

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arabidopsis thaliana unter Wasserstress:
Transkriptionsprofile der *MIP*-Familie und von Genen aus
dem Stress- und Sekundärstoffwechsel

Matthias Affenzeller

aus

Linz/OÖ

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von PD Dr. Anton R. Schäffner betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 31.10.2003

(Matthias Affenzeller)

Dissertation eingereicht am 31.10.2003

1. Gutachter: PD Dr. Anton R. Schäffner

2. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Cramer

Mündliche Prüfung am 8.12.2003

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die MIP-Familie.....	1
1.1.1 MIPs in Pflanzen.....	3
1.1.1.1 Wasserflüsse in der Pflanze.....	4
1.1.1.2 Verteilung von MIPs in der Pflanze und daraus resultierende mögliche Funktionen.....	5
1.1.1.3 MIPs bei Wasserstress.....	6
1.2 Wasserstress: Pflanzen unter Salz- und Trockenstress.....	8
1.2.1 Stress-Adaption bei Wasserstress.....	8
1.2.2 Signaltransduktion bei Wasserstress.....	9
1.2.3 Transkriptionelle Regulation bei Wasserstress.....	10
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2 MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1 Geräte.....	13
2.2 Chemikalien, Enzyme und Molekularbiologische „Kit“-Systeme.....	13
2.2.1 Feinchemikalien.....	13
2.2.2 Radiochemikalien.....	14
2.2.3 Enzyme.....	14
2.2.4 Molekularbiologische „Kit“-Systeme.....	14
2.3 Häufig verwendete Lösungen.....	15
2.4 Materialien.....	15
2.5 Verwendete Organismen.....	16
2.5.1 Bakterien.....	16
2.5.2 Pflanzen.....	16
2.6 Mikrobiologische Methoden.....	16
2.6.1 Herstellung von kompetenten Zellen mit Hilfe von RbCl.....	16
2.6.2 Bestimmung der Transformations-Effizienz der kompetenten Zellen.....	17
2.6.3 Transformation von RbCl-kompetenten Zellen.....	17
2.7 Anzucht der Pflanzen.....	17
2.7.1 Anzucht auf Erde.....	17
2.7.2 Anzucht in hydroponischer Kultur.....	17
2.7.2.1 NaCl- bzw. Sorbitolstress bei hydroponisch gewachsenen Pflanzen.....	18
2.7.3 Anzucht auf MS-Agar.....	19
2.7.4 Anzucht in Schüttelkulturen.....	19
2.7.5 Sterilisieren von Samen.....	19
2.7.6 Trockengewichtsbestimmung.....	19
2.8 Methoden zur Nukleinsäurechemie.....	19
2.8.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	19
2.8.1.1 DNA-Minipräparation.....	19
2.8.1.2 Isolierung von genomischer DNA.....	20
2.8.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>A. thaliana</i>	21

2.8.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe von LiCl	21
2.8.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy® Plant Mini Kits (Qiagen).....	21
2.8.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.8.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	22
2.8.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	22
2.8.6	Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pGEM®-T Easy (Promega)	22
2.8.7	Restriktionsverdau von genomischer DNA	22
2.8.8	Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen	22
2.8.9	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	23
2.8.10	Semi-quantitative RT-PCR	23
2.8.11	Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	25
2.9	Kreuzhybridisierung von homologen Genen.....	25
2.10	Der DNA-Microarray	26
2.10.1	Herstellung von Gen-spezifischen Sonden.....	26
2.10.2	Amplifizierung der 3'-UTR-Sonden zum Aufbringen auf die Membran.....	27
2.10.3	Übertragung der 3'-UTR-Sonden auf die Membran	28
2.10.4	Vorbereitung der Filter für die Hybridisierungen.....	29
2.10.5	Referenzhybridisierung der Membranen mit dem Oligonukleotid T7	30
2.10.6	Komplexe Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA.....	31
2.10.7	Auswertung der Signale am DNA-Microarray.....	32
2.11	Isolierung von Insertionsmutanten.....	33
2.11.1	Die <i>pip2;1</i> -Mutante	33
2.11.1.1	Isolierung einer Insertionsmutante im <i>PIP2;1</i> -Gen.....	34
2.11.1.2	Bestimmung der genauen Insertionsstelle von <i>En-1</i> in der <i>pip2;1</i> -Mutante	34
2.11.1.3	Southern-Analyse zur Bestimmung der Anzahl an <i>En-1</i> -Elementen in der <i>pip2;1</i> - Mutante ...	35
2.11.1.4	Auskreuzen von <i>En-1</i> -Elementen aus der <i>pip2;1</i> -Mutante	36
2.11.2	Die <i>pip1;4</i> -Mutante	37
2.11.2.1	Erzeugung homozygoter <i>pip1;4</i> -Mutanten.....	38
2.12	Statistische Analysen.....	39
2.13	Internetseiten.....	39
3	ERGEBNISSE.....	40
3.1	Etablierung eines DNA-Microarrays zur Untersuchung von Transkripten in <i>A. thaliana</i>	40
3.1.1	Erstellen von Gen-spezifischen Sonden für alle in <i>A. thaliana</i> vorhandenen <i>MIPs</i>	40
3.1.2	Qualifizierung der Gen-spezifischen Sonden	41
3.1.2.1	Computergestützte Qualifizierung der Sonden.....	41
3.1.3	Vergleich einer 3'-UTR-Sonde mit der entsprechenden cDNA-Sonde.....	44
3.2	<i>MIP</i>-Transkripte in Organen und Keimlingen von <i>A. thaliana</i>	44
3.3	Transkriptionsprofile unter Salz- und Sorbitolstress	48
3.3.1	Verhalten der <i>MIPs</i> unter Salz- und Sorbitolstress	48
3.3.2	Unterschiede und Übereinstimmungen in der Reaktion von <i>A. thaliana</i> auf NaCl- und Sorbitolstress mittels bekannter Stress-Markergene sowie Gene des Sekundärmetabolismus.....	52
3.3.2.1	Überlappende Reaktionen in <i>A. thaliana</i> unter NaCl- bzw. Sorbitolstress.....	56
3.3.2.2	Spezifische Reaktionen in <i>A. thaliana</i> unter NaCl- bzw. Sorbitolstress	57
3.4	Insertionsmutanten	58
3.4.1	Die <i>pip2;1</i> -Insertionsmutante.....	59
3.4.1.1	Charakterisierung der <i>pip2;1</i> -Mutante auf genomischer Ebene.....	59
3.4.1.2	Habitus-Vergleich und Bestimmung des Verhältnisses Blatt- zu Wurzel-Trockenmasse bei der <i>pip2;1</i> -Mutante und dem Wildtyp (Col-R).....	61
3.4.1.3	Transkriptionsprofile der <i>pip2;1</i> -Mutante im Vergleich zum <i>PIP2;1</i> -Wildtyp	62
3.4.1.4	Vergleich der Transkriptionsprofile in der <i>pip2;1</i> -Mutante und im <i>PIP2;1</i> -Wildtyp bei NaCl-Stress	64

3.4.2	Die <i>pip1;4</i> -Insertionsmutante.....	66
3.4.2.1	Identifikation der <i>pip1;4</i> -Mutante auf genomischer Ebene.....	66
3.4.2.2	Transkriptionsprofile in der <i>pip1;4</i> -Mutante im Vergleich zum <i>PIP1;4</i> -Wildtyp	66
4	DISKUSSION.....	69
4.1	Spezifität der verwendeten 3'-UTR-Sonden zur Unterscheidung homologer <i>MIP</i> -Gene.....	69
4.2	Organ-spezifische Expression der <i>MIPs</i> in <i>A. thaliana</i>	71
4.2.1	<i>MIP</i> -Expression in verschiedenen Organen der adulten <i>A. thaliana</i> Pflanze.....	71
4.2.2	Fazit der Organ-spezifischen Expressions-Analyse	75
4.2.3	<i>MIP</i> -Expression in Keimlingen.....	76
4.3	Reaktion der <i>MIPs</i> auf Wasserstress.....	77
4.3.1	Transkriptionsänderungen von <i>MIPs</i> bei NaCl- und Sorbitolstress	77
4.3.1.1	Vergleich der beiden Stressoren NaCl und Sorbitol anhand der <i>MIP</i> -Induktions- bzw. Repressionsprofile	77
4.3.1.2	Frühe Induktion von <i>MIPs</i> bei Wasserstress	79
4.3.2	Beteiligung von Aquaporinen bei Wasserstress	79
4.3.2.1	Wurzel.....	80
4.3.2.2	Blatt.....	82
4.4	Reaktion von <i>A. thaliana</i> auf NaCl- bzw. Sorbitolstress anhand von transkriptionellen Änderungen bekannter Stress-Markergene sowie von Genen des Sekundärmetabolismus.....	85
4.4.1	Reaktion der Pflanze auf NaCl- bzw. Sorbitolstress	85
4.4.2	Überlappende Reaktionen in <i>A. thaliana</i> auf NaCl- und Sorbitolstress	86
4.4.3	Spezifische Reaktionen in <i>A. thaliana</i> auf NaCl- bzw. Sorbitolstress.....	88
4.4.4	Fazit der Transkriptionsänderungen von Stress-regulierten Genen und Genen des Sekundärmetabolismus.....	90
4.5	Insertionsmutanten	90
4.5.1	Die <i>pip2;1</i> -Mutante	90
4.5.2	Die <i>pip1;4</i> -Mutante.....	92
4.6	Ausblick	92
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
6	LITERATUR.....	96
7	ANHANG.....	110
7.1	Oligonukleotide	110
7.1.1	Oligonukleotide zur Amplifikation der 3'-UTR-Sonden (5' nach 3').....	110
7.1.2	Oligonukleotide für die semi-quantitative RT-PCR (5' nach 3')	111
7.1.3	Oligonukleotide zur Identifikation der Insertionsmutanten (5' nach 3')	111
7.1.4	Oligonukleotide für die DNA-Microarray-Herstellung.....	111
7.1.5	Oligonukleotide zur Herstellung einer <i>TIP1;1</i> -Probe	111
7.2	Expression von <i>NIP3;1-PG</i>	112
7.3	Genlisten der Venn-Diagramme	113
7.4	Reaktionen von SODs auf NaCl- und Sorbitolstress.....	123
DANKSAGUNG.....	124	
LEBENS LAUF.....	125	

Abkürzungsverzeichnis

(ohne SI-Einheiten)

35S	35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus
ABA	Abscisinsäure
ABC-Transporter	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette Transporter
ABRE	<u>a</u> bscisic acid- <u>r</u> esponsive <u>e</u> lement
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
Col-R	<i>A. thaliana</i> Ökotyp Col-R
cRNA	komplementäre RNA
CYP	Cytochrom P450-Monooxygenase
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DRE	<u>d</u> ehydration- <u>r</u> esponsive <u>e</u> lement
<i>Ds</i>	Transposon aus Mais
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>En-1</i>	autonomes Transposon aus Mais
EST	<u>e</u> xpressed <u>s</u> equences <u>t</u> ag
GLP	<u>g</u> ermin- <u>l</u> ike <u>p</u> rotein
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	β-Glucuronidase
kb	Kilobasenpaare
<i>Ler</i>	<i>A. thaliana</i> Ökotyp Landsberg <i>erecta</i>
<i>L_p</i>	hydraulische Leitfähigkeit
<i>MIP</i>	<u>m</u> ajor <u>i</u> ntrinsic <u>p</u> rotein; das Gen oder seine Transkripte
MIP	<u>m</u> ajor <u>i</u> ntrinsic <u>p</u> rotein; das Protein oder seine Aminosäuresequenz
MIPS	<u>M</u> unich <u>I</u> nformation <u>C</u> enter for <u>P</u> rotein <u>S</u> equences
mRNA	<u>m</u> essenger RNA
MS	Murashige und Skoog
NIP	<u>N</u> OD26- <u>l</u> ike <u>i</u> ntrinsic <u>p</u> rotein
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP	<u>p</u> lasma membrane <u>i</u> ntrinsic <u>p</u> rotein
<i>P_{os}</i>	osmotische Wasserpermeabilität
PR-Protein	<u>p</u> athogenesis- <u>r</u> elated <u>p</u> rotein
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RT-PCR	<u>r</u> everse <u>t</u> ranscription-PCR
SIP	<u>s</u> mall <u>b</u> asic <u>i</u> ntrinsic <u>p</u> rotein
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TIP	<u>t</u> onoplast <u>i</u> ntrinsic <u>p</u> rotein
U	Unit
UGT	UDP-Glycosyltransferase
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierter Bereich
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Die MIP-Familie

Major intrinsic proteins (MIPs) sind eine Gruppe von Transport-Proteinen, die ubiquitär in Archaea, Pro- und Eukaryoten zu finden sind. Namengebend ist MIP26, ein Protein aus Zellen von Rinder-Linsen (Gorin et al., 1984). Lange Zeit konnte man diesen Proteinen keine Funktion zuordnen, auffallend war ihre Abundanz in den Membranen bestimmter Zellen. Erst 1992 konnten Preston et al. mit Hilfe einer heterologen Expression von CHIP28 (heute AQP1), einem Protein aus der Erythrozyten-Membran in *Xenopus* Oozyten zeigen, dass dieses MIP-Mitglied am Transport von Wasser über Biomembranen beteiligt ist. Viele weitere MIP-Mitglieder wurden bis *dato* als Aquaporine identifiziert (z.B. Baiges et al., 2002, Kozono et al., 2003).

Im Vergleich zur Diffusion von Wasser über die Lipid-Doppelschicht von Biomembranen besitzt der Protein-vermittelte Wassertransport einige spezifische Charakteristika:

- (i) Eine hohe Wasserpermeabilität ($P_{os} > 50-100 \mu\text{m/s}$) im Vergleich zur geringeren Wasserpermeabilität von etwa $10 \mu\text{m/s}$ einer Lipid-Doppelschicht ohne Aquaporine,
- (ii) eine geringe Arrhenius-Aktivierungsenergie E_a (geringe Temperatur-Abhängigkeit) von $17-25 \text{ kJ mol}^{-1}$, vergleichbar mit der Diffusion von H_2O -Molekülen in Wasser,
- (iii) einen im Verhältnis zum osmotischen Wasserpermeabilitätskoeffizienten P_{os} geringeren diffusiven Wasserpermeabilitätskoeffizienten P_d (Wasserpermeabilität ohne osmotischen und/oder hydrostatischen Gradienten über die Membran) und
- (iv) eine reversible Inhibierung des Wassertransports durch Quecksilber-Verbindungen. Da Quecksilber unspezifische Effekte auf den Metabolismus lebender Zellen hat, ist dessen Einsatz bei der Messung von Aquaporinaktivitäten allerdings etwas umstritten (Tyerman et al., 1999).

Da Wasser ein ungeladenes Molekül ist und sein Transport über Membranen keine Ladungsverschiebung verursacht, sind Techniken wie z.B. die *Patch Clamp*-Methode, ungeeignet zur Messung der Aquaporinaktivität. Ein bis heute häufig verwendetes System zur Bestimmung der osmotischen Wasserpermeabilität ist die heterologe Expression von MIPs in *Xenopus* Oozyten. Dabei werden cRNAs von MIPs in Oozyten injiziert und diese in ein hypotonisches Medium überführt. Anhand der Zeit-abhängigen Schwellung der Oozyten kann so P_{os} bestimmt werden. Auch an Protoplasten und Vesikeln kann P_{os} über eine Messung von Volumenänderungen (z.B. *light scattering*; Verkman, 1995) bestimmt werden. Für Pflanzenzellen, die im Gegensatz zu tierischen Zellen eine Zellwand besitzen, kann die hydraulische Leitfähigkeit (L_p) einzelner Zellen im Gewebe mit Hilfe der Zelldruck-Sonde gemessen werden (Steudle, 1993). Dabei wird eine mit Öl gefüllte Glaskapillare, die an einen Druckwandler angeschlossen ist, in die Zelle eingeführt. Mittels rascher Verschiebung des Öl/Zellsaft-Meniskus wird ein Druck appliziert. Über die Druck- und Volumenänderung kann die Elastizität der Zellwand bestimmt werden. Zusammen mit weiteren Parametern (z.B. der Halbwertszeit der Druckrelaxation bei konstantem Volumen und Verhältnis der Zelloberfläche zum Zellvolumen) kann so L_p bestimmt werden.

Einige MIP-Mitglieder sind zudem in der Lage kleine, ungeladene Moleküle wie z.B. Glycerin, Harnstoff, Formamid, etc. zu transportieren. Zu diesen MIP-Proteinen zählen unter anderem die menschlichen MIP-Mitglieder AQP3, AQP7 und AQP9 (Agre et al., 1998), GlpF, ein Glycerin-Transporter aus *E. coli* (Heller et al., 1980), als auch das pflanzliche NOD26, ein in der Peribakteroidmembran der Sojabohne lokalisiertes MIP-Mitglied (Rivers et al., 1997). Aus diesem Grund wurde die MIP-Familie in zwei funktionelle Gruppen, nämlich spezifische Wasserkanäle (Aquaporine) und Transporter, die kleine ungeladene Moleküle und/oder nicht Wasser transportieren (Glycerin-Transporter; Aquaglyceroporine) eingeteilt (Agre et al., 1998; Froger et al., 1998; Park und Saier, 1996). Von der phylogenetischen Perspektive scheint diese Einteilung allerdings etwas vereinfacht zu sein, und Zardoya und Villalba (2001) teilten die untersuchten 153 MIP-Proteine in 6 paraloge Gruppen ein: (1) GLPs (Glycerin-transportierende Kanäle), (2) AQPs (Aquaporine), (3) PIPs (*plasma membrane intrinsic proteins* aus Pflanzen), (4) TIPs (*tonoplast intrinsic proteins* aus Pflanzen), (5) NODs (NOD26-ähnliche Proteine aus Pflanzen) und (6) AQP8s (AQP8s aus Metazoa). AQPs, PIPs und TIPs wiederum scheinen phylogenetisch nahe verwandt zu sein.

Obgleich die Homologie der Aminosäuresequenzen einzelner MIP-Mitglieder weniger als 20 % beträgt (Froger et al., 1998), besitzen MIPs einige hoch konservierte Bereiche. Dazu zählen ein AEF-Motiv (Ala-Glu-Phe) in der N-terminalen Domäne sowie zwei NPA-Motive (Asp-Pro-Ala) im Zentrum und der C-terminalen Domäne (Zardoya und Villalba, 2001). Die Aminosäuresequenzen der MIPs bestehen aus zwei um 180° in Bezug zur Membran gedrehten Hälften und lassen auf interne Duplikationsereignisse schließen (Reizer et al., 1993). Jung et al. (1994) schlugen aufgrund elektronenmikroskopischer Studien ein 3-dimensionales Modell der MIPs vor („Sanduhr-Modell“): MIPs bestehen aus 6 transmembranen α -Helices, die über 5 Schleifen miteinander verbunden sind. Die Schleifen B und E, auf denen sich die beiden NPA-Motive befinden, tauchen in die Membran und bilden einen Kanal, durch den die Wassermoleküle perlschnurartig permeieren. Vier Monomere bilden ein tetrameres Aggregat, wobei jedes Monomer in der Lage ist, Wasser zu transportieren. Dieses „Sanduhr-Modell“ wurde durch elektronenkristallografische Methoden anhand von AQP1 bestätigt (Murata et al., 2000). Die Autoren geben auch eine mögliche Erklärung dafür, warum Protonen nicht transportiert werden: Protonen können entlang von Wasserstoffbrücken zwischen Wassermolekülen wandern (Grothuss-Mechanismus; Agmon, 1995). Beim Durchtritt des Wassermoleküls durch die Aquaporin-Pore bildet das Sauerstoff-Atom mit den Asn-Resten der NPA-Motive alternativ Wasserstoffbrücken und die daraus folgende Umorientierung des Wassermoleküls verhindert die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrücken mit anderen Wassermolekülen. Durch die Unterbrechung der Wasserstoffbrücken zwischen den Wassermolekülen können keine Protonen mehr daran entlang wandern. Auch für einen Glycerin-Transporter, GlpF aus *E. coli* wurde mittels röntgenkristallografischer Methoden ein atomares Bild erstellt, und dieses zeigt große Ähnlichkeiten mit der Struktur von AQP1 (Fu et al., 2000). Unterschiede sind vornehmlich innerhalb der Pore im Bereich der NPA-Motive zu finden, die bei GlpF weiter ist und den Durchtritt des im Vergleich zum Wassermolekül größeren Glycerinmoleküls ermöglicht.

