Die Bedeutung von AQUAPORIN INTERACTOR 1 (AQI1) 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
Eva Katharina Glink

aus Neuenbürg
2014

Dekan:	Prof. Dr. H. Breer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Pfitzner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Ludewig
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Schaller
Eingereicht am:	22.09.2014
Mündliche Prüfung am:	05.12.2014

Die vorliegende Arbeit wurde am 19.11.2014 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Programmierter Zelltod 2

1.1.1 Apoptose bei Säugern 3

1.1.2 Programmierter Zelltod bei Pflanzen 5

1.1.3 ROS („reactive oxygen species“) 9

1.2 Aquaporine 12

1.3 Aminoacylasen 15

1.3.1 Aminoacylase 1-homologe Proteine aus Pflanzen (AQI1 und NtAQI1) 19

1.4 Zielsetzung 22

2 Material 23

2.1 Chemikalien und Enzyme 23

2.2 Biologische Materialien 23

2.2.1 Pflanzen 23

2.2.1.1 Transgene Pflanzen 24

2.2.2 Virenstämme 24

2.2.3 Bakterienstämme 24

2.2.4 Hefestamm 25

2.2.5 Oozyten 25

2.3 Vektoren 25

2.3.1 pUC18/19 25

2.3.2 pBluescript II KS (+) 26

2.3.3 pBluescript/T-Vektor 26

2.3.4 pBT3-C 26

2.3.5 pBT3-N 27

2.3.6 pPR3-N 28

2.3.7 pDSL-Nx 28

2.3.8 pGEX-3X 29

2.3.9 pMAL-c2X 29

2.3.10 pOO2 30

2.3.11 pTAK35S 31

2.3.12 pK7FWG2C 32

2.4 Kits 32

2.4.1 Plasmid-Präparation 32

2.4.2 DNA-Elution aus Agarosegelen 32

2.4.3 *In-vitro* Transkription 33

2.4.4 Deglykosylierung von Proteinen 33

2.5 Größenmarker 33

2.5.1 DNA-Größenmarker 33

2.5.2 Protein-Molekulargewichtsstandard 33

2.6 Antiseren 34

2.6.1 Primäre Antikörperseren 34

2.6.1.1 Detektion von GFP 34

2.6.1.2 Detektion von GST 34

2.6.1.3 Detektion von ACY1 34

2.6.1.4 Detektion von NtAQI1 34

2.6.1.5 Detektion von AtTIP1;1 34

2.6.1.6 Detektion von Ubiquitin 34
2.6.1.7 Detektion von CaMV 35
2.6.1.8 Detektion von ApTV 35
2.6.2 Sekundäre Antikörperseren 35
2.6.2.1 Anti-Kaninchen Serum 35
2.6.2.2 Anti-Maus Serum 35
2.7 Synthetische Oligonukleotide 36
2.8 Gene und Proteine 38
2.8.1 Reportergene und -proteine 38
2.8.1.1 GFP 38
2.8.1.2 P19 39
2.8.1.3 Bax 39
2.8.1.4 AtBI1 39
2.8.1.5 NIMIN1 40
2.8.1.6 CAH 40
3 Methoden 41
3.1 Molekularbiologische Standardmethoden und Nukleinsäuretechniken 41
3.1.1 Anzucht von *E. coli* 41
3.1.2 Transformation von *E. coli* 42
3.1.2.1 Blau/Weiß-Selektion von *E. coli* DH5α 43
3.1.3 Plasmidpräparation aus *E. coli* 44
3.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA 45
3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 45
3.1.6 Sequenzspezifische Restriktion von DNA 46
3.1.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten (Gelelektrophorese) 46
3.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 47
3.1.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten 47
3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten 47
3.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR) 48
3.1.11.1 High Fidelity PCR 49
3.1.11.2 „Colony Screen“ mittels PCR 49
3.1.12 Sequenzierung von DNA-Fragmenten 50
3.1.13 Herstellung von Stammkulturen (Glycerinkulturen) 50
3.1.14 RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial 50
3.1.14.1 Reverse Transkription 51
3.2 Proteinbiochemische Methoden 52
3.2.1 Extraktion von Proteinen aus pflanzlichem Material 52
3.2.2 Quantitative Proteinbestimmung (Bradford-Test) 52
3.2.3 „Fast protein liquid chromatography“ (FPLC) 53
3.2.4 Deglykosylierung von Proteinen 54
3.2.5 Rekombinante Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* 54
3.2.5.1 Extraktion von Proteinen aus *E. coli* 55
3.2.6 Rekombinante Expression von MBP-Fusionsproteinen in *E coli* 55
3.2.6.1 Reinigung von MBP-Fusionproteinen aus *E. coli* (Affinitätschromatographie) 56
3.2.6.2 Dialyse und Aufkonzentration gereinigter Fusionsproteine 57
3.2.6.3 Spektralanalyse aufgereinigter Fusionsproteine 58
3.2.7 Detektion extrahierter Proteine mittels SDS-PAGE 58
3.2.7.1 Anfärben von Proteingelen mit Coomassie-Färbelösung 60
3.2.7.2 Immunodetektion von Proteinen (Western Blot) 60
3.2.8 Aminoacylase-Aktivitätstest („Ninhydrin-Assay“) 62

3.3 Experimente mit *Saccharomyces cerevisiae* **63**
3.3.1 Kultivierung von Hefezellen 63
3.3.1.1 Kultivierung von Hefe in Vollmedium 63
3.3.1.2 Kultivierung von Hefe in Selektionsmedium 64
3.3.2 Transformation von Hefezellen 65
3.3.3 Protein-Protein Interaktion im Split-Ubiquitin System 66
3.3.3.1 Qualitativer Test einer Protein-Protein Interaktion 67
3.3.3.2 Quantitativer Test einer Protein-Protein Interaktion 67
3.3.4 Hefewachstum unter H_2O_2-Einfluss 68
3.4 Oozyten-Expressionssystem (*Xenopus laevis*) **69**
3.4.1 Plasmid Midi-Präparation & *In vitro* Transkription 69
3.4.2 Operative Oozyten-Entnahme 70
3.4.3 Oozyten-Präparation 71
3.4.4 RNA-Mikroinjektion 71
3.4.5 „Schwell-Assay“ 71
3.5 Experimente mit Pflanzen **72**
3.5.1 Aufzucht und Kultur von Pflanzen 72
3.5.1.1 Selektion transgener Samen 72
3.5.1.2 Untersuchung des Hypokotyl Streckungswachstums von Keimlingen 73
3.5.2 Agrobakterien-vermittelte Transformation von Pflanzenzellen 73
3.5.2.1 Anzucht von Agrobakterienkulturen 73
3.5.2.2 Transformation von *A. tumefaciens* durch Elektroporation 74
3.5.2.3 Agrobakterien-Infiltration von *N. benthamiana* 75
3.5.3 „Cyanamidhydratase-Assay“ 76
3.5.4 Visualisierung von H_2O_2 in pflanzlichem Gewebe (DAB-Färbung) 76
3.5.5 Visualisierung von Zelltod in pflanzlichem Gewebe (Trypanblau-Färbung) 77
3.5.6 Virus-Inokulation von Pflanzen 77
3.5.7 Behandlung von Pflanzen mit Pelargonsäure 78

4 Ergebnisse **79**
4.1 Interaktion von AQI1 mit Aquaporinen im Split-Ubiquitin-System **79**
4.1.1 Interaktion von AQI1 aus *A. thaliana* mit Aquaporinen 79
4.1.2 Interaktion von NtAQI1 aus *N. tabacum* mit Aquaporinen 81
4.1.3 Interaktion von ACY1 aus *H. sapiens* mit Aquaporinen 83
4.2 Funktionelle Analyse der Wechselwirkung zwischen AQI1 und pflanzlichen Aquaporinen **86**
4.2.1 Einfluss von (Nt)AQI1 und ACY1 auf die H_2O_2-Kanalaktivität von NtTIP1;1 *in planta* 86
4.2.1.1 Zelltod Inhibition durch transiente Überexpression von (Nt)AQI1 und ACY1 86
4.2.1.2 Visualisierung von Zelltod und H_2O_2 89
4.2.1.3 Nachweis transient exprimierter Proteine 90
4.2.2 Einfluss von NtAQI1 auf die H_2O_2-Kanalaktivität von NtTIP1;1 in *S. cerevisiae* 91
4.2.3 Einfluss von (Nt)AQI1 auf die H_2O-Kanalaktivität von NtTIP1;1 bzw. AtTIP1;1 in *X. laevis* Oozyten 93
4.3 Expressionsanalyse von AQI1 *in planta* **95**
4.3.1 Untersuchung der Aminoacylase-Enzymaktivität von (Nt)AQI1 95
4.3.1.1 Enzymaktivität von rekombinant exprimiertem NtAQI1 95
4.3.1.2 Enzymaktivität von (Nt)AQI1 *in planta* 98
4.3.1.3 Substratspezifität von (Nt)AQI1 99
4.3.1.4 Zink-Ion Abhängigkeit von NtAQI1 100
4.3.1.5 FPLC-Analyse 101
4.3.1.6 Enzymaktivität von NtAQI1 in verschiedenen Pflanzenorganen von *N. tabacum* 102
4.3.1.7 Enzymaktivität von (Nt)AQI1 in Blättern unterschiedlichen Alters 103

4.3.2 Untersuchung der Genexpression von *NtAQI1 in planta* 106
4.3.2.1 Transkriptakkumulation von *NtAQI1* in verschiedenen Pflanzenorganen von *N. tabacum* .106
4.3.2.2 Transkriptakkumulation von *NtAQI1* in Blättern unterschiedlichen Alters 107
4.3.3 Untersuchung der Proteinakkumulation von NtAQI1 *in planta*....108
4.3.3.1 Herstellung eines spezifischen anti-NtAQI1-Antikörperserums 108
4.3.3.2 Analyse der Proteinakkumulation von NtAQI1 in Blättern unterschiedlichen Alters....111
4.3.4 Charakterisierung post-translationaler Modifikationen von NtAQI1 *in planta* 112
4.3.4.1 Überprüfung einer Glycosylierung von NtAQI1 112
4.3.4.2 Überprüfung einer Ubiquitinierung von NtAQI1 114
4.4 Physiologische Funktion von AQI1 *in planta*....115
4.4.1 Reaktionen von NtAQI1 auf Stress 115
4.4.1.1 Analyse der Proteinakkumulation von NtAQI1 als Folge einer hypersensitiven Abwehr-reaktion (HR) 115
4.4.1.2 Analyse der Proteinakkumulation von NtAQI1 als Folge von chemisch induziertem Zelltod 121
4.4.1.3 Analyse der Proteinakkumulation von NtAQI1 als Folge von H_2O_2-Stress....123
4.4.2 Auswirkungen einer Überexpression von NtAQI1-CAH Fusionsproteinen in *N. tabacum*....124
4.4.2.1 Nachweis der Überexpression von *NtAQI1-CAH* anhand der CAH-Aktivität in transgenen Pflanzen 125
4.4.2.2 Expressionsanalyse von *NtAQI1* in transgenen Pflanzen 126
4.4.2.3 Phänotypologische Untersuchungen transgener Pflanzen 130
4.4.2.4 Reaktionen *NtAQI1*-transgener Pflanzen auf eine hypersensitive Abwehrreaktion (HR)....131
4.4.3 Auswirkungen einer *AQI1* „knock-out“ Mutation in *A. thaliana*....135
4.4.3.1 Expressionsanalyse von *AQI1* in *aqi1-1* Mutanten....135
4.4.3.2 Phänotypologische Untersuchungen der „knock-out“ Mutante *aqi1-1* 137
4.4.3.3 Reaktionen der „knock-out“ Mutante *aqi1-1* auf Virusinfektionen 139
4.4.3.4 Untersuchung des Hypokotyl Streckungswachtums der „knock-out“ Mutante *aqi1-1* 141

5 Diskussion 143
5.1 Identifizierung von AQI1 als Aminoacylase 143
5.2 Subzelluläre Lokalisation von AQI1....149
5.3 Altersabhängige Akkumulation von AQI1 155
5.4 Physiologische Funktion von AQI1....158
5.4.1 AQI1 als Regulator der Kanalaktivität von Aquaporinen 160
5.4.2 Aminoacylase-Aktivität von AQI1 167

Zusammenfassung 171

Summary 172

Literaturverzeichnis 173

Abkürzungsverzeichnis 191

Anhang 195
I. DNA-Sequenzen 195
II. Vektor-Karten 198

***Curriculum vitae*.... 205**

Danke 207

1 Einleitung

Die Zelle ist die kleinste biologische Einheit, aus der alle bekannten Lebewesen aufgebaut sind. Zellen sind autonom zur Reproduktion und Selbsterhaltung fähig. Genauso besitzen sie die Fähigkeit gezielt „Selbstmord“ zu begehen, wenn sie nicht mehr gebraucht werden, oder zu einer Bedrohung für den Organismus geworden sind. Dieses gezielte und altruistische Absterben einzelner Zellen eines Organismus wird als programmierter Zelltod (PCD: „programmed cell death“) bezeichnet (SCHWARTZMAN, 2013).

Für die Umsetzung aller Stoffwechselprozesse eines Organismus muss die Zelle als individuelle Regulationseinheit fungieren. Sie wirkt als Empfänger, Vermittler und Absender einer Vielzahl verschiedener Signale, die zur physiologischen Umsetzung einer Botschaft führen. Hierzu ist nicht nur ein funktionierendes internes Kommunikationsnetzwerk nötig, sondern auch die Möglichkeit externe Signale, z. B. in Form von Signalmolekülen über die Zellmembran hinweg, ins Zellinnere weiter zu leiten. Organismen sind so befähigt Veränderungen in ihrem Lebensraum wahrzunehmen, um dann gezielt auf diese reagieren zu können, indem sie Genexpression und Stoffwechsel entsprechend beeinflussen. Die Kontrolle dieser Signalweiterleitung ist auch beim programmierten Zelltod (PCD) von enormer Bedeutung. PCD wird durch Zelltodsignale ausgelöst. Die Interaktion von beteiligten Molekülen spielt dabei eine essentielle Rolle (ALBERTS *et al*., 2010).

Sowohl in der Human- als auch in der Pflanzenforschung ist die Aufklärung des PCD von großer Wichtigkeit. Zum einen für die Entwicklung von Behandlungsstrategien bei der Bekämpfung von Krankheiten des Menschen, die auf einer Deregulation des PCD beruhen (z.B. Tumor- und Autoimmunerkrankungen). Zum anderen für die Agrarindustrie, da die Aufklärung des Zelltod-Signalwegs der Pflanze als Grundlage für die Herstellung neuer Pflanzenschutz- bzw. Pflanzenstärkungsmittel dienen kann. Dies könnte die Anwendung von sehr toxischen Substanzen dezimieren.

Man hat inzwischen zwar einen relativ guten, jedoch immer noch unvollständigen Überblick über eine Vielzahl von Genen, die an der Regulation des PCD beteiligt sind. Die hochkomplexen interaktiven Signalwege sind bisher nur ansatzweise verstanden (ELMORE, 2007). Vor allem der PCD bei Pflanzen wirft noch viele Fragen auf.

1.1 Programmierter Zelltod

Der Zelltod ist ein Ereignis, das zum Erlöschen des Stoffwechsels und der morphologischen Integrität einer Zelle führt. Er beendet irreversibel alle Lebensprozesse einer Zelle. Es werden verschiedene Formen des Zelltods unterschieden: Zum einen der als Nekrose bezeichnete nicht-physiologische Zelltod. Er entsteht als Ergebnis einer Zellschädigung, z. B. durch mechanische Verletzung, Vergiftungen oder Nährstoffmangel. Auf diesen degenerativen Prozess kann wenig Einfluss ausgeübt werden. Er stellt keine Gen-abhängige Form des Zelltods dar. Charakteristika sind das Anschwellen der Zelle, die Lyse und der Ausfluss von Zellbestandteilen (DUVALL & WYLLIE, 1986).

Im Gegensatz dazu steht der programmierte Zelltod (PCD). Hierbei handelt es sich um einen physiologischen, aktiven und genetisch regulierten Prozess. Es kommt zum gezielten „Zell-Selbstmord“ einzelner Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus. Zu den Kennzeichen von PCD gehören das Schrumpfen von Zelle und Zellkern, die Bläschenbildung der Plasmamembran an der Zelloberfläche („membrane blebbing“), vermehrter Calcium-Einstrom in die Zelle, die Kondensation des Chromatins im Zellkern sowie die Fragmentierung der DNA (EARNSHAW, 1995; MARTINS & EARNSHAW, 1997). Die geordnete Zerlegung von Zellbestandteilen führt schließlich zum Tod der Zelle (HENGARTNER, 2000; GREEN, 2000; ADRAIN & MARTIN, 2001). Der programmierte Zelltod (PCD) stellt einen sehr wichtigen Prozess bei der Entwicklung, Seneszenz und auch als Strategie zur Pathogenabwehr von Pflanzen und Tieren dar. Beispiele entwicklungsbedingten Zelltods wurden schon früh entdeckt. Carl Vogt beobachtete im Jahre 1842 erstmals, dass während der Entwicklung von Kaulquappen unerwünschte Gewebe, wie Schwanz oder Schwimmhäute, durch Zelltod gezielt abgebaut werden (VOGT, 1842). Dieser Zelltod wurde auch in der Ontogenese anderer Wirbeltiere und Invertebraten nachgewiesen und ist für die Selbstregulation eines mehrzelligen Organismus unabdingbar. Kranke oder nicht mehr benötigte Zellen werden dabei sauber aus einem Gewebe entfernt, ohne die Nachbarzellen zu schädigen (ELLIS *et al*., 1991). Nur das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum (Proliferation) und Zelltod kann die Zellzahl eines Organismus auf einem weitgehend konstanten Niveau halten. Eine Störung dieses Gleichgewichts ist ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung von Tumoren, Autoimmunerkrankungen oder degenerativen Veränderungen. Die Differenzierung der menschlichen Finger und Zehen in einem sich entwickelnden Embryo ist ein Beispiel für PCD (NATARAJ *et al*., 1994), ebenso wie die Differenzierung der Xylem-Leitbündel (Xylogenese) in Pflanzen (GREENBERG, 1996; FUKUDA, 1996; GROOVER *et al*., 1997). Programmierter Zelltod als Strategie zur Pathogenabwehr ist sowohl bei Tieren als auch

bei Pflanzen von Bedeutung. Im tierischen Immunsystem eliminieren zytotoxische T-Zellen (T-Killerzellen) des Immunsystems virusinfizierte oder entartete Zellen durch die Induktion von PCD. Bei Pflanzen kann bei Pathogenbefall eine hypersensitive Abwehrreaktion (HR) ausgelöst werden, wobei infizierte Zellen durch PCD gezielt getötet werden.

Ob PCD bei Tieren und Pflanzen verwandte Ereignisse sind, ist bisher noch nicht geklärt. Es ist bei einem derart alten und zentralen Prozess jedoch nicht unwahrscheinlich, dass gemeinsame Komponenten beteiligt sind, die zu ähnlichen zellulären Ereignissen führen.

1.1.1 Apoptose bei Säugern

Im tierischen System wird der programmierte Zelltod als Apoptose bezeichnet. Der Begriff Apoptose wurde 1972 eingeführt und sollte den natürlichen Zelltod während der Ontogenese von Tieren von der pathologischen Nekrose abgrenzen (KERR *et al*., 1972). Die aus dem Griechischen stammende Bezeichnung „Apoptose“ (*apoptosis*) beschreibt das Fallen der Blätter im Herbst und gibt damit einen bildlichen Vergleich für das Absterben einzelner Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus wieder (STEPHAN *et al*., 2000).

Die Apoptose ist ein komplexer, energieabhängiger Mechanismus. Sie wird von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt und ist somit Teil des Stoffwechsels der Zelle. Als Schlüsseleffektoren der Apoptose werden proteolytische Enzyme namens Caspasen („cysteinyl aspartate-specific proteases“) aktiviert (GREEN & REED, 1998). Caspaseaktivitäten bewirken Zellverdichtungen, Schrumpfung und die Bildung apoptotischer Körperchen (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997). Apoptotische Körper sind vesikuläre Strukturen, die durch Abschnürung der Plasmamembran im Anschluss an das „membrane blebbing“ entstehen. Diese können entweder von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert werden (WHITE, 1996; VAUX & STRASSE, 1996).

Ob eine Zelle sterben soll oder nicht hängt von vielen Komponenten innerhalb und außerhalb der Zelle ab. Anhand des Ortes der Initiation werden zwei Apoptose auslösende Signalwege unterschieden, der extrinsische (Typ I) und der intrinsische (Typ II) Signalweg (siehe Abb.1.1-1). Beim extrinsischen Signalweg (Typ I) geschieht die Anregung von außen z. B. durch Immunzellen. Diese sondern Zytokine ab, welche als Liganden an Todesrezeptoren binden, wodurch eine Caspase-Kaskade in Gang gesetzt wird. Der intrinsische Signalweg (Typ II) wird mitochondrial vermittelt. Als Apoptose-Stimuli wirken hierbei Schädigungen der DNA, z. B. durch UV- und γ-Strahlen oder Chemikalien. Als Folge einer solchen Schädigung werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche wiederum die Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie stimulieren. Diese Bcl-2 Proteine regulieren die Freilassung von Cytochrom c aus den

Mitochondrien ins Zytoplasma, indem sie sich in die äußere Mitochondrienmembran einlagern. Cytochrom c wirkt als Regulator einer Initiatorcaspase (Procaspase-9). Über das Adapterprotein Apaf-1 („apoptosis activating factor 1“) bindet Cytochrom c an Procaspase-9. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und initiiert die Caspase-Kaskade die zum geordneten Abbau der Zelle und somit zum Zelltod führt (HENGARTNER, 2000; GREEN, 2000; ADRAIN & MARTIN, 2001).

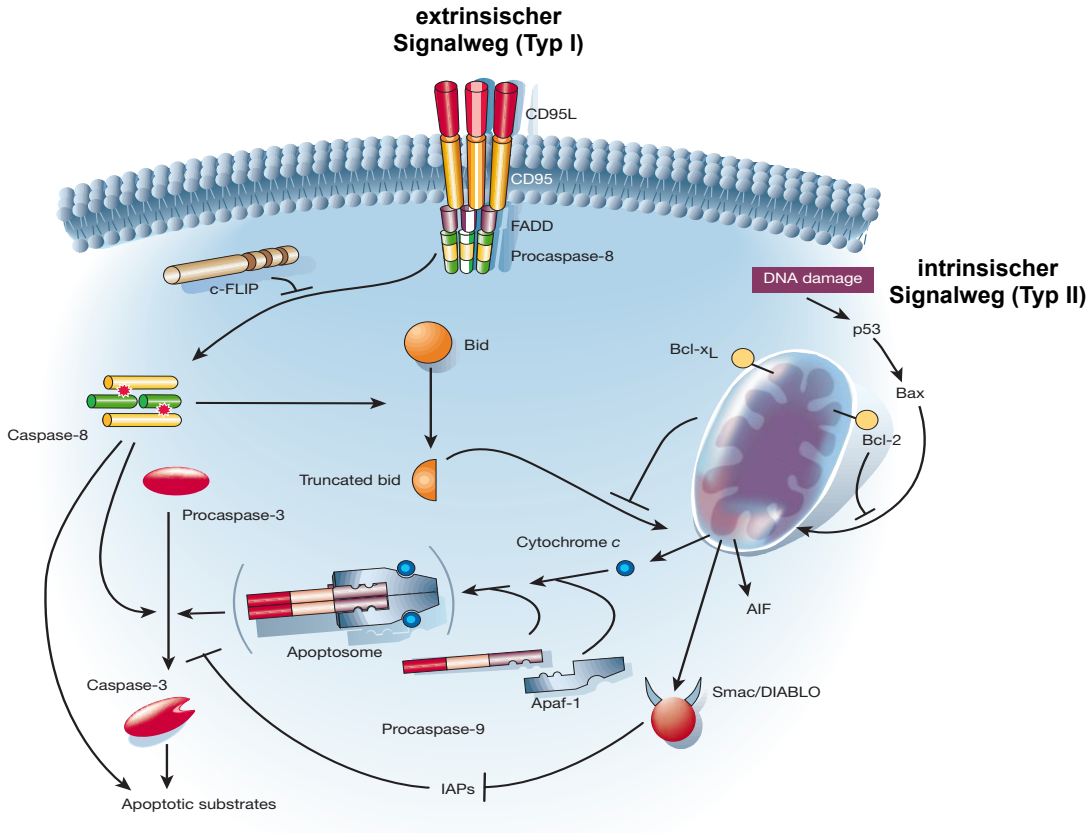


Abb. 1.1-1: Vereinfachte Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalwegs in Säugern (HENGARTNER, 2000). Beim extrinsischen Signalweg (Typ I) kommt es durch Ligandenbindung an einen Todesrezeptor auf der Zelloberfläche zur Initiation einer Caspase-Kaskade. Als Initiatorcaspase wirkt hier Caspase-8, welche die Effektorcaspase-3 aktiviert. Beim intrinsischen Signalweg (Typ II) kommt es durch DNA-Schäden zur Aktivierung von Bcl-2 Proteinen, welche die Freilassung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma veranlassen. Als Initiatorcaspase wirkt hier das Apoptosom (ein Komplex aus Caspase-9, Cytochrom c und Apaf-1), welches ebenfalls eine Caspase-Kaskade auslöst. Beide Signalwege führen zum Tod der Zelle (Apoptose).

Während dem Apoptose-Prozess wird außerdem die Elektronentransportkette inaktiviert und es entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und folglich oxidativer Stress (BLACKSTONE & GREEN, 1999), welcher auch einen Stimulus zur Auslösung von Zelltod darstellt. Die Mitochondrien spielen also bei der tierischen Apoptose eine zentrale Rolle (GREEN & REED, 1998). Sie liefern die nötige Energie in Form von ATP, können PCD-fördernde Substanzen wie Cytochrom c und Apaf-1 freisetzen und bilden ROS die häufig Zelltod einleiten.

Um die Mitochondrien zur Freisetzung der PCD-fördernden Substanzen zu veranlassen sind die schon erwähnten Zelltod-stimulierenden Bcl-2 Proteine von Bedeutung. Nach Initiation ihrer Expression liegen die pro- und anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine als Homo- und Heterodimere im Zytoplasma vor (REED, 1997; ANTONSSON & MARTINOU, 2000). Die Dimerisierung dient zur gegenseitigen Aktivierung oder Inhibierung. Durch Spaltung der Dimere werden Transmembrandomänen (TM) freigelegt, welche in die äußere Mitochondrienmembran integrieren können, um die Mitochondrien zur Freilassung der „pro-death" Signale zu veranlassen (HSU *et al*., 1997; GROSS *et al*., 1998; PUTHALAKATH *et al*., 1999). Die Familie der Bcl-2 Proteine besteht aus 20 kleinen Proteinen, mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 25 kDa (RENEHAN *et al*., 2001). Bcl-2 („B-cell lymphoma 2") wurde als erstes Mitglied dieser Apoptose regulierenden Proteinfamilie entdeckt (TSUJIMOTO *et al*., 1985). Weitere Mitglieder der Bcl-2 Familie wurden aufgrund von Sequenzhomologie oder ihrer Wechselwirkung mit Bcl-2 identifiziert (CHAO & KORSMEYER, 1998). Anhand ihrer Aktivität können zwei Hauptgruppen unterschieden werden: Pro-apoptotische Proteine, welche die Apoptose fördern (z. B. Bad, Bak, Bax, Bid, Bik) und anti-apoptotische Proteine, welche die Apoptose inhibieren (z. B. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, Ced-9, BHRF1) (GAJEWSKI & THOMPSON, 1996; SCHENDEL *et al*., 1997; GROSS *et al*., 1999). Alle Bcl-2 Proteine besitzen die für diese Familie charakteristischen hochkonservierten Aminosäuresequenzen, die sogenannten Bcl-2 Homologiedomänen (BH1 – BH4) (ADAMS & CORY, 1998).

Auch das anti-apoptotisch wirkende Protein BHRF1 („BamHI fragment H rightward open reading frame no. 1") ist ein Mitglied der Bcl-2 Familie. Es stammt aus einem lymphotrophen γ-Herpesvirus, dem Epstein-Barr Virus (EBV) und besitzt ein Molekulargewicht von 17 kDa (PFITZNER *et al*., 1987; PEARSON *et al*., 1987). BHRF1 und das ebenfalls anti-apoptotische Bcl-2 des Menschen teilen eine Sequenzhomologie von 38 %, die den hoch konservierten BH1-, BH2- und BH3-Domänen entspricht (ADAMS & CORY, 1998). KAWANISHI zeigte 1997, dass das virale BHRF1 das zelluläre Bcl-2 funktionell ersetzen kann (KAWANISHI, 1997). Die anti-apoptotische Wirkung von BHRF1 kommt der Vermehrung von EBV zugute, da Viren sich nur in noch lebenden Zellen vermehren können.

1.1.2 Programmierter Zelltod bei Pflanzen

Obwohl noch große Defizite im Verständnis des programmierten Zelltod (PCD) bei Pflanzen bestehen, weisen viele morphologische und biochemische Gemeinsamkeiten des PCD bei Tieren und Pflanzen darauf hin, dass zumindest Teile der Prozesse verwandt sind und während der Evolution konserviert blieben. In beiden Formen des PCD gibt es

gemeinsame Komponenten, die zu ähnlichen zellulären Ereignissen führen. Einige Beispiele sind das Schrumpfen von Zelle und Zellkern, das „membrane blebbing“, vermehrter Einstrom von Calcium in die Zelle (BLUME *et al*., 2000; NÜRNBERGER & SCHEEL, 2001), sowie die DNA-Fragmentierung (WANG *et al*., 1996; KRISHNAMURTHY *et al*., 2000; LAM *et al*., 2001; HOEBERICHTS & WOLTERING, 2003). Im Unterschied zu Tieren scheinen die Mitochondrien beim pflanzlichen PCD jedoch keine derart große Rolle zu spielen. Der Zelltod bei Pflanzen wird vor allem durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und daraus resultierendem oxidativen Stress ausgelöst. Die Bildung von ROS im Zusammenhang mit programmiertem Zelltod findet bei Pflanzen hauptsächlich außerhalb der Zelle und nicht an den Mitochondrien statt (SAGI & FLUHR, 2001; TORRES *et al*., 2002; BOLWELL *et al*., 2002). Bei Pflanzen wird der programmierte Zelltod auch nicht als Apoptose bezeichnet. Zytoplasmafragmentierungen bzw. die Bildung apoptotischer Körper treten bei Pflanzen nicht auf. Sie besitzen auch keine Phagozyten. Das Zytoplasma kann aber durch vakuoläre Autophagie abgebaut werden (LENZ, 2011). Auch die tierischen Apoptose-Schlüsselenzyme Caspasen und Bcl-2 Proteine gibt es bei Pflanzen nicht. Jedoch wurde eine Familie Caspase-verwandter Proteine, die Metacaspasen in Pflanzen identifiziert, welche eine Caspase-ähnliche proteolytische Domäne besitzen (UREN *et al*., 2000). Ob diese Metacaspasen funktionell äquivalent zu den klassischen Caspasen sind und somit auch an Zelltodprozessen beteiligt sind, ist noch nicht bekannt. Bcl-2 homologe Proteine konnten bei Pflanzen bisher nicht gefunden werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass verschiedene Bcl-2 Proteine anderer Organismen in transgenen Pflanzen Auswirkungen auf die Zelltodausprägung haben. Wird z.B. das pro-apoptotische Bcl-2 Protein Bax in transgenen Pflanzen exprimiert, kommt es zum Tod der betroffenen Zellen. Es ist bisher noch unklar, ob es sich hierbei um aktiven PCD handelt, oder ob dieser Effekt nur auf der Porenbildung von Bax in Mitochondrienmembranen beruht (XU & REED, 1998; LACOMME & SANTA CRUZ, 1999). Interessanterweise konnte ein pflanzliches Protein identifiziert werden, welches dem tierischen Bax-Inhibitor 1 (BI1) entspricht. BI1 interagiert mit Bax und ist bei Überexpression in der Lage, Bax-induzierten Zelltod zu unterdrücken (XU & REED, 1998). Mittlerweile sind mehrere homologe Pflanzenproteine bekannt (z. B. AtBI1 aus *Arabidopsis*, siehe 2.8.1.4), die Bax-induzierten Zelltod in transgenen Pflanzen inhibieren können (SANCHEZ *et al*., 2000; KAWAI-YAMADA *et al*., 2001). Deren natürlicher Interaktionspartner in Pflanzen ist jedoch noch nicht identifiziert worden.

PCD tritt bei Pflanzen, genau wie bei Tieren, häufig während ihrer Entwicklung auf. Beispiele hierfür sind unter anderem die Xylogenese oder die Bildung von Seitenwurzeln,

wobei Zellen im differenzierten Gewebe absterben müssen, um das Durchdringen der Seitenwurzeln zu ermöglichen (MERGEMANN & SAUTER, 2000; STEFFENS & SAUTER, 2009). Auch äußere Einflüsse wie UV-Bestrahlung und Pathogenbefall können bei Pflanzen programmierten Zelltod auslösen (RYERSON & HEATH, 1996; WANG *et al*., 1996).
Auf den Zelltod im Zuge der pflanzlichen Pathogenabwehr soll hier besonders eingegangen werden, da er für Pflanzen von enormer Bedeutung ist. Wie alle Organismen sind auch Pflanzen im Laufe ihrer Existenz einer Vielzahl von Pathogenen wie Viren, Bakterien und Pilzen ausgesetzt. Tiere haben zum Schutz vor solchen Pathogenangriffen ein Immunsystem mit hoch spezialisierten pathogenerkennenden Immunzellen (z. B. T-Zellen) entwickelt, die das Eindringen von Pathogenen in den gesamten Organismus verhindern. Da Pflanzen nicht wie Tiere über ein Immunsystem mit hoch spezialisierten pathogenerkennenden Immunzellen verfügen, haben sie andere Strategien entwickelt um sich vor schädlichen Eindringlingen zu schützen. Eine solche Strategie ist die hypersensitive Abwehrreaktion / „hypersensitive response“ (HR; siehe Abb. 1.1-2). Hierbei wird die systemische Ausbreitung biotropher Pathogene verhindert, indem infizierte Pflanzenzellen erkannt und durch PCD gezielt getötet werden. Von der infizierten Zelle werden Signale an die Nachbarzellen ausgesandt, um deren Absterben ebenfalls auszulösen. Es bilden sich sogenannte nekrotische Lokalläsionen. Das abgestorbene Gewebe in und um die Infektionsstelle schafft eine räumliche Barriere zwischen Wirt und Pathogen. Dieser uneigennützige Tod einzelner Zellen kann die Pflanze vor einer systemischen Infektion schützen (WEBER, 1994). Grundlage hierfür ist das Rezeptor-Elicitor-Modell (KEEN, 1990), das auf der Gen-für-Gen-Hypothese (FLOR, 1942) basiert. Demzufolge wird eine Resistenzreaktion in Pflanzen in Form einer HR nur dann ausgelöst, wenn die Pflanze ein Resistenzgen (*R*) besitzt und das Pathogen das zum Resistenzgen komplementäre Avirulenzgen (*avr*). Das Genprodukt des Resistenzgens kann dabei den Rezeptor darstellen und das Produkt des Avirulenzgens den Elicitor (KEEN, 1990). Infolge der Interaktion von Rezeptoren (*R*) und Elicitoren (*avr*), also der Erkennung des Pathogens durch die Pflanze, wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Bildung einer HR an der Infektionsstelle führt. Bei Tabakpflanzen mit dem N´-Resistenzgen (WHITHAM *et al*., 1994) konnte gezeigt werden, dass das Hüllprotein verschiedener Tobamoviren eine HR auslösen kann. Das Gen des Hüllproteins dieser Viren wird somit als Avirulenzgen betrachtet (PFITZNER & PFITZNER, 1992). Das lokale Absterben der infizierten Pflanzenzellen während einer HR ist mit einer Vielzahl von Mechanismen verbunden. Am Anfang der HR steht die Aktivierung von membrangebundenen NADPH-Oxidasen und Peroxidasen und folglich die Produktion und Anhäufung von H_2O_2, wodurch oxidativer

Stress ausgelöst wird. Zum einen fungiert H_2O_2 als Substrat für die oxidative Quervernetzung von Zellwand-Strukturproteinen, was eine schnelle Abwehrreaktion der Pflanze darstellt, zum anderen wirkt es als lokaler Auslöser des programmierten Zelltods. Außerdem fungiert es als Signal für die Induktion abwehrbeteiligter Gene in benachbarten Zellen (BRADLEY *et a*l., 1992; BRISSON *et al*., 1994; LAMB & DIXON, 1997, MONTILLET *et al*., 2005). Es kommt zur Auflagerung von Callose und zur Synthese und Akkumulation von PR-Proteinen („pathogenesis-related proteins“) (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996). Die Aktivierung der *PR*-Gene wiederum führt zur Ausbildung einer systemischen Resistenz „systemic acquired resistance“ (SAR; siehe Abb. 1.1-2). Diese erhöht die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen bei erneutem Pathogenbefall. Sie entwickeln eine unspezifische Resistenz gegen ein breites Spektrum phytopathogener Viren, Bakterien und Pilze, auch in entfernten, nicht infizierten Pflanzenteilen (RYALS *et al*., 1996).

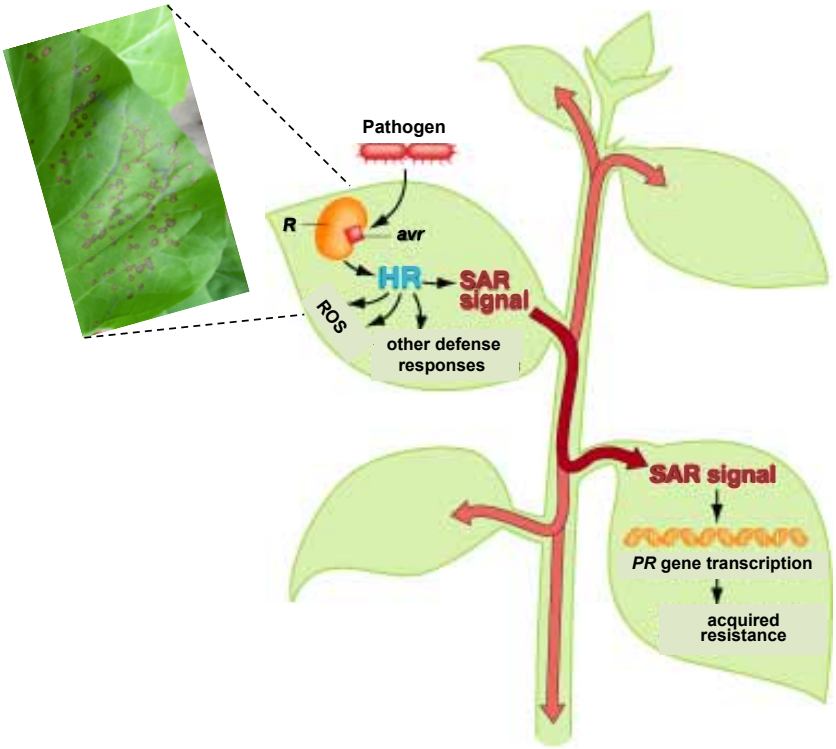


Abb. 1.1-2: Schematische Darstellung der hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) und der daraus resultierenden systemisch erworbenen Resistenz (SAR) nach Pathogenbefall (verändert nach wps.prenhall.com/esm_freeman_biosci_1/7/1955/500507.cw/index.html). Auslöser ist die Interaktion zwischen Avirulenzgen (*avr*) des Pathogens und Resistenzgen (*R*) der Pflanze.

Auch die Blattseneszenz stellt eine besondere Form des PCD bei Pflanzen dar (GRAY & JOHAL, 1998; LIM *et al*., 2003). Als Seneszenz wird der natürliche Alterungsprozess bezeichnet. Sie unterscheidet sich von anderen PCD-Arten durch einen langsameren und geordneteren Ablauf. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass diese Art des PCD im Gegensatz zur Pathogenabwehr dem Recycling von Nährstoffen während der

Reorganisationsphase dient. Die Seneszenz ist ein anfänglich umkehrbarer Prozess (NOODEN & PENNEY, 2001), der schließlich aber zum Zelltod führt. Entstehende Degradationsprodukte werden zunächst in die Vakuole transportiert, um die Zelle zu schützen (PARTHIER, 1988). Letztendlich kann die Vakuole aber über ihre autolytische Funktion die Seneszenz terminieren (THOMAS *et al*., 2003). Genau wie bei anderen Arten des PCD spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) auch bei der Initiation der Seneszenz eine zentrale Rolle. Bereits im Jahre 1956 wurde die Theorie zur Alterung durch freie Radikale postuliert (HARMAN, 1956). Genau wie die HR, geht auch die Blattseneszenz immer mit einer erhöhten H_2O_2-Produktion bzw. -Akkumulation einher (PETROV & BREUSEGEM, 2012). H_2O_2 wirkt hierbei vor allem als Signalmolekül für den Start der Seneszenz, indem es seneszenzabhängige Gene induziert (ZENTGRAF, 2008; ZENTGRAF *et al.*, 2012). Man nimmt zudem an, dass es durch die oxidative Degradierung von Chlorophyll und Membranen zur Bildung von zusätzlichen Sauerstoff-Radikalen kommt (MUNNÉ *et al*., 2002; ZIMMERMANN & ZENTGRAF, 2005).

1.1.3 ROS („reactive oxygen species“)

Sauerstoff ist für alle aeroben Organismen lebensnotwendig. Durch die Aufnahme von Sauerstoff und dessen Reduktion zu Wasser entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Hierzu gehören freie Radikale wie O_2^- OH^-, RO_2 und RO, aber auch stabile molekulare Oxidantien wie H_2O_2, ROOH, O_3, OCl^- und O_2. Sie entstehen als toxisches Nebenprodukt des normalen zellulären Metabolismus in allen multizellulären Organismen (THANNICKAL & FANBURG, 2000) und können durch Oxidation zur Schädigung von Lipiden (Membranen), Proteinen und Nukleinsäuren und letztendlich zum Zelltod führen (FREEMAN & CRAPO, 1982; BIENERT *et al*., 2006). Um sich davor zu schützen, besitzen Zellen eine zelleigene Entgiftungsmaschinerie in Form von antioxidanten Enzymen, wie Superoxiddismutasen, Katalasen und Glutathionperoxidasen. Diese Antioxidantien sorgen dafür, dass überschüssige ROS abgebaut werden und die Zelle davor geschützt wird. Wenn der Organismus jedoch schädlichen Bedingungen, wie z. B. UV-Strahlung, Wassermangel, mechanischen Verletzungen oder Pathogenbefall ausgesetzt ist, kommt es zur vermehrten Bildung und Akkumulation von ROS. Die zelleigene Entgiftungsmaschinerie ist dann nicht mehr in der Lage die produzierte Menge an ROS zu bewältigen (DEVASAGAYAM *et al*., 2004). Es entsteht oxidativer Stress.

ROS sind aber nicht nur als schädliche Moleküle anzusehen, sondern ganz im Gegenteil als sehr wichtige Komponenten bei der Regulation und Signaltransduktion von Zellen (FINKEL, 1998; RHEE, 1999). Sie können die Expression bestimmter Gene beeinflussen

(APEL & HIRT, 2004; VAN BREUSEGEM & DAT, 2006) und sind in der Lage, eine Antwort auf verschiedene Stressfaktoren auszulösen (NEILL *et al*., 2002; BIENERT *et al*., 2006).

Von besonderem Interesse ist hier Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Obwohl H_2O_2 besser bekannt für seine zytotoxischen Effekte ist, konnte es in den letzten Jahren auch als Signalmolekül im Rahmen der eukaryotischen Signaltransduktion identifiziert werden. In Säugern ist H_2O_2 in Prozesse wie die Aktivierung von Immunzellen oder die Umgestaltung von Blutgefäßen involviert (GEISZT & LETO, 2004; VEAL *et al*., 2007). In Pflanzen wirkt H_2O_2 als Signalmolekül bei verschiedenen physiologischen Prozessen, wie Zellwandverstärkung durch oxidative Quervernetzung von Strukturproteinen, Produktion von Phytoalexinen, Stomataschließung, Wurzelwachstum und dem Erwerb einer systemischen Resistenz (SAR) (LAMB & DIXON, 1997; FOREMAN *et al*., 2003; BAIS *et al*., 2003; LALOI *et al*., 2004). Auch der programmierte Zelltod (PCD) bei Pflanzen stellt einen wichtigen biologischen Prozess dar, der durch H_2O_2 vermittelt wird (NEILL *et al*., 2002, BETHKE & JONES, 2001; GECHEV & HILLE, 2005). Dies macht sich sowohl bei der Regulation von Seneszenzprozessen bemerkbar, wo vor allem H_2O_2 eine wichtige Rolle als Signalmolekül zugesagt wird (ZENTGRAF *et al*., 2012), als auch bei der Abwehr von Pathogenen. Im Zuge der hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) nach Pathogenbefall induziert H_2O_2 das lokale Absterben infizierter Zellen, um die systemische Ausbreitung von biotrophen Pathogenen zu verhindern (LEVINE *et al*., 1994). Die Anzahl der geopferten Zellen muss dabei möglichst gering gehalten werden, um eine schützende und nicht zerstörerische Wirkung der HR zu gewährleisten. Es ist also besonders wichtig, dass H_2O_2 für eine kontrollierte Signalwirkung räumlich und zeitlich reguliert wird. Die intrazelluläre H_2O_2-Konzentration entscheidet schließlich darüber, wie vital eine Zelle ist. Zu starker unkontrollierter H_2O_2-Influx führt zum unkontrollierten Zelltod. Die grundlegenden Prinzipien der räumlichen und zeitlichen H_2O_2-Regulation werfen noch einige Fragen auf und waren zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Die Quellen der H_2O_2 Produktion sind bekannt (siehe Abb. 1.1-3). Innerhalb der Zelle entsteht es hauptsächlich während der Atmungskette beim Elektronentransport in den Mitochondrien (MØLLER, 2001). Bei Pflanzen entsteht H_2O_2 außerdem an der Thylakoidmembran der Chloroplasten während der Mehler-Reaktion (MEHLER, 1951). Auch durch die Photorespiration der Peroxisomen wird H_2O_2 freigesetzt. Außerhalb pflanzlicher Zellen steigern abiotischer und biotischer Stress die H_2O_2-Produktion durch Plasmamembran-lokalisierte Enzyme, wie NADPH-Oxidasen aus der Familie der Nox-Proteine oder Zellwandperoxidasen (SAGI & FLUHR, 2001; TORRES *et al*., 2002; BOLWELL *et al*., 2002).

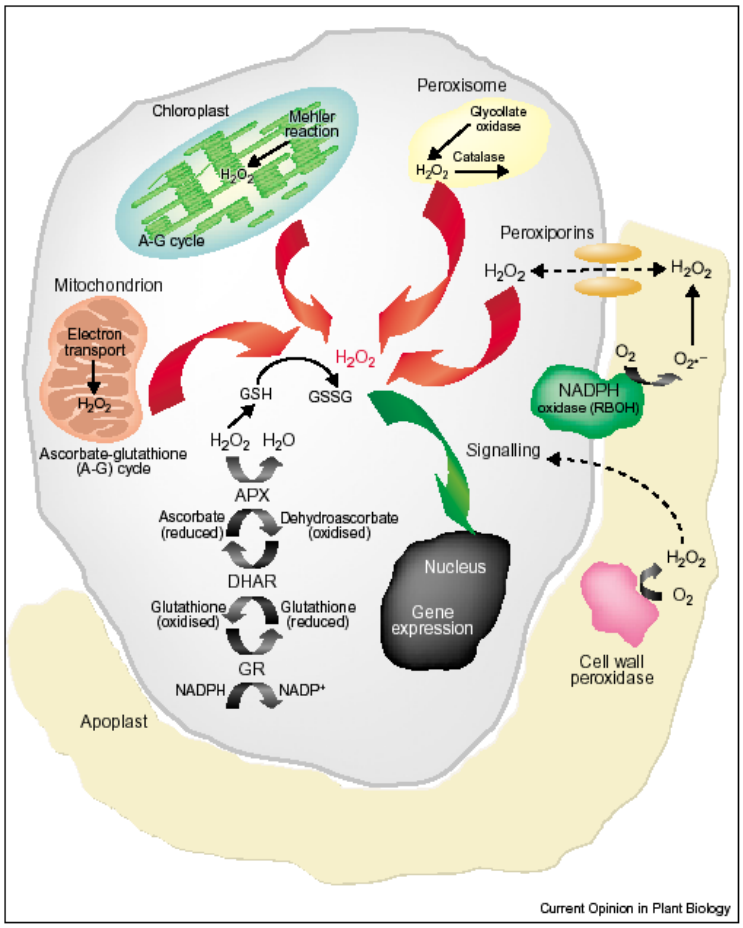


Abb. 1.1-3: Quellen der H_2O_2-Produktion in Pflanzenzellen (NEILL *et al.*, 2002). H_2O_2 entsteht entweder innerhalb der Zelle an den Mitochondrien, Chloroplasten und Peroxisomen, oder außerhalb der Zelle im Apoplasten durch die Aktivierung von NADPH-Oxidasen und Zellwandperoxidasen als Reaktion auf abiotischen und biotischen Stress. H_2O_2 welches im Apoplasten gebildet wird, gelangt durch Peroxiporine (z. B. Aquaporine) in die Zelle.

Da die Produktion von H_2O_2 als Reaktion auf Stress zu einem großen Teil durch NADPH-Oxidasen und Zellwandperoxidasen auf der extrazellulären Seite von Zellmembranen abläuft, ist es von großer Wichtigkeit zu verstehen, wie H_2O_2 über die Zellamembran hinweg in die Zelle transportiert wird, um dort seine Signalfunktion zu erfüllen (MILLER *et al.*, 2010). Lange Zeit wurde angenommen, dass H_2O_2 frei durch Zellemembranen diffundieren kann (LANCASTER, 1994). Mittlerweile wird diese Ansicht jedoch bezweifelt. Zum einen, weil eine Diffusion von H_2O_2 aufgrund des permanenten Dipolmoments von 2,26 x 10^{-18} elektrostatischen Einheiten wenig wahrscheinlich ist (ARDON, 1965). Zum anderen, da Ergebnisse aktueller Forschungsstudien darauf hinweisen, dass es H_2O_2-transportierende Kanalproteine (Peroxiporine) in Zellmembranen gibt. Zwischenzeitlich konnten verschiedene Aquaporine als Peroxiporine identifiziert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Aquaporine nicht nur Wasser transportieren, sondern auch als Vermittler für die H_2O_2-Aufnahme in die Zelle fungieren können (BIENERT *et al.*, 2006; DYNOWSKI *et al*, 2008; HOCH, 2011).

1.2 Aquaporine

Aquaporine sind integrale Membranproteine. Sie formen wasserleitende Känale durch Zellmembranen. Da biologische Membranen im Inneren hydrophob sind, ist deren Leitfähigkeit für Wassermoleküle sehr gering. Daher sind Kanäle nötig, die den passiven Durchtritt von Wasser und einigen weiteren Molekülen ermöglichen. Aquaporine sind hauptsächlich in der Plasmamembran von Zellen und in der Vakuolenmembran (Tonoplast) vertreten, können aber auch in anderen intrazellulären Membranen vorkommen (JOHANSSON *et al*., 1998; LIU *et al*., 2003). Sie sind ubiquitär, also in allen Organismen von Bakterien über Pilze und Pflanzen bis hin zu Tieren und Menschen vertreten. Beim Menschen regulieren Aquaporine unter anderem den Wasserhaushalt in der Niere, in den Erythrozyten, in der Augenlinse und im Gehirn (PRESTON & AGRE, 1991). Bei Pflanzen liegt die Funktion der Aquaporine in der Wasseraufnahme durch die Wurzeln und der Weiterleitung in die restliche Pflanze. Auf diese Weise besteht neben den Wasserleitgefäßen des Xylems ein zweites Wassertransportsystem durch die übrigen Pflanzengewebe. Aquaporine im Tonoplasten gewährleisten beim Zellwachstum die Volumenzunahme der Zelle durch Wasseraufnahme (EISENBARTH & WEIG, 2005). Sie erhalten den Zellturgor und sind an der Bildung von Samen und deren Keimung sowie der Regelung der Schließzellen beteiligt (JOHANSSON *et al*., 2000; SANSOM & LAW, 2001).

Aquaporine gehören zur Familie der „major intrinsic proteins“ (MIPs). Sie haben ein Molekulargewicht von 23 bis 34 kDa (CHAUMONT, 2004). Strukturell bestehen Aquaporine aus sechs transmembranen α-Helices (H 1 - 6), welche über fünf Schleifen (A - E) miteinander verbunden sind (HELDT & PIECHULLA, 2008) (siehe Abb. 1.2-1). C- und N-Terminus befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran (GONEN & WALZ, 2006). Ein Aquaporin Monomer vermittelt den Anschein, dass es aus zwei repetetiven Teilen gebildet wird (TM 1 - 3 und TM 4 - 6). Die beiden Proteinhälften sind um 180 °C zueinander gedreht. Die Schleifen B und E sind hydrophobe Schleifen. Sie enthalten je ein hoch konserviertes NPA-Motiv (Aminosäureabfolge aus Asparagin, Prolin und Alanin) (REIZER *et al*., 1993; CHRISPEELS & AGRE, 1994; PARK & SAIER, 1996). Während Schleife B die zweite und dritte Transmembrandomäne (TM) verbindet, ist Schleife E zwischen der fünften und sechsten lokalisiert. Im gefalteten Protein liegen die beiden Schleifen gegenüber und bilden mittels der beiden hydrophoben NPA-Motive die wasserdurchlässige Pore (JUNG *et al*., 1994; WU & BEITZ, 2007). Diese Struktur wird als „hourglass model“ (Sanduhr-Model), bezeichnet (JUNG *et al*., 1994).

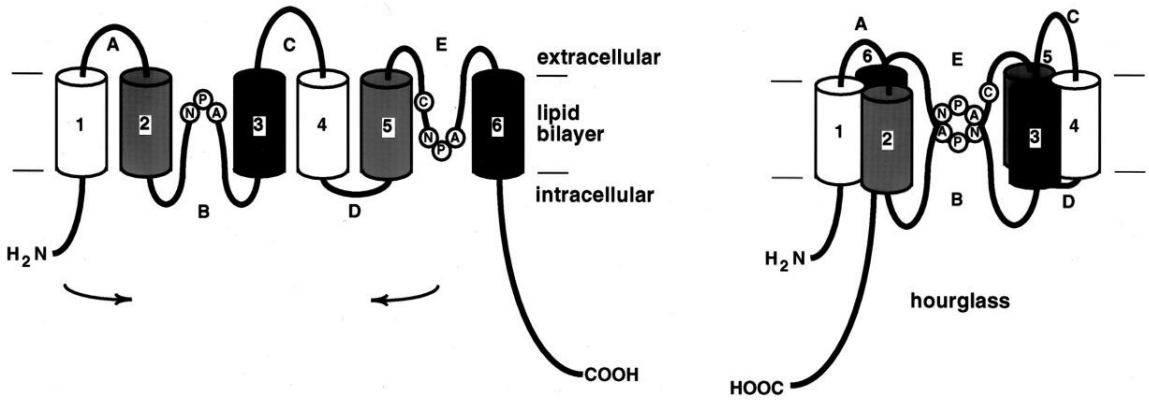


Abb. 1.2-1: Struktur eines Aquaporin Monomers („hourglass-model") (JUNG *et al.*, 1994). Jedes Monomer besteht aus zwei gegenüberliegenden symmetrischen Strukturen, die je drei Transmembrandomänen (TM 1 - 3 und TM 4 - 6) beinhalten. Die TM sind durch fünf Schleifen (A - E) miteinander verbunden. Schleife B und E enthalten je ein NPA-Motiv und bilden zusammen eine wasserdurchlässige Pore.

Aquaporine bilden Tetramere in der Zellmembran, wobei jedes Monomer als ein unabhängiger Kanal fungiert (siehe Abb. 1.2-2). Sie transportieren selektiv Wasser und einige weitere ungeladene Moleküle durch Membranen. Gleichzeitig verhindern sie die Passage von Ionen, einschließlich Protonen oder anderen gelösten Substanzen (GONEN & WALZ, 2006).

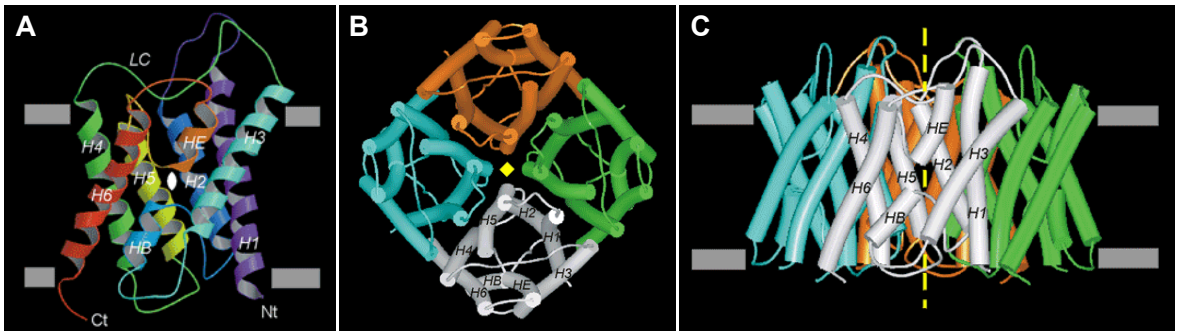


Abb 1.2-2: Bändermodell des humanen AQUAPORIN 1 (AQP1), (MURATA, 2000). Seitenansicht eines AQP1 Monomers, mit den sechs transmembranen α-Helices (H 1 - 6) sowie den Schleifen (A - E); Ct: C-Terminus, Nt: N-Terminus (A), Ansicht der extrazellulären Seite eines AQP1 Tetramers mit 4 unabhängigen Kanälen (B), Seitenansicht eines AQP1 Tetramers (C). Graue Balken kennzeichnen die Lipid-Doppelschicht; oben: extrazellulär, unten: zytoplasmatisch. Die gelbe Raute und die gelbe unterbrochene Linie kennzeichnen die vierzählige Symmetrieachse des Tetramers.

Die pflanzlichen Proteine der MIP-Familie werden aufgrund von Sequenzhomologien in vier Unterfamilien eingeteilt: „plasma membrane intrinsic proteins" (PIPs), „tonoplast intrinsic proteins" (TIPs), „Nodulin26-like intrinsic proteins" (NIPs) und „small basic intrinsic proteins" (SIPs) (JOHANSON *et al.*, 2001; CHAUMONT *et al.*, 2001; JOHANSON & GUSTAVSSON, 2002). TIPs und PIPs sind außerdem nach ihrer subzellulären Lokalisation

in Tonoplast und Plasmamembran eingeteilt. Diese ist jedoch nicht zwingend. Proteine der NIP-Unterfamilie sind in der Plasmamembran und anderen intrazellulären Membranen vertreten (MA *et al*., 2006; MIZUTANI *et a*l., 2006; TAKANO *et al*., 2006). Die Unterfamilie der SIPs bildet die kleinste Gruppe mit Proteinen die hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (ISHIKAWA *et al*., 2005). Bei *A. thaliana* gibt es 35 unterschiedliche MIPs (siehe Abb. 1.2-3).

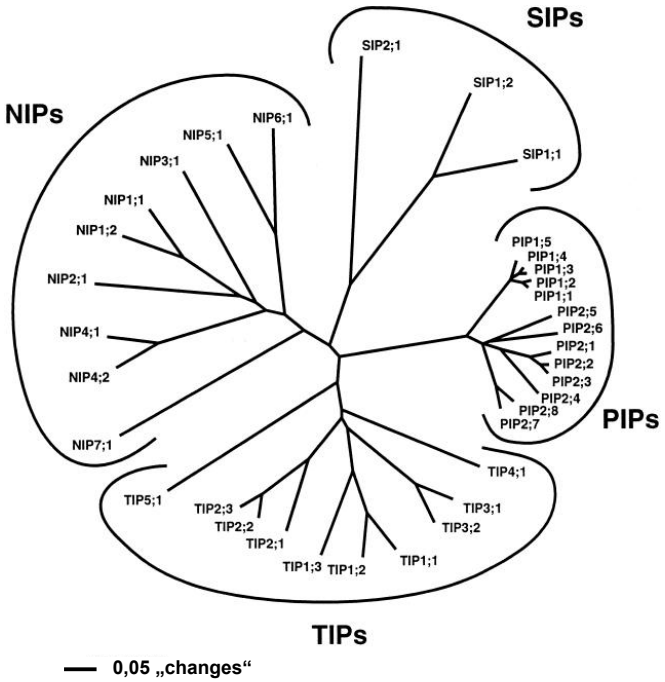


Abb. 1.2-3: Phylogenetische Gegenüberstellung der 35 MIPs aus *Arabidopsis thaliana* (JOHANSON *et al*., 2001). MIPs sind eingeteilt in die vier Unterfamilien TIPs, PIPs, NIPs und SIPs. Die erste Nummer der Proteinnomenklatur kennzeichnet die Gruppe, die zweite Nummer die Reihenfolge in der sie entdeckt wurden. Die Länge des Distanzbalkens mit dem Wert 0,05 entspricht 5 % Aminosäureaustausch pro Position im Sequenz-„Alignment“.

Weiterhin können MIPs aufgrund ihrer Transportselektivität in zwei funktionale Gruppen eingeteilt werden. Während viele pflanzliche MIPs ausschließlich als Wasserkanäle fungieren (orthodoxe Aquaporine), gibt es einige Beispiele die auch noch für andere Moleküle permeabel sind (Aquaglyceroporine). Aquaglyceroporine können kleine ungeladene, teilweise polare Stoffe wie Glycerin, Harnstoff, CO_2, Polyole, Purine, Pyrimidine, NH_3, NH_4^+ und dreiwertige anorganische Formen von Arsen und Antimon transportieren (FU *et al.*, 2000; LUDEWIG *et al*., 2002; LIU *et al*., 2003; UEHLEIN *et al*., 2003; LOQUÉ *et al.*, 2005; HOLM *et al*., 2005; HARA-CHIKUMA & VERKMAN, 2006). Auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kann durch manche Aquaporine transportiert werden (BIENERT *et al*., 2006, 2007; DYNOWSKI *et al*., 2008; HOCH, 2011). Ausschlaggebend für die Transportselektivität sind Größe und elektrochemische Eigenschaften der Moleküle sowie der Aquaporin-Pore (FUJIYOSHI *et al*., 2002; TAJKHORSHID *et al*., 2002; WU *et al*., 2007).

1.3 Aminoacylasen

Aminoacylasen (N-Acylaminosäurehydrolasen, EC 3.5.1.14) gehören zur Familie der M20-Metallopeptidasen (RAWLINGS & BARRETT, 1995). Sie katalysieren die Hydrolyse von N-terminal acylierten L-Aminosäuren zu einer freien L-Aminosäure und einer Acylgruppe (ENDO, 1980; PITTELKOW *et al.*, 1998; PERRIER *et al.*, 2005; siehe Abb. 1.3-1). Zu den Acylgruppen der allgemeinen Form R-(C=O) zählen die Acetylgruppe CH_3-(C=O), die Formylgruppe H-(C=O), die Benzoylgruppe C_6H_5-(C=O) und ähnliche Reste.
Auch die Gegenreaktion, die Acylierung von Aminosäuren, kann von Aminoacylasen katalysiert werden. Jedoch findet bevorzugt die Reaktion der Hydrolyse statt (LINDNER *et al.*, 2000).

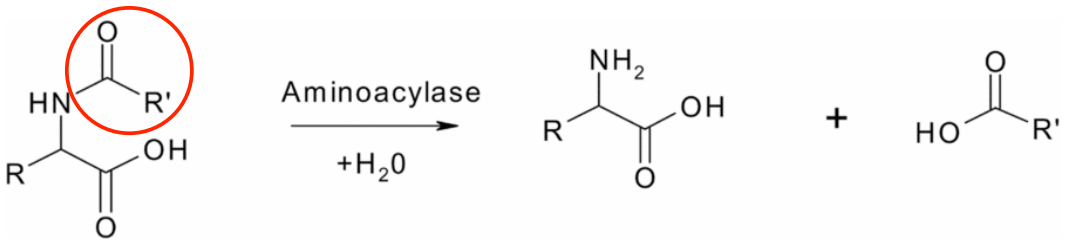


Abb. 1.3-1: Von Aminoacylasen katalysierte chemische Reaktion: Hydrolyse N-acylierter L-Aminosäure zu L-Aminosäure und Acylgruppe.

Aminoacylasen sind bei Mikroorganismen, Tieren und im Pflanzenreich weit verbreitet (SAKANYAN *et al.*, 1993; ISHIKAWA *et al.*, 2001; STORY *et al.*, 2001). Bei Säugern wurde vor allem die Niere als reichhaltige Quelle identifiziert (LINDNER, 2000; LINDNER *et al.*, 2003). SCHMIEDEBERG lieferte 1881 erstmals den Nachweis für ein Hippursäure spaltendes Enzym in wässrigen Gewebsauszügen der Schweineniere. In Anlehnung an die Lokalisation im Gewebe bezeichnete er das Enzym damals als „Histozym“ (SCHMIEDEBERG, 1881). In den folgenden Jahren beschäftigten sich viele Wissenschaftler mit der Lokalisation, Funktion, Struktur und Bedeutung dieses Enzyms. Auch SMORODINZEW untersuchte die Eigenschaften des „Histozyms“ und zeigte, dass es neben Hippursäure (N-Benzoylglycin) auch Benzoylleucin und Benzoylalanin hydrolysiert. Aufgrund seiner Befunde prägte er den Begriff der „Acylase“ (SMORODINZEW, 1922). Bei Säugern wurden bisher vier Aminoacylasen identifiziert, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. BIRNBAUM *et al.* gelang 1952 die Acylase-Isolierung aus Schweineniere. Sie stellten fest, dass sich zwei verschiedene Acylasen im rohen Homogenat befanden. Das eine Enzym, welches fast alle getesteten N-acylierten Aminosäuren hydrolysierte, nannten sie Aminoacylase 1 (Acy1). Das andere Enzym, welches lediglich N-Acetyl-Aspartat hydrolysierte, wurde als Aminoacylase 2 bezeichnet (BIRNBAUM *et al.*, 1952). 1978 wurde eine Aminoacylase im Nierenhomogenat entdeckt welche vor allem N-acetylierte

aromatische Aminosäuren deacetyliert. Sie wurde als Aminoacylase 3 bezeichnet (ENDO, 1978). Eine weitere Aminoacylase spaltet im Gegensatz zu den anderen Enzymen keine N-α-acetylierten Aminosäuren, sondern ausschließlich N-ε-Acetyl-L-Lysin. Diese wird als Acyl-Lysin-Deacylase bezeichnet (PAIK *et al*., 1957; ANDERS & DEKANT, 1994).

Bei den bis heute bekannten Acylasen handelt es sich meist um homodimere Metalloproteine. Es sind aber auch homotetramere Formen identifiziert worden (CHO *et al*., 1987; COOK *et al*., 1993; YANG *et al*., 1994; PALM & RÖHM, 1995; D´AMBROSIO *et al*., 2003). Für die Ausprägung der Enzymaktivität wird ein zweiwertiges Kation benötigt. Es handelt sich dabei meist um Zink. Jedes Monomer enthält ein mono- oder dinukleäres Zinkzentrum (WU & TSOU, 1993; LINDNER *et al*., 2003).

Die Aminoacylase 1 ist die prominenteste der bisher bekannten Acylasen. Seit 1975 wurden ihre Proteinstruktur und Katalysemechanismen von verschiedenen Forschergruppen untersucht (LÖFFLER, 1986; LINDNER *et al*., 2003, 2005, 2008a+b). Die Aminosäuresequenzen des Proteins aus Schweinen (pAcy1) und Menschen (ACY1) wurden 1992 und 1993 veröffentlicht (JAKOB *et al*., 1992; MITTA *et al*., 1993; COOK *et al*., 1993). Es zeigte sich, dass beide Proteine eine 87,7 % homologe Aminosäuresequenz aufweisen (MITTA *et al*., 1993).

Die humane ACY1 wird durch das Gen *ACY1* kodiert, welches auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p21.1) lokalisiert ist (NAYLOR *et al*., 1979, 1982; MILLER *et al*., 1990). Die Analyse der cDNA ergab eine Länge von 1438 Basenpaaren (bp) mit einem offenen Leserahmen von 1224 bp. Das Protein besteht demnach aus 408 Aminosäuren und hat eine berechnete Molekularmasse von 45,822 kDa (COOK *et al*., 1993). ACY1 katalysiert vorzugsweise die Umsetzung, neutraler, unverzweigter, aliphatischer Aminosäuren mit kurzen Acylresten, vor allem N-Acetyl-L-Methionin (BIRNBAUM *et al*., 1952; GREENSTEIN & WINITZ, 1961). Die Michaeliskonstante für N-Acetyl-L-Methionin beträgt 2 mM. Das Enantiomer N-Acetyl-D-Methionin wird hingegen nicht hydrolysiert (BRUNS & SCHULZE, 1962).

Die subzelluläre Lokalisation von Aminoacylase 1 ist noch unklar. Mehrere Forschergruppen charakterisierten Acy1 als zytosolisches Enzym (SCHMIEDEBERG, 1881; COOK *et al*., 1993; GIARDINA *et al*., 1999; LINDNER *et al.,* 2000). Jedoch wird auch über eine Membranassoziation der Acy1 spekuliert. (HEESE *et al*., 1988; PALM & RÖHM, 1995; GIARDINA *et al*., 1997). Dem liegt zugrunde, dass die Sequenzen der Proteine vom Acy1-Typ immer zwei charakteristische Sequenzabschnitte mit je einem PWW-Motiv enthalten. Diese PWW Motive sind eigentlich typisch für integrale Membranproteine. Jedoch wird

auch die Möglichkeit einer peripheren Membranverankerung von nicht-integralen Proteinen wie Acy1 über PWW-Motive postuliert (PALM & RÖHM, 1995).

Durch Kristallisation und Enzymaktivitätstests mit einer Mutante der humanen ACY1 (ACY1 Thr347Gly) (siehe Abb. 1.3-2) konnten wichtige Informationen zum Aufbau des aktiven Zentrums als auch zum Ablauf katalytischer Reaktionen des Enzyms erhalten werden. Zum aktiven Zentrum des Enzyms gehören die Aminosäuren Asp82 und Glu147 (LINDNER *et al*., 2003). ACY1 besteht aus zwei identischen Monomeren und bildet somit ein 90 kDa großes Homodimer (KÖRDEL & SCHNEIDER, 1997; LINDNER *et al*., 2000, 2003, 2005; PERRIER *et al*., 2005).

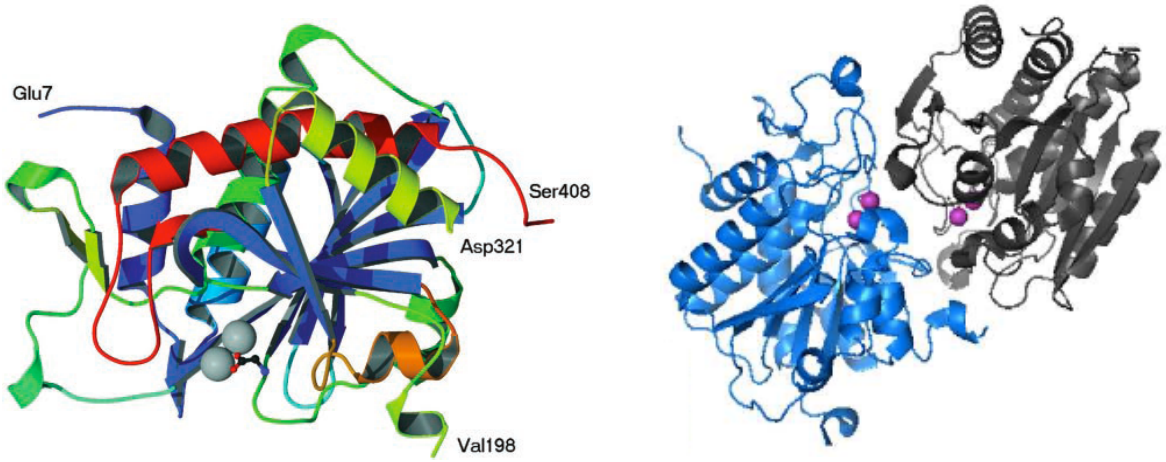


Abb. 1.3-2: Bändermodell des Zinkbindungsbereichs von ACY1 (links) (LINDNER *et al*., 2003) und eines ACY1 Homodimers (rechts) (SOMMER *et al*., 2012). Dargestellt ist die ACY1-Mutante Thr347Gly. Jedes Monomer bindet zwei Zinkionen (links: grau, rechts: violett).

Jedes Monomer enthält ein dinukleäres Zinkzentrum, welches Zinkionen (Zn^{2+}) über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Die Aminosäuren His80, Asp113, Glu148, Glu175 und His373 der C- und N-terminalen Region bilden die Zink-bindende Domäne (LINDNER *et al*., 2003). Die Zwischendomäne (Aminosäure 189 - 310) vermittelt die Dimerisierung (D´AMBROSIO *et al*., 2003). Zur Rolle der Zinkionen bei der Enzymaktivität gibt es unterschiedliche Meinungen. HEESE *et al*. gehen von einer rein strukturellen Funktion des Metallions aus (HEESE *et al*., 1990). ROWSELL *et al*. hingegen postulieren die direkte Beteiligung des Metallions an der Katalyse (ROWSELL *et al*., 1997) und COLEMAN *et al*. vermuten eine Funktion des Metallions bei der Substratbindung (COLEMAN *et al*., 1998). Für die Substratbindung verantwortliche Reste konnten noch nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Jedoch wird für Aminosäure Arg276 eine maßgebliche Beteiligung an der Bindung sowie der katalytischen Umsetzung des Substrats postuliert (LINDNER *et al*., 2005).

Die biologische Funktion von Aminoacylasen ist bisher noch kaum verstanden. Früher wurde ihre Aufgabe weniger in der Hydrolyse von N-acylierten Aminosäuren als in der Synthese (z. B. Hippursäure-Synthese) gesehen. Mit den Untersuchungen von GREENSTEIN & WINITZ (1961) zur Stereoselektivität und Substratspezifität der Acy1 aus Schweinen, verlagerte sich das Interesse an der Aktivität des Enzyms jedoch von der Synthese auf die Hydrolyse N-ac(et)ylierter Aminosäuren.

Die N-Acetylierung von Aminosäuren in Proteinen und Peptiden ist ein weit verbreiteter Mechanismus, der in vielen eukaryotischen Zellen zu finden ist. 85 % aller eukaryotischen Proteine sind N-terminal acetyliert (POLEVODA & SHERMAN, 2000). Ein großer Teil (40 %) dieser N-acetylierten Proteine sind Strukturproteine, wie z. B. Histone, Keratin, Aktin und ribosomale Proteine. Es gibt mehrere Hypothesen die als Grund für diese N-terminale Modifikation diskutiert werden. Im Allgemeinen können N-terminale Modifkationen die biologische Funktion, die Stabilität, die Proteinfaltung und den Abbau von Proteinen beeinflussen (KENDALL *et al*., 1990). So kann die Modifikation durch N-Acetylierung z. B. zum Schutz vor proteolytischem Abbau dienen, um die Halbwertszeit von Proteinen und Peptiden zu verlängern (JORNVALL, 1975; BACHMAIR *et al*., 1986; BRADSHAW, 1998). Auch Zwischenprodukte im Intermediärstoffwechsel sind manchmal durch N-Acetylierung stabilisiert, um unerwünschte Nebenreaktionen zu verhindern (KINDLER & GILVARG, 1960; SCAPIN & BLANCHARD, 1998). Die Stabilisierung ist aber nicht die einzige Funktion der N-Acetylierung. Sie kann auch regulierende Auswirkungen auf die Proteinaktivität haben. Die Eliminierung der N-terminalen positiven Ladung durch Acetylierung wirkt sich bei einigen Proteinen direkt funktionell aus (EVANS *et al.,* 1994; OHBA *et al*., 1997).

Die N-terminale Acetylierung von Proteinen wird von N-Acetyl-Transferasen katalysiert. Diese übertragen Acetyl-Gruppen von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) an das Ende von α-Aminosäuren (BRADSHAW *et al*., 1998). Über den genauen Abbauprozess dieser N-acetylierten Proteine ist bisher jedoch relativ wenig bekannt. Man weiß, dass zwei Proteine beteiligt sind (siehe Abb. 1.3-3). Zuerst werden die N-acetylierten Aminosäuren durch die N-Acylpeptid-Hydrolase (APH) vom Peptid abgespalten. Die freigesetzten acetylierten Aminosäuren müssen für den weiteren Metabolismus wieder deacetyliert werden. Dies geschieht in einem zweiten Schritt durch die von Aminoacylasen katalysierte Hydrolyse. Dabei entstehen freie Aminosäuren und Acetat (GADE & BROWN, 1981; GIARDINA *et al*., 1997; PITTELKOW *et al*., 1998).

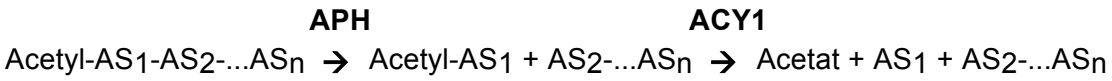


Abb. 1.3-3: Abbau von N-terminal acetylierten Proteinen durch N-Acylpeptid-Hydrolase (APH) und Aminoacylase 1 (ACY1).

Die freien Aminosäuren sind dann wieder für die Protein-Synthese verfügbar (PERRIER *et al*., 2005). Somit wird Aminoacylasen vor allem die Funktion der Deacetylierung von N-terminal blockierten Aminosäuren im Aminosäure-Metabolismus zugeschrieben (PALM & RÖHM, 1995). Diese Funktion passt gut zur beobachteten Substratspezifität der ACY1, da Alanin, Serin, Methionin, Glycin und Threonin die häufigsten Aminosäurereste am Aminoterminus von N-acetylierten Proteinen sind (ENDO, 1980; PITTELKOW *et al*., 1998; POLEVODA & SHERMAN, 2002).

1.3.1 Aminoacylase 1-homologe Proteine aus Pflanzen (AQI1 und NtAQI1)

Während über die Funktion von tierischen und humanen Aminoacylasen einiges bekannt ist, ist noch weitgehend unklar welche Rolle diese hoch konservierten Proteine in Pflanzen spielen.

Das pflanzliche Aminoacylase 1-homologe Protein AQI1 wurde in vorherigen Forschungsarbeiten am Institut für Genetik, Fachgebiet Allgemeine Virologie der Universität Hohenheim isoliert (HOCH, 2011).

Am Anfang stand hierbei die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem programmierten Zelltod (PCD) bei Säugern und Pflanzen besteht. Um dies zu klären wurden transgene Tabakpflanzen hergestellt, welche Gene für verschiedene Apoptose-regulierende Proteine der Bcl-2 Familie exprimieren (ROTH, 2003), unter anderem das Gen für das anti-apoptotische Protein BHRF1 des humanen Epstein-Barr Virus. Bei den Untersuchungen der *BHRF1*-transgenen Pflanzen konnte überraschenderweise eine stark pro-apoptotische Wirkung des viralen BHRF1 beobachtet werden (siehe Abb. 1.3-4).

Dies steht ganz im Gegensatz zu der eigentlich anti-apoptotischen Wirkung des Proteins in Säugern. Die konstitutive Expression von *BHRF1* führte zu einer altersabhängigen Sensibilisierung der transgenen Pflanzen gegen Zelltodreize. Es zeigte sich eine unerwartet starke Nekrosenbildung, die durch endogene Reize, wie eine hypersensitive Reaktion (HR) und Stress ausgelöst werden konnte. Ältere Blätter zeigten auch ohne äußeres Einwirken nekrotische Bereiche. Diese traten spontan auf und waren von unregelmäßiger Form.

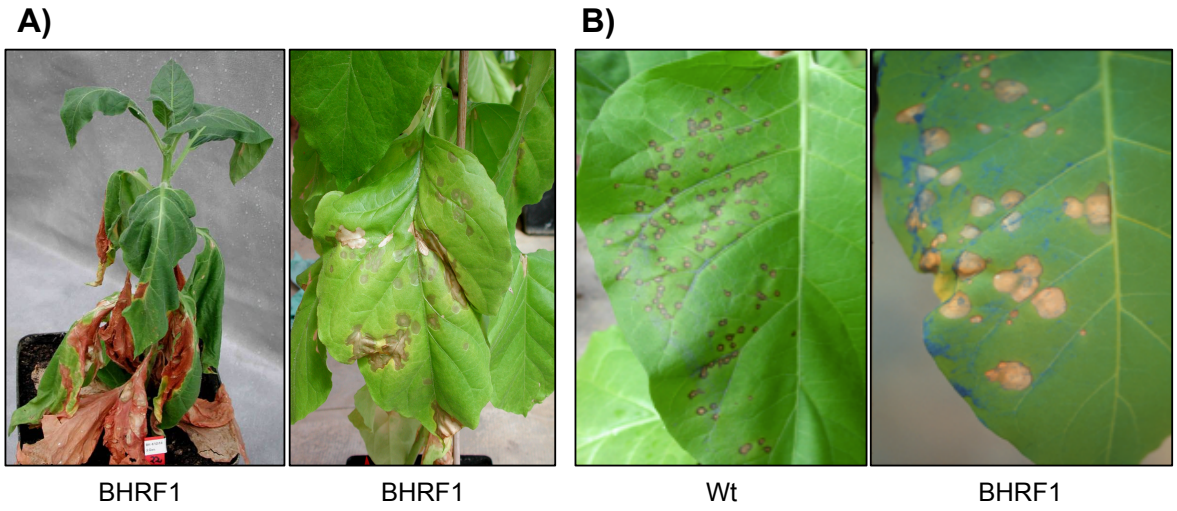


Abb. 1.3-4: typischer Phänotyp von *BHRF1*-transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum* NN). Überexpression von *BHRF1* führt zur Ausbildung unregelmäßiger Spontannekrosen in älteren Blättern (A). 5 Tage nach einer Infektion von *N. tabacum* NN mit Tabakmosaikvirus (TMV) kommt es zu einer hypersensitiven Abwehrreaktion (HR), die sich beim Wildtyp (Wt) in Form von begrenzten Lokalläsionen äußert. Bei *BHRF1*-transgenen Tabakpflanzen (BHRF1) wird die Begrenzung dieser Lokalläsionen nicht gewährleistet. Es kommt zur unkontrollierten Ausbreitung der nekrotischen Bereiche (B).

