATCGACAG
GTGCACGCTATTTTCGGGAGCGAGGCCTGCCAGCAATAGGATTTTCTCCAATGGCAAACACTCCGATT
CTTCTTCACGACCACAACGAGTCTTGAACAAGGATGAGTATTTGAAAGG TATTGATGTTTATGAGTC
AATAATCAAACCTTATGCATCTTATATTGAGCATCCAAGAGATGAGGCTTCGAGGGAAGAATTGTGA

BHRF1wt

ATGCATCACCATCACCATCACATGGCCTATTCAACAAGGGAGATACTGTTAGCCCTGTGTATACGGGA
CAGTCGTGTGCATGGAAATGGTACCCTGCATCCTGTGTTGGAGCTAGCAGCAAGAGAAACACCTCTCC
GCCTTTCGCCAGAGGACACTGTAGTTCTGCGTTATCATGTGTTGCTTGAGGAGATAATTGAACGAAAT
TCAGAGACATTTACAGAACTTGAACAGATTTATAACACACACCCGAACATGTGGACCTGGATTTTAA
CTCAGTATTTTTAGAGATATTTACCCTGGAGACCCAAGCCTTGGGCGCGCTTGGCCTGGATGGCCT
GGTGCATGCATGCCTGCAGGACATTGTGTTGTAACCAGTCTACTCCTTACTATGTTGTGGACCTGTCA
GTTTCGTGGGATGTTAGAAGCCAGCGAAGGCCTGGATGGTTGGATTTCATCAACAGGGCGGCTGGTCTAC
ATTAATTGAAGACAACATTCCTGGATCCAGAAGGTTTAGCTGGACTTTGTTTCTTGCTGGACTGACTT
TGAGTCTGTTAGTTATATGTAGTTATTTATTTATCTCCAGAGGAAGACACGAATTCTAA

10 Erklärung gemäß §8 Absatz 2 Aufzählungspunkt 2 der Promotionsordnung zum Dr. rer. nat. der Universität Hohenheim

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Tanja Hoch
Stuttgart, den 4. Juli 2011

11 Tagungsbeiträge und Publikationen

Tanja Hoch, Bernhard Roth, Markus Mainiero, Tobias Maile und Artur J. P. Pfitzner

BHRF1, a herpes virus cell death regulator protein, interferes with cell death regulation in plants by interaction with a conserved class of proteins. (Manuskript in Vorbereitung)

Tanja Hoch, Julia Köber, Bernhard Roth und Artur J. P. Pfitzner (2008)

Aquaporine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Programmierten Zelltods in Pflanzen. Molekularbiologie der Pflanzen, 21. Tagung in Wermelskirchen-Dabringhausen, Posterpräsentation

Tanja Hoch, Bernhard Roth, Simone Mast, Tobias Maile, Melanie Meier und Artur J. P. Pfitzner (2006)

Aquaporins are involved in the regulation of cell death in plants. Plant Biology, Boston, Massachusetts, USA, Posterpräsentation

12 Danksagung

Zuerst möchte ich allen danken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. A. Pfitzner für die Überlassung dieses interessanten Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Unterstützung sowie sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Schaller möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Co-Referates bedanken.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern und Diplomanden der Arbeitsgruppe Pfitzner für die langjährige Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Besonderer Dank geht dabei an Ingrid, Heike und Christine für zahlreiche kleine Tipps und Hilfestellungen im Laboralltag.

Steffi, Benjamin, Marion und Janina danke ich besonders für die vielen interessanten Diskussionen und anregenden Unterhaltungen. Bei Steffi möchte ich mich außerdem für die erfolgreiche und sehr angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Bei Roxi und Thomas möchte ich mich für die Versorgung der vielen Pflanzen im Gewächshaus bedanken.

Der größte Dank geht an meine Familie und meine Freunde, die mich während dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben. Bei meinem Freund Thomas bedanke ich mich für die viele Geduld und Unterstützung während dieser Zeit.