1.1.1 MIPs in Pflanzen

Das erste Aquaporin (TIP1;1) wurde von Maurel et al. (1993) in *A. thaliana* identifiziert. Auch in der Plasmamembran konnten in unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal MIPs (PIPs; *plasma membrane intrinsic proteins*) mit wassertransportierenden Eigenschaften identifiziert werden (Kammerloher et al., 1994). Anhand fortschreitender Sequenzierprojekte stellte sich bald heraus, dass Pflanzen eine große Anzahl *MIP*-ähnlicher Gene in ihren Genomen besitzen. In Mammalia wurden bis *dato* 10 MIPs gefunden, in *A. thaliana* sind es 38 *MIP* und *MIP*-ähnliche Sequenzen. In Abb. 1.1 sind die 35 MIP-Proteine aus *A. thaliana* Ökotyp Columbia (ohne Pseudo-Gene) aufgrund ihrer Sequenz-Homologien in einem Dendrogramm dargestellt.

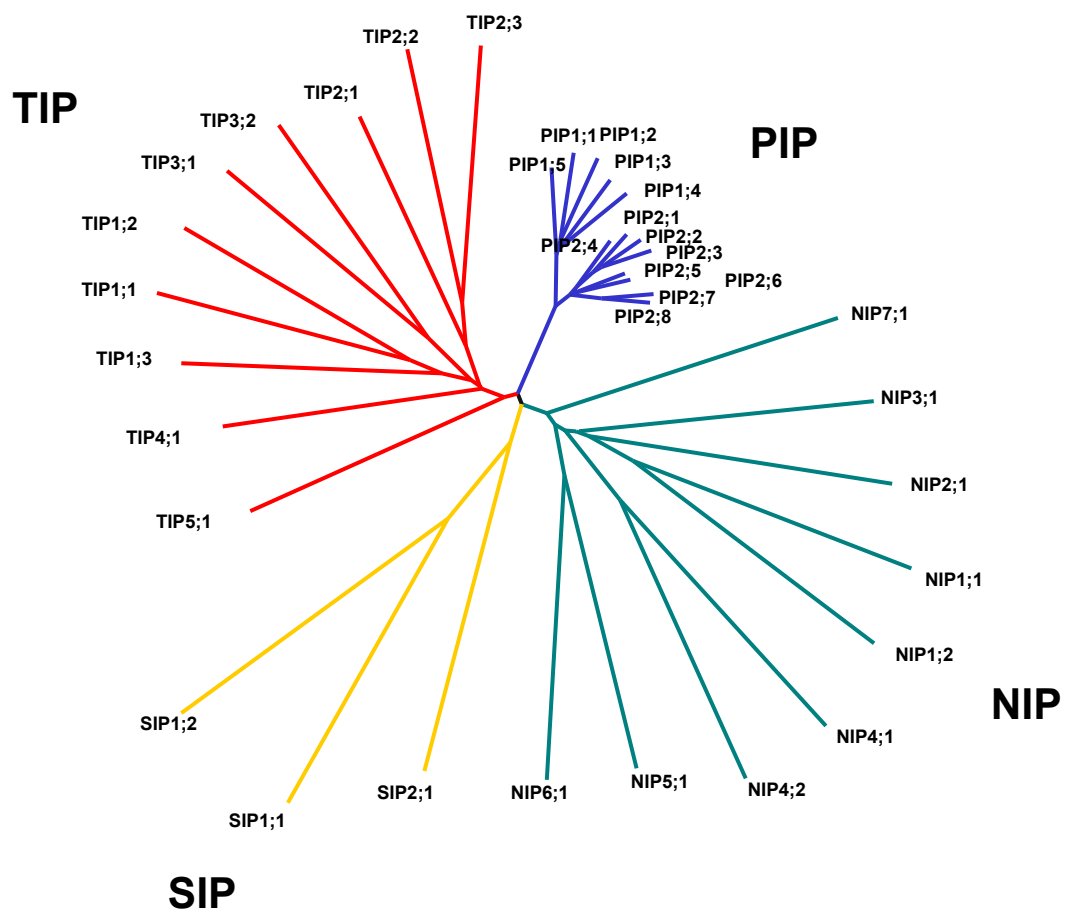


Abb. 1.1: Wurzelloses Dendrogramm der 35 *A. thaliana* MIP-Proteine. PIP, TIP, SIP und NIP kennzeichnen die 4 Subfamilien. Der Baum wurde mit Hilfe der Programme Vector-NTI Suit 6 (Informax) und TreeView (Page, 1996) erstellt. Der Balken beschreibt die Zahl an Austauschen pro Aminosäure.

Die MIP-Familie in *A. thaliana* spaltet sich in 4 Subfamilien auf. Die meisten Mitglieder (13) besitzt die PIP-Subfamilie. Die PIPs spalten sich wiederum in zwei Gruppen, PIP1 und PIP2 auf (Schäffner, 1998). Die Mitglieder der PIP-Subfamilie sind auch die am höchsten homologen Mitglieder der *A. thaliana* MIPs und scheinen erst relativ spät durch Gen-Duplikationen entstanden zu sein. Bei den PIP-Mitgliedern sind zudem die Intron-Positionen hoch konserviert (Baiges et al., 2002).

TIPs (*tonoplast intrinsic proteins*) sind im Tonoplast lokalisiert. Diese MIP-Subfamilie zählt 10 Mitglieder. Im Vergleich zu den PIPs besitzen TIPs einen kürzeren N-terminalen Bereich (Schäffner, 1998).

NIPs (*NOD26-like intrinsic proteins*) besitzen eine große Homologie zu einem MIP-Mitglied aus der Sojabohne, das in der Peribakteroidmembran sitzt und neben Wasser auch für Glycerin permeabel ist (Rivers et al., 1997, Dean et al., 1999). Bis *dato* ist allerdings noch nicht bekannt, wo innerhalb der Zelle die *A. thaliana* NIPs lokalisiert sind.

Die SIPs (*small basic intrinsic proteins*; Johanson und Gustavsson, 2002) sind eine relativ kleine Gruppe mit 3 Mitgliedern. Auch für die SIPs sind bis *dato* noch keine Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation beschrieben worden, außerdem noch keine Transport-Studien veröffentlicht. Aufgrund ihrer Homologie zu GlpF aus *E. coli* könnten diese MIPs am Transport anderer Moleküle als Wasser beteiligt sein.

PIPs, TIPs, NIPs und SIPs wurden in einer Vielzahl an Pflanzen-Spezies beschrieben, sodass davon ausgegangen werden kann, dass in den meisten Pflanzen diese 4 Subfamilien zu finden sind.

1.1.1.1 Wasserflüsse in der Pflanze

Pflanzen nehmen Wasser über die Wurzeln auf und transportieren es über das Xylem in die oberirdischen Organe. Die Abgabe des Wassers erfolgt über die Transpiration durch die Stomata. Innerhalb der Gewebe kann Wasser über verschiedene Wege transportiert werden:

- (i) extrazellulär über den Apoplasten,
- (ii) symplastisch über Plasmodesmata bzw.
- (iii) transzellulär über die Plasmamembran bzw. den Tonoplast durch das Zytosol bzw. die Vakuole (Steudle et al., 1993; Steudle, 1994).

Der symplastische und transzelluläre Wassertransport wird als Zell-Zell-Transport zusammengefasst. Hydrostatische bzw. osmotische (Druck-) Gradienten bestimmen dabei den Fluss von Wasser in der Pflanze. Sowohl osmotische als auch hydrostatische Gradienten sind die treibenden Kräfte des Wasserflusses über die Zellmembranen. Da der Reflexions-Koeffizient im Apoplasten gering ist (das heißt, der Apoplast diskriminiert nicht zwischen Wasser und gelösten Stoffen) und dadurch keine osmotischen Gradienten aufgebaut werden können, bestimmen fast ausschließlich hydrostatische Gradienten den Wasserfluss im Apoplasten (Steudle und Peterson, 1998).

Viele Untersuchungen von Wasserflüssen in der Pflanze wurden an Wurzeln durchgeführt. Dabei wurde vielfach beobachtet, dass die Wasserleitfähigkeit von Wurzeln (L_p) bei Tag und Nacht variiert. Die physiologische Bedeutung dieser Änderungen mag folgendermaßen begründet sein: Bei Tag generiert die Transpiration hohe Spannungen im Wurzel-Xylem und damit große Gradienten im Wasserpotenzial über den Wurzel-Zylinder. Diese Gradienten ermöglichen zusammen mit einer zu diesem Zeitpunkt hohen Wasserpermeabilität der Wurzel einen starken radialen Wasserfluss vom Boden zu den wasserführenden Gefäßen in der Stele. In der Nacht, bei geringer Transpirationsrate, sinken hydraulische (Druck-) Gradienten über dem Wurzel-Zylinder. Gradienten im Wasserpotenzial können dabei umgekehrt werden bzw.

nicht-hydraulischer Natur (z.B. osmotisch) sein. Unter diesen Bedingungen ist die Wasserleitfähigkeit der Wurzel gering. Damit scheint die Pflanze einem Rückfluss von Wasser in den Boden entgegenzuwirken. Dies könnte bedeuten, dass sich bei unterschiedlichen Bedingungen, abhängig von der Wasser-treibenden Kraft (hydraulisch/osmotisch) der Transportweg des Wassers (apoplastisch bzw. symplastisch/transzellulär) und die hydraulischen Leitfähigkeiten ändern (Tyerman et al., 1999).

Da Aquaporine die Wasserpermeabilitäten von Biomembranen beeinflussen, liegt die Vermutung nahe, dass sie an der Regulation der hydraulischen Leitfähigkeit beteiligt sind. Eine Korrelation zwischen einer diurnalen Änderung der Aquaporin-Expression und der Wasserleitfähigkeit von Wurzeln konnten Henzler et al. (1999) zeigen: Die L_p von *Lotus japonicus* Wurzeln verringerte sich bei Nacht. Der verminderten Wasserleitfähigkeit ging eine Repression von PIP1-Aquaporinen voran. Die Autoren vermuteten, dass eine veränderte PIP-Proteinmenge bei Nacht die hydraulische Leitfähigkeit der Wurzeln beeinflusste. Damit hätte die Pflanze die Möglichkeit, aktiv die Wasserpermeabilität der Zellmembranen und damit ganzer Organe zu regulieren, und so auf verschiedene Umweltbedingungen direkt zu reagieren.

1.1.1.2 Verteilung von MIPs in der Pflanze und daraus resultierende mögliche Funktionen

Noch bevor Mitgliedern der MIP-Familie eine genaue Funktion zugeordnet werden konnte, wurden Expressionsstudien zu diesen Proteinen durchgeführt. Bis heute sind Expressionsstudien von MIPs in mehr als 30 Pflanzen-Spezies bekannt (Maurel et al., 2002). Dabei zeigte sich, dass MIPs in allen untersuchten Organen und Geweben zu finden sind. In manchen Zellen konnte allerdings auch eine verstärkte Expression von MIPs festgestellt werden.

Dazu zählen z.B. sich vergrößernde/elongierende Zellen: MIP-Mitglieder, die in diesen Zellen gefunden wurden, sind z.B. *TIP1;1* aus *A. thaliana* (Ludevid et al., 1992), ein TIP aus Mais (Chaumont et al., 1998), So- δ TIP aus Spinat (Karlsson et al., 2000), zwei TIP-Mitglieder aus dem Rettich (Higuchi et al., 1998) und *BobTIP26-2* aus dem Blumenkohl (Barrieu et al., 1999). Die Volumenzunahme von Zellen erfolgt durch einen verstärkten Einfluss von Wasser in die Zentralvakuole. Eine starke Expression von TIPS zur Erhöhung der Wasserpermeabilität des Tonoplasten scheint dabei von zentraler Bedeutung zu sein. Es wird auch vermutet, dass in wachsenden Zellen Aquaporine an der Vakuole bei der Pufferung von osmotischen Veränderungen im Zytoplasma beteiligt sind.

Viele MIPs wurden auch in Zellen in und um das vaskuläre System gefunden: *ZmTIP1*, ein TIP-Mitglied aus Mais fand sich hauptsächlich in parenchymatischen Zellen um das Metaxylem von Wurzeln und Stängeln (Barrieu et al., 1998), SunTIP7 und 18 aus der Sonnenblume akkumulierten im Phloem von Wurzeln (Sarda et al., 1999). MIP-B, ein PIP1-Mitglied aus *Mesembryanthemum crystallinum* (Kirch et al., 2000) zeigte eine bevorzugte Expression in den parenchymatischen Zellen um das Xylem. In *A. thaliana* Blättern konnte für *PIP1;2* ebenfalls eine Expression in parenchymatischen Zellen in und um das vaskuläre System gefunden werden (Kaldenhoff et al., 1995). Arbeiten von Franck (1998) zeigen für Mitglieder aus der PIP2-Familie sowohl in Blättern als auch Wurzeln von *A. thaliana* eine verstärkte Expression in und um die Zellen des vaskulären Systems. Diese Expressionsmuster lassen darauf schließen, dass MIPs am transmembranen Wassertransport bei der Be- und Entladung des Xylems bzw. Phloems, sowie bei der kontinuierlichen Zirkulation des Wassers zwischen Xylem und Phloem beteiligt sind.

Auch in Zellen mit erheblichen Volumenänderungen wurden *MIPs* gefunden: *PIP1;2* aus *A. thaliana* (Kaldenhoff et al., 1995) sowie 2 *TIP*-Mitglieder aus der Sonnenblume (Sarda et al., 1997) wurden verstärkt in Schließzellen exprimiert. In der Mimose zeigte ein *PIP*-Mitglied eine mit der Blattbewegung korrelierende diurnale und circadiane Fluktuation im Transkriptgehalt in den bei der rhythmischen Blatt-Bewegung beteiligten Zellen (Moshelion et al., 2002).

Einige *TIPs* wurden auch als molekulare Marker für bestimmte Vakuolen-Typen (Speicher- und lytische Vakuolen) beschrieben (Jauh et al., 1999).

Für einige pflanzliche *MIPs* konnte auch gezeigt werden, dass sie permeabel für Glycerin sind. Dazu zählen *NIP*-Mitglieder aus den Leguminosen *Glycine max* (Dean et al., 1999) und *Lotus japonicus* (Guenther und Roberts, 2000). Diese sind in den Symbiosomen-Membranen lokalisiert und dürften bei der Interaktion zwischen den Rhizobien und der Pflanze eine Rolle spielen. Die genaue physiologische Funktion dieser *NIPs* im Transport von Glycerin ist aber nicht bekannt. Zwei *A. thaliana* *NIP*-Mitglieder sind ebenfalls permeabel für Glycerin und bevorzugt in Wurzeln exprimiert (Weig und Jakob, 2000b). Da von *A. thaliana* nicht bekannt ist, ob sie symbiontisch mit Rhizobien interagiert, dürften diese *NIPs* eine andere Aufgabe besitzen. Möglicherweise spielen sie eine Rolle bei hypoxischen bzw. anoxischen Bedingungen (Weig und Jakob, 2000a).

Für das menschliche *AQP1*, das u.a. in der Erythrozyten-Membran lokalisiert ist, gibt es Hinweise, dass es auch für CO_2 durchlässig ist (Prasad et al., 1998). Allerdings sprechen einige neuere Untersuchungen gegen einen *AQP1*-vermittelten CO_2 -Transport (z.B. Fang et al., 2002). CO_2 ist für Pflanzen ein essentielles Gas, aus dem sie Kohlenhydrate synthetisieren. Dabei ist *RubisCO* (*Ribulosebiphosphat-Carboxylase/Oxygenase*) das wichtigste Enzym. *RubisCO* hat eine relativ geringe Affinität zu CO_2 . Es ist daher für die Pflanze wichtig, dass dieses Gas ungehindert in die Chloroplasten gelangen kann. Untersuchungen von Uehlein et al. (2003) zeigten, dass ein Aquaporin aus Tabak (*NtAQP1*) permeabel für CO_2 ist, und die Überexpression von *NtAQP1* die Wachstumsrate der Blätter sowie die Photosyntheserate erhöhte. Damit ergeben sich Hinweise auf eine physiologische Relevanz des Aquaporin-vermittelten CO_2 -Transports in der Pflanze.

Auch für ein weiteres Gas, NH_3 , konnten Niemietz und Tyerman (2000) zeigen, dass es über Proteine durch die Peribakteroidmembran der Sojabohne permeiert. Ob es sich dabei um das untersuchte *NOD26* handelt oder um ein anders Protein, ist unklar.

1.1.1.3 MIPs bei Wasserstress

Wasser ist das wichtigste Molekül für alle Lebewesen. Als zumeist sessile Organismen in einer sich ständig ändernden Umwelt ist es für Pflanzen besonders wichtig, den Wasserhaushalt genauestens zu regulieren. Wasserstress tritt in der freien Natur hauptsächlich durch Trockenheit, hohe Salzkonzentrationen bzw. niedrige Temperaturen auf. Da *MIPs* die Wasserpermeabilität von Membranen beeinflussen, war und ist die Beteiligung der *MIPs* bei Wasserstress Ziel zahlreicher Untersuchungen. In einigen Pflanzen-Spezies, wie z.B. Mais, Paprika und *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass NaCl die hydraulische Leitfähigkeit der Wurzel vermindert (Azaizeh und Steudle, 1991; Carvajal et al., 1999; Martínez-Ballesta et al., 2003). Auch auf zellulärer Ebene konnte in Mais gezeigt werden, dass NaCl die Wasserpermeabilität senkt (Azaizeh et al., 1992). Die Annahme einer Beteiligung von Aquaporinen bei der Verminderung der hydraulischen Leitfähigkeit bei NaCl -Stress wird durch die Beobachtung von Carvajal et al. (1999) und Martínez-Ballesta et al. (2003) gestützt, dass HgCl_2 die verminderte hydraulische Leitfähigkeit von NaCl -gestressten Wurzeln nur geringfügig

beeinflusste. Johansson et al. (1996, 1998) konnten zeigen, dass PM28A, ein PIP2-Mitglied aus Spinat-Blättern unter Trockenstress dephosphoryliert und dabei inaktiviert wurde. Die Autoren vermuten, dass eine Plasmamembran-ständige Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase (CDPK) an der Aktivierung von PM28 beteiligt ist. Die Inaktivierung von PM28A könnte zu einer Verminderung der Wasserpermeabilität der Plasmamembran führen und so dem rapiden Wasserverlust entgegenwirken.

Auch auf Transkript-Ebene konnte für einige *MIP*-Mitglieder eine Repression unter Wasserstress festgestellt werden: *TIP1;1*, *TIP2;1*, *PIP2;3* (300 mM Mannitol, Keimlinge) und *NIP1;1* (300 mM NaCl, Keimlinge; Weig et al., 1997) aus *A. thaliana*, *WCP-1*, ein putatives *PIP*-Mitglied aus *Oryza sativa* (150 mM NaCl, Wurzeln; nach 7 Tagen Stress-Behandlung zeigte dieses *MIP*-Mitglied allerdings eine Induktion; Kawasaki et al., 2001), *SunTIP18* aus der Sonnenblume (Austrocknung, Wurzeln; Sarda et al., 1999) und *Cp-TIP* aus *Craterostigma plantagineum* (abgeschnittene Blätter, Austrocknung; Mariaux et al., 1998). Die Proteinmenge von MIP-F, ein TIP-Mitglied aus *Mesembryanthemum crystallinum* (200 mM NaCl, Wurzeln; Kirch et al., 2000) wurde bei Salzstress erniedrigt.