Die Ursache für den nekrotischen Phänotyp der transgenen Pflanzen ist auf eine Bindung von BHRF1 an die pflanzlichen zellulären Aquaporine TIP1;1 und PIP2;2 zurückzuführen. Hierdurch kommt es vermutlich zu einer Fehlregulation der Kanalfunktion dieser Aquaporine. Da TIP1;1 und PIP2;2 unter anderem als H_2O_2-Kanäle fungieren, führt dies zur letalen Akkumulation von H_2O_2 in der Zelle und somit zu Zelltod (HOCH, 2011).

BHRF1 kommt natürlicherweise in Pflanzen nicht vor. Deshalb stellte sich die Frage nach dem endogenen zellulären Interaktionspartner bzw. Regulator der Aquaporine in Pflanzen. Speziell den H_2O_2-Transport betreffend muss es einen Regulationsfaktor geben, der die unkontrollierte Ausbreitung von toxischen Mengen H_2O_2 verhindert und die kontrollierte Signalwirkung von H_2O_2 ermöglicht. Mit einem speziellen Hefezweihybridsystem konnte in einer *Arabidopsis*-cDNA-Bank ein pflanzliches Protein als Interaktionspartner der pflanzlichen Aquaporine (TIP1;1 und PIP2;2) identifiziert werden. Dieses Protein wurde zukünftig AQUAPORIN INTERACTOR 1 (AQI1) genannt. Auch aus einer Tabak-cDNA Bank konnte das entsprechende homologe Protein isoliert werden (NtAQI1) (HOCH, 2011). AQI1 aus *A. thaliana* und NtAQI1 aus *N. tabacum* weisen eine hohe Sequenzhomologie zu Aminoacylase 1 aus Säugern auf. Laut Sequenzvergleich mit der Datenbank des NCBI (Blast-Programm; ALTSCHUL *et al.*, 1990) beträgt die Aminosäure-Identität für AQI1/ACY1 45 %, für NtAQI1/ACY1 42 % und für AQI1/NtAQI1 69 %.

Die Expression von *AQI1* (At4g38220) wird basierend auf „Microarray“-Daten (*Arabidopsis* eFP Browser, bar.utoronto.ca, WINTER *et al*., 2007) für alle Pflanzenorgane von *A. thaliana* angenommen (siehe Abb. 1.3-5).

Das höchste Expressionslevel wurde in der Wurzel, vor allem in der Wurzelhaarzone/Differenzierungszone detektiert. In dieser Wurzelzone findet die Ausdifferenzierung der Gewebe statt. Es entstehen Parenchym- und Sklerenchymzellen, aber auch Phloem und Xylem. Außerdem sind hier die Wurzelhaare für die Wasser- und Mineralstoffaufnahme angesiedelt.

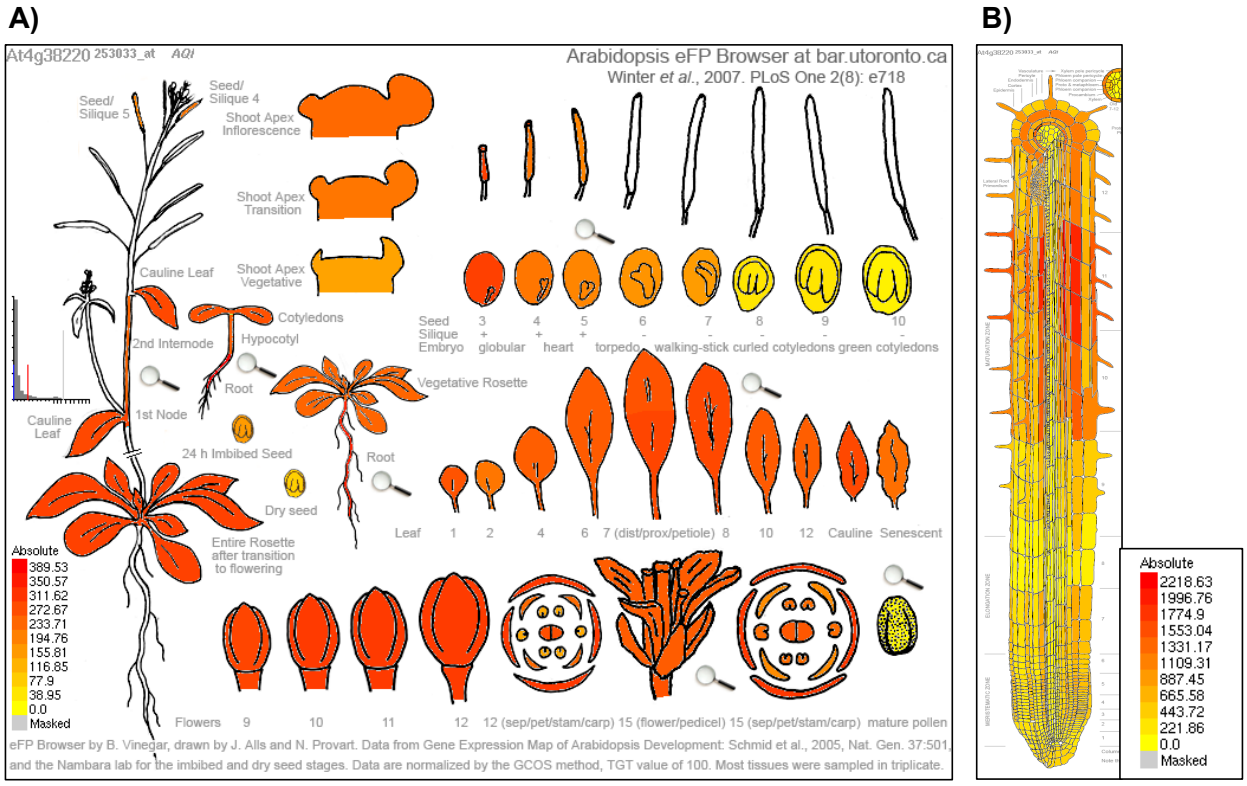


Abb. 1.3-5: Detektierte Expressionsstärke von *AQI1* (At4g38220) basierend auf „Microarray“-Daten (*Arabidopsis* eFP Browser, bar.utoronto.ca, WINTER *et al*., 2007). Expressionsstärke in verschiedenen Pflanzenorganen von *A. thaliana* (A). In der Wurzel, vor allem in der Wurzelhaarzone, wird die stärkste Expression für *AQI1* vorhergesagt (B). Angezeigt sind die absoluten Expressionssignale.

1.4 Zielsetzung

In vorrangegangenen Forschungsarbeiten konnten die pflanzlichen Aquaporine TIP1;1 und PIP2;2 als am programmierten Zelltod (PCD) beteiligte Proteine identifiziert werden. Es konnte belegt werden, dass diese Aquaporine als H_2O_2-Kanäle fungieren (HOCH, 2011). Reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 sind als wichtige Signalsubstanzen im Rahmen von Zelltodreaktionen, wie z. B. der hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) aufgrund von Pathogenbefall bei Pflanzen, bekannt. Somit lag die Vermutung nahe, dass Aquaporine als H_2O_2-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Zelltodregulation in Pflanzen spielen. Da die intrazelluläre H_2O_2-Konzentration über die Vitalität einer Zelle entscheidet, stellte sich natürlich die Frage, wie H_2O_2 räumlich und zeitlich reguliert wird. Deshalb wurde nach zellulären Interaktionspartnern und somit möglichen Regulatoren der H_2O_2-transportierenden Aquaporine gesucht. Hierbei konnte der cDNA-Klon des Aminoacylase 1-homologen Proteins AQUAPORIN INTERACTOR 1 (AQI1) isoliert werden (HOCH, 2011).

In der vorliegenden Arbeit sollte das Acy1-homolge pflanzliche Protein AQI1 charakterisiert werden. Es sollte die Funktion von AQI1 aus *A. thaliana* und NtAQI1 aus *N. tabacum* als Regulatoren der Kanalfunktion von pflanzlichen Aquaporinen untersucht und der Zusammenhang zwischen H_2O_2, den Aquaporinen und (Nt)AQI1 geklärt werden. Hierzu sollte die Interaktion von (Nt)AQI1 mit den Aquaporinen näher analysiert werden. Funktions- und Expressionsanalysen der Enzyme sollten durchgeführt werden, um Näheres bezüglich der molekularen Mechanismen von (Nt)AQI1 zu erfahren. Letzten Endes sollte die physiologische Funktion von (Nt)AQI1 anhand transgener Pflanzen untersucht werden. Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung von AQUAPORIN INTERACTOR 1 (AQI1) für die Zelltodregulation in Pflanzen zu klären.

2 Material

2.1 Chemikalien und Enzyme

Verwendete Standardchemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Duchefa (Haarlem, NL) und der Carl Roth GmbH (Karlsruhe) erworben. Biologische Arbeitsstoffe stammten von den Firmen Thermo Fisher Scientific Inc., St. Leon-Rot und New England Biolabs (Schwalbach). Die Verbrauchsmaterialien wurden von der Sarstedt AG & Co (Nürnbrecht) und Corning (Schiphol-Rijk, NL) bezogen. Davon abweichende Bezugsquellen sind gesondert im Text vermerkt.

Alle Puffer, Nährmedien und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Reinstwasser (18,3 MΩ/cm), welches über eine Filtrationsanlage (D7611; HERCO Wassertechnik GmbH, Freiberg) gereinigt wurde, angesetzt. Soweit es erforderlich war wurden sie autoklaviert. Temperatursensitive Lösungen (Antibiotika-, Magnesiumsulfat- und Glukose-Lösungen) wurden über einen Spritzenvorsatzfilter (*0,2 µm oder 0,45 µm; Corning, Schiphol-Rijk, NL)* steril filtriert.

2.2 Biologische Materialien

2.2.1 Pflanzen

- *Nicotiana tabacum* L. ´Samsun´ NN
- *Nicotiana tabacum* L. ´Samsun´ nn

  Herkunft: „Tobacco Institute“ (North Carolina, USA)

- *Nicotiana benthamiana* L.

  Herkunft: Prof. K.-W. Mundry (Universität Stuttgart)

- *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ´Columbia ´ (Col-0)

  Herkunft: Fred Auzebel (Massachusetts General Hospital)

- *Sinapis alba* L.

  Herkunft: Botanischer Garten (Universität Hohenheim, Stuttgart)

2.2.1.1 Transgene Pflanzen

- *Nicotiana tabacum* L. `Samsun` NN (70H1); *35S::NtAQI1-CAH*
- *Nicotiana tabacum* L. `Samsun` NN (44H2); *35S::CAH*

  Herkunft: Erzeugt mittels Agrobakterientransformation von Ingrid Prießnitz-Hohos im Institut für Genetik, Fg. Allgemeine Virologie (Universität Hohenheim, Stuttgart)

- *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Col-0, (*aqi1-1*); T-DNA-Insertion im Promotor von *AQI1* (At4g38220), homozygot

  Herkunft: NASC, European *Arabidopsis* Stock Centre, The University of Nottingham; SALK_095161C, N682679

2.2.2 Virenstämme

- Tobacco Mosaic Virus (TMV) Gelbstamm, "common strain"
- Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)

  Herkunft: Institut für Phytomedizin (Universität Hohenheim, Stuttgart)

- Alliaria petiolata Tymovirus (ApTV) (bisher unveröffentlicht)

  Herkunft: Feldisolat, Stuttgart Möhringen

2.2.3 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* DH5α

  Herkunft: Laborbestand (HANAHAN, 1983)

  Genotyp: F'Φ80d*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (r_k^-, m_k^+) *pho*A *sup*E44λ^- *thi*-1; *rec*A1; *gyr*A96 *rel*A1

- *Escherichia coli* XL1-blue

  Herkunft: Laborbestand (Prof. Dr. Anne Spang, Universität Basel, CH)

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

- *Escherichia coli* BL21-CodonPlus®

  Herkunft: Novagen® (Merck, Darmstadt)

  Genotyp: *E. coli* B F$^-$ *omp*T *hsd*S(r_B^- m_B^-) *dcm*$^+$ Tet^r *gal* ʎ(DE3) *end*A Hte [*arg*U *pro*L Cam^r] [*arg*U *ile*Y *leu*W Strep/Spec^r]

- *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

Herkunft: Laborbestand (HOEKEMA *et al.*, 1983)

Genotyp: Ach5 pTiAch5ΔT, Rif^R

- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Herkunft: Laborbestand (KONCZ & SCHELL, 1986)

Genotyp: pMP90RK, Gen^R, Rif^R

2.2.4 Hefestamm

- *Saccharomyces cerevisiae* NMY51

Herkunft: Dualsystems Biotech AG (Zürich, CH)

Genotyp: MATa*, his3delta200, trp1-901, leu2-3, 112, ade2,* LYS2*::(lexAop)*$_4$-HIS3, ura3::(lexAop)$_8$-lacZ (lexAop)$_8$-ADE2 GAL4)

2.2.5 Oozyten

- *Xenopus laevis* Oozyten

Herkunft: Institut für Kulturpflanzenwissenschaften, Fg. Ernährungsphysiologie der Kulturpflanzen (Universität Hohenheim, Stuttgart)

2.3 Vektoren

Alle Vektor-Karten und MCS-Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen befinden sich im Anhang (II. Vektor-Karten).

2.3.1 pUC18/19

Bei pUC18/19 handelt sich um kleine (2.686 bp), mit hoher Kopienanzahl replizierende *E. coli*-Plasmidvektoren (YANISCH-PERRON *et al.*, 1985). Beide Vektoren tragen eine Ampicillinresistenz (*bla*-Gen) und erlauben die Identifizierung rekombinanter Bakterienklone durch Blau/Weiß-Selektion, welche durch die α-Komplementation des *lacZ*-Gens z. B. in *E. coli* DH5α ermöglicht wird. Die Varianten pUC18 und pUC19 unterscheiden sich lediglich in der entgegengesetzten Orientierung ihrer multiplen Klonierungsstelle (MCS), welche die Insertion von DNA-Fragmenten ermöglicht.

2.3.2 pBluescript II KS (+)

Der Vektor pBluescript II KS (+) (Stratagene, USA) wurde zur Klonierung, Sequenzierung, *in vitro* Mutagenese und *in vitro* Transkription eingefügter Gene entwickelt und hat eine Größe von 2.961 bp. Er enthält den Replikationsursprung (ori) des Bakteriophagen M13, eingebaut in ein pUC-Plasmid, welches über T3 und T7 Bakteriophagen-Promotoren verfügt. Die MCS, welche in der codierenden Region des ß-Galaktosidase-Gens (*lac*Z) liegt, ermöglicht eine Blau/Weiß-Selektion rekombinanter Klone. Das Plasmid codiert außerdem für eine Ampicillinresistenz (Amp^R).

2.3.3 pBluescript/T-Vektor

Der T-Vektor wurde von Ingrid Prießnitz-Hohos (Universität Hohenheim, Institut für Genetik, Fg. Allgemeine Virologie) hergestellt, indem das Plasmid pBluescript II KS (+) (Stratagene, USA) mit *EcoR32I* (*EcoRV*) linearisiert und mit einer terminalen Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) in Gegenwart von Didesoxythymidintrisphosphat (ddTTP) behandelt wurde, um Desoxythymidine an die 3'-OH-Enden des glatt geschnittenen DNA-Doppelstranges anzuhängen. Da viele *Taq*-Polymerasen dazu neigen, ein zusätzliches Nukleotid (in der Regel Adenosin) an die 3'-OH-Enden amplifizierter DNA-Stränge anzufügen, welche mit dem überhängenden Thymin des T-Vektors hybridisieren können, ist dieser Vektor besonders gut zum Klonieren von PCR-Produkten geeignet.

2.3.4 pBT3-C

Der Plasmidvektor pBT3-C hat eine Größe von 7.605 bp und gehört zu den „bait"-Vektoren des Split Ubiquitin Systems (siehe 3.3.3) für Interaktionsexperimente in Hefe (NMY51). Der Vektor wurde von Dualsystems Biotech AG, Zürich (CH) bezogen. Er besitzt ein Gen, welches für ein Enzym der Leucin-Biosynthese kodiert. Im Hefestamm NMY51 fehlt dieses Gen. Dies ermöglicht eine Selektion plasmidtragender Hefen auf Minimalmedium ohne Leucin. Das Plasmid kodiert für die C-terminale Hälfte eines Hefe-Ubiquitins (Cub) und für den Transkriptionsfaktor LV, bestehend aus LexA und VP16, wobei LexA die DNA-Bindungsdomäne und VP16 die Aktivierungsdomäne darstellt, die sich am 3'-Ende der multiplen Klonierungsstelle (MCS) befinden. Das zu untersuchenden Protein wird in die MCS ligiert. Nach der Expression entsteht ein C-terminales Fusionsprotein aus dem zu untersuchenden Protein, Cub und LexA-VP16 (LV). Zur Selektion in *E. coli* trägt das Plasmid eine Kanamycinresistenz.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten pBT3-C-Vektorkonstrukte sind in Tab. 2.3-1 aufgelistet. Zusätzlich sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen,

die entstehenden Fusionsproteine und die Bezugsquellen der fertigen Konstrukte angegeben.

Tab. 2.3-1: Verwendete Vektorkonstrukte basierend auf pBT3-C. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen, entstehende Fusionsproteine und Bezugsquellen sind mit angegeben.

Vektor-Konstrukt	Klonierung	Fusionsprotein	Quelle/Referenz
pBT3-C:NtTIP1;1	*SfiI*	NtTIP1;1-CubLV	HOCH, 2011
pBT3-C:NtPIP2;2	*SfiI*	NtPIP2;2-CubLV	HOCH, 2011
pBT3-C:AtTIP1;1	*SfiI*	AtTIP1;1-CubLV	HOCH, 2011
pBT3-C:AtPIP2;2	*SfiI*	AtPIP2;2-CubLV	HOCH, 2011
pBT3-C:hAQP1	*SfiI*	hAQP1-CubLV	HOCH, 2011

2.3.5 pBT3-N

Dieses 7.614 bp große Plasmid wurde ebenfalls von Dualsystems Biotech AG, Zürich (CH) bezogen und als „bait"-Vektor für Split Ubiquitin Interaktionsexperimente (siehe 3.3.3) in Hefe (NMY51) verwendet. pBT3-N besitzt genau wie pBT3-C ein Gen, welches für ein Enzym der Leucin-Biosynthese kodiert und somit die Selektion auf Minimalmedium ermöglicht. Der Vektor kodiert ebenfalls für den Transkriptionsfaktor LV (LexA-VP16), sowie für die C-terminale Hälfte eines Hefe-Ubiquitins (Cub), welche sich im Gegensatz zu pBT3-C am 5'-Ende der multiplen Klonierungsstelle (MCS) befinden. Nach der Expression entsteht ein N-terminales Fusionsprotein aus LexA-VP16 (LV), Cub und dem zu untersuchenden Protein, das in die MCS kloniert wurde. Zur Selektion in *E. coli* trägt das Plasmid eine Kanamycinresistenz.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten pBT3-N-Vektorkonstrukte sind in Tab. 2.3-2 aufgelistet. Zusätzlich sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen, die entstehenden Fusionsproteine und die Bezugsquellen der fertigen Konstrukte angegeben.

Tab. 2.3-2: Verwendete Vektorkonstrukte basierend auf pBT3-N. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen, entstehende Fusionsproteine und Bezugsquellen sind mit angegeben.

Vektor-Konstrukt	Klonierung	Fusionsprotein	Quelle/Referenz
pBT3-N:NtTIP1;1	*SfiI*	CubLV-NtTIP1;1	HOCH, 2011
pBT3-N:NtPIP2;2	*SfiI*	CubLV-NtPIP2;2	HOCH, 2011
pBT3-N:AtTIP1;1	*SfiI*	CubLV-AtTIP1;1	HOCH, 2011
pBT3-N:AtPIP2;2	*SfiI*	CubLV-AtPIP2;2	HOCH, 2011
pBT3-N:hAQP1	*SfiI*	CubLV-hAQP1	HOCH, 2011

2.3.6 pPR3-N

Auch dieses Plasmid wurde von Dualsystems Biotech AG, Zürich (CH) bezogen. Es hat eine Größe von 6.204 bp und wurde als „prey"-Vektor für Interaktionsexperimente im Split Ubiquitin System (siehe 3.3.3) in Hefe (NMY51) eingesetzt. Dieser Vektor besitzt ein Gen, das für ein Enzym der Tryptophan-Biosynthese kodiert, welches bei NMY51 mutiert ist, um die Selektion auf Minimalmedium ohne Tryptophan zu gewährleisten. Die kodierende Sequenz für das zu untersuchende Protein wird in die multiple Klonierungsstelle (MCS) kloniert. Am 5'-Ende der MCS liegt ein ORF für die N-terminale Hälfte eines durch Mutation veränderten Hefe-Ubiquitins (NubG), welches bei Expression eine N-terminale Fusion mit dem zu untersuchenden Protein bildet. Zur Selektion in *E. coli* trägt das Plasmid eine Ampicillinresistenz.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten pPR3-N-Vektorkonstrukte sind in Tab. 2.3-3 aufgelistet. Zusätzlich sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen, die entstehenden Fusionsproteine und die Bezugsquellen der fertigen Konstrukte angegeben.

Tab. 2.3-3: Verwendete Vektorkonstrukte basierend auf pPR3-N. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen, entstehende Fusionsproteine und Bezugsquellen sind mit angegeben.

Vektor-Konstrukt	Klonierung	Fusionsprotein	Quelle/Referenz
pPR3-N:NtAQI1	*BamHI/BglII*	NubG-NtAQI1	HOCH, 2011
pPR3-N:ACY1	*SfiI*	NubG-ACY1	GLINK, 2014
pPR3-N:BHRF1	*SmaI/HindIII*	NubG-BHRF1	HOCH, 2011

2.3.7 pDSL-Nx

Das Plasmid pDSL-Nx wurde ebenfalls von der Firma Dualsystems Biotech AG, Zürich (CH) bezogen. Es handelt sich um einen 6.336 bp großen „prey"-Vektor, welcher mit einer integrierten *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bank (*Arabidopsis thaliana* NubG-x cDNA library, P02210) geliefert wurde. Proteine der cDNA-Bank bilden mit der N-terminale Hälfte eines durch Mutation veränderten Hefe-Ubiquitins (NubG) eine N-terminale Fusion. Dies dient dazu, 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. Dies gewährleistet, dass auf Minimalmedium ohne Tryptophan nur Hefen wachsen, welche das Plasmid pDSL-Nx enthalten. Zur Selektion in *E. coli* trägt das Plasmid eine Ampicillinresistenz.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete pDSL-Nx-Vektorkonstrukt ist in Tab. 2.3-4 aufgeführt. Zusätzlich sind die für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstelle, das entstehende Fusionsprotein und die Bezugsquelle des fertigen Konstrukts angegeben.

Tab. 2.3-4: Verwendetes Vektorkonstrukt basierend auf pDSL-Nx. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstelle, entstehendes Fusionsprotein und Bezugsquelle sind mit angegeben.

Vektor-Konstrukt	Klonierung	Fusionsprotein	Quelle/Referenz
pDSL-Nx:AQI1(Δ1-94)	*SfiI*	NubG-AQI1(Δ1-94)	Dualsystems Biotech AG

2.3.8 pGEX-3X

Dieses Plasmid ist ca. 4.900 bp groß und trägt für die Selektion in *E. coli* eine Ampicillinresistenz. Bei pGEX-3X handelt es sich um einen Expressionsvekor unter dessen Verwendung eine N-terminale Fusion des Zielproteins mit einer Glutathion-S-Transferase (GST, ca. 26 kDa) in *E. coli* exprimiert wird. 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 *lac*UV5-Promotors. Er wird über ein internes *lac*I^q-Gen reguliert und durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induziert. Um das Zielprotein bei Bedarf leicht von GST abspalten zu können, ist zwischen GST und dem Zielprotein die Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa vorhanden.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete pGEX-3X-Vektorkonstrukt ist in Tab. 2.3-5 aufgeführt. Zusätzlich sind die für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstelle, das entstehende Fusionsprotein und die Bezugsquelle des fertigen Konstrukts angegeben.

Tab. 2.3-5: Verwendetes Vektorkonstrukt basierend auf pGEX-3X. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstelle, entstehendes Fusionsprotein und Bezugsquelle sind mit angegeben.

Vektor-Konstrukt	Klonierung	Fusionsprotein	Quelle/Referenz
pGEX-3X:NtAQI1	*EcoRI*	GST-NtAQI1	HOCH, 2011

2.3.9 pMAL-c2X

Dieses Plasmid ist 6.646 bp groß und trägt für die Selektion in *E. coli* eine Ampicillinresistenz. Es handelt sich um einen Expressionsvektor der die Überexpression eines Zielproteins fusioniert mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP, ca. 42,5 kDa) in *E. coli* ermöglicht. Für die IPTG-induzierte Überexpression des Fusionsproteins liegen ein starker

tac-Promotor, sowie *malE* Translations-Initiations-Signale vor. Aufgrund der Affinität des MBP zu Maltose ist eine Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie möglich. Um das aufgereinigte Zielprotein bei Bedarf von MBP abspalten zu können, liegt zwischen MBP und Zielprotein (5´der MCS) die Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa vor.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete pMAL-c2X-Vektorkonstrukt ist in Tab. 2.3-6 aufgeführt. Zusätzlich sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen, das entstehende Fusionsprotein und die Bezugsquelle des fertigen Konstrukts angegeben.

Tab. 2.3-6: Verwendetes Vektorkonstrukt basierend auf pMAL-c2X. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen, entstehendes Fusionsprotein und Bezugsquelle sind mit angegeben.

Vektor-Konstrukt	Klonierung	Fusionsprotein	Quelle/Referenz
pMAL-c2X:NtAQI1ΔPWW	*BamHI/BglII*	MBP- NtAQI1ΔPWW	GLINK, 2014

2.3.10 pOO2

Im Falle von pOO2 handelt es sich um einen 3.003 bp großen Vektor für die Expression von Proteinen in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Der Expressionsvektor ist von einem pBF-Plasmid-Vektor abgeleitet. Er wurde durch Austausch des 40 bp langen durch einen 92 bp langen Poly(A)-Schwanz erzeugt und enthält 5´und 3´untranslatierte β-Globin-Sequenzen des Krallenfrosches (LUDEWIG *et al*., 2002). Ferner besitzt der Vektor eine SP6-RNA-Polymerase-Promotorsequenz (notwendig für die 5´→ 3´RNA-Synthese durch die SP6-RNA-Polymerase), das Gen *LacZα (*Blau/Weiß-Selektion), eine MCS, einen ColE1 ori zur doppelsträngigen DNA-Replikation und einen f1 ori zur einzelsträngigen DNA-Replikation. Der Vektor kodiert des Weiteren für eine Ampicillinresistenz, um die Selektion in *E. coli* zu ermöglichen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten pOO2-Vektorkonstrukte sind in Tab. 2.3-7 aufgelistet. Zusätzlich sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen und die Bezugsquellen des fertigen Konstrukts angegeben.

Tab. 2.3-7: Verwendete Vektorkonstrukte basierend auf pOO2. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen und Bezugsquellen sind mit angegeben.

Vektor-Konstrukt	Klonierung	Quelle/Referenz
pOO2:NtTIP1;1	*XbaI/NcoI*	GLINK, 2014
pOO2:NtAQI1	*SacI/KpnI*	GLINK, 2014
pOO2:AtTIP1;1	*HindIII/BamHI*	FISCHER, 2013
pOO2:AQI1	*SacI/PstI*	FISCHER, 2013

2.3.11 pTAK35S

pTAK35S basiert auf dem Vektor pBI101 (BEILMANN *et al*., 1991), welcher wiederum auf das binäre Plasmid pBIN19 (BEVAN, 1984) zurückzuführen ist, das zur Pflanzentransformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* verwendet wird. Er kann in *E. coli* und *A. tumefaciens* replizieren und codiert durch das Neomycin Phosphostransferase II (*npt*II)-Gen für eine Resistenz gegenüber Kanamycin (Kan^R) in Bakterien und Pflanzen. Der 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 wird. Innerhalb der zwei Grenzen (LB, RB) befindet sich der *35S* RNA-Promotor (*35S*; 1,5 kb) des „Cauliflower Mosaic Virus" (CaMV), der für ein hohes Transkriptionslevel des Zielgens sorgt, anschließend die MCS und schließlich das Poly-A Signal des Nopalinsynthasegens (*NOS*-Terminator, NT; 0,2 kb) um die Transkription zu beenden. pTAK35S wird wie pBIN19 zur Transformation von Pflanzen mittels *A. tumefaciens* eingesetzt und misst ohne die funktionelle Einheit (*35S-Zielgen-NT*) ca. 12 kb.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten pTAK35S-Vektorkonstrukte, sowie ein pBIN61-Vektorkonstrukt (VOINNET, 2003), sind in Tab. 2.3-8 aufgelistet. Zusätzlich sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen, die verwendeten Agrobakterienstämme und die Bezugsquellen der fertigen Konstrukte angegeben.

Tab. 2.3-8: Verwendete Vektorkonstrukte basierend auf pTAK35S. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen, Agrobakterienstämme und Bezugsquellen sind mit angegeben.

Vektor-Konstrukt	Klonierung	Agrobakterienstamm	Quelle/Referenz
pTAK35S:AQI1	*BamHI/SacI*	GV3101	GLINK, 2014
pTAK35S:NtAQI1	*BamHI/SacI*	GV3101	GLINK, 2014
pTAK35S:NtAQI1-CAH	*BamHI/SacI*	GV3101	HOCH, 2011
pTAK35S:ACY1	*BamHI/SacI*	GV3101	GLINK, 2014
pBIN61:P19	*BamHI/SacI*	GV3101	VOINNET, 2003
pTAK35S:Bax	*BamHI/SacI*	LBA4404	Pfitzner, Laborbestand
pTAK35S:AtBI1	*BamHI/SacI*	LBA4404	Pfitzner, Laborbestand
pTAK35S:NIMIN1	*BamHI/SacI*	LBA4404	Pfitzner, Laborbestand
pTAK35S:GFP	*BamHI/SacI*	LBA4404	Pfitzner, Laborbestand

2.3.12 pK7FWG2C

Bei diesem Plasmid handelt es sich um einen „Gateway-Vektor“ zur Expression von GFP-Fusionsproteinen in transgenen Pflanzen. Es hat eine Größe von ca. 11.880 bp und besitzt einen *35S*-Promotor sowie die zur Rekombination notwendigen „attR-sites“ (attR1 und attR2). Der Vektor trägt ein Spectinomycinresistenzgen für die Selektion in Bakterien, sowie ein Kanamycinresistenzgen zur Selektion bei der Transformation von Pflanzen. pK7FWG2C exprimiert ein Fusionsprotein mit C-terminaler *Egfp*-Fusion. Dadurch kann das Fusionsprotein mittels UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden.
Das in der vorliegenden Arbeit verwendete pK7FWG2C-Vektorkonstrukt ist in Tab. 2.3-9 aufgeführt. Zusätzlich sind der verwendete Agrobakterienstamm und die Bezugsquelle des fertigen Konstrukts angegeben.

Tab. 2.3-9: Verwendetes Vektorkonstrukt basierend auf pK7FWG2C. Verwendeter Agrobakterienstamm und Bezugsquelle ist mit angegeben.

Vektor-Konstrukt	Agrobakterienstamm	Quelle/Referenz
pK7FWG2C:NtTIP1;1	LBA4404	HOCH, 2011

2.4 Kits

2.4.1 Plasmid-Präparation

- GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (#K0503; Thermo Fisher Scientific Inc., St. Leon-Rot)

  Dieses Kit diente zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Kulturen von *E. coli*, um besonders reine Plasmid-DNA für Klonierungszwecke und zur Sequenzierung zu erhalten.

- NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren)

  Dieses Kit diente zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Kulturen von *E. coli,* um DNA in möglichst hohen Konzentrationen für eine anschließende *in-vitro* Transkription zu erhalten.

2.4.2 DNA-Elution aus Agarosegelen

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

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

2.4.3 *In-vitro* Transkription

- Ambion® mMESSAGE mMACHINE® High Yield Capped RNA Transcription SP6 Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt)

Dieses Kit diente zur *in-vitro* Transkription linearisierter DNA, welche für Expressionsversuche im Oozyten-System (siehe 3.4) eingesetzt werden sollte.

2.4.4 Deglykosylierung von Proteinen

- Protein Deglycosylation Mix (P6039S; NEB, Schwalbach)

Dieser Protein-Mix diente dazu Zuckerreste von potentiellen Glykoproteinen zu entfernen.

2.5 Größenmarker

2.5.1 DNA-Größenmarker

In elektrophoretischen Auftrennungen von DNA Fragmenten auf Agarosegelen wurde folgender DNA-Größenmarker eingesetzt. Die Referenzbanden sind fett gedruckt.

- Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (SM0311; Thermo Fisher Scientific Inc.):
10 kb/8 kb/**6 kb**/5 kb/4 kb/3,5 kb/**3 kb**/2,5 kb/2 kb/1,5 kb/**1 kb**/750 bp/500 bp/250 bp

2.5.2 Protein-Molekulargewichtsstandard

Für Proteingele, die nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) einer Coomassie-Färbung unterzogen, oder auf Nitrocellulose übertragen und anschließend in eine Immunodetektion eingesetzt wurden, wurden Größenmarker mit vorgefärbten Proteinen verwendet, die an einen blauen Farbstoff gekoppelt sind. Die Referenzproteine sind mit einem roten bzw. grünen Farbstoff gekoppelt.

- PageRuler™ Prestained Protein Ladder (26616, Thermo Fisher Scientific Inc.):

170 kDa/130 kDa/100 kDa/70 kDa/55 kDa/40 kDa/35 kDa/25 kDa/15 kDa/10 kDa

- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (26634, Thermo Fisher Scientific Inc):

260 kDa/140 kDa/100 kDa/70 kDa/50 kDa/40 kDa/35 kDa/25 kDa/15 kDa/10 kDa

- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (26619, Thermo Fisher Scientific Inc.):

250 kDa/130 kDa/100 kDa/70 kDa/55 kDa/35 kDa/25 kDa/15 kDa/10 kDa

2.6 Antiseren

2.6.1 Primäre Antikörperseren

2.6.1.1 Detektion von GFP

Zur Detektion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) wurde der Antikörper „anti-GFP (FL), rabbit polyclonal IgG“ (sc-8334, 200 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:3.000 in Blockierungslösung verwendet.

2.6.1.2 Detektion von GST

Zur Detektion der Glutathion-S-Transferase (GST) bzw. GST-Fusionsproteinen wurde der Antikörper „anti-GST, rabbit polyclonal (71-7500, 250 µg/ml; Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt) in einer Verdünnung von 1:1.000 in Blockierungslösung verwendet.

2.6.1.3 Detektion von ACY1

Zur Detektion der humanen AMINOACYLASE 1 (ACY1) wurde der Antikörper „anti-ACY1, mouse polyclonal“ (A01, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching) in einer Verdünnung von 1:2.000 in Blockierungslösung verwendet.

2.6.1.4 Detektion von NtAQI1

Zur Detektion des „AQUAPORIN INTERACTOR 1“ aus *N. tabacum* (NtAQI1) wurde der Antikörper „anti-NAQ, rabbit polyclonal antibody“, Titer 86.000 (Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg) in einer Verdünnung von 1:250 in Blockierungslösung verwendet. Die Herstellung dieses Antikörperserums wurde mit chromatographisch aufgereinigtem Protein durch Inokulation von Kaninchen veranlasst.

2.6.1.5 Detektion von AtTIP1;1

Zur Detektion des Aquaporins TIP1;1 aus *A. thaliana* wurde der Antikörper „anti-AtTIP1;1/gamma TIP, rabbit polyclonal“ (ASO9482, Agrisera AB, Väänäs, SE) in einer Verdünnung von 1:1.000 in Blockierungslösung verwendet.

2.6.1.6 Detektion von Ubiquitin

Zur Detektion von Ubiquitin wurde der Antikörper „anti-Ub (FL-76), rabbit polyclonal (sc-9133, 200 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:250 in Blockierungslösung verwendet.

2.6.1.7 Detektion von CaMV

Zur Detektion des Capsidproteins des Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) wurde der Antikörper „anti-CaMV, rabbit polyclonal antibody“ (ATCC PVAS-147, LGC Standards, Wesel) in einer Verdünnung von 1:3.000 in Blockierungslösung verwendet.

2.6.1.8 Detektion von ApTV

Zur Detektion des Capsidproteins des Alliaria petiolata Tymovirus (ApTV) wurde der Antikörper „anti-TYMV, rabbit polyclonal antibody“ (Frau Dr. König, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig) in einer Verdünnung von 1:3.000 in Blockierungslösung verwendet. Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrads von TYMV und ApTV lässt sich mit diesem Antiserum auch das Capsidprotein von ApTV nachweisen.

2.6.2 Sekundäre Antikörperseren

2.6.2.1 Anti-Kaninchen Serum

Für die Detektion von primären Antikörpern, welche als polyklonales Antiserum aus Kaninchen gewonnen wurden (rabbit polyclonal), wurde ein aus Ziegen gewonnener polyklonaler „anti-rabbit“ Antikörper verwendet, welcher an eine Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt ist („α-rabbit IgG-HRP“, 4750.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 in Blockierungslösung eingesetzt.

2.6.2.2 Anti-Maus Serum

Für die Detektion von primären Antikörpern, welche als polyklonales Antiserum aus Mäusen gewonnen wurden (mouse polyclonal), wurde ein aus Kaninchen gewonnener „anti-mouse“ Antikörper eingesetzt, welcher an Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt ist („α-mouse IgG-HRP“, 2006; Rockland Immunochemicals Inc., Glibertsville, USA). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:5.00

2.7 Synthetische Oligonukleotide

Zur Sequenzierung von Proteinen die in den Plasmiden pUC18/19, pBluescript/T-Vektor, pGEX-3X und pMAL-c2X vorlagen, wurden Oligonukleotide der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) verwendet (siehe Tab. 2.7-1).

Tab. 2.7-1: Auflistung aller Oligonukleotide, die von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) für Sequenzierungszwecke verwendet wurden.

Bezeichnung	Sequenz 5´→3
M13 uni (- 21)	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 rev (- 29)	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
pGEX for	ATA GCA TGG CCT TTG CAG G
pGEX rev	GAG CTG CAT GTG TCA GAG G
MalE	GGT CGT CAG ACT GTC GAT GAA GCC

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden selbst entworfen und von Invitrogen™ (Life Technologies GmbH, Darmstadt) synthetisiert und bezogen (siehe Tab. 2.7-2). Von den gelieferten lyophilisierten Oligonukleotiden wurden 100 µM Stocklösungen mit H_2O hergestellt und bei - 20 °C gelagert. Zur weiteren Verwendung wurden 10 µM Arbeitslösungen hergestellt. Die optimalen Annealingtemperaturen (o. A.) der Oligonukleotide wurden von den Tm-Werten (50 mM Na^+) abgeleitet. Restriktionsschnittstellen innerhalb der Oligonukleotide sind unterstrichen.

Tab. 2.7-2: Auflistung aller Oligonukleotide, die selbst entworfen und von Invitrogen™ Life Technologies GmbH (Darmstadt) bezogen wurden. Restriktionsschnittstellen innerhalb der Oligonukleotide sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz 5´→3	o. A.
pBT3-C fwd	TGG CAT GCA TGT GCT CTG	45 °C
pBT3-N fwd	CAG AAG GAG TCC ACC TTA C	46 °C
pPR3-N fwd (pDSL-Nx)	GTC GAA AAT TCA AGA CAA GG	43 °C
pPR3-N rev (pBT3-N, pDSL-Nx)	AAG CGT GAC ATA ACT AAT TAC	41 °C
pOO2 5´fwd	CGG CTA CAA TTA ATA CAT AAC	41 °C
pOO2 3´rev	GTA AAG TGT AAG TTG TGA TTA TG	43 °C
5BamACY1	TGG ATC CCC ATG ACC AGC AAG GGT	56 °C
3SacACY1	AGA GCT CAT CAG CTG TCA CTG GGC A	56 °C
5SfiACY1	TGG CCA TTA CGG CCA TGA CCA GCA AGG GT	61 °C
3SfiACY1	GGG CCG AGG CGG CCT CAG CTG TCA CTG GGC AG	70 °C
5NtAQI1Bam	AGG ATC CAT GAG TTT TTG CGG CGG TAG GCG A	61 °C
3NtAQI1Sal	TGT CGA CTC ACA ATT CTT CCC TCG AAG CCT CAT CTC T	62 °C
3NtAQI1 mycREELSac	TGA GCT CTC ACA ATT CTT CCC TCA GGT CTT CCT CAC TGA TCA GCT TCT GTT CCT CCG AAG CCT CAT CTC T	71 °C
NtAQI1 200-180 rev	ACT CGG CGG CTT CAT AGT AGT	49 °C
NtAQI1 400-420 fwd	GCG GCA ACA TCT ACG CCC GG	55 °C
AQI1 5´	GGA ATT CAG GAT CCA AAA TGA GTC TTC TTC GTC TTC TCC TCG	62 °C
AQI1 3´	GGA ATT CGA GAT CTT AAC TCA TCT CGT GAA CCA CTT TTG CTT	60 °C
5AQI1Bam	CGG ATC CAT GAG TCT TCT TCG TCT TCT CCT C	59 °C
3AQI1 mycRDELSac	TGA GCT CTC ATA ACT CAT CTC GCA GGT CTT CCT CAC TGA TCA GCT TCT GTT CCT CTG AAC CAC TTT TGC T	70 °C
NtTIP1;1 5´	GGG GAT CCA AAA ATG CCG ATC CAC CAA A	56 °C
NtTIP1;1 3´	CCG GAT CCA AAA TCT CCA CTG GGG AGT	58 °C
AtTIP1;1 5´	GGT CTA GAA AAA TGC CGA TCA GAA ACA TCG	55 °C
AtTIP1;1 3´	CCG GAT CCG TAG TCT GTG GTT GGG AGC	61 °C
NtSSU 1	GGC TTC CTC AGT TCT TTC C	46 °C
NtSSU 2	GTA GCC TTC TGG CTT GTA GGC	51 °C

2.8 Gene und Proteine

Alle in dieser Arbeit untersuchten Gene bzw. Proteine sind in Tab. 2.8-1. Wenn verfügbar, ist die „Accession"-Nummer (UniProt und NCBI) der zugehörigen Referenz-Sequenz (Aminosäure- und/oder Nukleotidsequenz) mit angegeben. Die für die Proteine kodierenden vollständigen Sequenzen (cDNA) befinden sich im Anhang.

Tab. 2.8-1: Auflistung aller Gene bzw. Proteine, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Referenzgen	Organismus	„UniProt"	„NCBI"
AQI1	*A. thaliana*	Q8S9L3	NP_568036.2 und NM_119983.2
AtTIP1;1	*A. thaliana*	P25818	NP_181221.1 und NM_129238.3
AtPIP2;2	*A. thaliana*	P43287	NP_181254.1 und NM_129273.4
NtAQI1	*N. tabacum*	-	EB448218.1
NtTIP1;1	*N. tabacum*	Q9ZR68	CAA69353.1 und Y08161.1
NtPIP2;2	*N. tabacum*	-	EB426354.1
ACY1	*H. sapiens*	Q03154	NP_000657.1 und NM_000666.2
hAQP1	*H. sapiens*	P29972	NP_932766 und NM_198098.2
BHRF1	EBV	P03182	YP_401646.1 und DQ_279927.1

2.8.1 Reportergene und -proteine

Alle Gene bzw. Proteine die zu Analysezwecken als Marker, „Silencing Suppressoren" oder in ähnlicher Weise genutzt wurden, sind im Folgenden kurz beschrieben.

2.8.1.1 GFP

Das „green fluorescent protein" (GFP) wurde erstmals 1961 aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* isoliert (SHIMOMURA *et al.*, 1962). Es handelt sich um ein Photoprotein, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Für die Fluoreszenz werden keine Co-Faktoren benötigt. GFP besitzt zwei Absorptionsmaxima (395 nm und 475 nm), aber nur ein Emissionsmaximum (509 nm). Für die Forschung ist GFP von großer Bedeutung, da es anhand der Fluoreszenz möglich ist durch Gen-spezifische Fusionen mit anderen Proteinen deren räumliche und zeitliche Verteilung in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen zu beobachten. Die Primärstruktur des Proteins besteht aus 238 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 26,9 kDa (PRASHER *et al.*, 1992). 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 in basischem pH sogar noch leicht erhöht werden kann (HAUPTS *et al.*, 1998).

2.8.1.2 P19

P19 ist ein 19 kDa großes Protein des Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV). Das Protein ist für die Pathogenität des Virus von großer Bedeutung, da es in den Zell-zu-Zell Transport und in die systemische Verbreitung des Virus in der Wirtspflanze involviert ist. In TBSV-resistenten Pflanzen spielt es eine Rolle als Induktor der hypersensitiven Reaktion (CHU *et al*., 2000; QIU *et al*., 2002; TURINA *et al*., 2003). P19 fungiert außerdem als Suppressor des post-transkriptionalen und Virus-induzierten „gene silencing" (QU & MORRIS, 2002; SILHAVY *et al*., 2002; SZITTYA *et al*., 2003; VOINNET *et al*., 2003). Für Forschungszwecke ist P19 aufgrund dieser Eigenschaft als „Silencing Suppressor" von besonderer Bedeutung. Bei transienter Expression von Transgenen in Pflanzen mittels Agrobakterieninfiltration kann P19 genutzt werden um die Expression des Fremdgens zu gewährleisten, indem der pflanzliche Abwehrmechanismus des „Silencing" verhindert wird.

2.8.1.3 Bax

Bei Bax handelt es sich um ein pro-apoptotisches Protein der Bcl-2 Familie mit einer Größe von 21 kDa (GAJEWSKI & THOMPSON, 1996; REED *et al*., 1997; GROSS *et al*., 1999). Bcl-2 Proteine sind für die Apoptose in Säugern von besonderer Bedeutung, da sie an der Regulation des intrinsischen Signalwegs beteiligt sind. Sie veranlassen die Freilassung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma wodurch die Elektronentransportkette inaktiviert wird und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (BLACKSTONE & 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 eine Caspase-Kaskade in Gang, wodurch es zur Apoptose kommt (GREEN, 1998; ADRAIN & MARTIN, 2001; KAUFMANN & HENGARTNER, 2001).

2.8.1.4 AtBI1

AtBI1 ist ein pflanzliches Homolog des humanen Bax-Inhibitor 1 (BI1), welches aus *A. thaliana* isoliert wurde. Es besitzt wie auch BI1 die Fähigkeit, die letalen Auswirkungen des pro-apoptotischen Proteins Bax (siehe 2.8.1.3) bei heterologer Expression in Hefe (KAWAI *et al*, 1999) und in Pflanzen (KAWAI-YAMADA *et al*., 2001) zu supprimieren. Bei Verwundung oder Pathogenbefall von Pflanzen kommt es zu einem starken Anstieg der Expression von AtBI1. Dies lässt auf eine Beteiligung von AtBI1 an pflanzlichen Reaktionen auf biotischem und abiotischem Stress schließen (SANCHEZ *et al*., 2000).

2.8.1.5 NIMIN1

NIMIN1 (NIM1-INTERACTING 1) ist eines von drei strukturverwandten NIM1 (NPR1) interagierenden Proteinen (WEIGEL *et al*., 2001). Es stellt ein Schlüsselenzym der „systemic acquired resistance“ (SAR) dar. Durch Überexpression von *NIMIN1* wird die Salicylat-abhängige Induktion der *PR-1* („Pathogenesis related protein“ 1) Gene supprimiert, was zu einer Verminderung der SAR in *Arabidopsis* führt (WEIGEL *et al*., 2005). NIMIN1 wirkt also als Repressor von *PR-1* im Zuge einer SAR. Laut neuester Studien ist bei Überexpression von NIMIN1 auch eine Zelltod induzierende Wirkung bekannt (MASROOR, 2013)

2.8.1.6 CAH

Obwohl Cyanamid oder ähnliche Stoffe ursprünglich nicht in der Natur vorkommen, wurde ein Enzym, dass die funktionelle Nitrilgruppe solcher Verbindungen hydratisiert, in verschiedenen Bakterien, Pilzen und in Pflanzen nachgewiesen (CASTRIC *et al*., 1972; ASANO *et al.*, 1982; NAGASAWA *et al*., 1986, 1987, 1988). Das Enzym Cyanamid Hydratase (CAH) wurde 1973 aus dem Bodenpilz *Myrothecium verrucaria* isoliert (STRANSKY & AMBERGER, 1973). In dieser Arbeit wurde das aus der Genbank von *M. verrucaria* isolierte 732 bp große *CAH*-Gen, welches für das Enzym CAH (244 Aminosäuren, 27,7 kDa) codiert, genutzt. Das Enzym CAH kann toxisches Cyanamid in Harnstoff umsetzen, indem es die Hydratisierung der Nitrilgruppe von Cyanamid katalysiert. CAH kann als Markergen bei transgenen Pflanzen fungieren, da die Enzymaktivität von CAH mittels eines einfachen „Assays“ (siehe 3.5.3) nachgewiesen werden kann (MAIER-GREINER *et al*., 1991). Außerdem erhalten transgene Pflanzen durch Einbau des Gens für die Cyanamidhydratase eine Resistenz gegenüber Cyanamid-basierten Herbiziden. Das phytotoxische Cyanamid wird durch das exprimierte Gen zu physiologisch unbedenklichem Harnstoff abgebaut. In Gegenwart des Harnstoff-abbauenden Enzyms Urease, das in vielen Pflanzen vorkommt, kann das Hydrolyseprodukt (NH_4^+) sogar noch als Stickstoffquelle für die Pflanzen dienen (MAIER-GREINER *et al*., 2006).

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Standardmethoden und Nukleinsäuretechniken

3.1.1 Anzucht von *E. coli*

Alle Nährmedien und Stammlösungen zur Anzucht und Kultivierung von Bakterien wurden nach SAMBROOK *et al.* (1989) hergestellt. *Escherichia coli* Bakterien wurden bei ihrer Optimaltemperatur von 37 °C in LB Medium angezogen.

- **LB Flüssigmedium** (autoklavieren)
  10 g Pepton
  5 g Hefeextrakt
  10 g NaCl
  ad. 1 l H_2O
  pH 7,5 (NaOH)

- **Agarplatten**

  Flüssiges LB-Nährmedium wurde mit 1,5 % Micro-Agar autoklaviert. Es wurden 25 ml pro Platte gegossen. Vor dem Gießen der Platten wurden die entspechenden Zusätze und Antibiotika zugegeben.

  Im Falle einer Blau/Weiß-Selektion (siehe 3.1.2.1) wurden pro Agarplatte folgende Zusätze beigemischt:

Tab. 3.1-1: Zusätze in Agarplatten für eine Blau/Weiß-Selektion.

Zusatz	Stammlösung	Agarplatte
IPTG	100 mM in H_2O	40 µM
X-Gal	20 mg/ml in DMFA	40 µg/ml

- **Antibiotika-Konzentrationen für Selektionsmedien**

Tab. 3.1-2: Antibiotika-Konzentrationen für LB-Selektionsmedien.

Antibiotika	Stammlösung	Flüssigmedien	Agarplatten
Ampicillin	50 mg/ml in H_2O	100 µg/ml	50 µg/ml
Gentamycin	50 mg/ml in H_2O	100 µg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml in H_2O	100 µg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H_2O	50 µg/ml	25 µg/ml
Rifampicin	50 mg/ml in DMSO	100 µg/ml	50 µg/ml
Nalidixin	10 mg/ml in H_2O	20 µg/ml	10 µg/ml

3.1.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach INOUE *et al.* (1990).

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen:

- **Tfb I** (steril filtrieren; 0,2 µM)
  30 mM KOAc
  50 mM $MnCl_2$
  100 mM KCl
  10 mM $CaCl_2$
  15 % Glycerin (w/v)

- **Tfb II** (autoklavieren)
  10 mM Na-MOPS (3-(N-morpholino)propanesulphonic acid) pH 7,0
  75 mM $CaCl_2$
  10 mM KCl
  15 % Glycerin (w/v)

Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und mit vorgekühlten Lösungen, Zentrifugenbechern und Pipetten durchgeführt. Von einer Gefrierkultur des gewünschten Bakterienstammes (DH5α, XL1-blue, BL21CodonPlus®) wurde ein Aliquot mittels Dreifelderausstrich auf eine Agarplatte, bestehend aus 25 ml LB/$MgSO_4$ (10 mM) und dem für den Bakterienstamm entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und diese im Brutschrank (Heraeus® Function Line, Typ B12; Heraeus Instruments, Hanau) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine einzelne der gewachsenen Kolonien wurde in 5 ml Flüssigmedium LB/$MgSO_4$ (10 mM), plus entsprechendem Antibiotikum, über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator (GFL 3031; Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) angezogen. Am nächsten Tag wurde die Übernachtkultur in einen 1 l Kolben mit 100 ml LB und dem entsprechenden Antibiotikum überimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Der Kolben wurde für 10 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakterien für 10 min bei 5.300 rpm und 4 °C pelletiert (Biofuge 15R, Heraeus Instruments, Hanau). Der Überstand wurde verworfen und der Bakterienniederschlag in 40 ml Tfb I resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt, wobei nochmals 40 ml Tfb I eingesetzt wurden. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 5 min auf Eis inkubiert und erneut für 10 min bei 5.300 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 8 ml Tfb II resuspendiert und in 100 µl Aliquots durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei - 70 °C gelagert und waren ca. 6 Monate haltbar.

Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Zellen:

Ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (DH5α, XL1-blue, BL21CodonPlus®) wurde auf Eis aufgetaut und anschließend mit 5 - 10 µl eines Ligationsansatzes oder 1 ng DNA versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock im Wasserbad (GFL 1003; Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) für 30 - 45 sec bei 42 °C. Der Transformationsansatz wurde sofort auf Eis transferiert und für weitere 2 min inkubiert. Pro Ansatz wurden 900 µl LB zugegeben und für 60 min bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden für 3 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert (Centrifuge 5415 R; Eppendorf AG, Hamburg), der Überstand abgekippt, die Zellen im Restüberstand resuspendiert und jeweils 100 µl unverdünnt (90% der Zellen) bzw. 1:10 in LB verdünnt (10% der Zellen) auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gepickt und zur Plasmidpräparation (siehe 3.1.3) in einer 5 ml LB-Flüssigkultur angezogen.

3.1.2.1 Blau/Weiß-Selektion von *E. coli* DH5α

Die Blau/Weiß-Selektion wird generell nur dann angewandt, wenn *E. coli* DH5α mit pBluescript (siehe 2.3.2) oder darauf basierenden Vektoren, z.B. dem T-Vektor (siehe 2.3.3) transformiert wurde. Die Selektion beruht auf der Tatsache, dass die MCS dieser Vektoren im Bereich des *lacZ*-Gens liegt, welches für das N-terminale α-Fragment einer IPTG-induzierbaren ß-Galactosidase codiert. Das Fragment komplementiert ein durch das Genom von *E. coli* DH5α codiertes C-terminales α-Fragment der ß-Galactosidase. Die komplementierte ß-Galactosidase spaltet den Indikator 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal), welcher in den speziell hierfür verwendeten Agarplatten vorliegt (siehe 3.1.1), zu einem blauen Farbstoff. Die entsprechende Kolonie erscheint blau und kann als negativ bezüglich des Transformationserfolgs gewertet werden. Wird das α-Peptid des *lacZ*-Gens jedoch durch den Einbau eines Inserts in die MCS unterbrochen, kann es nicht mehr vollständig exprimiert werden. Dadurch bleibt die ß-Galactosidase funktionslos. Die entsprechende Bakterienkolonie erscheint weiß und ist somit positiv bezüglich der Transformation zu werten.

3.1.3 Plasmidpräparation aus *E. coli*

- **Lösung I**
  50 mM Tris/HCl pH 8,0
  10 mM EDTA/NaOH pH 8,0
  100 µg/ml RNase A 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/NaOH pH 8,0

Von einer 5 ml Übernachtkultur des zu untersuchenden Bakterienklons wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden durch 2-minütiges Zentrifugieren bei 12.000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und der Zellniederschlag in 100 µl Lösung I resuspendiert. Es wurden 200 µl Lösung II dazugegeben, vorsichtig durch Invertieren gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl eiskalter Lösung III wurde der Ansatz wieder vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine und genomische *E. coli*-DNA wurden bei 12.000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne Proteinreste mitzunehmen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl RT warmem Isopropanol versetzt und sofort wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der DNA-Niederschlag mit 400 µl kaltem, 70 % Ethanol p.a. durch „Vortexen“ und nochmaliges Zentrifugieren gewaschen. Der DNA-Niederschlag wurde 15 min luftgetrocknet und in 50 µl 1 x TE aufgenommen. Die nach diesem Verfahren aufgereinigte DNA wurde für Analysen mittels Restriktionsendonukleasen verwendet.
Um besonders reine Plasmid-DNA für Klonierungszwecke und zur Sequenzierung zu erhalten, wurde die DNA über Kieselgel-Spin-Säulen des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits (siehe 2.4.1) laut Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Zur Aufreinigung einer Nukleinsäurelösung wurden unerwünschte noch vorhandene Proteine mittels Phenol extrahiert.

Hierzu musste zuerst eine Fällung der Nukleinsäure mit Natrium-Acetat durchgeführt werden.

Reaktionsansatz:
50 µl Nukleinsäurelösung
10 µl Na-Ac (3M)
140 µl H_2O

Um nach einem Restriktionsverdau eine selektive DNA-Fällung zu erreichen und kleine, herausgeschnittene DNA-Fragmente zu entfernen, wurde eine Fällung mit Ammonium-Acetat durchgeführt.

Reaktionsansatz:
20 µl DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau
80 µl Am-Ac (5M)
100 µl H_2O

Die gefällte Nukleinsäurelösung (200 µl) wurde mit 100 µl Phenol in ein Reaktionsgefäß überführt und durch „Vortexen“ gut gemischt. Zur Trennung der wässrigen von der organischen Phase wurde das Gemisch für 2 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Die DNA-enthaltende wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 100 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 800 µl eiskaltem 96 % Ethanol gefällt. Danach wurde für 10 min bei 11.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Sediment für ca. 10 min bei RT luftgetrocknet und dann in 50 µl 1 x TE aufgenommen.

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung zu bestimmen wurde diese zunächst 1:50 mit H_2O verdünnt. Von der Verdünnung wurden 50 µl in eine UVette® (Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Als Referenz dienten 50 µl H_2O. Zur Messung wurde ein Ultrospec 3000 Spektrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) verwendet.

Die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung wird nach folgender Formel berechnet:

Konzentration = [(Absorption λ 260nm) - (Absorption λ 280)] * F * V^{-1}

F (Faktor) [µg/ml] = Faktor 2500 für DNA und 2000 für RNA
V (Verdünnungsstufe) = 1/50

3.1.6 Sequenzspezifische Restriktion von DNA

Plasmid-DNA oder PCR-Produkte wurden durch Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers mit den empfohlenen Puffern verdaut. 0,2 - 2 µg DNA wurden in einem Endvolumen von 20 µl mit jeweils 5 Units Enzym für mindestens 2 h bei der für das Enzym erforderlichen Temperatur inkubiert.

Eine Inaktivierung durch Hitze war nötig, wenn die verdaute DNA im nächsten Schritt nicht über ein Gel aufgetrennt wurde. Die Inaktivierung erfolgte für jedes Enzym nach Angaben des Herstellers.

3.1.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten (Gelelektrophorese)

- **50 x TAE-Puffer**
  242 g Tris
  100 ml 500 mM EDTA/NaOH pH 8,0
  57,1 ml 100 % Essigsäure
  ad. 1 l H_2O

- **6 x „orange loading dye“**
  10 mM Tris/HCl pH 7,6
  0,03 % Xylencyanol FF
  0,15 % Orange G
  60 % Glycerin
  60 mM EDTA/NaOH pH 7,6

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in einem 1 % Agarosegel. Dazu wurde eine entsprechende Menge Agarose (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm) in 1 x TAE-Puffer gegeben und aufgekocht. Zur späteren Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente auf einem Transluminator (UV-Tisch FLUO-LINKTFL-20M; Vilber Lourmat, Torcy, F) wurden 10 µg/ml Ethidiumbromid zu der bis auf etwa 55 °C abgekühlten Agarosegellösung gegeben. Anschließend wurde die Agarosegellösung in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Gelträger in eine Elektrophoresekammer (Easy-Cast^{TM} Electrophoresis System; Owl Scientific, Inc.; Waltham, MA, USA)) eingesetzt und mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die aufzutrennenden Proben wurden 1:6 mit 6 x „orange loading dye“ versetzt und in die Gelkammern des Agarosegels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 bis 120 Volt. Um die Fragmentgrößen der DNA-Banden abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein DNA-Größenstandard (siehe 2.5.1) mit auf das Agarosegel aufgetragen.

3.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um reine DNA-Fragmente definierter Länge für Klonierungszwecke zu erhalten, wurden abgeschlossene Restriktions- bzw. PCR-Ansätze einer Gelelektrophorese unterzogen. Die Isolierung und Aufreinigung der gewünschten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A.^{TM} Gel Extraction Kit (siehe 2.4.2) nach Angaben des Herstellers.

3.1.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Religation von geschnittenen DNA-Fragmenten (z. B. Vektor-DNA) kann durch die Abspaltung ihrer terminalen Phosphatgruppen verhindert werden. Diese Reaktion wird durch das Enzym „shrimp alkaline phosphatase“ (SAP) katalysiert.

Reaktionsansatz:
20 µl DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau
3 µl 10 x SAP-Puffer
1 µl SAP (1u/µl)
6 µl H_2O (*p. a.*)

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der SAP durch Inkubation bei 65 °C für 15 min.

3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten (Insert) mit Plasmid-DNA (Vektor) 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. Das molare Verhältnis zwischen Vektor- und Insert-DNA sollte bei „blunt-end“-Ligationen 1:1 und bei „sticky-end“-Ligationen 1:5 betragen.

Ligationsansatz:
2-5 µl Vektor-DNA
X µl Insert-DNA
2 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer
1 µl T4-DNA-Ligase (5u/µl)
ad. 20 µl H_2O (*p. a.*)

Die Ligation erfolgten über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde der Ligationsansatz direkt in eine *E. coli* Transformation (siehe 3.1.2) eingesetzt.

3.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation definierter DNA-Sequenzen wurde die „polymerase chain reaction" (PCR) nach dem Protokoll von SAIKI *et al.* (1988) und BEJ *et al.* (1991) angewandt. Mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen (z. B. High Fidelity PCR Enzyme Mix und Taq-Polymerasen) und synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (Primern) können bestimmte DNA-Fragmente so stark amplifiziert werden, dass sie im Agarosegel detektierbar sind. Durch Variation der Anlagerungstemperatur („Annealing") der Primer oder der Mg^{2+}-Ionenkonzentration ist eine Beeinflussung der Spezifität der Reaktion möglich.

Alle Ansätze wurden auf Eis in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Thermowell™ Tubes, Corning Inc., UK) pipettiert. Die Reaktionen wurden im programmierbaren Thermocycler (Mastercycler personal Model 5332 bzw. 5333; Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt. Die Amplifikate wurden anschließend über eine Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.7) aufgetrennt und bei Bedarf aus der Gelmatrix eluiert (siehe 3.1.8).

Standard-Reaktionsansatz:
1-100 ng „template" (c)DNA
2 µl 10 x PCR-Puffer (15 mM $MgCl_2$)
2 µl dNTP-Mix (2 mM)
0,5 µl Primer 3´ (10 mM)
0,5 µl Primer 5´ (10 mM)
0,5 µl Taq-Polymerase (5U/µl)
ad. 20 µl H_2O (*p. a.*)

Als Negativkontrolle wurde H_2O (*p. a.*) anstelle von DNA eingesetzt. Eine entsprechende Positivkontrolle wurde wenn möglich ebenfalls angesetzt.

Der Thermocycler wurde mit einem Standard-PCR-Programm mit 34 Zyklen programmiert.

Initiale Denaturierung	94 °C	2:00 min
Denaturierung	94 °C	1:00 min
„Annealing"	*var.* °C	1:00 min
Elongation	72 °C	*var.* min
Finale Elongation	72 °C	10:00 min

Die variablen (*var.*) Angaben für die „Annealing"-Temperatur bzw. für die Dauer der Zweitstrangsynthese (Elongation) sind abhängig von der optimalen Anlagerungstemperatur (o. A.) des Primerpaares (siehe 2.7) bzw. der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes (1 min/1000 Basen).

3.1.11.1 High Fidelity PCR

Um DNA-Sequenzen für Klonierungen zu amplifizieren, wurden die entsprechenden PCR-Reaktionen mit Hilfe des High Fidelity (HF) PCR Enzyme Mix durchgeführt. Dieser Polymerase-Mix besteht aus einer *Taq*-Polymerase und einer *Pfu*-Polymerase, welche eine 3‘ → 5‘ Exonukleaseaktivität besitzt, um Mutationen in den PCR-Produkten zu minimieren. Der High Fidelity PCR Enzyme Mix amplifiziert Genome bis zu 10 kb. Die Genauigkeit dieses Mix (5,2 x 10-6 Fehler pro Nukleotid pro Zyklus) ist 4 Mal höher als die der *Taq*-Polymerase (2,2 x 10-5 Fehler pro Nukleotid pro Zyklus) alleine.
Der Reaktionsansatz entspricht dem Standard-Reaktionsansatz für PCR (siehe 3.1.11), wobei *Taq*-Polymerase und PCR-Puffer durch HF PCR Enzym Mix (5U/µl) und dazugehörigen Puffer ausgetauscht werden. Das Programm im Thermocycler entspricht ebenfalls dem Standard-Programm für PCR (siehe 3.1.11).

3.1.11.2 „Colony Screen“ mittels PCR

Um transformierte Bakterien auf das Vorhandensein des gewünschten Transgens zu testen, kann statt einer Plasmidpräparation mit anschließendem analytischen Restriktionsverdau auch ein „Colony Screen“ mittels PCR durchgeführt werden. Dies geschah vor allem, wenn sehr viele Bakterienkolonien auf Transformationsereignisse überprüft werden sollten, oder bei Transformanten der Gattung *A. tumefaciens*, bei denen eine Plasmidipräparation nur schwer möglich ist. In ein dünnwandiges 0,5 ml PCR Reaktionsgefäß wurden 10 µl H_2O (*p. a.*) vorgelegt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden Einzelkolonien der zu analysierenden Bakterien gepickt. Zur späteren Rückverfolgung der Kolonien wurde eine Masterplatte angelegt, indem auf einer neuen Selektivagarplatte Tochterkolonien der gepickten Kolonien durch leichtes Abstreichen der Pipettenspitze angeimpft und durchnummeriert wurden. Die verbleibenden Bakterien an der Pipettenspitze wurden in dem H_2O des Reaktionsgefäßes resuspendiert. Die Masterplatte mit den Tochterkolonien wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienzellen im Reaktionsgefäß wurden zunächst im PCR Thermocycler aufgeschlossen.

Dauer	Temperatur
5 min	96 °C
90 sec	50 °C
90 sec	96 °C
1 min	45 °C
1 min	96 °C
1 min	40 °C

Die aufgeschlossene Bakteriensuspension wurde als „template DNA“ in einen Standard-PCR-Ansatz eingesetzt (siehe 3.1.11). Als Primerpaar wurden Oligonukleotide aus dem Bereich des Insert-Fragments, des Vektors oder eine Kombination aus beidem verwendet. Die Amplifikate wurden nach der Reaktion mittels Gelelektrophorese (siehe 3.1.7) analysiert. Wenn positive Banden vorhanden waren, konnten die entsprechenden Bakterienkolonien von der Masterplatte in Selektiv-Flüssigmedium angezogen werden.

3.1.12 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Hierzu wurde 1 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl in H_2O (*p. a.*) in einem Reaktionsgefäß eingeschickt. Wenn verfügbar, wurden Primer aus dem Angebot der Firma Eurofins MWG Operon ausgewählt, andernfalls wurden der DNA-Lösung passende Primer (1 µM) aus dem Laborbestand zugefügt.

Die Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe des „Basic Local Alignment Search Tools“ (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) ausgewertet. Gen- bzw. Vektorkarten wurden mit Hilfe des Online Tools „Web Map“ (http://pga.mgh.harvard.edu/web_apps/web_map/start) des Massachusetts General Hospitals (Boston, USA) erstellt.

3.1.13 Herstellung von Stammkulturen (Glycerinkulturen)

Für die Haltbarmachung zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterien- bzw. Hefekulturen wurden 800 µl einer frisch angezogenen Übernacht-Flüssigkultur mit 200 µl sterilem Glycerin vermischt und in einem Kryoreaktionsgefäß bei - 70 °C gelagert.

3.1.14 RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial

Um RNase-freies H_2O zu erhalten, wurde gefiltertes Reinstwasser mit 0,05 % DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert.

Die RNA-Isolation erfolgte mittels TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Hierzu wurden je 100 mg Pflanzenmaterial unmittelbar nach Entfernen von der Pflanze in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Plastik Pistill fein zerrieben. Das Pulver wurde anschließend mit 1 ml TRI Reagent® versetzt und durch „Vortexen“ gut gemischt. Pflanzenreste wurden für 10 min bei 12.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und für 15 sec „gevortext“. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei RT für 15 min mit anschließender Zentrifugation für 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C.

Die so enstehenden 3 Phasen (flüssige, farblose Phase = RNA; Interphase = DNA; organische, rote Phase = Proteine) können bei 2 - 8 °C gelagert werden und bei Bedarf auch zur Isolation von DNA und Proteinen herangezogen werden. Die flüssige RNA Phase wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort mit 0,5 ml Isopropanol gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde erneut für 10 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der RNA-Niederschlag wurde mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und anschließend für 5 – 10 min luftgetrocknet. Danach konnte das Präzipitat in 50 µl DEPC-H_2O aufgenommen und für 10 min bei 55 °C im Heizblock (PEQLAB-Biotechnologie GmbH, 91-D1100; Erlangen) gelöst werden.

3.1.14.1 Reverse Transkription

Um die isolierte RNA (siehe 3.1.14) in eine Reverse Transkriptionsreaktion einsetzen zu können, musste zuerst die Konzentration im Spektrophotometer bestimmt werden (siehe 3.1.5). Anschließend erfolgte eine DNAse Behandlung, wobei 1 µg RNA mit DEPC-H_2O auf 14 µl aufgefüllt und mit 4 µl DNAse I plus 2 µl des zugehörigen DNAse I-Puffers (10 x) für 30 min bei 37 °C inkubiert wurden. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz mit 2 µl EDTA (25 mM) versetzt und zur Inaktivierung der DNase I einem Hitzeschritt für 15 min bei 70 °C unterzogen. Zum Nachweis spezifischer RNA-Transkripte wurde 1 µl der RNA-Lösung in eine Reaktion mit einem Random Hexamer Primer eingesetzt um mit Hilfe von Reverser Transkriptase einen cDNA-Doppelstrang zu synthetisieren.

Reaktionsansatz:
1 µl RNA
1 µl Random Hexamer Primer
10,5 µl DEPC-H_2O
Inkubation für 5 min bei 70 °C, anschließend Abkühlung auf Eis
4 µl Reaktionspuffer für Reverse Transkriptase (5 x)
2 µl dNTP-Mix (2 mM)
0,5 µl RiboLock™ Ribonuklease-Inhibitor
Inkubation für 5 min bei 25 °C
1 µl RevertAidTM M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl)

Der komplette Reaktionsansatz wurde im Thermocycler für 10 min bei 25 °C, dann für 60 min bei 42 °C inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min gestoppt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt. Zum Nachweis eines bestimmten Transkripts wurden 2 µl der fertigen cDNA in einen Standard-PCR Ansatz (siehe 3.1.11) mit sequenzspezifischen Primern (siehe 2.7) eingesetzt. Die restliche cDNA wurde bei - 20 °C eingefroren.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Extraktion von Proteinen aus pflanzlichem Material

- **Natrium-Phosphatpuffer (0,5 M Stammlösung, pH 7,0)**
  Ca. 2/3 Di-Natriumhydrogenphosphat (0,5 M)
  Ca. 1/3 Natriumdihydrogenphosphat (0,5 M)
  Mischverhältnis pH 7,0

- **Lysepuffer**
  50 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,0
  10 mM EDTA
  0.1 % Triton-X 100 (w/v)
  0.1 % Lauroylsarcosinat (w/v)
  10 mM ß-Mercaptoethanol

Um lösliche Proteine zu extrahieren wurde abgewogenes Pflanzenmaterial in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Pflanzenmaterial wurde mit einer definierten Menge (2 µl Puffer pro 1 mg Pflanzenmaterial) Natrium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) durch mörsern mit einem Plastik-Pistill aufgeschlossen. Um lösliche Proteine von Zellwandresten zu trennen, wurden die Proben für 10 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und konnte zum Nachweis von Aminoacylase-Aktivität (siehe 3.2.8), oder zur Detektion von Proteinen mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7) verwendet werden.
Zur Extraktion von Proteinen der Membranfraktion wurden die verbliebenen Zellwandreste zunächst mit 500 µl Natrium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen, um alle restlichen löslichen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial in der selben definierten Menge Lysepuffer nochmals gemörsert, die zuvor in Form von Natrium-Phosphatpuffer zum Einsatz kam (2 µl Puffer pro 1 mg Pflanzenmaterial). Es wurde ebenfalls für 10 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen, welcher jetzt die Membranproteine enthalten sollte. Diese Proteinfraktion konnte nun auch zur Analyse mittels SDS-PAGE herangezogen werden.

3.2.2 Quantitative Proteinbestimmung (Bradford-Test)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von löslichen Proteinextrakten (siehe 3.1.5) erfolgte nach der Methode von Bradford (BRADFORD, 1976). Hierzu wurde Roti®-Nanoquant Lösung (Roth, Karlsruhe) im Verhältnis 1:5 mit H_2O verdünnt, 800 µl in einer Einweg-Plastikküvette vorgelegt und 200 µl des verdünnten Proteinextraktes (1:100 in

H_2O) zugegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurde die optische Dichte bei 590 nm und bei 450 nm im Spektrophotometer bestimmt und anschließend der Quotient OD_{590}/OD_{450} gebildet. Als Referenz diente 1 ml H_2O. Es wurde eine Kalibrierungsgerade mittels definierter Konzentrationen BSA (Bovines Serum Albumin Fraction V; PAA Laboratories GmbH, Linz, AU) inklusive eines Nullwertes erstellt, anhand derer auf die Proteinkonzentrationen der Pflanzenextrakte geschlossen werden konnte.

3.2.3 „Fast protein liquid chromatography“ (FPLC)

- **Kalium-Phosphatpuffer (0,5 M Stammlösung, pH 7,0)**
  Ca. 2/3 Di-Kaliumhydrogenphosphat (0,5 M)
  Ca. 1/3 Kaliumdihydrogenphosphat (0,5 M)
  Mischverhältnis pH 7,0

Um pflanzliche Proteingemische mittels „Fast protein liquid chromatography“ (FPLC) aufreinigen und analysieren zu können, musste zuerst eine größere Menge eines Pflanzenextraktes erzeugt werden. 15 g Blattmaterial wurden in 30 ml Kalium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) in einem Mixer aufgeschlossen und anschließend durch ein Stück Mull filtriert. Der flüssige Durchlauf, ohne Pflanzenrückstände, wurde einer 80 % Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen, um die Proteinkonzentration der Lösung zu erhöhen. Hierzu wurde dem Extrakt Ammoniumsulfat zugefügt (516 mg/ml) und für 15 min vorsichtig auf Eis gerührt. Anschließend wurde für 10 min bei 5.300 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 3 ml Kalium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) aufgenommen und über Nacht gegen Kalium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) dialysiert (siehe 3.2.6.2). Das dialysierte Extrakt wurde nochmals für 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Erfolg der Protein-Aufkonzentration konnte mittels quantitativer Proteinbestimmung (siehe 3.2.2) und Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) überprüft werden. Nun wurden 0,5 ml des aufkonzentrierten Extrakts in die FPLC (LKB FRAC-100; Pharmacia Biosytems, Freiburg) eingesetzt. Als stationäre Phase diente eine Sepharose-Matrix-Säule (Hiload 16/60 Superdex^{TM} 200 prep grade), auf die das Pflanzenextrakt geladen wurde. Danach wurde mit der mobilen Phase, ca. 100 ml Kalium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0), eluiert (1 ml/min) und 95 Fraktionen à 1 ml aufgefangen. Diese Fraktionen enthielten nun die nach Größe aufgetrennten Proteine des pflanzlichen Proteingemisches und konnten für weitere Analysen, wie z.B den Aminoacylase-Aktivitätstest, verwendet werden. Um den Proteinen der einzelnen Fraktionen Größen

zuordnen zu können, wurde die FPLC-Säule mit Rinderalbumin („bovine serum albumin“,BSA) als Größenstandard nach selbigem Verfahren geeicht.

3.2.4 Deglykosylierung von Proteinen

Um pflanzliche Proteine auf das Vorhandensein einer post-translationalen Modifikation durch Glykosylierung zu untersuchen, wurde ein Protein Deglykosylierungs-Mix (P60039S, NEB, Schwalbach; siehe 2.4.4) eingesetzt. Um den deglykosylierenden Enzymen einen besseren Zugang zu den Zuckerresten zu gewährleisten, wurden die Proteine zunächst entfaltet. Hierfür wurden die Proteinextrakte (siehe 3.2.1) 1:5 mit 5 x SDS-Ladepuffer (siehe 3.2.7) und 100 mM DTT versehen und für 10 min bei 100 °C gekocht. Als Kontolle wurde Fetuin verwendet. Alle weiteren Reaktionsschritte wurden nach Angeben des Herstellers durchgeführt. Der Erfolg der Deglykosylierung wurde mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (siehe 3.2.7.1) und Immunodetektion (siehe 3.2.7.2) durchgeführt.

3.2.5 Rekombinante Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Für die heterologe Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppelten Fusionsproteinen wurde der *E. coli* Stamm BL21-CodonPlus® (siehe 2.2.3) mit dem Expressionsvektor pGEX-3X (siehe 2.3.8) transformiert (siehe 3.1.2). Einerseits wurden Bakterien mit dem leeren Plasmid pGEX-3X transformiert (Negativkontrolle), andererseits war in den Expressionsvektor das entsprechende Zielgen für das zu untersuchende Protein eingesetzt. Je 5 ml des LB-Selektionsmediums wurden mit einer Kolonie der Transformanten beimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Aus jeder Übernachtkultur wurden am nächsten Tag 2 Aliquots á 500 µl in je 5 ml frisches LB-Selektionsmedium überimpft und erneut bei 37 °C und 250 rpm angezogen, bis eine OD_{600} von 0,5 erreicht war. Anschließend folgte die Induktion von jeweils einer der beiden übereinstimmenden Kulturen mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches als Induktor des regulierbaren Promotors von pGEX-3x dient. Nach Induktion mit IPTG wird das zu untersuchende Protein, gekoppelt an eine N-terminale GST-Domäne aus *Schistosoma japonicum* exprimiert. Die uninduzierten Kulturen dienten wiederum als Negativkontrollen. Alle Kulturen wurden nun weitere 3 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

3.2.5.1 Extraktion von Proteinen aus *E. coli*

denaturierende Proteinextraktion:

Zur Analyse von Bakterienproben mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7) wurden je 500 µl der Bakterienkulturen bei 12.000 rpm für 3 min abzentrifugiert und das Bakterienpräzipitat in je 80 µl H_2O resuspendiert. Nach Zugabe der entsprechenden Mengen 5 x SDS Loading Buffer und DTT (2M) (siehe 3.2.7) wurden die Ansätze gemischt und für 10 min bei 100 °C gekocht. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 12.000 rpm konnte der Überstand auf SDS-Gele aufgetragen werden.

Native Proteinextraktion:

- **PBS** (steril filtrieren; 0,45 µM)
  140 mM NaCl
  2,7 mM KCl
  10 mM Na_2HPO_4
  1,8 mM KH_2PO_4
  ad. 1 l H_2O
  pH 7,3 (HCl)

Um im speziellen Fall exprimierte GST-NtAQI1-Fusionen auf Aminoacylase-Aktivität überprüfen zu können, mussten die Bakterienzellen unter nativen Bedingungen aufgeschlossen werden. Hierzu wurden ebenfalls 500 µl der Expressionskulturen abzentrifugiert und der Bakterienniederschlag in 1 ml PBS resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 0,1 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid). Die Zellsuspension wurde anschließend dreimal für je 30 sec einer Ultraschallbehandlung mit darauf folgender Inkubation auf Eis unterzogen. Zum weiteren Aufschluss der Zellen folgte die Zugabe von 5 µl Lysozym (10 mg/ml) und eine 30-minütige Inkubation bei RT. Danach wurden 100 µl Triton® X-100 (10%) zugegeben und das Gemisch für 30 min bei 4 °C geschwenkt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 12.000 rpm konnte der Überstand in den Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) eingesetzt werden.