Im Gegensatz dazu wurden für manche *MIP*-Transkripte auch Induktionen unter Wasserstress beschrieben. Die *A. thaliana* *PIP*-Mitglieder *RD28* (heute *PIP2;3*; Austrocknung, ganze Pflanzen; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992; Seki et al., 2002a), *SIMIP* (*PIP2;7*), *PIP1;4* (150 mM NaCl, Keimlinge; Pih et al., 1999; Pih et al., 1997) und *PIP2;6* (Austrocknung, ganze Pflanzen; Seki et al., 2001), ein *PIP*-Mitglied aus *Hordeum vulgare* (Austrocknung, Wurzeln; Ozturk et al., 2002), *mipA* aus *Brassica oleracea* (Antheren, Austrocknung; Ruitter et al., 1997), *NeMIP1*, *NeMIP2* und *NeMIP3* aus *Nicotiana excelsior* (250 mM NaCl, Austrocknung, Blätter; Yamada et al., 1997), *Cp-PIPa6* und *Cp-PIPa2* aus *Craterostigma plantagineum* (Austrocknung, Wurzel und Blätter; Mariaux et al., 1998) sowie zwei *Oryza sativa*-*PIPs*, *OsPIP1a* und *OsPIP2a* (Austrocknung, abgeschnittene Stängel; Malz und Sauter, 1999), akkumulierten unter Wasserstress.

Die *TIP*-Mitglieder *TIP1;2* aus *A. thaliana* (150 mM NaCl, Keimlinge; Pih et al., 1999; Austrocknung, ganze Pflanzen; Seki et al., 2001), *SunTIP7* aus der Sonnenblume (Wurzeln, Austrocknung; Sarda et al., 1999) sowie *Bob-TIP26* aus dem Blumenkohl (600 mM Mannitol, Gewebeschnitte von Blüten; Barrieu et al., 1999) wurden ebenfalls durch Wasserstress induziert.

Diese Untersuchungen zeigen ein sehr komplexes Bild bei der transkriptionellen Reaktion der *MIPs* auf Wasserstress. In vielen dieser Untersuchungen wurden allerdings nur einzelne oder einige wenige *MIPs* untersucht, bzw. bei Studien mit DNA-Arrays (z.B. Kawasaki et al., 2001, Seki et al., 2002a+b, Seki et al., 2001 und Ozturk et al., 2002) wurden cDNAs als Sonden verwendet, mit denen es zu Kreuzhybridisierungen hoch homologer Transkripte kommen kann (Richmond und Somerville, 2000). Auch variierte die „Art“ des Wasserstresses in verschiedenen Studien stark. Anhand dieser Befunde wird aber deutlich, dass *MIPs* sehr spezifisch auf die Veränderungen in der Verfügbarkeit von Wasser reagieren.

Ein Pflanzen-Hormon, das vermehrt bei Wasserstress gebildet wird und Gen-Expressionen beeinflusst, ist ABA (Abscisinsäure) (Bray, 1997). Bei einigen *MIPs* konnte eine Transkriptionsänderung durch ABA gezeigt werden. Die *A. thaliana* *PIPs* *PIP1;2* (Kaldenhoff et al., 1993; Hoth et al., 2002), *PIP2;3* (Seki et al., 2002b) sowie *Cp-PIPa2* aus *Craterostigma plantagineum* (Mariaux et al., 1998) wurden durch eine externe ABA-Applikation induziert. *NIP1;1* aus *A. thaliana* wurde durch eine ABA-Behandlung reprimiert (Weig et al., 1997), *NIP1;2* induziert (Hoth et al., 2002).

Auf ABA reagierende Promotor-Elemente (ABREs; *ABA-responsive elements*; siehe 1.2.3) wurden von Kaldenhoff et al. (1993) im Promotor von *PIP1;2* gefunden. Im Gegensatz dazu konnte für einige *MIPs* eine ABA-unabhängige Induktion gezeigt werden: *Cp-PIPa6*, *Cp-PIPa7* und *Cp-PIPc* aus *Craterostigma plantagineum* (Mariaux et al., 1998) und *PIP2;3*

in *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992). ABA-unabhängige Promotor-Elemente (DREs, siehe 1.2.3) wurden in einigen Wasserstress-induzierten Genen gefunden, ob diese auch in *MIPs* vorhanden sind, wurde bis *dato* noch nicht untersucht.

1.2 Wasserstress: Pflanzen unter Salz- und Trockenstress

1.2.1 Stress-Adaption bei Wasserstress

Wasserstress tritt in der Natur hauptsächlich durch hohe Salzkonzentrationen im Boden, Trockenheit und niedrige Temperaturen auf. Gerade in der Landwirtschaft kann eine suboptimale Wasserversorgung von Kulturpflanzen zu erheblichen Ernteeinbrüchen führen.

Salz- und Trockenstress beeinflussen eine Vielzahl an physiologischen bzw. metabolischen Prozessen in der Pflanze. Dabei sind besonders drei Aspekte bei der Anpassung an den Wasserstress von zentraler Bedeutung:

(a) Änderungen in der Homöostase, wie z.B. Ionen-Gleichgewichte (Salzstress) bzw. osmotische Gleichgewichte, müssen wiederhergestellt werden.

Trockenheit und erhöhte Salzkonzentrationen rufen durch die Veränderung des Wasserpotenzials im Boden einen osmotischen Stress für die Pflanzen hervor. Zusätzlich beinhaltet eine hohe Salzkonzentration eine ionische Komponente. Zu hohe Na^+ - bzw. Cl^- -Konzentrationen in der Zelle sind für die Pflanze toxisch, da sie unter anderem Enzyme durch Störung der hydrophobisch-elektrostatischen Balance der Proteinstruktur hemmen können (Wyn Jones und Pollard, 1983). Durch die erhöhte Konzentration von Na^+ und Cl^- wird nicht nur das Gleichgewicht dieser beiden Ionen gestört, auch die Konzentration von z.B. Kalium wird in der Zelle beeinflusst. K^+ ist ein wichtiger Co-Faktor vieler Enzyme. Seine Aufnahme in die Zelle wird durch eine hohe externe Na^+ -Konzentration negativ beeinflusst. Es wird angenommen, dass nicht-selektive Kationen-Kanäle permeabel für Na^+ -Ionen sind. Na^+ scheint bei seinem Transport in die Zelle mit K^+ zu konkurrieren. Für viele als Kalium-Transporter beschriebene Proteine, wie z.B. HKT1, konnte auch der Transport von Na^+ gezeigt werden (Rubio et al., 1995).

Für die Pflanze ist es daher wichtig, die übermäßige Aufnahme von Na^+ - bzw. Cl^- -Ionen zu verhindern, bzw. aus dem Zytoplasma zu entfernen. Mittels genetischer, molekularer und biochemischer Analysen anhand von NaCl -hypersensitiven *A. thaliana* Mutanten konnte ein Signalweg identifiziert werden, der bei der Kompartimentierung von Na^+ -Ionen beteiligt ist (*SOS- (salt overly sensitive) pathway* (Zhu, 2000)): SOS3, ein myristoyliertes Calcium-Bindeprotein mit drei EF-Händen interagiert mit und aktiviert SOS2, eine Serin/Threonin-Kinase. Dieser SOS3-SOS2-Komplex reguliert die Expression von *SOS1* und ist auch bei der Aktivierung des SOS1-Proteins beteiligt. SOS1 ist ein Na^+/H^+ -Antiporter in der Plasmamembran, der Na^+ aus der Zelle transportiert. Es wird auch vermutet, dass der SOS3-SOS2-Komplex die Aktivitäten anderer Transport-Proteine beeinflusst, wie z.B. die vakuoläre H^+ -ATPase und die inorganische H^+ -Pyrophosphatase, einen vakuolären Na^+/H^+ -Austauscher (NHX) bzw. K^+ - und Na^+ -Transporter in der Plasmamembran (Zhu, 2002).

Auf die Veränderung des Wasserpotenzials im Boden, hervorgerufen durch Trocken- bzw. Salzstress reagieren Pflanzen mit der Synthese von sogenannten kompatiblen Substanzen (*compatible solutes*), um damit das osmotische Potenzial innerhalb der Zellen zu senken. Metabolite mit osmolytischer Funktion sind hauptsächlich Zucker (z.B. Fruktose, Saccharose), Zucker-Alkohole und komplexe Zucker, wie z.B. Raffinose oder Fruktane. Auch geladene Metabolite wie Glycin-Betain oder Prolin bzw. Ionen (z.B. K^+) können als Osmolyte fungieren (Hasegawa et al., 2000).

(b) Schäden, die bei den Stress-Bedingungen entstehen, müssen repariert bzw. verhindert werden.

Trockenheit und Salzstress induzieren die Akkumulation von ROS (*reactive oxygen species*) wie Superoxid (O_2^-), Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (OH) (z.B. Hasegawa et al., 2000; Jiang und Zhang, 2002; Zhu, 2001). Besonders das Hydroxylradikal, gegen das die Pflanze keine Schutzenzyme besitzt, schädigt durch seine Oxidationswirkung wichtige Makromoleküle wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren. Als Antwort auf den oxidativen Stress wird eine Vielzahl an Enzymen induziert, die bei der Beseitigung von ROS bzw. Entgiftung ROS-geschädigter Moleküle beteiligt sind. Dazu zählen Superoxid-Dismutasen, Katalasen, Ascorbat-Peroxidasen sowie Glutathion-abhängige Enzyme wie Glutathion-Reduktasen und Glutathion-S-Transferasen. *Compatible solutes* wie z.B. Mannitol scheinen ebenfalls an der Detoxifizierung von ROS beteiligt zu sein (Shen et al., 1997).

Die hydrophile Natur vieler *compatible solutes* lässt zudem vermuten, dass diese Moleküle Wasser an der Oberfläche von Proteinen, Protein-Komplexen bzw. Membranen ersetzen können und somit als *Osmoprotectants* bzw. Chaperone fungieren können (Hasegawa et al., 2000).

(c) Das Pflanzenwachstum muss den veränderten Bedingungen angepasst werden.

Auf Salz- und Trockenstress reagieren Pflanzen mit einem verminderten Wachstum. Ein Grund für die Reduktion der Wachstumsrate bei Wasserstress ist die Verringerung der Photosyntheseleistung durch geringere Aufnahme von CO_2 , hervorgerufen durch das Schließen der Stomata. Wasserstress scheint auch die Zellteilung bzw. Zellexpansion direkt zu beeinflussen. Wang et al. (1998) konnten zeigen, dass ABA *ICK1*, einen Cyclin-abhängigen Proteinkinase-Inhibitor, induziert und dieser die Aktivität von Cyclin-abhängigen Protein-Kinasen, die beim Zellzyklus beteiligt sind, inhibiert. Die genauen Zusammenhänge zwischen Wasserstress und Regulation der Zell-Expansion sind zwar noch nicht gänzlich verstanden, eine Beteiligung von Phytohormonen wie Auxine, Cytokine, Gibbereline und Brassinolide, die bei verschiedenen Prozessen des zellulären Wachstums eine Rolle spielen, wäre ebenfalls denkbar (Zhu, 2001).

1.2.2 Signaltransduktion bei Wasserstress

Unter Wasserstress kommt es innerhalb der Pflanzen zu einer Erhöhung einer Vielzahl von Signalstoffen wie Phospholipide (IP_3 , DAG, etc.), Ca^{2+} , ABA oder ROS, die zu einer Reihe von adaptiven Stress-Reaktionen der Pflanze führen (Regulation des Wachstums, Bildung von *compatible solutes*, s. a. 1.2.1).

Wenig ist dabei über die an der Signaltransduktion beteiligten Rezeptoren bekannt. Ein potenzieller Sensor für osmotischen Stress ist AtHK1 (*A. thaliana* Histidin Kinase 1), der strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Hefe Zwei-Komponenten Rezeptor SLN1 aufweist (Urao et al., 1999). *AtHK1*-Transkripte akkumulierten bei hoher bzw. niedriger externer Osmolarität, und die Überexpression von AtHK1 in Hefe-Mutanten mit defekten Osmosensoren führte zu einer Verringerung der Letalität bei hohen NaCl-Konzentrationen im Medium. Es wird vermutet, dass MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen)-Kaskaden bei der weiteren Signaltransduktion beteiligt sind (Urao et al., 1999). Droillard et al. (2002) zeigten, dass zwei MAP-Kinasen in *A. thaliana*-Zellsuspensionskulturen (AtMPK3 und AtMPK6) durch osmotischen Stress induziert wurden. MAPK Kaskaden dürften bei der Bildung von *compatible solutes*, Antioxidantien bzw. auch bei der Regulation des Zellzyklus unter osmotischen Stress beteiligt sein (Xiong et al., 2002).

Phospholipide spielen bei Tieren und neueren Untersuchungen zufolge auch in Pflanzen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion. Phosphatidylinositol ist, wenn auch in relativ

geringen Mengen, Bestandteil von Zellmembranen. Die daraus gebildeten wichtigsten Signalmoleküle sind Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂), Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP₃). DAG aktiviert die Proteinkinase C, und IP₃ fördert die Ca²⁺-Ausschüttung intrazellulärer Kompartimente in Tieren (Berridge, 1993). In einer *Daucus carota* Zellsuspensionskultur konnte nachgewiesen werden, dass hyperosmotischer Stress, hervorgerufen durch NaCl bzw. Mannitol, zu einer Erhöhung des intrazellulären IP₃-Spiegels führt (Drøbak und Watkins, 2000). DeWald et al. (2001) konnten zudem zeigen, dass ein erhöhter IP₃-Spiegel in NaCl-gestressten *A. thaliana* Pflanzen mit einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels korrelierte. Auch Phosphatidsäure dürfte bei der Signaltransduktion bei Salz- und Trockenstress beteiligt sein. Eine Phospholipase D, *AtPLDδ*, wurde bei Salz- und Trockenstress induziert. In transgenen *AtPLDδ antisense*-Pflanzen kam es bei Trockenstress auch zu einer geringeren Akkumulation von Phosphatidsäure (Katagiri et al., 2001).

Kalzium ist ein wichtiges Signalmolekül, das Ca²⁺-abhängige Phosphoprotein-Kaskaden reguliert. Neben SOS3-Proteinen sind CDPKs (*calcium-dependent protein kinases*) an der Weiterleitung von Ca²⁺-gekoppelten Signaltransduktionen beteiligt. Urao et al. (1994) konnten zeigen, dass CDPKs in *A. thaliana* durch Salz- bzw. Trockenstress induziert werden. Einen direkten Beweis zur Beteiligung von CDPKs bei Stress lieferte Sheen (1996). Die Autorin zeigte, dass konstitutiv aktive CDPKs den Stress-aktivierbaren Promotor HVA1 ohne weitere Stress-Applikation in Mais-Protoplasten aktivierten.

ABA (Abscisinsäure) ist ein Pflanzenhormon, das vermehrt bei Wasserstress gebildet wird. Unter anderem ist ABA am Schließen der Stomata unter Wasserstress beteiligt. ABA spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion bei Salz- bzw. Trockenstress, indem es die Transkription vieler Stress-Gene beeinflusst (siehe 1.2.3). Die Regulation des ABA-Spiegels in der Zelle erfolgt hauptsächlich über die an der ABA-Biosynthese beteiligten Enzyme. Die Mechanismen, durch die diese Gene bei Salz- bzw. Trockenstress induziert werden, sind nicht bekannt, möglicherweise sind dabei Ca²⁺-abhängige Kaskaden beteiligt (Xiong et al., 2002).

Auch ROS sind bei der Signaltransduktion bei Wasserstress beteiligt. Jiang und Zhang (2002) konnten in Mais-Blättern zeigen, dass Wasserstress (-0,7 MPa) eine vermehrte Bildung von ROS zur Folge hatte. Aufgrund ihrer Befunde nahmen die Autoren weiters an, dass der erhöhte ABA-Spiegel die vermehrte Bildung von ROS auslöste, und dadurch die Aktivitäten von Antioxidationsenzymen wie Superoxid-Dismutase, Katalase, Ascorbat-Peroxidase und Glutathion-Reduktase erhöht wurden.

1.2.3 Transkriptionelle Regulation bei Wasserstress

Mit Hilfe von DNA-Arrays wurden schon vielfach die transkriptionellen Änderungen von Genen bei Salz- bzw. Trockenstress untersucht (z.B. Seki et al., 2001; Kreps et al., 2002). Die Signalwege, die zur Induktion vieler dieser Gene führen, sind zum großen Teil noch nicht genau identifiziert. Bei einer Gruppe von Stress-induzierten Genen, zu der *RD29A* (*COR78/LTI78*) zählt, ist allerdings die transkriptionelle Stress-Regulation schon gut verstanden. Die Promotoren dieser Gene enthalten sowohl ein ABRE (*ABA-responsive element*) als auch ein DRE-Motiv (*dehydration-responsive element*; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994; Stockinger et al., 1997) (Abb. 1.2).

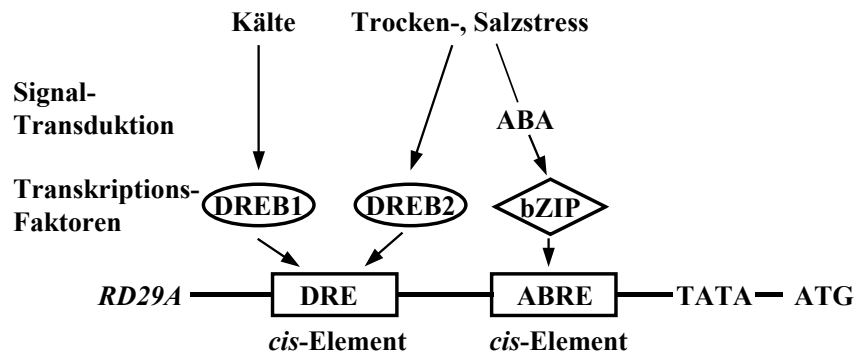


Abb. 1.2: Cis-Elemente und *trans*-Faktoren, die bei der transkriptionellen Stress-Regulation von *RD29A* beteiligt sind. Näheres siehe Text. Nach Liu et al. (1998).

Transkriptionsfaktoren, die an das DRE-Element binden, sind die DREB-Proteine (*dehydration-responsive element binding proteins*; Liu et al., 1998). Mit Ausnahme der EREBP/AP2-DNA-Bindungs-Domäne (*ethylene-responsive element binding protein*, Ohme-Takagi und Shinshi, 1995; *APETALA2*, Jofuku et al. 1994) besitzen diese Proteine eine sehr geringe Sequenzhomologie (Liu et al., 1998). DREB1A scheint bei der Signaltransduktion bei Kältestress involviert zu sein (Liu et al., 1998). Die Überexpression von DREB1A führte zu einer verstärkten Transkription von Stress-Genen unter ungestressten Bedingungen. Die transgenen *A. thaliana* Pflanzen, die die DREB1A cDNA überexprimierten, waren zudem toleranter gegenüber Kälte- und Trockenstress (Liu et al., 1998). Im Gegensatz dazu scheinen DREB2A und DREB2B ausschließlich an der Signaltransduktion bei osmotischem Stress beteiligt zu sein: *DREB2A* und *DREB2B* wurden bei osmotischem Stress (Austrocknung und hohe Salz-Konzentration) induziert, nicht aber bei Kältestress (Nakashima et al., 2000). Da die Überexpression von DREB2A in ungestressten transgenen *A. thaliana* Pflanzen zu keiner Erhöhung von DRE-gesteuerten Transkripten und keiner erhöhten Stress-Toleranz führte (Liu et al., 1998), scheint die Funktion der DREB2s zusätzlich über Stress-aktivierte Phosphorylierungen und/oder Interaktionen mit anderen Faktoren gesteuert zu sein (Nakashima et al., 2000).

Basische Leucin-Zipper (bZIP) Transkriptionsfaktoren (ABF/AREB), die an das ABRE-Motiv binden können und die Expression von ABRE-getriebenen Reportergenen aktivieren, wurden von Choi et al. (2000) und Uno et al. (2000) isoliert. Uno et al. (2000) zeigten, dass *AREB1* und *AREB2* durch NaCl-, Trockenstress und ABA induziert werden. Auch für ihre Aktivierung benötigen *AREB1* und *AREB2* ABA, da ihre Transaktivierungs-Aktivitäten in der ABA-defizienten Mutante *aba2* und ABA-insensitiven Mutante *abil-1* reduziert, in der ABA-hypersensitiven Mutante *eral* aber induziert waren. Möglicherweise sind ABA-aktivierte Proteinkinasen an dieser posttranskriptionellen Aktivierung beteiligt.

Einige Stress-reagierende Gene, wie z.B. *RD22* enthalten aber keine DRE-Elemente. Für *RD22* konnten Abe et al. (1997) zwei Transkriptions-Aktivatoren identifizieren (*rd22BP1* (MYC) und *ATMYB2* (MYB)), die an der Trocken- und ABA-induzierbaren Expression dieses Gens beteiligt sind.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das vorrangige Ziel dieser Dissertation war, die gesamte *MIP*-Familie in der Modellpflanze *A. thaliana* anhand von Transkriptmessungen genauer zu charakterisieren. Zur parallelen Untersuchung von Genen wurde in den letzten Jahren die DNA-Microarray-Technik entwickelt, mit deren Hilfe Transkriptome untersucht werden können. Um die oftmals hoch homologen *MIP*-Mitglieder unterscheiden zu können, sollten Gen-spezifische Sonden entworfen und in einen DNA-Microarray integriert werden.

Von den meisten *MIP*-Mitgliedern in *A. thaliana* ist bis *dato* wenig darüber bekannt, wo sie in der Pflanze exprimiert werden. Aus diesem Grund sollte mittels Transkript-Analysen in allen Organen (Wurzel, Blätter, Stängel, Blüten und Schoten) für alle *MIP*-Mitglieder Expressionsprofile beschrieben und damit auch Einblicke in mögliche Funktionen, bzw. hinsichtlich Redundanz gewonnen werden.

Da von einigen *MIPs* in *A. thaliana* bekannt ist, dass sie als Aquaporine fungieren können, sollten anhand des DNA-Microarrays Reaktionen der *MIPs* auf Wasserstress, der in Form von NaCl- und Sorbitolstress appliziert werden sollte, untersucht werden. Damit sollten zum einen *MIP*-Mitglieder identifiziert werden, die möglicherweise bei der Stress-Anpassung beteiligt sind, zum anderen Unterschiede in der Stress-Antwort in Wurzeln und Blättern von *A. thaliana* aufgespürt werden.

Da die Reaktionen der Pflanze auf Wasserstress metabolische Veränderungen und die rasche Bildung von ROS einschließen (siehe Einleitung, 1.2), sollte parallel das transkriptionelle Verhalten von Genen des Redox-Stoffwechsels, Stress- und Sekundärmetabolismus untersucht werden. Dadurch sollten auch Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Stress-Antwort auf die NaCl- und Sorbitol-Behandlung aufgefunden gemacht werden.

Als Grundlage für weiterführende Ansätze zur funktionellen Charakterisierung von *MIPs* sollten Insertionsmutanten in *MIP*-Genen identifiziert und auf Transkript-Ebene näher charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Bio-Rad Gel Doc 2000	Bio-Rad Lab GmbH, München
Drehofen zur Hybridisierung	Bachofer GmbH, München
Eppendorf Zentrifuge 5451C	Eppendorf, Hamburg
FLA-3000	FUJI Photo Film Co., LTD, Japan
Halbmikro-Osmometer TYP M	KG Dr. Herbert Knauer, Berlin
Heizblock	Bachofer GmbH, Reutlingen
Hettich Tischzentrifuge EBA12	Hettich, Tuttlingen
Microgrid II	BioRobotics, UK
Mikrotiterplatten-Zentrifuge 4K15C	Sigma GmbH, Osterode
MultiCycler PTC-200	Biozym, Oldenburg
Speed-Vac Concentrator SVC-100 H	Bachofer GmbH, München
Spektrophotometer DU [®] 640	Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim
Szintillationszähler	Beckman Coulter GmbH, USA
Tragbarer Kontaminationsmonitor LB1210B	Berthold, Bad Wildbach
UV Stratalinker [®]	Stratagene, La Jolla, USA

2.2 Chemikalien, Enzyme und Molekularbiologische „Kit“-Systeme

2.2.1 Feinchemikalien

Agar	USB, Cleveland
Agarose SEA KEM [®] LE	FMC Biochemicals, Maine, USA
Ampicillin	Roche, Mannheim
BSA (Rinderserum-Albumin, Fraktion V)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Life Technologies, Groningen, NL
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	SERVA, Heidelberg
Ethidiumbromid	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Ficoll Typ 400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Heringssperma-DNA	Boehringer Mannheim, Mannheim
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Kanamycin	Roche, Mannheim
MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Murashige und Skoog (MS) Medium	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Nukleotide (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Oligo-dT	Invitrogen, Life Technologies, Groningen, NL

pAW109 RNA	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Polyethylenglykol 6000	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon MW 40.000 (PVP-40; K30)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Polyvinylpyrrolidon MW 360.000 (PVP-360)	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Spermidin	SERVA, Heidelberg
Tris (hydroxymethyl)-aminomethyl	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Tween 20	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Xylencyanol FF	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim

Alle nicht im Detail genannten Chemikalien wurden *p. A.* bzw. in der höchsten erhältlichen Reinheit verwendet.

2.2.2 Radiochemikalien

α -[³³ P]-dATP (>2500 Ci/mmol), Redivue	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
γ -[³³ P]-ATP (>2500 Ci/mmol), Redivue	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.2.3 Enzyme

<i>Hind</i> III (10 U/ μ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Boehringer Mannheim, Mannheim
RNase-Inhibitor RNasin (35-50 U/ μ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Superscript TM II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Invitrogen, Life Technologies, Groningen, NL
T4 Polynukleotid Kinase (10 U/ μ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Qbiogene, Heidelberg

Alle Enzyme wurden gemeinsam mit den zugehörigen Puffern bezogen.

2.2.4 Molekularbiologische „Kit“-Systeme

DecaLabel TM DNA Labelling Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
pGEM [®] -T Easy Vector System	Promega GmbH, Mannheim
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick TM Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.3 Häufig verwendete Lösungen

100x Denhardt-Lösung	2 % (w/v) Ficoll Typ 400 2 % (w/v) PVP-360 2 % BSA Sterilfiltriert
1x TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA, pH 8,0
1x TE	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O pH 7,0
DEPC-behandeltes ddH ₂ O	0,1 % (v/v) DEPC, autoklaviert
Heringssperma-DNA	10 mg/ml, autoklaviert
LB-Medium	2,5 % (w/v) Miller's Luria Broth Base (Sigma) 60 µl 5 M NaOH/100 ml Medium
LB-Platten	1,25 % (w/v) Bacto Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) 2,5 % (w/v) Miller's Luria Broth Base (Sigma) 60 µl 5 M NaOH/100 ml Medium
RB-Medium	1 % (w/v) Trypton (Difco Laboratories, Detroit, USA) 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt (Difco Laboratories, Detroit, USA) 0,5 % (w/v) NaCl 2 ml 1 M NaOH/l Medium
X-Gal	100 mg in 2 ml N,N'-Dimethyl-Formamid

2.4 Materialien

AutoSeq™ G-50	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond-N+ Nylonmembran (15 mm x 73 mm)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybridisierungsröhrchen (50 mm x 150 mm)	ThermoHybaid, Heidelberg
Imaging Plate BAS-IP 2340	FUJI Photo Film Co., LTD, Japan
MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
MicroSpin™ S-400 HR Columns	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Miracloth-Filter	Calbiochem, La Jolla, USA
MultiScreen PCR®	Millipore, Eschborn
PCR-Reaktionsgefäße (einzeln und Platten)	Biozym, Hess. Oldendorf
Steinwolle (Grodan®)	Grodania A/S, Hannover
Whatman-Papier	Schleicher&Schuell, Dassel

2.5 Verwendete Organismen

2.5.1 Bakterien

Escherichia coli Stamm DH5 α (Mass. General Hospital, Boston, USA)

2.5.2 Pflanzen

Arabidopsis thaliana Ökotyp Col-R (eigene Inzuchtlinie, basierend auf Columbia-Stamm von G. Redei, Columbia, Missouri, USA)

Arabidopsis thaliana Ökotyp Landsberg *erecta* (Ler; G. Jürgens, Tübingen, eigene Inzuchtlinie)

Insertionsmutante für *PIP2;1* (ZIGIA Projekt, MPI Köln für Züchtungsforschung) Ökotyp Columbia
Linie 6AAS98

Insertionsmutante für *PIP1;4* (Sundaresan et al., 1995) Ökotyp Landsberg
Linie N100263

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Herstellung von kompetenten Zellen mit Hilfe von RbCl

250 ml RB-Medium mit 20 mM MgSO₄ wurden mit 1 ml einer *E. coli* Vorkultur (Stamm DH5 α) angeimpft und bei 37 °C auf einem Schüttler bei 250 Upm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die OD (Optische Dichte) der Suspensionskultur bei 600 nm gemessen. Hatte die Bakteriensuspensionskultur eine OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 erreicht, wurden die Zellen sedimentiert (4 °C, 5 min, 5000 Upm; Sorvall[®] GSA Rotor) und in 100 ml Puffer TFB I (auf Eis gekühlt) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 5 min auf Eis inkubiert, die Zellen pelletiert (siehe Text oben) und diese in 10 ml Puffer TFB II (auf Eis gekühlt) erneut resuspendiert.

TFB I

30 mM Kaliumacetat
100 mM RbCl
10 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O
50 mM MnCl ₂ x 2 H ₂ O
15 % (v/v) Glycerin
pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert

TFB II

10 mM MOPS, Natrium-Salz
75 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O
10 mM RbCl
15 % (v/v) Glycerin
pH 6,5 mit KOH eingestellt und sterilfiltriert

Die Bakterien wurden für 60 min auf Eis inkubiert, anschließend in 100 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.6.2 Bestimmung der Transformations-Effizienz der kompetenten Zellen

100 µl RbCl-kompetente Zellen wurden mit 0,1, 1, 10 und 100 pg/5µl pBluescript-Vektor (Stratagene) transformiert (2.6.3), auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und die Bakterien verwendet, wenn die Effizienz mehr als 10⁶ cfu (*colony forming units*)/µg Vektor betrug.

2.6.3 Transformation von RbCl-kompetenten Zellen

5 µl Ligationsansatz (2.8.6) bzw. Plasmid-DNA wurden mit 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45 sec, 37 °C) wurde für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen.

2.7 Anzucht der Pflanzen

2.7.1 Anzucht auf Erde

Arabidopsis thaliana Samen wurden auf einem Erde-Sandgemisch (Floraton1 (Floragard®):Grobsand 4:1) ausgesät (ca. 5-10 Samen/5x5 cm Töpfchen), mit Leitungswasser befeuchtet und mit Haushaltsfolie abgedeckt. Die Samen wurden für 2 Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend in den Anzuchtraum gestellt. Nachdem die Keimblätter sichtbar waren, wurde die Haushaltsfolie entfernt und die Pflanzen regelmäßig gegossen. Die Pflanzen wurden bei ca. 200 µE m⁻² s⁻¹, 23±2 °C, 50 % Luftfeuchtigkeit und einem 16 Stunden Lichttag bis zum gewünschten Alter herangezogen.

2.7.2 Anzucht in hydroponischer Kultur

Bei einigen Untersuchungen (Organ-spezifische Expression, NaCl- und Sorbitolstress sowie bei der Untersuchung der *pip2;1*-Mutante) wurden *A. thaliana* Pflanzen auf hydroponischen Wannen angezogen. Diese Anzucht erfolgte in Anlehnung an die von Gibeaut et al. (1997) beschriebene Methode. Die Wannen waren aus grauem PVC gefertigt und hatten ein Fassungsvermögen von rd. 16 l. Die Abmaße der Wanne waren 33,5 x 40 x 12 cm (Abb. 2.1).



Abb. 2.1: Anzucht von *A. thaliana* auf hydroponischen Wannen. Einzelheiten siehe Text

Der Deckel hatte Bohrungen mit einem Durchmesser von 12 mm in einem Abstand von 40 mm. Darin befanden sich 15 mm lange Stopfen, in die 20 mm lange Streifen aus Steinwolle (Gordan[®]) gesteckt wurden. Die Steinwolle wurde mit Nährlösung getränkt und darauf ca. 5 Samen, die in 0,1 %-iger Agarose resuspendiert waren, aufgetragen. Zur Verhinderung von Sauerstoffmangel an den Wurzeln wurde die Nährlösung ständig mit Raumluft über Aquariensteine und einer Pumpe belüftet. Bis zum Alter von 8 Tagen wurden die Pflanzen mit einer Plexiglashaube abgedeckt. Danach wurde die Plexiglashaube schrittweise abgenommen und die Pflanzen bis zum gewünschten Alter herangezogen.

Nährlösung

Makroelemente (je 200x Stammlösungen, autoklaviert)
250 mM KNO ₃
300 mM Ca(NO ₃) ₂
150 mM MgSO ₄
100 mM KH ₂ PO ₄
Mikroelemente (je 1000x Stammlösungen, autoklaviert)
50 mM H ₃ BO ₃
1,5 mM CuSO ₄
2 mM ZnSO ₄
75 μM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄
50 mM KCl
72 mM Fe-EDTA
10 mM MnSO ₄
100 mM Na ₂ O ₃ Si
0,5 g/l MES, pH mit Phosphorsäure auf 5,3-5,4 eingestellt

2.7.2.1 NaCl- bzw. Sorbitolstress bei hydroponisch gewachsenen Pflanzen

Um hydroponisch gewachsene Pflanzen einem Wasserstress auszusetzen, wurde der Nährlösung 100 mM NaCl bzw. 200 mM Sorbitol (Endkonzentration) zugegeben. Das Alter der Pflanzen betrug 21 Tage. Die Osmolalitäten der Nährlösungen wurden mit einem Osmometer (Knauer) bestimmt und auftretende Unterschiede in den Osmolalitäten durch Zugabe des jeweiligen Osmotikums (NaCl bzw. Sorbitol) ausgeglichen. Die Wurzeln und Blätter von Kontroll- (hydroponische Kultur ohne NaCl bzw. Sorbitol), Salz- und Sorbitol-

gestressten Pflanzen wurden nach 5, 24 und 48 Stunden (nach Stress-Applikation) geerntet, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.7.3 Anzucht auf MS-Agar

Die *pip1;4*-Mutante entstand durch Transformation eines *Ds*-Elements, das ein Kanamycin-Resistenz-Gen (*NPTII*, Neomycin Phosphotransferase) trägt. Zur Selektion wurde das Ausgangssaatgut sterilisiert (2.7.5) und die Samen auf MS-Agar mit Kanamycin ausgesät (4,43 g/l MS Nr. 5519, 1 % Saccharose, 1 % Phytagar, pH 5,8 mit NaOH eingestellt, 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin). Nach ca. 2 Wochen wurden die Pflanzen auf Erde überführt.

2.7.4 Anzucht in Schüttelkulturen

Zur Untersuchung von Keimlingen der *pip1;4*-Mutante (2.12.2) wurden die Samen sterilisiert (2.7.5) und anschließend in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml MS-Medium (4,43 g/l MS Nr. 5519, 1 % Saccharose, pH 5,8 mit NaOH eingestellt) überführt. Nach 2 Tagen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Kolben in den Anzuchtraum auf einen Schüttler (80 Upm) gestellt. 7 Tage alten Keimlingen wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 150 mM zugesetzt (1,55 ml 5 M NaCl zu 50 ml MS-Medium). Die Stress-Dauer bei den Keimlingen betrug 6 Stunden. Die Keimlinge wurden über Miracloth-Filter abfiltriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.7.5 Sterilisieren von Samen

Zu ca. 50 Samen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) wurde 1 ml 80 %-iger Ethanol pipettiert und für 2-3 min inkubiert. Der Ethanol wurde abgehoben, und 1 ml Chlorbleiche (DanKlorix) mit Tween-20 (50 ml Chlorbleiche mit 1 Tropfen Tween-20) zugegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurden die Samen dann 5x mit ddH₂O gewaschen.

2.7.6 Trockengewichtsbestimmung

Blätter bzw. Wurzeln wurden in zuvor abgewogene Bechergläser überführt, bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Trockenschrank für 2 Tage getrocknet und danach erneut abgewogen.

2.8 Methoden zur Nukleinsäurechemie

2.8.1 Isolierung von genomischer DNA aus *A. thaliana*

2.8.1.1 DNA-Minipräparation

Zur Überprüfung von Transposon-Insertionen in den *mip*-Mutanten wurde eine schnelle und einfache Methode zur Isolierung der genomischen DNA verwendet. Je ein Blatt wurde in ein auf Eis gekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß geerntet und mit einer an der Spitze abgeflamten Pipettenspitze zerrieben. Dazu kamen 200 μl 2x CTAB-Puffer. Nach heftigem

Durchmischen wurde für mindestens 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde mit einem Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) extrahiert und für 2 min bei 10.000xg zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgehoben und 1 µl 1 % LPA als Präzipitierhilfe zugesetzt. 2 Volumen 100 % Ethanol wurden zugesetzt und die DNA bei -70 °C für 20 min präzipitiert. Daran anschließend wurde die DNA mit einer Zentrifugation (10.000xg, 4 °C, 15 min) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde 2x mit 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

2x CTAB-Puffer

2 % CTAB (w/v)
100 mM Tris/HCl pH 8,0
1,4 M NaCl
1 % PVP-40 (w/v)
20 mM EDTA, pH 8,0

1 % LPA (Linares Polyacrylamid)

Herstellung: 0,5 g Acrylamid werden in 10 ml 40 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EGTA aufgenommen und anschließend 0,5 ml 10 %-iges (w/v) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ und 50 µl TEMED zugefügt. Nachdem die Lösung bei Raumtemperatur polymerisiert (rd. 30 min) wird mit ddH ₂ O auf 50 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

2.8.1.2 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA, die einem Restriktionsverdau unterzogen wurde, wurde nicht mit der DNA-Minipräparation isoliert, da diese Methode keine effektive Abtrennung von Polysacchariden und phenolischen Verbindungen gewährleistet und dadurch Restriktionsenzyme gehemmt werden können. Stattdessen wurde folgende Isolierungsmethode verwendet:

1 g Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 5 ml Carlson-Lysis-Puffer versetzt. Dazu kamen 12,5 µl 2-Mercaptoethanol. Es erfolgte eine Inkubation bei 74 °C für 20 min. Anschließend wurde 2x eine Chloroform:Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt. Der wässrigen Phase wurde 1 Volumen Isopropanol zugefügt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (30 min, 7000 Upm, 4 °C, Sorvall® GSA Rotor). Das Pellet wurde in 1 ml ¼TE-Puffer mit 1 M NaCl und 50 µg/ml RNase A bei 37 °C gelöst. Dazu kamen 425 µl ddH₂O und 825 µl QBT-Puffer (Plasmid Mini Kit, Qiagen). tip 20-Säulchen (Plasmid Mini Kit, Qiagen) wurden mit 1 ml QBT äquilibriert und darauf die DNA-Lösung gegeben. Die Säulchen wurden 3x mit je 1 ml QC (Plasmid Mini Kit, Qiagen) gewaschen. Die DNA wurde dann mit QF (auf 50 °C erwärmt; Plasmid Mini Kit, Qiagen) eluiert (2x 1 ml). Nach einer Isopropanol-Fällung wurde das DNA-Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen und in 20 µl EB (Plasmid Mini Kit, Qiagen) aufgenommen.