3.2.6 Rekombinante Expression von MBP-Fusionsproteinen in *E coli*

Für die heterologe Expression von Fusionsproteinen, gekoppelt an das aus *E. coli* stammende 42,5 kDa Maltose-Bindeprotein (MBP) wurde der *E. coli* Stamm DH5α (siehe 2.2.3) mit dem Expressionsvektor pMAL-c2X (siehe 2.3.9) transformiert (siehe 3.1.2). Zuvor wurde die entsprechende cDNA des zu untersuchenden Proteins, „downstream“ des *malE* Gens in das Expressionsplasmid eingebracht. Es wurde zuerst eine IPTG induzierte Probeexpression in 5 ml Kulturen durchgeführt, wie unter 3.2.5 beschrieben. Wurde diese

mittels SDS-PAGE als positiv analysiert, konnte eine Großexpressionskultur angesetzt und das Fusionsprotein daraus isoliert werden. Hierfür wurde eine 5 ml Übernachtkultur in 200 ml frisches LB-Selektionsmedium überimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Als Negativkontrolle wurde 1 ml der uninduzierten Kultur abgenommen (-). Anschließend wurde auch hier die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Expressionskultur für weitere 2 h inkubiert. Als Positivkontrolle für den Erfolg der Induktion wurde auch hier 1 ml abgenommen (+). Die Bakterien wurden für 20 min bei 4.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Bakterienniederschlag gewogen und dann bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C eingefroren.

3.2.6.1 Reinigung von MBP-Fusionproteinen aus *E. coli* (Affinitäts-chromatographie)

- **Lysepuffer:**
  10 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,2)
  100 mM NaCl
  10 mM EDTA
  10 mM EGTA
  10 mM ß-Mercaptoethanol

- **Säulenpuffer:**
  20 mM Tris/HCl (pH 7,4)
  0,2 M NaCl
  1 mM EDTA
  1 mM DTT

Die Aufreinigung von großen Mengen MBP-gekoppeltem Fusionsprotein aus bakteriellen Extrakten erfolgte durch Säulen-Affinitätschromatographie über eine Amylose Matrix (Amylose Resin High Flow E80225; NEB, Schwalbach), wobei man sich die Affinität des MBP gegenüber Maltose zu Nutze macht.
Die eingefrorenen Bakterien der Großexpression (siehe 3.2.6) wurden lysiert, indem pro Gramm Bakterienzellen 3 ml Lysepuffer, 4 µl PMSF (100 mM) und 80 µl Lysozym (10mg/ml) zugegeben und die Suspension für 20 min bei RT geschwenkt wurde. Anschließend wurde das Gemisch auf 0,25 % Tween eingestellt. Störende DNA-Reste wurden durch Zugabe von DNAse I (200 µg pro Gramm Bakterienzellen) und Inkubation für 30 min bei RT abgebaut. Das Lysat wurde für 30 min bei 9.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden unter Eiskühlung durchgeführt. Der Überstand, der die gelösten Proteine enthält, wurde abgenommen, auf 0,2 M NaCl

eingestellt und mit Säulenpuffer im Verhältnis 1:6 verdünnt. In der Zwischenzeit wurde eine Chromatographiesäule (GSTrap^{TM} FF Columns; GE Healthcare Europe GmbH, München) vorbereitet. Die Säule wurde mit 2 ml Amylose Säulenmaterial beladen und anschließend mit 10 ml H_20 und 10 ml Säulenpuffer gewaschen.

Nachdem die Säule vorbereitet war, wurde sie mit dem eisgekühlten Proteinextrakt beladen. Zuvor wurde jedoch ein Aliquot á 1 ml als Kontrolle entnommen (P1). Vom Durchfluss wurde ebenfalls ein Aliquot á 1 ml als Kontrolle aufgefangen (P2). Dann wurde zweimal mit je 10 ml Säulenpuffer gewaschen. Auch von diesem Durchlauf wurde eine 1 ml Probe aufgefangen (P3). Die Elution des Fusionsproteins aus der Säulenmatrix erfolgte mit 5 ml Elutionspuffer (Säulenpuffer + 10 mM Maltose). Daraus resultierten 5 Fraktionen à 1 ml (E1 - E5), welche bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gekühlt wurden. Zur denaturierenden Entfernung aller noch vorhandener Reste aus der Matrix folgte eine letzte Elution mit 6 ml Guanidin-Hydrochlorid (6 M), wobei der komplette Durchlauf aufgefangen wurde (GH).

Nach erfolgter Elution des Fusionsproteins wurde die Säule mit 6 ml 0,1 % SDS und 2 ml H_2O gereinigt. In 20 % Ethanol konnte die Matrix bei 4 °C aufbewahrt und wiederverwendet werden.

3.2.6.2 Dialyse und Aufkonzentration gereinigter Fusionsproteine

Um die chromatographisch aufgereinigten Proteine für die Produktion von spezifischen Antikörpern (Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg) nutzen zu können, mussten die Eluate rückstandslos und mit einer Proteinkonzentration von 0,4 - 1 mg/ml vorliegen.

Hierzu erfolgte zunächst eine Dialyse der vereinten Proteineluate gegen Natrium-Phosphatpuffer. Ein Dialyseschlauch ausreichender Länge wurde für 1 h in H_2O eingeweicht. Anschließend wurden die Eluate vereint in den Schlauch gefüllt, dieser mit Klammern verschlossen und in 2 l Natrium-Phosphatpuffer (50 mM; pH 7,0) auf einem Magnetrührer bei 4 °C für 3 - 4 h dialysiert. Danach wurde der Puffer erneuert und die Dialyse bei 4 °C über Nacht fortgesetzt.

Um die Proteinkonzentration zu erhöhen wurde das dialysierte Eluat im Dialyseschlauch in einen mit PEG 6000 gefüllten Behälter gelegt und bei 4 °C inkubiert, bis sich die Flüssigkeitsmenge auf 1 ml reduziert hatte. Nun konnte die Konzentration der Proteine bestimmt und eine geeignete Menge zur Antikörperproduktion zu Davids Biotechnologie GmbH nach Regensburg versendet werden.

3.2.6.3 Spektralanalyse aufgereinigter Fusionsproteine

Eine grobe Abschätzung der aufgereinigten Proteinmengen erhält man durch eine spektrophotometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm, da aromatische Aminosäurereste in diesem Bereich absorbieren. Die Messergebnisse wurden mit der Software GENtle (http://gentle.magnusmanske.de) unter Berücksichtigung des Molekulargewichts, dem Anteil der aromatischen Aminosäuren und der Schichtdicke der UVette® (Eppendorf AG, Hamburg) ausgewertet. Der berechnete Wert ist nur annähernd genau, reicht aber aus um eine grobe Einschätzung der Konzentration zu erhalten.

3.2.7 Detektion extrahierter Proteine mittels SDS-PAGE

- **Lösung I**
  18,3 g Tris
  115 µl TEMED
  ad. 100 ml H_2O
  pH 8,9 (HCl)

- **Lösung III**
  6,1 g Tris
  230 µl TEMED
  ad. 100 ml H_2O
  pH 6,8 (HCl)

- **Acrylamidlösung**
  Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1; Roth, Karlsruhe)

- **1 x Elektrophorese-Puffer**
  3 g Tris
  14,4 g Glycin
  1 g SDS
  ad. 1 l H_2O

Proteine aus zuvor angefertigten pflanzlichen oder bakteriellen Proteinextrakten (siehe 3.2.1 und 3.2.5.1) wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) aufgetrennt. In der diskontinuierlichen SDS-PAGE, welche das am häufigsten angewandte Verfahren zur Auftrennung von denaturierten Proteinen darstellt, werden zwei verschiedene Polyacrylamidgele mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichem pH-Wert vorbereitet. Im Sammelgel, welches einen neutralen pH-Wert besitzt, werden die Proteine aufkonzentriert und anschließend durch den basischen pH-Wert im Trenngel aufgetrennt.

Um die Acrylamidgele zu gießen wurden folgende Lösungen frisch angesetzt:

- **Trenngel (15 %)**
  3,5 ml Gel 30
  1,75 ml Lösung I
  70 µl 10 % SDS
  1,68 ml H_2O
  175 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat)

- **Sammelgel**
  470 µl Gel 30
  875 µl Lösung III
  35 µl 10 % SDS
  2,12 ml H_2O
  87,5 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat)

Unmittelbar nach Zugabe der APS-Lösung wurde das Gel gegossen, da APS als Katalysator für die Polymerisation des Acrylamids wirkt. Eine Glasplatte und eine Aluminiumoxidplatte, die durch Abstandhalter von 1 mm Dicke getrennt waren, wurden in eine spezielle Halterung (Multiple Gel Caster; Amersham Biosciences, Freiburg) eingespannt. Das Trenngel wurde zuerst zwischen die Platten gegossen und vorsichtig mit 1 ml H_2O überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das H_2O mit einem Papiertuch abgesaugt, ein Probenkamm eingefügt und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet. Der Kamm wurde nach Polymerisation des Sammelgels entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer (Mighty Small II SE 250; Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) eingespannt und mit 1 x Elektrophorese-Puffer versetzt.
Die aufzutrennenden Proteinproben mussten für die Elektrophorese zunächst mittels SDS maskiert und denaturiert werden.

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

Hierzu wurden sie mit 5 x SDS-Ladepuffer (Verhältnis 5:1) und DTT (Endkonzentration: 100 mM) versetzt. Dieses Gemisch wurde zur Denaturierung der Proteine für 10 min bei 100 °C gekocht und anschließend für 3 min bei 12.000 rpm zentrifugiert.
Es wurden je 10 - 20 µl der vorbereiteten Proben in die Taschen des Gels aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei ca. 120 V für 1 - 2 h.

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden die Gele entweder mit einer Coomassie-Färbelösung (siehe 3.2.7.1) angefärbt, oder zum spezifischen Nachweis von Proteinen in eine Immunodetektion (siehe 3.2.7.2) eingesetzt.

3.2.7.1 Anfärben von Proteingelen mit Coomassie-Färbelösung

- **Coomassie-Färbelösung**
  2,5 g Coomassie Brillant Blue (R-250; Serva, Heidelberg)
  450 ml H_2O
  100 ml Essigsäure
  450 ml Methanol

- **Schnellentfärber**
  430 ml H_2O
  70 ml Essigsäure
  500 ml Methanol

Nach erfolgter SDS-PAGE (siehe 3.2.7) wurde das Sammelgel vollständig abgetrennt und das Trenngel über Nacht, unter leichtem Schütteln, in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 1 h in Schnellentfärber teilweise entfärbt und danach über Nacht in 5% Essigsäure inkubiert, um das restliche Coomassie Brillant Blue aus den nicht-proteinhaltigen Bereichen des Gels zu entfernen. Zur Dokumentation wurde das Gel mit einer digitalen Kamera fotografiert oder am Computer eingescannt.

3.2.7.2 Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)

Um Proteine spezifisch nachweisen zu können, wurden diese nach Auftrennung mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7) auf eine Nitrocellulosemembran (porablot NCP; Macherey-Nagel, Düren) transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert, wobei die sekundären Antikörper an eine Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt waren. Der Protein-Antikörper-Komplex konnte somit durch die Peroxidaseaktivität der HRP mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden.

<u>Proteintransfer:</u>

- **Western Blot Puffer**
  5,45 g Tris
  25,9 g Glycin
  ad. 1620 ml H_2O
  180 ml Methanol

Für den Proteintransfer wurde das Sammelgel vollständig abgetrennt.

Mit dem Trenngel und der Nitrocellulosemembran wurde in einer mit Western-Blot Puffer gefüllten Kunststoffkammer folgende Anordnung aufgebaut:

Lochplatte am Minuspol (schwarz)
Schwammtuch
2 Schichten Rotilabo®-Blottingpapier (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Nitrocellulosemembran
2 Schichten Rotilabo®-Blottingpapier (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Schwammtuch
Lochplatte am Pluspol (rot)

Diese Anordnung wurde in einen Criterion™ Blotter (Wet/Tank-Blot System; Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gegeben und dieser mit Western-Blot Puffer aufgefüllt. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 1 A für 45 min auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

Immunodetektion:

- **TBS**
  20 mM Tris/HCl (pH 7,5)
  500 mM NaCl

- **TTBS**
  0,5 ml Tween 20
  ad. 1 l TBS

- **Blockierungslösung**
  5% Magermilchpulver (Fluka, CH) in TTBS

- **Solution A**
  0,1 M Tris/HCl (pH 8,6)
  250 mg/l Luminol

- **Solution B**
  11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO

- **ECL-Detektionssreagenz (für eine Membran, 9 x 6 cm)**
  2 ml Solution A
  0,6 µl 30% H_2O_2
  200 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 (GFL 3012; Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz mit TTBS abgespült, mit 2 - 5 ml des

primären Antikörpers in Blockierungslösung (Konzentrationen eingesetzter Antikörper siehe 2.6.1) eingeschweißt und für 90 min bei RT auf einem Rollenmischer (ELMI Shaker S4; Riga, LV) hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran 3 x für 10 min mit TTBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran für weitere 60 min in 5 ml einer Antikörperlösung, welche den spezifischen sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper (siehe 2.6.2) enthielt. Danach wurde erneut dreimal für 10 min mit TTBS und dreimal für 10 min mit TBS gewaschen. Die Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte durch Nachweis der Peroxidaseaktivität mittels einer auf Luminol basierenden Chemilumineszenzreaktion. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran für 2 min in frisch angesetztem ECL-Detektionsreagenz inkubiert. Danach wurde sie in Klarsichtfolie verpackt und ein Autoradiographiefilm (Fuji Medical X-Ray Film, Super RX; FUJIFILM GmbH Europe, Düsseldorf) aufgelegt. Der Röntgenfilm wurde je nach Stärke der Reaktion für wenige Sekunden bis zu einer Stunde exponiert und anschließend durch je 2-minütiges Eintauchen in Entwickler- und Fixiererlösungen (Carestream® Kodak® processing chemicals for autoradiography films; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) entwickelt.

Nach erfolgreicher Immunodetektion wurden die transferierten Proteine mit dem roten Azofarbstoff Ponceau S angefärbt, um eine Ladekontrolle zu erhalten. Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran für 20 min in einer Ponceau S Färbelösung (0,1 % in 5 % Essigsäure) inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und zur Wiederverwendung aufbewahrt. Reste vom Farbstoff wurden durch mehrmaliges Schwenken in H_2O entfernt. Sichtbare Proteinbanden konnten nun zur Dokumentation fotografiert werden.

3.2.8 Aminoacylase-Aktivitätstest („Ninhydrin-Assay“)

Dieser „Assay“ basiert auf der von Aminoacylasen katalysierten Hydrolyse N-acetylierter Aminosäuren zu Ac(et)ylgruppe und freier Aminosäure.

Die zu testenden Proteinextrakte (siehe 3.2.1 und 3.2.5.1) wurden in einen „Ninhydrin-Assay“ zum Nachweis freier Aminogruppen eingesetzt. Als Substrat wurde N-Acetyl-L-Methionin verwendet. Bei Vorhandensein aktiver Aminoacylase im Extrakt reagiert Ninhydrin mit den frei gewordenen primären Aminogruppe des Substrats unter H_2O-Abspaltung zu einer Schiffschen Base. Nach Decarboxylierung der Aminosäure und anschließender Abspaltung des Amino-Restes entsteht Amino-Ninhydrin, welches wiederum mit Ninhydrin zu einem violetten Farbstoff (Ruhemanns Purpur) dimerisiert. Die Reaktion ist mit einer Nachweisgrenze von 0,001 - 0,1 mg relativ empfindlich. Die Intensität der Farbe ist der Konzentration des Farbstoffes und somit der Konzentration des umgesetzten hydrolysierten Substrats proportional (EBEL UND ROTH, 1987).

Zur Durchführung des „Ninhydrin-Assays“ wurden die Proteinextrakte zusammen mit dem Substrat für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Reaktionsansatz:
10 mM Substrat (N-Acetyl-L-Methionin)
50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,0)
40 µl pflanzliches Proteinextrakt bzw. 50 µl Bakterienlysat
ad. 200 µl H_2O

Als Referenz wurde ein Ansatz mit H_2O anstelle von Proteinextrakt erstellt. Als Kontrollen wurden durch Kochen denaturierte Proteinextrakte und Ansätze ohne Substratzugabe eingesetzt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch 5-minütiges Erhitzen der Proben auf 90 °C. Anschließend wurden 100 µl der gekochten Proben mit 700 µl Natrium-Phosphatpuffer (50 mM; pH 7,0) und 200 µl Ninhydrin (1% in H_2O) versetzt und nochmals für 15 min auf 90 °C erhitzt. Der gegebenenfalls entstandene violette Farbstoff konnte nun bei einer Wellenlänge von 570 nm im Photometer gemessen werden. Zur quantitativen Analyse wurden die OD_{570}-Werte der gemessenen Proben mit einer Eichgerade verglichen, die anhand bekannter Konzentrationen L-Methionin erstellt wurde. Anhand der ermittelten Menge umgesetzten Substrats und unter Berücksichtigung der Gesamtproteinmenge des eingesetzten Extrakts konnte die spezifische Enzymaktivität berechnet werden.

3.3 Experimente mit *Saccharomyces cerevisiae*

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

3.3.1 Kultivierung von Hefezellen

3.3.1.1 Kultivierung von Hefe in Vollmedium

- **YPAD-Medium** (autoklavieren)
  20 g Pepton/Trypton
  5 g Hefeextrakt
  40 mg Adenin
  ad. 950 ml H_2O
  pH 6,0 (mit H_2SO_4)

Für Festmedium wurden 15 g Agar pro 1 l Medium zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml einer sterilen 40 % Glucose-Lösung pro 1 l Medium zugefügt. Hefezellen wurden stets bei ihrer Optimaltemperatur von 30 °C im Vollmedium YPAD kultiviert, wobei Flüssigkulturen bei 250 rpm geschüttelt wurden.

3.3.1.2 Kultivierung von Hefe in Selektionsmedium

- **SD-Medium** (autoklavieren)
  1,7 g YNB (Hefegrundmedium)
  5 g $(NH_4)_2SO_4$
  ad. 910 ml H_2O
  pH 5,9 (NaOH)

Für Festmedium wurden 15 g Agar pro 1 l Medium zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden je 10 ml der entsprechenden 100 x Aminosäure/Nukleinbasen-Lösungen sowie 50 ml einer sterilen 40 % Glucose-Lösung pro 1 l Medium zugefügt. Die Konzentrationen der unterschiedlichen Stocklösungen sind nachfolgend angegeben. Alle Stocklösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µM) und bei 4 °C gelagert.

Tab. 3.3-1: Konzentrationen der 100 x Aminosäure „Drop-in-Lösungen" für SD-Selektionsmedien.

100 x Aminosäure „Drop-in-Lösungen"	
L-Histidin/Monohydratchlorid	2 g/l
L-Adenin Hemisulfat	2 g/l
L-Uracil	2 g/l
L-Tryptophan	2 g/l
L-Leucin	10 g/l

Zur Selektion nach Transformation von Hefezellen wurde das SD-Minimalmedium unter Zugabe der entsprechenden „Drop-in-Lösung" verwendet. Durch die Kombination der essentiellen Lösungen kann die Selektionskraft des Minimalmediums bestimmt werden. Dem liegt zugrunde, dass der verwendete Hefestamm NMY51 (siehe 2.2.4) auxotroph für bestimmte essentielle Stoffwechselkomponenten ist. Er kann auf Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan, Histidin, Adenin und Uracil nicht wachsen. Die zur Transformation verwendeten Plasmide (siehe 2.3) enthalten Gene, welche die Auxotrophie von NMY51 gegenüber bestimmten Aminosäuren komplementieren können. Um zu selektieren führt man dem SD-Medium alle essentiellen Aminosäure- und Nukleinbasen-Lösungen zu, mit Ausnahme der vom Plasmid komplementierbaren Aminosäure. So können nur die plasmidtragenden Hefen im Selektionsmedium wachsen. Zur Deklaration der

Selektionsmedien wurden die Anfangsbuchstaben der Aminosäuren angegeben und mit einem Minus versehen, welche dem Medium nicht zugefügt wurden. Im Falle von SD-Medium ohne Tryptophan und Leucin wäre dies SD/-L,T. Diese Komplementation von auxotrophen Markern in *S. cerevisiae* entspricht der Selektion auf Antibiotikaresistenz in *E. coli*.

- **SD/3-AT-Medium**

Um im Split-Ubiquitin System (siehe 3.3.3) die Interaktion zweier Proteine zu analysieren und zu verifizieren, wurde dem auf 55 °C abgekühlten SD-Festmedium außer Glucose und der entsprechenden „Drop-in-Lösung", sterilfiltriertes (0,2 µM) 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) zugefügt. Mit einer 1 M Stocklösung wurden Endkonzentrationen von 1 - 20 mM 3-AT erzielt und daraus Selektionsplatten gegossen. 3-AT wirkt als Hemmstoff des Genproduktes von *HIS3*, welches ein Enzym im Histidin-Biosyntheseweg darstellt und als Reportergen im Split-Ubiquitin System dient. Somit wird durch Zugabe von 3-AT der Selektionsdruck erhöht.

3.3.2 Transformation von Hefezellen

Um Plasmide in Hefezellen zu transformieren, wurde nach dem Protokoll von DOHMEN *et al*. (1991) vorgegangen.

Herstellung kompetenter Hefezellen:

- **Lösung A** (autoklavieren, Lagerung bei - 20 °C)
  10 mM Bicine
  1 M Sorbitol
  3 % Ethylenglycol (v/v)
  pH 8,35 (KOH)

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde eine 5 ml Übernachtkultur in YPAD-Medium herangezogen. Die Kultur wurde bei 3.000 rpm für 10 min abzentrifugiert und der Zellniederschlag in 500 µl des Überstandes resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurde eine 100 ml YPAD-Kultur inokuliert und bei 30 °C und 250 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3.000 rpm geerntet und in 20 ml Lösung A gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden sie in 2 ml Lösung A resuspendiert und in 100 µl Aliquots zuerst bei - 20 °C in einem Styroporbehälter eingefroren und dann bei - 70 °C gelagert. Die Zellen konnten mehrere Monate gelagert werden ohne einen wesentlichen Verlust ihrer Kompetenz.

Transformation von Hefezellen:

- **Lösung B** (autoklavieren)
  200 mM Bicine
  40 % Polyethylenglycol 1000 (w/v)
  pH 8,35 (KOH)
- **Lösung C** (autoklavieren)
  10 mM Bicine
  150 mM NaCl
  pH 8,35 (KOH)

Zur Transformation der kompetenten Hefezellen wurde 0,1 - 1 µg Plasmid-DNA mit 50 µg einer Träger-DNA (Lachssperma-DNA, 2 mg/ml) gemischt und auf ein 100 µl Aliquot der gefrorenen, kompetenten Hefezellen pipettiert. Nach dem Auftauen der Hefezellen bei 37 °C für 3 min wurde 1 ml Lösung B zugegeben, gemischt und 1 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 12.000 rpm für 30 sec geerntet und in 800 µl Lösung C gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden sie in 100 µl Lösung C resuspendiert und auf einer SD-Selektionsplatte mit geeigneter „Drop-in-Lösung“ (siehe 3.3.1.2) ausplattiert, um den Transformationserfolg zu überprüfen. Nach 3 Tagen konnten die transformierten Kolonien für weitere Versuche verwendet werden.

3.3.3 Protein-Protein Interaktion im Split-Ubiquitin System

Um Proteininteraktionen im Hefesystem zu analysieren wurde das Split-Ubiquitin System (DUALmembrane kit 3; Dualsystems Biotech, Zürich, CH) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein speziell für Membranproteine entwickeltes Hefezweihybridsystem. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass die interagierenden Membranproteine nicht selbst in den Zellkern gelangen müssen um dort bestimmte Reportergene zu aktivieren, da ein Transkriptionsfaktor diese Aufgabe erfüllen kann.

Mittels der „bait“- und „prey“-Vektoren des Systems (siehe 2.3.4 - 2.3.7) werden die zu untersuchenden Proteine als Fusionen mit einer C-terminalen (Cub) bzw. einer mutierten N-terminalen (NubG) Hälfte von Ubiquitin in Hefe exprimiert (siehe Abb. 3.3-1). Cub ist außerdem mit einem Transkriptionsfaktor (LV), bestehend aus einer DNA-Bindedomäne LexA und einer Aktivierungsdomäne VP16, verbunden. Kommt es zur Interaktion der beiden Proteine lagern sich die Ubiquitinhälften zum sogenannten Split-Ubiquitin zusammen. Dieser Komplex wird von Ubiquitin-spezifischen Proteasen (UBPs) erkannt, woraufhin der Transkriptionsfaktor abgespalten wird.

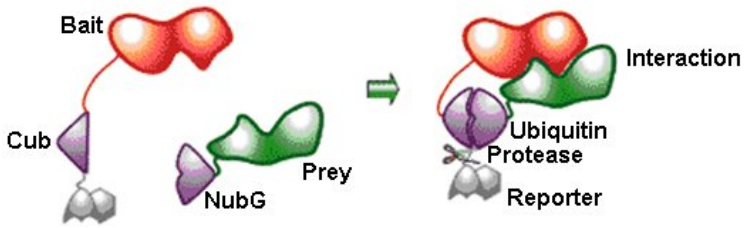


Abb. 3.3.-1: Interaktion von „bait"-Protein und „prey"-Protein im Split-Ubiquitin Hefezweihybrid-system (www.dualsystems.com).

Der Transkriptionsfaktor wandert in den Zellkern, bindet an den *LexA* Operator der DNA und aktiviert die Transkription der Reportergene *HIS3* bzw. *lacZ*.

3.3.3.1 Qualitativer Test einer Protein-Protein Interaktion

Mit Hilfe des *HIS3* Reportergens lässt sich eine Proteininteraktion im Hefe-System qualitativ bestimmen, indem man co-exprimierende Hefen auf Selektionsmedien anzieht und deren Wachstum analysiert. Die zu untersuchenden Proteine mussten hierfür zuerst in die entsprechenden „bait"- und „prey"-Vektoren (DUALmembrane kit 3; Dualsystems Biotech, Zürich, CH) (siehe 2.3.4 - 2.3.7) kloniert und gemeinsam in den Hefestamm NMY51 (siehe 2.2.4) co-transformiert werden. Anschließend wurden 5 ml Flüssigkulturen in entsprechendem SD-Selektionsmedium über Nacht angezogen. Beim Erreichen einer OD_{600} von > 1,0 wurden die Kulturen mit sterilem H_2O auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt. Diese Verdünnungen wurden in 3 µl Aliquots auf SD- bzw. SD/3-AT-Selektionsplatten (siehe 3.3.1.2) aufgetropft, welchen außer den vom Plasmid kodierten Aminosäuren auch noch Histidin fehlt. Histidin wird bei erfolgreicher Interaktion durch Aktivierung des Reportergens *HIS3* verfügbar gemacht. Nach 3-tägiger Inkubation bei 30 °C konnte das Wachstum der Hefen analysiert werden.

3.3.3.2 Quantitativer Test einer Protein-Protein Interaktion

- **Z-Puffer** (autoklavieren)
  60 mM Na_2HPO_4 x 7 H_2O
  40 mM Na_2HPO_4 x H_2O
  10 mM KCl
  1 mM $MgSO_4$
  pH 7,0 (mit NaOH)

Mit Hilfe des *lacZ* Reportergens lässt sich ein quantitativer Test der Interaktion zweier Proteine im Hefe-System durchführen. Dies beruht darauf, dass die Aktivität des von *lacZ* codierten Enzyms β-Galaktosidase 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 Übernachtkultur co-transformierter Hefen, wie schon beim qualitativen Interaktionstest beschrieben (siehe 3.3.3.1), in SD-Selektionsmedium bis zu einer OD_{600} von 1,0 - 1,5 kultiviert. Mit 1 ml dieser Kultur wurde zunächst die OD_{600} bestimmt. Anschließend wurden 700 µl abgenommen und für 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Zur Lyse der Hefezellen wurde der Zellniederschlag in 100 µl Z-Puffer resuspendiert und für 1 min in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Zellen anschließend im Wasserbad bei 37 °C wieder aufzutauen. Dieses Vorgehen wurde dreimal wiederholt. Danach wurden 700 µl Z-Puffer/β-Mercaptoethanol (2,7 ml β-Mercaptoethanol/1 l Z-Puffer) zugegeben. Ein Ansatz ohne Hefezellen wurde parallel als Nullprobe angesetzt. Nach Zugabe von 160 µl frisch angesetzter ONPG-Lösung (4mg/ml) wurden die Reaktionsansätze bei 30 °C und 250 rpm inkubiert und der Startzeitpunkt vermerkt. Bei Expression des Reportergens *lacZ* wird das Substrat ONPG durch die β-Galaktosidase in ein gelbes Endprodukt umgesetzt. Nach wenigen Minuten bis zu 2 Stunden kann die Farbreaktion durch Zugabe von 400 µl Na_2CO_3-Lösung (1 M) abgestoppt werden. Der Zeitpunkt des Abstoppens der Reaktion musste auch vermerkt werden. Nach 5-minütiger Zentrifugation der abgestoppten Reaktionen bei 12.000 rpm wurde die OD_{420} des gelb gefärbten Überstandes bestimmt.
Die Enzymaktivität der β-Galaktosidase berechnet sich wie folgt (MILLER, 1972):

Miller – Einheiten	=	**$1000 \times OD_{420} / (t \times V \times OD_{600})$**
t	=	Reaktionszeit/Zeit der Inkubation (min)
V	=	700 µl (Volumen der verwendeten Zellsuspension)
OD_{600}	=	Zelldichte der verwendeten Übernachtkultur

3.3.4 Hefewachstum unter H_2O_2-Einfluss

Um die Auswirkung verschiedener heterolog exprimierter Proteine bzw. Protein-Kombinationen auf die Sensitivität von Hefezellen gegenüber H_2O_2 zu untersuchen, wurden zunächst Hefezellen (NMY51, siehe 2.2.4) mit den entsprechenden Protein-Vektorkonstrukten transformiert (siehe 3.3.2). Hierzu wurden die Vektoren bzw. Protein-Vektorkonstrukte des Split-Ubiquitin-Systems verwendet (siehe 2.3.4 und 2.3.6). Es mussten immer ein „bait"-Vektor und ein „prey"-Vektor co-transformiert werden. Bei alleiniger Expression eines Proteins wurde das entsprechenden Protein-Vektorkonstrukt (z. B. „bait"-Vektor pBT3-C:NtTIP1;1) mit dem zugehörigen leeren Vektor ohne eingebrachtes Transgen (z. B. „prey"-Vektor pPR3-N) transformiert. Bei der Expression von Protein-Kombinationen wurden die beiden entsprechenden Protein-Vektorkonstrukte (z. B. pBT3-C:NtTIP1;1 und pPR3-N:NtAQI1) co-transformiert. Als Kontrolle wurden

Hefezellen mit beiden leeren Vektoren (pBT3-C und pPR3-N) co-transformiert. Die Transformanten wurden für 2-3 Tage in selektivem SD-Flüssigmedium angezogen (siehe 3.3.1.2). Anschließend wurden die Kulturen einheitlich in einem Volumen von 5 ml frischem SD-Flüssigmedium auf eine OD_{600} von 0,008 verdünnt. Pro Transformationsansatz wurden 6 Verdünnungen angesetzt, wobei dreimal 2 mM H_2O_2 zugefügt wurde. Diese Flüssigkulturen wurden nun für 3 Tage bei 30 °C und 250 rpm inkubiert, wobei in regelmäßigen Abständen die OD_{600} bestimmt wurde, um das Wachstum der Hefen unter H_2O_2-Einfluss vergleichend zu analysieren.

3.4 Oozyten-Expressionssystem (*Xenopus laevis*)

Das *Xenopus laevis* Expressionssystem nach LUDEWIG (2004) und MAYER *et al.* (2006) bietet die Möglichkeit, die Funktion von Transportproteinen oder Poren durch heterologe Expression in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) zu charakterisieren. Im speziellen Fall der Expressionsanalyse von Wasserkanalproteinen (Aquaporinen) kann ein „Schwell-Assay“ eingesetzt werden. Dieser basiert darauf, dass Aquaporin-exprimierende Oozyten unter osmotischem Druck anschwellen, da durch die Überexpression von Wasserkanälen mehr Transportmöglichkeiten für Wassermoleküle durch die Zellmembran vorhanden sind. Somit kann mehr Wasser pro Zeiteinheit in Richtung des osmotischen Gefälles in die Oozyten einströmen. Die Volumenzunahme der Oozyten über einen definierten Zeitraum lässt sich experimentell bestimmen. Dies macht es möglich mittels Vergleichsanalysen die eingebrachten Transportproteine bezüglich ihrer Funktion und Transportfähigkeit zu untersuchen.
Der gesamte Versuchsablauf wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ludewig und Dr. Neuhäuser des Instituts für Kulturpflanzenwissenschaften, Fg. Ernährungsphysiologie der Kulturpflanze (340 h), Universität Hohenheim, durchgeführt.

3.4.1 Plasmid Midi-Präparation & *In vitro* Transkription

Die kodierende cDNA für die zu untersuchenden Proteine, wurde mittels *E. coli* DH5α in den Expressionsvektor pOO2 kloniert (siehe 2.3.10). Um Plasmid-DNA in einer möglichst hohen Konzentration in die *in vitro* Transkription einsetzen zu können, wurde diese zuerst mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit (siehe 2.4.3) aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt. Im nächsten Schritt erfolgte die Linearisierung der Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *MluI*, welches im Expressionsvektor pOO2 eine singuläre Schnittstelle an Position 1314 aufweist. Mit der vollständig linearisierten DNA

erfolgten nacheinander ein ProteinaseK Verdau (200 ng/µl), eine Phenol/Chloroform Aufreinigung und eine Präzipitation mit anschließender Konzentrationsbestimmung der DNA. Die *in vitro* Transkription des linearisierten Plasmids erfolgte im Anschluss unter Verwendung des Ambion® mMESSAGE mMACHINE® High Yield Capped RNA Transcription SP6 Kits (siehe 2.4.3). Das verwendete Kit enthält ein Cap-Analogon ($m^7G(5')ppp(5')G$), welches aufgrund seiner Struktur ausschließlich an erster Stelle des 5´-terminalen Guanins des Transkripts eingegliedert wird, um die gebildete mRNA vor Abbau durch 5´-Exonukleasen zu schützen. Die Konzentration der mit Hilfe von SP6-RNA-Polymerase synthetisierten RNA wurde abschließend mittels SYBR Green bestimmt.

3.4.2 Operative Oozyten-Entnahme

- **ND96 (- Ca)**
  82,5 mM NaCl
  2 mM KCl
  1 mM $MgCl_2$
  5 mM HEPES/NaOH (pH 7,4)

Die Oozyten eines weiblichen erwachsenen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) wurden mittels eines chirurgischen Eingriffs gewonnen. Die gesamte Operation fand unter sterilen Bedingungen statt. Zu Beginn erfolgte die Betäubung des Frosches mit dem Narkosemittel Tricaine (0,03 %) mittels Tauchbadnarkose. Um die Oozyten zu gewinnen musste die Bauchhöhle im Bereich der Leistengegend geöffnet werden. Hierzu wurden die äußere Hautschicht, sowie die inneren Haut- und Fettschichten, mit einem ca. 4 mm großen Schnitt aufgetrennt. Die Ovarien konnten mit Hilfe einer Pinzette durch den Schnitt herausgezogen werden, bis die gewünschte Anzahl an Oozyten erreicht war (nie mehr als 400 Stück). Die gewonnenen Oozyten wurden auf Eis in vorgekühlter ND96 (- Ca) Lösung bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Nun wurden zuerst die inneren Hautschichten mit selbstauflösendem Operationsgarn und mindestens 2 Stichen vernäht. Anschließend wurde die äußere Hautschicht mit nicht-auflösendem Garn und 2 - 4 Stichen verschlossen. Nach vollendeter Operation wurde der Frosch gründlich unter fließendem Wasser abgespült und danach bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins in eine Box, gefüllt mit Leitungswasser, gesetzt. Aufgrund gesetzlicher Vorschriften dürfen chirurgische Eingriffe nur von speziell geschulten Personen durchgeführt werden.
Dies wurde von Herrn Dr. Neuhäuser, Institut für Kulturwissenschaften, Fg. Ernährungsphysiologie der Kulturpflanze (340 h), Universität Hohenheim, übernommen.

3.4.3 Oozyten-Präparation

- **ND96**
  96 mM NaCl
  2 mM KCl
  1 mM $MgCl_2$
  1,8 mM $CaCl_2$
  2,5 mM Na-Pyruvat
  5 mM HEPES/NaOH (pH 7,4)

- **Kollagenase-Lösung**
  10 mg Kollagenase (type IA)
  5 mg Trypsin-Inhibitor (TypIII-0)
  ad. 5 ml ND96 (- Ca)

Die gewonnenen Oozyten mussten zum weiteren Gebrauch mit Kollagenase (2 mg/ml) und Trypsin-Inhibitor (1 mg/ml) für 60 - 90 min bei RT defollikuliert werden. Anschließend wurden die Oozyten in Petrischalen überführt und 5 - 6 Waschschritten mit ND96-Lösung, versetzt mit 0,1 % BSA, unterzogen. Währenddessen wurden unbrauchbare Oozyten aussortiert. Als unbrauchbar galten solche, die entweder eine ungleichmäßige Form aufwiesen, geplatzt waren, oder bei denen kein vollständiger Kollagenaseverdau stattgefunden hatte. Die sortierten Oozyten wurden in ND96 bei 4 °C über Nacht gelagert.

3.4.4 RNA-Mikroinjektion

Jede zu injizierende RNA wurde zuerst auf eine Konzentration von 500 ng/µl mit RNase freiem H_2O verdünnt. Bei Co-Injektion zweier verschiedener RNA-Konstrukte, wurden die Verdünnungen zu gleichen Teilen gemischt. Anschließend wurden 3 µl der RNA-Lösung in eine sehr feine Glaskapillare, welche zuvor mit Öl gefüllt wurde, aufgezogen. Hierbei durften keine Luftblasen erzeugt werden. Die Oozyten wurden auf einem feinen Nylon-Gitter platziert um ein Verrutschen während der Injektion zu vermeiden. Unter Verwendung eines Mikromanipulators wurden die Oozyten einzeln, unter einem Stereomikroskop, mit je 50 nl RNA-Lösung (= 25 ng RNA) injiziert. Als Kontrolle wurden Oozyten mit der gleiche Menge H_2O injiziert. Die injizierten Oozyten wurden in ND96-Lösung für 2 - 3 Tage bei 16 °C inkubiert, um optimale Bedingungen für die Expression der Proteine zu gewährleisten.

3.4.5 „Schwell-Assay“

Nach Expression der Proteine erfolgte zunächst eine erneute Selektion der Oozyten unter dem Stereomikroskop (Leica MZ-Series; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar), wobei alle geplatzten Oozyten aussortiert wurden. Nur Oozyten die noch ihre natürliche

runde Form und Farbe besaßen, wurden in den „Schwell-Assay“ eingesetzt. Hierfür wurden sie aus ihrer Aufbewahrungslösung ND96 (200 mosm) in eine hypoosmolare Lösung (50% ND96, 100 mosm) überführt. Das Schwellen der Oozyten wurde dann unter mikroskopischer Kontrolle (Zeiss Stemi 2000-C Stereomikroskop mit Axio Cam MRm und Durchlichteinheit S mit Lichtleiter 1500, 8/1000 mm; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) beobachtet und in definierten Zeitabschnitten dokumentiert (1 Bild/min). Für die Aufnahme dieser Bilderserien wurde das Programm Axio Vision Special Edition 64 Bit (Version 4.8.3 SP1) der Firma Zeiss verwendet. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ wurde dann zuerst die Graustufen-Färbung der Oozyten-Aufnahmen in schwarz-weiß konvertiert, um dann die Oozytenfläche in Pixeln zu berechnen. Die ermittelten Werte wurden zur weiteren Auswertung in Excel übertragen.

3.5 Experimente mit Pflanzen

3.5.1 Aufzucht und Kultur von Pflanzen

Die Aufzucht von nicht transgenen Pflanzen (siehe 2.2.1) erfolgte im Gewächshaus, mit mindestens 16 h natürlicher oder künstlicher Belichtung pro Tag, bei Temperaturen zwischen 22 °C und 28 °C. Die Samen wurden auf feuchter Einheitserde (Typ P, 05216; Patzer GmbH, Sinntal-Jossa) in Pikierschalen ausgelegt und zur Keimung sofort ins Licht gestellt. Nach dem Auskeimen wurden die Pflänzchen in Einzeltöpfe mit gedämpfter Erde umgetopft.

3.5.1.1 Selektion transgener Samen

- **½ MS-Medium** (autoklavieren)
  2,15 g MS-Salze (Murashige & Skoog, Basal Salt Mixture; Duchefa, NL)
  10 g D(+)-Saccharose
  6 g Phytoagar (Duchefa, NL)
  ad. 1 l H_2O
  pH 5,7 (KOH)

Bei der Aufzucht transgener Tabakpflanzen (siehe 2.2.1.1) war es möglich, anhand einer eingebrachten Kanamycin-Resistenz, eine Vorselektion der transgenen Samen durchzuführen, um später auch sicher nur transgene Pflanzen anzuziehen. Die Selektion mittels Antibiotika ist bei Pflanzen aufgrund der Antibiotika-sensitiven Chloroplasten möglich. Die Samen mussten zunächst sterilisiert werden. Hierzu wurden sie für 30 sec in 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in 5 % Natrium-Dichlorisocyanurat Dihydrat

für 20 min inkubiert. Danach wurden sie dreimal mit sterilem H_2O gewaschen. Nun wurden die Samen auf sterilem ½ MS-Medium mit Kanamycin (400 µg/ml) ausgelegt und zur Stratifikation für 2 Tage bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie in einen Klimaschrank überführt und bis zur Keimung bei 24 °C und 16 h künstlicher Belichtung pro Tag angezogen. Die Keimlinge konnten dann im Gewächshaus pikiert und wie unter 3.5.1 beschrieben in Erde kultiviert werden.

3.5.1.2 Untersuchung des Hypokotyl Streckungswachstums von Keimlingen

Die Samen der zu untersuchenden Pflanzen wurden auf Filterpapier mit unterschiedlichem Wasserangebot (750 µl, 1000 µl, 1500 µl) ausgelegt. Um die Keimung zu synchronisieren wurden die ausgelegten Samen zuerst für 3 Tage im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Danach folgte die Initialisierung der Keimung durch 6-stündigen Lichteinfluss. Anschließend wurden die Samen wieder für 5 Tage im Dunkeln inkubiert, jedoch bei normalen Temperaturen (Tag/Nacht Rhythmus 22 °C/18 °C). An Tag 5 wurde die Länge der gewachsenen Hypokotyle gemessen.
Der gesamte Versuchsablauf wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ludewig und Dr. Neuhäuser des Instituts für Kulturpflanzenwissenschaften, Fg. Ernährungsphysiologie der Kulturpflanze (340 h), Universität Hohenheim, durchgeführt

3.5.2 Agrobakterien-vermittelte Transformation von Pflanzenzellen

Um Genkonstrukte transient *in planta* exprimieren zu können, mussten diese zunächst in den binären Vektor pTAK35S (siehe 2.3.11) kloniert und zur Analyse in *E. coli* transformiert (siehe 3.1.2) werden. Anschließend wurde die aus *E. coli* aufgereinigte (siehe 3.1.3) Plasmid-DNA per Elektroporation in *Agrobacterium tumefaciens* (siehe 2.2.3) eingebracht. Durch Infiltration der transformierten Agrobakterien in Blätter von *N. benthamiana,* wurden die Fremdgene in das Pflanzengenom integriert und von der Pflanze exprimiert.

3.5.2.1 Anzucht von Agrobakterienkulturen

Agrobakterien wurden bei ihrer Optimaltemperatur von 30 °C in Minimalmedium (1x Min-A) kultiviert.

- **5 x Min-A Salze** (autoklavieren)
  52,5 g K_2HPO_4
  22,5 g KH_2PO_4
  5 g $(NH_4)_2SO_4$
  2,5 g Tri-Natriumcitrat (x 2 H_2O)
  ad. 1 l H_2O

1 x Min-A Flüssigmedium
20 ml 5 x Min-A Salze (autoklaviert)
100 µl 20 % $MgSO_4$ (steril filtriert)
1 ml 20 % Glukose (steril filtriert)
ad. 100 ml H_2O (autoklaviert)

- **Min-A Agarplatten**

  Flüssiges 1 x Min-A-Medium wurde vor Zugabe von Glukose und $MgSO_4$ mit 1,5 % Micro-Agar versetzt und autoklaviert. Erst unmittelbar vor dem Gießen der Platten wurden die entspechenden Antibiotika, Glucose und $MgSO_4$ zugegeben. Rifampicin wurde immer benötigt, die anderen Antibiotika je nach Agrobakterienstamm und enthaltenem Plasmid. Es wurden 25 ml pro Platte gegossen.

- **Antibiotika-Konzentrationen für Selektionsmedien**

Tab. 3.5-1: Antibiotika-Konzentrationen für Min-A-Selektionsmedien.

Antibiotika	Stammlösung	Flüssigmedien	Agarplatten
Gentamycin	50 mg/ml in H_2O	100 µg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml in H_2O	100 µg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H_2O	50 µg/ml	25 µg/ml
Rifampicin	50 mg/ml in DMSO	100 µg/ml	50 µg/ml

3.5.2.2 Transformation von *A. tumefaciens* durch Elektroporation

Die Elektroporation wurde nach MERSEREAU *et al.* (1990) durchgeführt.

Herstellung elektrokompetenter Agrobakterienzellen:

Mit dem Agrobakterienstamm GV3101 (siehe 2.3.1) wurde eine 50 ml Min-A-Flüssigkultur (Rifampicin, 100 µg/ml) angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min bei 5.300 rpm und 4 °C abzentrifugiert und in 50 ml eiskaltem, sterilem H_2O resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Bakterien in 1 ml Glycerinlösung (10 %) aufgenommen und in Aliquots von 50 µl in vorgekühlte Reaktionsgefäße pipettiert. Durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff wurden die elektrokompetenten Zellen schockgefroren und bis zum Gebrauch bei - 70 °C gelagert.

Elektroporation:

Die Elektroporation wurde mit einem Gene Pulser™ und Pulse Controller (Bio-Rad, München) durchgeführt. Ein Aliquot (50 µl) der elektrokompetenten Agrobakterienzellen wurde auf Eis aufgetaut und zusammen mit 200 ng Plasmid-DNA in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm; Bio-Rad, München) pipettiert. Die Elektro-

poration erfolgte bei 2,0 kV mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Zeitkonstante von 4 - 5 ms. Unmittelbar nach dem elektrischen Impuls wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium ohne jeglichen Zusatz von Antibiotika aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Regeneration der Zellen erfolgte für 2 h bei 30 °C und 225 rpm. Anschließend wurden 10 % bzw. 90 % der transformierten Zellen auf Min-A-Selektivagarplatten ausplattiert und im Wärmeschrank bei 30 °C für 2 - 3 Tage inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden anschließend per „Colony Screen“ (siehe 3.1.11.2) auf die Anwesenheit des binären Vektors mit enthaltenem Transgen überprüft. Mit positiven Kolonien wurden Glycerin-Stammkulturen erzeugt (siehe 3.1.13).

3.5.2.3 Agrobakterien-Infiltration von *N. benthamiana*

- **Infiltrationspuffer** (steril filtrieren; 0,2 µM)
  10 mM $MgCl_2$
  100 µM Acetosyringon in 70 % Ethanol

Zunächst wurden die Agrobakterienstämme mit den entsprechenden Plasmiden aus Glycerin-Stammkulturen auf Min-A-Selektivagarplatten ausplattiert und für 2 - 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Gewachsene Einzelkolonien wurden in 5 ml selektives Min-A-Flüssigmedium überführt und ebenfalls für 2 Tage bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurde von jeder Bakterienkultur die OD_{600} gemessen und die Bakterien für 10 min bei 5.300 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Um eine einheitliche OD_{600} von 0,7 zu erhalten, wurden alle Bakterienkulturen in der entsprechenden Menge Infiltrationspuffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden für 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturen entsprechend der gewünschten Co-Expression so zusammengemischt, dass im Endvolumen der Infiltrationslösung immer die gleiche Konzentration an Agrobakterien eines Konstrukts vorlag. Um immer dasselbe Endvolumen zu erreichen, wurde mit Infiltrationspuffer aufgefüllt. Agrobakterienkulturen die mit dem Gen für den „Silencing Suppressor“ P19 transformiert waren, wurden immer beigemischt. Die fertig gemischten Infiltrationskulturen wurden in 1 ml Spritzen (ohne Kanüle) aufgezogen und in Blätter von *N. benthamiana* infiltriert. Hierzu wurde die Spritze im rechten Winkel an der Blattunterseite angesetzt und mit dem Finger ein leichter Gegendruck erzeugt, um die Lösung ohne Luftblasen vorsichtig infiltrieren zu können. Die Pflanzen wurden für eine Woche im Gewächshaus kultiviert und anschließend analysiert. Die sichtbare Expression des Reportergens GFP konnte schon nach 3 - 4 Tagen detektiert werden.

3.5.3 „Cyanamidhydratase-Assay“

Das Enzym Cyanamidhydratase (CAH) (siehe 2.8.1.6) wurde als Marker verwendet, um die Expression von transgenen CAH-Fusionsproteinen nachweisen zu können. Hierzu wurde die CAH-Enzymaktivität in transgenen Tabakpflanzen oder nach Agrobakterieninfiltration von CAH-Fusionsproteinen gemessen. Der hier verwendete „Assay“ beruht darauf, dass CAH das Substrat Cyanamid in Harnstoff umsetzen kann (MAIER-GREINER *et al*., 1991). Nicht gespaltenes Cyanamid bildet mit Pentacyanoamineferroat einen eisenhaltigen violetten Komplex, welcher photometrisch nachgewiesen werden kann. Dies bedeutet je mehr CAH-Aktivität, desto mehr Cyanamid kann in der Probe umgesetzt werden und je niedriger ist die gemessene Absorption.

Aus 50 mg der zu untersuchenden Pflanzenproben wurden Proteinextrakte mit 100 µl Natrium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) hergestellt (siehe 3.2.1). Nach Zentrifugation enthielt der Überstand alle löslichen Proteine. Um auch die Membranproteinfraktion erfassen zu können, wurden die abzentrifugierten Pflanzenreste ebenfalls in den folgenden „Assay“ eingesetzt. 100 µl des Proteinextraktes, bzw. die abzentrifugierten Pflanzenreste versetzt mit 100 µl H_2O, wurden mit 2 µl Cyanamid (1 M) bei 37 °C für 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden gekochte Proteinextrakte verwendet. Anschließend konnte das durch die Cyanamidhydratase umgesetzte Cyanamid quantitativ bestimmt werden. Hierfür wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

60 µl Protein-Ansatz (nach 24 h Inkubation mit Cyanamid)
400 µl Na_2CO_3 (0,2 M)
50 µl 4 % Pentacyanoamineferroat
490 µl H_2O

Als Nullwert wurde in den Ansatz 60 µl Natrium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) statt Proteinextrakt eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 10 min bei RT im Dunkeln. Anschließend wurde die Absorption bei 530 nm im Photometer gemessen. Die Absorptionsabnahme, im Vergleich zur Negativkontrolle, konnte mit der CAH-Aktivität gleichgesetzt werden.

3.5.4 Visualisierung von H_2O_2 in pflanzlichem Gewebe (DAB-Färbung)

Um H_2O_2 in Blättern sichtbar zu machen, wurden diese mit einer 3,3‘-Diaminobenzidinlösung (DAB) behandelt. Hierzu wurde DAB in Tris-Acetatpuffer (50 mM, pH 5,0) gelöst (0,5 mg/ml) und die Blätter über Nacht bei RT darin inkubiert. DAB wird durch H_2O_2, welches vor allem bei biotischem und abiotischem Stress in Pflanzengewebe akkumuliert, zu einem braunen unlöslichen Farbstoff oxidiert.

Anschließend folgte die Entfärbung mittels Ethanol/Aceton (4:1), wobei die Entfärbelösung mehrmals gewechselt wurde, bis das Chlorophyll der Blätter völlig entfernt und nur noch das braune unlösliche Präzipitat zu sehen war.

3.5.5 Visualisierung von Zelltod in pflanzlichem Gewebe (Trypanblau-Färbung)

- **Trypanblau-Färbelösung**
  30 ml Ethanol
  10 ml Phenol
  10 ml H_2O
  10 ml Glycerin
  10 ml Milchsäure
  10 mg Trypanblau

- **Entfärbelösung**
  Chloralhydrat in H_2O (2,5 g/ml)

Um tote Zellen in nekrotischem Blattgewebe sichtbar zu machen, wurden Blätter mit Trypanblau angefärbt. Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen. Nur abgestorbene, perforierte Zellen nehmen den Farbstoff auf und werden dadurch dunkelblau angefärbt. Die Blätter wurden in Trypanblau-Färbelösung eingelegt und für 10 min bei 100 °C gekocht. Anschließend wurde für 3 min bei RT inkubiert, die Färbelösung entnommen und durch Entfärbelösung ersetzt. Es wurde nochmals für 3 min bei 100 °C gekocht. Die Entfärbelösung wurde mehrmals gewechselt, bis das Blatt völlig entfärbt und nur noch die toten, blau angefärbten Zellen zu sehen waren.

3.5.6 Virus-Inokulation von Pflanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Viren (siehe 2.2.2) sind mechanisch übertragbar. Dies bedeutet, dass die Viren über verletzte Epidermiszellen in die Pflanze eindringen können. Um dies zu gewährleisten, wurde eine kleine Menge Graphitschleifstaub (Carborund) auf ein einzelnes Blatt gestreut und 50 µl (bei Infektion von *N. tabacum* und *S. alba*) bzw. 10 µl (bei Infektion von *A. thaliana*) einer Virussuspension (1:50 bzw. 1:10) in Tris/HCl, 50 mM, pH 7,5) dazu pipettiert. Dieses Gemisch wurde vorsichtig mit dem Finger in das Blatt eingerieben. Carborund bewirkte hierbei eine leichte Verletzung der Blattepidermis, wodurch die Viren leichter ins Blatt gelangen konnten. Als Kontrolle (mock) wurden 50 µl virusfreies Tris/HCl (50 mM, pH 7,5) nach gleichem Verfahren inokuliert. Nach ca. 1 Woche konnten die Symptome der Virusinfektion analysiert werden.

3.5.7 Behandlung von Pflanzen mit Pelargonsäure

Um die Reaktion von Pflanzen auf chemisch erzeugten Zelltod analysieren zu können, wurden Tabakpflanzen mit Pelargonsäure behandelt. Pelargonsäure ist eine Fettsäure aus Pelargonien, die als nicht-selektives Kontaktherbizid in der Unkrautbekämpfung eingesetzt wird. Sie dringt in die Membran der Pflanzenzellen ein und zerstört diese, wodurch es zur Ausbildung von nekrotischem Gewebe kommt. Um dies für Versuchszwecke zu nutzen, wurde Finalsan® Konzentrat (W. Neudorff GmbH KG, Emmerthal) 1:10 mit H_2O verdünnt und 50 µl pro Blatt eingerieben. Nachdem die Nekrose deutlich zu erkennen war, konnten die Blätter analysiert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Interaktion von AQI1 mit Aquaporinen im Split-Ubiquitin-System

In vorangegangenen Arbeiten (ROTH, 2003; HOCH, 2011) konnte gezeigt werden, dass bestimmte pflanzliche Aquaporine als H_2O_2-Kanäle fungieren können und durch diese Eigenschaft eine Schlüsselrolle bei der Zelltodregulation spielen. Das Aminoacylase 1-homologe Protein AQUAPORIN INTERACTOR 1 (AQI1) aus *Arabidopsis* wurde als Interaktionspartner und somit potentieller Regulator dieser Aquaporine isoliert (HOCH, 2011). Im Folgenden wurde unter Zuhilfenahme des Split-Ubiquitin-Systems (siehe 3.3.3) die Protein-Protein-Interaktion verschiedener pflanzlicher Aquaporine mit Aminoacylasen bzw. Aminoacylase-homologen Proteinen aus *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana* und *Homo sapiens* näher charakterisiert.

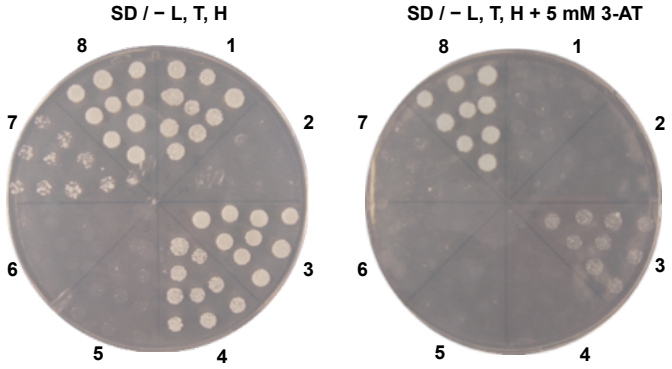
4.1.1 Interaktion von AQI1 aus *A. thaliana* mit Aquaporinen

Um die zelluläre Interaktion des *Arabidopsis* Proteins AQI1 mit den Aquaporinen TIP1;1 und PIP2;2 aus Tabak und *Arabidopsis* und dem humanen AQUAPORIN 1 (hAQP1) in Hefe zu untersuchen, wurde die Deletionsmutante AQI1Δ1-94 verwendet. Diese Mutante zeichnet sich durch das Fehlen der Aminosäuren 1 - 94 aus und wurde in dieser Form bei einem vorrangegangenen cDNA-Screening mit Aquaporinen isoliert (HOCH, 2011). Daher kann von einer Irrelevanz des N-Terminus bei der Protein-Protein Interaktion von AQI1 mit Aquaporinen ausgegangen werden. Da AQI1Δ1-94 aus der von Dualsystems bezogenen *A. thaliana* cDNA-Bank stammt, liegt der Klon im „prey"-Vektor pDSL-Nx (siehe 2.3.7) vor. Bei Expression in Hefe entsteht eine Fusion von AQI1Δ1-94 mit der N-terminalen Hälfte von Ubiquitin (NubG), die vom „prey"-Vektor codiert wird. Die Aquaporine wurden für die Interaktionsstudien in den „bait" Vektor pBT3-N (siehe 2.3.5) kloniert. Im „bait"-Vektor entstehen Fusionen der Proteine mit einer C-terminalen Hälfte des Ubiquitins (Cub) und einem Transkriptionsfaktor aus LexA und VP16 (LV). Als Positivkontrolle (+) wurde die Interaktion von BHRF1 (pPR3-N:BHRF1; siehe 2.3.6) mit PIP2;2 aus Tabak (pBT3-N:PIP2;2, siehe 2.3.5; pBT3-C:PIP2;2, siehe 2.3.4) dargestellt, da diese schon mehrfach mit zuverlässiger Stärke bewiesen wurde (MAST, 2000; HOCH, 2011). Als Negativkontrolle (-) wurde die Interaktion von AQI1Δ1-94 mit dem leeren „bait"-Vektor überprüft, wobei der Transkriptionsfaktor (LV) des Vektors pBT3-N zuvor entfernt werden musste, da es sonst zu fälschlicherweise positiv deutbarem Hefewachstum kommt (HOCH, 2011).

Qualitative Interaktionsstudien (siehe Abb. 4.1-1):

Ein qualitativer Test der Protein-Protein Interaktion zwischen AQI1 und den Aquaporinen wurde unter Verwendung des im Hefestamm NMY51 vorliegenden *HIS3*-Reportergens durchgeführt (siehe 3.3.3.1).

Es konnte eine deutliche Interaktion des *Arabidopsis* Proteins AQI1Δ1-94 mit den *Arabidopsis* Aquaporinen AtTIP1;1 und AtPIP2;2 festgestellt werden (siehe Abb. 4.1-1, Sektor 3 + 4). Auch NtTIP1;1 aus Tabak zeigte Interaktion mit AQI1Δ1-94 (siehe Abb. 4.1-1, Sektor 1), wohingegen NtPIP2;2 nicht mit AQI1Δ1-94 interagierte (siehe Abb. 4.1-1, Sektor 2). Die Positivkontrolle wurde in zwei Varianten verwendet (siehe Abb. 4.1-1, Sektor 7 + 8), wobei die im „bait"-Vektor codierte Ubiquitinhälfte mit Transkriptionsfaktor (CubLV) einmal C-terminal und einmal N-terminal an NtPIP2;2 fusioniert war. Hierbei zeigte sich, dass die C-terminale Fusion in diesem Falle die Interaktion begünstigt. Daher wurde in folgenden Interaktionstests nur noch diese Variante als Positivkontrolle (+) verwendet.



	NubG Fusion		CubLV Fusion	
1:	NubG-AQI1(Δ1-94)	//	CubLV-NtTIP1;1	
2:	NubG-AQI1(Δ1-94)	//	CubLV-NtPIP2;2	
3:	NubG-AQI1(Δ1-94)	//	CubLV-AtTIP1;1	
4:	NubG-AQI1(Δ1-94)	//	CubLV-AtPIP2;2	
5:	NubG-AQI1(Δ1-94)	//	CubLV-hAQP1	
6:	NubG-AQI1(Δ1-94)	//	Cub-Vektor	**(−)**
7:	NubG-BHRF1	//	CubLV-NtPIP2;2	**(+)**
8:	NubG-BHRF1	//	NtPIP2;2-CubLV	**(+)**

Abb. 4.1-1: Interaktionsanalyse von NubG-AQI1(Δ1-94) Fusionsproteinen mit CubLV-Aquaporin-fusionen im Hefe Split-Ubiquitin-System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens. Um die Interaktion zu verifizieren wurden Konzentrationen von 0 und 5 mM 3-AT eingesetzt. Die Interaktion von BHRF1 mit NtPIP2;2 diente als positive Kontrolle (+). Als negative Kontrolle (-) wurde NubG-AQI1(Δ1-94) mit dem leeren „bait"-Vektor ohne Transkriptionsfaktor kombiniert.

Quantitative Interaktionsstudien (siehe Abb. 4.1-2):

Um die Stärke der Protein-Protein Interaktionen auch quantifizieren zu können, wurde das *lacZ*-Reportergen des verwendeten Hefestammes NMY51 zu Hilfe genommen (siehe 3.3.3.2).

Die Quantifizierung des Interaktionstests (siehe Abb. 4.1-2) entsprach dem Ergebnis des qualitativen Tests (siehe Abb. 4.1-1). Die Interaktion von AQI1Δ1-94 mit AtTIP1;1, AtPIP2;2 und NtTIP1;1 konnte auch hier nachgewiesen werden. Laut der quantitativen Interaktionsstudien ließ sich sogar eine geringe Wechselwirkung zwischen dem humanen AQP1 und AQI1Δ1-94 messen.

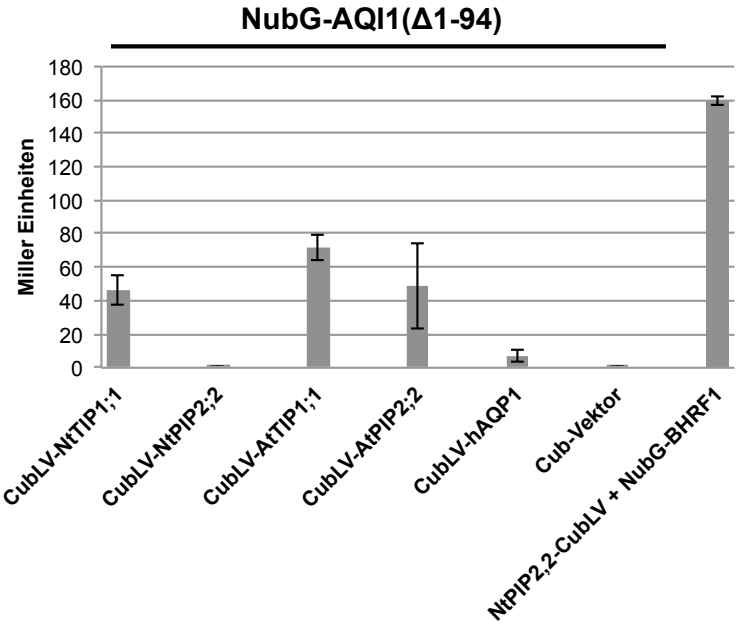


Abb. 4.1-2: Darstellung der Interaktionsstärke von NubG-AQI1(Δ1-94) Fusionsproteinen mit CubLV-Aquaporinfusionen im Hefe Split-Ubiquitin-System unter Verwendung des *lacZ*-Reportergens. Die Interaktion von BHRF1 mit NtPIP2;2 diente als positive Kontrolle (+). Als negative Kontrolle (-) wurde NubG-AQI1(Δ1-94) mit dem leeren „bait"-Vektor ohne Transkriptionsfaktor kombiniert. (n = 3)

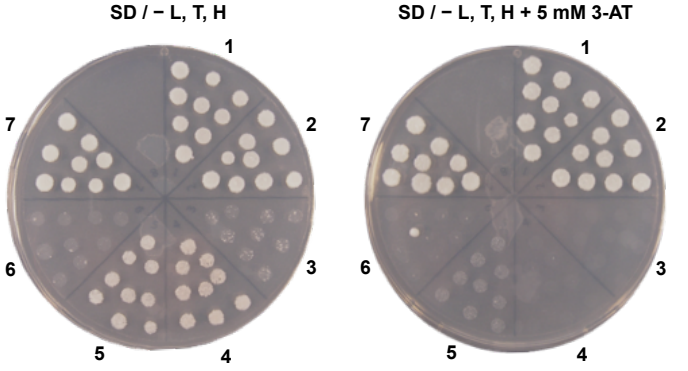
4.1.2 Interaktion von NtAQI1 aus *N. tabacum* mit Aquaporinen

Um die zelluläre Interaktion des Tabak Proteins NtAQI1 mit den Aquaporinen TIP1;1 und PIP2;2 aus Tabak und *Arabidopsis* und dem humanen AQUAPORIN 1 in Hefe zu untersuchen, wurde das Volllängenprotein NtAQI1, welches aus einer *N. tabacum* cDNA-Bank (pAD-GAL4-2.1; ZWICKER *et al*., 2007) amplifiziert wurde, verwendet. NtAQI1 lag im „prey"-Vektor pPR3-N vor (siehe 2.3.6). Die Aquaporine lagen im „bait" Vektor pBT3-C (siehe 2.3.4) vor. Als Positivkontrolle (+) wurde wie bei 4.1.1 die Interaktion von BHRF1 mit PIP2;2 aus Tabak dargestellt. Als Negativkontrolle (-) wurde die Interaktion von NtAQI1 mit dem leeren „bait"-Vektor pBT3-C (siehe 2.3.4) überprüft.

Qualitative Interaktionsstudien (siehe Abb. 4.1-3):

Ein qualitativer Test der Protein-Protein Interaktion zwischen NtAQI1 und den Aquaporinen wurde unter Verwendung des im Hefestamm NMY51 vorliegenden *HIS3*-Reportergens durchgeführt (siehe 3.3.3.1).

Es konnte eine deutliche Interaktion des Tabak Proteins NtAQI1 mit den Tabak Aquaporinen NtTIP1;1 und NtPIP2;2 festgestellt werden (siehe Abb. 4.1-3, Sektor 1 + 2). Auch die Interaktion von NtAQI1 mit dem artfremden Aquaporin AtPIP2;2 ließ sich nachweisen (siehe Abb. 4.1-3, Sektor 4). Ebenso konnte im qualitativen Interaktionstests eine Wechselwirkung zwischen dem humanen AQP1 und NtAQI1 gezeigt werden (siehe Abb. 4.1-3, Sektor 5).



	NubG Fusion		CubLV Fusion	
1:	NubG-NtAQI1	//	NtTIP1;1-CubLV	
2:	NubG-NtAQI1	//	NtPIP2;2-CubLV	
3:	NubG-NtAQI1	//	AtTIP1;1-CubLV	
4:	NubG-NtAQI1	//	AtPIP2;2-CubLV	
5:	NubG-NtAQI1	//	hAQP1-CubLV	
6:	NubG-NtAQI1	//	Vektor-CubLV	**(−)**
7:	NubG-BHRF1	//	NtPIP2;2-CubLV	**(+)**

Abb. 4.1-3: Interaktionsanalyse von NubG-NtAQI1 Fusionsproteinen mit Aquaporin-CubLV-Fusionen im Hefe Split-Ubiquitin-System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens. Um die Interaktion zu verifizieren wurden Konzentrationen von 0 und 5 mM 3-AT eingesetzt. Die Interaktion von BHRF1 mit NtPIP2;2 diente als positive Kontrolle (+). Als negative Kontrolle (-) wurde NubG-NtAQI1 mit dem leeren „bait"-Vektor kombiniert.

Quantitative Interaktionsstudien (siehe Abb. 4.1-4):

Um die Stärke der Protein-Protein Interaktionen auch quantifizieren zu können, wurde das *lacZ*-Reportergen des verwendeten Hefestammes NMY51 zu Hilfe genommen (siehe 3.3.3.2).

Die Quantifizierung des Interaktionstests (siehe Abb. 4.1-4) entsprach dem Ergebnis des qualitativen Tests (siehe Abb. 4.1-3). Die Interaktion von NtAQI1 mit NtTIP1;1, NtPIP2;2 und AtPIP2;2 konnte auch hier nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine schwache Interaktion zwischen NtAQI1 und AtTIP1;1 detektiert werden.

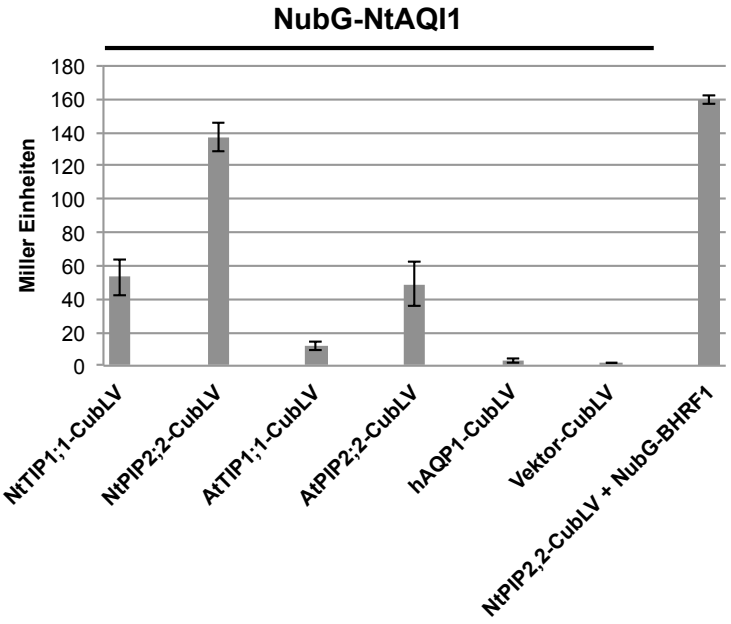


Abb. 4.1-4: Darstellung der Interaktionsstärke von NubG-NtAQI1 Fusionsproteinen mit Aquaporin-CubLV-Fusionen im Hefe Split-Ubiquitin-System unter Verwendung des *lacZ*-Reportergens. Die Interaktion von BHRF1 mit NtPIP2;2 diente als positive Kontrolle (+). Als negative Kontrolle (-) wurde NubG-NtAQI1 mit dem leeren „bait"-Vektor ohne Transkriptionsfaktor kombiniert. (n = 3)

4.1.3 Interaktion von ACY1 aus *H. sapiens* mit Aquaporinen

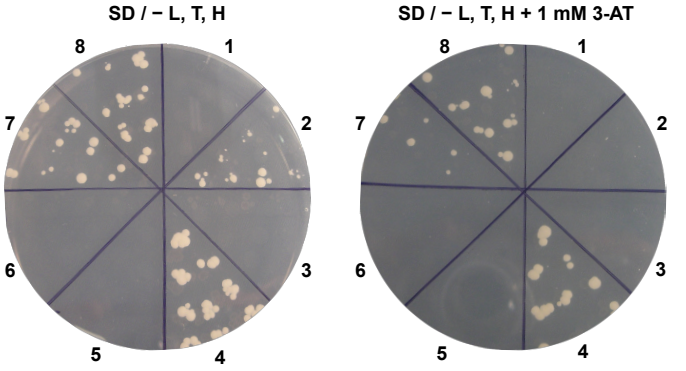
Da sowohl AQI1 als auch NtAQI1 eine hohe Sequenzhomologie zur humanen AMINOACYLASE 1 (ACY1) aufweisen (Aminosäure-Identität 45 % bzw. 41 %), wurde auch die Fähigkeit von ACY1 überprüft mit pflanzlichen Aquaporinen wechselwirken zu können.

Hierzu wurde *ACY1* mittels spezifischer Oligonukleotide (siehe 2.7) aus einer humanen cDNA-Bank („human adult kidney cDNA"; Dualsystems Biotech AG, Zürich) amplifiziert und in den „prey"-Vektor pPR3-N kloniert (siehe 2.3.6). Für die Interaktionsstudien wurden die Aquaporine NtTIP1;1 und NtPIP2;2 herangezogen, welche in den „bait"-Vektoren pBT3-C und pBT3-N (siehe 2.3.4 und 2.3.5) vorlagen. Positivkontrollen (+) und Negativkontrollen (-) wurden verwendet wie gehabt (siehe 4.1.1 und 4.1.2).

Qualitative Interaktionsstudien (siehe Abb. 4.1-5):

Ein qualitativer Test der Protein-Protein Interaktion zwischen ACY1 und den Tabak Aquaporinen wurde unter Verwendung des im Hefestamm NMY51 vorliegenden *HIS3*-Reportergens durchgeführt (siehe 3.3.3.1).

Auch zwischen der humanen AMINOACYLASE 1 und dem pflanzlichen Aquaporin NtTIP1;1 konnte eine Interaktion nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.1-5, Sektor 2 + 4). Die Interaktion zwischen ACY1 und NtPIP2;2 konnte nicht gezeigt werden (siehe Abb. 4.1-5, Sektor 1 + 3).



	NubG Fusion		CubLV Fusion	
1:	NubG-ACY1	//	CubLV-NtPIP2;2	
2:	NubG-ACY1	//	CubLV-NtTIP1;1	
3:	NubG-ACY1	//	NtPIP2;2-CubLV	
4:	NubG-ACY1	//	NtTIP1;1-CubLV	
5:	NubG-ACY1	//	Vektor-CubLV	**(−)**
6:	NubG-ACY1	//	Cub-Vektor	**(−)**
7:	NubG-BHRF1	//	CubLV-NtPIP2;2	**(+)**
8:	NubG-BHRF1	//	NtPIP2;2-CubLV	**(+)**

Abb. 4.1-5: Interaktionsanalyse von NubG-ACY1 Fusionsproteinen mit CubLV-Fusionen der Tabakaquaporine TIP1;1 und PIP2;2 im Hefe Split-Ubiquitin-System unter Verwendung des *HIS3*-Reportergens. Um die Interaktion zu verifizieren wurden Konzentrationen von 0 und 1 mM 3-AT eingesetzt. Die Interaktion von BHRF1 mit NtPIP2;2 diente als positive Kontrolle (+). Als negative Kontrolle (-) wurde NubG-ACY1 mit den leeren „bait"-Vektoren kombiniert.

Quantitative Interaktionsstudien (siehe Abb. 4.1-6):

Um die Stärke der Protein-Protein Interaktionen auch quantifizieren zu können, wurde das *lacZ*-Reportergen des verwendeten Hefestammes NMY51 zu Hilfe genommen (siehe 3.3.3.2).

Die Quantifizierung des Interaktionstests (siehe Abb. 4.1-6) entsprach dem Ergebnis des qualitativen Tests (siehe Abb. 4.1-5). Die Interaktion von ACY1 mit NtTIP1;1 konnte auch hier nachgewiesen werden, wohingegen eine Interaktion zwischen ACY1 und NtPIP2;2 auch hier nicht gemessen wurde.

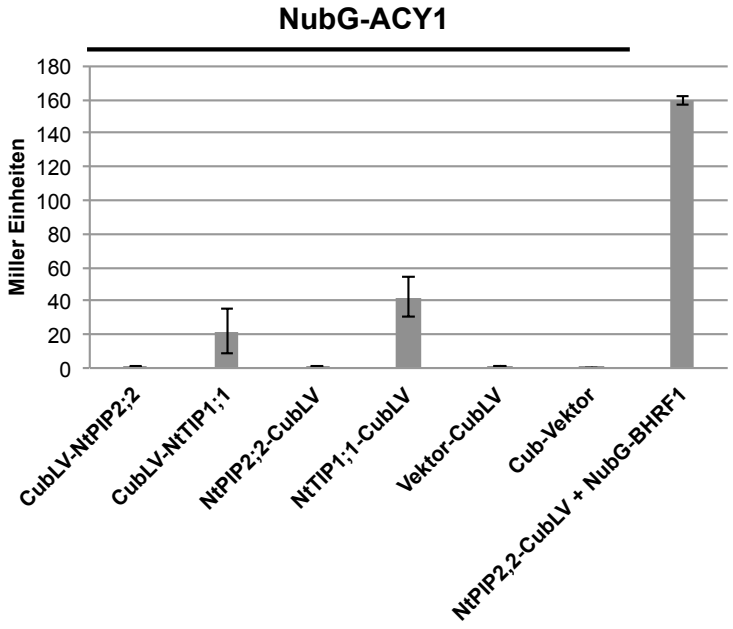


Abb. 4.1-6: Darstellung der Interaktionsstärke von NubG-ACY1 Fusionsproteinen mit Aquaporin-CubLV-Fusionen im Hefe Split-Ubiquitin-System unter Verwendung des *lacZ*-Reportergens. Die Interaktion von BHRF1 mit NtPIP2;2 diente als positive Kontrolle (+). Als negative Kontrollen (-) wurde NubG-ACY1 mit den leeren „bait"-Vektoren kombiniert. (n = 3)

4.2 Funktionelle Analyse der Wechselwirkung zwischen AQI1 und pflanzlichen Aquaporinen

Da eine Protein-Protein Interaktion der Aminoacylase 1-homologen Proteine aus Pflanzen (AQI1 und NtAQI1) mit den pflanzlichen Aquaporinen TIP1;1 und PIP2;2 bewiesen werden konnte (siehe 4.1.1 und 4.1.2), folgte nun die Charakterisierung der zellulären Funktion dieser Wechselwirkung.

4.2.1 Einfluss von (Nt)AQI1 und ACY1 auf die H_2O_2-Kanalaktivität von NtTIP1;1 *in planta*

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass eine Überexpression des viralen anti-apoptotischen Proteins BHRF1 (Protein der Bcl-2 Familie) in transgenen Pflanzen eine pro-apoptotische Wirkung zeigt. Es kommt zu verstärkten Zelltodreaktionen, wenn diese Pflanzen in Stresssituationen geraten, z.B. bei Kontakt mit nekrotischen Pathogenen (ROTH, 2003). Mittels des Hefezweihybrid-Systems konnte eine Interaktion zwischen BHRF1 und den pflanzlichen H_2O_2-transportierenden Aquaporinen PIP2;2 und TIP1;1 bewiesen werden. Die hierbei relevante Interaktionsdomäne der Aquaporine (TM1, TM2, NPA) entspricht derjenigen, die auch für die Interaktion von NtPIP2;2 mit NtAQI1 identifiziert wurde (HOCH, 2011; siehe Abb. 5.4-1). Dieses Ergebnis lieferte Hinweise darauf, dass BHRF1 zu einer Fehlregulation der Aquaporine führen könnte, wodurch vermehrtes Einströmen von H_2O_2 und folglich verstärkter Zelltod zustande kommt. Im Folgenden wurde untersucht, ob es sich bei (Nt)AQI1 um den natürlicherweise vorkommenden Regulator der H_2O_2-Kanalfunktion von Aquaporinen *in planta* handelt.

4.2.1.1 Zelltod Inhibition durch transiente Überexpression von (Nt)AQI1 und ACY1

Um den Einfluss von (Nt)AQI1 bzw. ACY1 auf den H_2O_2-Transport durch Aquaporine in Pflanzen zu untersuchen und (Nt)AQI1 somit eine Regulatorfunktion zuschreiben zu können, wurden die zu analysierenden Proteine transient in *N. benthamiana* Blättern exprimiert. Hierzu wurde die Methode der Agrobakterieninfiltration (siehe 3.5.2) angewandt (verwendete Vektorkonstrukte siehe 3.2.11 und 3.2.12). Es wurden zum einen Agrobakterien infiltriert, welche *NtTIP1;1* als *GPF*-Fusion exprimieren. Dies führt an der Infiltrationsstelle zu Zelltod, in Form einer deutlich sichtbaren Nekrose (siehe Abb. 4.2-1, A3, B3, C3). Dieser Zelltod ist auf vermehrte H_2O_2-Aufnahme in die Zelle zurückzuführen, welche durch die überexprimierten Aquaporin-GFP Fusionen zustande kommt (HOCH, 2011). Zum anderen wurden Co-Infiltrationen mit diesen Agrobakterien

(*NtTIP1;1-GFP*) und *(Nt)AQI1* bzw. *ACY1* exprimierenden Agrobakterien durchgeführt, um den Einfluss dieser Proteine auf die Zelltodinduktion zu untersuchen. Allen Infiltrationsansätzen wurden außerdem Agrobakterien beigemischt, welche den viralen „Silencing Suppressor“ *P19* exprimieren. Dies verhindert den Abbau der mRNA der gewünschten transgenen Proteine *in planta* durch den pflanzlichen Mechanismus des „gene silencing“.