Carlson-Lysis-Puffer

100 mM Tris/HCl pH 9,5
2 % CTAB (w/v)
1,4 M NaCl
1 % PEG 6000 (w/v)
20 mM EDTA, pH 8,0

2.8.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. thaliana*

2.8.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe von LiCl

Chang et al. (1993) entwickelten ein RNA-Isolierungsprotokoll, das sich besonders gut für Pflanzengewebe eignet, die hohe Anteile an Polysacchariden und/oder phenolischen Verbindungen enthalten. Diese Methode erwies sich auch als besonders effektiv, um Gesamt-RNA aus Schoten zu isolieren. Für die Organ-spezifische Expressions-Analyse wurde deshalb diese Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert. 490 µl Extraktionspuffer plus 10 µl 2-Mercaptoethanol wurden auf 65 °C erwärmt und zum gemörserten Pflanzenmaterial (100 mg) zugegeben. Nach heftigem Mischen wurde 2x mit 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zum wässrigen Überstand kam ¼ Volumen 10 M LiCl. Die RNA wurde über Nacht bei 4 °C präzipitiert und bei 10.000xg für 20 min pelletiert. Das *Pellet* wurde in 500 µl SSTE gelöst und eine weitere Chloroform:Isoamylalkohol-Extraktion angeschlossen. Zum Überstand wurden 2 Volumen 100 % Ethanol zugegeben und die RNA für 20 min bei -70 °C und anschließender Zentrifugation (20 min, 4 °C, 10.000xg) gefällt. Das *Pellet* wurde getrocknet und die RNA in 50 µl DEPC-behandeltem ddH₂O gelöst.

Extraktionspuffer

2 % CTAB
2 % PVP K30
100 mM Tris/HCl pH 8,0
25 mM EDTA, pH 8,0
2 M NaCl
0,5 g/l Spermidin

SSTE

1 M NaCl
0,5 % SDS
10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA, pH 8,0

2.8.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy[®] Plant Mini Kits (Qiagen)

Die Methode von Chang et al. (1993) erwies sich als ungeeignet, um Gesamt-RNA aus Wurzeln von Sorbitol-gestressten Pflanzen zu isolieren. Deshalb wurde der RNeasy[®] Plant Mini Kit der Firma Qiagen zur Isolierung von Gesamt-RNA für die Wasserstress-Versuche verwendet. Es wurde den Angaben des Herstellers gefolgt. Für Blätter wurde dabei der Lysis-Puffer RLC, für Wurzeln Puffer RLT verwendet.

2.8.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als *Taq*-DNA-Polymerase wurde stets die DNA-Polymerase der Firma Qbiogene mit zugehörigem Puffer verwendet.

Die für die DNA-Synthese verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang angegeben. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte am Institut für BIO-DV des GSF.

2.8.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden stets 1 %-ige Gele verwendet. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquickTM Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert. Dabei wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

2.8.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Wurden PCR-Produkte in einen Vektor kloniert, wurden diese zuvor mit Hilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Dabei wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

2.8.6 Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durchgehend der Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega) zur Ligation von PCR-Produkten verwendet. Dieses System hat den Vorteil, dass die PCR-Produkte direkt ohne weitere enzymatische Manipulation in den Vektor kloniert werden können. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:3. Der in der Anleitung des Herstellers angegebene Reaktionsansatz wurde halbiert, ansonsten wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

2.8.7 Restriktionsverdau von genomischer DNA

Zur Ermittlung der Anzahl an *En-1*-Elementen in der *pip2;1*-Mutante wurde die genomische DNA mit *Hind*III für eine Southern-Analyse (2.11.1.3) verdaut. Der Reaktionsansatz (300 µl) enthielt 2-3 µg genomische DNA, 20-60 U *Hind*III, 1x Puffer und ddH₂O ad 300 µl. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die verdaute DNA wurde anschließend gereinigt und gefällt: Zum Reaktionsansatz kamen 1 µl LPA und 1 Volumen Phenol (Tris-gesättigt). Zur Phasentrennung wurde 5 min bei mindestens 10.000xg zentrifugiert. Zur oberen, wässrigen Phase wurde NaCl zugesetzt (2 µl 5 M NaCl pro 100 µl Volumen). Die DNA wurde durch Zugabe von 2,5 Volumen 100 % Ethanol gefällt, pelletiert (15 min, 10.000xg) und anschließend mit 75 % Ethanol gewaschen. Das *Pellet* wurde getrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst.

2.8.8 Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen

Die Auftrennung von Nukleinsäuren (genomische DNA, PCR-Produkte bzw. Gesamt-RNA) erfolgte in Agarosegelen (0,7-2 % Agarose in TAE-Puffer; Sambrook et al., 1989). Zur Sichtbarmachung der Nukleinsäuren unter UV-Durchlicht wurde dem Elektrophoresepuffer (1x TAE) Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde zusätzlich zum Elektrophoresepuffer dem Agarosegel Ethidiumbromid in der gleichen Konzentration zugegeben. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1/5 Volumen Beladungspuffer versetzt. Zur Größenbestimmung der Nukleinsäuren wurde bei jedem Gellauf ein DNA-Fragmentlängenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 5-10 V/cm.

Beladungspuffer

30 % Glycerin (v/v)
0,25 % Bromphenolblau (w/v)
0,25 % Xylencyanol FF (w/v)

2.8.9 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration bzw. des Reinheitsgrades von Nukleinsäuren wurden diese bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm photometrisch gemessen. Bei 260 nm absorbieren hauptsächlich Nukleinsäuren, bei 280 nm Proteine. Das Verhältnis der Absorptionswerte von 260 zu 280 nm beschreibt dabei den Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Lösung (Sambrook et al., 1989). Die DNA-Lösung in der Küvette hatte eine Konzentration von 50 µg/ml wenn der OD₂₆₀-Wert 1 betrug. Eine RNA-Lösung hatte eine Konzentration von 40 µg/ml bei einem OD₂₆₀-Wert von 1.

2.8.10 Semi-quantitative RT-PCR

Die semi-quantitative RT-PCR wurde verwendet, um damit ausgewählte Befunde der DNA-Microarray-Analysen zu überprüfen. In einer RT-Reaktion (Reverse Transkription) wird zuerst mRNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben und anschließend eine PCR durchgeführt. Anhand der entstehenden Produkt-Mengen können so Rückschlüsse auf die relative Anzahl der in der Probe vorliegenden mRNAs gezogen werden. Da sowohl RT-Reaktion als auch PCR durch Salze und andere Stoffe in der Probe beeinflusst werden können, wurde der Gesamt-RNA in Anlehnung an Weig und Komor (1996) ein nicht-pflanzlicher mRNA-Standard (pAW109 RNA; Applied Biosystems) zur Normalisierung der entstehenden PCR-Produkte zugegeben. Bei der semi-quantitativen RT-PCR ist es besonders wichtig, dass die gleichen Ausgangsmengen an Gesamt-RNA der zu vergleichenden Proben verwendet werden. Die Messung von Gesamt-RNA mit dem Spektralphotometer liefert zwar gute Anhaltswerte zur Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA, dabei muss aber beachtet werden, dass bei dieser Methode alle Nukleinsäuren in der Lösung gemessen werden, also auch etwaige Verunreinigungen wie z.B. genomische DNA. Daher wurde die Gesamt-RNA zusätzlich über Agarosegele quantifiziert. Die Gesamt-RNA wurde zunächst mit dem Spektralphotometer gemessen, die Konzentrationen bestimmt (2.8.9) und 1 µg Gesamt-RNA auf das Gel aufgetragen. Als relative Richtgröße für die Menge an Gesamt-RNA dienten die beiden ribosomalen Banden 18S und 25S rRNA, die auch die beiden prominentesten Banden beim Gellauf waren. Mit Hilfe des Softwareprogramms Multi-Analyst (Bio-Rad) wurden die relativen Mengen an 18S und 25S anhand der Ethidiumbromid-Fluoreszenz der entsprechenden Banden in den Proben bestimmt und etwaige Unterschiede zwischen den Proben ausgeglichen. Die Proben wurden erneut auf ein Agarosegel aufgetragen, und aufeinander abgeglichen und dieser Vorgang solange wiederholt, bis die Proben die gleichen Mengen an 18S und 25S rRNA hatten. Ein RT-Ansatz (20 µl) setzte sich dann aus folgenden Komponenten zusammen:

5x Erststrang-Puffer (Invitrogen)	4 μ l
0,1 M DTT (Invitrogen)	2 μ l
20 mM dNTPs (jedes)	1 μ l
Oligo-dT (13-15mer, 0,05 μ g/ μ l, Invitrogen)	3,5 μ l
pAW109 (10 ⁶ Kopien/ μ l, Applied Biosystems)	0,5-1 μ l
RNase-Inhibitor (35-50U/ μ l; MBI Fermentas)	0,5 μ l
Gesamt-RNA	1 μ g
DEPC-behandeltes ddH ₂ O	ad 20 μ l

Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu kam 1 μ l (67 U) Superscript II (1:3 in 1x Erststrang-Puffer verdünnt). Der RT-Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und im MultiCycler PTC-200 mit folgendem Programm die cDNA-Synthese durchgeführt:

30 min	42 °C
40 min	50 °C
5 min	95 °C
10 min	4 °C

1-4 μ l des RT-Ansatzes wurden anschließend in einer PCR eingesetzt. Neben den Gen-spezifischen Oligonukleotiden (*primer-f* und *primer-r*) enthielt der Ansatz 2 weitere, pAW109-spezifische Oligonukleotide (DM151 und DM152). Der PCR-Ansatz (15 μ l) enthielt:

10x <i>Taq</i> -Puffer	1,5 μ l
dNTPs (jedes 20 mM)	0,15 μ l
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,3 μ l
10 μ M DM151	0,75 μ l
10 μ M DM152	0,75 μ l
10 μ M <i>primer-f</i>	0,75 μ l
10 μ M <i>primer-r</i>	0,75 μ l
cDNA	1-4 μ l
ddH ₂ O	9-6 μ l

Die Gen-spezifischen Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie eine Schmelztemperatur von 55 °C besaßen und somit der von DM151 und DM152 entsprachen. Die Zyklenzahl der PCR wurde in Vorversuchen empirisch ermittelt und sollte gewährleisten, dass sich die entstehenden Produktmengen nicht im Sättigungsbereich befanden. Das PCR-Programm der RT-PCR war:

2 min	94 °C	
30 sec	94 °C	}
30 sec	55 °C	
1 min 30 sec	72 °C	} 30-40x
7 min	72 °C	

Die gesamte PCR-Reaktion wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, die PCR-Produkte (Gen- und pAW109-spezifisches PCR-Produkt) wurden mit Hilfe des Softwareprogramms Multi-Analyst (Bio-Rad) quantifiziert und das Verhältnis zwischen Gen-spezifischem Produkt und pAW109-spezifischem Produkt bestimmt. Dieser Wert wurde als relativer mRNA-Gehalt definiert.

2.8.11 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung von PCR-Produkten bzw. Plasmiden wurde von den Firmen TopLab oder MediGenomix (beide Martinsried) durchgeführt.

2.9 Kreuzhybridisierung von homologen Genen

Zur Überprüfung von Kreuzreaktionen homologer Gene wurden die beiden homologen *TIP*-Mitglieder *TIP1;1* und *TIP1;2* untersucht. Dazu wurde ein DNA-Microarray, auf dem die 3'-UTR-Sonden für *TIP1;2*, eine cDNA-Sonde von *TIP1;2* sowie als Kontrolle eine 3'-UTR-Sonde von *TIP1;1* aufgebracht waren, mit einer radioaktiv markierten Probe von *TIP1;1* hybridisiert.

Die Probe wurde folgendermaßen hergestellt: Zuerst wurde eine PCR mit *TIP1;1*-spezifischen Oligonukleotiden (*TIP1;1spec_f* und *TIP1;1spec_r*) an einer cDNA (Herstellung einer cDNA, siehe 2.8.10) als Vorlage gestartet. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie den gesamten kodierenden Bereich von *TIP1;1* sowie 181 bp vom 3'-UTR Bereich umspannten. Die relative Lage der Sonden zur *TIP1;1*-Probe ist in Abb. 3.1 (Ergebnisse, 3.1.3) schematisch dargestellt. Der PCR-Ansatz (15 µl) enthielt 1x *Taq*-Puffer, 200 µM dNTPs (jedes), 0,5 µM je Oligonukleotid, 2 U *Taq*-DNA-Polymerase, 4 µl cDNA und ddH₂O ad 15 µl. Das PCR-Programm war:

2 min	94 °C	
30 sec	94 °C	}
30 sec	54 °C	
1 min 30 sec	72 °C	} 41x
7 min	72 °C	

Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel eluiert (2.8.4). Die radioaktive Markierung erfolgte in einem 20 µl-Ansatz der folgende Komponenten enthielt: 2 µl 10x dNTP-Mix (-dATP), 5 µl α-[³³P]-dATP, 1x *Taq*-Puffer, je 0,5 µM Oligonukleotid (*TIP1;1spec_f* und *TIP1;1spec_r*), 1,25 U *Taq*-DNA-Polymerase, 5 ng PCR-Produkt und ddH₂O ad 20 µl. Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und damit eine PCR gestartet:

5 min	94 °C	
1 min	94 °C	}
1 min	54 °C	
1 min	72 °C	} 41x
7 min	72 °C	

10x dNTP-Mix (-dATP)

20 µM dGTP

20 µM dCTP

20 µM dTTP

Das PCR-Produkt wurde über AutoSeq™ G-50 Säulchen (Amersham Pharmacia) aufgereinigt und 1 µl im Szintillationszähler gemessen. Vor der Hybridisierung wurde das markierte PCR-Fragment denaturiert (5 min 95 °C und anschließend auf Eis gekühlt). Zur Hybridisierung wurden 2-3 x 10⁶ cpm eingesetzt. Die Hybridisierung, das Waschen der Filter bzw. die Auswertung erfolgten wie in 2.10.6 beschreiben.

2.10 Der DNA-Microarray

Im Gegensatz zur Northern-Analyse, bei der die mRNA bzw. Gesamt-RNA auf eine Membran immobilisiert und mit einer markierten Sonde hybridisiert wird, werden bei der Array-Technik die Sonden selbst auf eine Membran (bzw. anderer Materialien wie z.B. Glas) aufgebracht und mit markierter cDNA hybridisiert. Diese Technik („reverse Northern-Analyse“) erlaubt die parallele Untersuchung einer großen Zahl an Transkripten in einem einzigen Experiment. Die Array-Technik stellt somit ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung von ganzen Transkriptomen dar. Als Sonden werden häufig cDNAs, spezifische PCR-Fragmente bzw. Oligonukleotide verwendet. Die Markierung der cDNA erfolgt zumeist über einen Einbau von radioaktiv- bzw. Fluoreszenzfarbstoff-markierten Nukleotiden bei der Umschreibung der mRNA in cDNA.

2.10.1 Herstellung von Gen-spezifischen Sonden

Viele Gen-Familien enthalten Mitglieder, die auf Transkript-Ebene hohe Homologien zueinander aufweisen. Die MIP-Familie in *A. thaliana* besitzt 38 MIP-ähnliche Sequenzen in ihrem Genom, deren Homologien zueinander oftmals 90 % überschreiten. Der Einsatz von cDNAs als Sonden ist somit nicht geeignet. Aus diesem Grund wurden für alle 38 MIP-ähnlichen Sequenzen Sonden entworfen, die aus dem 3'-UTR-Bereich stammen. Dieser Bereich ist wegen des geringeren Selektionsdrucks auch bei hoch homologen Genen oft sehr unterschiedlich.

In einem ersten Schritt wurden von jedem MIP-Mitglied 30 bp von der kodierenden Sequenz plus 250 bp von dem 3'-UTR-Bereich aus Internet-Datenbanken (2.13) extrahiert und für jede MIP-Subfamilie diese Sequenzen miteinander verglichen. Als Sonden wurde für jedes MIP-Mitglied jener Bereich ausgewählt, der eine möglichst geringe Homologie mit anderen MIP-Mitgliedern zeigte. Es wurde darauf geachtet, dass die Sondenlänge mehr als 100 bp betrug. Diese Sonden-Sequenzen wurden dann mittels einer Datenbank-Recherche bei TAIR (<http://www.arabidopsis.org/home.html>) und in Zusammenarbeit mit MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*) mit annotierten und tatsächlichen EST-Sequenzen verglichen. Diese Informationen gaben Aufschlüsse über mögliche Kreuzhybridisierungen mit anderen Genen (siehe Ergebnisse, Tab. 3.1, 3.1.2.1).

Die Amplifikation der 3'-UTR-Sonden erfolgte über PCR mit den jeweiligen spezifischen Oligonukleotiden. Diese sind im Anhang für alle MIP-3'-UTR-Sonden angegeben. Der PCR-Reaktionsansatz (50 µl) enthielt in der Regel 2 U *Taq*-DNA-Polymerase, 1x *Taq*-Puffer, 0,3 µM je spezifisches Oligonukleotid, 200 µM dNTPs (jedes), 0,5-1 µg genomische DNA und ddH₂O ad 50 µl. Das PCR-Programm war:

5 min	95 °C	} 41x
30 sec	95 °C	
30 sec	x °C (abhängig von den Oligonukleotiden)	
30 sec	72 °C	
7 min	72 °C	

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (2.8.5) und in den pGEM[®]-T Easy Vektor (Promega) ligiert (2.8.6) und in *E. coli* transformiert (2.6.3). Zur Blau-Weiß-Selektion wurden auf LB-Platten (mit 50 µg/ml Ampicillin) 100 µl 100 mM IPTG und 20 µl X-Gal (100mg/ml) ausgestrichen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diesen Platten wurde der Transformationsansatz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die weißen Kolonien (enthalten in der Regel das Insert) wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt und eine Flüssigkultur (4 ml LB mit 50 µg/ml Ampicillin) angelegt. Die Bakterienkulturen wurden mittels PCR-Analyse nochmals auf das Vorhandensein des Inserts überprüft und daraus Glycerin-Stammkulturen angelegt (Bakterienkultur mit 15 % Glycerin), die bei -70 °C gelagert wurden.

2.10.2 Amplifizierung der 3'-UTR-Sonden zum Aufbringen auf die Membran

Für die DNA-Microarray-Analysen muss eine ausreichend große Menge an Sonden auf der Nylon-Membran immobilisiert werden. Die Amplifikation der 3'-UTR-Sonden aus den Glycerin-Stammkulturen erfolgte dabei in 2 PCR-Runden. In der ersten PCR-Runde wurde aus den Glycerin-Stammkulturen die Sonden mittels Vektor-spezifischen Oligonukleotiden M13(22)-f und M13(25)-r amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte im Mikrotiterplattenformat. Der PCR-Ansatz (100 Ansätze je 50 µl) enthielt folgende Komponenten:

ddH ₂ O	1900µl
10x <i>Taq</i> -Puffer	500 µl
20 mM dNTPs (jedes)	50 µl
200 µM M13(22)-f	12,5 µl
200 µM M13(25)-r	12,5µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	25 µl

In jede Mikrotiterplatten-Vertiefung wurden 25 µl ddH₂O vorgelegt. Mit einer Impföse wurden dann die Klone aus den Glycerin-Stammkulturen in die Mikrotiterplatte übertragen. Pro Mikrotiterplatten-Vertiefung wurden 25 µl PCR-Ansatz zugegeben. Das PCR-Programm war:

5 min 30 sec	95 °C	} 41x
1 min	95 °C	
45 sec	57 °C	
2 min	72 °C	
7 min	72 °C	

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und anschließend 1:50 verdünnt. Je 5 µl wurden dann für eine *nested*-PCR eingesetzt. Diese *nested*-PCR wurde mit den Vektor-spezifischen Oligonukleotiden SP6 und T7 durchgeführt, die beide in Richtung Insert eingerückt waren. Pro 3'-UTR-Sonde wurden 200 µl PCR, aufgeteilt auf zwei Mikrotiterplatten angesetzt. Der PCR-Ansatz für 200 Reaktionen je 100 µl enthielt:

ddH ₂ O	16,6 ml
10x <i>Taq</i> -Puffer (Hybaid)	2 ml
20 mM dNTPs (jedes)	200 µl
200 µM SP6	50 µl
200 µM T7	50 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	100 µl

Der Puffer der Firma Hybaid (mit weniger Detergenz) wurde verwendet, da damit die besten Hybridisierungssignale erzielt wurden (Glombitza, 2002).