Durch die Co-Expressionsexperimente konnte gezeigt werden, dass durch NtTIP1;1-GFP verursachter Zelltod von (Nt)AQI1 inhibiert werden kann (siehe Abb. 4.2-1, A4, B4). Sogar die humane AMINOACYLASE 1 kann durch ihre Wechselwirkung mit dem Tabak-Aquaporin TIP1;1 inhibierenden Einfluss auf die Zelltodausprägung nehmen (siehe Abb. 4.2-1, C4).

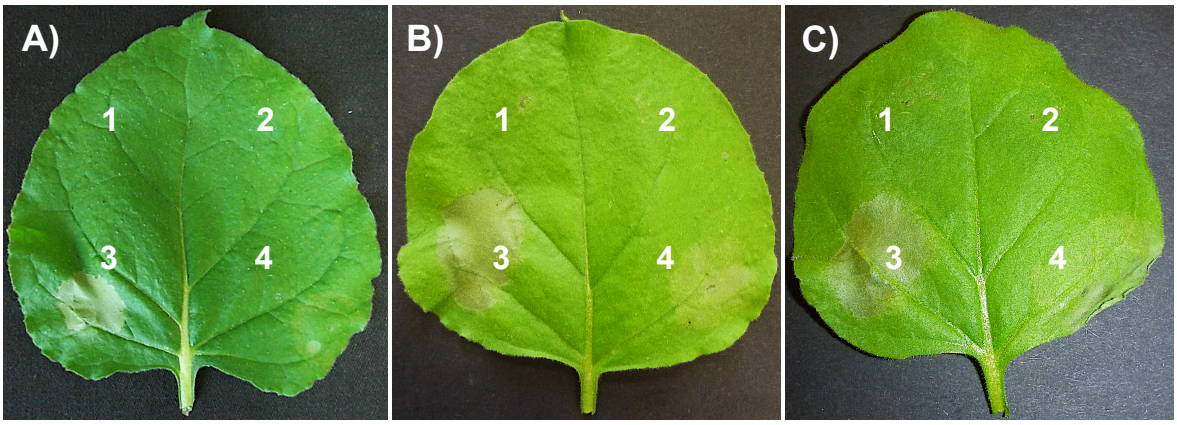


Abb. 4.2-1: Symptome von Blättern einer *N. benthamiana* Pflanze, 7 Tage nach Agrobakterien-infiltration. Überexpression von *NtTIP1;1-GFP* induziert Zelltod (A3, B3, C3), welcher durch Co-Expression von *NtAQI1* (A4), *AQI1* (B4) und *ACY1* (C4) inhibiert werden kann. Als „Silencing Suppressor“ wurde das Protein P19 verwendet.

Um die Spezifität der (Nt)AQI1 bedingten Zelltod-Inhibition zu untersuchen, wurden Agrobakterieninfiltrationen (siehe 3.5.2) mit anderen Zelltod auslösenden Proteinen durchgeführt. Die Induktion der Nekrosen wurde zum einen mit Bax, einem pro-apoptotischen Protein der Bcl-2 Familie (siehe 2.8.1.3) ausgelöst. Zum anderen wurde NIMIN1, ein Schlüsselenzym der „systemic acquired resistance“ (SAR) (siehe 2.8.1.5) eingesetzt, von dem laut neuester Studien auch eine Zelltod induzierende Wirkung bekannt ist (MASROOR, 2013). Als Kontrolle wurden die Nekrosen mit dem Bax-Inhibitor AtBI1 (siehe 2.8.1.4) aus *A. thaliana* inhibiert. Mittels Co-Infiltration von NtAQI1 wurde auch hier die Einflussnahme auf die Zelltodausprägung überprüft.

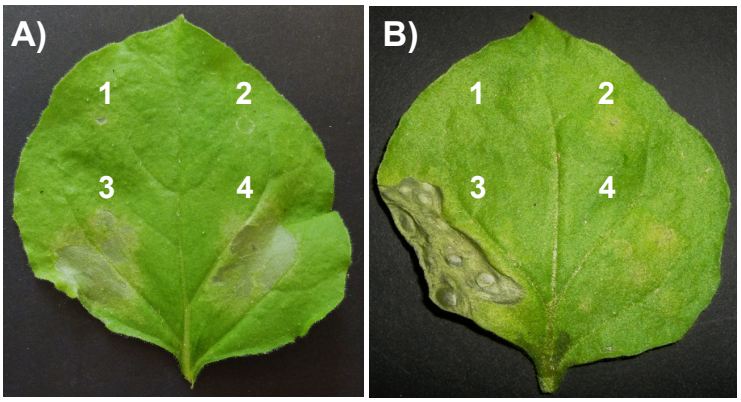
Allen Infiltrationsgemischen wurde der „Silencing Suppressor“ P19 (siehe 2.8.1.2) zugefügt (verwendete Vektorkonstrukte siehe 2.3.11).

Es konnte gezeigt werden, dass NtAQI1 nicht in der Lage ist, Zelltod der aufgrund von Überexpression der Proteine Bax und NIMIN1 entsteht, zu inhibieren (siehe Abb. 4.2-2, A und 4.2-3, A). Der Bax-Inhibitor aus *Arabidopsis* (AtBI1) hingegen, konnte in beiden Fällen den Zelltod verhindern (siehe Abb. 4.2-2, B und 4.2-3, B).



1:	Bax	1:	Bax
2:	Bax + NtAQI1	2:	Bax + AtBI1

Abb. 4.2-2: Symptome von Blättern einer *N. benthamiana* Pflanze, 7 Tage nach Agrobakterieninfiltration. Überexpression von *Bax* induziert Zelltod (A1, B1). Die Co-Expression von *NtAQI1* (A 2) kann diesen Zelltod nicht inhibieren. Durch den spezifischen Bax-Inhibitor aus *Arabidopsis* (AtBI1) ist es möglich die Nekrose zu verhindern (B 2). Als „Silencing Supressor“ wurde das Protein P19 verwendet.



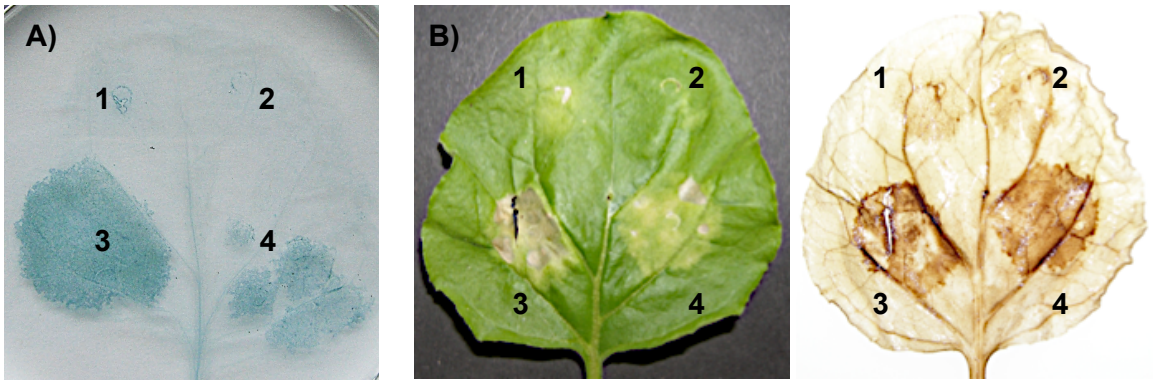
1:	NtAQI1	1:	AtBI1
2:	P19	2:	P19
3:	NIMIN1	3:	NIMIN1
4:	NIMIN1 + NtAQI1	4:	NIMIN1 + AtBI1

Abb. 4.2-3: Symptome von Blättern einer *N. benthamiana* Pflanze, 7 Tage nach Agrobakterieninfiltration. Überexpression von *NIMIN1* induziert Zelltod (A3, B3). Die Co-Expression von *NtAQI1* (A 4) kann diesen Zelltod nicht inhibieren. Durch den Bax-Inhibitor (AtBI1) ist es auch hier möglich die Nekrose zu verhindern. Als „Silencing Suppressor“ wurde das Protein P19 verwendet.

4.2.1.2 Visualisierung von Zelltod und H_2O_2

Um den durch Überexpression von *NtTIP1,1-GFP* verursachten Zelltod bzw. die Zelltod-Inhibition durch Co-Expression von *NtAQI1* deutlicher darzustellen, wurden abgestorbene Zellen mittels Trypanblau (siehe 3.5.5) angefärbt (siehe Abb. 4.2-4, A).

Zum Nachweis von Zelltod-bedingter H_2O_2-Akkumulation in den Blättern nach Agrobakterieninfiltration wurde H_2O_2 mittels 3,3´-Diaminobenzidin (DAB) detektiert (siehe 3.5.4). DAB reagiert in Gegenwart von Peroxidasen mit dem gebildeten H_2O_2 zu einem unlöslichen braunen Präzipitat (siehe Abb. 4.2-4, B).



1: NtAQI1
2: P19
3: NtTIP1;1-GFP
4: NtTIP1;1-GFP + NtAQI1

1: NtTIP1;1-GFP
2: P19
3: NtTIP1;1-GFP
4: NtTIP1;1-GFP + NtAQI1

Abb. 4.2-4: *N. benthamiana* Blätter 7 Tage nach Agrobakterieninfiltration. Tote Zellen wurden mittels Trypanblau angefärbt (A), H_2O_2 wurde mittels DAB detektiert (B).

Durch die Blaufärbung der toten Blattzellen (siehe Abb. 4.2-4, A), konnte die NtTIP1;1-GFP induzierte Nekrose (3) als totes Gewebe identifiziert werden. Die Inhibition des Zelltods durch NtAQI1 konnte verdeutlicht werden, da die Blaufärbung an der entsprechenden Infiltrationsstelle (4) viel geringer ausfiel. Das bedeutet, dass der Zelltod hier noch nicht so weit fortgeschritten war.

Mittels DAB (siehe Abb. 4.2-4, B) wurde die H_2O_2-Akkumulation nach Infiltration von *NtTIP1;1-GFP* anhand einer starken Braunfärbung der Infiltrationsstelle (3) detektiert. An der Infiltrationsstelle der Co-Expression von *NtTIP1;1-GFP* und *NtAQI1* (4) kam es jedoch zu genau der selben Braunfärbung. Offensichtlich akkumuliert hier dieselbe Menge an H_2O_2, obwohl der Zelltod in Form einer Nekrose noch nicht sichtbar ist. Dies macht deutlich, dass nicht die bei Stress entstehende H_2O_2-Akkumulation ausschlaggebend für das Auslösen von Zelltod ist. Vielmehr ist die H_2O_2-Aufnahme in die Zelle, welche bei Co-Expression des Aquaporins NtTIP1;1 mit NtAQI1 inhibiert wird, der entscheidende Faktor.

4.2.1.3 Nachweis transient exprimierter Proteine

Um die Expression von infiltrierten Proteinen beweisen zu können, wurden verschiedene Nachweisverfahren angewandt. Es wurden je 4 Blätter von *N. benthamiana* mit Agrobakterienkulturen infiltriert (siehe 3.5.2), welche die Proteine ACY1 oder NtAQI1-CAH (schematische Darstellung von NtAQI1-CAH siehe Abb. 4.4-12) exprimieren. GFP und der „Silencing Suppressor" P19 wurde immer beigemischt (verwendete Vektorkonstrukte siehe 2.3.11).

Die Expression von GFP und ACY1 konnte 7 Tage nach erfolgter Infiltration mittels Immunodetektion (Western Blot) (siehe 3.2.7.2) nachgewiesen werden, da für die genannten Proteine spezifische Antikörper (siehe 2.6.1) verfügbar waren. Als Kontrolle wurde ein uninfiltriertes Blatt (-) eingesetzt (siehe Abb. 4.2-5, A).

GFP konnte außerdem visuell anhand von Fluoreszenz unter einer UV-Lampe detektiert werden (siehe Abb. 4.2-5, B).

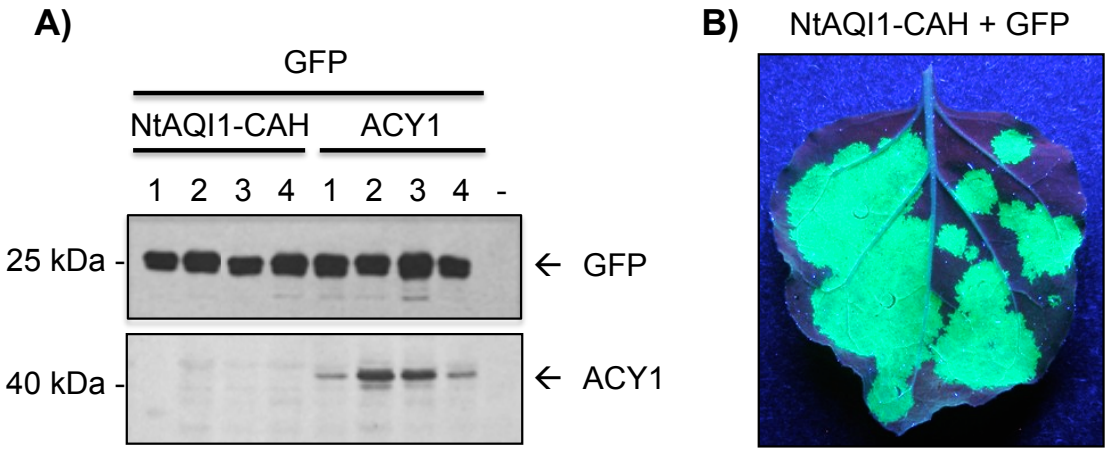


Abb. 4.2-5: Nachweis transient exprimierter Proteine in Blättern von *N. benthamiana*, 7 Tage nach Agrobakterieninfiltration. Immunodetektion der Proteine GFP und ACY1. Als negative Kontrolle wurde ein uninfiltriertes Blatt (-) verwendet (A). Fluoreszenzaufnahme eines mit NtAQI1-CAH und GFP co-infiltrierten Blattes (B).

Der Nachweis von NtAQI1 mittels Immunodetektion war nicht möglich, da die speziell produzierten Antikörper (siehe 2.6.1.4) zu stark mit dem endogenen Protein AQI1 aus *N. benthamiana* wechselwirkten und deshalb keine spezifischen Proteinbanden detektiert werden konnten. Daher wurde eine andere Methode zu Hilfe genommen. Hierfür wurde NtAQI1 als Fusionsprotein mit einer Cyanamidhydratase (CAH) (siehe 2.8.1.6) infiltriert. Die Aktivität dieser Cyanamidhydratase ist mittels eines einfachen „CAH-Assays" (siehe 2.5.3) messbar. Als Kontrollen wurden mit Infiltrationspuffer infiltrierte Blätter (mock), und Blätter die nur mit dem Aquaporin NtTIP1;1-GFP infiltriert wurden, verwendet. Die CAH-Aktivität wurde in Blättern nach Co-Infiltration von NtAQI1-CAH mit NtTIP1;1 und in Blättern nach alleiniger Infiltration von NtAQI1-CAH gemessen.

Die Expression des Fusionsproteins NtAQI1-CAH konnte anhand der CAH-Aktivität in allen entsprechend infiltrierten Blättern nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.2-6). Allerdings war die Aktivität hauptsächlich in der Membranprotein-Fraktion messbar. In den Proteinextrakten welche ausschließlich die löslichen Proteine enthielten, war kaum CAH-Aktivität vorhanden. Dieser Befund lieferte erste Hinweise auf eine Membranassoziation von NtAQI1, welche in späteren Versuchen (siehe 4.4.2.1) noch bestätigt werden konnte.

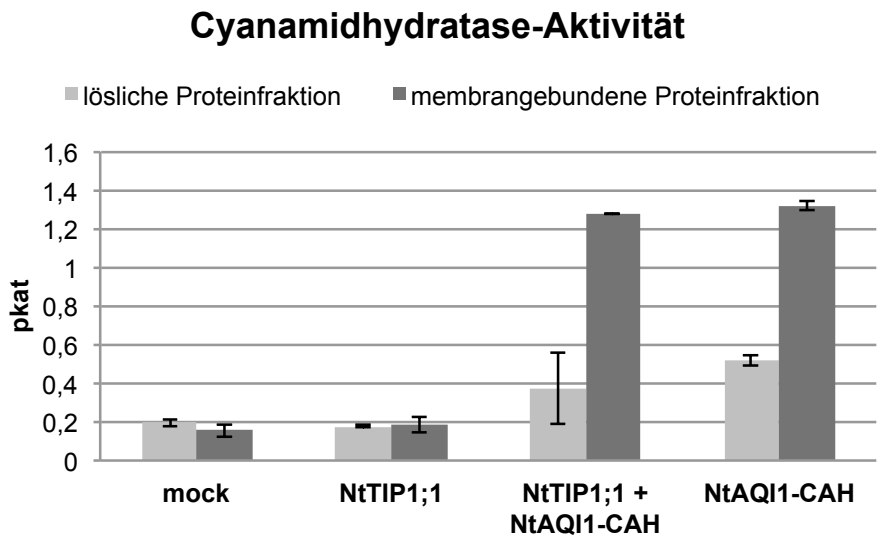


Abb. 4.2-6: Nachweis der Aktivität des Enzyms Cyanamidhydratase (CAH), 7 Tage nach Agrobakterieninfiltration von *N. benthamiana* mit NtAQI1-CAH Fusionsproteinen. Dargestellt ist die CAH-Aktivität in der löslichen und der membrangebunden Proteinfraktion von infiltrierten Blättern. (n = 3)

4.2.2 Einfluss von NtAQI1 auf die H_2O_2-Kanalaktivität von NtTIP1;1 in *S. cerevisiae*

Da die funktionelle Analyse der Protein-Protein Interaktion von (Nt)AQI1 mit dem Aquaporin NtTIP1;1 *in planta* Hinweise auf eine regulatorische Funktion von (Nt)AQI1 bezüglich des H_2O_2-Transports lieferte, wurde dies nun auch heterolog im Hefesystem überprüft (siehe 3.3.4). Hierfür konnten die Protein-Vektorkonstrukte (siehe 2.3.4 und 2.3.6) herangezogen werden, welche in Kapitel 4.1 für die Interaktionsstudien im Split-Ubiquitin-System verwendet wurden. Im Hefestamm NMY51 (siehe 2.2.4) wurde zum einen das Aquaporin *NtTIP1;1* alleine exprimiert (Vektorkonstrukt pBT3-C:NtTIP1;1, siehe 2.3.4). Zum anderen wurde *NtAQI1* (Vektorkonstrukt pPR3-N:NtAQI1, siehe 2.3.6) alleine exprimiert. Um die Auswirkung der Protein-Protein Interaktion zu untersuchen, wurde NtTIP1;1 mit NtAQI1 co-exprimiert. Als Kontrolle wurden außerdem Hefen mit den beiden leeren Vektoren (pBT3-C, siehe 2.3.4 und pPR3-N, siehe 2.3.6) co-transformiert.

Unter normalen Bedingungen, ohne Zugabe von H_2O_2, zeigten alle Hefetransformanten annähernd gleiche Wachstumsraten (siehe Abb. 4.2-7, A). Signifikante Wachstumsunterschiede ließen sich erst durch Zugabe von 2 mM H_2O_2 feststellen (siehe Abb. 4.2-7, B).

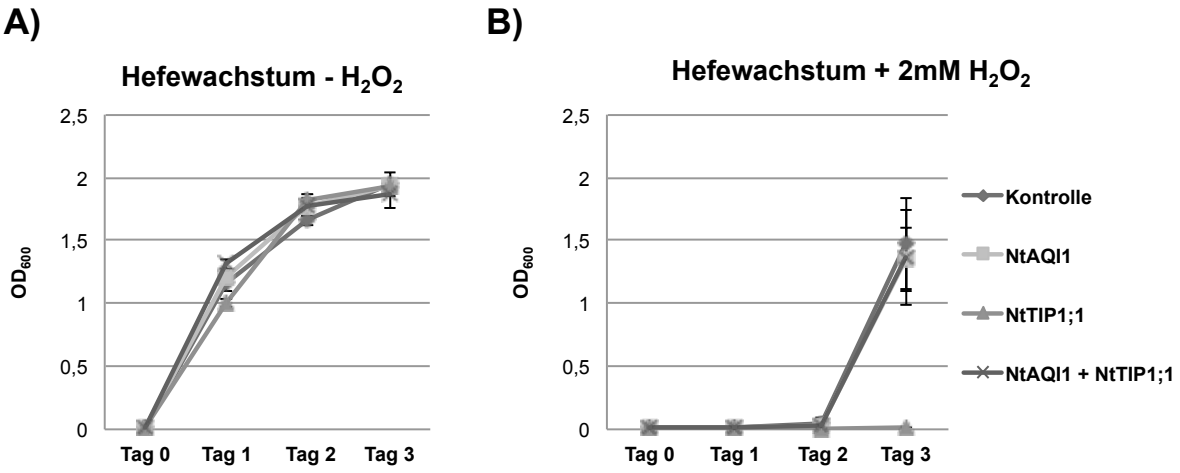


Abb. 4.2-7: Wachstum verschiedener Hefe-Transformanten über 3 Tage, ohne (A) und mit 2 mM H_2O_2 (B) (n = 3). Die Hefezellen exprimieren die entsprechenden Proteine als Fusionen mit Split-Ubiquitin. Als Kontrolle wurden die leeren „bait" und „prey" Vektoren des Split-Ubiquitin Systems transformiert.

Es konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von H_2O_2 ins Medium das Wachstum aller Hefekulturen beeinträchtigt. Jedoch konnten sich die Kontrollen, die *NtAQI1*-exprimierenden Hefekulturen und auch die Hefekulturen welche *NtTIP1;1* mit *NtAQI1* co-exprimierten nach 2 Tagen erholen. Sie erreichten am dritten Tag noch einen OD_{600}-Wert von ca. 1,5. Lediglich bei den Hefekulturen welche nur das Aquaporin *NtTIP1;1* exprimierten, konnte kein Wachstum gemessen werden (siehe Abb. 4.2-7, B).
Dadurch wurde deutlich, dass die Überexpression von Aquaporinen, welche als H_2O_2-Kanäle fungieren können, die Sensitivität von Hefezellen gegenüber H_2O_2 erhöht. Außerdem wurde die Annahme bestätigt, dass die Wechselwirkung zwischen NtAQI1 und NtTIP1;1 reguatorischen Einfluss auf die H_2O_2-Aufnahme durch Aquaporine nimmt. Bei einer Co-Expression ließ sich eine Art „Rescue-Effekt" beobachten. Das Wachstum der Hefen wurde unter H_2O_2-Einfluss nur in dem Maß beeinträchtigt, wie es bei den Kontrollen ohne Aquaporin-Expression der Fall war. Auch dieser Befund lieferte Hinweise auf eine Blockierung der Aquaporine durch (Nt)AQI1.

4.2.3 Einfluss von (Nt)AQI1 auf die H_2O-Kanalaktivität von NtTIP1;1 bzw. AtTIP1;1 in *X. laevis* Oozyten

In 4.2.1 und 4.2.2 wurde der regulatorische Einfluss von (Nt)AQI1 auf die H_2O_2-Kanalfunktion von Aquaporinen untersucht und bestätigt. Nun sollte überprüft werden, ob durch die Interaktion zwischen (Nt)AQI1 und den Aquaporinen auch der Wassertransport beeinflusst werden kann. Hierzu wurde das Oozyten-Expressionssystem (siehe 3.4) zu Hilfe genommen, welches eine Möglichkeit zur heterologen Expression von Proteinen bietet. Membranproteine, wie z. B. Transportproteine oder Poren, können in Oozyten exprimiert werden, um mittels elektrophysiologischer Messungen oder „Schwell-Assays" deren Funktion näher zu charakterisieren. Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* (siehe Abb. 4.2-8, A) wird für diesen Zweck als bevorzugter Modellorganismus eingesetzt, da seine Embryonen leicht zugänglich und einfach zu halten sind. Zudem sind Krallenfrösche äußerst robust, weswegen die fachgerechte Entnahme der Oozyten (siehe Abb. 4.2-8, B) in einem Intervall von 6 Monaten kein Problem darstellt.

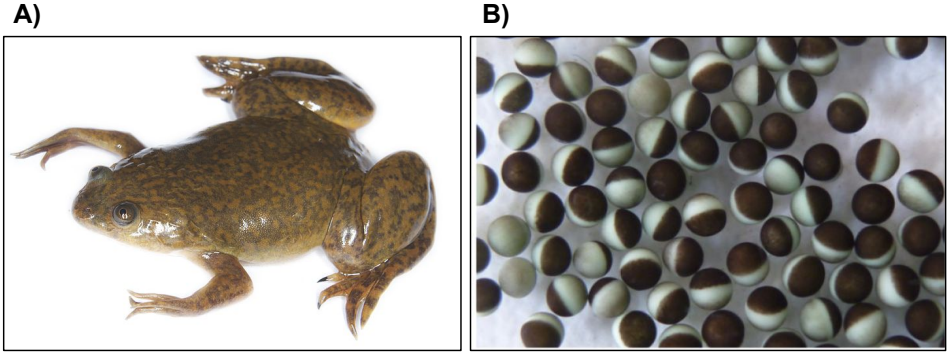


Abb. 4.2-8: *Xenopus laevis* (afrikanischer Krallenfrosch). Ausgewachsener Krallenfrosch mit natürlicher Farbgebung (A) (Foto: BRIAN GRATWICKE, 2007). *X. laevis* Oozyten, Durchmesser ca. 1,0 – 1,2 mm (B) (www.diacleanshop.com).

Im Falle von Aquaporinen ist es möglich anhand eines „Schwell-Assays" (siehe 3.4.5) deren H_2O-Transportfähigkeit zu verifizieren. Oozyten schwellen bei heterologer Überexpression von H_2O-Kanälen messbar an, sobald sie in eine hypoosmolare Lösung überführt werden (LUDEWIG, 2004; MAYER, 2006).

Die cDNA-Sequenzen der Gene *TIP1;1* und *AQI1* aus *N. tabacum* und *A. thaliana* wurden in den Oozyten-Expressionsvektor pOO2 kloniert. Mittels dieser Vektorkonstrukte (siehe 2.3.10) wurde RNA erzeugt (siehe 3.4.1). Um die gewünschten Proteine zu exprimieren wurde die entstandene RNA in die vorher isolierten Oozyten injiziert (siehe 3.4.2, 3.4.3, 3.4.4). Die Oozyten wurden währenddessen die ganze Zeit in einer osmotischen Lösung gehalten. Als Referenz wurden Oozyten mit H_2O injiziert. Für den „Schwell-Assay" wurden nun die Referenz-Oozyten (H_2O), Oozyten welche nur das Aquaporin *TIP1;1*

alleine exprimierten und Oozyten welche *TIP1;1* und *AQI1* co-exprimierten gleichzeitig in eine hypoosmolare Lösung überführt. Außerdem wurde je eine uninjizierte Oozyte (-) als Verfahrenskontrolle mitgeführt, welche jedoch nicht in die spätere Auswertung mit aufgenommen wurde. Die Volumenzunahme der Oozyten wurde in regelmäßigen Abständen anhand einer Bilderserie unter dem Mikroskop dokumentiert (siehe Abb. 4.2-9). Die Bilderserien wurden ausgewertet, indem die relative Flächenzunahme der Oozyten in % berechnet wurde.

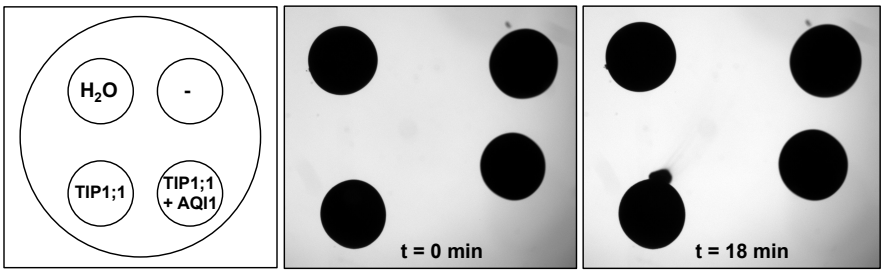


Abb. 4.2-9: Versuchsanordnung der Oozyten im „Schwell-Assay". Schematische Darstellung der Versuchsanordnung (links). Mikroskopische Aufnahme der Oozyten zu Beginn des „Schwell-Assays", t = 0 min (mitte) und am Ende des „Schwell-Assays", t = 18 min (rechts). Die Volumenzunahme der Oozyten am Ende des „Schwell-Assays" ist mit bloßem Auge kaum sichtbar. Wenn eine Oozyte platzt, lässt sich jedoch der Austritt des Oozyten-Inhalts erkennen.

Anhand von Vergleichsanalysen bezüglich der gemessenen Flächenzunahme der jeweiligen Oozyten konnte gezeigt werden, dass (Nt)AQI1 nicht nur regulatorisch auf den H_2O_2-Transport durch das Aquaporin TIP1;1 einwirkt, sondern in gewissem Maße auch den H_2O-Transport beeinflussen kann. Oozyten welche *TIP1;1* und *AQI1* co-exprimierten, zeigten eine 20 - 30 % geringere Zunahme, als Oozyten die nur das Aquaporin *TIP1;1* exprimierten (siehe Abb. 4.2-10). Dieses Ergebnis konnte sowohl für die Proteine aus Tabak (siehe Abb. 4.2-10, A), als auch für die entsprechenden Proteine aus *Arabidopsis* (siehe Abb. 4.2-10, B) gezeigt werden.

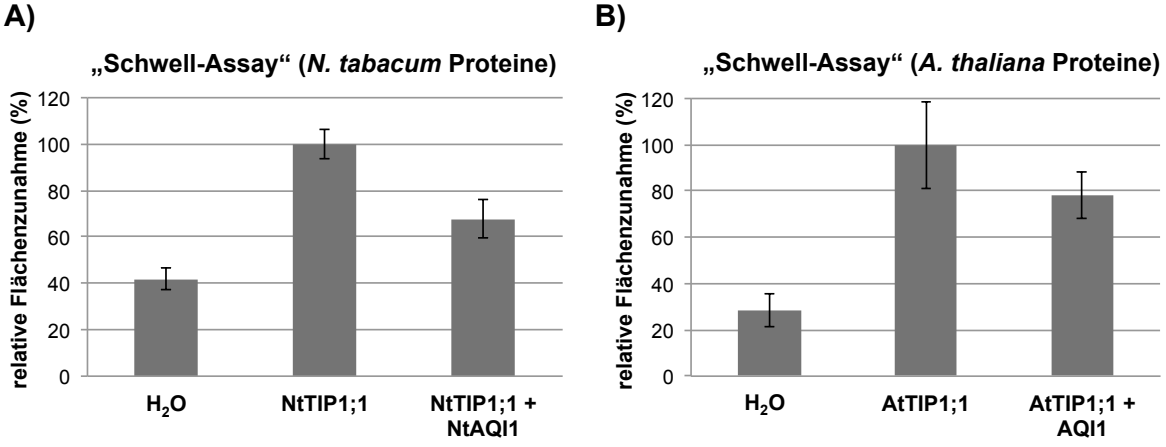


Abb. 4.2-10: Auswertung des Oozyten „Schwell-Assays" bei heterologer Expression der Proteine NtTIP1;1 und NtAQI1 aus Tabak, n = 6 (A) bzw. AtTIP1;1 und AQI1 aus *Arabidopsis*, n = 21 (B).

4.3 Expressionsanalyse von AQI1 *in planta*

Um Näheres bezüglich des molekularen Mechanismus der Aminoacylase-homologen Proteine AQI1 und NtAQI1 in Pflanzen zu erfahren, wurden im Folgenden verschiedene Expressionsanalyseverfahren angewandt. Dies diente dazu, Fragen zu Enzymaktivität, Vorkommen und Regulation von (Nt)AQI1 zu klären und Proteineigenschaften zu charakterisieren.

4.3.1 Untersuchung der Aminoacylase-Enzymaktivität von (Nt)AQI1

Da es sich bei (Nt)AQI1 laut Sequenzvergleich (NCBI, Blast-Programm; ALTSCHUL *et al*., 1990) um ein Aminoacylase 1-homologes Protein handelt, konnten die für Acy1 bekannten Eigenschaften für die Analyse der Enzymaktivität der entsprechenden Pflanzenproteine AQI1 und NtAQI1 genutzt werden. Es ist bekannt, dass Aminoacylasen die Hydrolyse N-terminal acylierter Aminosäuren zu einer freien Aminosäure und einer Acylgruppe katalysieren (ENDO, 1980; PITTELKOW *et al*., 1998; PERRIER *et al*., 2005). Demzufolge wurde ein Aminoacylase-Aktivitätstest („Ninhydrin-Assay“, siehe 3.2.8) angewandt, mit dessen Hilfe die chemische Reaktion der Deac(et)ylierung einer N-Ac(et)ylaminosäure detektiert werden kann. Als Substrat wurde N-Acetyl-L-Methionin verwendet. Durch Einsatz der Substanz Ninhydrin in den Reaktionsansatz konnten freie Aminogruppen nach erfolgreicher Deacetylierung mittels eines Farbumschlags nachgewiesen werden (EBEL & ROTH, 1987). Die spezifische Enzymaktivität wurde anhand der ermittelten Menge umgesetzten Substrats errechnet.

4.3.1.1 Enzymaktivität von rekombinant exprimiertem NtAQI1

Der Nachweis der Aminoacylase-Enzymaktivität von NtAQI1 erfolgte zunächst *in vitro*, mittels rekombinanter Expression von *NtAQI1* in *E. coli*. Hierzu wurde die cDNA-Sequenz des Volllängenproteins NtAQI1 im Expressionsvektor pGEX-3X verwendet (siehe 2.3.8 und Abb. 4.3-1). Bei Expression des Zielproteins entsteht mit Hilfe dieses Vektors ein Fusionsprotein, wobei eine Glutathion-S-Transferase (GST) an den N-Terminus des Zielproteins fusioniert wird. Dies dient dazu bei Bedarf rekombinant exprimierte Zielproteine einfach mittels Affinitätschromatographie aufreinigen zu können, wobei GST als Affinitätsepitop genutzt wird. Der Vektor verfügt außerdem über einen regulierbaren *tac*-Promotor. Dieser ermöglicht die Induktion der Expression des Fusionsproteins durch Zugabe des künstlichen Induktors Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG).

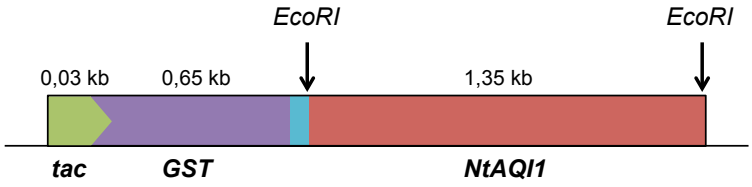


Abb. 4.3-1: Schematische Darstellung von pGEX-3X:NtAQI1. Durch Induktion des regulierbaren *tac*-Promotors entsteht ein Fusionsprotein aus NtAQI1 und einer Glutathion-S-Transferase (GST).

Das Vektorkonstrukt pGEX-3X:NtAQI1 wurde in den *E. coli* Expressionszellstamm BL21-CodonPlus® (siehe 2.2.3) transformiert, der sich besonders gut zur rekombinanten Expression von eukaryotischen Genen eignet.

Zuerst wurde die Expression des GST-Fusionsproteins nach erfolgter IPTG-Induktion (siehe 3.2.5) mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7) nachgewiesen. Die hierfür nötige denaturierende Proteinextraktion erfolgte wie unter 3.2.5.1 beschrieben.

In allen induzierten Proteinproben konnte das Fusionsprotein aus NtAQI1 (ca. 50 kDa) und GST (26 kDa) deutlich nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.3-2). Außerdem konnte ein gewisser Teil an freiem GST nachgewiesen werden, was auf einen Abbau des Fusionsproteins hindeutet.

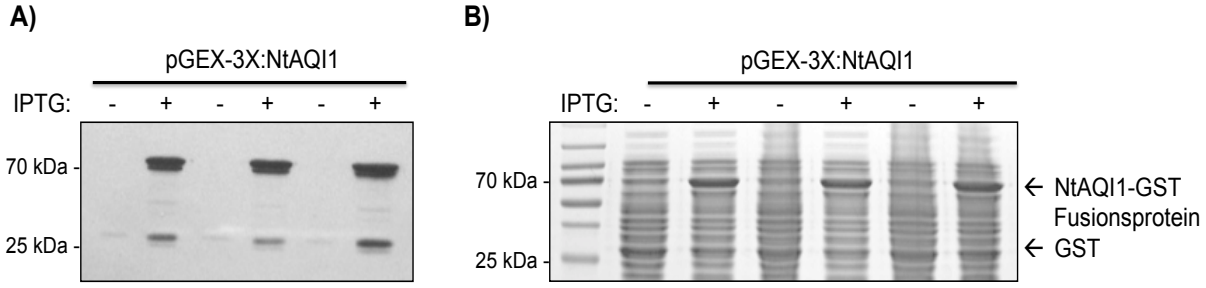


Abb. 4.3-2: Nachweis des rekombinant exprimierten Fusionsproteins NtAQI1-GST (ca. 76 kDa). Immunodetektion mit GST-Antikörperserum (siehe 2.6.1.2) (A) und Coomassie-Färbung des Proteingels (B) mit (+) und ohne (-) Induktion der Expression mittels IPTG.

Die Aufreinigung des nativen rekombinant exprimierten Proteins mit Hilfe des GST-Affinitätsepitops war nicht möglich. Das Protein konnte nach erfolgter Säulenchromatographie nicht wieder aus der Säulenmatrix eluiert werden, was vermutlich in der Bildung schwer löslicher Proteinaggregate begründet liegt.

Um das rekombinant exprimierte Protein trotzdem für Aktivitätsanalysen nutzen zu können, wurden die Expressionskulturen einer nativen Proteinextraktion unterzogen (siehe 3.2.5.1). Die extrahierten Proteine wurden in einen Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) eingesetzt. Als negative Kontrolle wurden Bakterienkulturen verwendet, welche zuvor mit dem leeren Expressionsvektor pGEX-3X (siehe 2.3.8) ohne Zielgen transformiert wurden.

Die Aminoacylase-Aktivität des rekombinant exprimierten Tabakproteins NtAQI1 konnte eindeutig bewiesen werden (siehe Abb. 4.3-3). Die Aktivität in mit NtAQI1 transformierten Bakterienlysaten war deutlich messbar, wohingegen in Bakterienlysaten welche mit dem leeren Expressionsvektor pGEX-3X transformiert wurden keine Aminoacylase-Aktivität detektiert werden konnte.

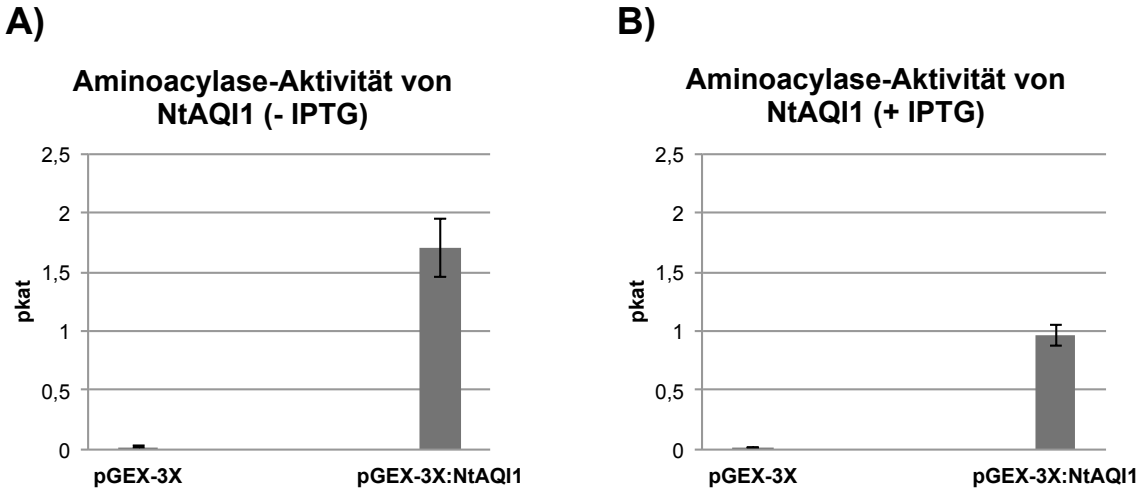


Abb. 4.3-3: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von rekombinant exprimiertem NtAQI1. Uninduziert (A) und mit Induktion mittels IPTG (B). Der leere Vektor pGEX-3X wurde als negative Kontrolle eingesetzt. (n = 3)

Allerdings war auffällig, dass die Enzymaktivität nach einer Induktion mittels IPTG deutlich geringer war (siehe Abb. 4.3-3, B), als ohne Induktion der Expression mittels IPTG (siehe Abb. 4.3-3, A). Dies spricht dafür, dass eine zu starke Expression des rekombinanten Proteins zur Bildung von intrazellulären Einschlusskörperchen, sogenannten „Inclusion bodies" führt, was vor allem für regulatorische Proteine nicht untypisch ist. „Inclusion bodies" sind dichte, granuläre Strukturen, die meist bei der heterologen Expression von Fremdproteinen in einer Zelle entstehen. Bei extrem hoher lokaler Proteinkonzentration können die hydrophoben Bereiche der Proteine miteinander in Kontakt treten, was dann zur Aggregation dieser Proteine und Deponierung in Einschlusskörpern führt (PROUTY & GOLDBERG, 1972; BANEYX & MUJACIC, 2004). Hiermit ließen sich auch die Probleme bei der Aufreinigung und Elution des rekombinant exprimierten Proteins erklären.

Die messbare Aminoacylase-Aktivität der uninduzierten (- IPTG) Proteinproben (siehe Abb. 4.3-3, A) kommt zustande, da auch ohne Induktion eine schwache Expression des Zielgens (*NtAQI1*) stattfindet. Diese ist wohl für den sehr empfindlichen „Ninhydrin-Assay" ausreichend. Für den Nachweis von NtAQI1 mittels Immunodetektion (siehe Abb. 4.3-2) ist die Proteinmenge jedoch zu gering.

4.3.1.2 Enzymaktivität von (Nt)AQI1 *in planta*

Nachdem bewiesen war, dass es sich bei dem pflanzlichen Protein NtAQI1 nicht nur laut Sequenzvergleich, sondern auch aufgrund seiner Enzymaktivität *in vitro* um ein Aminoacylase-homologes Protein handelt, wurde nun die Enzymaktivität von (Nt)AQI1 auch *in planta* analysiert. Hierfür wurde der in 4.3.1.1 schon genannte Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) zu Hilfe genommen. Die Extraktion von Proteinen aus pflanzlichem Material erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben. Mittels einer Kinetik wurde der „Assay" zunächst für Pflanzenproben (*N. tabacum* NN) standardisiert (siehe Abb. 4.3-4). Hierbei zeigte sich, dass eine Inkubation der Reaktionsansätze für 24 h bei 37 °C und der Einsatz von 40 µl des Proteinextraktes optimale Bedingungen darstellen. Diese Bedingungen wurden fortan standardgemäß angewandt.

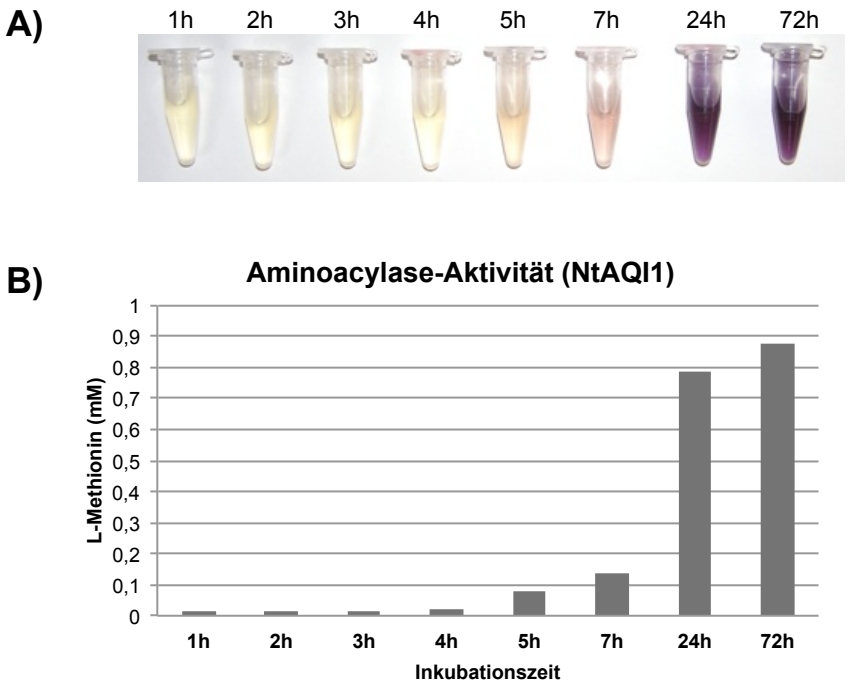


Abb. 4.3-4: Kinetik des Aminoacylase-Aktivitätstests mit einem Proteinextrakt von *N. tabacum* NN und Reaktions-Inkubationszeiten von 1-72 h. Ninhydrin-basierte Farbreaktion freier Aminogruppen (A) und Quantifizierung des deacetylierten L-Methionins (B) nach erfolgtem Aminoacylase-Aktivitätstest mit N-Acetyl-L-Methionin als Substrat.

Da es sich bei den pflanzlichen Proteinextrakten immer um Proteingemische des gesamten pflanzlichen Proteins handelt, musste sichergestellt werden, dass die gemessene Aminoacylase-Aktivität auch wirklich auf das Protein (Nt)AQI1 zurückzuführen ist. Es musste ausgeschlossen werden, dass nicht andere pflanzliche Proteasen für die nachgewiesene Hydrolyse der acetylierten Aminosäuren verantwortlich sind. Beweise hierfür lieferten verschiedene, im Folgenden auch noch näher erläuterte Versuchsergebnisse, wie die Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 nach rekombinanter

Expression in *E. coli* (siehe 4.3.1.1), die Übereinstimmung der Aktivitätsstärke mit der Proteinakkumulation von NtAQI1 (siehe 4.3.1.7) und das Fehlen der Aminoacylase-Aktivität bei *AQI1*-Nullmutanten (siehe 4.4.3.1).

Um falsch positive Ergebnisse durch den Nachweis von frei vorliegenden Aminogruppen in den Pflanzenextrakten zu verhindern wurden verschiedene Kontrollansätze durchgeführt. Zum einen wurden gekochte Pflanzenextrakte in den Aktivitätstest eingesetzt, zum anderen wurden Ansätze ohne Zugabe des Substrats (acetylierte Aminosäure) und auch ohne Zugabe des Proteinextrakts durchgeführt. Bei diesen Kontrollen wurde nie Aminoacylase-Aktivität gemessen.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass das Einfrieren der pflanzlichen Proteinextrakte bei - 20 °C völligen Aktivitätsverlust von NtAQI1 hervorruft und auch das Lagern der Proteinextrakte bei 4 °C zum Sinken der Aktivität führt. Deshalb wurden Proteinextrakte immer frisch angesetzt und unmittelbar in den „Assay“ eingesetzt.

4.3.1.3 Substratspezifität von (Nt)AQI1

Über die Substratspezifität der Aminoacylase 1 aus Säugern ist bekannt, dass sie sowohl was den Aminosäure- als auch den Acylrest angeht, gering ist (CHENAULT *et al*., 1989). Bevorzugte Substratkomponenten sind neutrale, unverzweigte, aliphatische Aminosäuren mit einem kurzkettigen Acylrest, vor allem N-Acetyl-L-Methionin (BIRNBAUM *et al.,* 1952; GREENSTEIN & WINITZ, 1961).

Aufgrund dieser Erkenntnisse über die Substratspezifität der Aminoacylase 1 aus Säugern wurde nun die Substratspezifität der pflanzlichen Aminoacyalse-homologen Proteine NtAQI1 aus Tabak und AQI1 aus *Arabidopsis* untersucht. Hierzu wurden verschiedene potentielle Substrate in einer Konzentration von 10 mM in den Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) mit frischen Proteinextrakten (siehe 3.2.1) aus *N. tabacum* NN und *A. thaliana* Col-0 eingesetzt. Als potentielle Substrate wurden die Substanzen N-Acetyl-L-Methionin, Hippursäure (N-Benzoylglycin), N-Acetylglycin, N-Acetyl-L-Asparaginsäure und N-Acetyl-D-Sphingosin ausgewählt. Mit Ausnahme von N-Acetyl-D-Sphingosin waren sie alle als Substrate für tierische Aminoacylasen beschrieben worden. N-Acetyl-D-Sphingosin hätte man als pflanzliches Substrat von (Nt)AQI1 vermuten können, da es sich hierbei um eine wichtige zelluläre Signalsubstanz handelt, die aufgrund ihres strukturellen Aufbaus eine Deacylierung zuließe. In tierischen Zellen nimmt man eine Verwicklung von Sphingosin in Apoptose-Ereignisse an. Außerdem wird eine Interaktion zwischen Aminoacylase 1 und Sphingosin-Kinase 1 im tierischen System postuliert (MACEYKA *et al*., 2004).

Es zeigte sich, dass die pflanzlichen Proteine NtAQI1 und AQI1 im Gegensatz zu ihrem tierischen Homolog Acy1 eine hohe Substratspezifität bezüglich der getesteten Substanzen aufweisen. Ihnen war lediglich der Umsatz des Substrats N-Acetyl-L-Methionin in detektierbarem Maße möglich (siehe Abb. 4.3-5). Der Substratumsatz von Hippursäure, N-Acetylglycin, N-Acetyl-L-Asparaginsäure und im Falle von NtAQI1 auch N-Acetyl-D-Sphingosin konnte für beide Pflanzenproteine nicht bzw. kaum detektiert werden.

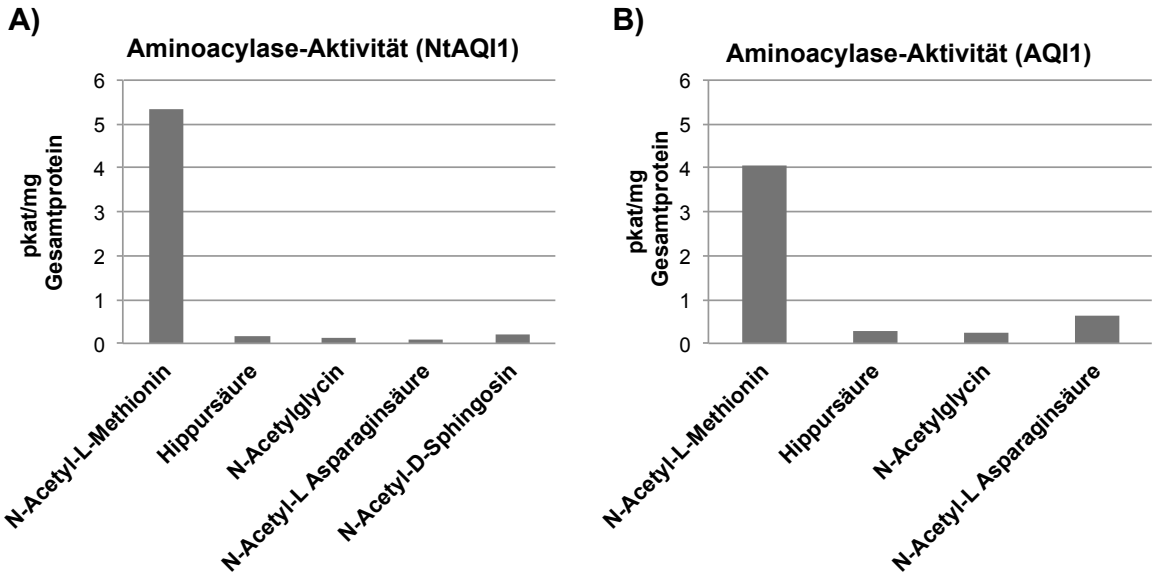


Abb. 4.3-5: Deac(et)ylierung verschiedener potentieller Substrate durch die Aminoacylase 1-homologen Proteine NtAQI1 aus Tabak (A) und AQI1 aus *Arabidopsis* (B).

4.3.1.4 Zink-Ion Abhängigkeit von NtAQI1

Es ist bekannt, dass Aminoacylasen der Familie der M20-Metallopeptidasen angehören (RAWLINGS & BARRETT, 1995). Bei der Aminoacylase 1 aus Säugern handelt es sich um ein Zink-II-Ion bindendes Metalloprotein (PALM & RÖHM, 1995; LINDNER *et al*., 2003).

Im Folgenden wurde überprüft, ob die Aminoacylase-Enzymaktivität des pflanzlichen Proteins NtAQI1 abhängig von der Bindung eines Zink-II-Ions ist. Hierzu wurde ein Proteinextrakt (siehe 3.2.1) aus Blättern von *N. tabacum* NN erzeugt. Durch verschiedene Behandlungsschritte wurde proteingebundenes Zink entfernt und später wieder zugegeben. Alle Behandlungsschritte wurden in den Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) eingesetzt, um das Vorhandensein der Enzymaktivität mit und ohne Zink zu überprüfen. Als erste Probe (P 1) wurde das unbehandelte Proteinextrakt in den Aktivitätstest eingesetzt, um die Ausgangsaktivität zu erfassen. Um Zink-II-Ionen zu entfernen, wurde dem Proteinextrakt der Chelator EDTA (10 mM) zugesetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei RT wurde eine zweite Probe (P 2) genommen und in den Aktivitätstest eingesetzt. In dieser Probe sollte proteingebundenes Zink durch den Chelator verdrängt worden sein. Nun erfolgte eine Dialyse des Extraktes über Nacht (siehe 3.2.6.2), um den

Chelator EDTA wieder zu entfernen. Anschließend konnte das Zink-II-Ion in Form von $ZnCl_2$ (10 mM) durch 20 minütige Inkubation bei RT wieder rückgeführt und auch diese Probe (P 3) im Aktivitätstest geprüft werden.

Die Abhängigkeit der Aminoacylase-Aktiviät des Enzyms NtAQI1 von der Bindung eines Zink-II-Ions konnte bewiesen werden (siehe Abb. 4.3-6). Nach Entfernen von proteingebundenem Zink mittels EDTA ging die Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 nahezu vollständig verloren. Durch erneute Zugabe von Zink konnte die Aktivität teilweise wieder rückgeführt werden.

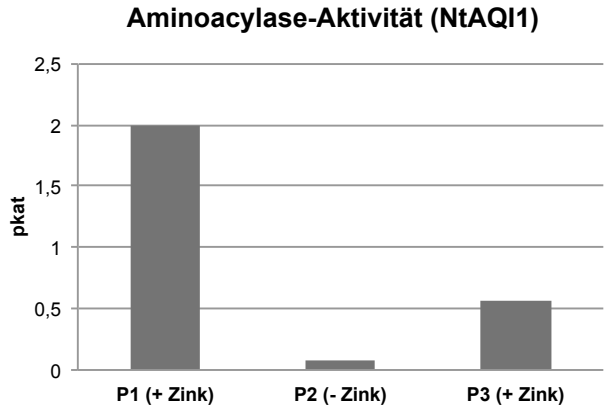


Abb. 4.3-6: Zn^{2+}-Abhängigkeit der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1. Mittels eines „Ninhydrin-Assays“ wurde die Aminoacylase-Aktivität in Proteinextrakten von *N. tabacum* NN unbehandelt (P 1), nach entfernen der proteingebundenen Zink-II-Ionen mittels EDTA (P 2) und nach Rückführung der Zink-II-Ionen (P 3) gemessen.

Dasselbe Ergebnis ezielten KUHNS *et al*. mit dem Acy1-homologen Protein L-ACY-1 aus *Heliothis virescens* (KUHNS *et al*., 2012). Dieses Resultat liefert Hinweise darauf, dass gebundenes Zink bei Proteinen der Acylase-Familie eine wichtige Rolle bei der Katalyse spielt.

4.3.1.5 FPLC-Analyse

Es wurde mehrfach nachgewiesen, dass Proteine des Aminoacylase 1-Typ als Homodimere vorliegen (COOK *et al.,* 1993; D'AMBROSIO *et al*., 2003). Um dies auch für das pflanzliche homologe Protein NtAQI1 aus Tabak zu überprüfen, wurde ein Proteinextrakt aus *N. tabacum* NN mittels „Fast Protein Liquid Chromatography“ (FPLC) (siehe 3.2.3) analysiert. Hierbei wurden die Proteine des Proteingemisches der Größe nach aufgetrennt und in einzelnen Fraktionen portioniert. Um den Proteinfraktionen die richtigen Größen zuordnen zu können, wurde eine Bezugskurve mit BSA erstellt. Anschließend wurde in den Proteinfraktionen nach NtAQI1 gesucht, indem die einzelnen Fraktionen in den „Ninhydrin-Assay“ (siehe 3.2.8) eingesetzt wurden, mit dem sich die Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 nachweisen lässt.

Aminoacylase-Aktivität konnte in den Fraktionen 63 - 65 nachgewiesen werden, wobei der Aktivitäts-Peak eindeutig bei Fraktion 64 lag (siehe Abb. 4.3-7).

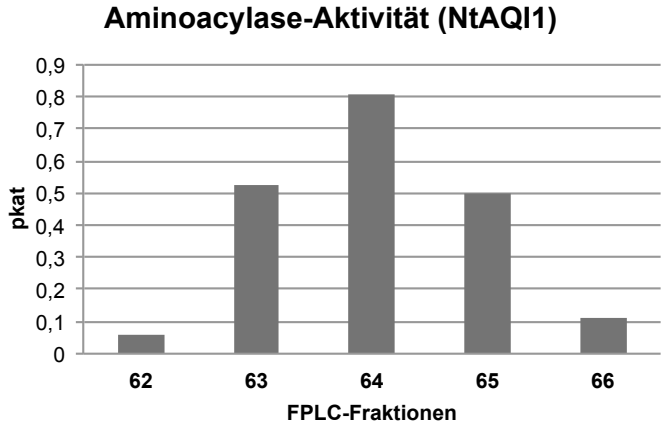


Abb. 4.3-7: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität in Proteinfraktionen von *N. tabacum* NN nach Auftrennen der Proteine mittels FPLC.

Proteine der Fraktion 64 haben laut Eichung mit BSA eine Größe von ca. 180 kDa. Dies würde bedeuten, dass NtAQI1 (45 kDa) in seiner Acylase-aktiven Form in löslichen Proteinextrakten von *N. tabacum* als Tetramer vorliegt.

4.3.1.6 Enzymaktivität von NtAQI1 in verschiedenen Pflanzenorganen von *N. tabacum*

Da die Expression für AQI1 laut „Microarray"-Daten (siehe Abb. 1.3-5) für alle Pflanzenorgane bestätigt ist und bisher immer nur Pflanzenblätter in den Aminoacylase-Aktivitätstest eingesetzt wurden, sollte nun überprüft werden, ob NtAQI1 auch in Blüten und Wurzeln von Tabakpflanzen aktiv ist. Hierzu wurden Proteinextrakte (siehe 3.2.1) aus Blüten und Wurzeln von *N. tabacum* NN erstellt und diese im „Ninhydrin-Assay" (siehe 3.2.8) auf Aminoacylase-Aktivität untersucht. Um die Proteine besser aus den Wurzeln extrahieren zu können, wurde vor dem Mörsern der Proben eine kleine Menge Graphitstaub zugefügt.

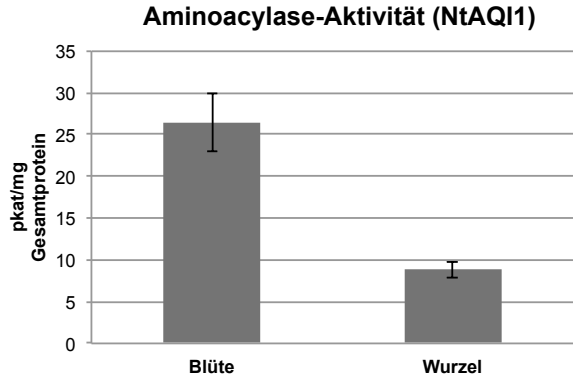


Abb. 4.3-8: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in Blüten und Wurzeln von *N. tabacum* NN. (n = 3)

Es konnte gezeigt werden, dass NtAQI1 sowohl in Blüten, als auch in Wurzeln von *N. tabacum* aktiv ist (siehe Abb. 4.3-8).

Die gemessene Aminoacylase-Aktivität der Wurzeln war vergleichbar mit der von jungen Blättern. Die Aktivität in den Blüten übertraf diese um ein Vielfaches.

4.3.1.7 Enzymaktivität von (Nt)AQI1 in Blättern unterschiedlichen Alters

Im Folgenden wurde die Enzymaktivität von NtAQI1 in Blättern unterschiedlichen Alters untersucht. Dies sollte dazu dienen zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen NtAQI1 und Seneszenz bzw. Vitalität von Pflanzenorganen besteht. Die Blattseneszenz ist eine besondere Form des programmierten Zelltods (PCD) (GRAY & JOHAL, 1998; LIM *et al*., 2003), die immer mit einer erhöhten H_2O_2-Produktion bzw. -Akkumulation einher geht (PETROV & BREUSEGEM, 2012). Da eine Regulatorfunktion von NtAQI1 beim H_2O_2-Transport durch Aquaporine vermutet wird, ist eine Beteiligung von NtAQI1 an Seneszenzprozessen denkbar. Es wurden Proteinextrakte (siehe 3.2.1) aus unterschiedlich alten Blättern einer *N. tabacum* NN Pflanze in einen „Ninhydrin-Assay“ (siehe 3.2.8) eingesetzt und auf Aminoacylase-Aktivität überprüft.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 einem deutlichen Altersgradienten unterliegt, wobei die Enzymaktivität im jüngsten Blatt am stärksten ist und mit dem älter werden der Blätter stark nachlässt (siehe Abb. 4.3-9). Die Aktivität von NtAQI1 korreliert also mit der Vitalität der Blätter.

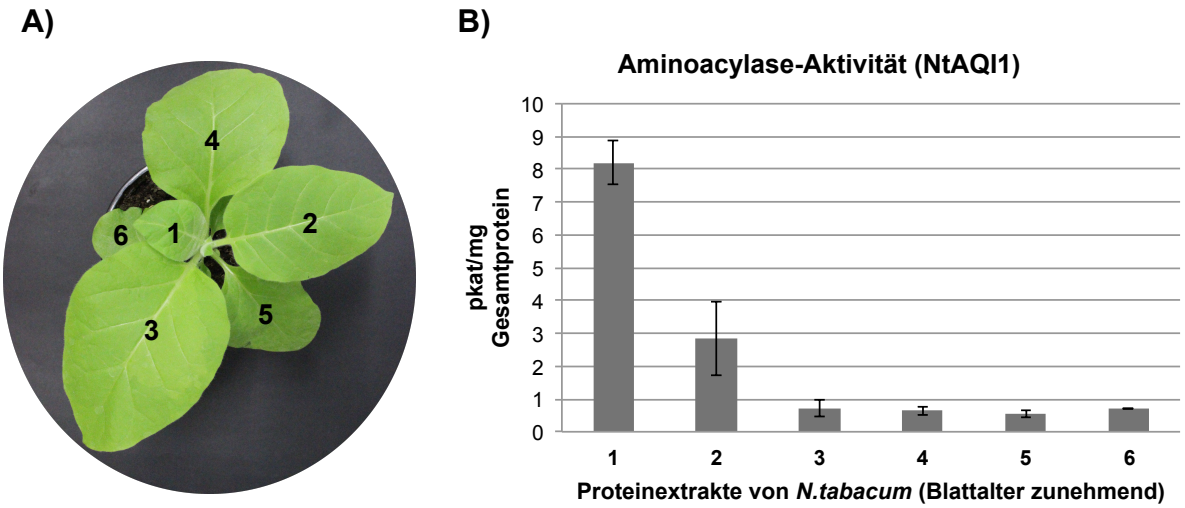


Abb. 4.3-9: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in unterschiedlich alten Blättern von *N. tabacum* NN (n = 3)

Ob auch das Alter der Pflanze hierbei eine Rolle spielt und in wie weit sich dieser Aktivitätsgradient bei Pflanzen höherer Blattstadien verschiebt, wurde mit unterschiedlich alten *N. tabacum* NN Pflanzen analysiert. Es wurden Pflanzen herangezogen, die sich im 4-, 6-, 10-, 12-, und 15-Blattstadium befanden. Alle Blätter dieser Pflanzen wurden zu Proteinextrakten verarbeitet (siehe 3.2.1). Anschließend wurde die Aminoacylase-Aktivität aller Extrakte im „Ninhydrin-Assay“ (siehe 3.2.8) gemessen.
Der NtAQI1 Aktivitäts-Gradient wurde bei allen Pflanzen, also in jeder Altersstufe gefunden (siehe Abb. 4.3-10). Die Aktivitätsstärke im jüngsten Blatt war bei allen Pflanzen annähernd gleich, unabhängig davon in welchem Blattstadium sich die Pflanzen befanden. Innerhalb der 4 jüngsten Blätter konnte bei allen Pflanzen ein ähnlich starker Aktivitätsabfall gemessen werden. Ab dem 5. Blatt war kaum noch Enzymaktivität messbar, unabhängig davon wie viele Blätter noch folgten.

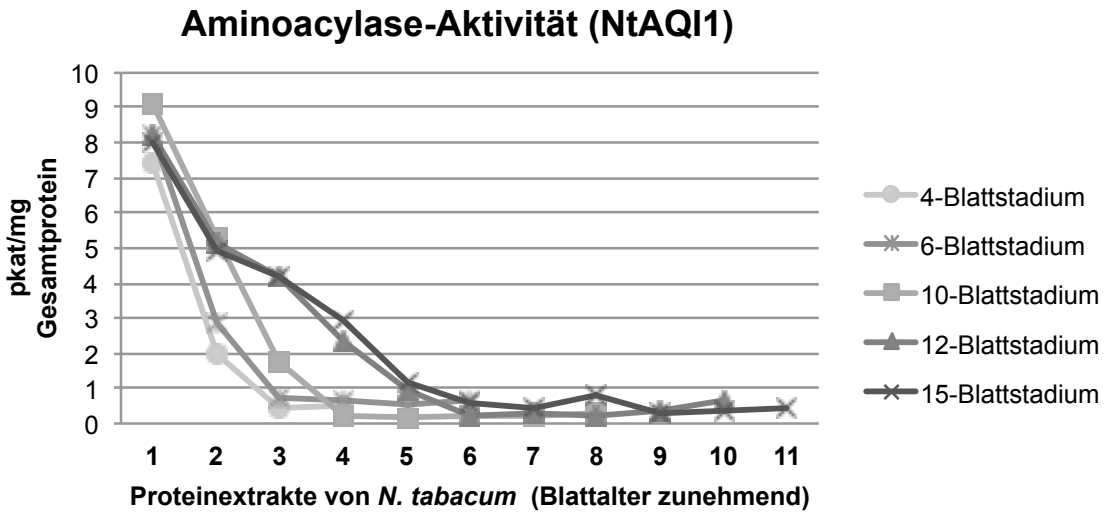


Abb. 4.3-10: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in unterschiedlich alten Blättern von Pflanzen (*N. tabacum* NN) unterschiedlicher Blattstadien.

Das Gesamtalter der Pflanze hat also keinen Einfluss auf den Aktivitätsgradienten der Blätter. Dieser spiegelt sich immer in den 4 - 5 jüngsten Blättern der Pflanze wieder.

Nun sollte auch AQI1 aus *A. thaliana* bezüglich seiner Enzymaktivität in unterschiedlich altem Blattgewebe untersucht werden. Da es sich bei *Arabidopsis* um eine Rosettenpflanze handelt, war es nur schwer möglich alle Blätter einem Altersgradienten folgend zu untersuchen. Deshalb wurden 3 Rosettenblätter einer Pflanze ausgewählt, denen eindeutig die Altersstufen jung (1), mittel (2) und alt (3) zugeordnet werden konnten. Diese Blätter wurden vor Sprosswachstum und Ausbildung des Blütenstandes geerntet (siehe Abb. 4.3-11, A).

Außerdem wurde die AQI1-Enzymaktivität der Gesamtheit der Rosettenblätter mit der Aktivität der Gesamtheit an Blättern des Blütenstandes/Sprosses verglichen. Hierbei können die Rosettenblätter als alte und die Blätter des Blütenstandes/Sprosses als junge Blätter betrachtet werden (siehe Abb. 4.3-11, B).

Es zeigte sich, dass auch die Aktivität von AQI1 in *Arabidopsis* einem altersabhängigen Gradienten folgt. Vor Ausbildung des Blütenstandes, solange die Pflanzen noch keinen Spross gebildet hatten, war in den Rosettenblättern noch Aminoacylase-Aktivität messbar. Auch diese folgte einem leichten Aktivitätsgradienten von jung nach alt (siehe Abb. 4.3-11, A).

Sobald es aber zum Sprosswachstum und somit zur Ausbildung des Blütenstandes und zur Seneszenz der Rosettenblätter kam, nahm die AQI1-Enzymaktivität der Rosettenblätter ab. In den jungen Blättern des Blütenstandes hingegen war die Aminoacylase-Aktivität deutlich messbar (siehe Abb. 4.3-11, B).

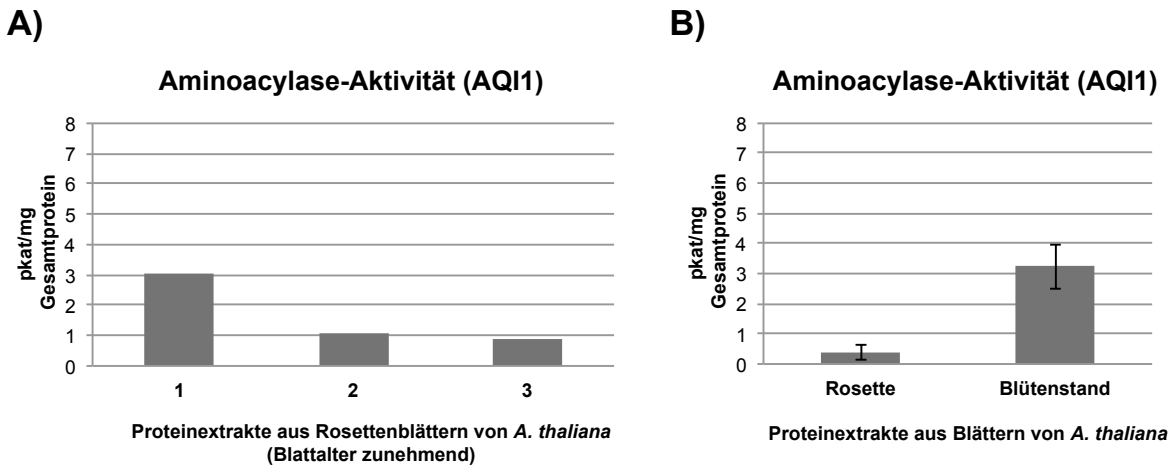


Abb. 4.3-11: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von AQI1. Aminoacylase-Aktivität in Rosettenblättern von *A. thaliana* mit zunehmendem Blattalter, noch vor Sprosswachstum bzw. Ausbildung des Blütestandes (A). Vergleich der Aminoacylase-Aktivität von AQI1 in Rosettenblättern und Blättern des Blütenstandes/Sprosses (n=3) (B).

Hier lässt sich ein Zusammenhang zur H_2O_2-Akkumulation herstellen. Misst man die Konzentration von H_2O_2 in verschieden alten *Arabidopsis* Pflanzen, steigt sie in Blättern genau zum Zeitpunkt der Spross- und Blüteninduktion an (MIAO *et al*., 2004; ZIMMERMANN & ZENTGRAF, 2006), also genau dann, wenn die Enzymaktivität von AQI1 abnimmt.

4.3.2 Untersuchung der Genexpression von *NtAQI1 in planta*

Die Ergebnisse der Aktivitätsstudien bezüglich (Nt)AQI1 (siehe 4.3.1) warfen einige Fragen auf. Vor allem die Frage der Regulation des Enzyms stand hier im Fokus. Nachdem nachgewiesen wurde, dass die Aminoacylase-Aktivität von (Nt)AQI1 entlang eines altersabhängigen Gradienten verläuft und in älteren Blättern kaum noch vorhanden ist, sollte zunächst geklärt werden, auf welcher Ebene die Regulation dieser Enzymaktivität statt findet. Als Erstes wurde die Möglichkeit der Regulation auf Transkriptebene überprüft. Transkriptomanalysen zeigen, dass 12 - 16 Prozent aller *Arabidopsis* Gene während der Blattseneszenz umprogrammiert und entweder aktiviert oder abgeschaltet werden (BUCHANAN-WOLLASTON *et al*., 2003, 2005; GUO *et al*., 2004; ZENTGRAF *et al*., 2004).

4.3.2.1 Transkriptakkumulation von *NtAQI1* in verschiedenen Pflanzenorganen von *N. tabacum*

Bei *A. thaliana* wurde das höchste Expressionslevel für AQI1 mittels „Microarray"-Analysen in der Wurzel detektiert (*Arabidopsis* eFP Browser, bar.utoronto.ca, WINTER *et al*., 2007, siehe Abb. 1.3-5). Jedoch konnte bei *N. tabacum* in den Blüten eine stärkere NtAQI1-Enzymaktivität gemessen werden, als in Blättern und Wurzeln (siehe 4.3.1.6). Im Folgenden wurde untersucht ob dieser Aktivitätsunterschied mit einer unterschiedlichen Transkriptakkumulation von NtAQI1 in den einzelnen Pflanzenorganen übereinstimmt. Hierzu wurde zunächst RNA aus Blüten, Blättern und Wurzeln von *N. tabacum* NN isoliert (siehe 3.1.14). Diese diente dazu mittels RT-PCR (siehe 3.1.14.1 und 3.1.11) die Menge an *NtAQI1*-Transkripten der einzelnen Pflanzenorgane zu vergleichen. Da die Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in Blüten deutlich erhöht war, würde man im Falle der Proteinregulation auf Transkriptebene eine sichtbar größere Menge des Transkripts in Blüten, im Vergleich zu Blättern und Wurzeln erwarten.

Es konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Enzymaktivität in Blüten nicht mit einer verstärkten Transkriptakkumulation übereinstimmt (siehe Abb. 4.3-12).

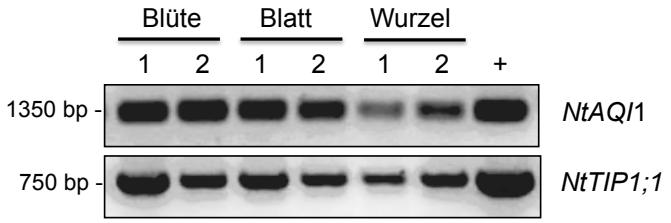


Abb. 4.3-12: Transkriptanalyse von *NtAQI1* in Blüten, Blättern und Wurzeln von *N. tabacum* NN. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Aquaporin *NtTIP1;1* detektiert. Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion (+) diente Plasmid-DNA, welche die cDNA-Sequenzen von *NtAQI1* bzw. *NtTIP1;1* enthält.

NtAQI1 scheint ähnlich wie *NtTIP1;1* in allen Pflanzenorganen exprimiert zu werden. Die etwas schwächere Detektion der *NtAQI1*-Transkripte in Wurzeln lässt sich durch gewebebedingte Schwierigkeiten bei der RNA-Isolation aus Wurzeln erklären. Dies ist auch anhand der Transkriptmenge von *NtTIP1;1* in Wurzeln zu sehen.
Da sich die Transkriptmenge von *NtAQI1* in Blüten und Blättern nicht mit der Stärke der Enzymaktivität deckt, konnte die Proteinregulation auf Transkriptebene in diesem Fall ausgeschlossen werden.

4.3.2.2 Transkriptakkumulation von *NtAQI1* in Blättern unterschiedlichen Alters

Aufgrund des altersabhängigen Aktivitätsgradienten von NtAQI1 (siehe 4.3.1.7) wurde auch die Transkriptakkumulation von *NtAQI1* in unterschiedlich alten Blättern einer *N. tabacum* NN Pflanze untersucht. Mittels RT-PCR (siehe 3.1.14.1) wurde überprüft, ob der Aktivitätsabfall in älteren Blättern mit einer verminderten *NtAQI1*-Transkriptakkumulation in diesen Blättern übereinstimmt.
Auch hier stimmte die Enzymaktivität von NtAQI1 nicht mit der Transkriptmenge überein. *NtAQI1*-Transkripte konnten in Blättern jeden Alters in gleichem Maße gefunden werden (siehe Abb. 4.3-13). Ein altersabhängiger Transkriptgradient wurde nicht gefunden. Lediglich im jüngsten Blatt wurde eine etwas geringere Transkriptakkumulation von NtAQI1 detektiert, welche keinesfalls mit der Aminoacylase-Aktivität übereinstimmt, die in diesem Blatt am stärksten war.

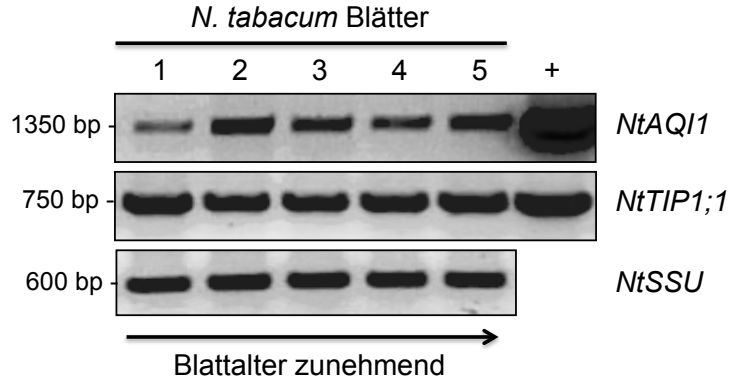


Abb. 4.3-13: Transkriptanalyse von *NtAQI1* in Blättern unterschiedlichen Alters von *N. tabacum* NN. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR. Als Kontrollen wurden das konstitutiv exprimierte Aquaporin *NtTIP1;1* und die kleine Untereinheit von RuBisCo (*NtSSU*) detektiert. Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion (+) diente Plasmid-DNA, welche die cDNA-Sequenzen von *NtAQI1* bzw. *NtTIP1;1* enthält.

Somit konnte auch hier die Regulation von *NtAQI1* auf Transkriptebene ausgeschlossen werden. *NtAQI1* wird in allen Pflanzenorganen und in Blättern jeden Alters konstitutiv exprimiert.

4.3.3 Untersuchung der Proteinakkumulation von NtAQI1 *in planta*

Wie gezeigt werden konnte, wird die Enzymaktivität von NtAQI1 nicht per Transkriptakkumulation reguliert. Diese Erkenntnis warf die Frage nach einer post-translationalen Reguation von NtAQI1 auf. Im Folgenden wurde dies in Form von Proteinanalysen und Charakterisierung von möglichen post-translationalen Modifikationen des nativen Enzyms NtAQI1 *in planta* geklärt.

4.3.3.1 Herstellung eines spezifischen anti-NtAQI1-Antikörperserums

Um die Proteinakkumulation von NtAQI1 *in planta* analysieren zu können, musste zuerst ein spezifisches anti-NtAQI1 Antiserum hergestellt werden. Hierzu wurde NtAQI1 rekombinant in *E. coli* exprimiert und nach anschließender Extraktion und Aufreinigung zu einer Antikörper produzierenden Firma (Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg) geschickt. Dort wurde mittels Injektion der Proteinlösung in Kaninchen ein spezifisches Antiserum erstellt.

Rekombinante Expression von NtAQI1ΔPWW als MBP-Fusionsprotein in *E. coli*:

In einem vorrangegangenen Versuch war es nicht möglich das Volllängenprotein NtAQI1 nach heterologer Expression in *E. coli* im Expressionsvektor pGEX-3X in seiner nativen Form zu isolieren. Das entstandene GST-Fusionsprotein konnte während der Aufreinigung mittels Säulen-Affinitätschromatographie nicht wieder aus der Affinitäts-Matrix eluiert werden (siehe 4.3.1.1). Dies lag vermutlich an einer verstärkten Aggregatbildung des Proteins.

Aus diesem Grund wurde dieses Mal nur eine Deletion von NtAQI1 exprimiert, bei der die beiden in Aminoacylasen konservierten PWW-Motive (PWW = AS_{219}-AS_{221} und VWW = AS_{359}-AS_{361}) entfernt wurden (NtAQI1ΔPWW), für die eine Beteiligung bei der Proteinaggregation vermutet wird. Durch die Deletion der PWW-Motive sollte die hydrophobe Wechselwirkung zwischen einzelnen Proteinmolekülen vermieden werden, mit dem Ziel die Aggregation von NtAQI1 zu verhindern. Statt dem Expressionsvektor pGEX-3X wurde dieses Mal der Expressionsvektor pMAL-c2X (siehe 2.3.9) verwendet. Bei Expression entsteht ein 66,5 kDa großes Fusionsprotein aus der Deletionsmutante NtAQI1ΔPWW (654 bp, ca. 24 kDa) und einem Maltose-Bindeprotein (MBP, 42,5 kDa) aus *E. coli* (Vektorkonstrukt siehe 2.3.9 und Abb. 4.3-14).