Je 95 µl PCR-Ansatz wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte vorgelegt und je 5 µl aus der Verdünnung der 1. PCR-Runde zupipettiert. Das PCR-Programm war folgendes:

5 min 30 sec	95 °C	
1 min	95 °C	}
45 sec	50 °C	
2 min	72 °C	}
7 min	72 °C	

} 41x

Beide Reaktionen wurden vereinigt und 3 µl zur Überprüfung auf ein Agarosegel aufgetragen. Danach wurden die PCR-Produkte über die Multiscreen PCR[®]-Platte (Millipore) entsalzt und aufkonzentriert. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in 60 µl ddH₂O resuspendiert und erneut 3 µl auf ein Agarosegel aufgetragen. Dies sollte sicherstellen, dass die Sonden die zu erwartende Größe besaßen und die PCR-Produkte sich nicht zu sehr in ihrer Menge unterschieden. Abb. 2.2 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus einem solchen Agarosegel.

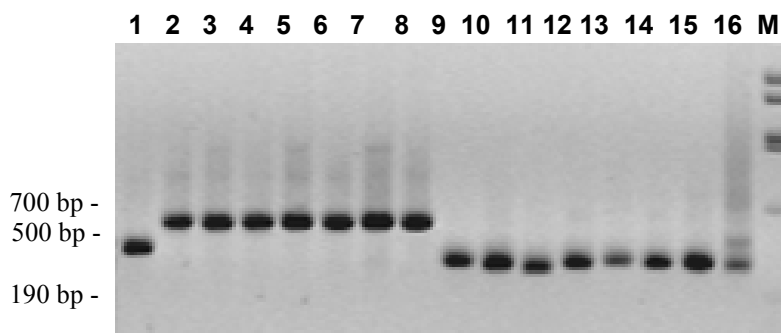


Abb. 2.2: Ausschnitt aus einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel mit Gen-spezifischen Sonden. Aufgetragen sind 3 µl (rd. 600 ng) Sonden nach Reinigung mit den Millipore-Platten. Invertierte Darstellung. M kennzeichnet den DNA-Längenstandard, die Zahlen bezeichnen verschiedene 3'-UTR-Sonden.

2.10.3 Übertragung der 3'-UTR-Sonden auf die Membran

Die Übertragung der 3'-UTR-Sonden auf die Nylon-Membranen (Amersham Pharmacia) erfolgte mit Hilfe des MicroGrid II (BioRobotics). Der Stempel, mit dem die 3'-UTR-Sonden auf die Membranen aufgebracht wurden, enthielt 96 Nadeln, die einen Durchmesser von je 400 µm hatten und pro Nadel ein Volumen von rund 15 nl transferierten. Jede 3'-UTR-Sonde wurde in Duplikaten auf die Membran aufgebracht. Jede Sonde wurde zudem 10x mit Hilfe des Stempels auf dieselbe Stelle übertragen, damit eine ausreichend große Menge an PCR-Produkten auf den Membranen vorlag. Insgesamt wurden 6 Mikrotiterplatten mit je 96 Sonden auf die Membran übertragen. Zusätzlich zu den 3'-UTR-Sonden der *MIPs* enthielten diese Platten 3'-UTR-Sonden von GSTs (Glutathion-*S*-Transferasen), Cytochrom P450-Monooxygenasen, UGTs (UDP-Glycosyltransferasen), ABC-Transporter (Glombitza, 2002) sowie Stress-Markergene aus Kooperationen mit anderen Instituten. Entsprechend den Mikrotiterplatten ergab sich ein 12x8 Muster (Level 1) das sich aufgrund der 6 Platten in ein 4x4 Muster (Level 2) aufspaltete. Abb. 2.3 zeigt dabei die Positionen der 6 Platten auf Level 2-Ebene.

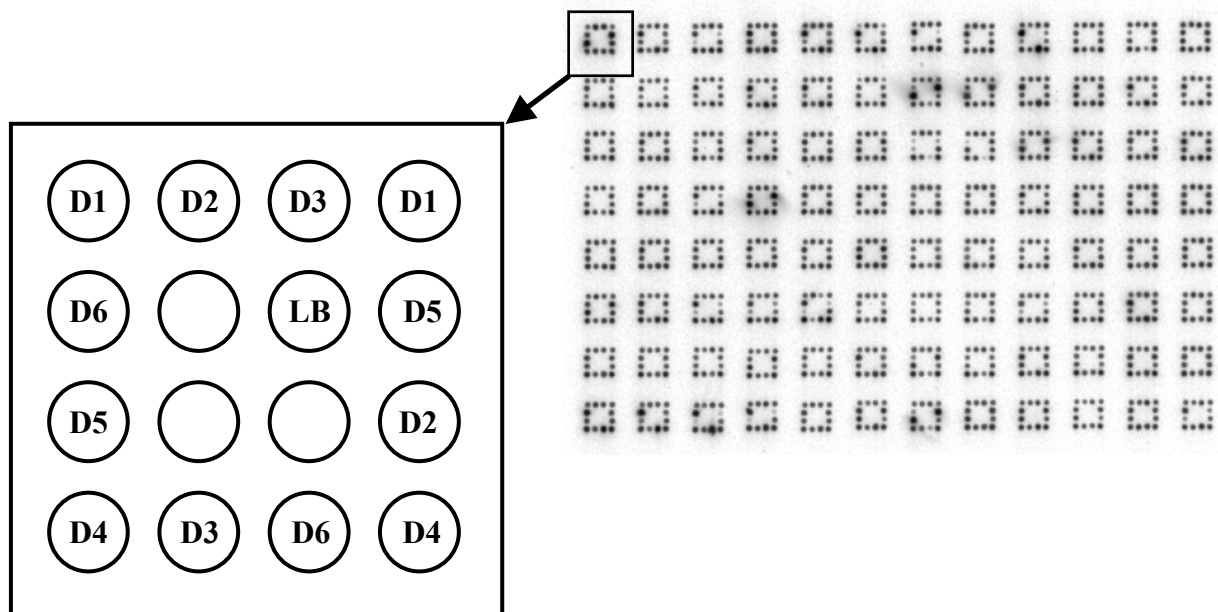


Abb. 2.3: Verteilung der Sonden auf Level 2-Ebene auf dem DNA-Microarray. D1-D6 kennzeichnen die 6 Mikrotiterplatten. LB *Local background*, der in die Verrechnung der Signale einbezogen wurde (2.10.7).

2.10.4 Vorbereitung der Filter für die Hybridisierungen

Nach dem Aufbringen der Sonden auf die Membranen wurden die Sonden mit dem UV-Stratalinker[®] (Stratagene) fixiert (*cross-linked*) und anschließend denaturiert. Dazu wurden die Membranen nacheinander mit 3 Lösungen getränkt. Je Lösung wurden drei Lagen Whatman-Filter befeuchtet und die Membranen mit den Sonden nach oben auf die Whatman-Filter gelegt. Die Lösungen sollten dabei die Membranen schnell durchfeuchten wobei darauf geachtet wurde, dass die Lösungen nicht über die Membran-Oberseite flossen. Nach 5 min wurden die Filter auf die gleiche Weise mit der jeweils nächsten Lösung behandelt. Die Lösungen waren:

Lösung 1

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Lösung 2

1,5 M NaCl
0,5 M Tris/HCl pH 7,5

Lösung 3

2x SSC

Anschließend kamen die Filter in Schalen mit 2x SSC, in denen sie bis zur Neutralisation gewaschen wurden.

Vor der ersten Hybridisierung wurden die Filter 2x 30 min mit 0,4 M NaOH inkubiert und bis zur Neutralisation mit 2x SSC gewaschen. Der Grund für diese Vorbehandlung war, dass Hauser et al. (1998) feststellten, dass die Sonden-Menge auf den Membranen nach der ersten Hybridisierung und anschließendem *strippen* signifikant abnimmt, dann allerdings auch nach

mehrmaliger Hybridisierung relativ konstant bleibt. Die Membranen wurden getrocknet und bei Raumtemperatur bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.10.5 Referenzhybridisierung der Membranen mit dem Oligonukleotid T7

Da das Hybridisierungssignal von der Menge an aufgebrachtener Sonde abhängt, wurden die Membranen in einem ersten Schritt mit einem Vektor-spezifischen Oligonukleotid (T7) hybridisiert. Da alle Sonden in den gleichen Vektor (pGEM[®]-T Easy) kloniert wurden, konnte somit eine Quantifizierung aller Sonden mit einem einzigen Oligonukleotid durchgeführt werden.

Die Membranen wurden zuerst 2-3 Stunden in Plastik-Wannen bei 38 °C im Wasserbad prähybridisiert. Pro Membran wurden 10 ml Prähybridisierungslösung verwendet.

Prähybridisierungslösung

5x SSC
5x Denhardt
0,5 % SDS
100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA (5 min 95 °C, auf Eis abgekühlt)

Die radioaktive Markierung des T7-Oligonukleotids erfolgte durch Phosphorylierung seines 5'-Endes mit dem γ -³³Phosphat des γ -[³³P]-ATPs über eine T4-Polynukleotid-Kinase (PNK, MBI Fermentas). Die Markierungsreaktion pro Membran enthielt:

10 µM T7	2,5 µl
10x PNK Puffer A	1,25 µl
γ -[³³ P]-ATP	1 µl
PNK (10 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	6,75 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert, mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt und über Microspin[™] G-25 Säulchen (Amersham Pharmacia) gereinigt. 1 µl wurde im Szintillationszähler gemessen. Die Gesamtaktivität betrug zwischen 10 und 15x10⁶ cpm. Der gesamte Ansatz wurde dann zur Prähybridisierungslösung zupipettiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 38 °C über Nacht (20 Stunden) im Wasserbad. Am nächsten Tag wurden die Filter folgendermaßen gewaschen:

2x SSC / 0,1 % SDS (w/v)	bei Raumtemperatur spülen
2x SSC / 0,1 % SDS (w/v)	20 min bei 38 °C waschen
0,2x SSC / 0,1 % SDS (w/v)	bei Raumtemperatur spülen
0,2x SSC / 0,1 % SDS (w/v)	20 min bei 38 °C waschen

Die Membranen wurden auf Whatman-Papier gelegt, die zuvor mit 2x SSC getränkt wurden. Dies sollte ein Austrocknen der Membranen verhindern. Anschließend wurden die Membranen in Haushaltsfolie eingewickelt. Diese wurden dann in Film-Kassetten gelegt und eine Imaging-Platte (Fuji) aufgelegt und über Nacht (15-20 Stunden) exponiert. Die Signale auf den Platten wurden mit dem FLA-3000 (Fuji) eingelesen und mit Hilfe des Programms ArrayVision (Interfocus) die Rohdaten (2.10.7) erstellt. Zur Entfernung der radioaktiven T7-Oligonukleotide von den Membranen wurden diese 2x mit 0,4 M NaOH für 30 min gewaschen und mit Hilfe eines tragbaren Kontaminationsmonitors die Gesamtaktivität der

Membranen gemessen. Betrug diese mehr als 15 cpm/Membran, wurden die Membranen wiederholt mit 0,4 M NaOH gewaschen, bis die Gesamtaktivität pro Membran kleiner als 15 cpm war. Die Membranen wurden anschließend mit 2x SSC neutral gewaschen, getrocknet und bis zur komplexen Hybridisierung bei Raumtemperatur gelagert.

2.10.6 Komplexe Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA

Die Markierung der cDNA erfolgt durch Einbau von radioaktiv markiertem dATP in den neu synthetisierten cDNA-Strang. Die Markierung erfolgte in Anlehnung an Hauser et al. (1998). Die spezifische Aktivität wurde dabei auf 1,16 $\mu\text{Ci}/\text{pmol}$ dATP erhöht. Vor der komplexen Hybridisierung wurden die Membranen einzeln in Hybridisierungsröhrchen mit 3 ml Prähybridisierungslösung (2.10.5) für 2,5 Stunden bei 65 °C im Drehofen prähybridisiert.

30 μg Gesamt-RNA wurden in einer Speed-Vac eingedampft und in 10,5 μl DEPC-behandeltem ddH₂O gelöst. 0,5 μl wurden zur Qualitätsüberprüfung auf ein Agarosegel aufgetragen. Zu 10 μl Gesamt-RNA-Lösung kam 1 μl Oligo-dT (Stammlösung 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Es wurde 10 min bei 70 °C inkubiert und die Lösung anschließend für 2-3 min auf Eis schnell abgekühlt. Dazu kamen 7 μl α -[³³P]-dATP (entspricht 70 μCi) sowie 13,5 μl von Mix I.

Mix I

dNTP (7,5 mM jedes ohne dATP)	1 μl
5x Erststrang-Puffer (Life Technologies)	6 μl
0,1 M DTT	3 μl
RNase-Inhibitor (RNasin, MBI Fermentas)	1 μl
32 μM dATP	1 μl
Superscript II (200 U/ μl)	1,5 μl

Die RNA-Lösung wurde für 2 Stunden bei 42 °C inkubiert und anschließend wurden 5 μl Mix II zupipettiert.

Mix II

1 % SDS	1 μl
0,5 M EDTA pH 8,0	1 μl
3 M NaOH	3 μl

Nach weiteren Inkubationen für 30 min bei 65 °C und 15 min bei Raumtemperatur wurden 63 μl Mix III zupipettiert.

Mix III

1 M Tris/HCl pH 8,0	10 μl
2 M HCl	3 μl
ddH ₂ O	50 μl

Die nicht eingebauten Nukleotide wurden über MicroSpinTM S-400 HR Säulchen (Amersham Pharmacia) abgetrennt und 1 μl im Szintillationszähler gemessen. Die radioaktiv markierte cDNA besaß eine Gesamtaktivität von 40-80x10⁶ cpm. Vor der Zugabe zur Prähybridisierungslösung wurde die Probe zur Denaturierung der Sekundärstruktur 5 min bei 95 °C inkubiert und raschest möglich auf Eis (3 min) abgekühlt. Die Probe wurde zur Prähybridisierungslösung zugegeben und die Membranen für mindestens 20 Stunden im Drehofen bei 65 °C hybridisiert. Die Membranen wurden anschließend wie folgt gewaschen:

2x SSC / 0,1 % SDS (w/v)	bei Raumtemperatur spülen
2x SSC / 0,1 % SDS (w/v)	20 min bei 65 °C waschen
0,2x SSC / 0,1 % SDS (w/v)	bei Raumtemperatur spülen
0,2x SSC / 0,1 % SDS (w/v)	20 min bei 65 °C waschen

Die Membranen wurden auf in 2x SSC getränkten Whatman-Filtern gelegt, mit Haushaltsfolie eingewickelt und für 15-20 Stunden auf Imaging Platten (Fuji) exponiert. Am folgenden Tag wurden die auf den Platten gespeicherten Signale mit dem FLA-3000 (Fuji) eingelesen und daraus die Rohdaten mit Hilfe des Softwareprogramms ArrayVision (Interfocus) erstellt.

2.10.7 Auswertung der Signale am DNA-Microarray

Technische Variationen, wie unterschiedlich stark markierte cDNA oder unterschiedlich starker Hintergrund der Membranen kann zu Missinterpretationen der Signale am DNA-Array führen. Hinzu kommt noch, dass die Signalintensitäten von der Menge an aufgetragener DNA abhängen. Beim Auftragen der Sonden auf den Nylonfilter kann es aber vorkommen, dass dieselbe Sonde bei zwei Membranen in unterschiedlicher Menge aufgebracht wird. Im Gegensatz zur Fluoreszenzhybridisierung, bei der Kontrolle und Behandlung auf ein und denselben Array hybridisiert werden kann, werden bei der Arraytechnik mit Radioaktivität Kontrolle und Behandlung auf zwei getrennte Arrays hybridisiert und dann miteinander verglichen und verrechnet. Gerade in diesem Fall ist es besonders wichtig, dass die Filter zuerst normalisiert werden. Um all diese Variationen möglichst auszugleichen, wurde am MPI Golm ein Algorithmus (Haruspex) entwickelt, der Rohdaten zu sogenannten Genaktivitäten normalisiert (Thimm et al., 2001).

Zuerst wurden sowohl von der Referenzhybridisierung als auch von der komplexen Hybridisierung Rohdaten mit Hilfe des Softwareprogramms ArrayVision (Interfocus) erstellt. Mit diesem Programm wurden lediglich die Intensitäten der einzelnen Signale gemessen, es fand noch keine weitere Bearbeitung der Daten (Abzug des Hintergrundes, etc.) statt. Abb. 2.4 zeigt die eingelesenen Signale am FLA-3000 Scanner einer Referenzhybridisierung (A) und einer komplexen Hybridisierung (B) wie sie für die Berechnung der Rohdaten mit ArrayVision (Interfocus) verwendet wurden.

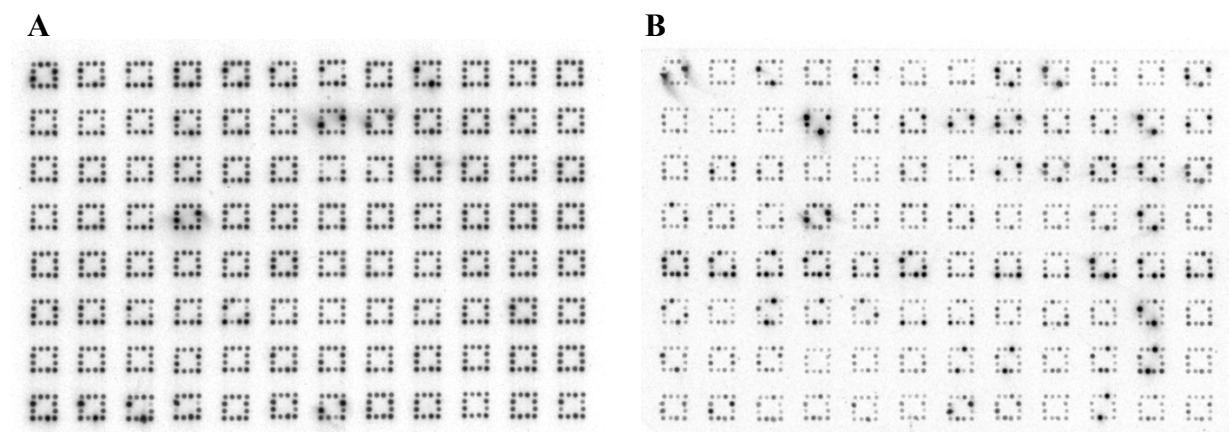


Abb. 2.4: Vergleich einer Referenzhybridisierung (A) mit einer komplexen Hybridisierung (B). Die Referenzhybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierten T7-Oligonukleotiden, die komplexe Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA.

Die Rohdaten der Referenzhybridisierung und der komplexen Hybridisierung wurden dann in der Haruspex-Datenbank zu „Genaktivitäten“ verrechnet.

Sowohl die Referenzhybridisierung als auch die komplexe Hybridisierung wurden zuerst „intern“ (d.h. über alle Messwerte) normalisiert. Von jenen Signalen, deren Intensitäten 2-fach höher als die benachbarten (lokalen) Hintergrundsignale waren (Abb. 2.3, 2.10.3), wurde das lokale Hintergrundsignal abgezogen. Signale, deren Werte 2-fach niedriger als der lokale Hintergrund waren, wurden durch das lokale Hintergrundsignal ersetzt und mit einem Minus als Markierung versehen. Zur Normalisierung wurden anschließend alle Werte durch den Mittelwert aller positiven Werte, nach Abzug des Hintergrundsignals, dividiert.