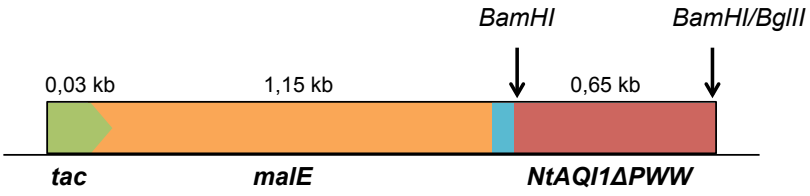


Abb. 4.3-14: Schematische Darstellung von pMAL-c2X:NtAQI1ΔPWW. Durch Induktion des regulierbaren *tac*-Promotors entsteht ein Fusionsprotein aus NtAQI1ΔPWW und einem Maltose-Bindeprotein (MBP, codierendes Gen *malE*).

Anschließend wurde das Konstrukt in *E. coli* DH5α (siehe 2.2.3) transformiert (siehe 3.1.2). Zur Kontrolle des Expressionserfolgs des MBP-Fusionsproteins erfolgte eine Induktion der Proteinexpression mit IPTG (siehe 3.2.6) und anschließend der Nachweis von exprimiertem Fusionsprotein mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7). Die hierfür nötige denaturierende Proteinextraktion erfolgte wie unter 3.2.5.1 beschrieben.

In allen induzierten Proteinproben konnte das Fusionsprotein aus NtAQI1ΔPWW (ca. 24 kDa) und MBP (42,5 kDa) deutlich nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.3-15).

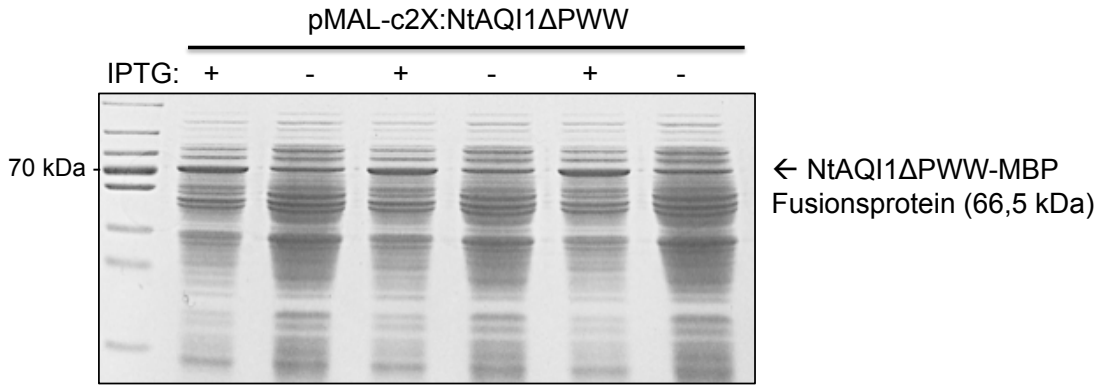


Abb. 4.3-15: Nachweis des rekombinant exprimierten Fusionsproteins aus NtAQI1ΔPWW und MBP (66,5 kDa). SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Proteingels mit (+) und ohne (-) Induktion der Expression mittels IPTG.

Aufreinigung von NtAQI1ΔPWW-MBP mittels Säulen-Affinitätschromatographie:

Um ein spezifisches Antikörperserum mit rekombinant exprimierten Proteinen herstellen zu können, müssen diese in einer Konzentration von 0,3 - 2 mg/ml in einer physiologischen, nicht toxischen Lösung vorliegen. Um dies zu gewährleisten wurde eine Großexpression (siehe 3.2.6) mit einer der erfolgreich induzierten Bakterien-Expressionskulturen angesetzt. Die Aufreinigung großer Mengen des MBP-gekoppelten Fusionsproteins erfolgte per Säulen-Affinitätschromatographie (siehe 3.2.6.1) über eine Amylose Matrix. Hierbei macht man sich die Affinität von MBP gegenüber Maltose zu

Nutze. Der Erfolg dieser Proteinaufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7) analysiert. Noch vor Beginn der Affinitätschromatographie wurden zwei Proben genommen, um den Expressionserfolg nochmals zu überprüfen. Minus (-) kennzeichnet die Bakterienprobe vor Induktion mit IPTG, Plus (+) die Probe nach erfolgter IPTG-Induktion. Die Proben P1 - P3 stellen die einzelnen Waschschritte während der Affinitätschromatographie dar. E1 - E5 sind die Eluate, in welchen das gereinigte Fusionsprotein enthalten sein sollte. GH kennzeichnet einen letzten Waschschritt mit Guanidin-Hydrochlorid, der gegebenenfalls aggregiertes Protein, welches sich mittels Maltose-Elutionspuffer nicht aus der Affinitätsmatrix lösen ließ, denaturieren und somit herauslösen sollte.

Anhand des Proteingels war der Erfolg der Affinitätschromatographie ersichtlich (siehe Abb. 4.3-16). Die Expression konnte mittels IPTG (+) induziert werden. Die Waschschritte P1 und P2 enthielten noch bakterielles Protein, wohingegen im Waschschritt P3 kein Protein mehr nachweisbar war. In den Eluaten E2 und E3 konnte dann das gereinigte Fusionsprotein detektiert werden. Außerdem wurden bei einer Größe von ca. 40 kDa Proteinbanden detektiert, welche vermutlich Bruchstücke des Fusionsproteins darstellen.

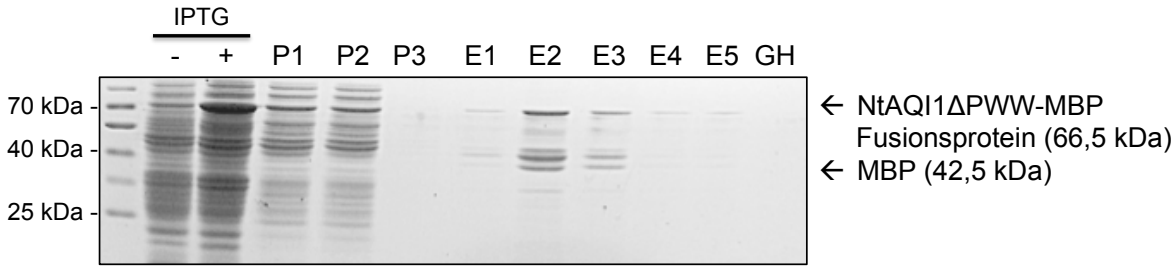


Abb. 4.3-16: SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung des Proteingels einer Säulen-Affinitätschromatographie von rekombinant exprimiertem NtAQI1ΔPWW-MBP Fusionsprotein. Dargestellt ist der Nachweis der Proteinexpression vor (-) und nach (+) Induktion der Expression mit IPTG, die einzelnen Waschschritte während der Affinitätschromatographie (P1 - P3), die Proteineluate (E1 - E5) und ein letzter denaturierender Waschschritt mit Guanidin-Hydrochlorid (GH).

Die Eluate E2 und E3 wurden vereint, gegen Natrium-Phosphatpuffer dialysiert und anschließend mittels PEG 6000 aufkonzentriert (siehe 3.2.6.2), um die benötigte Proteinkonzentration für die Antikörper-Produktion zu erreichen. Die erzielte Endkonzentration der Proteinlösung betrug 0,8 mg/ml. Diese Proteinlösung wurde zu Davids Biotechnologie GmbH nach Regensburg geschickt, um einen Monat später ein polyklonales anti-NtAQI1 Antikörperserum (anti-NAQ; siehe 2.6.1.4) zu erhalten.

4.3.3.2 Analyse der Proteinakkumulation von NtAQI1 in Blättern unterschiedlichen Alters

Nach Erhalt des spezifischen anti-NtAQI1 Antikörperserums (siehe 2.6.1.4), wurde dieses für Proteinanalysen *in planta* eingesetzt. Da das Ergebnis des altersabhängigen Aktivitätsgradienten von (Nt)AQI1 (siehe 4.3.1.7) nicht mit der Transkriptakkumulation des Proteins korreliert, sollte nun die Proteinakkumulation von NtAQI1 untersucht und eine post-translationale Regulation überprüft werden. Es wurden Proteine aus Blättern zunehmenden Alters einer *N. tabacum* NN Pflanze extrahiert. Da aufgrund der konservierten PWW-Motive die Möglichkeit einer Membranassoziation von NtAQI1 in Erwägung gezogen wurde, mussten Proteinextrakte erstellt werden, die zum einen die lösliche Proteinfraktion und zum anderen die membrangebundene Proteinfraktion enthielten (siehe 3.2.1). Die fertigen Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7) aufgetrennt und anschließend mittels Immunodetektion (siehe 3.2.7.2) mit dem anti-NtAQI1 Antikörperserum analysiert.

Sowohl in der Membranproteinfraktion, als auch in der löslichen Proteinfraktion konnte das NtAQI1-Monomer (45 kDa) nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.3-17). Laut Nukleotid- bzw. Aminosäure-Sequenz des Volllängenproteins (siehe 5.1) würde man für NtAQI1 eine Größe von 50 kDa erwarten. Allerdings besitzt NtAQI1 am N-Terminus eine ER-Lokalisationssequenz. Solche ER-Signale werden bei der Prozessierung von Proteinen abgespalten, nachdem sie ins ER gelangt sind und bevor sie an ihren endgültigen Standort weiter geleitet werden. Daher wird für das native NtAQI1-Monomer *in planta* eine Größe von ca. 45 kDa angenommen. Weitere Proteinbanden konnten mit Größen von 60 kDa und größer detektiert werden. Die ca. 60 kDa großen Proteinbanden stellen eine ubiquitinierte Form von NtAQI1 dar, was in späteren Versuchen (siehe 4.3.4.2) noch gezeigt werden konnte. Bei den größeren Proteinbanden, ab ca. 90 kDa handelt es sich vermutlich um Oligomere von NtAQI1. In der Membranproteinfraktion wurde eine deutlich stärkere Proteinakkumulation für NtAQI1 (45 kDa) gefunden, als in der Fraktion der löslichen Proteine. Dieser Befund bestärkt die Annahme, dass es sich bei NtAQI1 um ein membranassoziiertes Protein handelt, wie es auch für Proteine vom Aminoacylase 1-Typ angenommen wird (PALM & RÖHM, 1995).

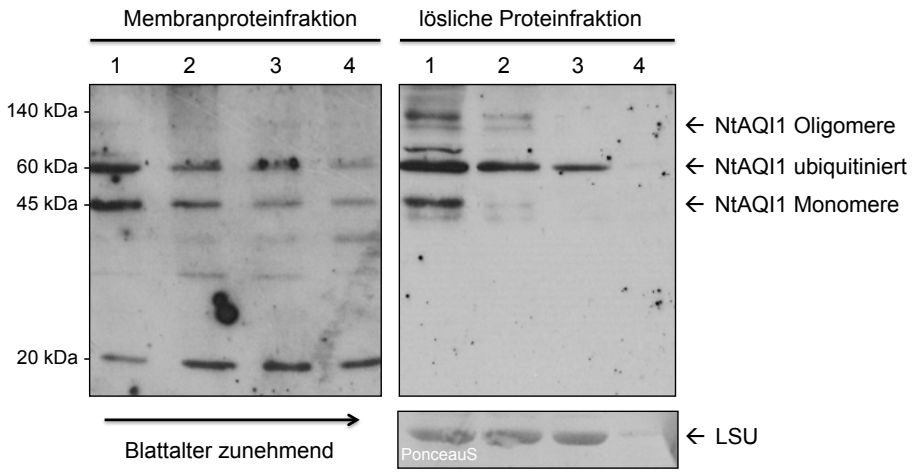


Abb. 4.3-17: Immunodetektion (anti-NtAQI1) von membrangebundenem und löslichem NtAQI1 (45 kDa) in Blättern zunehmenden Alters von *N. tabacum* NN. Eine Ponceau S Färbung wurde als Ladekontrolle mitgeführt und die große Untereinheit von RuBisCo (LSU) als Referenz genutzt.

Ein weiteres wichtiges Resultat dieses Versuchs war die Analyse der Proteinakkumulation in unterschiedlich alten Blättern. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an NtAQI1 (45 kDa) mit dem Alter der Blätter deutlich abnahm (siehe Abb. 4.3-17). Gleichzeitig nahm die Menge an Abbauprodukten des Proteins zu, was sich in Form von Proteinbanden mit Größen zwischen 20 und 45 kDa zeigte, die mit dem älter werden der Blätter vermehrt auftraten. Es besteht also auch bezüglich der Proteinakkumulation ein altersabhängiger Gradient. Wie hier gezeigt werden konnte, kommt dieser durch Proteinabbau in älteren Blättern zustande. Der Gradient korreliert mit der Enzymaktivität von NtAQI1 und der Vitalität der Blätter. Die post-translationale Regulation von NtAQI1 gilt somit als bestätigt. Wodurch der Proteinabbau in älteren Blättern gesteuert wird war jedoch noch unklar. Eine denkbare Möglichkeit wäre die Steuerung des Proteinabbaus durch Ubiquitinierung von NtAQI1.

4.3.4 Charakterisierung post-translationaler Modifikationen von NtAQI1 *in planta*

Bei der Immunodetektion von NtAQI1 in Proteingelen tauchten Proteinbanden auf, die aufgrund ihrer Größe (60 kDa und größer) nicht eindeutig zuzuordnen waren (siehe Abb. 4.3-17). Da auch die Frage der Regulation des Proteinabbaus in älteren Blättern noch nicht geklärt war, sollte überprüft werden, ob NtAQI1 post-translational modifiziert und somit eventuell reguliert wird.

4.3.4.1 Überprüfung einer Glycosylierung von NtAQI1

Eine Vielzahl eukaryotischer Proteine werden post-translational glykosyliert. Dies dient sehr unterschiedlichen Funktionen, wie der Proteinstabilität, der Proteinkonformation oder auch dem „Proteintargeting“ (BROOKS, 2006).

Bei der Aminoacylase 1 aus Schweineniere wurden zwei potentielle Glykosylierungsbereiche beschrieben, wobei bisher allerdings noch keine Kohlenhydrate im gereinigten Enzym nachgewiesen werden konnten (PITTELKOW *et al*., 1998). Per Sequenzanalyse mit dem „Expert Protein Analysis System“ (ExPASy; YinOYang 1.2 Server, Technical University of Denmark, CBS) wurde auch für NtAQI1 eine mögliche Glykosylierung vorhergesagt. Im Folgenden wurde dies in Proteinextrakten der löslichen und der Membranproteinfraktion einer *N. tabacum* NN Pflanze untersucht. Mit Hilfe von deglycosylierenden Enzymen sollte festgestellt werden, ob sich Saccharidgruppen von NtAQI1 lösen lassen. Dies ließe sich anhand eines Größenverlusts der Proteinbande im SDS-Gel detektieren. Die Proteinextrakte wurden in einen Reaktionsansatz mit einem Protein Deglycosylierungs-Mix eingesetzt (siehe 3.2.4). Als Kontrolle wurde das Glycoprotein Fetuin verwendet. Der Erfolg der Deglycosylierung wurde mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7) kontrolliert.

Eine Glycosylierung von NtAQI1 konnte anhand dieses Ergebnisses ausgeschlossen werden. Die Größe der Proteinbanden veränderte sich auch nach Behandlung der Proteinextrakte mit deglycosylierenden Proteinen nicht (siehe Abb. 4.3-18). Das bedeutet, dass keine Saccharidreste vom Protein abgespalten wurden. Sowohl in der löslichen, als auch in der Membranprotein-Fraktion blieben die 45 kDa und die 60 kDa großen Proteinbanden unverändert. Der Größenverlust des Glykoproteins Fetuin bestätigte den Erfolg der Deglykosylierungs-Reaktion.

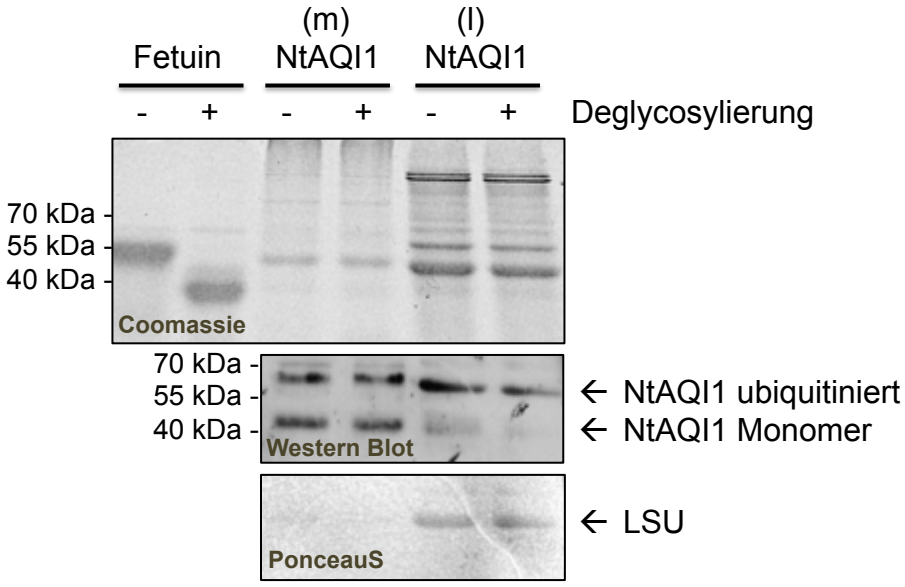


Abb. 4.3-18: Analyse einer möglichen Glycosylierung von NtAQI1. Dargestellt sind Proteingele nach Coomassie-Färbung bzw. Immunodetektion. Aufgetragen wurden membrangebundene (m) und lösliche (l) Proteinextrakte von *N. tabacum*, vor (-) und nach (+) Behandlung mit deglykosylierenden Enzymen. Das Glykoprotein Fetuin diente als Kontrolle. Eine Ponceau S Färbung der Nitrozellulosemembran wurde als Ladekontrolle mitgeführt und die große Untereinheit von RuBisCo (LSU) als Referenz genutzt.

4.3.4.2 Überprüfung einer Ubiquitinierung von NtAQI1

In jüngsten Proteomik-Studien mit *A. thaliana* Keimlingen konnten fast 950 Ubiquitinierungs-Ziele gefunden werden. Darunter befindet sich auch das Aminoacylase 1 homologe Protein AQI1 (KIM *et al*., 2013). Aufgrund dieses Befundes wurde auch NtAQI1 hinsichtlich der Möglichkeit einer post-translationalen Modifikation durch Ubiquitinierung überprüft.

Es wurden Proteinextrakte der löslichen (l) und der Membranprotein-Fraktion (m) von *N. tabacum* NN Blättern hergestellt. Auch hier wurden die Blätter einem Altersgradient folgend ausgewählt. Mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7) und Immunodetektion (siehe 3.2.7.2) mit einem anti-Ubiquitin-Antkörperserum (siehe 2.6.1.6) wurde die Ubiquitinierung von NtAQI1 analysiert.

In den Blattproben von *N. tabacum* konnten eindeutig ubiquitinierte Proteinbanden detektiert werden (siehe Abb. 4.3-19). Diese waren hauptsächlich in der Membranprotein-Fraktion mit einer Größe von ca. 53,5 und 62 kDa zu finden.

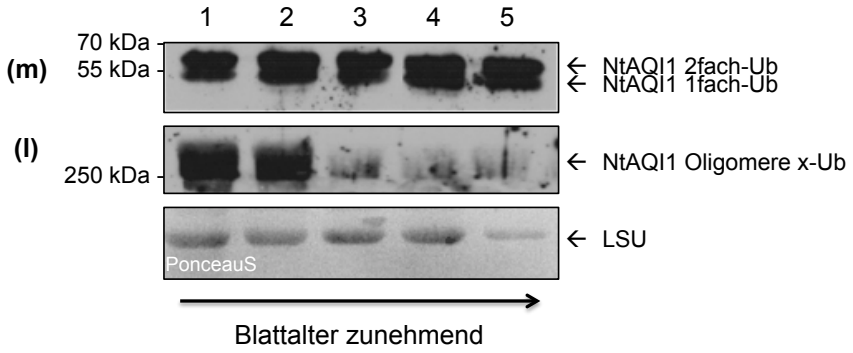


Abb. 4.3-19: Immunodetektion von ubiquitiniertem NtAQI1 in der löslichen (l) und membrangebundenen (m) Proteinfraktion von Blattproben einer *N. tabacum* NN Pflanze (Blattalter zunehmend). Eine Ponceau S Färbung der Nitrozellulosemembran wurde als Ladekontrolle mitgeführt und die große Untereinheit von RuBisCo (LSU) als Referenz genutzt.

Da die Ubiquitinierung von AQI1 aus *A. thaliana* von KIM *et al*. (2013) bestätigt wurde und die Proteinbanden von ca. 62 kDa auch mit dem spezifischen NtAQI1-Antikörperserum gezeigt werden konnten (siehe Abb. 4.3-17), ist mit höchster Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass es sich bei den hier detektierten Proteinbanden um das ubiquitinierte Protein NtAQI1 handelt. Die hier gefundene Doppelbande könnte einfach (NtAQI1 45 kDa + Ub 8,5 kDa = 53,5 kDa) und zweifach (NtAQI1 45 kDa + 2xUb 17 kDa = 62 kDa) ubiquitiniertes NtAQI1 darstellen. In der löslichen Proteinfraktion konnten mittels des anti-Ubiquitin-Antikörpers Proteinbanden bei einer Größe von ≥ 250 kDa gezeigt werden (siehe Abb. 4.3-19). Hierbei könnte es sich um ubiquitinierte Proteinaggregate handeln. Diese Proteinbanden wurden dem Altersgradienten folgend nur in den beiden jüngsten Blättern mit deutlicher Stärke detektiert.

4.4 Physiologische Funktion von AQI1 *in planta*

Auf proteinbiochemischer Ebene konnten schon einige interessante Gegebenheiten bezüglich der molekularen Mechanismen von (Nt)AQI1 gefunden werden. Die physiologische Funktion des Proteins *in planta* blieb dabei allerdings noch unklar.
Einen wichtigen Hinweis lieferte bisher der Befund der Protein-Protein-Interaktion zwischen (Nt)AQI1 und Aquaporinen. In tierischen Zellen führte die Überexpression von (Nt)AQI1 zu einem verminderten Wassertransport durch Aquaporine (siehe 4.2.3). In Hefen zu einer geringeren Sensitivität gegenüber H_2O_2 (siehe 4.2.2). Im pflanzlichen System konnte mittels transienter Überexpression von (Nt)AQI1 Zelltod inhibiert werden, was höchstwahrscheinlich auch durch Beeinflussung des H_2O_2-Signaltransduktionswegs zu Stande kommt (siehe 4.2.1). Die Blockierung bzw. Regulation der Kanalfunktion von Aquaporinen stellt eine mögliche physiologische Funktion von (Nt)AQI1 dar, die völlig unabhängig von der Acylase-Funktion des Enzyms ablaufen könnte.

4.4.1 Reaktionen von NtAQI1 auf Stress

Um die Rolle von NtAQI1 als Schlüsselregulator bei der Ausbreitung von H_2O_2 in Pflanzen zu klären, wurde im Folgenden das Verhalten des Enzyms in unterschiedlichen Stresssituationen analysiert. H_2O_2 wird vermehrt bei der abiotischen und biotischen Stressabwehr gebildet. In niedrigen Konzentrationen fungiert H_2O_2 als Signalmolekül verschiedener physiologischer Prozesse. In großen Mengen hingegen wirkt H_2O_2 in den Zellen toxisch und verursacht Zelltod. H_2O_2-induzierter Zelltod ist vor allem bei der Blatt-Seneszenz und der hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) als Folge von Pathogenbefall essentiell (BETHKE & JONES, 2001; GECHEV & HILLE, 2005). In folgenden Versuchen sollte die Rolle von NtAQI1 in Stresssituationen analysiert werden. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf H_2O_2-induzierte Zelltodereignissen gelegt.

4.4.1.1 Analyse der Proteinakkumulation von NtAQI1 als Folge einer hypersensitiven Abwehrreaktion (HR)

Um die Rolle von NtAQI1 bei programmiertem Zelltod (PCD) zu charakterisieren, wurde mittels Virusinfektion (siehe 3.5.6) eine hypersensitive Reaktion (HR) in Tabakpflanzen ausgelöst. Da das verwendete Tabakkultivar (*N. tabacum* Samsun, NN), das N´-Resistenzgen (WHITHAM *et al*., 1994) gegen das Tabakmosaikvirus (TMV) aufweist, kommt es bei Infektion dieser Pflanzen mit TMV zu einer hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) verbunden mit lokalen nekrotischen Reaktionen an der Viruseintrittsstelle. Diese biotische Stressabwehr geht immer mit vermehrter H_2O_2-Akkumulation einher.

H_2O_2 induziert das lokale Absterben der infizierten Zellen, um so die Ausbreitung des Pathogens zu verhindern (LEVINE *et al*., 1994).

Um die HR-bedingte H_2O_2-Akkumulation zu visualisieren, wurden die mit TMV infizierten Tabakblätter 7 Tage nach Virus-Inokulation (7 dpi) mit 3,3´Diaminobenzidin (DAB) behandelt (siehe 3.5.4). DAB wird durch H_2O_2 zu einem braunen unlöslichen Farbstoff oxidiert, der nach Entfernung des Chlorophylls aus den Blättern deutlich sichtbar ist (siehe Abb. 4.4-1).

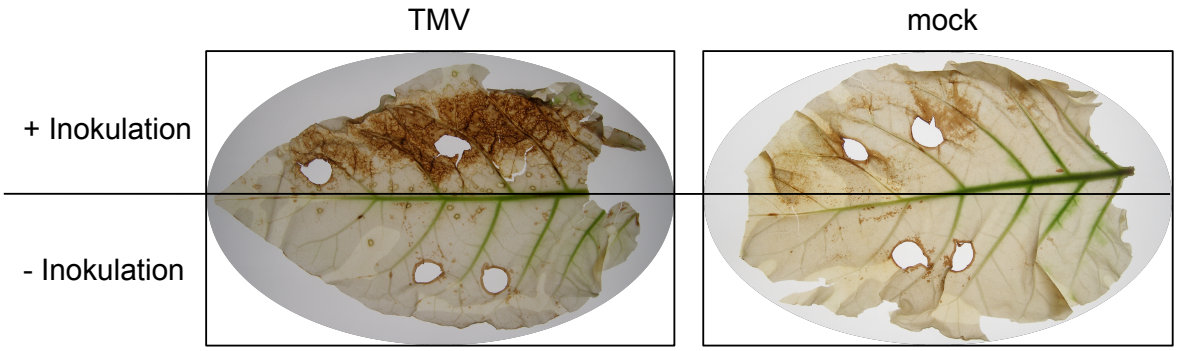


Abb. 4.4-1: H_2O_2-Akkumulation bei einer durch TMV-Infektion ausgelösten hypersensitiven Reaktion (HR) in jungen Blättern von *N. tabacum* NN. Die Visualisierung von H_2O_2 erfolgte mittels DAB (7 dpi). Als Kontrolle diente ein mit Tris-HCl Puffer inokuliertes Blatt (mock).

Die H_2O_2-Akkumulation infolge der virusinduzierten hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) konnte verdeutlicht werden. Das im Bereich der TMV-Nekrosen gebildete H_2O_2 reagierte mit DAB zu einem braunen unlöslichen Präzipitat (siehe Abb. 4.4-1).

In der Folge war zu untersuchen, inwieweit sich diese Stresssituation auf die Aminoacylase-Aktivität bzw. Proteinakkumulation von NtAQI1 auswirkt. Da im Zuge der HR eine vermehrte H_2O_2-Akkumulation gezeigt werden konnte und NtAQI1 vermutlich bei der H_2O_2-Ausbreitung durch Aquaporine eine wichtige Rolle spielt wären Veränderungen dieser Art durchaus denkbar. Zuerst wurde die Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in TMV-infizierten Blatthälften im Vergleich zu uninfizierten Blatthälften und im Gegensatz zum Puffer-inokulierten Kontrollblatt (mock) untersucht. Hierzu wurde der Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) angewandt, bei dem N-Acetyl-L-Methionin als Substrat dient. Als Kontrolle wurde der Versuchsansatz auch mit anderen acetylierten Aminosäuren als Substrate durchgeführt, die von NtAQI1 nicht umgesetzt werden können. So konnte sichergestellt werden, dass eine Veränderung der gemessenen Aminoacylase-Aktivität tatsächlich auf NtAQI1 zurückzuführen ist und die freien Aminogruppen nicht durch Induktion anderer Proteasen verursacht werden.

Im Zuge der durch TMV ausgelösten HR konnte ein deutlicher Anstieg der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 gemessen werden (siehe Abb. 4.4-2). Die Aktivitätssteigerung betrug ca. 100 %. Beim Kontrollblatt (mock) war dies nicht zu beobachten.
Bei Einsatz der Kontrollsubstrate konnten auch im Falle einer HR keine freien Aminogruppen detektiert werden.

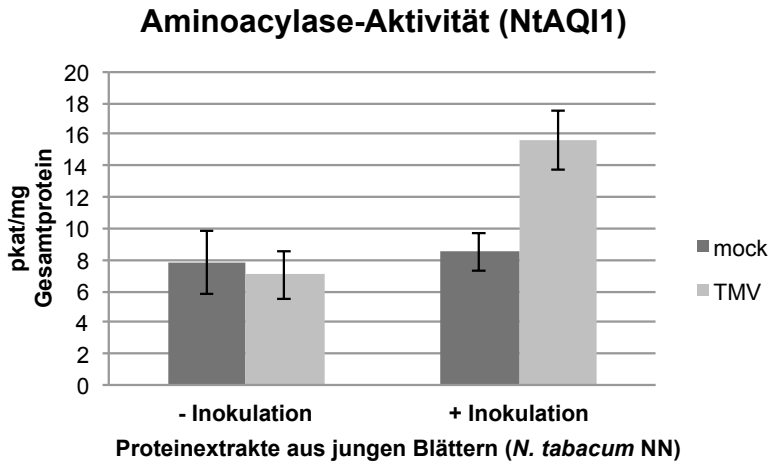


Abb. 4.4-2: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in uninfizierten (- Inokulation) und mit Tabakmosaikvirus (TMV) infizierten (+ Inokulation) Blatthälften von TMV-resistenten Tabakpflanzen (*N. tabacum* NN), 7dpi. Als Kontrolle (mock) wurden mit Tris-HCl Puffer inokulierte Blätter eingesetzt. (n=6)

Die gesteigerte Enzymaktivität von NtAQI1 wurde als Messwert für einen gesteigerten Bedarf an NtAQI1 gesehen. Dieser Befund weist auf eine Funktion von NtAQI1 bei programmierten Zelltodereignissen hin.

Um auch Veränderungen bezüglich der Expression von NtAQI1 zu überprüfen und festzustellen wo der gemessene Aktivitätsanstieg reguliert wird, wurde außerdem die Transkript- und Proteinakkumulation von NtAQI1 infolge der HR untersucht. Zum einen wurde mittels RT-PCR (siehe 3.1.14, 3.1.14.1, 3.1.11) die Transkriptmenge von *NtAQI1* aus TMV-infizierten (+ TMV) und uninfizierten (- TMV) Blatthälften von 4 unabhängigen *N. tabacum* NN Pflanzen verglichen (siehe Abb. 4.4-3, A). Zum anderen wurden mittels Immunodetektion (siehe 3.2.7.2) unter Einsatz des spezifischen NtAQI1-Antikörpers (siehe 2.6.1.4) mögliche Veränderungen der Proteinakkumulation als Folge der HR analysiert (siehe Abb. 4.4-3, B). Hierzu wurden Proteinextrakte der löslichen und der Membranprotein-Fraktion eingesetzt (siehe 3.2.1).

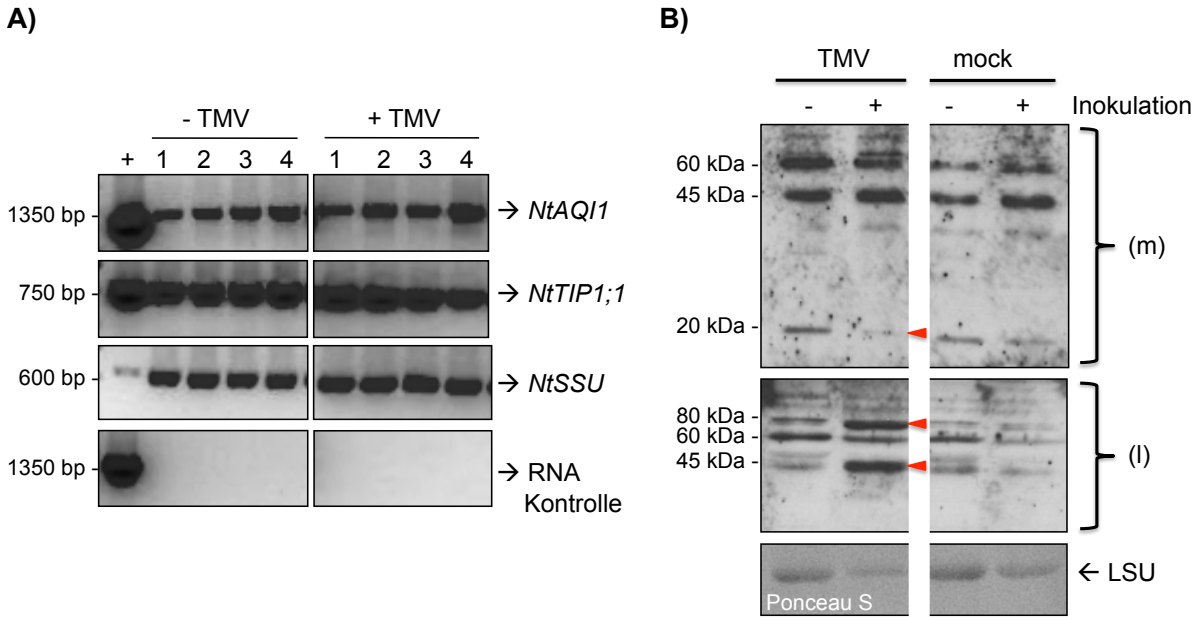


Abb. 4.4-3: Expressionsanalyse von NtAQI1 in uninfizierten (- TMV) und mit Tabakmosaikvirus infizierten (+ TMV) Blatthälften von TMV-resistenten Tabakpflanzen (*N. tabacum* NN), 7 dpi. Vergleichende RT-PCR-Analyse der *NtAQI1* RNA-Transkripte mit (+ TMV) und ohne (-TMV) TMV-Infektion von 4 unabhängigen Tabakpflanzen (1-4). Das Tabakaquaporin *NtTIP1;1* und die kleine Untereinheit von RuBisCo *NtSSU* dienten als Referenzgene. Außerdem wurde die isolierte RNA in den PCR-Ansatz eingesetzt um eine Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen (RNA Kontrolle). Als Positivkontrolle der PCR-Reaktion (+) wurde entsprechende Plasmid-DNA mit den jeweiligen spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt (A). Immunodetektion von NtAQI1 in löslichen (l) und membrangebundenen (m) Proteinextrakten aus Blättern von *N. tabacum* NN, ohne (-) und mit (+) TMV-Infektion. Als Kontrolle diente ein mit Tris-HCl Puffer inokuliertes Blatt (mock). Eine Ponceau S Färbung der Nitrozellulosemembran wurde als Ladekontrolle mitgeführt und die große Untereinheit von RuBisCo (LSU) als Referenz genutzt. Veränderungen im Proteinbandenmuster von NtAQI1 infolge einer TMV-Infektion sind mit roten Pfeilen markiert (B).

Die Transkriptanalyse zeigte keinerlei Veränderungen der Transkriptmenge von *NtAQI1* im Laufe einer durch TMV ausgelösten hypersensitiven Reaktion (HR) (siehe Abb. 4.4-3, A). Obwohl die NtAQI1-Enzymaktivität als Folge einer HR um das doppelte anstieg (siehe Abb. 4.4-2), veränderte sich hinsichtlich der Transkriptakkumulation nichts. Dies war zu erwarten, da die Aktivitätsabnahme von NtAQI1 im Laufe der Blatt-Seneszenz ebenfalls nicht auf Transkriptebene reguliert wird (siehe 4.3.2.2). Bei der Analyse der Proteinakkumulation (B) hingegen konnte eine deutliche Veränderung des Proteinbandenmusters festgestellt werden (siehe Abb. 4.4-3, B). In der Membranprotein-Fraktion (m) nahm die Detektionsstärke des 20 kDa großen NtAQI1-Abbauproduktes nach TMV-Infektion (+) und daraus resultierender HR, deutlich ab. Im Gegenzug wurde in der löslichen Proteinfraktion (l) eine starke Zunahme zweier Proteinbanden mit Größen von 45 kDa und ca. 80 kDa gefunden. Bei der 45 kDa großen Proteinbande handelt es sich um das NtAQI1-Monomer. Bei der ca. 80 kDa großen Proteinbande könnte es sich um ein NtAQI1 Homodimer handeln.

Diese Befunde weisen sehr stark darauf hin, dass im Zuge einer HR der Proteinabbau von NtAQI1 enorm verlangsamt wird. Auch die schwächere Detektion der 60 kDa großen Proteinbande, die mit großer Wahrscheinlichkeit die ubiquitinierte Form von NtAQI1 darstellt (siehe 4.3.4.2), könnte ein Hinweis für die Inhibition des Proteinabbaus sein.
Um diese Hypothese zu bestärken, wurde erneut eine Immunodetektion (siehe 3.2.7.2) unter Einsatz eines spezifischen anti-Ubiquitin Antikörpers (siehe 2.6.1.6) durchgeführt. Es wurden Membranprotein-Extrakte aus Blättern zunehmenden Alters (1-3) von uninfizierten (- TMV) und mit TMV infizierten (+ TMV) Blatthälften einer resistenten Tabakpflanzen (*N. tabacum* NN) analysiert.
Es konnte gezeigt werden, dass die Detektionsstärke der ubiquitinierten Form von NtAQI1 nach einer TMV-Infektion tatsächlich deutlich abnimmt (siehe Abb. 4.4-4).

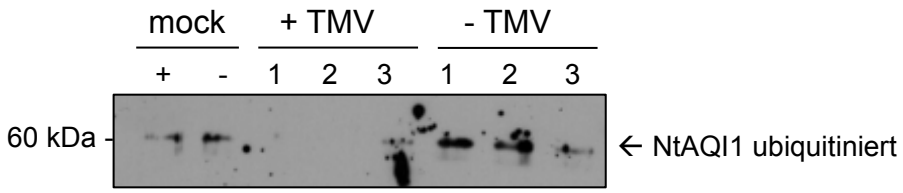


Abb. 4.4-4: Immunodetektion von ubiquitiniertem NtAQI1 aus uninfizierten (- TMV) und mit Tabakmosaikvirus infizierten (+ TMV) Blatthälften von TMV-resistenten Tabakpflanzen (*N. tabacum* NN), 7 dpi. Es wurden Membranprotein-Extrakte aus Blättern zunehmenden Alters (1-3) analysiert. Als Kontrolle diente ein mit Tris-HCl Puffer inokuliertes Blatt (mock +/-).

Dies bestärkt die Annahme, dass NtAQI1 durch Ubiquitinierung zum Abbau markiert wird. Dieser Prozess könnte bei einer HR inhibiert werden, um den Proteinabbau zu verlangsamen.
Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Proteinakkumulation von NtAQI1 als Folge von biotischem Stress verändert. Allerdings galt noch zu klären, ob dies tatsächlich als spezifischer Effekt als Reaktion auf eine hypersensitive Reaktion, also auf programmierten Zelltod (PCD) gewertet werden kann, oder ob NtAQI1 auch auf biotischen Stress reagiert, wenn es dabei nicht zum Auslösen einer HR kommt. Deshalb wurde ein weiterer Infektionsversuch durchgeführt, allerdings mit einem anderen Tabakkultivar (*N. tabacum* Samsun nn; siehe 2.2.1), welches kein Resistenzgen gegenüber TMV besitzt. Bei Infektion dieser Pflanzen mit TMV wird keine Abwehrreaktion in Form einer HR ausgelöst. Es kommt zur systemischen Infektion der ganzen Pflanze. Junge Blätter mehrerer Tabakpflanzen wurden mit einer infektiösen TMV-Lösung inokuliert (siehe 3.5.6). Als Kontrolle wurden uninfizierte Pflanzen im gleichen Entwicklungsstadium unter denselben Bedingungen gehalten. 10 Tage später war die systemische Infektion in Form

der typischen mosaikartigen Symptome sichtbar. Von jeder der Pflanzen wurde ein junges Blatt geerntet, zu einem Proteinextrakt verarbeitet (siehe 3.2.1) und in den Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) eingesetzt. Die NtAQI1-Enzymaktivität der infizierten Pflanzen wurde mit der Enzymaktivität der Kontrollpflanzen verglichen.

Es konnte keine Beeinflussung der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 als Reaktion auf eine systemische Infektion von Tabakpflanzen mit Tabakmosaikvirus (TMV) festgestellt werden (siehe Abb. 4.4-5). Die NtAQI1 spezifische Aminoacylase-Aktivität veränderte sich durch die systemische Infektion der Tabakpflanzen mit TMV nicht.

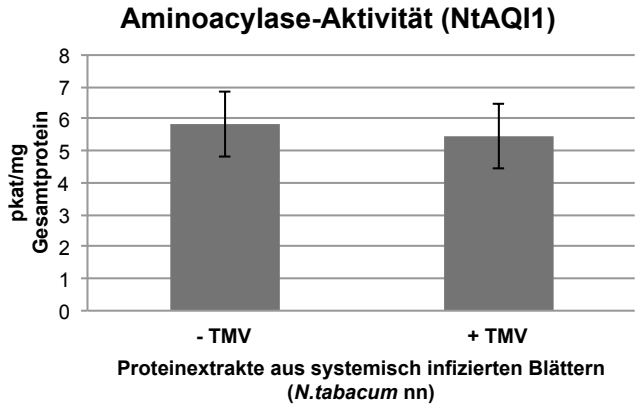


Abb. 4.4-5: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in jungen Blättern von uninfizierten (- TMV) und systemisch infizierten (+ TMV) *N. tabacum* nn Pflanzen, 10 dpi. (n=3)

Um sicher zu gehen, dass sich auch auf Proteinebene keine Veränderungen hinsichtlich der Akkumulation bzw. des Abbaus von NtAQI1 zeigen, wurden Proteinextrakte der löslichen (l) und membrangebundenen Proteinfraktion (m) mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7) und anschließender Immunodetektion (siehe 3.2.7.2) analysiert.

Auch im Proteinbandenmuster konnten nach einer systemischen Infektion der Tabakpflanzen mit TMV keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (siehe Abb. 4.4-6).

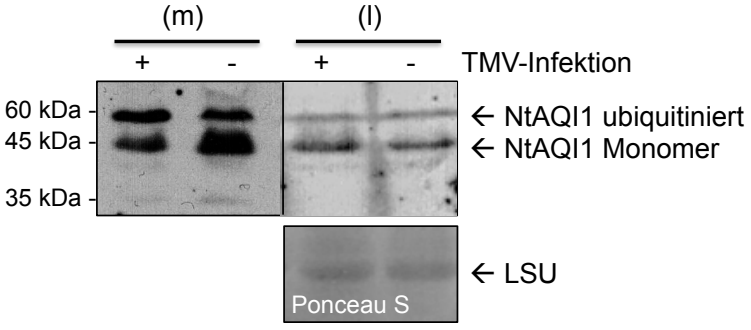


Abb. 4.4-6: Immunodetektion von NtAQI1 in löslichen (l) und membrangebundenen (m) Proteinextrakten aus Blättern von *N. tabacum* nn, ohne (-) und mit (+) systemischer TMV-Infektion, 10 dpi. Eine Ponceau S Färbung der Nitrozellulosemembran wurde als Ladekontrolle mitgeführt und die große Untereinheit von RuBisCo (LSU) als Referenz genutzt.

Sowohl im löslichen (l), als auch im Membranprotein-Extrakt (m) wurde die NtAQI1-Akkumulation mit annähernd gleicher Stärke detektiert. Es konnte lediglich eine leichte Abschwächung der NtAQI1-Proteinbande (Monomer, 45 kDa) als Folge der TMV-Infektion beobachtet werden (siehe Abb. 4.4-6). Die Resultate der Aminoacylase-Aktivitätsmessung stimmten mit der Proteinakkumulation überein. Dieses Ergebnis bestärkt die Annahme, dass tatsächlich die hypersensitive Reaktion (HR) der ausschlaggebende Faktor für die Veränderungen der Proteinakkumulation von NtAQI1 im vorherigen Versuch (siehe Abb. 4.4-2 und 4.4-3) ist. NtAQI1 wird also nicht in jedem Fall durch biotischen Stresseinfluss induziert, sondern nur im speziellen Fall von PCD- beziehungsweise HR-auslösenden Faktoren.

4.4.1.2 Analyse der Proteinakkumulation von NtAQI1 als Folge von chemisch induziertem Zelltod

Der vorherige Versuch (siehe 4.4.1.1) lieferte Hinweise darauf, dass NtAQI1 wohl eine Rolle bei der pflanzlichen hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) auf Pathogenbefall zuzuschreiben ist. Die Annahme, es könnte sich hierbei um einen allgemeinen Effekt als Reaktion auf biotischen Stress handeln konnte verworfen werden. Dieser Befund sollte nun auch bezüglich möglicher proteinbiochemischer Veränderungen von NtAQI1 als Reaktion auf chemisch erzeugten Zelltod untersucht werden. Um chemisch Nekrosen zu erzeugen, wurden einzelne Blätter von *N. tabacum* NN mit Pelargonsäure behandelt (siehe 3.5.7). Der durch Pelargonsäure hervorgerufene Zelltod ist ein völlig unphysiologischer Effekt, der nichts mit dem H_2O_2 Einstrom durch Aquaporine zu tun hat. Er wird allein durch die membranzerstörende Wirkung der Pelargonsäure hervorgerufen. Jedoch tritt auch bei dieser chemisch erzeugten Stresssituation eine vermehrte Akkumulation von H_2O_2 auf.
Um dies nachzuweisen wurden die leicht nekrotischen Blätter mit DAB behandelt (siehe 3.5.4). 24 h nach Behandlung der Blätter mit Pelargonsäure konnten in den behandelten Blatthälften schon größere Mengen H_2O_2 detektiert werden (siehe Abb. 4.4-7).

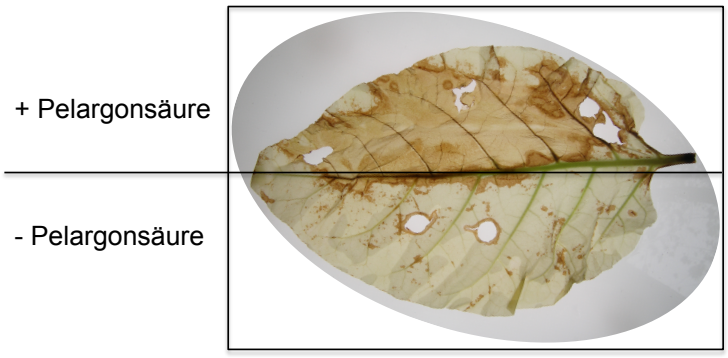


Abb. 4.4-7: H_2O_2-Akkumulation bei chemisch erzeugtem Zelltod in Blättern von *N. tabacum* NN. Die Visualisierung von H_2O_2 erfolgte 24 h nach Pelargonsäure-Behandlung mittels DAB.

Nun wurde überprüft, ob dieser chemisch erzeugte Zelltod ebenfalls Einfluss auf die Proteinakkumulation von NtAQI1 hat, wie es beim programmierten Zelltod in Form einer HR der Fall war. Zuerst wurden Veränderungen der Enzymaktivität von NtAQI1 24 h nach Pelargonsäurebehandlung überprüft. Hierzu wurden Proteinextrakte (siehe 3.2.1) aus behandelten (+) und unbehandelten (-) Blatthälften in einen Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) eingesetzt.

Ganz im Gegensatz zu dem während einer HR beobachteten Aktivitätsanstieg von NtAQI1 (siehe Abb. 4.4-2), konnte hier eine verminderte Enzymaktivität gemessen werden (siehe Abb. 4.4-8).

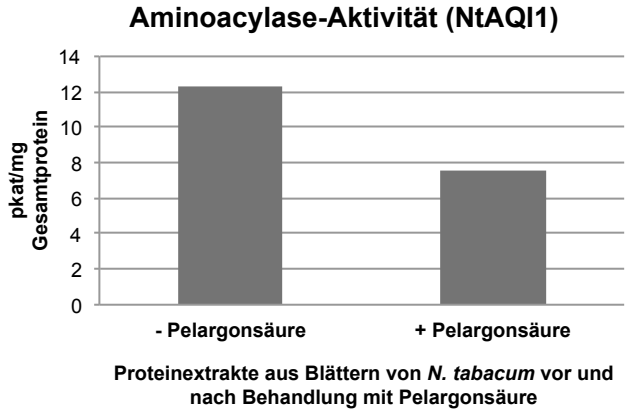


Abb. 4.4-8: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in jungen Blättern von *N. tabacum* NN. Dargestellt ist der Aktivitätsvergleich einer unbehandelten Blatthälfte (- Pelargonsäure) und einer Blatthälfte nach chemisch erzeugtem Zelltod (+ Pelargonsäure).

Um dies auch hinsichtlich der Proteinakkumulation zu untersuchen, wurden lösliche (l) und Membranprotein-Extrakte (m) der behandelten Blätter mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7) aufgetrennt und anschließend mittels Immunodetektion (siehe 3.2.7.2) analysiert.

Das Ergebnis zeigte, dass der Aktivitätsverlust von NtAQI1 nach Pelargonsäurebehandlung mit einer geringeren Proteinakkumulation übereinstimmt (siehe Abb. 4.4-9). Dies war besonders deutlich in der membrangebundenen Proteinfraktion (m) zu sehen.

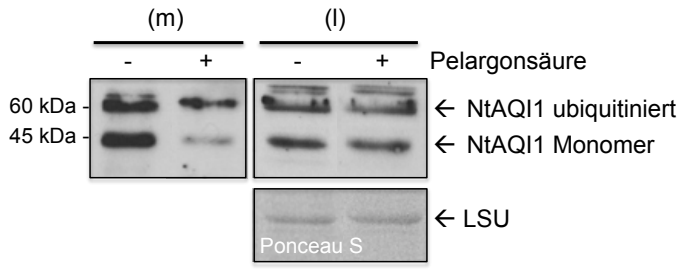


Abb. 4.4-9: Immunodetektion von NtAQI1 in löslichen (l) und membrangebundenen (m) Proteinextrakten aus Blättern von *N. tabacum* NN, ohne (-) und mit (+) chemisch erzeugtem Zelltod mittels Pelargonsäure. Eine Ponceau S Färbung der Nitrozellulosemembran wurde als Ladekontrolle mitgeführt und die große Untereinheit von RuBisCo (LSU) als Referenz genutzt.

Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da es sich bei NtAQI1, wie gezeigt werden konnte, um ein größtenteils membranassoziiertes Protein handelt (siehe 4.3.3.2). Der Verlust des Enzyms durch die zellmembranzerstörende Wirkung von Pelargonsäure ist daher naheliegend.

Die Annahme es könnte sich bei NtAQI1 um ein allgemein stressinduziertes Protein handeln konnte somit verworfen werden.

4.4.1.3 Analyse der Proteinakkumulation von NtAQI1 als Folge von H_2O_2-Stress

Die Spezifität der NtAQI1-Induktion als Reaktion auf eine HR wurde in einem weiteren Experiment analysiert. Hier ging es darum zu klären, ob es sich bei NtAQI1 möglicherweise um einen H_2O_2-Sensor handelt. Hierzu wurden Blattstücke von *N. tabacum* NN für 24 h in H_2O_2 (20 mM) inkubiert. Um dem H_2O_2-Abbau durch Katalasen entgegen zu wirken, wurde dem Ansatz 3-AT (5 mM) beigemischt, welches als Hemmstoff für Katalasen bekannt ist. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Blattstücke im Vergleich zu unbehandelten Blattstücken in einen Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) eingesetzt. So sollte überprüft werden, ob sich durch den Einfluss von H_2O_2 Änderungen bezüglich der Enzymaktivität von NtAQI1 ergeben. Aufgrund des Aktivitätsanstiegs im Zuge einer HR (siehe Abb. 4.4-2) hätte man eine Induktion der Enzymaktivität durch H_2O_2 erwarten können.

Der Aktivitätstest zeigte, dass sich eine Inkubation von Blattstücken in H_2O_2 (20 mM) nicht auf die Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 auswirkt (siehe Abb. 4.4-10).

Es konnte lediglich eine schwach reduzierte Aktivität in den mit H_2O_2 behandelten Blattstücken gemessen werden.

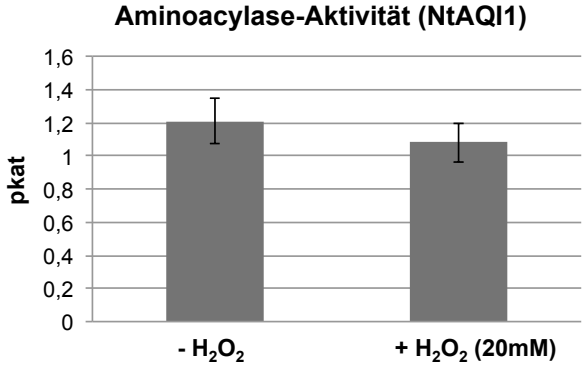


Abb. 4.4-10: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in Blattstücken von *N. tabacum* NN. Die Enzymaktivität wurde vor (- H_2O_2) und nach (+ H_2O_2) 24-stündiger Inkubation in H_2O_2 (20mM) + 3-AT (5 mM) gemessen. (n=3)

Eine Induktion der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 durch H_2O_2 konnte somit ausgeschlossen werden.

Dieser Befund wurde auch bezüglich der Proteinakkumulation von NtAQI1 untersucht. Hierzu wurden die in H_2O_2 inkubierten Blattstücke im Vergleich zu unbehandelten Blattstücken mittels Immunodetektion (siehe 3.2.7.2) analysiert. Die Akkumulation von NtAQI1 wurde in Proteinextrakten (siehe 3.2.1) der löslichen (l) und der Membranprotein-Fraktion (m) detektiert.

Auch hier konnten keine signifikanten Veränderungen der Proteinakkumulation von NtAQI1 durch den Einfluss von H_2O_2 beobachtet werden (siehe Abb. 4.4-11).

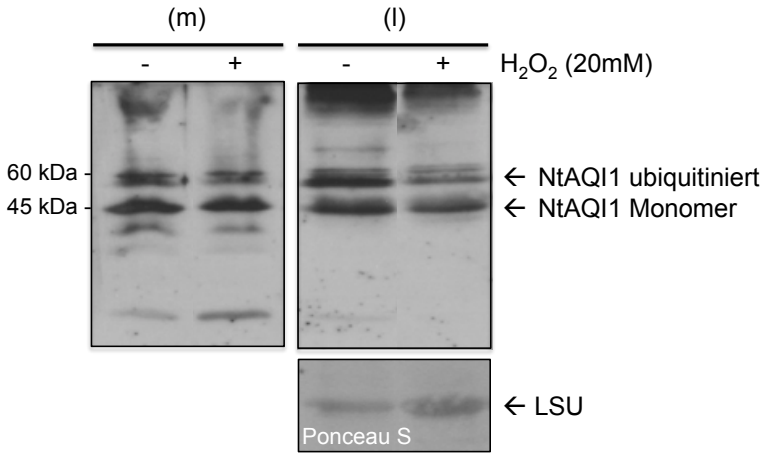


Abb. 4.4-11: Immunodetektion von NtAQI1 in löslichen (l) und membrangebundenen (m) Proteinextrakten von *N. tabacum* NN, vor (-) und nach (+) Inkubation von Blattstücken in H_2O_2 (20mM) + 3-AT (5 mM) für 24 h. Eine Ponceau S Färbung der Nitrozellulosemembran wurde als Ladekontrolle mitgeführt und die große Untereinheit von RuBisCo (LSU) als Referenz genutzt.

Die Funktion von NtAQI1 als H_2O_2-Sensor bzw. als H_2O_2-induziertes Protein konnte somit ausgeschlossen werden.

4.4.2 Auswirkungen einer Überexpression von NtAQI1-CAH Fusionsproteinen in *N. tabacum*

Durch die heterologe Überexpression von *(Nt)AQI1* in Hefezellen und tierischen Zellen (siehe 4.2.2 und 4.2.3), sowie die transiente Überexpression in Pflanzen (siehe 4.2.1) konnte die Hypothese einer Blockierung der Kanalfunktion von Aquaporinen (TIP1;1 und PIP2;2) durch das Enzym (Nt)AQI1 bestärkt werden. Die untersuchten Aquaporine sind für den Transport von H_2O und H_2O_2 durch Biomembranen bekannt (HOCH, 2011).

Nun galt es noch die Frage der physiologischen Funktion von NtAQI1 *in planta* hinsichtlich dieses Befundes zu klären. Im Vordergrund stand hierbei die Rolle von NtAQI1 bei der H_2O_2-abhängigen Pathogenantwort in Pflanzen. Um einer Antwort auf diese Frage ein Stück näher zu kommen, wurden die Auswirkungen einer stabilen Überexpression von *NtAQI1* in *N. tabacum* (NN) untersucht.

Zu diesem Zweck wurden transgene Linien charakterisiert, welche mit dem Vektor-Konstrukt pTAK35S:NtAQI1-CAH (siehe 2.3.11 und Abb. 4.4-12) transformiert wurden. Bei Expression des Transgens entsteht ein Fusionsprotein aus NtAQI1 und einer Cyanamidhydratase (CAH).

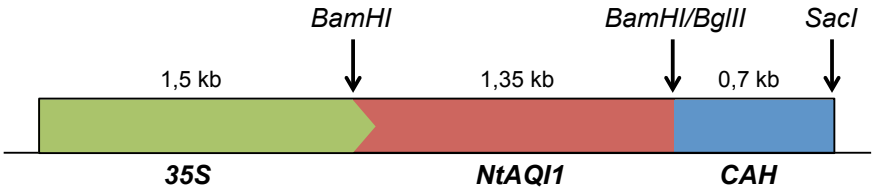


Abb. 4.4-12: Schematische Darstellung von pTAK35S:NtAQI1-CAH. Bei Expression entsteht ein Fusionsprotein aus NtAQI1 und einer Cyanamidhydratase (CAH).

Für alle weiteren Experimente wurde eine Pflanzenlinie mit konstitutiv hoher Expression von *NtAQI1-CAH* ausgewählt (70H1; siehe 2.2.1.1).

4.4.2.1 Nachweis der Überexpression von *NtAQI1-CAH* anhand der CAH-Aktivität in transgenen Pflanzen

Um die stabile Expression des Transgens *NtAQI1-CAH* zu beweisen, machte man sich die Fusion mit dem Enzym Cyanamidhydratase (CAH) (siehe 2.8.1.6) zu Nutze. Wie auch schon bei der transienten Expression von *NtAQI1-CAH* Fusionen in *N. benthamiana* beschrieben (siehe 4.2.1.3), kann die Aktivität der Cyanamidhydratase mittels eines einfachen „CAH-Assays“ (siehe 3.5.3) gemessen werden. Die Messung der CAH-Aktivität erfolgte vergleichend für Wildtyp-Tabakpflanzen (*N. tabacum* NN, Wt) und die transgene Linie, welche das Fusionsprotein NtAQI1-CAH exprimiert (*N. tabacum* NN, 70H1). Als positive Kontrolle wurde auch die CAH-Aktivität in transgenen Pflanzen gemessen, welche ausschließlich *35S::CAH* als Transgen tragen (*N. tabacum* NN, 44H2; siehe 2.2.1.1). Alle Pflanzen befanden sich zum Zeitpunkt der Messung im 10-Blattstadium. Es wurde immer die CAH-Aktivität der löslichen und der Membranprotein-Fraktion eines jungen Blattes erfasst.

Die stabile Expression des Fusionsproteins NtAQI1-CAH in der transgenen Pflanzenlinie 70H1 konnte anhand der CAH-Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.4-13). Auch die transgene Linie 44H2, welche ausschließlich *CAH* als Transgen exprimiert, war positiv bezüglich der CAH-Aktivität und somit der Expression ihres Transgens. Interessanterweise war auch in diesem Versuch die CAH-Aktivität der Linie 70H1 (*35S::NtAQI1-CAH*) hauptsächlich in der Membranprotein-Fraktion zu finden. Die lösliche Proteinfraktion wies eine deutlich geringere CAH-Aktivität auf.

Dieser Befund wurde schon bei der transienten Überexpression von *NtAQI1-CAH* Fusionen in *N. benthamiana* beobachtet (siehe 4.2.1.3). Bei der Kontrolllinie 44H2 (*35S::CAH*) wurde die CAH-Aktivität der löslichen und der Membranprotein-Fraktion mit gleicher Stärke gemessen.

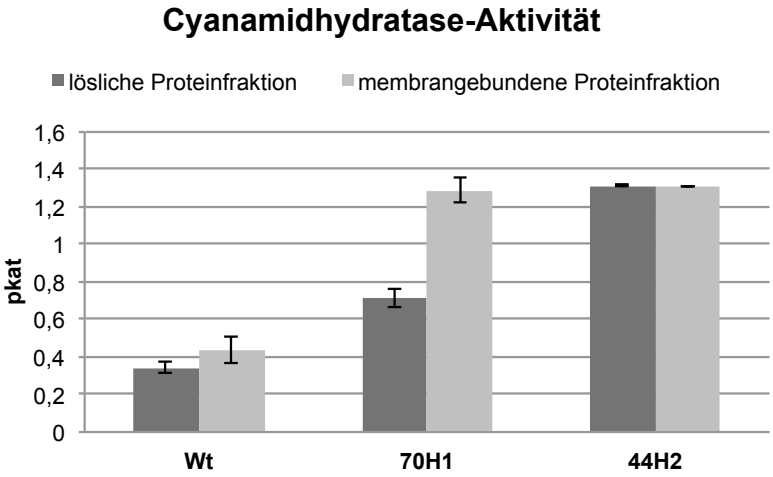


Abb. 4.4-13: Nachweis der Aktivität des Enzyms Cyanamidhydratase (CAH) in transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum*, NN). Wt: untransformiert; 70H1: eingebrachtes Transgen *35S::NtAQI1-CAH*; 44H2: eingebrachtes Transgen *35S::CAH*. Dargestellt ist die CAH-Aktivität der löslichen und der Membranprotein-Fraktion in jungen Blättern. (n = 3)

Die Ursache für die bevorzugte Membranassoziation von NtAQI1-CAH bzw. das verminderte Vorkommen in der löslichen Proteinfraktion liegt somit mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Seiten von NtAQI1. Die Annahme, CAH könnte das Fusionsprotein durch vermehrte Aggregationsbereitschaft aus der löslichen Proteinfraktion abziehen ist unwahrscheinlich, da CAH alleine (44H2) in löslicher und Membranfraktion gleichermaßen zu finden ist (siehe Abb. 4.4-13).

4.4.2.2 Expressionsanalyse von *NtAQI1* in transgenen Pflanzen

Die Expression des Transgens *NtAQI1-CAH* sollte im Folgenden auch auf Transkriptebene überprüft werden. Hierzu wurde mittels RT-PCR (siehe 3.1.14, 3.1.14.1, 3.1.11) die Transkriptmenge von transgenen Tabakpflanzen (70H1) und Wildtyp Tabakpflanzen (Wt) verglichen. Die zu analysierende RNA wurde aus Blättern, einem Altersgradienten folgend von jung nach alt, isoliert (Blatt 2, 4, 6, 8, 10). Es wurde immer die gleiche Menge an RNA (0,05 µg) in den RT-PCR Ansatz eingesetzt. Die anschließende Standard-PCR erfolgte unter Einsatz von 1 µl der gewonnenen cDNA als „template“ und spezifischen Oligonukleotiden (siehe 2.7) für das entsprechende Gen.

Im Fall des *NtAQI1*-Nachweises wurde die Standard-PCR mit einer größeren Menge cDNA (3 µl) wiederholt, um das Ergebnis zu verdeutlichen.

In den Blättern der transgenen Pflanzen (70H1) konnte eine stärkere Akkumulation von *NtAQI1*-Transkripten detektiert werden, als in Blättern von Wildtyp Tabakpflanzen (Wt) (siehe Abb. 4.4-14). Bei Einsatz von 1 µl cDNA waren beim Wildtyp noch keine *NtAQI1*-spezifischen Banden detektierbar wohingegen bei der transgenen Linie (70H1) klare Banden detektiert werden konnten. Beim Einsatz von 3 µl cDNA konnten auch beim Wildtyp die spezifischen Banden detektiert werden. Bei den transgenen Pflanzen waren diese jedoch deutlich stärker. Die Transkriptakkumulation der Kontrollgene *NtTIP1;1* und *NtSSU* fiel für Wt und 70H1 gleich stark aus.

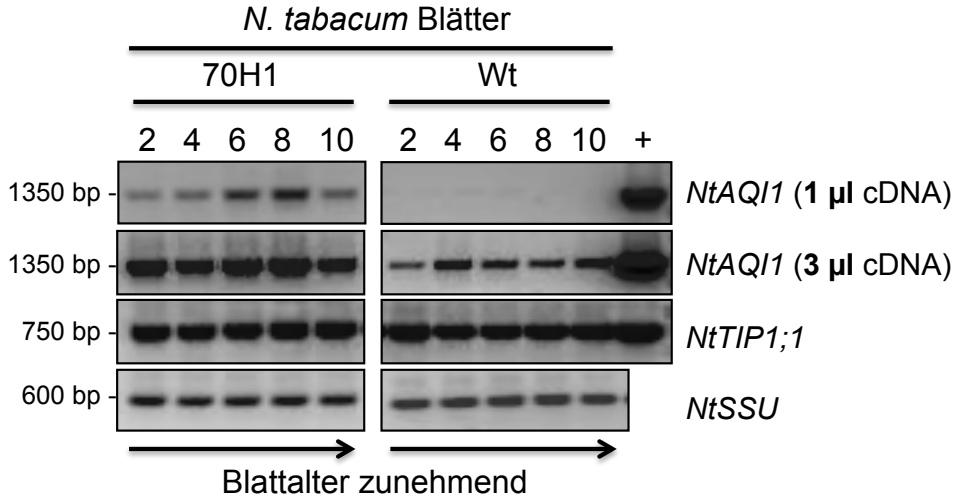


Abb. 4.4-14: Transkriptanalyse von *NtAQI1* in Blättern unterschiedlichen Alters von transgenen (70H1; *35S::NtAQI1-CAH*) und untransformierten (Wt) *N. tabacum* NN Pflanzen. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR, mit Einsatz unterschiedlicher Mengen cDNA (1 µl bzw. 3 µl). Als Kontrollen wurden die Transkripte des Aquaporins *NtTIP1;1* und die kleine Untereinheit von RuBisCo *NtSSU* detektiert. Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion (+) diente Plasmid-DNA, welche die Gene *NtAQI1* bzw. *NtTIP1;1* enthält.

Dieses Ergebnis bewies erneut den Erfolg der Überexpression von *NtAQI1-CAH* in der transgenen Pflanzenlinie 70H1.

Im nächsten Schritt sollte die Protein-Akkumulation der transgenen Linie (70H1) analysiert werden. Hierzu diente die Messung der Aminoacylase-Aktivität (siehe 3.2.8) von NtAQI1 in transgenen Tabakpflanzen (70H1) im Vergleich zu Wildtyp Tabakpflanzen (Wt). Zuerst wurden Blattextrakte der löslichen Proteinfraktion (siehe 3.2.1) untersucht. Die Blätter wurden wieder einem Altersgradient folgend, von jung nach alt, ausgewählt (Blatt 2, 4, 6, 8, 10) (siehe Abb. 4.4-15, A und B). Anschließend wurde die Aminoacylase-Aktivität in Blüten und Wurzeln verglichen (siehe Abb. 4.4-15, C).

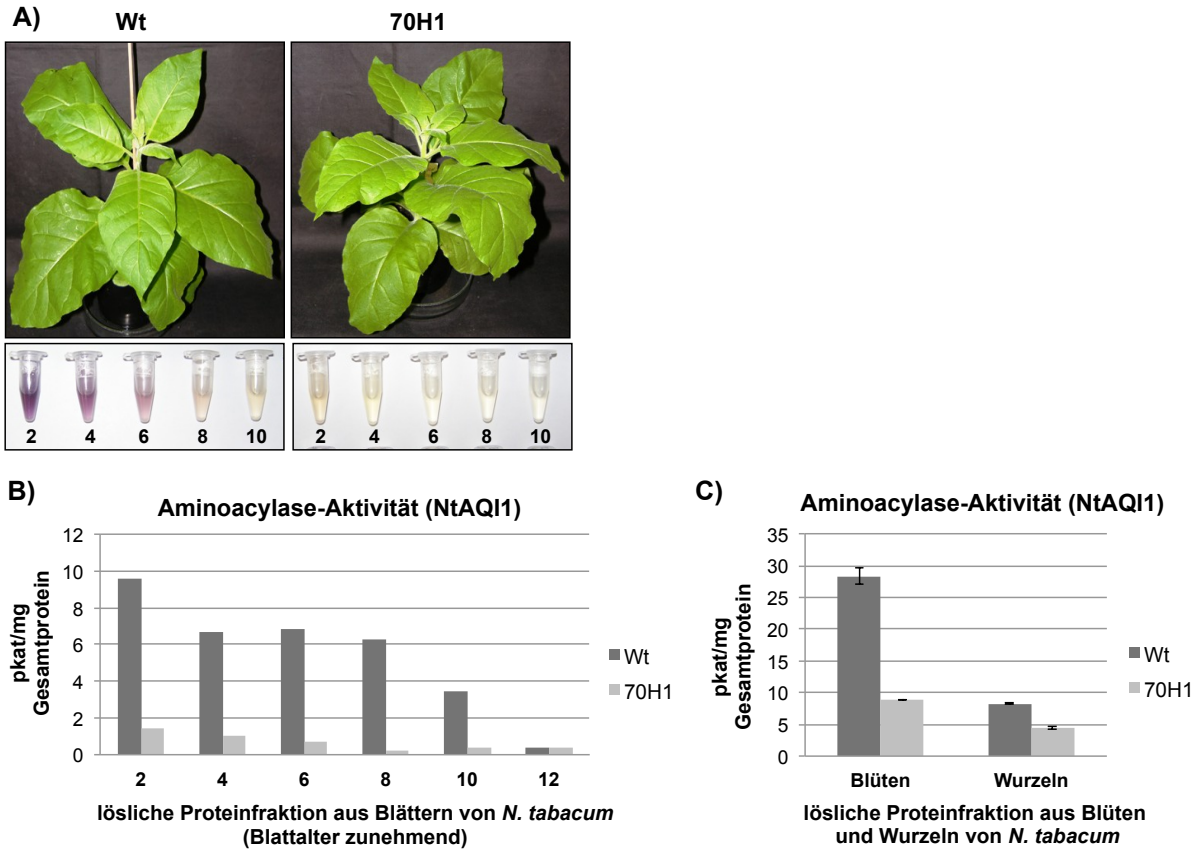


Abb. 4.4-15: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in transgenen (70H1; *35S::NtAQI1-CAH*) und untransformierten (Wt) *N. tabacum* NN Pflanzen. Vergleich der Aminoacylase-Aktivität in Blättern unterschiedlichen Alters (A) und quantitative Darstellung der Aminoacylase-Aktivität in der löslichen Proteinfraktion dieser Blätter (B). Quantitativer Vergleich der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in Blüten und Wurzeln (C).

Trotz der erhöhten Transkriptakkumulation von *NtAQI1* in Blättern der transgenen überexprimierenden Pflanzen (70H1) (siehe Abb. 4.4-14), konnte kaum Aminoacylase-Aktivität bei diesen Pflanzen gemessen werden (siehe Abb. 4.4-15, A und B). Die Blätter der Wildtyp Pflanzen zeigten den typischen altersabhängigen Aktivitätsgradienten. In Blättern der transgenen Pflanzen war kaum Aktivität messbar, unabhängig davon in welchem Alter sich die Blätter befanden.

Auch die Aminoacylase-Aktivität in Blüten und Wurzeln war bei der transgenen Linie (70H1) um ein Vielfaches geringer als beim Wildtyp (Wt) (siehe Abb. 4.4-15, C).

Da jedoch die Messung der CAH-Aktivität in transgenen Pflanzen schon eine begünstigte Membranassoziation des Fusionsproteins NtAQI1-CAH vermuten ließ (siehe 4.4.2.1), wurde nun auch die Aminoacylase-Aktivität der Membranprotein-Fraktion analysiert. Hierzu wurden die bei der Proteinextraktion verbliebenen Pflanzenreste (20 mg) in der entsprechenden Menge H_2O (40 µl) aufgenommen und ebenfalls in den Aminoacylase-Aktivitätstest (siehe 3.2.8) eingesetzt.

Bei der Aktivitäts-Messung der Membranprotein-Fraktion konnte auch im Falle der transgenen Linie (70H1) Aminoacylase-Aktivität gemessen werden (siehe Abb. 4.4-16). Die Aminoacylase-Aktivität der transgenen Pflanzen unterschied sich jedoch kaum von der Aktivität des Wildtyps. Eine verstärkte Aktivität, wie man aufgrund von Überexpression vermuten würde, konnte nicht gefunden werden.

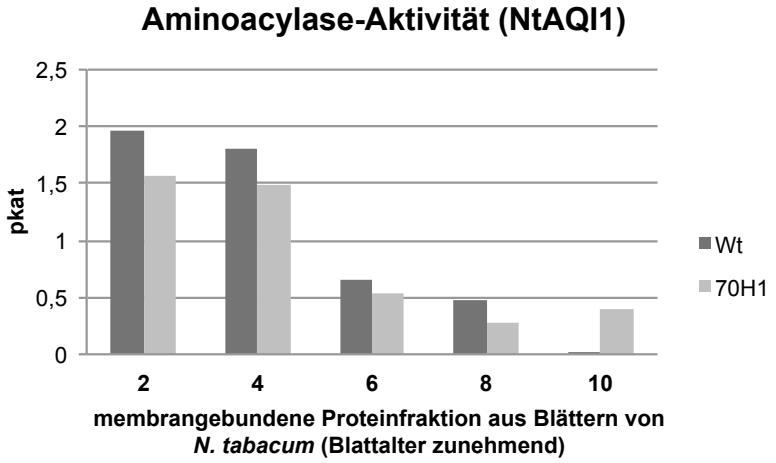


Abb. 4.4-16: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in Blättern unterschiedlichen Alters von transgenen (70H1; *35S::NtAQI1-CAH*) und untransformierten (Wt) *N. tabacum* NN Pflanzen. Dargestellt ist die Aminoacylase-Aktivität der membrangebundenen Proteinfraktion pro 20 mg Blattgewebe.

Warum jedoch bei den transgenen „Überexprimierern“ (70H1) keine verstärkte Aminoacylase-Aktivität messbar war und warum sogar die Aminoacylase-Aktivität des endogenen NtAQI1 in der löslichen Proteinfraktion schwindet, gilt es noch zu klären.

Die Stilllegung der Genexpression durch „gene silencing“ kann aufgrund des Transkriptnachweises (siehe Abb. 4.4.14) ausgeschlossen werden. Auch die Annahme, das transgene Fusionsprotein NtAQI1-CAH könnte aufgrund von Fehlfaltung oder dergleichen komplett abgebaut werden, kann aufgrund der gemessenen CAH-Aktivität (siehe 4.4.2.1) in den transgenen Pflanzen verworfen werden. Jedoch war auch die CAH-Aktivität hauptsächlich in der Membranprotein-Fraktion zu finden. Es ist denkbar, dass das Fusionsprotein NtAQI1-CAH durch Wechselwirkung mit dem löslichen endogenen Protein NtAQI1 Mischkomplexe eingeht. Durch das Vorhandensein von SH-Gruppen und

die mehrfach bestätigte Bereitschaft zur Bildung von Dimeren und Tetrameren wäre eine solche Wechselwirkung naheliegend. Aufgrund der Aggregation könnten die Enzym-Aktivität des transgenen Fusionsproteins NtAQI1-CAH, sowie des löslichen endogenen Proteins in diesen Mischkomplexen verloren gehen. Möglicherweise behindert die Fusion mit CAH das aktive Zentrum von NtAQI1, bzw. die Bindung an das Substrat. Des Weiteren könnte das Fusionsprotein NtAQI1-CAH als fremd bzw. fehlgefaltet erkannt werden, was dafür sorgt, dass die Mischkomplexe (transgenes Fusionsprotein NtAQI1-CAH + endogenes NtAQI1) abgebaut werden. Solche Prozesse laufen generell in der löslichen Proteinfraktion schneller ab. In der Membranproteinfraktion sind die Proteine stabiler und bleiben länger erhalten. Daher kann hier das Fusionsprotein NtAQI1-CAH anhand der CAH-Aktivität nachgewiesen werden. Außerdem bilden sich hier nicht so leicht Mischkomplexe, sodass ein Teil des endogenen NtAQI1 aktiv bezüglich seiner Aminoacylase-Aktivität bleibt. Dies würde den Nachweis der CAH- und Aminoacylase-Aktivität in der Membranfraktion und das Fehlen von CAH- und Aminoacylase-Aktivität in der löslichen Proteinfraktion erklären.

Mit dem spezifischen NtAQI1-Antikörperserum (siehe 2.6.1.4) konnte die Proteinakkumulation des transgenen Fusionsproteins NtAQI1-CAH nicht detektiert werden. Die Proteinbandenmuster von transgenen (70H1) und Wildtyp Tabakpflanzen zeigten keine auffälligen Unterschiede. Bei den Proteinproben der transgenen Linie konnte keine zusätzliche Bande detektiert werden, welche der erwarteten Größe von ca. 70 kDa für das Fusionsprotein (45 kDa NtAQI1 + 25 kDa CAH) entsprach. Entweder stört die Fusion mit CAH die Antikörperbindung an NtAQI1, oder es war zu wenig vom Transgen vorhanden um überhaupt detektiert werden zu können.

4.4.2.3 Phänotypologische Untersuchungen transgener Pflanzen

Die Keimung, das Wachstum und die Entwicklung der transgenen Pflanzenlinie 70H1 (*35S::NtAQI1-CAH*), wurde über einen längeren Zeitraum unter konstanten Standardbedingungen (siehe 3.5.1.1) beobachtet.

Im Vergleich zum Wildtyp (*N. tabacum* NN) zeigten sich phänotypisch keine signifikanten Auffälligkeiten bzw. Unterschiede (siehe Abb. 4.4-17). Die transgenen Pflanzen (70H1) verhielten sich genau wie die wildtypischen Tabakpflanzen (Wt). Es konnte kein Vor- oder Nachteil bezüglich der Keimung, des Wurzelwachstums oder auch des Sprosswachstums unter Standardbedingungen festgestellt werden. Während der gesamten Wachstumsphase waren die Habitus beider Pflanzen von gleicher Gestalt. Auch bezüglich der Floreszenz und Seneszenz waren keine phänotypischen Unterschiede bemerkbar.

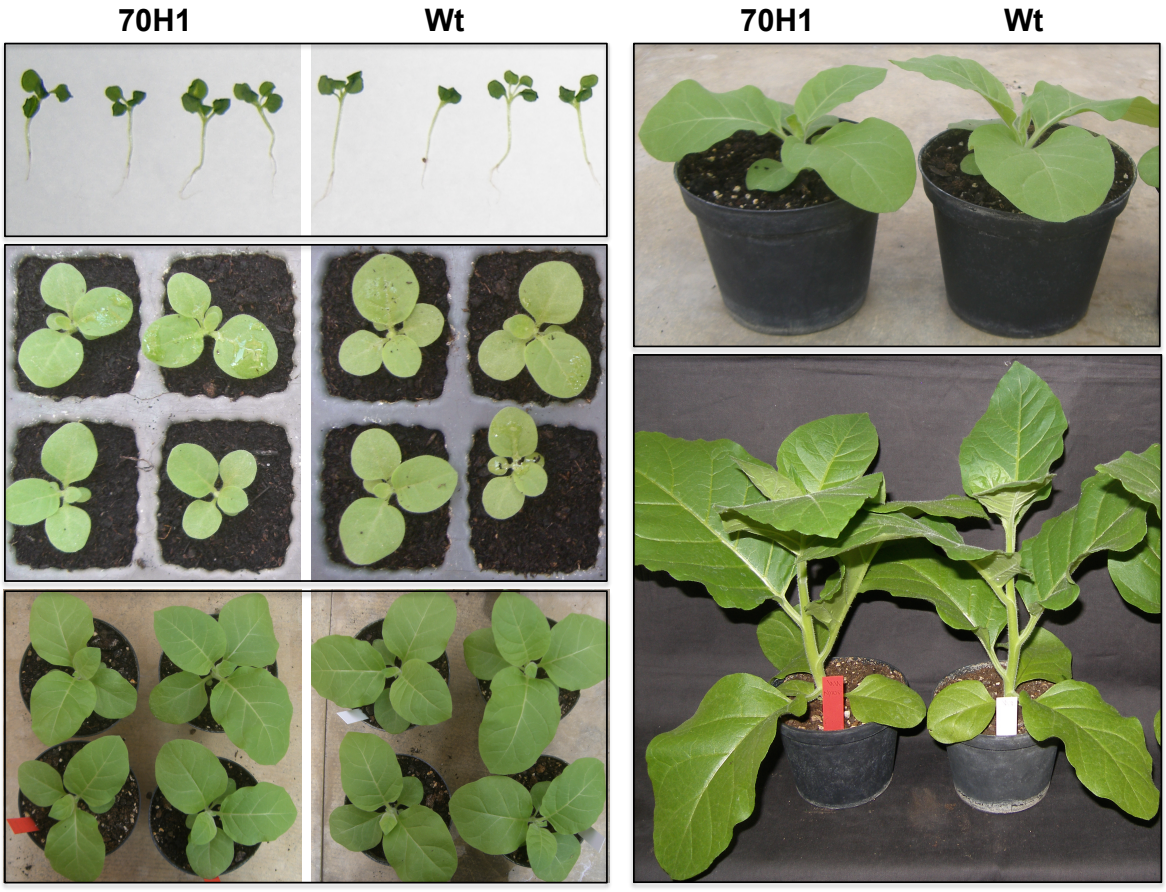


Abb. 4.4-17: Wachstumsvergleich der transgenen Tabaklinie 70H1 (*35S::NtAQI1-CAH*) und der Wildtyp Tabaklinie (Wt; *N. tabacum* NN) unter Standardbedingungen. Die abgebildeten Pflanzen befinden sich in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, vom Keimling bis zur adulten Pflanze.

Beim Versuch die Tabaksamen auf Salzstress (150 mM NaCl) keimen zu lassen, konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen transgenen und wildtypischen Pflanzen beobachtet werden. Die Samen der jeweiligen Pflanzen wurden zunächst sterilisiert (siehe 3.5.1.1), dann auf sterilem Medium +/- 150 mM NaCl ausgesät und zur Stratifikation für 2 Tage bei 4 °C inkubiert. Ein Teil der Keimlinge wurde erst nach Stratifikation auf salzhaltiges Medium (150 mM NaCl) umgesetzt, der andere Teil war dem Salzstress schon von Anfang an ausgesetzt. Anschließend wurde die Keimung und das Wachstum in einem Klimaschrank unter konstanten Bedingungen beobachtet (siehe. 3.5.1.1).

Keimung und Wurzelwachstum beider Pflanzenlinien liefen annähernd synchron ab. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

4.4.2.4 Reaktionen *NtAQI1*-transgener Pflanzen auf eine hypersensitive Abwehrreaktion (HR)

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Aminoacylase-Aktivität von endogenem NtAQI1 durch die Überexpression von *NtAQI1-CAH* in transgenen Pflanzen (70H1) (siehe 2.2.1.1) nicht wie erwartet ansteigt, sondern zumindest in der löslichen Proteinfraktion stark

vermindert wird (siehe Abb. 4.4-15). Allerdings zeigte dieser Befund bisher keine phänotypischen Auswirkungen auf die Entwicklungsprozesse der transgenen Pflanzen. Neben der Aminoacylase-Aktivität konnten mittels verschiedener Experimente Hinweise auf eine zweite, möglicherweise unabhängige Funktion von (Nt)AQI1 erhalten werden: Die Blockierung der Kanalfunktion von Aquaporinen. Somit ist (Nt)AQI1 möglicherweise an der Regulation des H_2O_2- und eventuell auch H_2O-Transportes durch Aquaporine beteiligt.

Ob die Überexpression von *NtAQI1-CAH* bei der transgenen Pflanzenlinie 70H1 Einfluss auf diese Blockierung von Aquaporinen in der Membran nimmt war bisher noch nicht geklärt. Deshalb wurde der Einfluss der Überexpression von *NtAQI1-CAH* auf die H_2O_2 abhängige Pathogenantwort in Pflanzen überprüft. Wie bei 4.4.1.1 schon mit Wildtyp Tabakpflanzen durchgeführt, wurden jetzt Blätter von transgenen Tabakpflanzen (70H1) mit Tabakmosaikvirus (TMV) infiziert (siehe 3.5.6). Da auch die transgene Tabaklinie 70H1 (siehe 2.2.1.1) das N´-Resistenzgen (WHITHAM *et al*., 1994) gegen TMV aufweist, kommt es auch hier zu einer hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) verbunden mit lokalen nekrotischen Reaktionen. Die Ausprägung der HR von transgenen Tabakpflanzen (70H1) wurde mit der HR bei Wildtyp Tabakpflanzen (Wt) verglichen. Die infizierten Blätter befanden sich immer im gleichen Alter und die Pflanzen wurden unter denselben Bedingungen gehalten.

Bei mehrfacher Wiederholung dieses Experiments konnte in den meisten Fällen ein vermindertes Auftreten von Nekrosen bei Pflanzen der transgenen Linie 70H1 beobachtet werden (siehe Abb. 4.4-18).

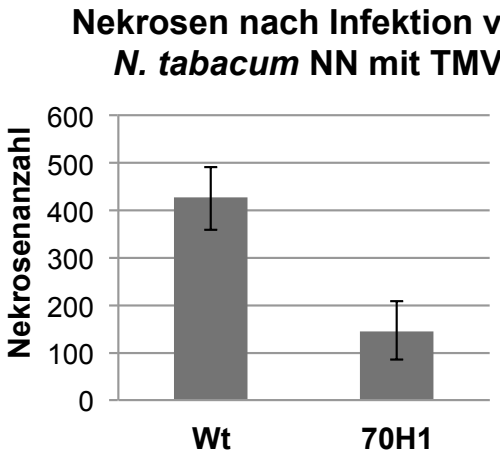


Abb. 4.4-18: Vergleich der Nekrosenanzahl im Zuge einer durch TMV Infektion ausgelösten HR, 7 dpi. Nekrosen wurden bei transgenen (70H1; *35S::NtAQI1-CAH*) und untransformierten (Wt) Tabakpflanzen (*N. tabacum* NN) ausgezählt. (n=6)

Dieses Ergebnis war jedoch nicht in jedem Fall reproduzierbar und somit nicht eindeutig. Manche der untersuchten Pflanzen unterschieden sich nicht in der Ausprägung der lokalen nekrotischen Reaktion. Es konnten jedoch nie mehr Nekrosen bei der transgenen Linie 70H1 im Gegensatz zum Wildtyp gezählt werden.

Die transgenen Tabakpflanzen zeigten also eine leichte Tendenz zur reduzierten Ausbildung von Lokalläsionen im Zuge einer HR. Dieses Ergebnis lieferte erste Hinweise darauf, dass sich die Überexpression von *NtAQI1-CAH* in der Membranprotein-Fraktion bemerkbar machen könnte. Möglicherweise kann die lokale nekrotische Reaktion bei diesen Pflanzen etwas besser unter Kontrolle gehalten werden. Das würde bedeuten, dass das Fusionsprotein NtAQI1-CAH trotz des Verlusts der Acylase-Aktivität, die Fähigkeit zur Blockierung der Aquaporine beibehält und so den H_2O_2-Einstrom in die Zelle verringern kann. Auch die transiente Expression von *NtAQI1-CAH* in *N. benthamiana* bestärkt diese Annahme, da die Inhibition des Aquaporin (NtTIP1;1-GFP)-induzierten Zelltods mit NtAQI1-CAH Fusionen genauso möglich war, wie es bei NtAQI1 ohne CAH der Fall war (siehe 4.2.1).

Da sich bei Wildtyp Tabakpflanzen eine Steigerung der Aminoacylase-Aktivität nach Virusinfektion verbunden mit einer HR feststellen ließ (siehe Abb. 4.4-2), wurde dies auch bei den transgenen Pflanzen (70H1) überprüft. Trotz der sehr geringen Ausgangs-Enzymaktivität bei Blattproben der transgenen Linie (70H1), konnte ein deutlicher Aktivitätsanstieg im Zuge der HR gemessen werden (siehe Abb. 4.4-19).

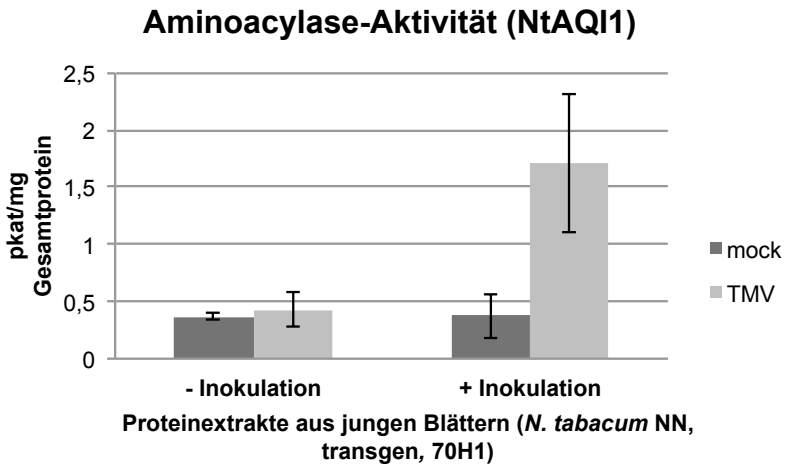


Abb. 4.4-19: Nachweis der Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in uninfizierten (- Inokulation) und mit TMV infizierten (+ Inokulation) Blatthälften von transgenen *N. tabacum* NN Pflanzen (70H1; *35S::NtAQI1-CAH*), 7 dpi. Als Kontrolle (mock) wurden mit Tris-HCl Puffer inokulierte Blätter eingesetzt. (n=5)

Dieses Ergebnis wies erneut auf eine Inhibierung des Proteinabbaus von NtAQI1 als Folge einer hypersensitiven Reaktion hin.

Nun wurde überprüft, ob sich der Aktivitätsanstieg im Falle der transgenen Pflanzen nicht im Transkript-, aber im Proteinlevel von NtAQI1 bemerkbar macht, wie es beim Wildtyp der Fall war (siehe Abb. 4.4-3). Zum einen wurde die Transkriptmenge von *NtAQI1* in TMV-infizierten (+ TMV) und uninfizierten (- TMV) Blatthälften von 4 unabhängigen transgenen Tabakpflanzen (70H1) mittels RT-PCR (siehe 3.1.14, 3.1.14.1, 3.1.11) verglichen (siehe Abb. 4.4-20, A).

Zum anderen wurden mittels Immunodetektion (siehe 3.2.7.2) mögliche Veränderungen der Proteinakkumulation von NtAQI1 als Folge einer HR analysiert. Hierzu wurden Proteinextrakte der löslichen (l) und der Membranprotein-Fraktion (m) (siehe 3.2.1) eingesetzt (siehe Abb. 4.4-20, B).

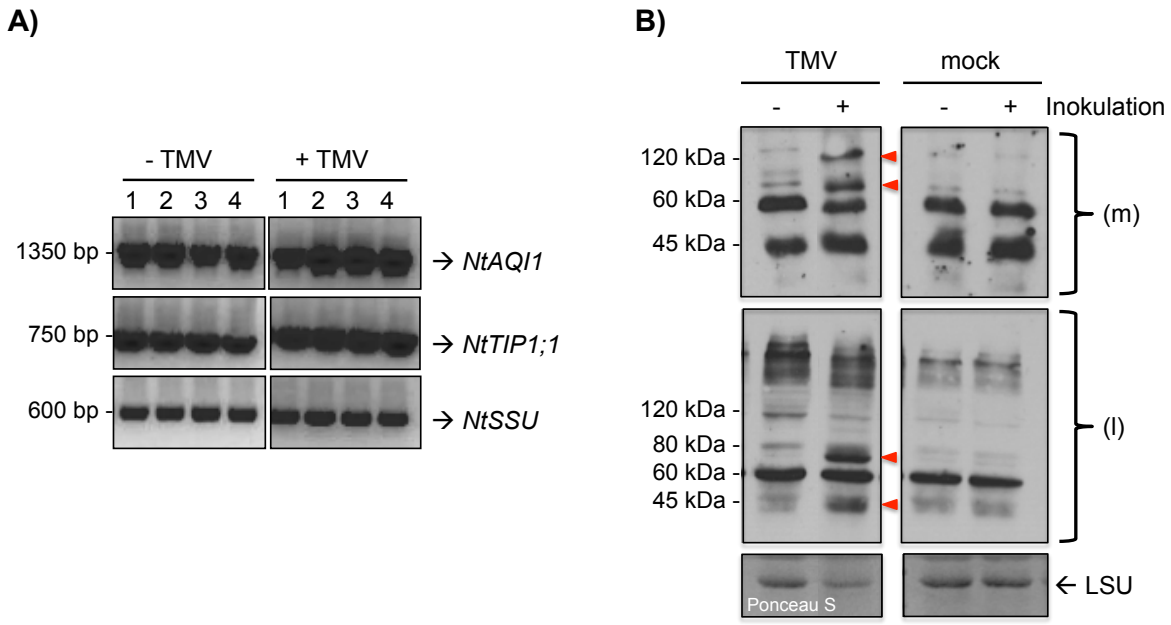


Abb. 4.4-20: Expressionsanalyse von NtAQI1 in uninfizierten (- TMV) und mit TMV infizierten (+ TMV) Blatthälften von TMV-resistenten transgenen Tabakpflanzen (70H1; *35S::NtAQI1-CAH*), 7 dpi. Vergleichende RT-PCR-Analyse der *NtAQI1* RNA-Transkripte mit (+ TMV) und ohne (-TMV) TMV-Infektion von 4 unabhängigen Tabakpflanzen (1 - 4). Das Tabakaquaporin *NtTIP1;1* und die kleine Untereinheit von RuBisCo *NtSSU* dienten als Referenzgene (A). Immunodetektion von NtAQI1 in löslichen (l) und membrangebundenen (m) Proteinextrakten aus Blättern ohne (-) und mit (+) TMV-Infektion. Als Kontrolle diente ein mit Tris-HCl Puffer inokuliertes Blatt (mock). Eine Ponceau S Färbung der Nitrozellulosemembran wurde als Ladekontrolle mitgeführt und die große Untereinheit von RuBisCo (LSU) als Referenz genutzt. Veränderungen im Proteinbandenmuster von NtAQI1 infolge einer TMV-Infektion sind mit roten Pfeilen markiert (B).

Genau wie beim Infektionsversuch mit Wildtyp Tabakpflanzen (siehe 4.4.1.1) konnten auch bei den transgenen Pflanzen keinerlei Veränderungen der Transkriptmenge von *NtAQI1* im Laufe einer durch TMV ausgelösten hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) beobachtet werden (siehe Abb. 4.4-20, A).

Obwohl die NtAQI1-Enzymaktivität auch hier anstieg, veränderte sich hinsichtlich der Transkriptakkumulation nichts. Dies bestätigte erneut den bisher beobachteten Befund, dass die Regulation der Enzymaktivität von NtAQI1 sowohl im Laufe der Blatt-Seneszenz als auch als Reaktion auf programmierten Zelltod nicht auf Transkriptebene abläuft.
Bei der Analyse der Proteinakkumulation hingegen, konnte auch bei den transgenen Pflanzen eine deutliche Veränderung des Proteinbandenmusters festgestellt werden (siehe 4.4-20, B). In der löslichen Proteinfraktion (l) wurde auch hier eine starke Zunahme zweier Proteinbanden mit Größen von 45 kDa und ca. 80 kDa gefunden. Dies entspricht genau dem Ergebnis des Infektionsversuches von Wildtyp Tabakpflanzen (siehe Abb. 4.4-3). Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der 45 kDa großen Proteinbande um das endogene NtAQI1-Monomer und bei der ca. 80 kDa großen Proteinbande um ein NtAQI1 Homodimer handelt. Ein spezifischer Nachweis des transgenen Fusionsproteins NtAQI1-CAH (angenommene Größe ca. 70 kDa) war mit dem NtAQI1-Antikörperserum nicht möglich (siehe auch 4.4.2.2). Allerdings treten im Fall der transgenen Pflanzen in der Membranprotein-Fraktion nach erfolgter TMV-Infektion Proteinbanden von ca. 80 kDa und 120 kDa auf. Diese wurden beim Wildtyp nicht detektiert. Es könnte sich hierbei um Mischkomplexe aus endogenem NtAQI1 und transgenem Fusionsprotein NtAQI1-CAH handeln, welche durch den verlangsamten Proteinabbau verstärkt vorzufinden sind.

4.4.3 Auswirkungen einer *AQI1* „knock-out“ Mutation in *A. thaliana*

Komplementierend zu den Überexpressions-Experimenten mit *N. tabacum* wurde nach einer *A. thaliana* „knock-out“ Mutante gesucht, die keine Expression für *AQI1* aufweist. Nach der Analyse von verschieden Mutanten aus der Kollektion des „Arabidopsis Stock Center, NASC“ konnte eine Mutante identifiziert werden, die eine homozygote T-DNA Insertion im Promotor des Gens At4g38220 (*AQI1*) enthält und folglich kein *AQI1*-Transkript bilden sollte. Diese Mutante wurde fortan als *aqi1-1* (siehe 2.2.1.1) bezeichnet.

4.4.3.1 Expressionsanalyse von *AQI1* in *aqi1-1* Mutanten

Zur Charakterisierung der potentiellen „knock-out“ Linie *aqi1-1* (siehe 2.2.1.1) musste überprüft werden, ob tatsächlich keine Expression von *AQI1* statt findet. Es wurde eine Transkriptanalyse durchgeführt um das Fehlen von *AQI1*-Transkripten zu beweisen. Hierzu wurde RNA aus Rosettenblättern (R) und Blättern des Blütenstandes/Sprosses (Bl) von *A. thaliana* (Col-0) Wildtyp Pflanzen (siehe 2.2.1) und der *A. thaliana* Mutante *aqi1-1* isoliert (siehe 3.1.14).

Mittels RT-PCR (siehe 3.1.14.1, 3.1.11) wurden die *AQI1*-Transkripte amplifiziert und detektiert (siehe Abb. 4.4-21, A).

Außerdem wurde die Aminoacylase-Aktivität (siehe 3.2.8) aus Blättern der Mutante *aqi1-1* im Vergleich zum Wildtyp gemessen (siehe Abb. 4.4-21, B). Bei fehlender Expression von *AQI1* sollte auch keine AQI1-spezifische Aminoacylase-Aktivität zu messen sein.

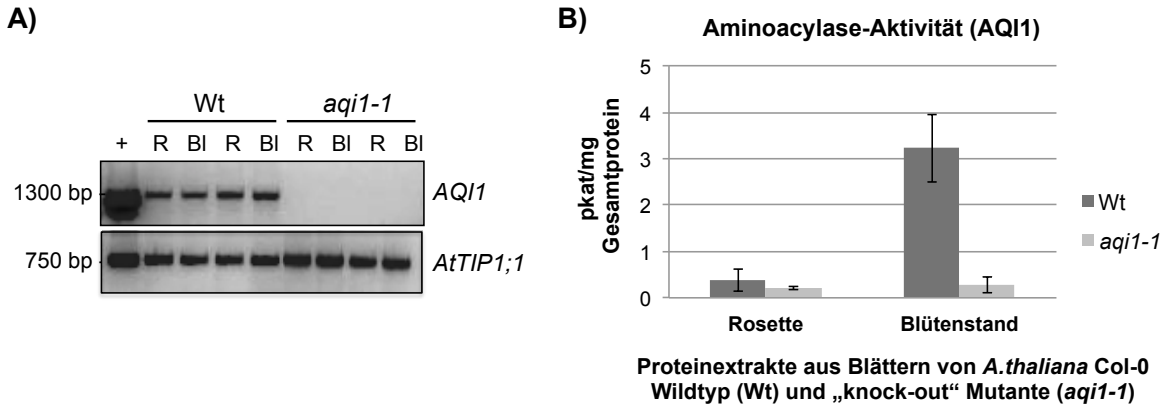


Abb. 4.4-21: Expressionsanalyse der „knock-out“ Mutante *aqi1-1*. Transkriptanalyse (A) und Nachweis der Aminoacylase-Aktivität (n = 3) (B) von *AQI1*/AQI1 in Rosettenblättern (R) und Blättern des Blütenstandes (Bl) von *A. thaliana* Col-0 Wildtyp Pflanzen (Wt) und der „knock-out“-Mutante *aqi1-1*. Die Transkriptanalyse erfolgte mittels RT-PCR. Als Kontrolle wurden die Transkripte des Aquaporins AtTIP1;1 detektiert. Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion (+) diente Plasmid-DNA, welche die cDNA-Sequenzen von *AQI1* bzw. *AtTIP1;1* enthält.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse konnte *aqi1-1* eindeutig als „knock-out“-Mutante identifiziert werden. Die RNA-Proben aus Rosettenblättern (R) und Blättern des Blütenstandes (Bl) von *aqi1-1* enthielten keine *AQI1*-spezifischen Transkripte, während beim Wildtyp die konstitutive Expression von *AQI1* in allen Blättern nachgewiesen wurde (siehe Abb. 4.4-21, A). Auch die AQI1-spezifische Aminoacylase-Aktivität konnte bei der Mutante *aqi1-1* nicht gemessen werden (siehe Abb. 4.4-21, B). Beim Wildtyp hingegen wurde vor allem in Proteinextrakten aus Blättern des Blütenstandes (Bl) Aminoacylase-Aktivität gemessen. Dies beruht auf der altersabhängigen Proteinregulation von AQI1, wie auch schon in Kapitel 4.3.1.7 gezeigt wurde.

4.4.3.2 Phänotypologische Untersuchungen der „knock-out“ Mutante *aqi1-1*

Da die *Arabidopsis* Mutante *aqi1-1* (siehe 2.2.1.1) als positiv bezüglich der „knock-out“ Mutation identifiziert wurde, folgte nun die physiologische Charakterisierung der mutanten Linie. Zunächst wurden Keimung, Wachstum und Entwicklung von *aqi1-1* über einen längeren Zeitraum unter konstanten Standardbedingungen (siehe 3.5.1) beobachtet.

Im Aufbau des Habitus von *aqi1-1* im Vergleich zum Wildtyp (*A. thaliana*, Col-0) zeigten sich phänotypisch keine signifikanten Auffälligkeiten (siehe Abb. 4.4-22). Beim direkten Vergleich von etwa gleich groß gewachsenen Pflanzen beider Linien konnten keine äußerlich sichtbaren Unterschiede festgestellt werden.

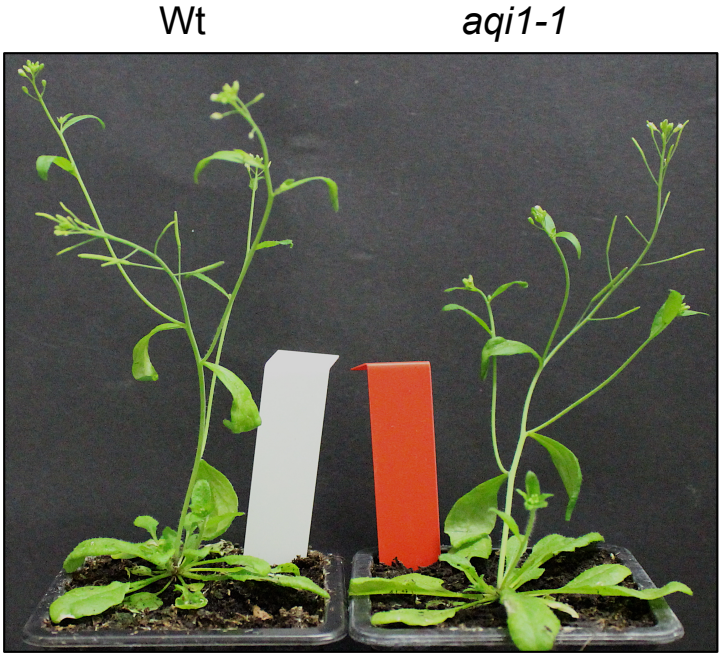


Abb. 4.4-22: Vergleich des Habitus von *A. thaliana* Col-0 Wildtyp (Wt, links) und der „knock-out“ Mutante *aqi1-1* (rechts).

Wenn man jedoch die Entwicklung beider Pflanzenlinien von der Keimung, bis zur Seneszenz synchron beobachtete, konnte man eine leichte Tendenz bezüglich unterschiedlicher Entwicklungsgeschwindigkeiten beobachten (siehe Abb. 4.4-23). In den meisten Fällen war das Wachstum der *aqi1-1* Mutanten etwas verzögert. Die Ausbildung des Blütenstandes setzte bei *aqi1-1* später ein. Somit wurde auch erst später Energie in die Samenbildung gesteckt und die Seneszenz trat etwas verspätet auf.

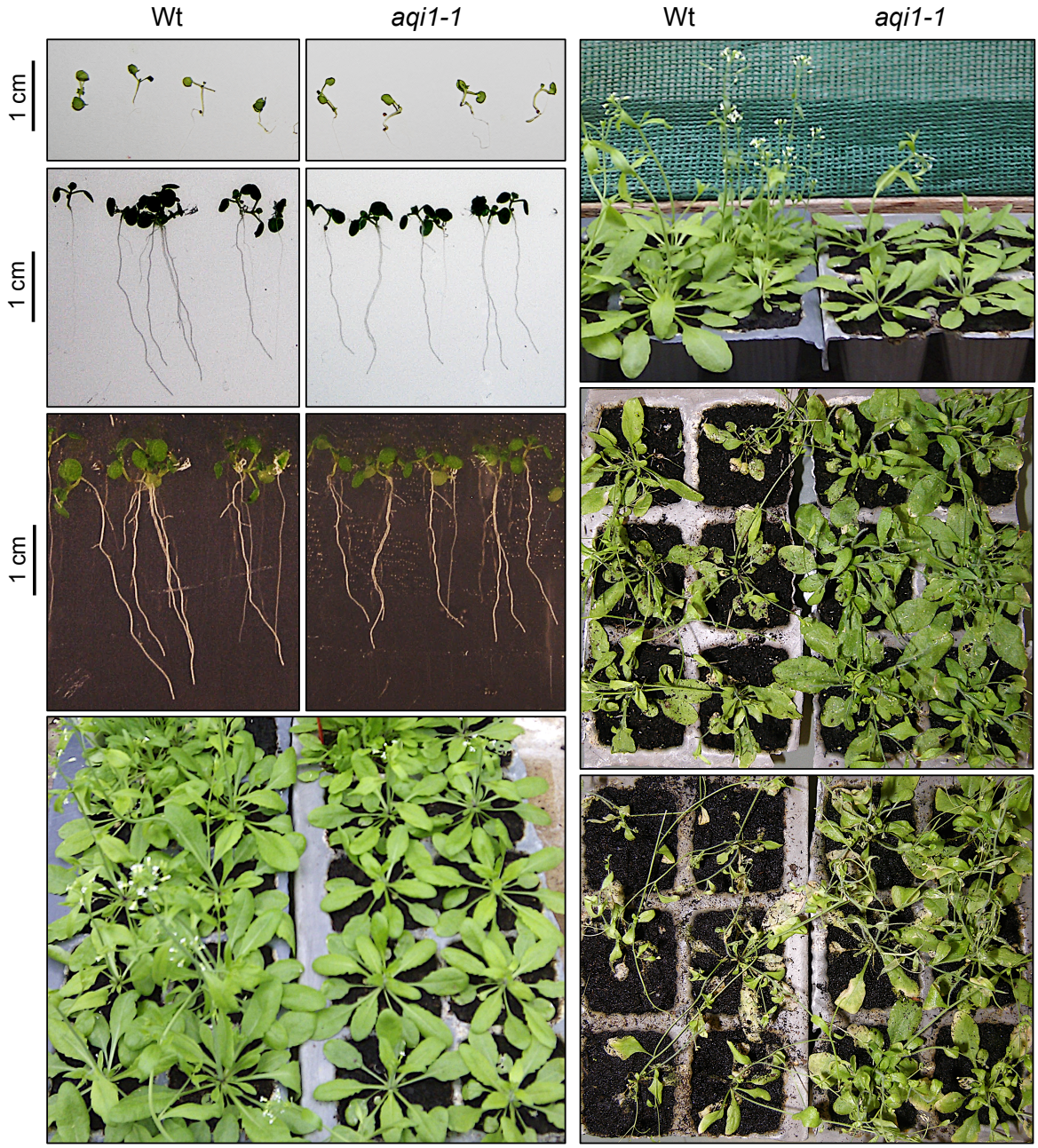


Abb. 4.4-23: Wachstumsvergleich von „knock-out" Mutante *aqi1-1* und *A. thaliana* Col-0 Wildtyp (Wt) unter Standardbedingungen. Die abgebildeten Pflanzen befinden sich in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, vom Keimling über die adulte Pflanze, bis hin zur Seneszenz.

Es folgte ein Versuch die *Arabidopsis*-Samen auf Salzstress (150 mM NaCl) keimen zu lassen, um so eine mögliche physiologische Funktion von AQI1 bei der Wasseraufnahme, bzw. beim Wassertransport näher zu charakterisieren. Die Samen der jeweiligen Pflanzen wurden zunächst sterilisiert (siehe 3.5.1.1), dann auf sterilem Medium +/- 150 mM NaCl ausgesät und zur Stratifikation für 2 Tage bei 4 °C inkubiert. Ein Teil der Keimlinge wurde erst nach Stratifikation auf salzhaltiges Medium (150 mM NaCl) umgesetzt, der andere Teil war dem Salzstress schon von Anfang an ausgesetzt. Anschließend wurden Keimung

und Wachstum in einem Klimaschrank unter konstanten Bedingungen beobachtet (siehe 3.5.1.1).

Es konnten jedoch keine reproduzierbaren signifikanten Unterschiede oder Auffälligkeiten beobachtet werden. In den meisten Fällen liefen Keimung und Wurzelwachstum beider Pflanzenlinien annähernd gleich, bzw. entsprechend dem Wachstumsverhalten unter Standardbedingungen ab.

4.4.3.3 Reaktionen der „knock-out“ Mutante *aqi1-1* auf Virusinfektionen

Wie auch mit den transgenen Tabakpflanzen (70H1; *35S::NtAQI1-CAH*) durchgeführt, wurde nun die Reaktion der *Arabidopsis* „knock-out“-Mutante *aqi1-1* auf biotischen Stress untersucht. Hierzu wurden Virusinfektionen durchgeführt (siehe 3.5.6). Die verwendeten Virenstämme CaMV (Cauliflower Mosaik Virus) und ApTV (Alliaria petiolata Tymovirus) (siehe 2.2.2) wurden zunächst auf *Sinapis alba* (siehe 2.2.1) angezogen. Beide Virenstämme verursachen hier eine systemische Infektion.

Im Fall von CaMV zeigten sich 7 Tage nach Infektion (7 dpi) deutliche Symptome in Form von hellen Flecken und deformierten, eingerollten Blättern (siehe Abb. 4.4-24).



Abb. 4.4-24: Systemische Infektion von *S. alba* mit Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), 7 dpi.

ApTV hingegen verursachte keine äußerlich sichtbaren Symptome.

Die Blätter der virusinfizierten Pflanzen wurden nun geerntet und durch Mörsern in der doppelten Menge (2 µl pro 1 mg Pflanzenmaterial) Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) zu Virusextrakten verarbeitet. Diese Virusextrakte dienten zur Infektion von *A. thaliana* „knock-out"-Mutanten (*aqi1-1*) und Wildtyp Pflanzen (Wt). Pro Pflanze wurden 2 Rosettenblätter mit einer 1:10 Virusverdünnung inokuliert (siehe 3.5.6). Die Pflanzen wurden 28 Tage lang beobachtet.

Die Infektion der *Arabidopsis*-Pflanzen blieb in beiden Fällen über den kompletten Beobachtungszeitraum (28 Tage) symptomlos. Weder die Infektion mit CaMV, noch mit ApTV verursachte äußerlich sichtbare Symptome (siehe Abb. 4.4-25, A).

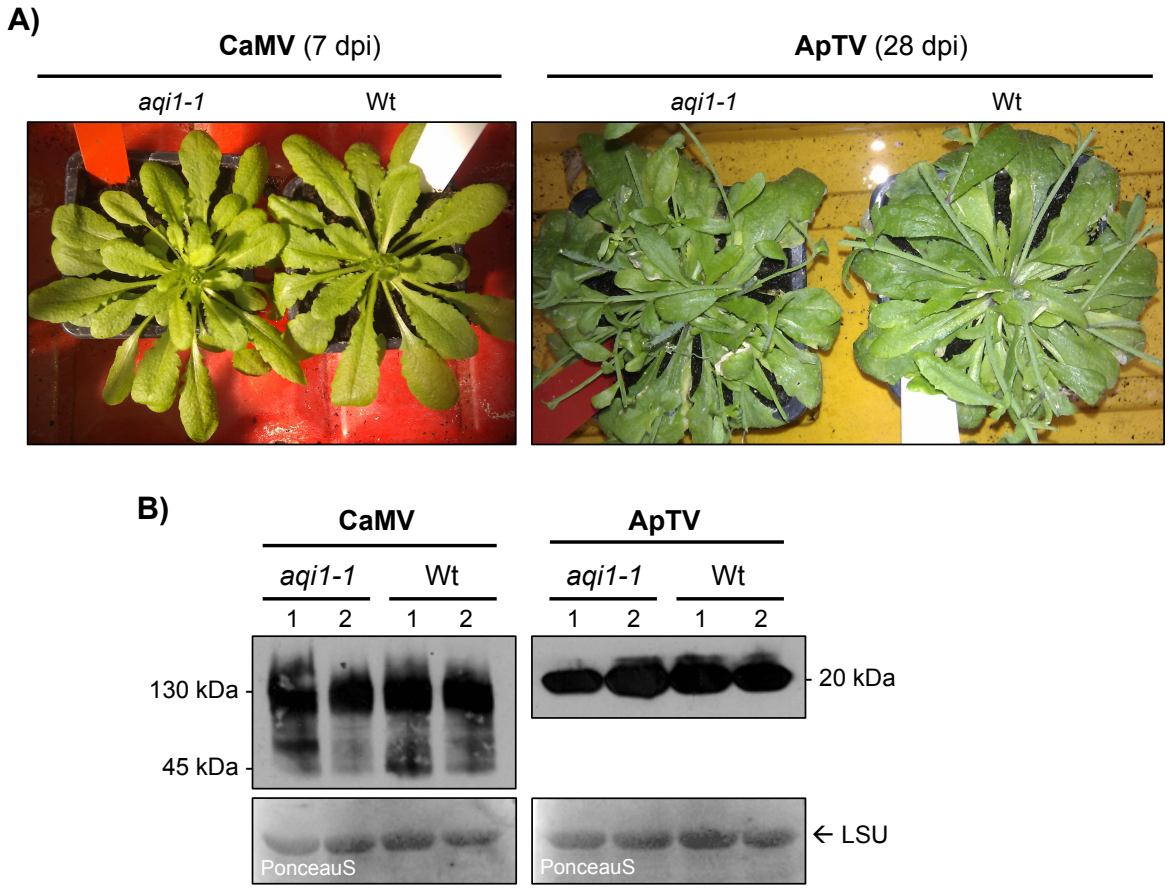


Abb. 4.4-25: Virusinfektionen von *A. thaliana* Col-0 Wildtyp (Wt) und „knock-out" Mutante (*aqi1-1*). Infektion mit Cauliflower Mosaic Virus (CaMV, links, 7 dpi) und Alliaria petiolata Tymovirus (ApTV, rechts, 28 dpi) (A). Immunodetektion der Capsidproteine von CaMV (45 kDa) und ApTV (20 kDa) in infizierten *A. thaliana* Col-0 Wildtyp Pflanzen (Wt) und „knock-out" Mutante (*aqi1-1*), 28 dpi. Eine Ponceau S Färbung der Nitrozellulosemembran wurde als Ladekontrolle mitgeführt und die große Untereinheit von RuBisCo (LSU) als Referenz genutzt (B).

Um die Viren dennoch nachzuweisen und eventuelle Unterschiede bezüglich der Infektionsstärke zwischen Wildtyp (Wt) und Mutante (*aqi1-1*) feststellen zu können, wurde 28 Tage nach Infektion (28 dpi) eine Immunodetektion durchgeführt (siehe 3.2.7.2). Da durch Ausbleiben der phänotypischen Symptome die Verbreitung der Viren in den Pflanzen nicht sichtbar war, mussten die ganzen Pflanzen zu Proteinextrakten verarbeitet werden. Pro Infektionsansatz wurden 2 infizierte Pflanzen verwendet. Nach erfolgter SDS-PAGE (siehe 3.2.7) wurden die Capsidproteine der Viren mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Das CaMV-spezifische Antikörperserum (siehe 2.6.1) weist das ca. 45 kDa große Capsidprotein von CaMV nach. Im Fall von ApTV wurde ein TYMV (Turnip Yellow Mosaic Virus) spezifisches Antikörperserum (siehe 2.6.1) verwendet. Da die Virenstämme ApTV und TYMV nahe verwandt sind, ist der Nachweis des ca. 20 kDa großen Capsidproteins von ApTV mit diesem Antikörperserum möglich.

Mittels dieser Immunodetektion konnte gezeigte werden, dass die Infektion der *Arabidopsis*-Pflanzen trotz Ausbleiben sichtbarer Symptome erfolgreich war (siehe Abb. 4.4-25, B). Sowohl in Wildtyp Pflanzen (Wt), als auch in den Mutanten *aqi1-1* konnten Capsidproteine der jeweiligen Viren detektiert werden. Im Fall von CaMV kam es außerdem zur Detektion von mehreren Proteinbanden mit Größen zwischen 45 kDa und 130 kDa. Dies liegt daran, dass bei der Genexpression von CaMV zuerst ein 216 kDa großes Polyprotein entsteht, welches proteolytisch in die vier Produkte Capsidprotein, Aspartatproteinase, Reverse Transkriptase und ein Zell-zu-Zell-Bewegungsprotein gespalten wird (FÜTTERER, 2001; OLSZEWSKI & LOCKHART, 2001).

Bezüglich der Infektionsstärke der beiden Viren konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden. Die Menge der detektierten Virusproteine war in beiden Pflanzen annähernd gleich, sowohl im Fall von CaMV-Infektionen als auch bei ApTV-Infektionen.

4.4.3.4 Untersuchung des Hypokotyl Streckungswachtums der „knock-out" Mutante *aqi1-1*

Im folgenden Experiment wurde die physiologische Rolle von AQI1 bei der Wasseraufnahme durch Aquaporine näher analysiert. Es wurde überprüft, ob sich die „knock-out" Mutante *aqi1-1* hinsichtlich der Hypokotylstreckung unter Lichtausschluss vom Wildtyp unterscheidet. Das Hypokotyl Streckungswachstum bei Pflanzenkeimlingen kommt durch Wasseraufnahme zustande. Es beruht nicht auf Zellteilung, sondern wird durch die Streckung der Pflanzenzellen durch Vergrößerung des Zellsaftraums unter Wasseraufnahme verursacht. Aufgrund der fehlenden „Stöpselwirkung" von AQI1 bei den

„knock-out“ Mutanten wäre ein gesteigertes Hypokotyl Streckungswachstum durch vermehrte Wasseraufnahme denkbar.

Die Samen von *A. thaliana* Col-0 Wildtyp und „knock-out“ Mutante *aqi1-1* wurden auf Filterpapier mit unterschiedlichem Wasserangebot (750 µl, 1000 µl, 1500 µl) ausgelegt. Zur Initialisierung des Hypokotyl Streckungswachstums wurde wie unter 3.5.1.2 beschrieben vorgegangen. Nach 5 Tagen wurde die Länge der gewachsenen Hypokotyle gemessen und verglichen.

Sowohl beim Wildtyp als auch bei *aqi1-1* konnte die maximale Hypokotylstreckung bei der höchsten Wasserkonzentration (1500 µl) beobachtet werden (siehe Abb. 4.4-26). Bei *aqi1-1* nahm die Hypokotylstreckung parallel mit der Wasserkonzentration kontinuierlich zu. Beim Wildtyp hingegen konnte bei niedrigeren Wasserkonzentrationen (750 µl und 1000 µl) eine prozentual schwächere Streckung der Hypokotyle im Vergleich zu *aqi1-1* beobachtet werden, welche sich als signifikant erwies. Bei der höchsten Wasserkonzentration (1500 µl) war diese Differenz jedoch wieder ausgeglichen und kaum ein Unterschied der Hypokotylstreckung zwischen Wildtyp und Mutante zu sehen.

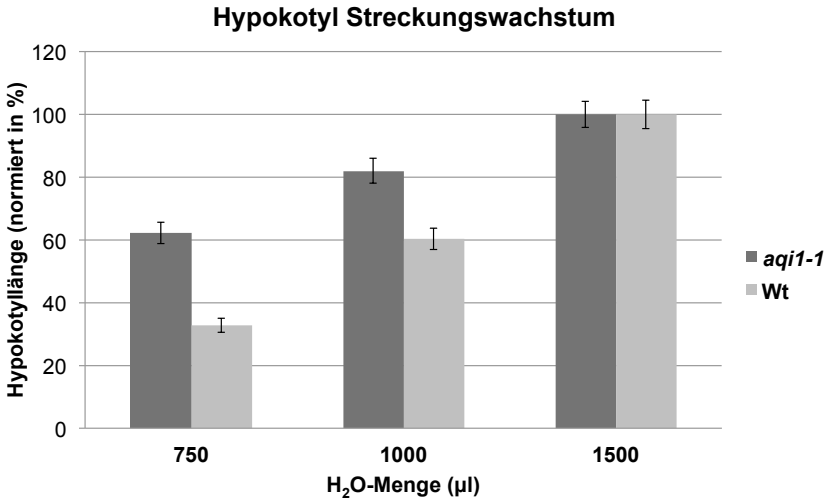


Abb. 4.4-26: Vergleich des Hypokotyl Streckungswachstums von *A. thaliana* Col-0 Wildtyp (Wt) und „knock-out“ Mutante *aqi1-1* bei unterschiedlichem Wasserangebot. Die Länge der Hypokotyle wurde 5 Tage nach Initialisierung der Keimung gemessen. (n = 200)

Da die Hypokotylstreckung durch Wasseraufnahme zu Stande kommt, könnte man davon ausgehen, dass das gesteigerte Hypokotylwachstum der Mutanten (*aqi1-1*) mit dem Fehlen von AQI1 zusammenhängt. Möglicherweise wird vermehrt H_2O durch die Aquaporine aufgenommen, da diese nicht mehr von AQI1 reguliert bzw. blockiert werden können, wie es beim Wildtyp der Fall ist.

5 Diskussion

Der programmierte Zelltod (PCD) ist für Pflanzen von enormer Wichtigkeit. Zum einen für Entwicklung und Seneszenzprozesse, zum anderen für die Pathogenabwehr in Form der hypersensitiven Abwehrreaktion (HR).

Die Induktion von PCD bei Pflanzen erfolgt über komplexe interaktive Signalwege. Hierbei spielen reaktive Sauerstoffspezies, wie H_2O_2, als Signalsubstanzen eine wesentliche Rolle. Diese Signalsubstanzen müssen über Zellmembranen hinweg kontrolliert transportiert werden. Der Transport von H_2O_2 erfolgt über Aquaporine (BIENERT *et al*., 2007; HOCH, 2011), welche ihre Kanalfunktion betreffend reguliert werden müssen.

Als zellulärer Interaktionspartner der H_2O_2-transportierenden Aquaporine wurde das pflanzliche Enzym AQUAPORIN INTERACTOR 1 (AQI1) identifiziert. AQI1 besitzt eine hohe Sequenzhomologie zur Aminoacylase 1 (Acy1) aus Säugern. In dieser Arbeit wurden die physiologische Funktion von AQI1 als potentieller Regulator von Aquaporinen, sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen analysiert.

5.1 Identifizierung von AQI1 als Aminoacylase

Die erste Frage die es zu klären galt war, ob es sich bei AQI1 tatsächlich um eine pflanzliche Aminoacylase handelt, wie aufgrund der Aminosäuresequenz vermutet wurde. *AQI1* wurde als Interaktionspartner des Aquaporins AtTIP1;1 aus einer *Arabidopsis thaliana* cDNA Bank isoliert (HOCH, 2011). Die Aminosäuresequenzen von AQI1, sowie dem entsprechenden Tabakprotein NtAQI1, weisen eine starke Homologie zu Aminoacylase 1 aus Säugern auf. Wenn man die Sequenzen der pflanzlichen Enzyme mit der Sequenz der humanen AMINOACYLASE 1 (ACY1) vergleicht, beträgt die Aminosäure-Identität für AQI1/ACY1 = 45 %, für NtAQI1/ACY1 = 42 % und für AQI1/NtAQI1 = 69 % (NCBI, Blast-Programm; ALTSCHUL *et al*., 1990).

Das „Alignment“ (siehe Abb. 5.1-1) der Aminosäuresequenzen aller drei Enzyme macht deutlich, wie groß die Ähnlichkeit vor allem bezüglich konservierter Domänen und Motive ist. Die beiden PWW(VWW)-Motive (siehe Abb. 5.1-1, grün) kommen in allen drei Enzymen vor und sind höchstwahrscheinlich für eine Membranassoziation der Proteine verantwortlich (siehe auch 5.2). Für das humane Protein ACY1 konnten das aktive Zentrum (siehe Abb. 5.1-1, rosa), die Zinkbindestelle (siehe Abb. 5.1-1, rot) und eine an der Substratbindung beteiligte Aminosäure (siehe Abb. 5.1-1, blau) anhand von

Experimenten mit ACY1-Mutanten identifiziert werden (LINDNER *et al.*, 2003, 2005). Diese Motive scheinen konserviert zu sein und liegen in den pflanzlichen homologen Proteinen AQI1 und NtAQI1 in selber Weise vor. Daher liegt nahe, dass die entsprechenden Aminosäuren der pflanzlichen Proteine auch dieselbe Funktion erfüllen.

```
ACY1    -------------------------MTSKGPEEEHPSVTLFRQYLRIRTVQPKPDYGAAV 35
AQI1    -------------MSLLRLLLVVVVLHLSAVAGDDAIVSRFQEYLRINTVQPNPEYYKAV 47
NtAQI1  MSFCGGRRDKHNSYHYSLCLSVLLLVTATAAEEASTIISRFQQYLQINTAQPQPNYYEAA 60
                                 :  ..       :: *::**:*.*.**:*:*  *.

ACY1    AFFEETARQLGLGCQKVEVAPGYVVTVLTWPGTNPTLSSILLNSHTDVVPVFKEHWSHDP 95
AQI1    DFIISQAKPLSLESQTIEFVKGKPLLLLKWVGSDPTLPAFLLNSHTDVVPFEDSKWTHHP 107
NtAQI1  EFITSQAKSLNLESQTLELVKGKPLILLKWAGKDPSLPSVLLNSHTDVVPSEHHKWAHPP 120
         *: . *: * * .*.:*.. *  : :*.* *.:*:* :.**********  . :*:* *

ACY1    FEAFKDS-EGYIYARGAQDMKCVSIQYLEAVRRLKVEGHRFPRTIHMTFVPDEEVGGHQG 154
AQI1    LQAHMDH-HGDIYARGSQDMKCVGMQYLEAIRKLQASGFKPLRSVYLSFVPDEEIGGHDG 166
NtAQI1  FSAHLDPASGNIYARGSQDMKCVGLQYLEAIRKLKASGFQPTRTVYLSFVPDEEIGGDDG 180
        :.*. *   * *****:******.:*****:*:*:..*.:  *:::::******:**.:*

ACY1    MELFVQRPEFHALRAGFALDEGIANPTDAFTVFYSERSPWWVRVTSTGRPGHASRFMEDT 214
AQI1    AEKFAESQLFKSLNIAIVLDEGLPSPTESYRVFYGERSPWWLVIKAKGPPGHGAKLYDNS 226
NtAQI1  AGKFVDSDVFVKMNVGIVLDEGLPSPTENYRAFYGERSPWWLVVKAVGAPGHGAKLYDNT 240
           *.:   *  :. .:.****: .**: : .**.******: :.: * ***.::: :::

ACY1    AAEKLHKVVNSILAFREKEWQRLQSNPHLKEGSVTSVNLTKLEG------GVAYNVIPAT 268
AQI1    AMENLLKSIESIRRFRASQFDLLKAG-GIAEGDVVSVNMAFLKAGTPSPTGFVMNLQPSE 285
NtAQI1  ATENLLKSIETIRRFRAAQFDLVKAG-LKAEGEVISVNMVFLKAGTPSPSGFVMNLQPSE 299
        * *:* * :::*  **  ::: :::     **.* ***:. *:.      *.. *: *:

ACY1    MSASFDFRVAPDVDFKAFEEQLQSWCQAAGEGVTLEFAQK------WMHPQVTPTDDSNP 322
AQI1    AEAGFDIRVPPSVDAEALERRLVEEWAPAARNMSFEFKQKLT-----GKQFLTAADDSNP 340
NtAQI1  AQAGFDIRVPPTADQASLEKRIAEEWAPASRNMTFEFKQKVSVNDKFGRPAITAVDSSNV 359
         .*.**:** * .*  ::*.:: .    *.. :::** **        :  :* .*.**

ACY1    WWAAFSRVCKDMN-LTLEPEIMPAATDNRYIRAVGVPALGFSPMNRTPVLLHDHDERLHE 381
AQI1    WWGLLENAVKEAGGRTSKPEIFPASTDARYFRKAGVPAFGFSPISNTPSLLHDHNEYLGK 400
NtAQI1  WWALLEESIVKANAGVGKPEIFPASTGARYFRERGLPAIGFSPMANTPILLHDHNEFLNK 419
        **. :..   .    . :***:**:*  **:*  *:**:****: .** *****:* * :

ACY1    AVFLRGVDIYTRLLPALASVPALPSDS------ 408
AQI1    AEYLKGIEVYVSIIKAYASYESKSGS---RDEL 430
NtAQI1  DEYLKGIDVYESIIKTYASYIEHPRDEASREEL 452
          :*:*:::*  :: : **      .
```

Abb. 5.1-1: Vergleich der Aminosäuresequenzen (NCBI) des humanen Proteins ACY1 (NP_000657.1) mit den pflanzlichen Proteinen AQI1 aus *A. thaliana* (NP_568036.2) und NtAQI1 aus *N. tabacum* (EB448218.1), („Alignment“, www.uniprot.org, CLUSTAL O). Völlige Übereinstimmung der Aminosäuren (gelb hinterlegt und *), sehr ähnlich (:), ähnlich (.). Konservierte Motive mit bekannter Funktion sind farbig hinterlegt: PWW-Motive (grün), aktives Zentrum (rosa), Zink-Bindestelle (rot), Substratbindestelle (blau), ER-Exportsignale (N-terminal) und ER-Lokalisationssignale (C-terminal) (türkis), typische Eigenschaften des N-terminalen ER-Export-Signals: hydrophober Kern (blaugrün); typische angrenzende Aminosäuren (hellgrau); potentielle Schnittstellen (oliv).

In Tabelle 5.1-1 sind die Aminosäure(positione)n aller bekannten Motive von ACY1 und die entsprechenden Aminosäure(positione)n der pflanzlichen Proteine AQI1 und NtAQI1 aufgelistet.

Tab. 5.1-1: Auflistung bekannter Motive des humanen Proteins ACY1 mit den zugehörigen Aminosäurepositionen (LINDNER *et al.*, 2003, 2005). Aufgrund von Homologie kann den entsprechenden Bereichen der pflanzlichen Proteine AQI1 und NtAQI1 dieselbe Funktion zugeordnet werden.

	ACY1	AQI1	NtAQI1
PWW-Motive (Membran-assoziation)	P, Pro193 W, Trp194 W, Trp195	P, Pro105 W, Trp106 W, Trp107	P, Pro219 W, Trp220 W, Trp221
	P, Pro322 W, Trp323 W, Trp324	P, Pro340 W, Trp341 W, Trp342	V, Val359 W, Trp360 W, Trp361
aktives Zentrum	D, Asp82 E, Glu147	D, Asp94 E, Glu159	D, Asp107 E, Glu173
Zink-Bindestelle	H, His80 D, Asp113 E, Glu148 E, Glu175 H, His373	H, His92 D, Asp125 E, Glu160 E, Glu187 H, His392	H, His105 D, Asp139 E, Glu174 E, Glu201 H, His411
Substrat-Bindestelle	R, Arg276	R, Arg293	R, Arg308

Der Unterschied der vollständigen Aminosäuresequenzen liegt zu einem großen Teil in den ER-Export- und ER-Lokalisationssequenzen (türkis) begründet, die sich am N- und C-Terminus der pflanzlichen Proteine AQI1 und NtAQI1, jedoch nicht am N- und C-Terminus des humanen Proteins ACY1 befinden.

C-terminale ER-Lokalisationssequenzen wie RDEL bzw. REEL sind weit verbreitet und können auf die Größe von vier Aminosäuren mit variabler, jedoch bekannter Reihenfolge begrenzt werden. Sie sorgen für die Retention von Proteinen im ER und verhindern den Wiedereintritt ins Zytoplasma (DENECKE *et al.*, 1992, VITALE *et al.*, 1993).

ER-Export-Signale am N-Terminus sorgen dafür, dass Proteine nach oder während ihrer Synthese aus dem Zytoplasma ins ER exportiert werden. Bei hydrophoben Signalsequenzen, wie es bei (Nt)AQI1 der Fall ist, findet dieser Transport oft co-translational, also während der Proteinbiosynthese am rauen ER statt.

Die exakte Größe der Export-Signale am N-Terminus von (Nt)AQI1 ist nicht bekannt. N-terminale Signalsequenzen dieser Art haben üblicherweise eine Länge von 15 - 50 Aminosäuren. Die genaue Abfolge der einzelnen Aminosäuren ist weniger wichtig als deren physikalischen Eigenschaften. Ein hydrophober Kern wird N-terminal von positiv geladenen Aminosäuren und C-terminal von polaren Aminosäuren flankiert.

Der C-terminale Bereich enthält oft helixbrechende Aminosäuren wie Prolin und Glycin. Meistens wird die N-terminale Signalsequenz vom Protein abgespalten bevor es an seinen endgültigen Standort gelangt. Die Schnittstelle wird durch kleine, ungeladene Aminosäurereste in der C-terminalen polaren Region der Signalsequenz definiert (BLOBEL & DOBBERSTEIN, 1975; MARTOGLIO & DOBBERSTEIN, 1998).
Aufgrund dieser bekannten Eigenschaften, könnten bei AQI1 die Aminosäuren 2 - 20 und bei NtAQI1 die Aminosäuren 2 - 35 ein solches Export-Signal darstellen (siehe Abb. 5.1-1, türkis). Beide Bereiche enthalten einen hydrophoben Kern aus Valin und Leucin und die entsprechenden positiv geladenen (R/Arginin bzw. H/Histidin) und polaren (S/Serin bzw. T/Threonin) Aminosäuren (hellgrau), welche den Kern (blaugrün) flankieren. Die Aminosäuren G/Glycin und A/Alanin könnten die Schnittstellen bzw. helixbrechende Aminosäuren darstellen (oliv). Aufgrund dieser variablen Signalsequenz ist der N-terminale Bereich der Proteine am wenigsten konserviert.
Geht man davon aus, dass diese N-terminalen Signalsequenzen auch bei (Nt)AQI1 abgespalten werden, entspricht die molekulare Masse der pflanzlichen Proteine in etwa der Molekularmasse der humanen ACY1 (45 kDa) (COOK *et al.*, 1993). Mittels Immunodetektion konnte NtAQI1 mehrfach mit einer Größe von ca. 45 kDa detektiert werden (siehe Abb. 4.3-17, 4.3-18, 4.4-3, 4.4-6, 4.4-9, 4.4-11).

Sucht man nach weiteren ACY1 bzw. AQI1-ähnlichen Sequenzen bei Tieren und Pflanzen stellt man fest, dass jede Art Aminoacylase 1-homologe Gene besitzt. Aminoacylasen sind hoch konservierte Proteine, die in allen Organismengruppen vertreten sind (SAKANYAN *et al.*, 1993; ISHIKAWA *et al.*, 2001; STORY *et al.*, 2001). Durch phylogenetische Gegenüberstellung verschiedener beispielhafter Aminosäure-Sequenzen, kann man den hohen Verwandtschaftsgrad zwischen pflanzlichen und tierischen Acy1-(homologen) Proteinen konkretisieren (siehe Abb. 5.1-2).
Die Verwandtschaftsbeziehung und Sequenzhomologie der pflanzlichen und tierischen Proteine reichen jedoch nicht aus, um AQI1 eindeutig als Aminoacylase zu identifizieren. Obwohl die Stärke der Homologie und die gemeinsamen konservierten Motive von ACY1 und (Nt)AQI1 dafür sprechen, waren noch weitere Nachweise nötig um (Nt)AQI1 auch funktionell den Aminoacylasen zuordnen zu können. Bisher war noch keines der Aminoacylase-homologen Proteine aus Pflanzen bezüglich seiner Funktion als Aminoacylase identifiziert worden.

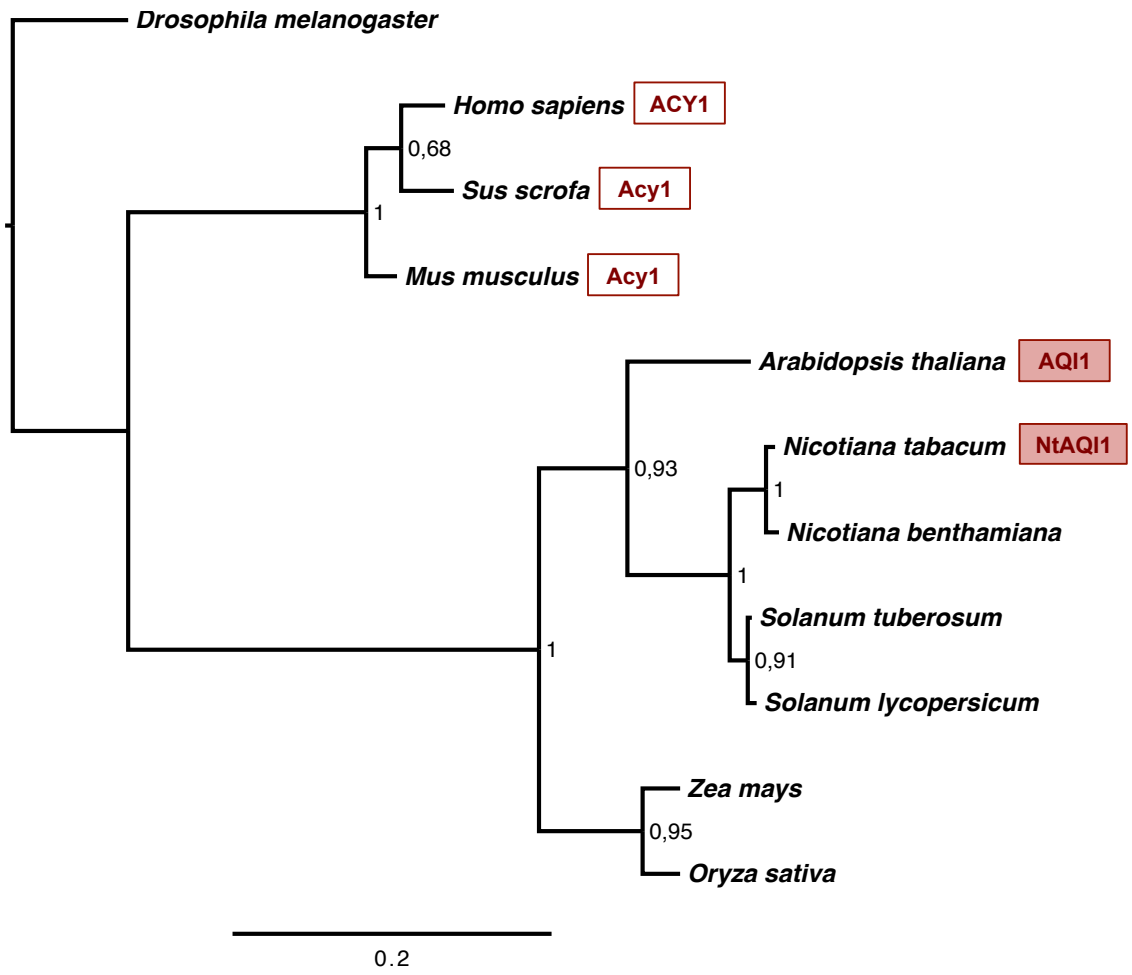


Abb. 5.1-2: Phylogenetische Gegenüberstellung verschiedener Acy1-(homologer) Proteine aus Tieren und Pflanzen (erstellt mit www.phylogeny.fr; DEREEPER & GUIGNON, 2008). Die Grundlage dieses Stammbaums bildet ein „Alignment" (MUSCLE Algorithmus) der Aminosäure-Sequenzen (NCBI: *Homo sapiens* NP_000657.1, *Mus musculus* NP_079647.1, *Sus scrofa* NP_999061.1, *Drosophila melanogaster* NP_650004.1, *Arabidopsis thaliana* NP_568036.2, *Nicotiana tabacum* EB448218.1, *Nicotiana benthamiana* BAO98754, *Solanum lycopersicum* XP_004231104.1, *Solanum tuberosum* XP_006064339.1, *Oryza sativa* EEC83866.1, *Zea mays* NP_001148589.1) von Acy1 bzw. Acy1-homologen Proteinen verschiedener Spezies. Die phylogenetische Analyse erfolgte mit dem „Maximum-Likelihood" Verfahren (WAG-Methode). Die „bootstrap"-Analyse wurde mit 500 Wiederholungen durchgeführt. Die Länge des Distanzbalkens mit dem Wert 0,2 entspricht 20 % Aminosäureaustausch pro Position im Sequenz-„Alignment". Die Werte an den Knotenpunkten geben an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit der Abgrenzung eines Clusters ist (1 = 100 %).

Eine typische Eigenschaft der bisher beschriebenen Aminoacylasen aus Säugern ist die von ihnen katalysierte chemische Reaktion: Die Hydrolyse von N-terminal ac(et)ylierten L-Aminosäuren zu einer freien L-Aminosäure und einer Ac(et)ylgruppe (ENDO, 1980; PITTELKOW *et al.*, 1998; PERRIER *et al.*, 2005).

Diese Funktion der Deacetylierung von Aminosäuren konnte in der vorliegenden Arbeit mittels eines spezifischen Aminoacylase-Aktivitätstests („Ninhydrin-Assay") auch für AQI1 und NtAQI1 nachgewiesen werden. Sowohl *in vitro* nach rekombinanter Expression in *E. coli* (siehe 4.3.1.1), als auch *in planta* (siehe 4.3.1.2) erfüllte (Nt)AQI1 diese für

Aminoacylasen typische Aufgabe. Die Beteiligung anderer Proteasen bei der Hydrolyse der N-acetylierten Aminosäuren im Aminoacylase-Aktivitätstest konnte mittels verschiedener Kontrollversuche ausgeschlossen werden.

Das heißt, es besteht nicht nur eine Sequenzhomologie zwischen den pflanzlichen Proteinen (Nt)AQI1 und Acy1 aus Säugern, sondern auch eine Homologie bezüglich der Enzymaktivität.

Zudem ist die Enzymaktivität der Aminoacylase 1 aus Säugern nachweislich abhängig von der Bindung eines Zink-II-Ions (GILLES *et al*., 1984; HEESE *et al*., 1990; WU & TSOU, 1993). Diese Abhängigkeit wurde in dieser Arbeit auch für NtAQI1 gefunden. Durch Entfernung von Zn^{2+} verlor das Enzym nahezu vollständig seine Fähigkeit zur Deacetylierung von N-acetyliertem L-Methionin. Im Gegenzug konnte die Acylaseaktivität durch erneute Zinkgabe, zumindest zu einem Teil, wieder zurück erlangt werden (siehe 4.3.1.4).

Bei Analysen der Protein-Protein-Interaktion mit den pflanzlichen Aquaporinen TIP1;1 und PIP2;2 aus *Arabidopsis* und Tabak wurde eine weitere Gemeinsamkeit der humanen ACY1 und der pflanzlichen homologen Proteine AQI1 und NtAQI1 festgestellt. Im Hefesystem konnte die Interaktion mit NtTIP1;1 sowohl für (Nt)AQI1, als auch für die humane ACY1 bewiesen werden (siehe 4.1). Auch die physiologische Funktion der Inhibition von Zelltod, welcher durch die Überexpression von Aquaporin-GFP-Fusionen (*NtTIP1;1-GFP*) ausgelöst wurde, konnte sowohl von den pflanzlichen Proteinen (Nt)AQI1, als auch von der humanen ACY1 gleichermaßen erfüllt werden (siehe 4.2.1.1). Diese Inhibition ist auf die zelluläre Interaktion von (Nt)AQI1 und ACY1 mit dem Aquaporin NtTIP1;1 zurückzuführen.

Die Gemeinsamkeiten der pflanzlichen Proteine (Nt)AQI1 und der humanen ACY1 bestätigen die Hypothese, dass es sich bei den Proteinen AQI1 und NtAQI1 um pflanzliche Aminoacylasen handelt. Auch funktionell konnte eine Homologie der Proteine bestätigt werden.

Somit gelten AQI1 und NtAQI1 als die ersten in Pflanzen identifizierten Aminoacylasen.

5.2 Subzelluläre Lokalisation von AQI1

Die subzelluläre Lokalisation der bisher beschriebenen Aminoacylasen aus Säugern wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Forschungsarbeiten vertreten die Hypothese, dass es sich bei Aminoacylasen vorwiegend um zytosolische Enzyme handelt (SCHMIEDEBERG, 1881; COOK *et al*., 1993; GIARDINA *et al*., 1999). Die erste Aminoacylase wurde in den wässrigen Gewebsauszügen der Schweineniere identifiziert (SCHMIEDEBERG, 1881). Jedoch wird auch über eine Membranassoziation der tierischen Aminoacylase 1 diskutiert. HEESE *et al*. zeigten, dass *in situ* ein erheblicher Teil der ACY1-Enzymaktivität der Nierenrinde an der Membran zu finden ist. Auch eine ausgeprägte Tendenz zur Assoziation mit Membranvesikeln konnte nachgewiesen werden (HEESE *et al*., 1988; PALM & RÖHM, 1995; GIARDINA *et al*., 1997).

In dieser Arbeit konnte das Vorkommen der pflanzlichen Proteine (Nt)AQI1, sowohl in löslichen Proteinextrakten, als auch in Membranprotein-Extrakten von Tabak und *Arabidopsis* nachgewiesen werden. Jedoch wurde die Proteinakkumulation von NtAQI1 in der Membranproteinfraktion deutlich stärker detektiert, als in der löslichen Proteinfraktion (siehe 4.3.3.2), was eindeutig für eine Membranassoziation des pflanzlichen NtAQI1 spricht.

In der Membranproteinfraktion wurde NtAQI1 hauptsächlich als Monomer (45 kDa) gefunden, wohingegen in der löslichen Proteinfraktion eher größere Proteinbanden vorlagen, die verschiedene multimere Formen von NtAQI1 darstellen könnten. Möglicherweise verliert das in der Membranproteinfraktion vorliegende NtAQI1 durch seine Assoziation an die Membran und die Interaktion mit den membranintegralen Aquaporinen die Fähigkeit zur Bildung von Multimeren, da es andersweitig gebunden ist. Die lösliche Form von NtAQI1 besitzt jedoch die Fähigkeit zu komplexieren und Multimere zu bilden. Das Vorkommen von tierischen Aminoacylasen als Homodimere und Homotetramere ist bekannt (CHO *et al*., 1987; YANG *et al*., 1994; PALM & RÖHM, 1995). Auch die Ergebnisse einer FPLC-Analyse mit Proteinextrakten aus Tabak weisen darauf hin, dass NtAQI1 in löslichen Proteinextrakten als Homotetramer vorliegt (siehe 4.3.1.5).

Bei genauerem Betrachten der Aminosäuresequenzen von AQI1 und NtAQI1 stellt man fest, dass beide Sequenzen über zwei hoch konservierte PWW(VWW)-Motive verfügen (siehe Abb. 5.1-1). Diese charakteristischen Motive sind in allen bisher identifizierten Proteinen vom Acy1 Typ enthalten. PWW-ähnliche Motive sind normalerweise typisch für integrale Membranproteine. Sie sind in fast allen bisher kristallisierten Membranproteinen zu finden. Die Motive liegen am Ende von Transmembranhelices und tauchen dabei mit

den Ringebenen der Aromaten senkrecht in den unpolaren Anteil der Membran ein. Der Sinn dieser Motive wird somit in einer transversalen Verankerung integraler Membranproteine in der Membran gesehen (COWAN & ROSENBUSCH, 1994; PALM & RÖHM, 1995; MARSH, 1996). RÖHM *et al*. stellten die Hypothese auf, dass auch eine periphere Membranverankerung durch PWW-Motive zu Stande kommen kann. Die stark polaren Reste die den Motiven üblicherweise vorangehen, könnten darauf hindeuten, dass diese Sequenzen Oberflächenschleifen bilden, die eine Membranassoziation vermitteln (JAKOB *et al.*, 1992; PALM & RÖHM, 1995). Bei der humanen ACY1 befinden sich die PWW-Motive in zwei Trypsin-resistenten Bereichen, der N-terminalen Hälfte (Aminosäure 6 - 196) und dem C-terminalen Viertel (Aminosäure 307 - 406) des Moleküls. Es wird vermutet, dass diese beiden Bereiche zwei unabhängig voneinander gefaltete Domänen bilden (siehe Abb. 5.2-1). Die polaren Reste, die den PWW-Motiven bei ACY1 vorausgehen, könnten auf eine periphere Membranverankerung über Oberflächenschleifen hindeuten (PALM & RÖHM, 1995).

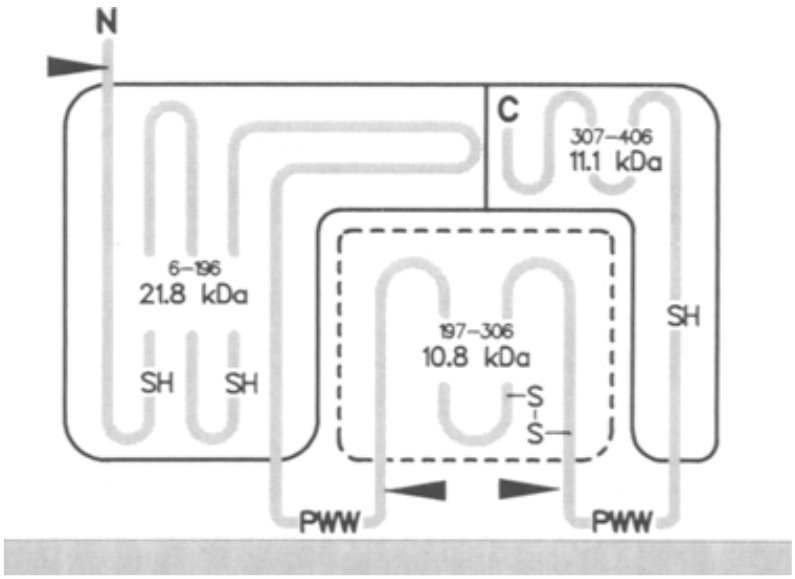


Abb. 5.2-1: Faltungsmodell eines ACY1-Monomers (PALM & RÖHM, 1995). Die beiden PWW-Motive befinden sich in Oberflächenschleifen, wodurch eine periphere Membranverankerung vermittelt wird.

Genau wie die tierischen Aminoacylasen sind auch die pflanzlichen Proteine AQI1 und NtAQI1 keine integralen Membranproteine. Sie haben keine Transmembrandomänen oder Membrananker. Eine Membranassoziation in Form einer durch PWW-Motive vermittelten peripheren Membranverankerung wäre jedoch auch für die pflanzlichen Proteine NtAQI1 und AQI1 gut vorstellbar.

Außerdem wäre eine Membranassoziation von (Nt)AQI1 aufgrund der Protein-Protein-Interaktion mit Aquaporinen (siehe 4.1) von Vorteil, da es sich bei Aquaporinen um integrale Membranproteine handelt. Eine periphere Membranverankerung von (Nt)AQI1 könnte die Interaktion mit den Aquaporinen begünstigen.

Ein weiterer Befund, der die subzelluläre Lokalisation der pflanzlichen Proteine AQI1 und NtAQI1 charakterisiert, ist das Vorhandensein der ER-Export- und ER-Lokalisationssignale am C- und N-Terminus der Proteine (siehe Abb. 5.1-1). Signalsequenzen dieser Art sind bei Proteinen zu finden, deren Bestimmungsort sich außerhalb der Zelle, in Biomembranen oder in Kompartimenten befindet (LEVITAN *et al*., 2005). Durch das Vorhandensein dieser ER-Signale kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei (Nt)AQI1 um ein zytoplasmatisches Protein handelt.

Das am N-Terminus der Aminosäuresequenz von (Nt)AQI1 vorliegende Exportsignal ist für den Export von Proteinen aus dem Zytoplasma ins ER verantwortlich. Über Vesikel-Transport gelangen solche Proteine dann entweder direkt oder *via* Golgi-Apparat an ihren Bestimmungort (BLOBEL & DOBBERSTEIN, 1975; MARTOGLIO & DOBBERSTEIN, 1998).

Am C-Terminus von (Nt)AQI1 befinden sich die typischen ER-Lokalisationssignale RDEL bzw. REEL. Aufgrund solcher Signalsequenzen wird der Wiedereintritt von Proteinen ins Zytoplasma verhindert. Diese C-terminalen Signale kennzeichnen hauptsächlich ER-Proteine, deren Bestimmungsort auch das ER darstellt. Diese Proteine verlassen das ER also nie. Es ist jedoch auch möglich, dass Proteine anhand dieser Signalsequenzen für den Transport zur Vakuole markiert werden. Als Beispiel sei der Vakuolen-Transport des Enzyms Sulfhydryl-Endopeptidase genannt, welcher über sogenannte KDEL-Vesikel (KV) erfolgt (OKAMOTO *et al*., 2003). Zudem ist es möglich, dass diese Sequenzen bei sekretorischen Proteinen durch Proteolyse abgespalten werden, um bei Bedarf das Zurückhalten der Proteine zu verhindern (DENECKE *et al*., 1992, VITALE *et al*., 1993).

Es ist vorstellbar, dass (Nt)AQI1 aufgrund der ER-Lokalisationssequenzen auf extrazellulärer Seite an die Plasmamembran, oder in die Vakuole bzw. an den Tonoplasten gelangt.

Bei einer Analyse des Vakuolenproteoms von *A. thaliana* konnte AQI1 in der Vakuole gefunden werden (CARTER *et al*., 2004). Außerdem interagieren sowohl AQI1, als auch NtAQI1 mit den Aquaporinen PIP2;2 und TIP1;1 (siehe 4.1), die sich in der Plasmamembran und im Tonoplasten pflanzlicher Zellen befinden. Dies passt sehr gut zu der Annahme, dass sich auch der Bestimmungsort von (Nt)AQI1 an diesen Membranen befindet.

Der Transportweg der integralen Aquaporine in die Membran und an ihren Bestimmungsort ist bisher nicht bekannt. Folgendes Modell (siehe Abb. 5.2-2) bezüglich des Transports und der Lokalisation von (Nt)AQI1 und ihrer zellulären Interaktionspartner PIP2;2 und TIP1;1 wäre denkbar:

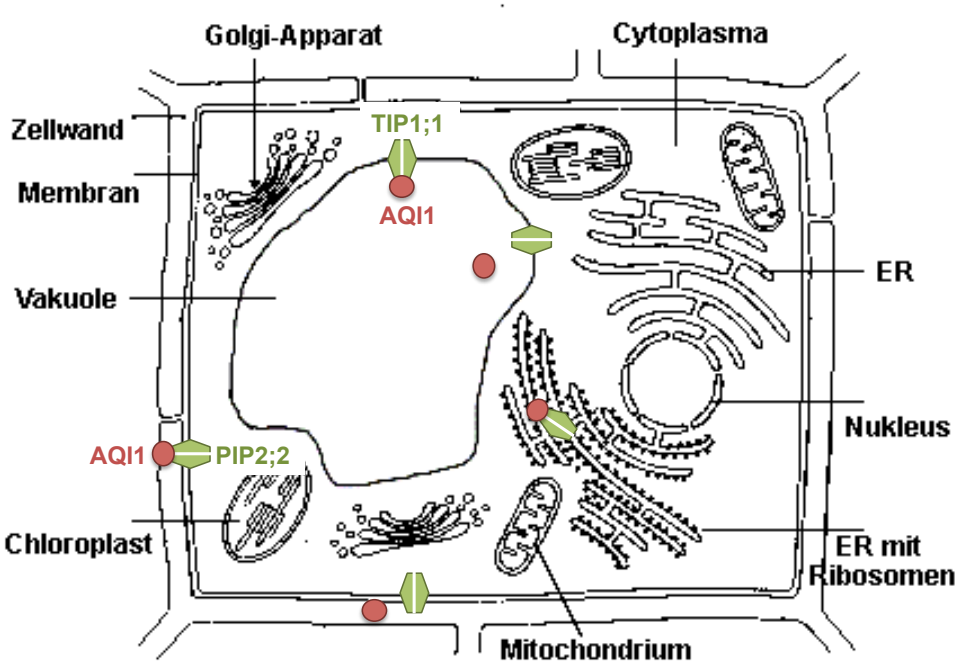


Abb. 5.2-2: Hypothetisches Modell des Transportwegs und der Lokalisation von AQI1 und der interagierenden Aquaporine PIP2;2 und TIP1;1 (modifiziert, www.testedich.de, pic_1321649589_2). Die Bildung von AQI1 (rot) verläuft aufgrund des relativ hydrophoben ER-Exportsignals am N-Terminus co-translational am rauen ER. Im ER findet dann die korrekte Faltung von AQI1 statt. Außerdem kommt es möglicherweise schon im ER zur Assemblierung von AQI1 und den Aquaporinen (grün) PIP2;2 bzw. TIP1;1. Auch eine Einlagerung der integralen Aquaporine in vom ER produzierte Membranstücke findet statt. Die ER-Lokalisationssequenzen am C-Terminus von AQI1 verhindern den Wiedereintritt von AQI1 ins Cytoplasma und sorgen für den Transport zu einem Bestimmungort außerhalb der Zelle, z. B. im Apoplasten oder in der Vakuole. Der Komplex aus AQI1, PIP2;2 bzw. TIP1;1 und einem Stück der ER-Membran wird mittels Vesikeltransport an den jeweiligen Bestimmungsort dirigiert. Bei PIP2;2 zur Plasmamembran, bei TIP1;1 zum Tonoplasten. Dies geschieht entweder auf direktem Weg, oder über den Golgi Apparat. Am Bestimmungsort angelangt kommt es zur Verschmelzung der Lipiddoppelschicht mit dem Komplex aus neu generierter Membran, integralem Aquaporin und AQI1. AQI1 befindet sich hierbei auf der nicht-zytoplasmatischen Seite der entsprechenden Membranen, also im Apoplasten oder in der Vakuole. Durch Interaktion mit den Aquaporinen und durch periphere Membranverankerung über die beiden PWW-Motive, findet die Membranassoziation von AQI1 statt. Bei Bedarf kann sich (Nt)AQI1 von den Aquaporinen bzw. der Membran lösen und in der Vakuole bzw. im Apoplasten in die lösliche Form übergehen, oder es erfolgt der Abbau von AQI1.

Ausgehend von dieser Hypothese wäre die messbare Aminoacylase-Aktivität sowie die Detektion der spezifischen Proteinbanden in der löslichen Proteinfraktion auf gelöstes (Nt)AQI1 in der Vakuole bzw. im Apoplasten zurückzuführen.

Die ER-Export- und Lokalisationssequenzen wie sie bei (Nt)AQI1 gefunden wurden, machen einen bedeutenden Unterschied zwischen den pflanzlichen Aminoacylase-homologen Proteinen und den tierischen Aminoacylasen aus. Tierische Aminoacylasen verfügen nicht über solche Signalsequenzen. Die Homologie zwischen (Nt)AQI1 und der Aminoacylase 1 aus Säugern beginnt erst nach der N-terminalen ER-Export-Sequenz.
Außerdem fällt beim Vergleich verschiedener Acy1-homologer Proteine aus Pflanzen und Tieren auf, dass alle pflanzlichen Proteine eine ER-Lokalisationssequenz der Form REEL/RDEL/RAEL besitzen. Keines der tierischen Proteine verfügt über ein solches Signal am C-Terminus (siehe Abb. 5.2-3). Tiere besitzen also im Gegensatz zu Pflanzen keine ER-lokalisierte Acy1, sondern nur eine zytoplasmatische Form des Proteins.

```
H. sapiens (ACY1)        ...HDERLHEAVFLRGVDIYTRLLPALASVPALPSDS------ 408
M. musculus (Acy1)       ...HNERLHEDIFLRGVDIYTGLLSALASVPTLPGES------ 408
S. scrofa (Acy1)         ...HDERLHEAVFLRGVDIYTQLLSALASVPALPSES------ 407
D. melanogaster          ...HDEFIQADIYLRGVQIFQKIISNIANV------------- 401
A. thaliana (AQI1)       ...HNEYLGKAEYLKGIEVYVSIIKAYASYESKS---GSRDEL 430
N. tabacum (NtAQI1)      ...HNEFLNKDEYLKGIDVYESIIKTYASYIEHPRDEASREEL 452
N. benthamiana           ...HNEFLNKDEYLKGIDVYGSIIKTYASYIEHPRDEAPREEL 452
S. lycopersicum          ...HNEFLNKDEYLKGIDVYESIIKTYASYIQYQRDDASREEL 448
S. tuberosum             ...HNEFLNKDEYLKGIDVYESIIKTYASYIQYQRDDASREEL 452
O. sativa                ...HNEFLSKDEYLKGIGIYESIIRTLATLKDSNVDYESRAEL 457
Z. mays                  ...HNEFLSKDEYLKGIGIYESIIRALATHEDGGKDDESRAEL 457
                            *:* :    :*:*: ::  ::   *.
```

Abb. 5.2-3: Vergleich der Aminosäuresequenz des C-Terminus einiger Acy1-(homologer) Proteine aus Tieren und Pflanzen. („Alignment“, www.uniprot.org, CLUSTAL O; Sequenzen NCBI: *Homo sapiens* NP_000657.1, *Mus musculus* NP_079647.1, *Sus scrofa* NP_999061.1, *Drosophila melanogaster* NP_650004.1, *Arabidopsis thaliana* NP_568036.2, *Nicotiana tabacum* EB448218.1, *Nicotiana benthamiana* BAO98754, *Solanum lycopersicum* XP_004231104.1, *Solanum tuberosum* XP_006064339.1, *Oryza sativa* EEC83866.1, *Zea mays* NP_001148589.1). Alle pflanzlichen Proteine weisen eine ER-Lokalisationssequenz (RDEL/REEL/RAEL) am C-terminalen Ende auf. Tierische Proteine verfügen nicht über eine solche Sequenz. Völlige Übereinstimmung der Aminosäuren (*****), sehr ähnlich (**:**), ähnlich (**.**).