Die zweite Normalisierung erfolgte, indem jedes intern normalisierte Signal der komplexen Hybridisierung durch sein korrespondierendes, intern normalisiertes Signal der Referenzhybridisierung dividiert wurde.

Da jede 3'-UTR-Sonde in Duplikaten auf den DNA-Microarray aufgetragen wurde, wurde aus diesen beiden Werten der Mittelwert gebildet und als Genaktivität bezeichnet.

Die so entstandenen Genaktivitätswerte dienten als Verrechnungsgrundlage beim Vergleich von Behandlung (z.B. NaCl-gestresste Wurzeln) und Kontrolle (z.B. Wurzeln ohne NaCl-Stress). Um Induktionen oder Repressionen (manchmal als Induktionsfaktoren bezeichnet) von Genen zu berechnen, wurden die Genaktivitäten von der Behandlung durch die Genaktivitäten der Kontrolle dividiert. Beim Vergleich einer Kontrollbehandlung mit einer Stressbehandlung konnte es passieren, dass z.B. in der Kontrollbehandlung der gemessene Wert eines Signals mit einem Minus versehen war, in der Behandlung war hingegen ein deutliches Signal gemessen worden. Um einer solchen augenscheinlichen Induktion einen Wert zu geben, wurde mit dem Betrag des negativ gekennzeichneten Signals in der Kontrolle gerechnet. Diese Induktion entspricht einem Mindestwert, da das Signal bei der Kontrolle den kleinsten messbaren Wert auf Level 2-Ebene bezeichnet, der tatsächliche Wert aber durchaus darunter liegen konnte. Waren die Genaktivitäten sowohl bei Kontrolle als auch bei der Behandlung mit einem Minus versehen, wurden diese aus den Berechnungen herausgenommen. Da alle DNA-Microarray-Experimente dreimal wiederholt wurden, wurden aus den Induktions- und Repressionswerten sowohl der Mittelwert als auch die Standardabweichung bestimmt.

Für die Berechnung der Genexpressionen bei den Organ-Untersuchungen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Genaktivitäten dreier unabhängiger Experimente berechnet. In diesem Fall wurden die negativen Genaktivitäten durch 0 ersetzt und in die Berechnung mit einbezogen.

2.11 Isolierung von Insertionsmutanten

2.11.1 Die *pip2;1*-Mutante

Im Rahmen des ZIGIA- (ehemals AMAZE-) Projekts des MPI Köln werden Insertionsmutanten in *A. thaliana* erstellt. Ziel dieses Projekts ist, eine Mutanten-Kollektion zu erstellen, in der jedes der rund 25.000 nukleären Gene von *A. thaliana* eine Insertion des *En-1*-Elements besitzt. Dazu wurden Pflanzen mit einem Mais-Transposon (*En-1*) transformiert über mehrere Generationen hinweg geselbstet und so eine Population von 11.000 Linien erzeugt, die im Durchschnitt 6 Transposons tragen.

2.11.1.1 Isolierung einer Insertionsmutante im *PIP2;1*-Gen

In Zusammenarbeit mit dem MPI Köln wurden Insertionsmutanten-Linien ermittelt, die ein *En-1*-Element im *PIP2;1*-Gen tragen. Dazu wurde die Insertionsmutanten-Kollektion mittels PCR- und anschließender Southern-Analyse am MPI Köln auf eine *En-1*-Insertion im *PIP2;1*-Gen hin untersucht. Die PCR enthielt 3 Oligonukleotide: 2 *En-1*-spezifische Oligonukleotide (En26 und En8202), die das *En-1*-Gen überspannten, sowie ein *PIP2;1*-spezifisches Oligonukleotid (PIP2abw). Abb. 2.5 zeigt schematisch die Lage der verwendeten Oligonukleotide.



Abb. 2.5: Schematische Lage der Oligonukleotide in der 3-Oligonukleotid-PCR zur Identifikation einer *En-1*-Insertion im *PIP2;1*-Gen. ATG und TGA kennzeichnen Start- und Stop-Codon des *PIP2;1*-Gens, die Pfeile symbolisieren die Oligonukleotide. *En-1* kann dabei in zwei Orientierungen relativ zu *PIP2;1* inseriert sein.

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit einer *PIP2;1*-spezifischen Sonde in einer Southern-Analyse hybridisiert und so eine positive Linie (6AAS98) ermittelt.

2.11.1.2 Bestimmung der genauen Insertionsstelle von *En-1* in der *pip2;1*-Mutante

Die Samen der Linie 6AAS98 wurden ausgesät und von den Pflanzen aus je einem Blatt genomische DNA isoliert (2.8.1.1). Mit Hilfe einer 3-Oligonukleotid-PCR wurden dann jene Pflanzen identifiziert, die ein *En-1*-Transposon enthielten. Es wurden jene Oligonukleotide verwendet, die schon bei der Identifikation der Linie 6AAS98 am MPI Köln verwendet wurden (2.11.1.1). Der PCR-Ansatz (15 μ l) enthielt folgende Komponenten:

10 μ M En26	0,75 μ l
10 μ M En8202	0,75 μ l
10 μ M PIP2abw	0,75 μ l
10x <i>Taq</i> -Puffer	1,5 μ l
20 mM dNTPs (jedes)	0,15 μ l
genomische DNA	2 μ l
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,1 μ l
ddH ₂ O	9 μ l

Das PCR-Programm war:

2 min	85 °C	
40 sec	94 °C	}
1 min	65 °C	
2 min	72 °C	} 41x
5 min	72 °C	

Zur Bestimmung der relativen Orientierung des *En-1*-Elements im *PIP2;1*-Gen wurde von den *En-1*-positiven Pflanzen nochmals eine PCR gestartet, in der die 3-Oligonukleotid-PCR in zwei PCR-Reaktionen mit je 2 Oligonukleotiden aufgespalten wurde. Die erste PCR-Reaktion enthielt die Oligonukleotide PIP2abw und En26, die zweite PIP2abw und En8202. Der Ansatz entsprach dem oben beschriebenen, das Volumen des 3. Oligonukleotids wurde allerdings durch ddH₂O ersetzt. Da nur die PCR-Reaktionen mit dem Oligonukleotid-Paar En26 und PIP2abw ein PCR-Produkt lieferten, war somit die relative Lage des *En-1*-Elements bestimmt.

Um die genaue Insertionsstelle des *En-1*-Elements im *PIP2;1*-Gen zu ermitteln, wurde das PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden PIP2abw und En205 sequenziert. En205 hybridisiert am selben Ende des *En-1*-Elements wie En26 und ist nur in Richtung *En-1*-Genmitte eingerückt (siehe Ergebnisse, Abb. 3.9, 3.4.1.1).

2.11.1.3 Southern-Analyse zur Bestimmung der Anzahl an *En-1*-Elementen in der *pip2;1*-Mutante

Da die Insertionsmutanten des ZIGIA-Projekts in der Regel mehr als nur ein Transposon im Genom der Mutanten besitzen, müssen diese durch wiederholtes Rückkreuzen in den Wildtyp entfernt werden. Um die Anzahl der *En-1*-Elemente in der *pip2;1*-Mutante zu bestimmen, wurde eine Southern-Analyse durchgeführt. Als Hybridisierungs-Sonde wurde ein *En-1*-Teilstück verwendet. Abb. 2.6 zeigt schematisch die Strategie der Southern-Analyse zur Bestimmung der Anzahl an *En-1*-Elementen in der *pip2;1*-Mutante.

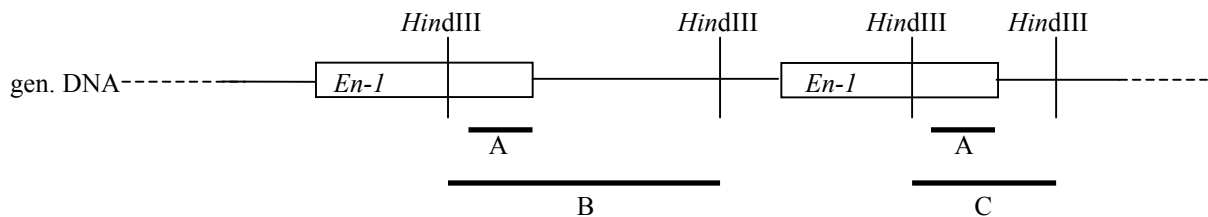


Abb. 2.6: Strategie der Southern-Analyse zur Bestimmung der Anzahl an *En-1*-Elementen in der *pip2;1*-Mutante. Gezeigt ist ein Ausschnitt möglicher *En-1*-Insertionen im Genom der *pip2;1*-Mutante. Die genomische DNA wird mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut und mit einer radioaktiv markierten Sonde (A) hybridisiert. Die am Southern-Blot sichtbaren Fragmente (B, C) entsprechen der Anzahl an *En-1*-Insertionen im Genom der *pip2;1*-Mutante.

Radioaktive Sonden-Markierung für die Southern-Analyse der *pip2;1*-Mutante

Als Sonde für die Hybridisierung von *HindIII* verdauter genomischer DNA der *pip2;1*-Mutante diente ein 5'-Fragment des *En-1*-Elements, das über PCR aus dem Plasmid pACYC177/*En-1* amplifiziert wurde. Das Plasmid pACYC177/*En-1* wurde freundlicherweise von Frau Dr. Sabine Steiner-Lange (MPI Köln) zur Verfügung gestellt. Als Oligonukleotide dienten En1 und En603. Das entstehende Fragment (rd. 400 bp) ist kleiner als erwartet (600 bp), da das *En-1*-Element in diesem Bereich eine interne Deletion trägt (S. Steiner-Lange, pers. Mitteilung). Der PCR-Ansatz (50 µl) enthielt 2 U *Taq*-DNA-Polymerase, 1x *Taq*-Puffer, 200 µM dNTPs (jedes), 2 ng pACYC177/*En-1*, je 0,3 µM der beiden Oligonukleotide En1 und En603 sowie ddH₂O ad 50 µl. Die PCR-Bedingungen waren:

5 min	95 °C	} 41x
30 sec	95 °C	
30 sec	60 °C	
30 sec	72 °C	
7 min	72 °C	

Das entstandene PCR-Produkt wurde aus dem Gel ausgeschnitten und daraus extrahiert. Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte mit dem DecaLabelTM DNA Labelling Kit (MBI Fermentas): Zu 40 ng Sonde (3 µl) kamen 2 µl Decanukleotide (in 5x Puffer) und 1,2 µl ddH₂O. Nach 10-minütiger Inkubation bei 95 °C und anschließender rascher Abkühlung auf Eis kamen 0,6 µl Mix A, 3 µl α-[³³P]-dATP und 0,2 µl Klenow-Enzym hinzu. Nach 10-minütiger Inkubation auf 37 °C wurden 0,8 µl dNTPs (im Kit enthalten) zupipettiert, erneut 5 min inkubiert und schließlich 90 µl 1,1 mM EDTA pH 8,0 zugegeben. 1 µl wurde daraufhin in einem Szintillationszähler gemessen. Um die verbleibenden, nicht eingebauten radioaktiv markierten Nukleotide abzutrennen, wurde der Mix über MicroSpinTM S-400 HR Säulchen (Amersham Pharmacia) gereinigt. Nach der Reinigung wurde erneut 1 µl markierte Sonde im Szintillationszähler gemessen. Die Sonde wurde verwendet, wenn die Einbaurrate mehr als 20 % betrug. Für die Hybridisierung wurde der gesamte Ansatz eingesetzt. Bevor die Sonde zur Hybridisierung verwendet wurde, wurde sie für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Hybridisierung der genomischen DNA mit der *En-1*-Sonde

Aus den geselbsteten Nachkommen der Pflanze 15-0 wurde genomische DNA isoliert (2.8.1.2) und mit *Hind*III verdaut (2.8.7). Die DNA wurde auf einem 0,7 %-igen Agarosegel aufgetrennt, das Gel anschließend kurz mit ddH₂O gewaschen und die DNA in 0,25 M HCl 30 min depuriniert. Das Gel wurde erneut mit ddH₂O gewaschen und in 0,4 M NaOH 20 min neutralisiert. Die DNA wurde mittels Saugverfahren (Sambrook et al., 1989) auf eine Nylonmembran über Nacht in 0,4 M NaOH übertragen. Danach wurde die Membran mit 2x SSC bis zur Neutralisation gewaschen, getrocknet und die DNA im UV Stratalinker[®] fixiert. Anschließend wurde die Membran in 6 ml Prähybridisierungslösung (2.10.5) bei 65 °C für 2-3 Stunden im Drehofen prähybridisiert. Im Anschluss daran wurde die radioaktiv markierte *En-1*-Sonde zugegeben und über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Filter gewaschen (2.10.6.), in Frischhaltefolie eingewickelt und für 15-20 Stunden auf den Imaging-Platten (Fuji) exponiert. Die Auswertung der Signale erfolgte mit dem FLA-3000 (Fuji).

2.11.1.4 Auskreuzen von *En-1*-Elementen aus der *pip2;1*-Mutante

Da sich neben der *En-1*-Insertion im *PIP2;1*-Gen noch weitere Transposons im Genom der Mutante befinden, wurden diese durch wiederholtes Einkreuzen in Wildtyp-Pflanzen entfernt. Dazu wurden neben der Mutante Wildtyp-Pflanzen angezogen. Von noch geschlossenen Blüten des Wildtyps wurden die Kelch-, Blüten- und Staubblätter entfernt, sodass nur noch die Griffel übrig waren. Auf die Narbe wurde dann der Pollen von den Staubblättern der Mutanten-Blüten aufgebracht. Die daraus entstehenden Samen wurden geerntet, erneut ausgesät und die Pflanzen auf das Vorhandensein des *En-1*-Elements im *PIP2;1*-Gen mittels PCR überprüft (2.11.1.2). Zur Überprüfung der Anzahl weiterer *En-1*-Elemente wurde von diesen Pflanzen erneut eine Southern-Analyse durchgeführt (2.11.1.3).

Durch das Einkreuzen in den Wildtyp sind die Pflanzen hemizygot in Bezug auf die *En-1*-Insertion im *PIP2;1*-Gen. Da aber ein völliges Ausschalten der *PIP2;1*-Transkripte für die weiteren Untersuchungen erwünscht war, wurden hemizygoten Pflanzen durch Selbstung in hemizygot mutante Individuen, homozygot mutante Individuen und Wildtyp-Nachkommen aufgespalten. Zur Identifikation dieser Pflanzen wurde aus ihnen genomische DNA isoliert (2.8.1.1) und eine PCR-Analyse durchgeführt. Für jede Pflanze wurden 2 PCR-Reaktionen angesetzt. Die PCR-Reaktion 1 enthielt das *PIP2;1*-spezifische Oligonukleotid 6AA-f und das *En-1*-spezifische Oligonukleotid 6AA-En, PCR-Reaktion 2 die beiden *PIP2;1*-spezifischen Oligonukleotide 6AA-f und 6AA-r. Der PCR-Ansatz entsprach dem von 2.11.1.2, das Volumen des 3. Oligonukleotids wurde aber durch ddH₂O ersetzt. Das PCR-Programm war:

5 min	95 °C	
30 sec	95 °C	}
30 sec	50 °C	
30 sec	72 °C	}
7 min	72 °C	

} 41x

Abb. 2.7 zeigt schematisch die Lage der Oligonukleotide mit den erwarteten PCR-Produkten zur Unterscheidung homozygot mutanter, hemizygot mutanter und Wildtyp-Pflanzen.

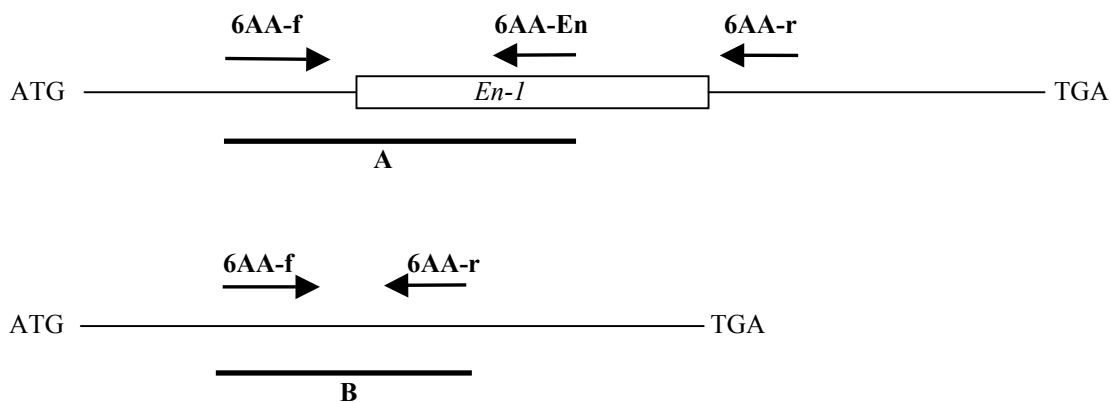


Abb. 2.7 : PCR zur Unterscheidung von homozygot mutanten, hemizygot mutanten und wildtypischen-Pflanzen. A und B kennzeichnen die PCR-Produkte, die bei den angegebenen Oligonukleotid-Kombinationen entstehen. Bei homozygot mutanten Pflanzen entsteht nur PCR-Produkt A (563 bp) (beide Allele besitzen ein *En-1*-Element), bei Wildtyp-Pflanzen nur PCR-Produkt B (314 bp) und bei hemizygot mutanten Pflanzen entstehen sowohl PCR-Produkt A als auch B. ATG und TGA kennzeichnen Start- bzw. Stop-Codon von *PIP2;1*, die Pfeile symbolisieren die Oligonukleotide.

2.11.2 Die *pip1;4*-Mutante

Die *pip1;4*-Mutante stammt aus der Insertionsmutanten-Kollektion, die von Sundaresan et al. (1995) erstellt und beschrieben wurde. Diese Insertionsmutanten enthalten das modifizierte Mais-Transposon *Ds*, das im Gegensatz zum *En-1*-Element nicht autonom ist. Diese Insertionslinien sind bezüglich des *Ds*-Elements stabil und enthalten in der Regel nur ein einziges *Ds*-Element je Insertionslinie. Als Selektionsmarker enthält das *Ds*-Element ein Kanamycin-Resistenz-Gen (*NPTII*). Anhand von Datenbank-Recherchen konnte eine Insertionslinie (N100263) identifiziert werden, die im 2. Exon von *PIP1;4* ein *Ds*-Element

besitzt. Die Samen dieser Linie wurden über NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center, Nottingham, Schottland) bezogen.

2.11.2.1 Erzeugung homozygoter *pip1;4*-Mutanten

Die Samen der Linie N100263 wurden auf MS-Agar mit Kanamycin ausgebaut (2.7.3), anschließend in Erde gesetzt und von jeder Pflanze die genomische DNA aus einem Blatt isoliert (2.8.1.1). Mittels einer 3-Oligonukleotid-PCR wurden *Ds*-positive Pflanzen identifiziert und gleichzeitig die relative Lage des *Ds*-Elements im *PIP1;4*-Gen bestimmt. Abb. 2.8 zeigt schematisch die relative Lage der 3 Oligonukleotide im *PIP1;4*-Gen. Das *Ds*-Element kann dabei in 2 relativen Orientierungen im *PIP1;4*-Gen inseriert sein.