Bei *A. thaliana* sind neben *AQI1* (At4g38220) noch zwei weitere Acy1-homologe Gene bekannt (At1g44180 und At1g44820). Die Aminosäuresequenzen dieser zusätzlichen Gene weisen, genau wie die tierischen Acy1-Sequenzen, keine ER-Lokalisationssignale am C-Terminus auf. Es handelt sich hier also höchstwahrscheinlich um zytoplasmatische Acy1-homologe Proteine. Trotz des Fehlens der ER-Signalsequenzen ist die Homologie der Aminosäuresequenzen zwischen diesen Proteinen und Acy1 aus Säugern geringer, als die Homologie zwischen AQI1 und Acy1. Die Homologie der beiden Proteine zueinander ist jedoch mit 85 % Aminosäure-Identität sehr hoch.

Das Vorkommen zusätzlicher Acy1-homologer Proteine bei *Arabidopsis* machte sich während dieser Arbeit auch bei Experimenten mit AQI1-„knock-out“ Mutanten (*aqi1-1*) bemerkbar. Im standardisierten Aminoacylase-Aktivitätstest zum Nachweis der Enzymaktivität von AQI1 wurde bei diesen Pflanzen aufgrund der fehlenden Expression von *AQI1* keine Aminoacylase-Aktivität gemessen. Setzte man jedoch etwa die dreifache Menge an Proteinextrakt in den „Assay“ ein, war auch hier eine schwache Aminoacylase-Aktivität messbar. Allerdings konnte im Unterschied zur Substratspezifität von AQI1 auch eine schwache Umsetzung der Substrate N-Acetylglycin und N-Acetyl-L-Asparaginsäure gemessen werden. Dies weist darauf hin, dass die gemessene Aminoacylase-Aktivität von einem anderen Enzym mit einer anderen Substratspezifität stammen muss.

Es stellt sich natürlich die Frage, warum bei Pflanzen eine ER-lokalisierte Form von Acy1-Proteinen notwendig ist, während bei Tieren anscheinend kein Bedarf dafür besteht. Dies könnte auf das Vorkommen von Vakuolen in Pflanzenzellen zurückzuführen sein.

Aufgrund der ER-Signalsequenzen, der Interaktion mit den im Tonoplasten lokalisierten Aquaporinen (TIP1;1) und den Studien des Vakuolenproteoms von *A. thaliana* (CARTER *et al*., 2004) spricht alles für eine Lokalisation von AQI1 in der Vakuole. Die Vakuole ist für Pflanzenzellen ein besonders wichtiges Kompartiment. Ihre Hauptaufgabe ist die osmotische Wasseraufnahme bei Wachstumsvorgängen und zur Erhaltung des Zellturgors. Zudem dienen Vakuolen als Stoffspeicher von Proteinen, Aminosäuren, organischen Verbindungen und Ionen. Über diese Speicherfunktion schützen sie die Zelle vor Stoffen die giftig wirken oder den Stoffwechsel stören könnten (HOFFMANN-THOMA, 2001). Wenn man davon ausgeht, dass die Funktion des pflanzlichen (Nt)AQI1 zu einem großen Teil in der Regulation von Aquaporinen besteht (siehe 5.4) verwundert es nicht, dass Pflanzenzellen auch einen Regulator für die im Tonoplasten befindlichen Aquaporine (z. B. TIP1;1) benötigen. Der enorme Wassertransport durch den Tonoplasten, aber möglicherweise auch der Abtransport von schädlichen Mengen H_2O_2 aus der Zelle sowie der Rückhalt in der Vakuole, könnten das Vorkommen von vakuolärem AQI1 erklären.

Bei Säugern spielt die Regulation der Kanalfunktion von Aquaporinen vermutlich keine derart große Rolle. Sie müssen keinen Turgor aufrechterhalten und auch bezüglich der Signalübertragung ist der Molekültransport über Aquaporine nicht von solch großer Bedeutung, wie es bei Pflanzen angenommen wird. Daher ist bei Säugern eine zytoplasmatische Aminoacylase 1 ausreichend.

5.3 Altersabhängige Akkumulation von AQI1

Ein äußerst interessanter Befund ist die altersabhängige Akkumulation von (Nt)AQI1. Obwohl *(Nt)AQI1* laut RT-PCR-Analysen in Pflanzengeweben jeden Alters konstitutiv exprimiert wird (siehe Abb. 4.3-13), konnte bezüglich der Aminoacylase-Aktivität der Enzyme ein deutlicher Altersgradient gemessen werden (siehe 4.3.1.7). Es konnte gezeigt werden, dass die Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 in den jüngsten Blättern von Tabakpflanzen am stärksten ist und mit dem älter werden der Blätter stark nachlässt. Die Aktivität von NtAQI1 korreliert also mit der Vitalität der Blätter. Auch für das *Arabidopsis*-Protein AQI1 konnte eine vergleichbare Beobachtung bezüglich der Enzymaktivität gemacht werden. Da *Arabidopsis* eine Rosettenpflanze ist, war es nicht ohne weiteres möglich die Blätter einem Altersgradienten zuzuordnen. Jedoch konnte auch hier die höchste Aminoacylase-Aktivität in den jungen Blättern des Blütenstandes/Sprosses gemessen werden. Die älteren Rosettenblätter zeigten kaum messbare Aminoacylase-Aktivität. In frühen Pflanzenstadien, noch vor Ausbildung des Sprosses bzw. Blütenstandes, war auch in den Rosettenblättern Aminoacylase-Aktivität messbar. Diese ging jedoch verloren, sobald es zur Ausbildung des Blütenstandes kam (siehe Abb 4.3-11). Genau zu diesem Zeitpunkt steigt auch die H_2O_2-Konzentration in den Rosettenblättern an (MIAO *et a*l., 2004; ZIMMERMANN & ZENTGRAF, 2005; ZIMMERMANN *et al*., 2006). Dies kann als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen AQI1 und H_2O_2 betrachtet werden.

Da sich der altersabhängige Aktivitätsgradient nicht in der Transkriptakkumulation von *NtAQI1* widerspiegelte und somit eine Regulation auf Transkriptebene ausgeschlossen werden konnte, stellte sich natürlich die Frage, wie (Nt)AQI1 dann bezüglich seiner Enzymaktivität reguliert wird. Die Regulation auf Proteinebene wurde mittels Immunodetektion analysiert. Auch die Möglichkeit einer post-translationalen Modifikation von NtAQI1 durch Glykosylierung oder Ubiquitinierung wurde überprüft. Es stellte sich heraus, dass NtAQI1 (45 kDa) in jungen Blättern akkumuliert und die Menge an NtAQI1 mit zunehmendem Blattalter deutlich abnimmt. Dies konnte auf eine Degradation des Proteins in älteren Blättern zurückgeführt werden. Die Proteinbanden des vollständigen Proteins (45 kDa) wurden immer schwächer, wohingegen Abbauprodukte in Form kleinerer Proteinbanden zwischen 20 und 45 kDa mit zunehmender Stärke detektiert wurden, je älter die beprobten Blätter waren (siehe Abb. 4.3-17). Es konnte also auch bezüglich der Proteinakkumulation von NtAQI1 ein altersabhängiger Gradient gefunden werden. Dieser korreliert mit der Enzymaktivität und der Vitalität der Blätter und kommt durch Proteinabbau in älteren Blättern zustande.

Der pflanzliche Lebenszyklus ist von der Samenkeimung bis zur Seneszenz von kontinuierlichem Proteinabbau geprägt (VIERSTRA; 1993). Dieser essentielle Vorgang ermöglicht der Pflanze den Bedarf an Proteinen in bestimmten Entwicklungsprozessen oder an verschiedenste Umweltbedingungen anzupassen. Es gibt bei Pflanzen mindestens zwei hochkonservierte, proteolytische Prozesse des Proteinabbaus. Zum einen den Abbau durch das Proteasom, zum anderen den Abbau durch Autophagie (REGGIORI & KLIONSKY, 2002; SMALLE & VIERSTRA, 2004). Was ist jedoch der ausschlaggebende Faktor für die Initiation des post-translationalen Abbaus von Proteinen, wie z. B. (Nt)AQI1 in älteren Blättern?

Eine Möglichkeit wie Proteine für den Abbau markiert werden, ist das Anhängen von Ubiquitin. Ubiquitin (Ub) ist ein 8,5 kDa großes ubiquitär vorkommendes Protein, das an andere Proteine bindet um diese zu markieren. Es ist eines der wichtigsten Signalmoleküle, welches der post-translationalen Modifikation von Proteinen dient. Durch Ubiquitinierung verändern sich die Eigenschaften von Proteinen. Je nach Art und Anzahl der Ubiquitin-Bindungen werden dadurch deren Halbwertszeit, Funktion oder Lokalisation in der Zelle reguliert (PEARCE *et al*., 2008). Es wird zwischen Mono-, Oligo-, Multi- und Poly-Ubiquitinierung unterschieden (MUKHOPADHYAY & RIEZMAN, 2007). Ubiquitin selbst besitzt 7 funktionelle Lysine (6, 11, 27, 29, 33, 48, 63) über die eine Bindung mit anderen Ubiquitin-Molekülen bewerkstelligt werden kann (HICKE *et al*., 2005; DIKIC *et al*., 2009). Ubiquitin-Rezeptoren können zwischen den spezifischen Längen, oder der Art der Ubiquitinketten unterscheiden (DIKIC *et al*., 2009).

Bei einer Polyubiquitinierung ist die Funktion abhängig vom Lysin-Rest über den die Bindung zwischen den Ubiquitinen erfolgt. Bei „Lys-11 und Lys-48-linked" Polyubiquitinketten werden die so modifizierten Zielproteine hauptsächlich dem Abbau durch das 26S Proteasom zugeführt. Bei „Lys-29- und Lys-63-linked" Polyubiquitinketten, aber auch beim Anhängen von einzelnen Ubiquitin-Molekülen, wird vermutet, dass die so markierten Proteine lysosomal bzw. vakuolär degradiert werden (selektive Autophagie). Außerdem erfolgt Autophagie bei oligomeren und aggregierten Proteinen, für die die Kapazität des Proteasoms nicht ausreicht (KIRKIN *et al*, 2009). Sowohl der autophagische Abbau, als auch der Abbau durch das Proteasom, dienen der regulatorischen Proteolyse von metabolischen, regulierenden und fehlerhaften Proteinen (CALLIS, 1995; THROWER *et al*., 2000; HICKE, 2001; WING, 2003).

Mono- und Multi-Ubiquitinierungen beeinflussen auch oft die intrazelluläre Verteilung von Proteinen und können die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen (POLO *et al*., 2002).

Bei der Analyse möglicher post-translationaler Modifikationen konnte eine Ubiquitinierung von NtAQI1 nachgewiesen werden. Bei der Immunodetektion mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörperserum wurden Proteinbanden der gleichen Größe detektiert, wie sie auch bei der Immunodetektion mit dem spezifischen NtAQI1-Antikörperserum zu sehen waren (siehe Abb. 4.3-19). Die Größe der Banden von ca. 53,5 kDa und 62 kDa entspricht der Größe von einfach und zweifach ubiquitiniertem NtAQI1 (45 kDa NtAQI1 + 8,5 kDa Ubiquitin + 8,5 kDa Ubiquitin). Diese Ubiquitin-spezifischen Proteinbanden waren hauptsächlich in der Membranproteinfraktion zu finden. In der löslichen Proteinfraktion konnten nur in den jüngsten Blättern Ubiquitin-spezifische Proteinbanden nachgewiesen werden, welche allerdings bei einer Größe von ≥ 250 kDa detektiert wurden. Was die Annahme bestärkt, dass es sich hierbei um ubiquitiniertes NtAQI1 handelt, sind Ergebnisse jüngster Proteomik-Studien mit *A. thaliana* Keimlingen. Hierbei konnten fast 950 Ubiquitinierungs-Ziele gefunden werden, unter denen sich auch AQI1 befindet (KIM *et al*., 2013).

Da Mono- und Multi-Ubiquitinierungen oft die intrazelluläre Lokalisation und Interaktion von Proteinen mit anderen Proteinen beeinflussen (POLO *et al*., 2002), könnte man hiermit das fast ausschließliche Auftreten der ein- und zweifach ubiquitinierten Proteinform (53,5 kDa und 62 kDa) in der Membranprotein-Fraktion erklären. Auch bei der Interaktion von NtAQI1 mit den membranintegralen Aquaporinen könnte dieser Befund von Bedeutung sein.

Der altersabhängige Gradient von (Nt)AQI1 kommt, wie gezeigt werden konnte, durch Proteinabbau in älteren Blättern zustande. Daher wäre auch die Funktion der Ubiquitinierung, NtAQI1 zum autophagischen Abbau zu markieren durchaus denkbar. Da es sich bei (Nt)AQI1 um ein extrazelluläres Protein handelt ist der autophagische Abbau wahrscheinlicher, als der Abbau am Proteasom.

Es ist vorstellbar, dass NtAQI1 wenn es sich in der Membranproteinfraktion befindet, mit den integralen Aquaporinen interagiert oder zumindest membranassoziiert vorliegt. Sobald es abgebaut werden soll, z. B. wenn Blätter anfangen zu altern, wird es durch Ubiquitinierung markiert. Bei Anhängen von 1 - 2 Ubiquitinmolekülen wird die Membranassoziation und Interaktion mit den Aquaporinen noch gewährleistet. Sobald mehrere Ubiquitinmoleküle angehängt werden, ist NtAQI1 für den autophagischen Abbau markiert. Bei in der Vakuole vorliegendem (Nt)AQI1 kann die Autophagie direkt vor Ort durch Hydrolasen erfolgen (OSHUMI, 2001; LEVINE & KLIONSKY, 2004). Liegt (Nt)AQI1 im Apoplasten vor kommt es zum autophagosomalen Transport über membranumschlossene Vesikel. Diese expandieren letztendlich zu einem großen,

doppelmembranösen Autophagosom, welches wiederum in die Vakuole überführt wird, wo Hydrolasen für den Abbau des Inhalts sorgen (MARTY, 1999; KIM & KLIONSKY, 2000; KLIONSKY & EMR, 2000). Bei Pflanzen beginnt der Abbau von Proteinaggregaten auch schon im Autophagosom (TOYOOKA *et al*., 2006).

Da die Ubiquitin-spezifischen Proteinbanden der löslichen Proteinfraktion bei einer Größe von ≥ 250 kDa detektiert wurden, könnte es sich hier um polyubiquitinierte Proteinaggregate in den Autophagosomen, oder im Proteasom handeln.

Da auch die Autophagie bei Pflanzen einen Prozess darstellt, der durch oxidativen Stress aktiviert wird (XIONG *et al*., 2007 a + b), lässt sich eine Verbindung zur altersabhängigen Akkumulation von (Nt)AQI1 herstellen. In älterem Blattgewebe steigt die ROS-Konzentration an, folglich kommt es zur Verstärkung der Autophagie, welche zum Abbau von (Nt)AQI1 in älteren Blättern führt. Ebenso legt der interessante Befund des altersabhängigen Gradienten von (Nt)AQI1 die Hypothese einer maßgeblichen Beteiligung von (Nt)AQI1 an der Blattalterung bzw. Blattseneszenz von Pflanzen nahe. (Nt)AQI1 könnte für die Jungerhaltung von Blättern bzw. Pflanzengeweben von großer Bedeutung sein. In welcher Form man sich diese Funktion als „Jungbrunnenprotein“ vorstellen könnte, wird in Kapitel 5.4.1 näher erläutert

5.4 Physiologische Funktion von AQI1

Ein sehr wichtiger Gesichtspunkt den es in dieser Arbeit zu klären galt, war die Frage nach der physiologischen Funktion von AQI1 in Pflanzen. Da bisher noch kein pflanzliches Enzym mit Acy1-Homologie beschrieben wurde, ist noch weitgehend unklar, welche Rolle diese hoch konservierten Proteine in Pflanzen spielen. Selbst die physiologische Funktion der tierischen Aminoacylase 1 konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden. Die chemische Reaktion welche von Aminoacylasen katalysiert wird, die Hydrolyse N-acylierter Aminosäuren, ist bekannt (ENDO, 1980; PITTELKOW *et al*., 1998; PERRIER *et al*., 2005). Welchem Zweck dies dient, und ob Acy1 neben der Katalyse dieser chemischen Reaktion noch weitere Aufgaben erfüllt, bleibt auch bei Tieren noch ein Rätsel. Jedoch spricht das hoch konservierte und weit verbreitete Vorkommen von Acy1 für eine bedeutende Rolle des Enzyms.

Diskutiert wird vor allem die Funktion von Acy1 bei der Deacetylierung von N-terminal blockierten Aminosäuren im Aminosäure-Metabolismus (PALM & RÖHM, 1995) (siehe auch 1.3).

Seit 2005 wird die humane ACY1 als Schlüsselenzym einer vererbbaren Stoffwechselstörung (ACY1-Mangel) betrachtet. Hierbei kommt es zu hohen Konzentrationen von N-acetylierten Aminosäuren im Urin verbunden mit pathologischen Veränderungen im Gehirn. Die klinischen Anzeichen der Patienten sind jedoch sehr variabel und reichen von motorischen Entwicklungsstörungen, über Fieberkrämpfe bis hin zu leichten geistigen Behinderungen (VAN COSTER *et al*., 2005; SASS *et al*., 2006). Außerdem wird ACY1 mit onkologischen Fragestellungen in Zusammenhang gebracht. Neueste Untersuchungen zeigen, dass die humane ACY1 in Neuroblastomzellen exprimiert wird (LONG *et al*., 2011). Bei einigen Karzinomen lassen sich Veränderungen im *ACY1*-Gen nachweisen Es wird angenommen, dass ACY1 als Tumorsuppressor in verschiedenen Karzinomen wirken soll (COOK *et al.,* 1998; ZHONG *et al*., 2009). Eine Beteiligung von Acy1 an Zelltodprozessen im tierischen System wäre daher durchaus denkbar.

Die Fakten bezüglich der Funktion der tierischen Acy1 lassen sich jedoch nicht einfach auf die pflanzlichen homologen Proteine (Nt)AQI1 übertragen. Schon die Tatsache der ER-Lokalisation des pflanzlichen (Nt)AQI1 spricht für eine gesonderte Bedeutung des Proteins in Pflanzen.

Im Zuge dieser Promotionsarbeit konnte neben der Katalyse der Deacetylierung von Aminosäuren eine weitere Funktion des pflanzlichen Acy1-homologen Proteins (Nt)AQI1 gefunden werden. Durch Protein-Protein-Interaktion mit den Aquaporinen (TIP1;1, PIP2;2) (siehe 4.1) reguliert (Nt)AQI1 die Kanalfunktion dieser Aquaporine. AQI1 nimmt dabei Einfluss auf den H_2O-, aber vor allem auf den H_2O_2-Transport durch diese Aquaporine (siehe 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3).

H_2O_2 stellt eine wichtige Signalsubstanz bei pflanzlichen Zelltodprozessen dar. Aufgrund der Funktion als Regulator des H_2O_2-Transports wird dem pflanzlichen (Nt)AQI1 daher eine bedeutende Rolle bei der Zelltodregulation in Pflanzen zugesagt (nähere Erläuterung folgt in Kapitel 5.4.1).

Vermutlich stellen die Hydrolyse acetylierter Aminosäuren und die Regulation der Kanalaktivität von Aquaporinen zwei völlig unabhängige Funktionen des pflanzlichen Enzyms (Nt)AQI1 dar.

5.4.1 AQI1 als Regulator der Kanalaktivität von Aquaporinen

Das pflanzliche Acy1-homologe Protein AQI1 wurde als potentieller Regulator der Kanalaktivität von pflanzlichen Aquaporinen (TIP1;1, PIP2;2) isoliert. Vorangegangene Studien lieferten erste Hinweise darauf, dass AQI1 durch diese Regulatorfunktion eine wichtige Rolle beim pflanzlichen Zelltod spielen könnte. Dem liegt zugrunde, dass die Aquaporine TIP1;1 und PIP2;2 als H_2O_2-Kanäle identifiziert wurden (HOCH, 2011). Eine Fehlregulation dieser Kanäle durch Protein-Protein-Interaktion mit heterolog exprimiertem BHRF1 in transgenen Pflanzen führte zur Aufnahme toxischer Mengen H_2O_2 in die Zelle und folglich zu Zelltod (siehe 1.3.1). Da BHRF1 in Pflanzen normalerweise nicht vorkommt, wurde nach dem zellulären pflanzlichen Gegenspieler gesucht, der die Aufgabe der Aquaporin-Regulation erfüllt und somit natürlicherweise an Zelltodprozessen beteiligt ist. Hierbei wurde AQI1 als endogener Interaktionspartner der Aquaporine und somit potentieller Regulator selbiger identifiziert.

Wie bei Experimenten mit Deletionsmutanten gezeigt wurde, binden NtAQI1 und BHRF1 an genau denselben Bereich der Aquaporine: Transmembrandomäne 1 und 2 und das erste der beiden NPA-Motive (HOCH, 2011; siehe Abb. 5.4-1).

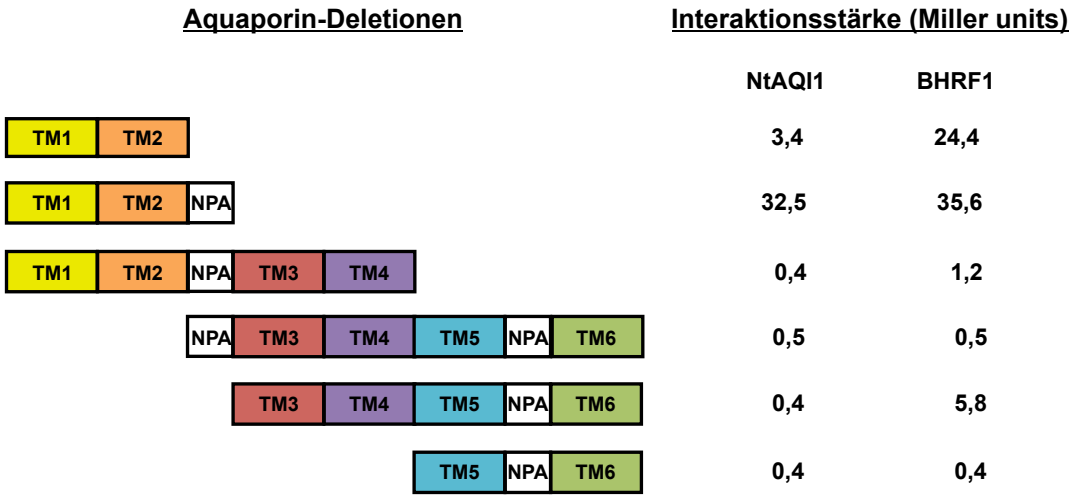


Abb. 5.4-1: Schematische Darstellung der Aquaporin-Deletionen (PIP2;2) und der Stärke der gemessenen Interaktion mit NtAQI1 und BHRF1 (verändert nach HOCH, 2011).

Dieser Bereich stellt die Poren-formende Region der Aquaporine dar. Die Beeinflussung des Stofftransports durch eine Bindung von Interaktionspartnern an diesen Bereich ist daher äußerst wahrscheinlich. Die ähnliche Bindungsweise bestärkt die Annahme, dass es sich bei (Nt)AQI1 um das endogene pflanzliche „Pendant“ zu BHRF1 handelt. Bei der Überexpression von BHRF1 in transgenen Pflanzen könnte es zu einer Konkurrenzsituation zwischen BHRF1 und dem endogenen NtAQI1 um die Bindungsstelle an den Aquaporinen kommen. Wenn BHRF1 aufgrund der starken Expression die

Überhand gewinnt und das endogene NtAQI1 von seiner Bindungsstelle an den Aquaporinen verdrängt, kommt es zur Störung der Regulation dieser H_2O_2-Kanäle und folglich zu Zelltod.

Bei ausführlichen Protein-Protein-Interaktionstests mit einem speziell für Membranproteine entwickelten System, konnte die Interaktion zwischen AQI1 aus *Arabidopsis* und NtAQI1 aus Tabak mit den Aquaporinen TIP1;1 und PIP2;2 aus *Arabidopsis* und Tabak eindeutig bestätigt werden (siehe 4.1).

Für (Nt)AQI1 konnte der Interaktionsbereich auf den mittleren Teil des Proteins (AQI1: AS_{97} - AS_{203}; NtAQI1: AS_{110} - AS_{216}) eingegrenzt werden (HOCH, 2011). Innerhalb dieses Bereichs befinden sich für M20-Metallopeptidasen, zu denen auch Aminoacylasen zählen, charakteristische Sequenzhomologien (AQI1: AS_{118} - AS_{162}; NtAQI1: AS_{132} - AS_{176}), welche Interaktionsdomänen darstellen könnten. Die Interaktions-Beteiligung des N- und C-Terminus, sowie der beiden hoch konservierten PWW-Motive und der konservierten Sequenz LLNSHTCVV (AQI1: AS_{88} - AS_{96}; NtAQI1: AS_{101} - AS_{109}) konnte ausgeschlossen werden.

Die zelluläre Funktion der Wechselwirkung zwischen (Nt)AQI1 und den pflanzlichen Aquaporinen wurde anhand verschiedener Experimente analysiert (4.2). Angenommen wurde die Regulation des H_2O_2-Transports durch Aquaporine, um das Eindringen von toxischen Mengen H_2O_2 in die Zelle zu verhindern bzw. unter Kontrolle zu halten. Außerhalb der Zelle wird H_2O_2 als Folge von abiotischem und biotischem Stress von Plasmamembran-lokalisierten Enzymen, wie NADPH-Oxidasen, oder Zellwandperoxidasen gebildet (SAGI & FLUHR, 2001; TORRES *et al*., 2002; BOLWELL *et al*., 2002). Die Aquaporine TIP1;1 und PIP2;2 kommen in Plasmamembran und Tonoplast vor. Auch das Vorkommen von (Nt)AQI1 wird an bzw. in der Nähe dieser Membranen vermutet (siehe Abb. 5.2-2). Zum einen könnte (Nt)AQI1 den H_2O_2-Transport vom Apoplasten in die Zelle durch die in der Plasmamembran lokalisierten Aquaporine (PIP2;2) regulieren. Zum anderen wäre vorstellbar, dass überschüssiges H_2O_2 durch im Tonoplasten lokalisierte Aquaporine (TIP1;1), aus der Zelle in die Vakuole abtransportiert wird, um es dort unschädlich zu machen. In der Vakuole sind Peroxidasen zur Entgiftung von H_2O_2 lokalisiert (YAMASAKI et al., 1997). Da H_2O_2 unter anderem für seine Zelltod-induzierende Wirkung bekannt ist, wäre (Nt)AQI1 somit an der Regulation von Zelltodprozessen beteiligt. Diese Hypothese konnte anhand transienter Expression der Proteine in Pflanzen bestärkt werden. Es konnte gezeigt werden, dass (Nt)AQI1 Zelltod inhibieren kann, welcher durch die Überexpression des Aquaporins NtTIP1;1-GFP zustande kommt (siehe 4.2.1.1). Dieser Zelltod liegt im vermehrten und unkontrollierten H_2O_2-Einstrom in die

Zelle durch NtTIP1;1-GFP begründet. Es ist naheliegend, dass die Inhibition dieses Zelltods mit der Kontrolle des H_2O_2-Transports zusammenhängt. Durch gleichzeitige Expression von (Nt)AQI1 und NtTIP1;1-GFP ist die Regulation des Transportmechanismus offenbar wieder ausreichend gewährleistet, um für eine optimale H_2O_2-Menge innerhalb der Zelle zu sorgen und das Überleben der Zelle zu sichern. Im Rahmen dieses Experiments konnte auch die Spezifität der Zelltod-Inhibition durch (Nt)AQI1 bewiesen werden. Es zeigte sich, dass (Nt)AQI1 nicht in der Lage ist Zelltod, der aufgrund von Überexpression anderer zelltodauslösender Proteine (Bax und NIMIN1) entsteht, zu inhibieren (siehe 4.2.1.1). Dies weist darauf hin, dass die Inhibition des NtTIP1;1-GFP induzierten Zelltods durch (Nt)AQI1 ein spezifischer Effekt ist, der auf die Wechselwirkung mit den H_2O_2-transportierenden Aquaporinen zurückzuführen ist.

Anhand der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse, kristallisierte sich ein Modell heraus (siehe Abb. 5.4-2), durch welches sich die Regulation der Kanalaktivität von Aquaporinen erklären lässt. (Nt)AQI1 blockiert durch Wechselwirkung mit den Aquaporinen die Pore der Aquaporine und macht diese für H_2O_2, und in gewissem Maße auch für H_2O, undurchlässig.

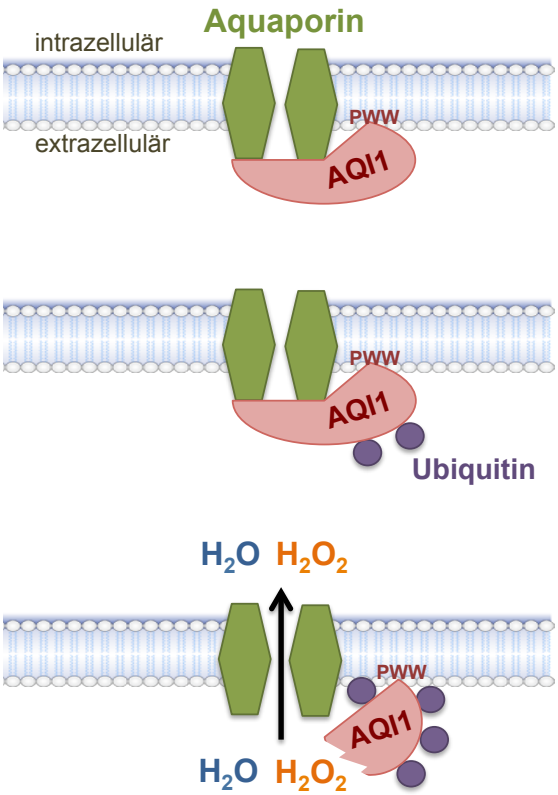


Abb. 5.4-2: Modell der Regulation der Kanalaktivität von Aquaporinen durch AQI1. AQI1 verschließt die Aquaporine um den Transport von H_2O und H_2O_2 bei Bedarf zu blockieren. Sobald die Blockade nicht mehr nötig ist wird AQI1 ubiquitiniert. Bei ein- und zweifach ubiquitiniertem AQI1 besteht die Interaktion mit den Aquaporinen noch. Sobald mehrere Ubiquitinmoleküle gebunden sind wird AQI1 abgebaut. Der Abbau erfolgt möglicherweise autophagisch. Die Aquaporin-Kanäle sind jetzt geöffnet und durchlässig für H_2O und H_2O_2.

(Nt)AQI1 fungiert also als eine Art „Stöpsel“, der die Aquaporinkanäle bei Bedarf verschließen kann, um diese in ihrer Transporteigenschaft zu regulieren. So wird die Aufnahme von toxischen Konzentrationen H_2O_2 in die Zelle verhindert und dem Absterben der Zellen entgegengewirkt.

Die Hypothese dieses Modells konnte unter anderem anhand von Experimenten im Hefesystem bestärkt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass NtAQI1 in der Lage ist, der erhöhten Sensitivität von NtTIP1;1-überexprimierenden Hefezellen gegenüber H_2O_2, entgegen zu wirken (siehe 4.2.2). Der regulatorische Einfluss der Wechselwirkung zwischen NtAQI1 und NtTIP1;1 auf die H_2O_2-Aufnahme durch die Aquaporine galt somit als bestätigt. Auch die Annahme, dass diesem regulatorischen Einfluss die Blockierung der Aquaporine durch NtAQI1 zugrunde liegt und (Nt)AQI1 wahrscheinlich als „Stöpsel“ auf den Aquaporinen sitzt, passt sehr gut zu diesem Befund.

Ein weiteres Experiment zeigte, dass auch der Wassertransport durch die Interaktion der Aquaporine mit (Nt)AQI1 beeinflusst werden kann. Bei heterologer Überexpression von TIP1,1 in *X. laevis* Oozyten kam es durch vermehrte Wasseraufnahme zum deutlich messbaren Anschwellen der Oozyten, sobald sie in eine hypoosmolare Lösung überführt wurden. Wurde jedoch TIP1;1 mit (Nt)AQI1 co-exprimiert, fiel die Schwellung der Oozyten deutlich geringer aus (siehe 4.2.3), was auf eine verminderte Wasseraufnahme zurückzuführen ist, welche mit großer Wahrscheinlichkeit in der Blockade der Aquaporinpore durch (Nt)AQI1 begründet liegt.

Auch die Untersuchungen von AQI1-„knock-out“-Mutanten (*aqi1-1*) lieferten Hinweise auf einen Einfluss von AQI1 auf den H_2O-Transport durch Aquaporine. Das Fehlen von AQI1 bei *aqi1-1* äußerte sich durch ein gesteigertes Hypokotyl Streckungswachstum im Gegensatz zu Wildtyppflanzen (siehe 4.4.3.4). Da die Hypokotylstreckung durch Wasseraufnahme erfolgt, weist dieser Befund darauf hin, dass aufgrund der fehlenden Blockade der Aquaporine die Wasseraufnahme bei *aqi1-1* verstärkt von statten geht.

Die Resultate dieser Experimente bestärken nachdrücklich die Annahme, dass die regulatorische Wirkung von (Nt)AQI1 tatsächlich im Verschließen der Aquaporin-Pore begründet liegt und somit der Transportweg für H_20 und H_2O_2 blockiert werden kann.

Wie schon mehrfach erwähnt, stellt H_2O_2 eine wichtige Signalsubstanz im Rahmen von pflanzlichen Zelltodprozessen dar. Durch die Regulation des H_2O_2-Transports durch Aquaporine könnte (Nt)AQI1 also maßgeblich an Zelltodprozessen in Pflanzen beteiligt sein. Einer der wichtigsten programmierten Zelltodprozesse bei Pflanzen ist die hypersensitive Abwehrreaktion (HR) als Antwort auf Pathogenbefall. Die Beteiligung von (Nt)AQI1 an der hypersensitiven Abwehrreaktion ist äußerst wahrscheinlich.

Diese Annahme wurde durch die Analyse von mit Tabakmosaikvirus (TMV) infizierten resistenten Tabakpflanzen (*N. tabacum* NN) bestärkt. Als Folge der Infektion wurde bei diesen Pflanzen eine HR ausgelöst, welche mit einer bis zu 100% erhöhten Aminoacylase-Aktivität von NtAQI1 einher ging (siehe Abb. 4.4-2). Dieser enorme Aktivitätsanstieg wurde von deutlichen Veränderungen der NtAQI1-Proteinakkumulation begleitet. Es konnte gezeigt werden, dass der post-translationale Proteinabbau von NtAQI1 nach TMV-Infektion und daraus resultierender HR, deutlich verlangsamt wird. Dies äußerte sich durch eine schwächere Detektion der NtAQI1-Abbauprodukte, während die Proteinbanden des vollständigen NtAQI1 deutlich an Stärke gewannen (siehe Abb. 4.4-3). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung von NtAQI1, welche höchstwahrscheinlich als Markierung des Proteins für den autophagischen Abbau dient, als Folge einer HR nachlässt (siehe Abb 4.4-4). Vermutlich besteht im Zuge der HR ein erhöhter Bedarf an NtAQI1, welcher durch verlangsamten Proteinabbau geregelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen HR- bzw. PCD-spezifischen Effekt handelt, da NtAQI1 nicht allgemein auf Stressreize reagierte. Bei einer TMV-Infektion von Tabakpflanzen (*N. tabacum* nn), welche nicht über das N´-Resistenzgen verfügen und folglich auch keine hypersensitive Abwehrreaktion (HR) bzw. keinen PCD ausbilden, konnten keine Auffälligkeiten bezüglich NtAQI1 beobachtet werden. Sowohl die Enzym-Aktivität, als auch die Proteinakkumulation veränderten sich nicht (siehe Abb 4.4-5, 4.4-6). Das gleiche galt auch bei chemisch erzeugtem Zelltod (siehe 4.4.1.2). Auch hier konnte keine Übereinstimmung mit den HR-bedingten Auswirkungen auf NtAQI1 festgestellt werden. NtAQI1 stellt also kein stressinduziertes Protein dar. Es wird nicht in jedem Fall durch abiotischen und biotischen Stress beeinflusst.

Auch eine Funktion von NtAQI1 als H_2O_2-Sensor konnte widerlegt werden, da keine signifikanten Veränderungen der Proteinakkumulation von NtAQI1 durch den reinen Einfluss von H_2O_2 beobachtet wurden (siehe 4.4.1.3).

Der ausschlaggebende Faktor für Veränderungen der Proteinakkumulation von NtAQI1 ist also die hypersensitive Abwehrreaktion (HR) bzw. der programmierte Zelltod (PCD).

Neben der HR gibt es noch weitere Möglichkeiten der Zelltodbeteiligung von (Nt)AQI1. Laut Microarray-Analysen wird *AQI1* in *Arabidopsis* am stärksten in der Wurzel, und hier vor allem in der Wurzelhaarzone, exprimiert (*Arabidopsis* eFP Browser, bar.utoronto.ca, WINTER *et al*., 2007; siehe Abb. 1.3-5). In dieser Wurzelzone findet neben der Wasser- und Mineralstoffaufnahme, auch die Ausdifferenzierung der Gewebe, wie z. B. Phloem und Xylem statt. Die Tracheenzellen des Xylems müssen für die Erfüllung ihrer Aufgabe, dem Wassertransport, zuerst absterben (Xylogenese). Dies geschieht in Form von

programmiertem Zelltod (PCD) in den sich differenzierenden Xylemzellen. Dieser PCD wird durch hohe H_2O_2-Konzentrationen eingeleitet (GREENBERG, 1996; FUKUDA, 1996). Auch die Aquaporine TIP1;1 und PIP2;2 werden hauptsächlich in der Wurzel exprimiert, wobei neben Cortex und Endodermis auch die Leitbündel als Ort mit hoher Expression beschrieben werden (DANIELS *et al*., 1996; QUIGLEY *et al*., 2001; JAVOT *et al*., 2003). Daher ist die Beteiligung dieser Aquaporine und (Nt)AQI1 an der Xylogenese durchaus denkbar.

Auch in die Xylemlignifizierung, welche zwar nichts mit PCD zu tun hat, für die aber auch größere Mengen an H_2O_2 benötigt werden, könnte (Nt)AQI1 involviert sein. Da das Xylem einem hohen Innendruck standhalten muss, ist hier die Lignifizierung besonders wichtig (PETER & NEALE, 2004). Außerdem kann Lignin durch seinen hydrophoben Charakter das Austreten von Wasser aus den Leitbündeln in das umgebende Gewebe verhindern (SITTE *et al*., 2002). Die Synthese von Lignin erfolgt spontan über eine Oxidations-Polymerisations-Reaktion. Einzelne Monolignole werden dabei zu Radikalen oxidiert und dann in das Ligninmolekül integriert (ADLER, 1977). Für diese radikalische Polymerisation dient H_2O_2 als Substrat (FRIAS *et al*., 1991; MARJAMAA *et al*., 2006). Der von (Nt)AQI1 kontrollierte Transport von H_2O_2 könnte also auch hier von Bedeutung sein.

Eine weitere Form des programmierten Zelltods, bei der (Nt)AQI1 von Belang sein könnte, stellt die Blattseneszenz dar. Die Regulationsmechanismen von Seneszenz-prozessen werfen noch viele Fragen auf. Es ist zwar bekannt, dass die beiden Pflanzenhormone Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA) eine Rolle spielen, sie sind aber vermutlich nicht die einzigen Inputsignale. Auch H_2O_2 geriet in Verdacht, in die Regulationsprozesse bei Seneszenzvorgängen involviert zu sein. Es ist bekannt, dass die Blattseneszenz mit erhöhten H_2O_2-Konzentrationen im Blattgewebe einhergeht (PETROV & BREUSEGEM, 2012). H_2O_2 wirkt hierbei als Signalmolekül für den Start der Seneszenz. Verschiedene seneszenzabhängige Gene (z. B. Transkriptionsfaktoren, WRKY53) werden durch H_2O_2 induziert (ZENTGRAF, 2008; ZENTGRAF *et al.*, 2012). Bei *A. thaliana* steigt die H_2O_2-Konzentration in den Rosettenblättern genau zu dem Zeitpunkt an, wenn es zur Ausbildung des Blütenstandes/Sprosses kommt (MIAO *et al*., 2004; ZIMMERMANN *et al*., 2006). Zu diesem Zeitpunkt ist in den Rosettenblättern auch keine AQI1-Aminoacylase-Aktivität mehr detektierbar (siehe Abb. 4.3-11). Das heißt der H_2O_2-Anstieg geht mit dem Verlust von AQI1 in den Rosettenblättern einher. Da die Akkumulation von (Nt)AQI1 auch bei Tabakpflanzen mit zunehmendem Blattalter stark nachlässt, wie anhand des Enzymaktivitätsgradienten und mittels Immunodetektion gezeigt werden konnte (siehe auch 5.3), wäre eine Rolle von (Nt)AQI1 bei Seneszenz- bzw. Senszenz-

entgegenwirkenden Prozessen durchaus denkbar. Man könnte sich vorstellen, dass die H_2O_2-transportierenden Aquaporine in jungen Blättern durch (Nt)AQI1 blockiert werden, um die Zellen vor H_2O_2 bzw. vor verfrühten Seneszenzerscheinungen zu schützen. In älteren Blättern wird (Nt)AQI1 abgebaut. Der Verlust von (Nt)AQI1 führt zum vermehrten H_2O_2-Eintritt in die Zelle und somit zur Einleitung der Seneszenz. (Nt)AQI1 könnte somit an der Jungerhaltung der Blätter beteiligt sein, indem es hilft den Eintritt von H_2O_2 in die Zelle zu verhindern.

Durch die Blockade der Aquaporine TIP1;1 und PIP2;2 mit dem Zweck der Regulation des H_2O_2-Transports wird in gewissem Maße auch der H_2O-Einstrom in die Zelle beeinflusst. Bei der H_2O-Aufnahme durch Aquaporine spielt (Nt)AQI1 jedoch vermutlich keine derart große Rolle, da es für den Wassertransport noch eine ganze Reihe weiterer Aquaporine gibt, die vermutlich nicht alle durch (Nt)AQI1 beeinflusst werden können. In gewissem Maße könnte sich jedoch auch schon die Blockade von TIP1;1 und PIP2;2 bezüglich der Wasseraufnahme bemerkbar machen. Dies könnte sich in der Größenzunahme älterer Blätter wiederspiegeln, welche ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr über Zellteilung, sondern über Wasseraufnahme und dessen Einlagerung in die Vakuole erfolgt. TIP1;1 ist als im Tonoplasten lokalisiertes Aquaporin bekannt, welches Wasser, Harnstoff und H_2O_2 transportiert (MAUREL *et al*., 1993; LIU *et al*., 2003; MA *et al*., 2004; BIENERT *et al*., 2007, HOCH, 2011). TIP1;1 und (Nt)AQI1 könnten somit eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des Zellturgors und beim Zellwachstum durch Wasseraufnahme spielen. Der Verlust von (Nt)AQI1 als Interaktionspartner der Aquaporine in Plasmamembran und Tonoplast könnte in älteren Blättern eine vermehrte Wasseraufnahme begünstigen, die Zellstreckungswachstum und somit Blattwachstum zur Folge hat.

(Nt)AQI1 könnte also in seiner Funktion als „Stöpsel“ der Aquaporine eine Rolle bei Seneszenzprozessen von Blättern spielen, indem es den H_2O_2-Transport reguliert. Ebenso könnte es regulierend auf den Wassertransport durch Aquaporine wirken und so Einfluss auf das Streckungswachstum älterer Blätter nehmen. AQI1 könnte neben seiner Funktion als Regulator bei der pflanzlichen hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) einen altersabhängigen Regulator der Kanalaktivität von Aquaporinen darstellen und somit an der Seneszenz beteiligt sein. Sowohl HR als auch Seneszenz stellen Formen des PCD dar. Ebenso die Xylogenese. Von einer Funktion von (Nt)AQI1 bei der Regulation von programmierten Zelltodprozessen (PCD) ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit auszugehen.

5.4.2 Aminoacylase-Aktivität von AQI1

Die Erkenntnis der Wechselwirkung von (Nt)AQI1 und Aquaporinen, mit dem Zweck der Regulation der Aquaporine bezüglich ihrer Kanalaktivität, lässt die Frage nach dem Sinn der Aminoacylase-Aktivität von (Nt)AQI1 offen. Die Hydrolyse N-acetylierter Aminosäuren ist definitiv eine von (Nt)AQI1 ausgeführte Aufgabe, wie mehrfach im Aminoacylase-Aktivitätstest („Ninhydrin-Assay“) gezeigt werden konnte (siehe 4.3.1). Ob es sich bei der Wechselwirkung von (Nt)AQI1 mit den Aquaporinen und der Aminoacylase-Aktivität um zwei völlig unabhängige Funktionen des Proteins handelt ist unklar, wird aber angenommen.

Es gibt einige Beispiele, bei denen die Acylase-Aktivität von (Nt)AQI1 von Bedeutung sein könnte. Wie bei allen eukaryotischen Zellen sind auch bei Pflanzen ca. 85 % der Proteine N-terminal acetyliert (POLEVODA & SHERMAN, 2000) und müssen um abgebaut werden zu können wieder deacetyliert werden. Wie es auch bei Tieren angenommen wird, könnte die Aminoacylase-Aktivität des pflanzlichen (Nt)AQI1, beim Recycling acetylierter Aminosäuren im Aminosäure-Metabolismus eine Rolle spielen. Die Lokalisation von AQI1 wird in der Vakuole postuliert (CARTER *et al*., 2004). Auch Aminosäuren werden zum raschen Zugriff in der Vakuole gespeichert, da zu hohe Konzentrationen im Zytosol den pH-Wert stark absenken würden. Andererseits werden sie benötigt, sobald die Syntheserate bestimmter Enzyme aufgrund äußerer Faktoren wie z. B. programmiertem Zelltod, sprunghaft ansteigt. Während die membranassoziierte Form von (Nt)AQI1 vermutlich mit der Regulation der Aquaporine beschäftigt ist, könnte die lösliche Form von (Nt)AQI1 die Aufgabe der Deacetylierung von gespeicherten acetylierten Aminosäuren in der Vakuole übernehmen, um diese der Zelle bei Bedarf wieder bereit zu stellen.

Einen Hinweis für die Rolle von AQI1 beim Recycling von Aminosäuren, könnte die leichte Wachstumsverzögerung von AQI1-„knock-out“-Mutanten (*aqi1-1*) im Gegensatz zu *A. thaliana* Wildtyp Pflanzen darstellen (siehe Abb. 4.4-23). Angenommen, die Acylase-Aktivität von AQI1 ist für das Recycling acetylierter Aminosäuren notwendig, könnte sich das Fehlen dieses Recyclings durchaus im Pflanzenwachstum widerspiegeln. Ebenso könnte sich die fehlende Deacetylierung von acetyliertem Methionin, welches das Substrat von AQI1 darstellt, auf den Ethenspiegel auswirken. Ethen wird durch Kopplung von Adenosin an freies Methionin gebildet. Es entsteht zuerst S-Adenosylmethionin und dann 1-Aminocyclopropancarbonsäure. In einem weiteren Schritt wird diese durch ACC-Oxidasen zu Ethen umgewandelt. Ethen beeinflusst die Seneszenz, Frucht- und Blütenreife, den Blattabwurf, sowie das Absterben von Pflanzenteilen (BLEECKER &

KENDE, 2000). Es wäre möglich, dass zu geringe Konzentrationen an freiem Methionin eine reduzierte Bildung von Ethen bewirken und somit auch die Pflanzenentwicklung beeinflussen.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Funktion von (Nt)AQI1 als Protease oder Peptidase bei der Aktivierung oder Inhibierung von am Zelltod beteiligten Proteinen. Dies könnte man sich ähnlich vorstellen, wie es im tierischen System bei Apoptose-Prozessen bekannt ist. Hier führt die Spaltung von Caspasen zu deren Aktivierung. Am programmierten Zelltod in Pflanzen sind Proteasen wie Aspartat-, Metallo-, Serin- und Threoninproteasen beteiligt (CHEN & FOOLAD, 1997; MURAKAMI, 2000; VERHAGEN *et al*., 2002; THORBURN *et al*., 2003). Daher besteht ebenso die Möglichkeit, dass auch die Metalloprotease (Nt)AQI1 hier mitwirkt. Diese Funktion würde eine Beteiligung an Zelltodprozessen bedeuten, die mit der Regulation des H_2O_2-Transports durch Aquaporine „Hand in Hand“ gehen könnte. Jedoch spricht gegen diese Hypothese, dass bisher noch keine Proteine bzw. Peptide als Substrate für Aminoacylasen gefunden wurden. Die bisher bekannten Aminoacylasen konnten immer nur einzelne freie acetylierte Aminosäuren hydrolysieren.

Auch eine direkte Verknüpfung zwischen der Aminoacylase-Aktivität von (Nt)AQI1 und der Regulation von Aquaporinen wäre vorstellbar. Einen Hinweis darauf liefern Befunde die zeigen, dass manche Aquaporine am Start-Methionin acetyliert vorliegen (PIETRO *et al*., 2013). Dies könnte ein mögliches Ziel von (Nt)AQI1 darstellen, mit dem Zweck diese Aquaporine in ihrer Funktion zu regulieren. Auch die in dieser Arbeit untersuchten Aquaporine AtTIP1;1 und AtPIP2;2 liegen am Start-Methionin N-acetyliert vor. Bei AtPIP2;2 betrifft dies sogar das Start-Methionin und das Alanin an zweiter Position. Es gibt jedoch zwei schwerwiegende Gesichtspunkte die gegen diese Hypothese sprechen. Zum einen die eben genannte Tatsache der Substratspezifität von Aminoacylasen, die sich bisher nur auf freie Aminosäuren beschränkt. Zum anderen die angenommene extrazelluläre Lokalisation von (Nt)AQI1 im Apoplasten bzw. in der Vakuole. Da sich der N-Terminus der Aquaporine auf zytoplasmatischer Seite befindet, hat (Nt)AQI1 vermutlich keinen Zugang zu diesem Bereich.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit folgende Funktionen des Aminoacylase 1-homologen Proteins (Nt)AQI1 in Pflanzen ermittelt werden:

(Nt)AQI1 reguliert den H_2O_2-Transport durch Aquaporine. Dies wird höchstwahrscheinlich über eine Blockade der Aquaporinpore bewerkstelligt. Daher wird auch der H_2O-Transport durch diese Aquaporine von (Nt)AQI1 beeinflusst. Durch die Regulation des H_2O_2-Transports spielt (Nt)AQI1 eine bedeutende Rolle bei programmierten Zelltodprozessen. Beispiele sind bei der hypersensitiven Abwehrreaktion (HR) als Folge von Pathogenbefall und der Xylogenese zu finden. Durch die altersabhängige Akkumulation ist (Nt)AQI1 ebenso an der Regulation von Seneszenzprozessen beteiligt.

Zusammenfassung

Der programmierte Zelltod (PCD) stellt einen wichtigen Prozess bei der Entwicklung, Seneszenz und Pathogenabwehr von Pflanzen und Tieren dar. Zum Wohle des Gesamtorganismus kommt es zum genetisch regulierten und gezielten Selbstmord einzelner Zellen. Bei Pflanzen ist PCD vor allem im Rahmen der „hypersensitiven Abwehrreaktion“ (HR) von enormer Wichtigkeit. Sie schützen sich vor schädlichen Eindringlingen, indem infizierte Pflanzenzellen durch PCD gezielt getötet werden. So wird eine räumliche Barriere zwischen Wirt und Pathogen geschaffen und die systemische Ausbreitung von biotrophen Pathogenen verhindert. Die Induktion von PCD erfolgt über komplexe Signalwege. Als Signalsubstanzen spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), vor allem H_2O_2, eine wesentliche Rolle. Der Transport von H_2O_2 über Zellmembranen hinweg erfolgt über Aquaporine. Da intrazelluläre H_2O_2-Konzentrationen darüber entscheiden wie vital eine Zelle ist, ist die räumliche und zeitliche Kontrolle dieses H_2O_2-Transports unabdingbar. Als potentieller Regulator der Kanalfunktion der Aquaporine wurde das Protein AQUAPORIN INTERACTOR 1 (AQI1) isoliert. Bei AQI1 handelt es sich um ein pflanzliches Protein mit Homologie zu Aminoacylase 1 aus Säugern. Über Aminoacylasen ist bekannt, dass sie die Hydrolyse acylierter Aminosäuren katalysieren. Die physiologische Funktion dieser Enzyme ist bisher jedoch kaum verstanden.

In dieser Arbeit erfolgte erstmals die Charakterisierung einer Aminoacylase (AQI1) aus Pflanzen. Es wurde die physiologische Funktion von AQI1 als Regulator von Aquaporinen, sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das pflanzliche Protein AQI1, neben der Deacetylierung von Aminosäuren, eine weitere Aufgabe erfüllen kann. Durch Protein-Protein Interaktion nimmt AQI1 Einfluss auf die Kanalaktivität von Aquaporinen. AQI1 kann den H_2O_2-Einstrom, sowie den H_2O-Einstrom durch Aquaporine inhibieren. Dies erfolgt vermutlich in Form einer Blockade der Aquaporinpore. Durch diese Funktion ist AQI1 wesentlich an der Zelltodregulation in Pflanzen beteiligt. Im Zuge der HR kommt es zur vermehrten Akkumulation von AQI1. Dies verhindert den Eintritt toxischer Mengen H_2O_2 in die Nachbarzellen, um so die lokale Kontrolle des PCD zu gewährleisten. Zudem scheint AQI1 an der Regulation von Seneszenzprozessen beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass AQI1 einem Altersgradienten folgend, in jungem Blattgewebe stark akkumuliert, wohingegen es in älterem Blattgewebe abgebaut wird. Durch diese altersabhängige Akkumulation könnte AQI1 zur Vitalität von Blättern beitragen, indem es in jungen Blättern den Eintritt zu hoher H_2O_2-Konzentrationen in die Zellen verhindert.

Summary

Programmed cell death (PCD) is an important process during development, senescence and pathogen defence in plants and in animals. It is a genetically regulated and targeted cell suicide of single cells, for benefit of the whole organism. In plants, PCD is of great importance, especially in the course of the "hypersensitive response" (HR). For protecting themselves against harmful intruders, infected plant cells are directly deposed of by PCD. The developing local lesions act as a barrier between host plant and pathogen. This prevents the systemic expansion of biotrophic pathogens within the whole plant. The induction of PCD involves complex signal transduction pathways. Reactive oxygen species (ROS), in particular H_2O_2, play an important role as signal molecules during PCD. The transport of H_2O_2 across cell membranes is conducted by aquaporins. As the vitality of cells depends on intracellular H_2O_2-levels, a spatiotemporal control of this H_2O_2-transport is indispensable.

AQUAPORIN INTERACTOR 1 (AQI1) was isolated as a potential regulator of the channel function of aquaporins. AQI1 is a plant protein with sequence homology to the mammal aminoacylase 1. It is known, that aminoacylases catalyse the hydrolysis of acyl-amino acids. However, the physiological function of these enzymes is still unclear.

This study represents the first characterisation of an aminoacylase (AQI1) in plants. The physiological function of AQI1 as a regulator of aquaporins, as well as the underlying molecular mechanisms, have been analysed. In addition to deacetylation of amino acids, a second function of the protein AQI1 was discovered. AQI1 interferes with the channel activity of aquaporins by protein-protein interaction. In this way, AQI1 is able to inhibit the H_2O_2-, and to a certain extent also the H_2O-influx, through aquaporins. Probably, this happens by blocking the aquaporinpore. Due to this function, AQI1 is a major component in cell death regulation in plants. During the „hypersensitive response" (HR), which is induced as a result of pathogen attack, AQI1 accumulates to high levels to prevent the influx of toxic amounts of H_2O_2 into neighbouring cells. This ensures a local control of PCD. In addition, AQI1 seems to be involved in regulation of senescence processes. It could be demonstrated, that AQI1 accumulates in a gradient from juvenile to senescent leaves, due to degradation in older tissues. By this age-dependent accumulation, AQI1 could contribute to the vitality of leaves, by preventing the influx of excessive amounts of H_2O_2 into the cell.

Literaturverzeichnis

ADAMS JM & CORY S (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival**.** Science 281: 1322 – 1325.

ADLER E (1977). Lignin Chemistry - Past, Present and Future**.** Wood Sci Technol 11: 169 – 218.

ADRAIN C & MARTIN SJ (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas**.** Trends Biochem Sci 26: 390 – 397.

ALBERTS B, BRAY D, HOPKIN K, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2010). Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie (4. Auflage). Wiley-VCH, Weinheim.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ (1990). Basic local alignment search tool**.** J Mol Biol 215: 403 – 410.

ANDERS MW & DEKANT W (1994). Aminoacylases**.** Adv Pharmocol 27: 413 – 448.

ANTONSSON B & MARTINOU JC (2000). The Bcl-2 protein family**.** Exp Cell Res 256: 50 – 57.

APEL K & HIRT H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 55: 373 – 399.

ARDON M (1965). Oxygen: elementary forms and hydrogen peroxide**.** W A Benjamin Inc, New York: 82.

ASANO Y, YASUDA T, TANI Y, YAMADA H (1982). A new enzymatic method of acrylamide production**.** Agr Biol Chem 46 (5): 1183 – 1189.

BACHMAIR A, FINLEY D, VARSHAVSKY A (1986). *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue**.** Science 234: 179 – 186.

BAIS HP, VEPACHEDO R, GILROY S, CALLAWAY RM, VIVANCO JM (2003). Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions**.** Science 5: 301 (5638): 1377 – 1380.

BANEYX F & MUJACIC M (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli***.** Nat Biotechnol 22: 1399 – 1408.

BEILMANN A, PFITZNER AJP, GOODMAN HM, PFITZNER UM (1991). Functional analysis of the pathogenesis-related 1a protein gene minimal promotor region: comparison of reporter gene expression in transient and in stable transfections**.** J Biochem 196: 415 – 421.

BEJ AK, MAHBUBANI MH, ATLAS RM (1991). Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications**.** Crit Rev Biochem Mol Biol 26: 301 – 334.

BETHKE PC & JONES RL (2001). Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species**.** Plant J 25 (1): 19 – 29.

BEVAN M (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation **.** Nucl Acids Res 12: 8711 – 8721.

BIENERT GP, MØLLER ALB, KRISTIANSEN KA, SCHULZ A, MØLLER IM, SCHJOERRING JK, JAHN TP (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes**.** J Biol Chem 282: 1183 – 1192.

BIENERT GP, SCHJOERRING JK, JAHN TP (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide**.** Biochim Biophys Acta 1758: 994 – 1003.

BIRNBAUM SM, LEVINTOV L, KINGSLEY RB, GREENSTEIN JP (1952). Specifity of amino acid acylases**.** J Biol Chem 194: 455 – 470.

BLACKSTONE NW & GREEN DR (1999). The evolution of a mechanism of cell suicide**.** BioEssays 21: 84 – 88.

BLEECKER AB & KENDE H (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annu Rev Cell Cev Biol 16: 1 – 18

BLOBEL G & DOBBERSTEIN B (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma**.** J Cell Biol 67 (3): 835 – 851.

BLUME B, NÜRNBERGER T, NASS N, SCHEEL D (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley**.** Plant Cell 12: 1425 – 1440.

BOLWELL GP, BINDSCHEDLER LV, BLEE KA, BUTT VS, DAVIES DR, GARDNER SL, GERRISH C, MINIBAYEVA F (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system**.** J Exp Bot 53: 1367 – 1376.

BRADFORD MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**.** Anal Biochem 72: 248 – 254.

BRADLEY DJ, KJELLBORN P, LAMB CJ (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response**.** Cell 70 (1): 21 – 30.

BRADSHAW RA, BRICKEY WW, KENNETH WW (1998). N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N^{α}-acetyl transferase families**.** Trends Biochem Sci 23: 263 – 267.

BRISSON LF, TENHAKEN R, LAMB C (1994). Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance**.** Plant Cell 6 (12): 1703 – 1712.

BROOKS SA (2006). Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins**.** Expert Rev Proteomics 3: 345 – 359.

BRUNS FH & SCHULZE C (1962). Acylase I: Reindarstellung , physikalisch-chemische Eigenschaften und Identität mit „Hippurikase“**.** Biochem Z 338: 162 – 181.

BUCHANAN-WOLLASTON V, EARL S, HARRISON E, MATHAS E, NAVABPOUR S, PAGE T, PINK D (2003). The molecular analysis of leaf senescence - a genomic approach**.** Plant Biotechnol J 1: 3 – 22.

BUCHANAN-WOLLASTON V, PAGE T, HARRISON E, BREEZE E, LIM PO, NAM HG, LIN JF, WU SH, SWIDZINSKI J, ISHIZAKI K, LEAVER CJ (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis.* Plant J 42 (4): 567 – 585.

CALLIS, 1995. Regulation of protein degradation**.** Plant Cell 7 (7): 845 – 857.

CARSTENS CP, BONNARDEL J, ALLEN R, WAESCHE A (2001). BL21-CodonPlus™ cells correct expression problems caused by codon bias**.** Strategies 14 (2): 50 – 52.

CARTER C, PAN S, ZOUHAR J, AVILA EL, GIRKE T, RAIKHEL NV (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins**.** Plant Cell 16: 3285 – 3303.

CASTRIC PA, FARNDEN KJ, CONN EE (1972). Cyanide metabolism in higher plants: V. The formation of asparagine from β-cyanoalanine**.** Arch Biochem Biophys 152 (1): 62 – 69.

CHAO DT & KORSMEYER SJ (1998). BCL-2 family: regulators of cell death**.** Annu Rev Immunol 16 (1): 395 – 419.

CHAUMONT F, BARRIEU F, WOJCIK E, CHRISPEELS MJ, JUNG R (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize**.** Plant Physiol 125: 1206 – 1215.

CHAUMONT F, FETTER K, VAN WILDER V, MOSHELION M (2004). Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity**.** Plant Cell 16: 215 – 228.

CHEN F & FOOLAD MR (1997). 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 35: 821 – 831.

CHENAULT HK, DAHMER J, WHITESIDES GM (1989). Kinetic resolution of unnatural and rarely occurring amino acids: Enantioselective hydrolysis of N-acylamino acids catalyzed by acylase I**.** J Am Chem Soc 111: 6354 – 6364.

CHO HY, TANIZAWA K, TANAKA H, SODA K (1987). A spectrometric rate assay of aminoacylase**.** Analytc Biochem 165: 142 – 146.

CHRISPEELS MJ & AGRE P (1994). Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells**.** Trends Biochem Sci 19: 421 – 425.

CHU M, DESVOYES B, TURINA M, NOAD R, SCHOLTHOF HB (2000). Genetic dissection of tomato bushy stunt virus p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion**.** Virology 266 (1): 79 – 87.

COLEMAN JE (1998). Zinc enzymes**.** Curr Opin Chem Biol 2: 222 – 234.

COOK RM, BURKE BJ, BUCHHAGEN DL, MINNA JD, MILLER YE (1993). Human aminoacylase I: cloning, sequence and expression analysis of a chromosome 3p21 gene inactivated in small cell lung cancer**.** J Biol Chem 268: 17010 – 17017.

COOK RM, FRANKLIN WA, MOORE MD, JOHNSON BE, MILLER YE (1998). Mutational inactivation of aminoacylase I in a small cell lung cancer cell line**.** Genes Chromosom Cancer 21: 320 – 325.

COWAN SW & ROSENBUSCH JP (1994). Folding pattern diversity of integral membrane proteins**.** Science 264: 914 – 916.

D´AMBROSIO C, TALAMO F, VITALE RM, AMODEO P, TELL G, FERRARA L, SCALONI A (2003). Probing the dimeric structure of porcine aminoacylase 1 by mass spectrometric and modeling procedures**.** Biochemistry 42: 4430 – 4443.

DANIELS MJ; CHAUMONT F, MIRKOV TE, CHRISPEELS MJ (1996). Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site**.** Plant Cell 8: 587 – 599.

DENECKE J, DE RYCKE R, BOTTERMAN J (1992). Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope**.** EMBO J 11 (6): 2345 – 2355.

DEREEPER A, GUIGNON V, BLANC G, AUDIC S, BUFFET S, CHEVENET F, DUFAYARD JF, GUINDON S, LEFORT V, LESCOT M, CLAVERIE JM, GASCUEL O (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist**.** Nucleic Acids Res 1 (36): 465 – 469.

DEVASAGAYAM TPA, TILAK JC, BOLOOR KK, SANE KETAKI S, GHASKADBI SAROJ S, LELE RD (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects**.** J Assoc Physicians India 52: 796.

DI PIETRO M, VIALARET J, LI GW, HEM S, PRADO K, ROSSIGNOL M, MAUREL C, SANTONI V (2013). Coordianted post-translational responses of aquaporins to abiotic and nutritional stimuli in *Arabidopsis* roots**.** Mol Cell Proteomics 12: 3886 – 3897.

DIKIC I, WAKATSUKI S, WALTERS KJ (2009). Ubiquitin-binding domains - from structure to functions**.** Nature Rev Mol Cell Biol 10: 659 – 671.

DOHMEN RJ, STRASSER AW, HÖNER CB, HOLLENBERG CP (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera**.** Yeast 7: 691 – 692.

DUVALL E & WYLLIE AH (1986). Death and the cell**.** Immunol Today 7: 337 – 343.

DYNOWSKI M, SCHAAF G, LOQUE D, MORAN O, LUDEWIG U (2008). Plant plasma membrane water channels conduct the signaling molecule H_2O_2**.** Biochem J 414: 53 – 61.

EARNSHAW WC (1995). Nuclear changes in apoptosis**.** Curr Opin Cell Biol 7: 337 – 343.

EBEL S & ROTH HJ (1987). Lexikon der Phamazie, Thieme Verlag Stuttgart: 465.

EISENBARTH DA & WEIG AR (2005). Dynamics of aquaporins and water relations during hypocotyl elongation in *Ricinus communis* L. seedlings**.** J Exp Bot 56 (417): 1831 – 1842.

ELLIS RE, JACOBSON DM, HORVITZ HR (1991). Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans***.** Genetics 129: 79 – 94.

Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol pathol 35 (4): 495 – 16.

ENDO Y (1978). N-acyl-L-aromatic amino acid deacylase in animal tissues**.** Biochim Biophys Acta 523 (1): 207 – 214.

ENDO Y (1980). *In vivo* deacetylation of N-acetyl amino acids by kidney acylases in mice and rats. A possible role of acylase system in mammalian kidneys**.** Biochim Biophys Acta 628: 13 – 18.

EVANS VR, MANNING AB, BERNARD LH, CHRONWALL BM, MILLINGTON WR (1994). A-Melanocyte-stimulating hormone and N-acetyl-β-endorphin immunoreactivities are localized in the human pituritary but are not restricted to the zone intermedia**.** Endocrinology 134: 97 – 106.

FINKEL T (1998). Oxygen radicals and signaling**.** Curr Opin Cell Biol 10: 248 – 253.

FISCHER K (2013). Charakterisierung der Funktion von Aquaporinen als Stresssignale in tierischen Zellen. Masterarbeit, Institut für Genetik, Fachgebiet Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim.

FLOR HH (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini***.** Phytopath 32: 653 – 669.

FOREMAN J, DEMIDCHIK V, BOTHWELL JH, MYLONA P, MIEDEMA H, TORRES MA, LINSTEAD P, COSTA S, BROWNLEE C, JONES JD, DAVIES JM, DOLAN L (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth**.** Nature 422 (6930): 442 – 446.

FREEMAN BA & CRAPO JD (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury**.** Lab Invest 47: 412 – 426.

FRIAS I, SIVERIO JM, GONZÁLEZ C, TRUJILLO JM, PÉREZ JA (1991). Purification of a new peroxidase catalysing the formation of lignan-type compounds**.** Biochem J 273: 109 – 113.

FU D, LIBSON A, MIERCKE LJ, WEITZMAN C, NOLLERT P, KRUCINSKI J, STROUD RM (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity**.** Science 290: 481 – 486.

FUJIYOSHI Y, MITSUOKA K, DE GROOT BL, PHILIPPSEN A, GRUBMÜLLER H, AGRE P, ENGEL A (2002). Structure and function of water channels**.** Curr Opin Struct Biol 12: 509 – 515.

FUKUDA H (1996). Xylogenesis: Initation, progression and cell death**.** Plant Physiol 47: 299 – 325.

FÜTTERER J (2001). RTBV-like viruses. The Springer index of viruses, Springer Berlin: 212 – 216.

GADE W & BROWN JL (1981). Purification, characterization and possible function of α-N-acylamino acid hydrolase from bovine liver**.** Biochim Biophys Acta 662: 86 – 93.

GAJEWSKI TF & THOMPSON CB (1996). Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence**.** Cell 87: 589 – 592.

GECHEV TS & HILLE J (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death**.** J Cell Biol 168 (1): 17 – 20.

GEISZT M & LETO TL (2004). The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond**.** J Biol Chem 279 (50): 51715 – 51718.

GIARDINA T, BIAGINI A, DALLE ORE F, FERRE E, REYNIER M, PUIGSERVER A (1997). The hog intestinal mucosa acylase I: subcellular localization, isolation, kinetic studies and biological function**.** Biochimie 79 (5): 265 – 273.

GIARDINA T, BIAGINI A, MASSEY-HARROCHE D, PUIGSERVER A (1999). Distribution and subcellular localization of acylpeptide hydrolase and acylase I along the hog gastro-intestinal tract**.** Biochimie 81: 1049 – 1055.

GILLES I, LÖFFLER HG, SCHNEIDER F (1984). Ein neues Isolierungsverfahren für Schweinenierenacylase. Kinetik des Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} und Cd^{2+}-Enzyms**.** Z Naturforsch 39c: 1017 – 1020.

GONEN T & WALZ T (2006). The structure of aquaporins**.** Q Rev Biophys 39 (4): 361 – 396.

GRAY J & JOHAL GS (1998). Programmed cell death in plants**.** Arabidopsis 1, England: 360.

GREEN DR & REED JC (1998). Mitochondria and apoptosis**.** Science 281 (5381): 1309 – 1312.

GREEN DR (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin**.** Cell 94: 695 – 698.

GREEN DR (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors**.** Cell 102 (1): 1 – 4.

GREENBERG JT (1996). Programmed cell death: a way of life for plants**.** Proc Natl Acad Sci 93 (22): 12094 – 12097.

GREENSTEIN JP & WINITZ M (1961). Chemistry of the amino acids**.** John Wiley & Sons Inc, New York: 1754 – 1767.

GROOVER A, DEWITT N, HEIDEL A, JONES A (1997). Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating *in vitro***.** Protoplasma 196: 197 – 211.

GROSS A, MCDONNELL JM, KORSMEYER SJ (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis**.** Genes Dev 13 (15): 1899 – 1911.

GROSS A, JOCKEL J, WEI MC, KORSMEYER SJ (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis**.** EMBO J 17 (14): 3878 – 3885.

GUO Y, CAI Z, GAN S (2004). Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence**.** Plant Cell Env 27: 521 – 549.

HAMMOND-KOSACK KE & JONES JDG (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses**.** Plant Cell 8: 1773 – 1791.

HANAHAN D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids**.** J Mol Biol 166 (4): 557 – 580.

HARA-CHIKUMA M & VERKMAN AS (2006). Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins**.** Cell Mol Life Sci 63: 1386 – 1392.

HARMAN D, 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry**.** J Gerontol 11: 298 – 300.

HAUPTS U, MAITI S, SCHWILLE P, WEBB WW (1998). Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy**.** Proc Natl Acad Sci 95: 13573 – 13578.

HEESE D, LOFFLER HG, ROHM KH (1988). Further characterization of porcine kidney aminoacylase I reveals close similarity to „renal dipeptidase“**.** Biol Chem Hoppe-Seyler 369: 559 – 566.

HEESE D, BERGER S, RÖHM KH (1990). Nuclear magnetic relaxation studies of the role of the metal ion in Mn^{2+}-substituted aminoacylase I**.** Eur J Biochem 88: 175 – 180.

HELDT HW, PIECHULLA B (2008). Pflanzenbiochemie 4, Spektrum Akademischer Verlag: 31 – 32.

HENGARTNER MO (2000). The biochemistry of apoptosis**.** Nature 407: 770 – 776.

HICKE L, SCHUBERT HL, HILL CP (2005). Ubiquitin-binding domains. Nature Rev Mol Cell Biol 6 (8): 610 – 621.

HICKE L (2001). Protein regulation by monoubiquitin**.** Nature Rev Mol Cell Biol 2 (3): 195 – 201.

HOCH T (2011). Die Bedeutung von Aquaporinen und ihren Interaktionspartnern für die Zelltodregulation in Pflanzen**.** Dissertation, Institut für Genetik, Fachgebiet Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim.

HOEBERICHTS FA & WOLTERING EJ (2003). Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant specific regulators**.** BioEssays 25: 47 – 57.

HOEKEMA A, HIRSCH PR, HOOYKAAS PJJ, SCHILPEROORT RA (1983). Binary vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid**.** Nature 303: 179 – 180.

HOFFMANN-THOMA G (2001). Die Vakuole - Recycling und Entsorgung in der Pflanzenzelle**.** Biologie in unserer Zeit, Band 31.

HOLM LM, JAHN TP, MØLLER ALB, SCHJOERRING JK, FEERI D, KLAERKE DA, ZEUTHEN T (2005). NH_3 and NH_4^+ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes**.** Pflug Arch 450: 415 – 428.

HSU YT, WOLTER KG, YOULE RJ (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis**.** Proc Natl Acad Sci 94 (8): 3668 – 3672.

INOUE H, NOJIMA H, OKAYAMA H (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids**.** Gene 96: 23 – 28.

ISHIKAWA F, ISHIDA H, MATSUI I, KAWARABAYASI Y, KIKUCHI H (2001). Novel bifunctional hyperthermostable carboxypeptidase/aminoacylase from *Pyrococcus horikoshii* OT3**.** Appl Environ Microbiol 67 (2): 673 – 679.

ISHIKAWA F, SUGA S, UEMURA T, SATO MH, MAESHIMA M (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana***.** FEBS Lett 579: 5814 – 5820.

JAKOB M, MILLER YE, RÖHM KH (1992). Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding aminoacylase 1 from porcine kidney**.** Biol Chem Hoppe-Seyler 373: 1227 – 1231.

JAVOT H, LAUVERGEAT V, SANTONI V, MARTIN-LAURENT F, GUECLUE J, VINH J, HEYES J, FRANCK KI, SCHAEFFNER AR, BOUCHEZ D, MAUREL C (2003). Role of a single aquaporin isoform in root water uptake**.** Plant Cell 15: 509 – 522.

JOHANSON U & GUSTAVSSON S (2002). A new subfamily of major intrinsic proteins in plants**.** Mol Biol Evol 19: 456 – 461.

JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON I, GUSTAVSSON S, SJÖVALL S, FRAYSSE L, WEIG AR, KJIELLBOM P (2001). 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 Physiol 126: 1358 – 1369.

JOHANSSON I, KARLSSON M, JOHANSON U, LARSSON C, KJIELLBOM P (2000). The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance**.** Biochim biophy Acta 1465: 324 – 342.

JOHANSSON I, KARLSSON M, SHUKLA VK, CHRISPEELS MJ, LARSSON C, KJIELLBOM P (1998). Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation**.** Plant Cell 10: 451 – 459.

JORNVALL H (1975). Acetylation of protein N-terminal amino groups structural observations on α-amino acetylated proteins**.** J Theor Biol 55 (1): 1 – 12.

JUNG JS, PRESTON GM, SMITH BL, GUGGINO WB, AGRE P (1994). Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP**.** J Biol Chem 269: 14648 – 14654.

KAUFMANN SH & HENGARTNER MO (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium**.** Trends Cell Biol 11: 526 – 534.

KAWAI M, PAN L, REED JC, UCHIMIYA H (1999). Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast**.** FEBS Lett 464 (3): 143 – 147.

KAWAI-YAMADA M, JIN L, YOSHINAGA K, HIRATA A, UCHIMIYA H (2001). Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 (AtBI-1)**.** Proc Natl Acad Sci 98 (21): 12295 – 12300.

KAWANISHI M (1997). Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects intestine 407 epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and anti-Fas antibody**.** J Virol 71 (4): 3319 – 3322.

KEEN NT (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions**.** Annu Rev Genet 24 (1): 447 – 463.

KENDALL RL, YAMADA R, BRADSHAW RA (1990). Cotranslational amino-terminal processing**.** Methods Enzymol 185 (398 – 407).

KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics**.** Br J Cancer 26: 239 – 257.

KIM J & KILONSKY DJ (2000). Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells**.** Annu Rev Biochem 69: 303 – 342.

KIM DY, SCALF M, SMITH LM, VIERSTRA RD (2013). Advanced proteomic analyses yield a deep catalog of ubiquitylation targets in *Arabidopsis***.** Plant Cell 25: 1523 – 1540.

KINDLER SH & GILVARG C (1960). N-Succinyl-Lα, -ε-diaminopimelin acid deacylase**.** J Biol Chem 235: 3532 – 3535.

KIRKIN V, MCEWAN DG, NOVAK I, DIKIC I (2009). A role for Ubiquitin in selective autophagy**.** Mol Cell 34 (3): 259 – 269.

KLIONSKY DJ & EMR SD (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation**.** Science 290: 1717 – 1721.

KONCZ C & SCHELL J (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector**.** Mol Gen Genet 204 (3): 383 – 396.

KÖRDEL W & SCHNEIDER F (1997). Renal aminoacylase, a zinc enzyme. Z Naturforsch C 32c: 342 – 344.

KRISHNAMURTHY KV, KRISHNARAJ R, CHOZHAVENDAN R, SAMUEL CHRISTOPHER F (2000). The programme of cell death in plants and animals - a comparison**.** Curr Sci 79 (9): 1169 – 1181.

KUHNS EH, SEIDL-ADAMS I, TUMLINSON JH (2012). A lepidopteran aminoacylase (L-ACY-1) in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) gut lumen hydrolyzes fatty acid-amino acid conjugates, elicitors of plant defense**.** Insect Biochem Mol Biol 42 (1): 32 – 40.

LACOMME C & SANTA CRUZ S (1999). Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response**.** Proc Natl Acad Sci 96: 7956 – 7961.

LAEMMLI UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**.** Nature 227:680 – 685.

LALOI C, APEL K, DANON A (2004). Reactive oxygen signaling: the latest news**.** Curr Opin Plant Biol 7: 323 – 328.

LAM E, KATO N, LAWTON M (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response**.** Nature 411: 848 – 853.

LAMB C & DIXON RA (1997). The oxidative burst in plant disease resistance**.** Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48: 251 – 275.

LANCASTER JR (1994). Stimulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide**.** Proc Natl Acad Sci 91: 8137.

LENZ HD (2011). Die Rolle Autophagie-assoziierter Proteine in der pflanzlichen Immunantwort**.** Dissertation, Fakultät für Biologie, Eberhard Karls Universität Tübingen.

LEVINE B & KLIONSKY DJ (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy**.** Dev Cell 6: 463 – 477.

LEVINE A, TENHAKEN R, DIXON R, LAMB C (1994). H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response**.** Cell 79: 583 – 593.

LEVITAN A, TREBITSH T, KISS V, PEREG Y, DANGOOR I, DANON A (2005). Dual targeting of the disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmatic reticulum**.** Proc Natl Acad Sci 102 (17): 6225 – 6230.

LIM PO, WOO HR, NAM HG (2003). Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis**.** Trends Plant Sci 8 (6): 272 – 278.

LINDNER HA, ALARY A, BOJU LI, SULEA T, MÉNARD R (2005). Roles of dimerization domain residues in binding and catalysis by aminoacylase 1**.** Biochemistry 44: 15645 – 15651.

LINDNER HA, ALARY A, WILKE M, SULEA T (2008 a). Probing the acy1-binding pocket of aminoacylase 1**.** Biochemistry 47: 4266 – 4275.

LINDNER HA, HÖPFNER S, TÄFLER-NAUMANN M, MIKO M, KONRAD L, RÖHM KH (2000). The distribution of aminoacylase I among mammalian species and localization of the enzyme in porcine kidney**.** Biochimie 82 (2): 129 – 136.

LINDNER HA, LUNIN VV, ALARY A, HECKER R, CYGLER M, MENARD R (2003). Essential roles of zinc ligation and enzyme dimerization for catalysis in the aminoacylase-1/M20 family**.** J Biol Chem 278: 44496 – 44504.

LINDNER HA, TÄFLER-NAUMANN M, RÖHM KH (2008 b). N-acetylamino acid utilization by kidney aminoacylase 1**.** Biochimie 90: 773 – 780.

LIU LH, LUDEWIG U, GASSERT B, FROMMER WB, VON WIRÉN N (2003). Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis***.** Plant Physiol 133: 1220 – 1228.

LÖFFLER HG, RÖHM KH, SCHNEIDER F (1986). Studies on the metal ion dependence, kinetics and SH (S-S) groups of acylamino acid amidohydrolase**.** Zink Enzymes 1: 281 – 288.

LONG PM, STRADECKI HM, MINTURN JE, WESLEY UV, JAWORSKI DM (2011). Differential aminoacylase expression in neuroblastoma**.** Int J Cancer 129: 1322 – 1330.

LOQUÉ D, LUDEWIG U, YUAN L, VON WIRÉN N (2005). Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH_3 transport into the vacuole**.** Plant Physiol 137: 671 – 680.

LUDEWIG U, VON WIRÉN N, FROMMER WB (2002). Uniport of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1**.** J Biol Chem 277 (16): 13548 – 13555**.**

LUDEWIG U (2004). Electroneutral ammonium transport by basolateral rhesus B glycoprotein**.** J Physiol 559: 751 – 759.

MA JF, TAMAI K, YAMAJI N, MITANI N, KONISHI S, KATSUHARA M, ISHIGURO M, MURATA Y, YANO M (2006). A silicon transporter in rice**.** Nature 440: 688 – 691.

MA S, QUIST TM, ULANOV A, JOLY R, BOHNERT HJ (2004). Loss of TIP1;1 aquaporin in Arabidopsis leads to cell and plant death**.** Plant J 40: 845 – 859.

MACEYKA M, NAVA VE, MILSTIEN S, SPIEGEL S (2004). Aminoacylase 1 is a sphingosine kinase 1-interacting protein**.** FEBS Lett 568: 30 – 34.

MAIER-GREINER UH, KLAUS C, ESTERMAIER LM, HARTMANN GR (1991). Herbizidresistenz in transgenen Pflanzen durch Abbau des Phytotoxins zu Harnstoff**.** Angewandte Chemie, 103 (10), 1353 – 1354.

MARJAMAA K, KUKKOLA E, LUNDELL T, KARHUNEN P, SARANPAÄ P, FRAGERSTEDT K (2006). Monolignol oxidation by xylem peroxidase isoforms of Norway spruce *Picea abies* and silver birch *Betula pentula***.** Tree Physiol 26: 605 – 611.

MARSH D (1996). Peptide models for membrane channels**.** Biochem J 315: 345 – 361.

MARTINS LM & EARNSHAW WC (1997). Apoptosis: alive and kicking in**.** Trends Cell Biol 7: 111 – 114.

MARTOGLIO B & DOBBERSTEIN B (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides**.** Trends Cell Biol 8 (10): 410 – 415.

MARTY F (1999). Plant vacuoles**.** Plant Cell 11: 587 – 600.

MASROOR A (2013). Effects of overexpression of *NIMIN* genes on salicylic acid-mediated *PR-1* gene activation and phenotype in *Nicotiana benthamiana***.** Dissertation, Institut für Genetik, Fachgebiet Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim.

MAST S (2000). Expression von apoptosemodulierenden Proteinen in *Nicotiana tabacum* L. und Analyse der Auswirkungen auf Physiologie und Pathogenabwehr der Pflanze**.** Diplomarbeit, Institut für Genetik, Fachgebiet Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim.

MAUREL C, REIZER J, SCHROEDER JI, CHRISPEELS MJ (1993). The vacuolar membrane protein γ-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes**.** EMBO J 12: 2241 – 2247.

MAYER M, SCHAAF G, MOURO I, LOPEZ C, COLIN Y (2006). Different transport mechanisms in plant and human AMT/Rh-type ammonium transport**.** J Gen Physiol 127: 133 – 144.

MEHLER AH (1951). Studies on the reactions of illuminated chloroplasts: I Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents**.** Arch Biochem Biophys 33: 65 – 77.

MERGEMANN H & SAUTER M (2000). Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice**.** Plant Physiol 124: 609 – 614.

MERSEREAU M, PAZOUR GJ, DAS A (1990). Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation**.** Gene 90 (1): 149 – 151.

MIAO Y, LAUN T, ZIMMERMANN P, ZENTGRAF U (2004). Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis**.** Plant Mol Biol 55: 853 – 867.

MILLER YE, DRABKIN H, JONES C, FISHER JH (1990). Human aminoacylase 1: cloning, regional assignment to distal chromosome 3p21.1, and identification of a cross-hybridizing sequence on chromosome 18**.** Genomics 8: 149 – 154.

MILLER EW, DICKINSON BC, CHANG CJ (2010). Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling**.** Proc Natl Acad Sci 107 (36): 15681 – 15686.

MILLER JH (1972). Experiments in molecular genetics**.** Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

MITTA M, KATO I, TSUNASAWA S (1993). The nucleotide sequence of human aminoacylase-1**.** Biochim Biophys Acta 1174: 201 – 203.

MIZUTANI M, WATANABE S, NAKAGAWA T, MAESHIMA M (2006). Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana***.** Plant Cell Physiol 47: 1420 – 1426.

MØLLER IM (2001). Plant mitochondrial and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species**.** Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52: 561 – 591.

MONTILLET JL, CHAMONGPOL S, RUSTERUCCI C, DAT J, VAN DE COTTE B, AGNEL JP, BATTESTI C, INZE D, VAN BREUSEGEM F, TRIANTAPHYLIDES C (2005). Fatty acid hydroperoxides and H_2O_2 in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves**.** Plant Physiol 138: 1516 – 1526.

MUKHOPADHYAY D & RIEZMAN H (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. Science 315 (5809): 201 -205.

MUNNÉ B, MUNNÉ-BOSCH S, ALEGRE L (2002). Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts**.** P lanta 214: 608 – 615.

MURAKAMI S, KONDO Y, NAKANO T, SATO F (2000). Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells**.** FEBS Lett 468: 15 – 18.

MURATA K, MITSUOKA K, HIRAI T, WALZ T, AGRE P, HEYMANN JB, ENGEL , FUJIYOSHI Y (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1**.** Nature 407: 599 – 605.

NAGASAWA T, MATHEW CD, MAUGER J, YAMADA H (1988). Nitrile hydratase-catalyzed production of nicotinamide from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. Appl Environ Microbiol 54 (7): 1766 – 1769.

NAGASAWA T & YAMADA H (1989). Microbial transformations of nitriles**.** Trends in Biotechnol 7 (6): 153 – 158.

NATARAJ A, PATHAK S, HOPWOOD V, MCDONELL T, ANANTHASWAMY H (1994). Bcl-2 oncogene blocks differentiation and extends viability but does not immortalize normal human keratinocytes**.** Int J Oncol 4: 1211 – 1218.

NAYLOR SL, SHOWS TB, KLEBE RJ (1979). Bioautographic visualization of aminoacylase 1: assignment of the structural gene ACY1 to chromosome 3 in man. Somatic Cell Genet 5: 11 – 21.

NAYLOR SL, ELLIOTT RW, BROWN JA, SHOWS TB (1982). Mapping of aminoacylase I and β-galactosidase-A to homologous regions of human chromosome 3 and mouse chromosome 9 suggests location of additional genes. Am J Hum Genet 34: 235 – 244.

NEILL S, DESIKAN R, HANCOCK J (2002). Hydrogen peroxide signaling**.** Curr Opin Plant Biol 5: 388 – 395.

NICHOLSON DW & THORNBERRY NA (1997). Caspases: killer proteases**.** Trends Biochem Sci 22: 299 – 306.

NOODEN LD & PENNEY JP (2001). Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*)**.** J Exp Bot 52: 2152 – 2159.

NÜRNBERGER T & SCHEEL D (2001). Signal transmission in the plant immune response**.** Trends Plant Sci 6: 372 – 379.

OHBA Y, HATTORI Y, SAKATA S, YAMASHIRO Y, OKAYAMA N, HIRANO T, NAKANISHI T, MIYAZAKI A, SHIMIZU A (1997). HB Niigata (β1(NAI)Val→Leu): The fifth variant with retention of the initiator methionine and partial acetylation**.** Hemoglobin 21: 179 – 186.

OKAMOTO T, SHIMADA T, HARA-NISHIMURA I, NISHIMURA M, MINAMIKAWA T (2003). C-terminal KDEL Sequence of a KDEL-tailed Cysteine Proteinase (Sulfhydryl-Endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of Sulfhydryl-Endopeptidase[1]. Plant Physiol 132: 1892 – 1900.

OLSZEWSKI NE & LOCKHART B (2001). Badnavirus**.** The Springer index of viruses, Springer Berlin: 194 – 198.

OSHUMI Y (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 211 – 216.

PAIK WK, BLOCH-FRANKENTHAL L, BIRNBAUM SM, WINITZ M, GREENSTEIN JP (1957). E-Lysin Acylase**.** Arch Biochem Biophys 69, 50 – 66.

PALM GJ & RÖHM KH (1995). Aminoacylase I from porcine kidney: identification and characterization of two major protein domains**.** J Protein Chem 14: 233 – 240.

PARK JH & SAIER MH (1996). Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins**.** J Membr Biol 153: 171 – 180.

PARTHIER B (1988). Gerontoplasts - the yellow end in the ontogenesis of chloroplasts**.** Endocyto Cell Res 5: 163 – 190.

PEARCE MJ, MINTSERIS J, FERREYRA J, GYGI SP, DARWIN KH (2008). Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis***.** Science 322 (5904): 1104 – 1107.

PEARSON GR, LUKA J, PETTI L, SAMPLE J, BIRKENBACH M, BRAUN D, KIEFF E (1987). Identification of an Epstein-Barr virus early gene encoding a second component of the restricted early antigen complex**.** Virology 160: 151 – 161.

PERRIER J, DURAND A, GIARDINA T, PUIGSERVER A (2005). Catabolism of intracellular N-terminal acetylated proteins: involvement of acylpeptide hydrolase and acylase**.** Biochimie 87 (8): 673 – 685.

PETER G & NEALE D (2004). Molecular basis for the evolution of xylem lignification**.** Curr Opin Plant Biol 7: 737 – 742.

PETROV VD & VAN BREUSEGEM F (2012). Hydrogen peroxide - a central hub for information flow in plant cells**.** AoB Plants: pls014.

PFITZNER UM & PFITZNER AJP (1992). Expression of a viral avirulence gene in transgenic plants is sufficient to induce the hypersensitive defense reaction**.** Mol Plant Microbe Interact 5: 318 – 321.

PFITZNER AJP, TSAI EC, STROMINGER JL, SPECK SH (1987). Isolation and characterization of cDNA clones corresponding to transcripts from the BamHI H and F regions of the Epstein-Barr virus genome**.** J Virol 61: 2902 – 2909.

PITTELKOW S, LINDNER H, RÖHM KH (1998). Human and porcine aminoacylase I overproduced in a baculovirus expression vector system. Evidence for structural and functional identity with enzymes isolated from kidney**.** Protein Expr Purif 12: 269 – 276.

POLEVODA B & SHERMAN F (2000). Nα-terminal acetylation of eukaryotic proteins**.** J Biol Chem 275 (47): 36479 – 36482.

POLEVODA B & SHERMAN F (2002). The diversity of acetylated proteins**.** Genome Biol 3 (5): reviews 0006.

POLO S, SIGISMUND S, FARETTA M, GUIDI M, CAPUA MR, BOSSI G, CHEN H, DE CAMILLI P, DI FIORE PP (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins**.** Nature 416 (6879): 451 – 455.

PRASHER DC, ECKENRODE VK, WARD WW, PRENDERGAST FG, CORMIER MJ (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein**.** Gene 111 (2): 229 – 233.

PRESTON GM & AGRE P (1991). Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family**.** Proc Natl Acad Sci 88 (24): 11110 – 11114.

PROUTY WF & GOLDBERG AL (1972). Fate of abnormal proteins in *E. coli* accumulation in intracellular granules before catabolism**.** Nature 240 (100): 147 – 150.

PUTHALAKATH H, HUANG DC, O´REILLY LA, KING SM, STRASSER A (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. Mol Cell 3 (3): 287 – 296.

QIU W, PARK JW, SCHOLTHOF HB (2002). Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity**.** Mol Plant Microb Interact 15 (3): 269 -280.

QU F & MORRIS TJ (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing**.** Mol Plant Microbe Interact 15 (3): 193 – 202.

QUIGLEY F, ROSENBERG JM, SHACHAR-HILL Y, BOHNERT HJ (2001). From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins**.** Genome Biol 3 (1): 0001.1 – 0001.17.

RAWLINGS ND & BARRETT AJ (1995). Evolutionary families of metallopeptidases**.** Methods Enzymol 248: 183 – 228.

REED JC (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family**.** Nature 387: 773 – 776.

REGGIORI F & KLIONSKY DJ (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. Eukaryot Cell 1: 11 – 21.

REIZER J, REIZER A, SAIER MH (1993). 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 28: 235 – 257.

RENEHAN AG, BOOTH C, POTTEN CS (2001). What is apoptosis, and why is it important? BMJ 322: 1536 – 1538.

RHEE SG (1999). Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger**.** Exp Mol Med 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 für Genetik, Fachgebiet Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim.

ROWSELL S, PAUPTIT RA, TUCKER AD, MELTON RG, BLOW DM, BRICK P (1997). Crystal structure of carboxypeptidase G_2, a bacterial enzyme with application in cancer therapy**.** Structure 5: 337 – 347.

RYALS JA, NEUENSCHWANDER UH, WILLITS MG, MOLINA A, STEINER HY, HUNT MD (1996). Systemic acquired resistance**.** Plant Cell 8: 1809 – 1819.

RYERSON DE & HEATH MC (1996). Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments**.** Plant Cell 8 (3): 393 – 402.

SAGI M & FLUHR R (2001). Superoxide production by plant homologues of the $gp91^{phox}$ NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection**.** Plant Physiol 126 (3): 1281 – 1290.

SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**.** Science 239: 487 – 491.

SAKANYAN V, DESMAREZ L, LEGRAIN C, CHARLIER D, METT I, KOCHIKYAN A, SAVCHENKO A, BOYEN A, FALMAGNE P, PIERARD A (1993). Gene cloning, sequence analysis, purification and characterization of a thermostable aminoacylase from *Bacillus stearothermophilus***.** Appl Environ Microbiol 59: 3878 – 3888.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989). Molecular cloning: a laboratory manuel (Vol. 2)**.** Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

SANCHEZ P, DE TORRES ZABALA M, GRANT M (2000). 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 21: 393 – 399.

SANSOM MSP & LAW RJ (2001). Membrane proteins: aquaporins - channels without ions**.** Curr Biol 11: R71 – R73.

SASS JO, MOHR V, OLBRICH H, LOGES NT, SCHWEITZER-KRANTZ S, MOEBUS R, WEILER P, KISPERT A, SUPERTI-FURGA A, WEVERS RA, OMRAN H (2006). Mutations in ACY1, the gene encoding aminoacyalse 1, cause a novel inborn error**.** Am J Hum Genet 78: 401 – 409.

SCAPIN G & BLANCHARD JS (1998). Enzymology of bacterial lysine biosynthesis**.** Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 72: 279 – 324.

SCHENDEL SL, XIE Z, MONTAL MO, MATSUYAMA S, MONTAL M, REED JC (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2**.** Cell Biology 94: 5113 – 5118.

SCHMIEDEBERG O (1881). Ueber Spaltungen und Synthesen im Thierkörper**.** Naunym-Schmiedebergs Archiv Exp Pathol Phamakol 19: 379 – 392.

SCHÖRG BF (2013). Vergleichende Analyse zweier Suppressoren des "Gene Silencings" in Pflanzen am Beispiel eines DNA- und eines RNA-Virus. Diplomarbeit, Institut für Genetik, Fachgebiet Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim.

SCHWARTZMAN RA & CIDLOWSKI JA (1993). Apoptosis: The Biochemistry and Molecular Biology of Programmed Cell Death. Endocr Rev 14 (2): 133-151.

SHIMOMURA O, JOHNSON FH, SAIGA Y (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan**.** Aequorin J Cell Comp Physiol 59: 223 – 239.

SILHAVY D, MOLNÁRA, LUCIOLI A, SZITTYA G, HORNYIK C, TAVAZZA M, BURGYÁN J (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs**.** EMBO J 21 (12): 3070 – 3080.

SITTE P, ZIEGLER H, EHRENDORFER F, BRESINSKY A (2002). Lignin (353 – 356), Sekundärwände von Faser- und Holzzellen (95 – 96)**.** Strasburger Lehrbuch der Botanik, Spectrum Heidelberg.

SMALLE J & VIERSTRA RD (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway**.** Annu rev Plant Biol 55: 555 – 590.

SMORODINZEW IA (1922). Über die Wirkung des Histozyms auf die Homologen der Hippursäure**.** Hoppe Seyler´s Z f Physiol Chem 124: 123 – 139.

SOMMER A (2012). Expressionsanalysen von Aminoacylasen – Untersuchungen zu Pathomechanismen angeborener Stoffwechselstörungen. Inauguraldisseratation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

STEFFENS B & SAUTER M (2009). Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene an H_2O_2 through an autoamplified signal pathway**.** Plant Cell 21: 184 – 196.

STEPHAN H, POLZAR B, MANNHERZ HG (2000). Sein oder nicht sein? Naturwissenschaftliche Rundschau 624: 273 – 281.

STORY SV, GRUNDEN AM, ADAMS MW (2001). Characterization of an aminoacylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus***.** J Bacteriol 183 (14): 4259 – 4268.

STRANSKY H & AMBERGER A (1973). Isolierung und Eigenschaften einer Cyanamid-hydratase (E.C.-Gruppe 4.2.1) aus *Myrothecium verrucaria***.** Z Pflanzenphysiol 70: 74 – 87.

SZITTYA G, SILHAVY D, MOLNÁR A, HAVELDA Z, LOVAS A, LAKATOS L, BÁNFALVI Z, BURGYÁN J (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation**.** EMBO J 22 (3): 633 – 640.

TAJKHORSHID E, NOLLERT P, JENSEN M, MIERCKE L, O´CONNELL J, STROUD R, SCHULTEN K (2002). Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning**.** Science 296: 525 – 530.

TAKANO J, WADW M, LUDEWIG U, SCHAAF G, VON WIRÉN N, FUJIWARA T (2006). The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation**.** Plant Cell 18: 1498 – 1509.

THANNICKAL VJ & FANBURG BL (2000). Reactive oxygen species in cell signaling**.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279: 1005 – 1028.

THOMAS H, OUGHAM HJ, WAGSTAFF C, STEAD AD (2003). Defining senescence and death**.** J Exp Bot 54 (385): 1127 – 1132.

THORBURN J, BENDER LM, THORBURN A (2003). Caspase- and serine protease-dependent apoptosis by the death domain of FADD in normal epithelia cells**.** Mol Biol Cell 14: 67 – 77.

THROWER JS, HOFFMAN L, RECHSTEINER M, PICKART CM (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal**.** EMBO J 19 (1): 94 – 102.

TORRES MA, DANGL JL, JONES JDG (2002). Arabidopsis gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response**.** Proc Natl Acad Sci 99: 517 – 522.

TOYOOKA K, MORIYASU Y, GOTO Y, TAKEUCHI M, FUKUDA H, MATSOUKA K (2006). Protein aggregates are transported to vacuoles by a macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells**.** Autophagy 2: 96 – 106.

TSUJIMOTO Y, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma**.** Science 228 (4706): 1440 – 1443.

TURINA M, OMAROV R, MURPHY JF, BAZALDUA-HERNANDEZ C, DESVOYES B, SCHOLTHOF HB (2003). A newly identified role for tomato bushy stunt virus P19 in short distance spread**.** Mol Plant Path 4 (1): 67 – 72.

UEHLEIN N, LOVISOLO G, SIEFRITZ F, KALDENHOFF R (2003). The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO_2 pore with physiological functions**.** Nature 425: 734 – 737.

UREN AG, O´ROURKE K, ARAVIND LA, PISABARRO MT, SESHAGIRI S, KOONIN EV, DIXIT VM (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma**.** Mol Cell 6: 961 – 967.

VAN BREUSEGEM F & DAT JF (2006). Reactive oxygen species in plant cell death**.** Plant Physiol 141: 384 – 390.

VAN COSTER RN, GERLO EA, GIARDINA GD, ENGELKE UF, SMET JE, DE PRAETER CM, MEERSSCHAUT VA, DE MEIRLEIR LJ, SENECA SH, DEVREESE B, LEROY JG, HERGA S, PERRIER JP, WEVERS RA, LISSENS W (2005). Aminoacylase 1 deficiency: a novel inborn error of metabolism**.** Biochem Biophys Res Commun 338: 1322 – 1326.

VAUX DL & STRASSER A (1996). The molecular biology of apoptosis**.** Proc Natl Acad Sci 93: 2239 – 2234.

VEAL EA, DAY AM, MORGAN BA (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling**.** Mol Cell 26 (1): 1 – 14.

VERHAGEN AM, SILKE J, EKERT PG, PAKUSCH M, KAUFMANN H, CONNOLLY LM, DAY CL, TIKOO A, BURKE R, WROBEL C, MORITZ RL, SIMPSON RJ, VAUX DL (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins**.** J Biol Chem 277: 445 – 454.

VIERSTRA RD (1993). Protein degradation in plants**.** Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 44: 385 – 410.

VITALE A, CERIOTTI A, DENECKE J (1993). The role of the endoplasmatic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport**.** J Exp Bot 44 (266): 1417 – 1444.

VOGT C (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (*Alytes obstetricans*)**.** Jent und Gassman, Solothurn.

VOINNET O, RIVAS S, MESTRE P, BAULCOMBE D (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of Tomato bushy stunt virus. Plant J 33 (5): 949 – 956.

WANG H, LI J, BOSTOCK RM, GILCHRIST DG (1996). Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development**.** Plant Cell 8: 375 – 391.

WEBER H (1994). Molekulare Analyse von Resistenzmechanismen gegen das Tomatenmosaikvirus in der Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**.** Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

WEIGEL RR, BÄUSCHER C, PFITZNER AJP, PFITZNER UM (2001). 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 Mol Biol 46: 143 – 160.

WEIGEL RR, PFITZNER UM, GATZ C (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in *Arabidopsis***.** Plant Cell 17 (4): 1279 – 1291.

WHITE E (1996). Life, death and the pursuits of apoptosis**.** Genes Dev 10: 1 – 15.

WHITHAM S, DINESH-KUMAR SP, CHOI D, HEHL R, CORR C, BAKER B (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor**.** Cell 78 (6): 1101 – 1115.

WING SS (2003). Deubiquitinating enzymes - the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway**.** Int J Biochem Cell Biol 35 (5): 590 – 605.

WINTER D, VINEGAR B, NAHAL H, AMMAR R, WILSON GV, PROVART NJ (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets**.** PloS one 2 (8): e718.

WU HB & TSOU CL (1993). A comparison of Zn(II) and Co(II) in the kinetics of inactivation of aminoacylase by 1,10-phenanthroline and reconstitution of the apoenzyme**.** Biochem J 296: 435 – 441.

WU B & BEITZ E (2007). Aquaporins with selectivity for unconventional permeants**.** Cell Mol Life Sci 64: 2413 – 2421.

XIONG Y, CONTENTO AL, BASSHAM DC (2007a). Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in Arabidopsis**.** Autophagy 3: 257 – 258.

XIONG Y, CONTENTO AL, NGUYEN PQ, BASSHAM DC (2007b). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in Arabidopsis**.** Plant Physiol 143: 291 – 299.

XU Q & REED JC (1998). Bax inhibitor 1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast**.** Mol Cell 1 (3): 337 – 346.

YAMASAKI H, SAKIHAMA Y, IKEHARA N (1997). Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cell against H_2O_2**.** Plant Physiol 115: 1405 – 1412.

YANG YB, HU HL, CHANG MC, LI H, TSAI YC (1994). Purification and characterization of L-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificants* DA181**.** Biosci Biotechnol Biochem 58 (1): 204 – 205.

YANISCH-PERRON C, VIEIRA J, MESSING J (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors**.** Gene 33: 103 – 119.

ZENTGRAF U (2008). Das molekulare Regulationsnetzwerk der Seneszenz in *Arabidopsis***.** Biospektrum 14: 465 – 468.

ZENTGRAF U, JOBST J, KOLB D, RENTSCH D (2004). Senescence-related gene expression profiles of rosette leaves of *Arabidopsis thaliana*: leaf versus plant age**.** Plant Biol 6: 178 – 183.

ZENTGRAF U, ZIMMERMANN P, SMYKOWSKI A (2012). Role of intracellular hydrogen peroxide as signaling molecule for plant senescence**.** Agricultural and Biological Sciences "Senescence": Chapter 2.

ZHONG Y, ONUKI J, YAMASAKI T, OGAWA O, AKATSUKA S, TOYOKUNI S (2009). Genome-wide analysis identifies a tumor suppressor role for aminoacylase 1 in iron-induced rat renal cell carcinoma**.** Carcinogenesis 30 (1): 158 – 164.

ZIMMERMANN P & ZENTGRAF U (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development**.** Cell Mol Biol Lett 10: 515 – 534.

ZIMMERMANN P, HEINLEIN C, ORENDI G, ZENTGRAF U (2006). Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**.** Plant Cell Environ 29 (6): 1049 – 1060.

ZWICKER S, MAST S, STOS V, PFITZNER AJ, PFITZNER UM (2007). Tobacco NIMIN2 proteins control *PR* gene induction through transient repression early in systemic acquired resistance**.** Molecular Plant Pathology 8 (4): 385-400.

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
A	Adenin
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
Abb.	Abbildung
Acy	Aminoacylase
ad.	auffüllen auf
Amp^R	Ampicillinresistenz
Apaf-1	Apoptosis activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ApTV	Alliaria petiolata Tymovirus
AQI1	AQUAPORIN INTERACTOR 1
AQP	Aquaporin
AS	Aminosäure
At	*Arabidopsis thaliana*
BI1	Bax-Inhibitor 1
ATP	Adenosintriphosphat
avr	Avirulenzgen
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BHRF1	BamHI fragment H rightward open reading frame no. 1
Bkg	Background
BLAST	Basic Local Alignment Tool
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cytosin
C-	Carboxy-
CAH	Cyanamidhydratase
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
Col	Columbia
Cub	C-terminale Hälfte von Ubiquitin
Da	Dalton
DAB	3,3‘-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	days post infection
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	*et alius*
EtOH	Ethanol
F	Faktor
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
fwd	forward
G	Guanin
GCOS	Gene Chip Operating Software

GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
Heynh.	Nomenklatur nach Gustav Heynhold
HR	Hypersensitive Response
HRP	Horse Radish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
JA	Jasmonic Acid
kat	Katal
kb	Kilobasen
KO	Knock-out
l	löslich
L.	Nomenklatur nach Carl von Linné
LB	Luria Bertani Medium
LV	LexA + VP16 (Transkriptionsfaktor)
m	membrangebunden
M	Mol
MBP	Maltosebindeprotein
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
MIP	Major Intrinsic Protein
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MS	Mineralsalze nach Murashige & Skoog
n	Anzahl
N-	Amino-
N. benthamiana	*Nicotiana benthamiana*
N. tabacum	*Nicotiana tabacum*
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
NIMIN1	NIM1-INTERACTING 1
NOS	Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthasegens
Nt	*Nicotiana tabacum*
NubG	N-terminale Hälfte von Ubiquitin mit Aminosäureaustausch Ile → Gly
o. A.	optimale Anlagerungstemperatur einer Primerpaares
OD	optische Dichte
ONPG	O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
ORF	Open Reading Frame
ori	origin of replication
osm	Osmol
p. a.	*pro analysi*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCD	Programmed Cell Death
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
Pfu-Polymerase	*Pyrococcus furiosus* DNA-Polymerase
PIP	Plasmamembrane Intrinsic Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR-1	Pathogenesis Related Protein 1
R	Resistenzgene
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S. alba	*Sinapis alba*
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SA	Salicylic Acid
SAR	Systemic Acquired Resistance
SD	Synthetic Dropout Medium
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunde
t	Reaktionszeit
T	Thymin
T-DNA	„Transfer"-DNA aus dem Ti-Plasmid von *A. tumefaciens*
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	*Thermophilus aquaticus* DNA-Polymerase
TBS	Tris Buffered Saline
TGT	Target intensity value
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
TIP	Tonoplast Intrinsic Protein
TM	Transmembrandomäne
TMV	Tabakmosaikvirus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTBS	Tris Bufferd Saline + Tween-20
TYMV	Turnip Yellow Mosaic Virus
U	Uracil
Ub	Ubiquitin
UBP	Ubiquitin-spezifische Protease
uni	universal
UV	Ultraviolett
V	Verdünnungsstufe
V	Volt
var.	variabel
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
X. laevis	*Xenopus laevis*
Y2H	Yeast Two Hybrid
YPAD	Yeast extract-Peptone-Dextrose medium + Adenine

Anhang

I. DNA-Sequenzen

AQI1 (*Arabidopsis thaliana,* Aminoacylase 1-Homolog, cDNA, NM_119983.2)

ATGAGTCTTCTTCGTCTTCTCCTCGTTGTTGTTGTTCTTCATCTTTCTGCGGTGGCCGGC
GACGACGCCATCGTCTCCAGATTCCAGGAGTACCTCCGAATCAACACGGTTCAGCCCAAC
CCGGAATACTACAAAGCCGTTGACTTTATAATATCTCAGGCGAAACCACTGTCCCTCGAA
TCTCAGACGATCGAATTTGTAAAAGGAAAGCCGCTTCTCCTCCTCAAATGGGTTGGCTCC
GACCCAACCCTACCTGCCTTTCTCCTCAACTCCCACACCGATGTCGTTCCCTTCGAGGAC
TCCAAGTGGACTCACCATCCGCTCCAAGCTCACATGGACCACCATGGCGACATCTATGCC
AGGGGTTCCCAGGACATGAAGTGCGTCGGGATGCAGTACCTCGAGGCCATACGCAAGCTC
CAGGCTTCTGGCTTCAAGCCACTCCGATCCGTCTATCTCTCCTTCGTCCCCGATGAAGAG
ATTGGCGGCCACGATGGCGCAGAGAAGTTTGCTGAATCCCAATTATTCAAGAGCTTGAAC
ATCGCAATCGTGCTCGACGAAGGCCTGCCATCGCCTACTGAGAGTTACAGAGTATTCTAT
GGAGAGAGGAGTCCCTGGTGGCTGGTGATTAAGGCTAAAGGTCCACCTGGCCACGGTGCC
AAGCTCTATGACAACTCTGCCATGGAGAATCTGCTCAAAAGCATTGAGAGTATTCGCAGA
TTCAGAGCTTCTCAGTTCGATCTTCTCAAAGCTGGTGGGATAGCTGAAGGCGATGTTGTC
TCTGTGAACATGGCCTTCCTCAAGGCTGGCACACCTTCTCCAACTGGTTTCGTAATGAAT
CTGCAACCATCTGAGGCAGAAGCTGGTTTCGACATTCGTGTTCCACCCAGCGTTGATGCT
GAAGCACTCGAAAGACGTTTAGTGGAGGAATGGGCTCCAGCAGCACGAAACATGTCCTTT
GAGTTCAAGCAGAAGCTTACGGGGAAGCAATTCCTTACAGCAGCAGATGATTCAAATCCT
TGGTGGGGGCTCTTGGAAAATGCTGTTAAGGAAGCCGGAGGTAGGACCAGTAAGCCTGAG
ATTTTCCCTGCATCAACGGATGCTCGCTACTTTCGCAAGGCTGGCGTGCCTGCCTTTGGG
TTCTCTCCCATATCAAACACCCCGAGTCTGCTTCATGACCACAATGAGTATTTGGGTAAA
GCTGAGTACTTGAAAGGCATTGAGGTGTATGTTTCAATCATCAAAGCTTATGCATCATAT
GAAAGCAAAAGTGGTTCACGAGATGAGTTA**TGA**

NtAQI1 (*Nicotiana tabacum,* Aminoacylase 1-Homolog, cDNA, EB448218.1)

ATGAGTTTTTGCGGCGGTAGGCGAGACAAGCACAACTCTTATCATTACTCTCTGTGTCTG
TCGGTCTTGTTGTTGGTCACAGCGACGGCCGCGGAAGAAGCGTCGACAATCATATCAAGA
TTCCAACAGTACCTTCAGATCAATACAGCCCAACCTCAGCCCAACTACTATGAAGCCGCC
GAGTTTATAACCTCACAGGCGAAGTCGCTAAACCTCGAATCCCAGACCCTGGAGCTGGTG
AAGGGCAAGCCTTTAATTCTCCTGAAATGGGCAGGCAAGGACCCCAGCCTCCCTTCCGTC
CTACTCAACTCACATACCGACGTTGTCCCTTCCGAGCATCACAAGTGGGCCCACCCACCT
TTCTCCGCCCACTTAGATCCCGCTAGCGGCAACATCTACGCCCGGGGTTCTCAGGACATG
AAGTGCGTGGGCTTGCAGTACCTGGAGGCCATTCGCAAGCTCAAGGCTTCTGGCTTCCAA
CCAACGCGCACTGTCTACCTCTCCTTCGTCCCCGACGAGGAAATCGGCGGAGACGATGGT
GCCGGAAAGTTTGTCGATTCCGATGTCTTCGTGAAGATGAATGTTGGGATTGTACTTGAC
GAGGGCTTGCCTTCTCCCACCGAAAACTATCGTGCATTCTATGGGGAGAGGTCCCCCTGG
TGGCTGGTCGTTAAAGCTGTAGGTGCTCCTGGACACGGGGCTAAGCTCTATGATAATACT
GCCACGGAGAATCTACTTAAAAGCATCGAAACTATAAGGAGATTCAGGGCTGCGCAGTTC
GATTTAGTTAAGGCGGGATTGAAAGCTGAAGGCGAGGTCATTTCTGTTAATATGGTCTTC
TTGAAAGCTGGCACCCCTTCTCCCTCTGGTTTTGTCATGAACCTGCAGCCATCTGAAGCC
CAAGCAGGATTTGACATCAGAGTACCGCCAACTGCAGATCAAGCATCCTTGGAGAAGAGA
ATAGCTGAGGAATGGGCACCTGCTTCACGAAACATGACTTTTGAGTTCAAGCAGAAGGTG
TCTGTGAATGACAAGTTTGGAAGGCCAGCCATTACAGCTGTTGACAGTTCCAATGTTTGG
TGGGCACTGTTAGAAGAATCTATCGTCAAAGCTAATGCCGGAGTTGGAAAACCAGAAATA
TTTCCTGCATCGACAGGTGCACGCTATTTTCGGGAGCGAGGCCTGCCAGCAATAGGATTT
TCTCCAATGGCAAACACTCCGATTCTTCTTCACGACCACAACGAGTTCTTGAACAAGGAT
GAGTATTTGAAAGGTATTGATGTTTATGAGTCAATAATCAAAACTTATGCATCTTATATT
GAGCATCCAAGAGATGAGGCTTCGAGGGAAGAAT**TGA**

ACY1 (*Homo sapiens,* Aminoacylase 1, cDNA, NM_000666.2)

ATGACCAGCAAGGGTCCCGAGGAGGAGCACCCATCGGTGACGCTCTTCCGCCAGTACCTG
CGTATCCGCACTGTCCAGCCCAAGCCTGACTATGGAGCTGCTGTGGCTTTCTTTGAGGAG
ACAGCCCGCCAGCTGGGCCTGGGCTGTCAGAAAGTAGAGGTGGCACCTGGCTATGTGGTG
ACCGTGTTGACCTGGCCAGGCACCAACCCTACACTCTCCTCCATCTTGCTCAACTCCCAC
ACGGATGTGGTGCCTGTCTTCAAGGAACATTGGAGTCACGACCCCTTTGAGGCCTTCAAG
GATTCTGAGGGCTACATCTATGCCAGGGGTGCCCAGGACATGAAGTGCGTCAGCATCCAG
TACCTGGAAGCTGTGAGGAGGCTGAAGGTGGAGGGCCACCGGTTCCCCAGAACCATCCAC
ATGACCTTTGTGCCTGATGAGGAGGTTGGGGGTCACCAAGGCATGGAGCTGTTCGTGCAG
CGGCCTGAGTTCCACGCCCTGAGGGCAGGCTTTGCCCTGGATGAGGGCATAGCCAATCCC
ACTGATGCCTTCACTGTCTTTTATAGTGAGCGGAGTCCCTGGTGGGTGCGGGTTACCAGC
ACTGGGAGGCCAGGCCATGCCTCACGCTTCATGGAGGACACAGCAGCAGAGAAGCTGCAC
AAGGTTGTAAACTCCATCCTGGCATTCCGGGAGAAGGAATGGCAGAGGCTGCAGTCAAAC
CCCCACCTGAAAGAGGGGTCCGTGACCTCCGTGAACCTGACTAAGCTAGAGGGTGGCGTG
GCCTATAACGTGATACCTGCCACCATGAGCGCCAGCTTTGACTTCCGTGTGGCACCGGAT
GTGGACTTCAAGGCTTTTGAGGAGCAGCTGCAGAGCTGGTGCCAGGCAGCTGGCGAGGGG
GTCACCCTAGAGTTTGCTCAGAAGTGGATGCACCCCCAAGTGACACCTACTGATGACTCA
AACCCTTGGTGGGCAGCTTTTAGCCGGGTCTGCAAGGATATGAACCTCACTCTGGAGCCT
GAGATCATGCCTGCTGCCACTGACAACCGCTATATCCGCGCGGTGGGGGTCCCAGCTCTA
GGCTTCTCACCCATGAACCGCACACCTGTGCTGCTGCACGACCACGATGAACGGCTGCAT
GAGGCTGTGTTCCTCCGTGGGGTGGACATATATACACGCCTGCTGCCTGCCCTTGCCAGT
GTGCCTGCCCTGCCCAGTGACAGC**TGA**

AtTIP1;1 (*Arabidopsis thaliana,* Aquaporin, cDNA, NM_129238.3)

ATGCCGATCAGAAACATCGCCATTGGCCGTCCAGATGAAGCCACCCGTCCCGATGCCTTA
AAGGCGGCGTTGGCTGAGTTCATTTCAACTTTGATCTTTGTCGTCGCCGGTTCAGGCTCT
GGCATGGCTTTCAACAAGCTCACTGAAAACGGAGCCACCACTCCTTCTGGTCTCGTAGCT
GCTGCAGTGGCTCATGCCTTTGGACTCTTCGTCGCTGTCTCAGTTGGTGCCAACATCTCT
GGTGGACACGTTAACCCTGCCGTCACTTTCGGTGCTTTCATTGGTGGTAACATCACTCTC
CTCCGTGGTATCCTCTACTGGATTGCTCAGCTTCTCGGCTCCGTCGTCGCTTGCCTCATC
CTTAAATTCGCCACCGGTGGCTTGGCTGTGCCGGCTTTTGGTCTCTCTGCTGGAGTAGGA
GTGTTGAACGCTTTCGTTTTCGAGATCGTGATGACATTCGGGCTTGTTTACACCGTCTAC
GCTACAGCCATTGACCCCAAAAACGGGAGTCTTGGAACAATTGCTCCCATCGCAATCGGT
TTCATTGTTGGAGCCAACATCTTAGCTGGAGGAGCTTTCTCTGGAGCCTCCATGAATCCC
GCCGTGGCTTTCGGACCAGCGGTGGTGAGCTGGACATGGACCAACCACTGGGTCTACTGG
GCCGGACCTCTCGTCGGCGGTGGAATCGCTGGACTCATCTACGAAGTTTTCTTCATCAAC
ACCACACACGAGCAGCTCCCAACCACAGACTAC**TGA**

AtPIP2;2 (*Arabidopsis thaliana,* Aquaporin, cDNA, NM_129273.4)

ATGGCCAAAGACGTGGAAGGACCTGAGGGATTTCAGACAAGAGACTACGAAGATCCGCCA
CCAACTCCGTTTTTCGATGCGGACGAGCTTACCAAGTGGTCTTTATACAGAGCCGTCATT
GCCGAGTTCGTAGCCACTCTCCTCTTCTTGTACATCACCGTTTTAACTGTCATCGGTTAC
AAGATTCAGTCCGACACAAAAGCCGGTGGAGTTGACTGCGGCGGCGTCGGAATCCTTGGC
ATCGCGTGGGCTTTTGGTGGCATGATCTTCATCCTTGTCTACTGCACCGCCGGTATCTCA
GGTGGTCACATAAACCCTGCGGTGACGTTTGGTTTGTTCTTAGCCCGGAAGGTATCGCTG
ATTAGGGCGGTGCTTTACATGGTGGCTCAGTGTTTGGGTGCTATTTGTGGAGTTGGTTTC
GTCAAAGCCTTTCAAAGCTCTTACTATGATCGTTACGGTGGAGGAGCCAACTCTCTAGCA
GACGGCTACAACACAGGCACCGGACTAGCCGCAGAGATCATTGGAACATTCGTTCTCGTC
TACACAGTCTTCTCCGCTACTGATCCCAAACGTAACGCTAGAGACTCCCACGTTCCGGTT
TTGGCGCCACTTCCGATTGGGTTTGCGGTGTTTATGGTACATTTGGCCACTATTCCGATC
ACCGGAACCGGCATCAACCCGGCTAGGAGTTTCGGAGCTGCCGTAATCTATAACAAGAGC
AAGCCATGGGATGACCACTGGATATTCTGGGTGGGACCATTCATTGGAGCTGCGATAGCT
GCATTTTATCACCAATTTGTCCTAAGGGCTTCAGGTTCCAAGTCACTTGGATCCTTCAGA
AGTGCAGCCAACGTT**TGA**

NtTIP1;1 (*Nicotiana tabacum*, Aquaporin, cDNA, Y08161.1)

ATGCCGATCCACCAAATTGCTGTTGGAAGCCATGAGGAACTCCGCCAATCAGGGACGCTC
AAGGCGGCCTTGGCGGAGTTCATCTGTACCCTGATCTTCGTTTTCGCAGGTCAGGGTTCT
GGCATGGCTTTCAACAAGCTATCAGCTGACGGTACCGCTACTCCCGCCGGCCTCATCTCT
GCCTCTATAGCGCATGCCTTCGGGCTGTTTGTGGCCGTCTCCGTCGGTGCTAACATCTCC
GGCGGCCATGTTAATCCCGCCGTTACCTTCGGTGCTTTCGTTGGTGGAAACATCACTTTG
TTCCGTGGCATTCTCTACATTGTCGCACAGTTGCTTGGATCCACTGTTGCTTGCTTCCTC
CTTGAATTTGCCACTGGTGGCATGAGCACAGGAGCATTTGCTTTGTCAGCTGGTGTATCA
GTATGGAATGCATTTGTCTTTGAAATAGTGATGACTTTTGGACTTGTTTACACTGTGTAT
GCCACTGCTGTTGACCCAAAGAAGGGAGACTTGGGTGTAATTGCACCAATTGCCATTGGT
TTTATTGTTGGTGCCAACATTTTAGCTGGTGGGGCCTTTACTGGAGCTTCAATGAACCCT
GCTGTCTCATTTGGGCCAGCTTTGGTTAGCTGGACCTGGACCCACCAATGGGTCTACTGG
GCTGGACCCCTTGTTGGTGGTGGGATTGCTGGTGTTGTCTATGAACTCATCTTCATCAAC
CACTCCCATGAGCCACTCCCCAGTGGAGATTTT**TAA**

NtPIP2;2 (*Nicotiana tabacum*, Aquaporin, cDNA, EB426354.1)

ATGACTAAAGAAGTAGAGGTAGCAACAGAGCAACCAACAGAGTTTTCAGCAAAAGACTAT
ACTGACCCTCCACCAGCTCCTTTAGTAGACTTTGAGGAGCTGGCACAATGGTCACTTTAC
AGAGCTGTTATTGCTGAGTTCATTGCCACTTTGCTTTTCCTTTATGTTACTGTTTTGACT
GTGATTGGGTATAAGGTCCAGTCAGATGTCAAAGCCGACGGTGATATCTGTGGCGGCGTT
GGTATTCTTGGTATTGCTTGGGCTTTTGGTGGCATGATTTTCATTCTTGTTTACTGCACC
GCCGGTATCTCCGGAGGACACATAAACCCAGCAGTGACATTTGGGCTGTTTTTGGCAAGG
AAAGTATCATTGATCAGAGCAGTATTGTACATGGTGGCACAGTGTTTGGGTGCAATCTGT
GGTGTGGGTTTTGTGAAGGCATTCCAGAGTGCTTATTATGTTAGGTATGGTGGAGGTGCT
AATGTCATGGCTCCTGGCCATACCAAAGGTGTTGGATTAGCTGCTGAAATTATTGGTACT
TTTGTTTTGGTTTACACTGTCTTCTCTGCCACTGACCCTAAGAGAAATGCTAGAGACTCC
CATGTCCCTGTGTTGGCACCACTTCCAATTGGATTTGCTGTGTTCATGGTTCACTTAGCC
ACCATACCAATTACTGGAACTGGCATCAATCCTGCTAGAAGTTTTGGTGCAGCAGTTATT
TACAATCATGACAAAGCTTGGGATGAACACTGGATTTTCTGGGTGGGTCCCTTCATCGGA
GCCTTTGCCGCCGCCGTCTACCACCAGTTCATCCTCCGTGCTGGTGCCATCAAAGCTCTT
GGTTCCTTCAGGAGCAATGCCAGG

AQP1 (*Homo sapiens,* Aquaporin, cDNA, NM_198098.2)

ATGGCCAGCGAGTTCAAGAAGAAGCTCTTCTGGAGGGCAGTGGTGGCCGAGTTCCTGGCC
ACGACCCTCTTTGTCTTCATCAGCATCGGTTCTGCCCTGGGCTTCAAATACCCGGTGGGG
AACAACCAGACGGCGGTCCAGGACAACGTGAAGGTGTCGCTGGCCTTCGGGCTGAGCATC
GCCACGCTGGCGCAGAGTGTGGGCCACATCAGCGGCGCCCACCTCAACCCGGCTGTCACA
CTGGGGCTGCTGCTCAGCTGCCAGATCAGCATCTTCCGTGCCCTCATGTACATCATCGCC
CAGTGCGTGGGGGCCATCGTCGCCACCGCCATCCTCTCAGGCATCACCTCCTCCCTGACT
GGGAACTCGCTTGGCCGCAATGACCTGGCTGATGGTGTGAACTCGGGCCAGGGCCTGGGC
ATCGAGATCATCGGGACCCTCCAGCTGGTGCTATGCGTGCTGGCTACTACCGACCGGAGG
CGCCGTGACCTTGGTGGCTCAGCCCCCCTTGCCATCGGCCTCTCTGTAGCCCTTGGACAC
CTCCTGGCTATTGACTACACTGGCTGTGGGATTAACCCTGCTCGGTCCTTTGGCTCCGCG
GTGATCACACACAACTTCAGCAACCACTGGATTTTCTGGGTGGGGCCATTCATCGGGGGA
GCCCTGGCTGTACTCATCTACGACTTCATCCTGGCCCCACGCAGCAGTGACCTCACAGAC
CGCGTGAAGGTGTGGACCAGCGGCCAGGTGGAGGAGTATGACCTGGATGCCGACGACATC
AACTCCAGGGTGGAGATGAAGCCCAAA**TAG**

BHRF1 (Epstein Barr Virus, Bcl-2-Homolog, cDNA, DQ_279927.1)

ATGGCCTATTCAACAAGGGAGATACTGTTAGCCCTGTGTATACGGGACAGTCGTGTGCAT
GGAAATGGTACCCTGCATCCTGTGTTGGAGCTAGCAGCAAGAGAAACACCTCTCCGCCTT
TCGCCAGAGGACACTGTAGTTCTGCGTTATCATGTGTTGCTTGAGGAGATAATTGAACGA
AATTCAGAGACATTTACAGAAACTTGGAACAGATTTATAACACACACCGAACATGTGGAC
CTGGATTTTAACTCAGTATTTTTAGAGATATTTCACCGTGGAGACCCAAGCCTTGGGCGC
GCGTTGGCCTGGATGGCCTGGTGCATGCATGCCTGCAGGACATTGTGTTGTAACCAGTCT
ACTCCTTACTATGTTGTGGACCTGTCAGTTCGTGGGATGTTAGAAGCCAGCGAAGGCCTG
GATGGTTGGATTCATCAACAGGGCGGCTGGTCTACATTAATTGAAGACAACATTCCTGGA
TCCAGAAGGTTTAGCTGGACTTTGTTTCTTGCTGGACTGACTTTGAGTCTGTTAGTTATA
TGTAGTTATTTATTTATCTCCAGAGGAAGACACGAATTC**TAA**

II. Vektor-Karten

pUC18/19

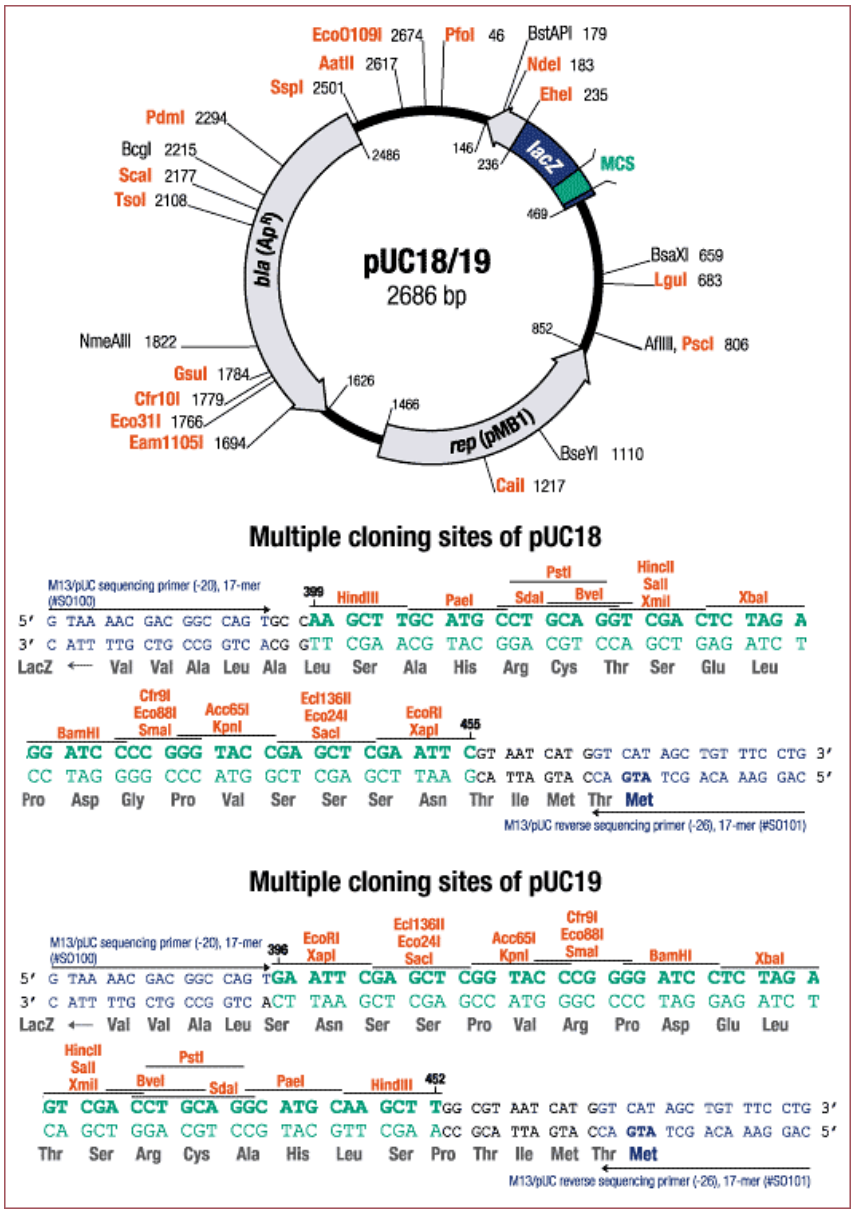


Abb. II-1: pUC18/19 (www.thermoscientificbio.com

pBluescript II KS (+) / pBluescript/T-Vektor

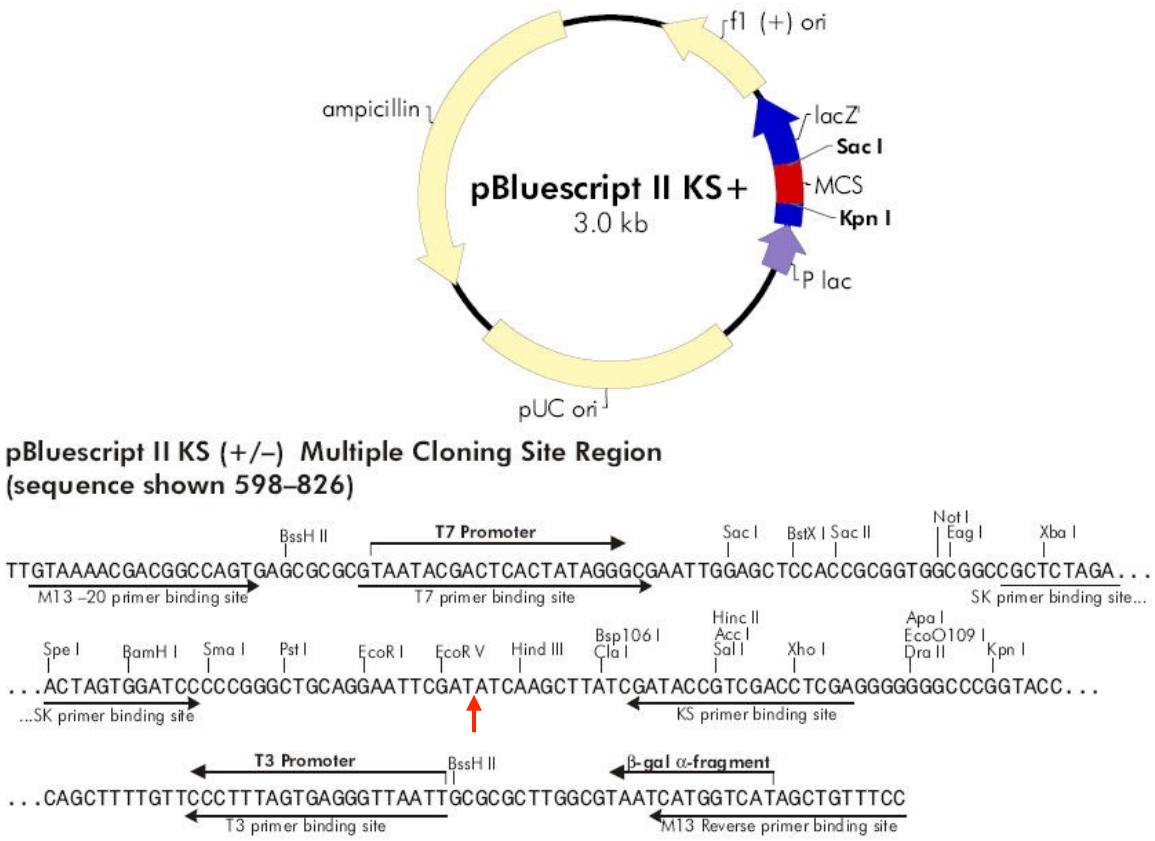
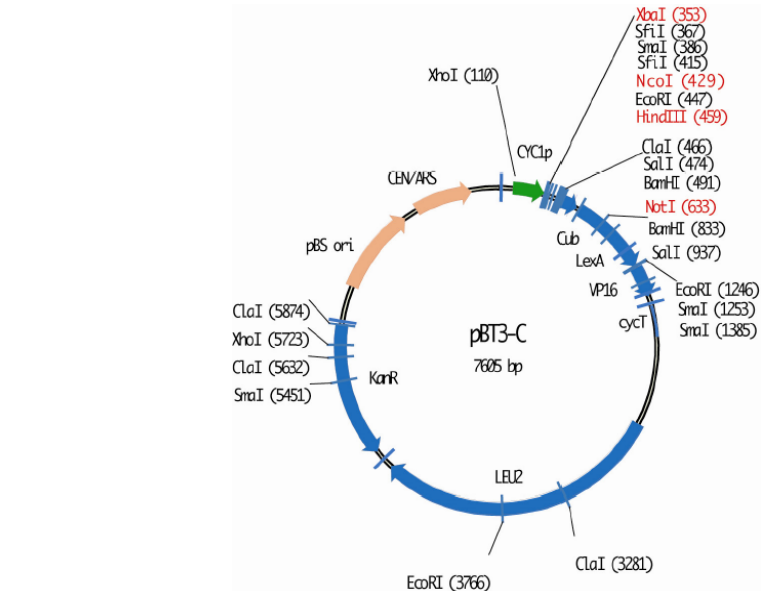


Abb. II-2: pBluescript II KS (+) / pBluescript/T-Vektor (www.xenbase.org). Der rote Pfeil markiert die Stelle, an der die T-Überhänge bei pBluescript/T-Vektor angefügt sind.

pBT3-C



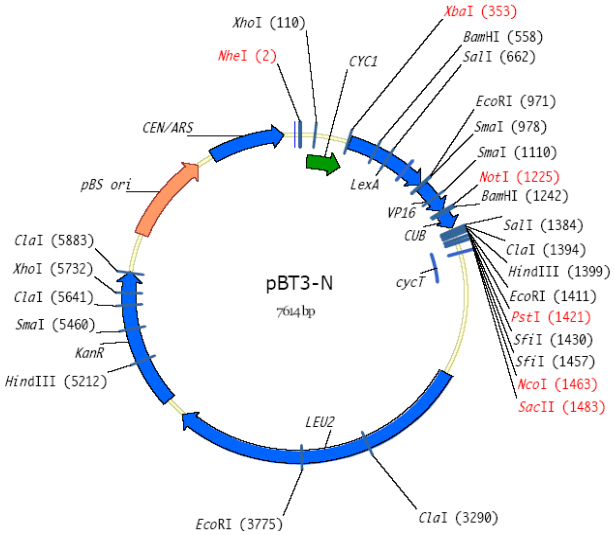

```
   Xba I          Sfi I                                                Sfi I
 ---------- ------------------                                  -----------------
atc  tag  acg  gcc att acg gcc aaa ctc gct cgc ccg ggc cga acc agt ggc tgc agg gcc gcc tcg gcc
 I    *   T    A   I   T   A   K   L   A   R   P   G   R   T   S   G   C   R   A   A   S   A

           Nco I                                Hind III
         --------                               --------
aaa ggc ctc cat ggg tat atc tgc agg aat tcg ata tca agc tta tcg ata ccg tcg acc atg tcg ggg

 K   G   L   H   G   Y   I   C   R   N   S   I   S   S   L   S   I   P   S   T   M   S   G
                                                                              ---------->
                                                                                  Cub
```

Abb. II-3: pBT3-C (www.dualsystems.com)

pBT3-N




```
      Pst I
      --------     Sfi I                          Sfi I        Nco I                Sac II
                ----------------              ---------------- -------             --------
aat tcc tgc agg gcc att acg gcc agg cct tta att aag gcc gcc tcg gcc cca tgg taa gta gct aac cgc gga
 N   S   C   R   A   I   T   A   R   P   L   I   K   A   A   S   A   P   W   *   V   A   N   R   G
-----------------
Cub reading frame
```

Abb. II-4: pBT3-N (www.dualsystems.com)

pPR3-N

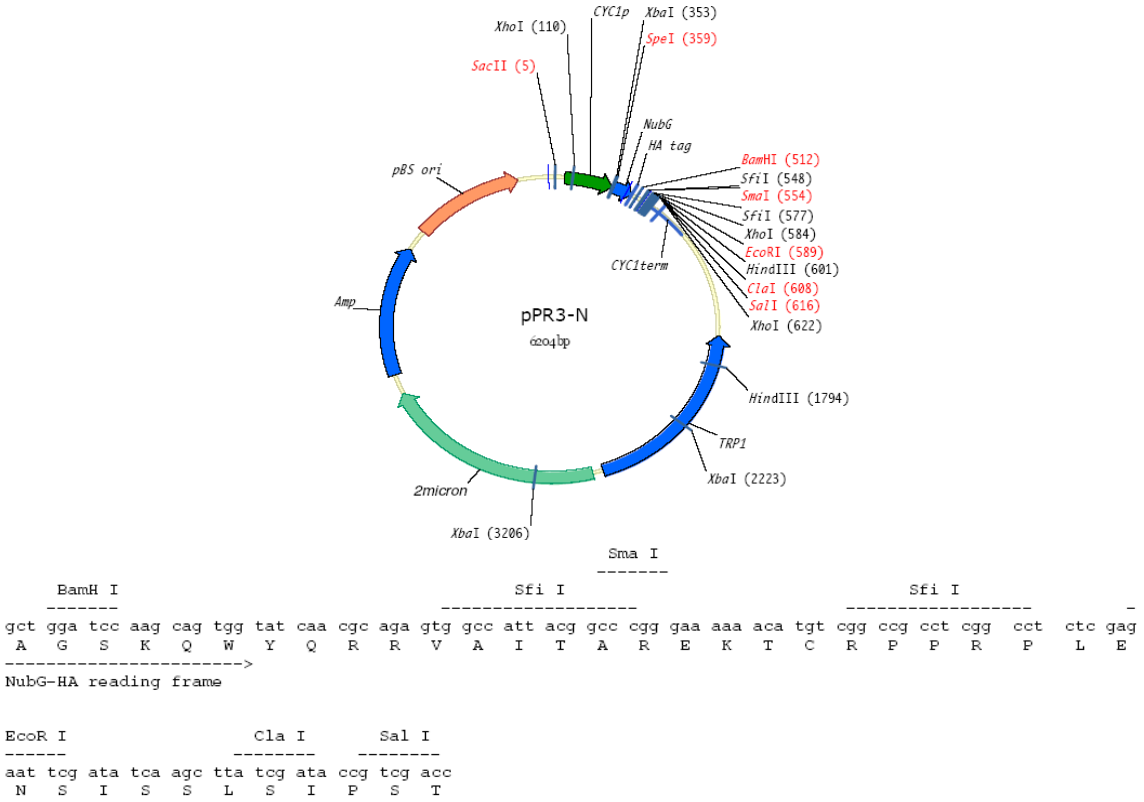


Abb. II-5: pPR3-N (www.dualsystems.com)

pDSL-Nx

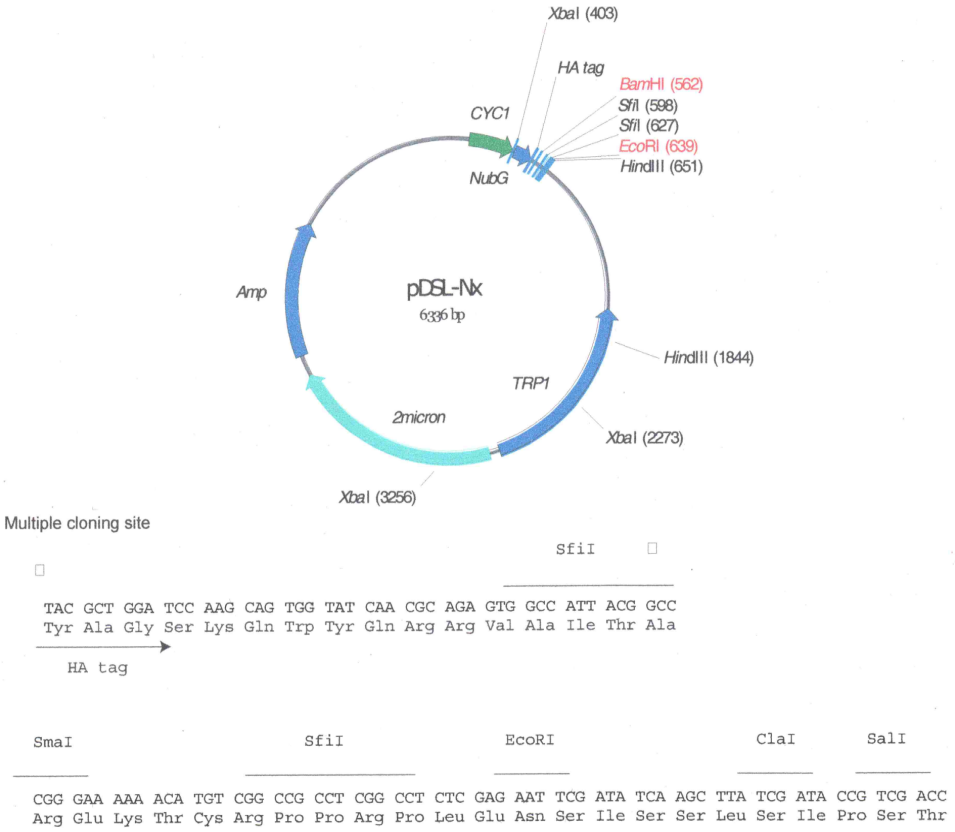


Abb. II-6: pDSL-Nx (www.dualsystems.com)

pGEX-3X

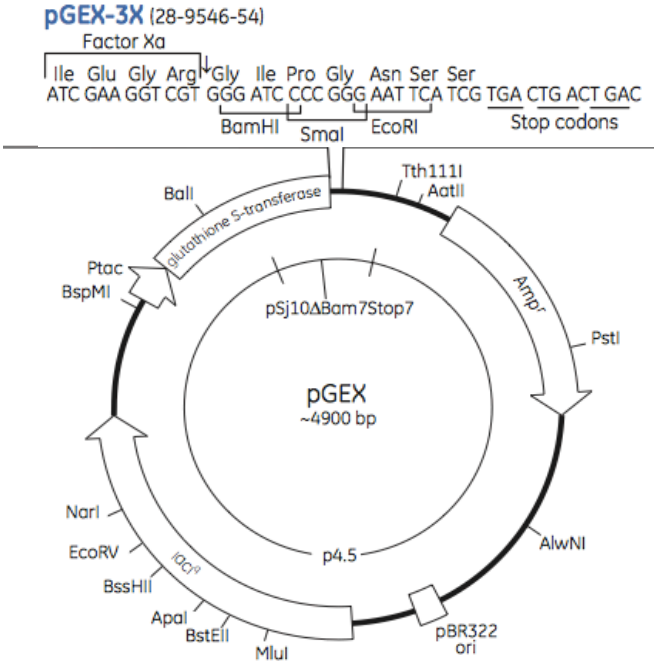


Abb. II-7: pGEX-3X (www.fishersci.ca)

pMAL-c2X

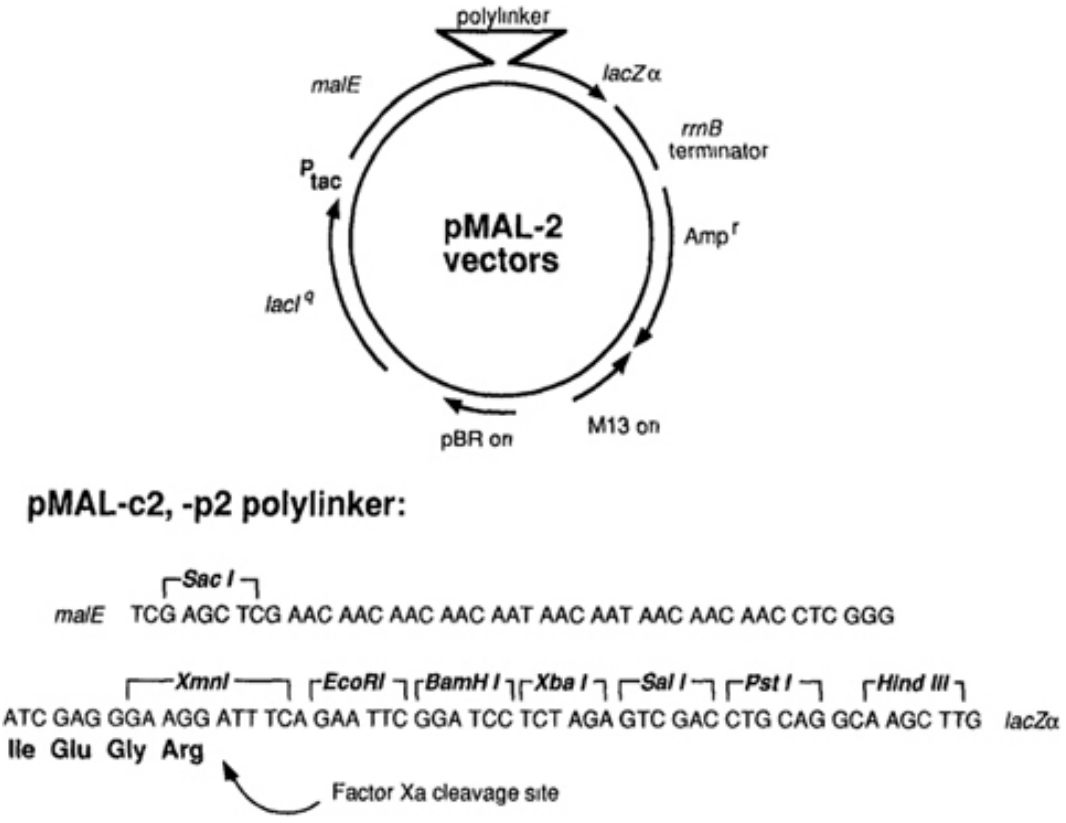
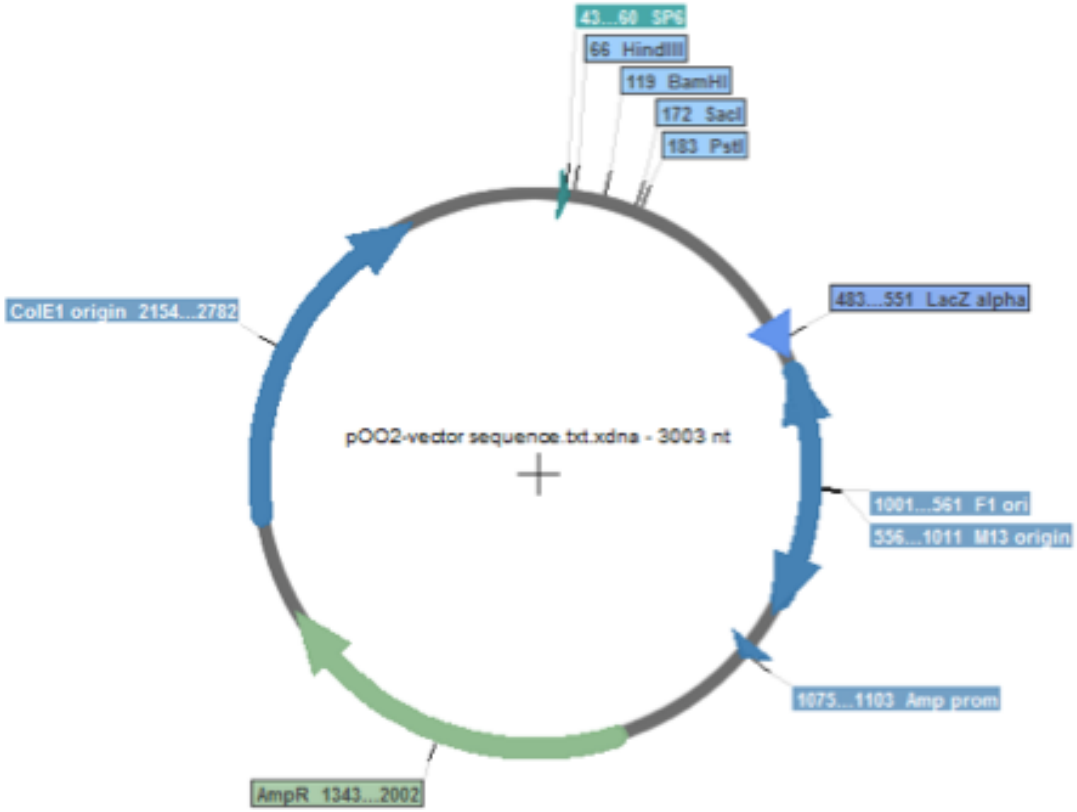


Abb. II-8: pMAL-c2X (link.springer.com)

pOO2




```
                                                                                  Sma1
                                                                                Apa1 |   Spe1
Hind3                 SpAcc   polyA                   BamH1 PspOM   | | Hpa1 |
    |                     |       |                       |     |   | |    | |
    aagcttgcttgttcttttgcagaagctcagaataaacgctcaactttggcagggatccgggccccgggttaact
 1  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+----- 75
    ttcgaacgaacaagaaaaacgtcttcgagtcttatttgcgagttgaaaccgtccctaggcccggggcccaattga

                                                                 BstE2
                                                                Kpn1 |
                                                Bgl2           Age1| |
                          Nco1            Sac1  |        Acc65  || |
      EcoR1       EcoRV  |            Xho1|  |      Pvu2  |  || |
   Xba1   |   Cla1   |  | Sal1      Ecl2||  |     Pst1|  |  || |
      |   |      |   |  |    |         |||  |        ||  |  || |
    agtctagaattcatcgatatccatggtcgacgagctcgagatctgcagctggtaccggttacca
76  ----+---------+---------+---------+---------+---------+--------- 139
    tcagatcttaagtagctataggtaccagctgctcgagctctagacgtcgaccatggccaatggt
```

Abb. II-9: pOO2 (Sequenz, LUDEWIG *et al.*, 2002)

pTAK35S

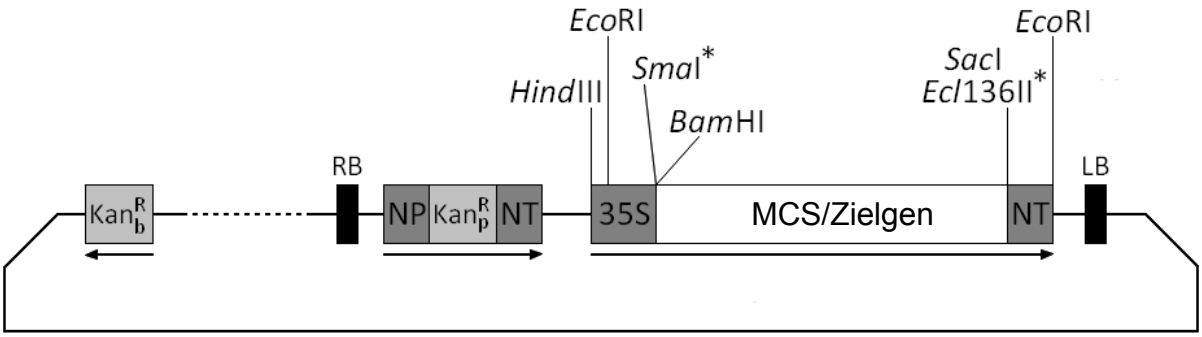


Abb. II-10: pTAK35S (verändert nach SCHÖRG, 2013)

pK7FWG2C

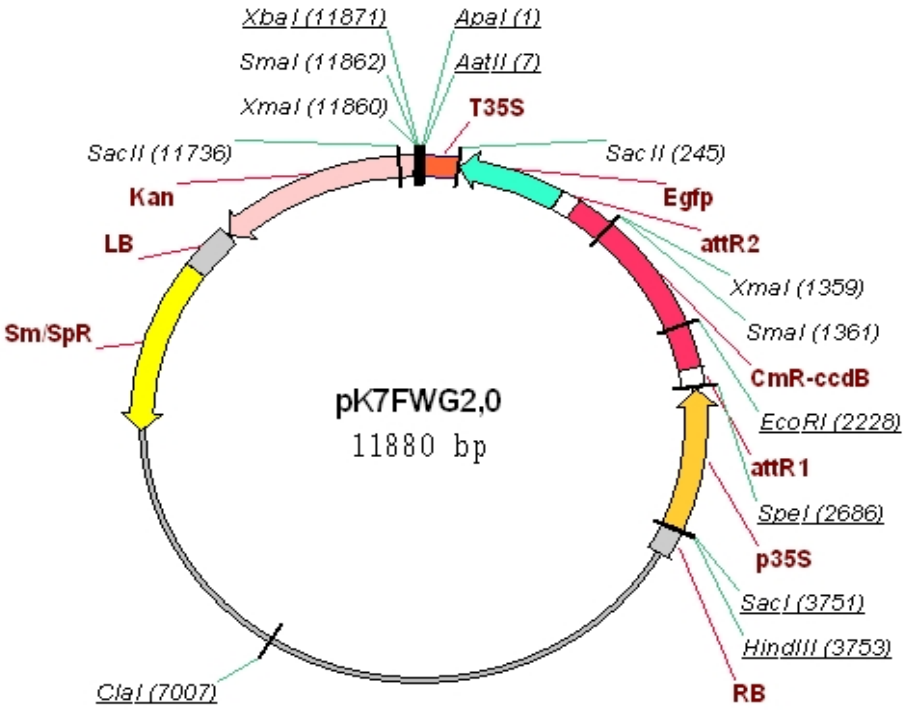


Abb. II-11: pK7FWG2C (www.lenaturaliste.net)

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name:	Eva Katharina Glink, geb. Heim
Geburtsdaten:	26.07.1984 in Neuenbürg
Familienstand:	Verheiratet
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Akademischer Werdegang

Seit 01/2011	Promotion am Institut für Genetik, Fachgebiet: Allgemeine Virologie; Universität Hohenheim, Stuttgart (Gesamtnote: magna cum laude)
10/2005 – 09/2010	Studium der Agrarbiologie, Fachrichtung Biotechnologie (Diplom) an der Universität Hohenheim, Stuttgart (Gesamtnote: sehr gut)
09/2001 – 06/2004	Johanna-Wittum Schule Pforzheim, Biotechnologisches Gymnasium; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Tätigkeiten

06/2011 – 06/2014	Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte am Institut für Genetik, Fachgebiet: Allgemeine Virologie; Universität Hohenheim, Stuttgart
10/2010 – 05//2011	Tätigkeit als geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Genetik, Fachgebiet: Allgemeine Virologie; Universität Hohenheim, Stuttgart
09/2010 – 11/2010	Tätigkeit als geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart
03/2010 – 09/2010	Praktikum am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart Abteilung: Molekulare Biotechnologie

03/2008 – 12/2009	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Botanik, Fachgebiet: Biodiversität und pflanzliche Interaktion; Universität Hohenheim, Stuttgart

Zusatzqualifikationen

- Erwerb des Projektleiterscheins gem. §15 GenTSV für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit
- Brandschutzausbildung mit Feuerlöschtraining
- Workshop „Wissenschaftsjournalismus“ beim Verlag Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg

Tagungsbeiträge

Glink EK, Fischer K, Neuhäuser B, Ludewig U, Pfitzner AJP (2014).
AQUAPORIN INTERACTING PROTEIN (AQI), a new regulator of cell death in plants.
25th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR), University of British Columbia, Vancouver, Canada, Juli 2014, Posterpräsentation.

Glink EK, Fischer K, Neuhäuser B, Ludewig U, Pfitzner AJP (2014).
AQUAPORIN INTERACTING PROTEIN (AQI), a new regulator of cell death in plants.
7th Regio Plant Science Meeting, Universität Hohenheim, Februar 2014, Posterpräsentation.

Glink EK, Hoch T, Pfitzner AJP (2012).
AQUAPORIN INTERACTING PROTEIN 1 (AQI1), a new player in the regulation of cell death in plants.
6th Regio Plant Science Meeting, Universität Tübingen, Oktober 2012, Posterpräsentation.

Danke

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Artur Pfitzner für die Betreuung meiner Promotion sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Für seine uneingeschränkte Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die unzähligen Gespräche und Diskussionen und die wissenschaftlichen Freiräume die mir gelassen wurden, bedanke ich mich herzlich.

Herrn Prof. Dr. Uwe Ludewig vom Institut für Kulturpflanzenwissenschaften, Fg. Ernährungsphysiologie der Kulturpflanze der Universität Hohenheim danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit, sowie für die sehr gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit bestimmte Teilgebiete dieser Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.
In diesem Zusammenhang danke ich auch ganz besonders Herrn Dr. Benjamin Neuhäuser des Instituts für Kulturpflanzenwissenschaften für seine tatkräftige Unterstützung, seine große Hilfsbereitschaft und die vielen fachlichen Ratschläge, welche die vorliegende Arbeit zweifelsohne bereichert haben.

Darüber hinaus danke ich allen heutigen und ehemaligen Mitarbeitern der „Allgemeinen Virologie“ für das sehr angenehme und positive Arbeitsklima.
Margarita Panarowski und Karla Fischer danke ich für ihre Unterstützung und Hilfestellung bei der Durchführung einiger Experimente meiner Arbeit. Besonderen Dank möchte ich hier auch Ingrid Prießnitz-Hohos und Christine Arnold aussprechen, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Meiner lieben Kollegin Ingrid danke ich außerdem für unzählige angenehme Mittagspausen, in denen sie immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte parat hatte.

Von ganzem Herzen danke ich meiner lieben Katha dafür, dass sie mir immer zur Seite steht und ich immer auf sie zählen kann. Außerdem danke ich ihr, meiner Freundin Karin, meiner Mama und Jürgen für das kritische Lesen dieser Arbeit und die guten und kompetenten Ratschläge.
Meinem Mann Alex danke ich von ganzem Herzen für den bedingungslosen Rückhalt und sein Verständnis in all meinen Gemütslagen.
Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mir mein Studium und somit auch diese Promotion durch ihre großzügige Unterstützung erst ermöglicht hat und stets hinter mir stand.