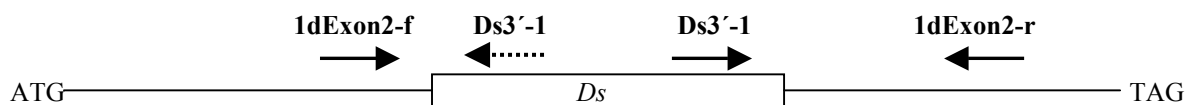


Abb. 2.8: Relative Lage der 3 Oligonukleotide 1dExon2-f, 1dExon2-r und Ds3'-1 in der *pip1;4*-Mutante. ATG und TGA kennzeichnen Start- und Stop-Codon von *PIP1;4*. Die Pfeile symbolisieren die Oligonukleotide. Das *Ds*-Element kann in 2 relativen Orientierungen im *PIP1;4*-Gen vorliegen (durch gestrichelten Pfeil angedeutet).

Die zu erwartenden Größen der PCR-Produkte waren: 1dExon2-f/1dExon2-r: 290 bp (wildtypisches PCR-Produkt ohne *Ds*-Insertion), 1dExon2-f/Ds3'-1: 269 bp, 1dExon2-r/Ds3'-1: 379 bp. Der PCR-Ansatz entsprach dem von 2.11.1.2 mit Ausnahme der verwendeten Oligonukleotide. Das PCR-Programm war:

5 min	95 °C	
30 sec	95 °C	} 41x
30 sec	53 °C	
30 sec	72 °C	
7 min	72 °C	

Da von allen DNAs der Pflanzen nur ein 379 bp großes Fragment in der PCR amplifiziert wurde, waren die Pflanzen einerseits homozygot bezüglich der *Ds*-Insertion und es konnte andererseits die Lage des *Ds*-Elements bestimmt werden (das 3'-Ende des *Ds*-Elements ist zum Stop-Codon von *PIP1;4* hin orientiert; siehe Ergebnisse, Abb 3.15, 3.4.2.1).

Die Pflanzen wurden anschließend in den Wildtyp (Ökotyp *Ler*) gekreuzt (siehe 2.11.1.4). Diese Samen wurden erneut ausgesät und die *Ds*-Insertion mittels oben beschriebener PCR-Strategie überprüft. Diese Pflanzen waren durch die Rückkreuzung in den Wildtyp hemizygot bezüglich der *Ds*-Insertion (aus allen DNAs der Pflanzen wurde sowohl ein 290 bp als auch ein 379 bp großes Fragment amplifiziert). Durch Selbstung dieser Pflanzen segregierten die Nachkommen in homozygot mutante, hemizygot mutante und Wildtyp-Pflanzen bezüglich der *Ds*-Insertion. Die Identifizierung erfolgte mittels PCR wie oben beschrieben mit den 3 Oligonukleotiden 1dExon2-f, 1dExon2-r und Ds3'-1. Aus den DNAs der homozygot mutanten Pflanzen wurde nur ein 379 bp Fragment, aus den DNAs der Wildtyp-Pflanzen nur ein 290 bp Fragment und aus den DNAs hemizygoter Pflanzen sowohl ein 290 bp als auch ein 379 bp Fragment amplifiziert.

2.12 Statistische Analysen

Die statistischen Auswertungen wurden von Dr. Gerhard Welzl, Institut für Biomathematik und Biostatistik (GSF) durchgeführt.

2.13 Internetseiten

Informationen zu Nukleinsäuresequenzen wurden über Datenbank-Analysen, die über das Internet zugänglich sind, eingeholt:

The TIGR Arabidopsis thaliana Database: <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>

MIPS Arabidopsis Thaliana DataBase: <http://mips.gsf.de/proj/thal/>

Arabidopsis Information Resource (TAIR) Database: <http://www.arabidopsis.org/home.html>

National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines DNA-Microarrays zur Untersuchung von Transkripten in *A. thaliana*

Zur Untersuchung von Transkripten können z.B. Northern-Analysen oder quantitative RT-PCR verwendet werden. Diese „klassischen“ Methoden wurden in jüngerer Zeit durch die „Array-Technologie“ ergänzt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eine große Anzahl an Genen parallel untersucht werden kann und wird daher heute bereits vielfach zur Analyse von ganzen Transkriptomen einzelner Organismen herangezogen. Da das Ziel der vorliegenden Arbeit darin bestand, das Transkriptionsverhalten aller *MIP*-Mitglieder in *A. thaliana* zu untersuchen, wurde ein Array entwickelt, auf dem Gen-spezifische Sonden für die gesamte *MIP*-Familie vereinigt waren. Zusätzlich wurden Sonden von Kontrollgenen und Genen aus dem Redox- und Sekundärstoffwechsel (ABC-Transporter, UDP-Glycosyltransferasen, Cytochrom P450-Monooxygenasen und Glutathion-abhängige Enzyme), die alle bei pflanzlichen Abwehrreaktionen während biotischen und abiotischen Stress-Situationen beteiligt sind, auf den Array mit aufgetragen. Dieser DNA-Microarray diente als Basis für die transkriptionellen Untersuchungen der Gene.

Die Organ-spezifische Expression der *MIPs* in *A. thaliana* sollte ein umfassendes Bild der Expression aller *MIP*-Mitglieder in *A. thaliana* liefern. Von vielen *MIP*-Mitgliedern ist bis *dato* noch nicht bekannt, wo sie in der Pflanze exprimiert werden. Dabei war von besonderem Interesse, ob hoch homologe Mitglieder ähnliche Expressionsprofile zeigen. Mit dem umfassenden Bild der *MIP*-Expression konnten auch Organe identifiziert werden, in denen *MIPs* bevorzugt exprimiert werden.

Da von einigen *MIP*-Mitgliedern aus *A. thaliana* bekannt ist, dass sie Aquaporine sind, wurde untersucht, inwieweit Wasserstress, ausgelöst durch NaCl bzw. Sorbitol in der Nährlösung, die Transkription von *MIPs* in Wurzeln und Blättern beeinflusst. Es bestehen bereits Hinweise, dass *MIPs* bei Wasserstress eine Veränderung in ihrem Transkriptgehalt zeigen, dabei wurden allerdings oftmals nur einige wenige *MIPs* untersucht oder bei Transkriptom-Untersuchungen meist cDNAs als Sonden verwendet, die möglicherweise Kreuzhybridisierungen verursachen können. Innerhalb dieser Untersuchungen variierte die Art des Wasserstresses oft sehr stark. Mit dem DNA-Microarray war es nun möglich, ein konsistentes Bild der gesamten *MIP*-Familie zu erstellen und alle Mitglieder zu identifizieren, die durch Wasserstress eine transkriptionelle Änderung zeigen und damit möglicherweise an der Stress-Anpassung in Blättern und Wurzeln beteiligt sind.

Anhand der zusätzlich zu den *MIPs* auf dem Array befindlichen Gen-Sonden wurde der Frage nachgegangen, welche Prozesse durch Wasserstress beeinträchtigt werden bzw. inwieweit NaCl und Sorbitol ähnliche oder unterschiedliche Reaktionen in *A. thaliana* hervorrufen.

Transkript-Untersuchungen an *pip*-Insertionsmutanten wurden durchgeführt, um herauszufinden, wie andere *MIP*-Mitglieder auf das Ausschalten eines PIPs reagieren bzw. welche Prozesse anhand der Transkriptionsprofile von Stress-Markergenen und Genen des Sekundärmetabolismus durch das Fehlen der *MIPs* beeinflusst werden.

3.1.1 Erstellen von Gen-spezifischen Sonden für alle in *A. thaliana* vorhandenen *MIPs*

Die Familie der *MIPs* in *Arabidopsis* besteht aus 38 Mitgliedern, darunter drei Pseudo-Gene, und spaltet sich in vier Subfamilien auf. PIPs (*plasma membrane intrinsic proteins*), TIPs (*tonoplast intrinsic proteins*), NIPs (*NOD26 like intrinsic proteins*) und SIPs (*small basic intrinsic proteins*) (siehe Einleitung, 1.1.1). Die Nukleinsäuresequenzen innerhalb der

Subfamilien sind oft sehr homolog. *PIP2;2* und *PIP2;3* sind dabei die am höchsten homologen Mitglieder mit einer Homologie von 94,8 % im kodierenden Bereich. Ein Einsatz von cDNAs als Sonden ist somit unmöglich, da eine Kreuzhybridisierung eine Unterscheidung der beiden Gene nicht zulässt. Vergleicht man die 3'-UTR (3'-untranslatierte Regionen) der beiden Gene miteinander, so sind diese nur noch zu 47,8 % homolog. Dieser Bereich steht unter einem geringeren Selektionsdruck als der kodierende Bereich, da sich eine Änderung in der Basenfolge nicht zwangsläufig in einer Änderung der Aminosäureabfolge bzw. in einer Veränderung der Transkription widerspiegelt. Somit stellen die 3'-UTR die geeigneten Matrizen zum Design von Gen-spezifischen Sonden dar. In einem ersten Schritt wurden die 3'-UTR der Mitglieder einer Subfamilie miteinander verglichen, da die Homologien zwischen den Mitgliedern innerhalb einer Subfamilie höher waren als zwischen den Mitgliedern verschiedener Subfamilien. Von jedem Gen wurde dann jener Bereich als Sonde ausgewählt, der eine möglichst geringe Homologie mit anderen Genen aufwies. Zusätzlich wurde auch darauf geachtet, dass die Sondenlänge mehr als 100 bp betrug.

3.1.2 Qualifizierung der Gen-spezifischen Sonden

Arabidopsis besitzt ein relativ dichtgedrängtes Genom. Die rund 25.000 Gene sind auf 125 Mb verteilt. Dabei kann es vorkommen, dass sich die 3'-UTR von Transkripten benachbarter Genen überlappen, falls die beiden Gene so orientiert sind, dass sich die 3'-UTR einander gegenüber liegen. Der Abstand der beiden Stop-Codons kann dabei weniger als 200 bp betragen. Dies kann dazu führen, dass eine Sonde nicht nur das entsprechende Gen identifiziert, sondern auch das benachbarte Gen erkennt. Mit Hilfe von Datenbank-Analysen können solche Fälle auffindig gemacht werden. Zusätzlich sollte der Vergleich der Sonde mit allen in *A. thaliana* bekannten Genen und Transkripten Aufschlüsse über mögliche Kreuzhybridisierungen geben.

3.1.2.1 Computergestützte Qualifizierung der Sonden

Die Qualifizierung der einzelnen Sonden erfolgte in Zusammenarbeit mit MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*). Mit Hilfe von Vergleichen mit annotierten Sequenzen aus Datenbanken und tatsächlichen EST-Sequenzen sollten eventuell auftretende hohe Homologien der 3'-UTR-Sonden zu anderen Genen bzw. Überlappungen mit den 3'-UTR benachbarter Gene aufgespürt werden. 3'-UTR-Sonden wurden dann als „zweifelsfrei“ spezifisch eingestuft, wenn sie weniger als 70 % Homologie über 70 bp mit anderen Genen besaßen (siehe auch 3.1.3). Die Überprüfung der Spezifität der 3'-UTR-Sonden erfolgte in einem mehrstufigen Verfahren:

Zuerst wurden alle Sonden mittels FASTA-Algorithmus mit 2 Datenbanken verglichen. Die erste Datenbank enthielt alle in *A. thaliana* annotierten Sequenzen plus je 500 bp vom 3'-UTR als auch vom 5'-UTR. Somit konnten mögliche Kreuzhybridisierungen mit homologen Sequenzen, sowie potenzielle Überlappungen von 2 benachbarten Genen im 3'-UTR auffindig gemacht werden. Um diese hypothetischen Kreuzhybridisierungen zu verifizieren wurden alle Gen-Sonden, die dabei eine Überlappung mit anderen Genen zeigten, mit tatsächlichen cDNA-Sequenzen (ESTs; *expressed sequence tags*) verglichen.

Die zweite Datenbank enthielt die gesamte genomische Sequenz aus *A. thaliana*. Der Vergleich mit dieser Datenbank sollte Homologien in jenen Bereichen aufspüren, die noch nicht bzw. falsch annotiert sind.

In Tab. 3.1 sind die Ergebnisse der Datenbank-Analyse zusammengefasst. Von den 38 Gen-spezifischen Sonden wurden 27 aufgrund der Computer-Analysen als zweifelsfrei spezifisch

eingestuft, d.h. keine Überlappung mit dem 3'-UTR-Bereich des nachfolgenden Gens bzw. keine Homologie mit anderen Genen, die größer als 70 % über 70 bp war.

Bei 5 Gen-Sonden, *NIP1;2*, *NIP7;1*, *TIP1;2*, *NIP5;1* und *TIP2;1* wurden zunächst Überlappungen mit nachfolgenden Genen bzw. Homologien mit anderen Genen angezeigt. Diese Sonden wurden trotzdem aus folgenden Gründen als spezifisch eingestuft:

Die Sonde für *NIP1;2* überlappte mit dem 5'-UTR-Bereich des nachfolgenden Gens. Da der überlappende Bereich 500 bp hinter dem Start-Codon des nachfolgenden Gens liegt, ist es unwahrscheinlich, dass dieser noch transkribiert wird. Es wurde auch kein EST, der diesen Bereich enthält, in den Datenbanken gefunden.

Die *NIP7;1*-Sonde überlappte im 3'-UTR-Bereich des nachfolgenden Gens. Bei diesem Gen handelte es sich um ein in den Datenbanken als „hypothetisches“ Protein bezeichnetes Gen, zu dem auch keine ESTs gefunden wurden.

Die Spezifität der *TIP1;2*-Sonde wurde in einem Experiment (3.1.3) überprüft und ergab, dass sie nicht mit Transkripten des homologen *TIP1;1* kreuzreagierte.

Die 3'-UTR-Sonde zu *NIP5;1* zeigt eine Homologie (80 % über 70 bp) mit dem nachfolgendem Gen. Zu diesem Gen gibt es auch keinen EST in den Datenbanken.

TIP2;1 überlappt mit dem 3'-UTR-Bereich des nachfolgenden Gens über 32 bp. Da dieser Bereich sehr kurz ist, ist eine Kreuzhybridisierung bei stringenten Bedingungen unwahrscheinlich.

Die Sonden für *NIP2;1-PG* und *NIP3;1-PG* zeigten Homologien zu *MIP*-Genen. Da sich Sonden für diese auch auf dem Array befanden, konnte durch den Vergleich mit deren Expressionsmuster eine eventuell stattfindende Kreuzhybridisierung aufgespürt werden.

Die Sonden für *NIP2;1*, *NIP6;1*, *TIP3;1* und *TIP3;2* können Kreuzhybridisierungen verursachen (siehe Tab. 3.1). Wurden für diese Gene bei den Transkriptionsuntersuchungen Expressionen festgestellt, so wurde gesondert darauf hingewiesen.

Die Sonden wurden in ein Datenbank-System in Zusammenarbeit mit MIPS integriert, das auf sich aktualisierende Informationen zu Expressionsdaten (neue EST-Sequenzen bzw. Annotierungen) zugreift. Damit wurden für *MIP*-Sonden, die eventuelle Kreuzhybridisierungen verursachen können bereits neue Sonden entworfen, die aber in die vorliegende Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht integriert werden konnten.

Tab. 3.1: 3'-UTR-Sonden zur Detektion aller in *A. thaliana* vorhandenen *MIPs*.

Gen	Atg-Code	Sonden-Länge in bp	Spezifität/Problem*
<i>NIP1;1</i>	At4g19030	204	1 - o.k.
<i>NIP1;2</i>	At4g18910	200	2 - o.k. (Überlappung im 5'-UTR-Bereich (636-436 bp vor Start-Codon) des nachfolgenden Gens; zu diesem Gen existiert auch kein EST in den Datenbanken (04/2003))
<i>NIP2;1</i>	At2g34390	197	3 - 170 bp Überlappung (100 %) mit nachfolgendem Gen (At2g34380; AA650952)
<i>NIP2;1-PG</i>	At2g29870	203	3 - 89 % Homologie über 98 bp mit NIP2;1
<i>NIP3;1</i>	“At1g31880”	205	1 - o.k.
<i>NIP3;1-PG</i>	At2g21020	202	3 - 69 % Homologie über 205 bp mit NIP3;1
<i>NIP4;1</i>	At5g37810	276	1 - o.k.
<i>NIP4;2</i>	At5g37820	278	1 - o.k.
<i>NIP5;1</i>	At4g10380	203	2 - o.k. (80 % Homologie über 70 bp mit nachfolgendem Gen (At4g10370); Homologie in einem vom Stop-Codon 300 bp entfernt liegenden Bereich; zu diesem Gen existiert auch kein EST in den Datenbanken (04/2003))
<i>NIP6;1</i>	At1g80760	214	3 - 86 bp Überlappung (100 %) mit nachfolgendem Gen (At1g80750; RAFL14-02-M18)
<i>NIP7;1</i>	At3g06100	206	2 - o.k. (Überlappung mit nachfolgendem Gen; Bereich liegt 146 bp nach Stop-Codon; zu diesem „hypothetischen Protein“ gibt es keinen EST in den Datenbanken (04/2003))
<i>PIP1;1</i>	At3g61430	184	1 - o.k.
<i>PIP1;2</i>	At2g45960	156	1 - o.k.
<i>PIP1;3</i>	At1g01620	105	1 - o.k.
<i>PIP1;4</i>	At4g00430	115	1 - o.k.
<i>PIP1;5</i>	At4g23400	173	1 - o.k.
<i>PIP2;1</i>	At3g53420	176	1 - o.k.
<i>PIP2;2</i>	At2g37170	218	1 - o.k.
<i>PIP2;3</i>	At2g37180	195	1 - o.k.
<i>PIP2;4</i>	At5g60660	209	1 - o.k.
<i>PIP2;5</i>	At3g54820	211	1 - o.k.
<i>PIP2;6</i>	At2g39010	208	1 - o.k.
<i>PIP2;7</i>	At4g35100	129	1 - o.k.
<i>PIP2;8</i>	At2g16850	210	1 - o.k.
<i>SIP1;1</i>	At3g04090	204	1 - o.k.
<i>SIP1;2</i>	At5g18290	192	1 - o.k.
<i>SIP2;1</i>	At3g56950	226	1 - o.k.
<i>TIP1;1</i>	At2g36830	183	1 - o.k.
<i>TIP1;2</i>	At3g26520	172	2 - o.k. (71 % Homologie über 117 bp mit <i>TIP1;1</i> . Spezifität mit markierter <i>TIP1;1</i> - Probe überprüft)
<i>TIP1;3</i>	At4g01470	197	1 - o.k.
<i>TIP2;1</i>	At3g16240	205	2 - o.k. (32 bp Überlappung (100 %) mit nachfolgendem Gen (At3g16250; AV560128); da der Bereich sehr kurz ist, sollten bei stringenten Hybridisierungsbedingungen keine Kreuzhybridisierungen auftreten)
<i>TIP2;x-PG</i>	At1g52180	209	1 - o.k.
<i>TIP2;2</i>	At4g17340	193	1 - o.k.
<i>TIP2;3</i>	At5g47450	198	1 - o.k.
<i>TIP3;1</i>	At1g73190	155	3 - 50 bp Überlappung (100 %) mit nachfolgendem Gen (At1g73200; AV567490)
<i>TIP3;2</i>	At1g17810	166	3 - 55 bp Überlappung (100 %) mit nachfolgendem Gen (At1g17820; RAFL09-59-G08)
<i>TIP4;1</i>	At2g25810	201	1 - o.k.
<i>TIP5;1</i>	At3g47440	183	1 - o.k.

* beschreibt die computergestützte Analyse der Sonden: 1 bedeutet, dass eine Homologie mit anderen Genen kleiner als 70 % über 70 bp vorlag und die Sonde nicht mit dem 5'-oder 3'-UTR-Bereich eines nachfolgenden Gen-Transkripts überlappt (zweifelsfrei spezifisch). 2 bedeutet, dass die computergestützte Analyse auf ein bestimmtes Problem hindeutete, die Sonden aber individuell als spezifisch eingestuft wurden. 3 kennzeichnet Sonden, die mit anderen Genen kreuzreagieren können (Homologie größer als 70 % über 70 bp) oder mit dem 3'-UTR-Bereich des nachfolgenden Gens überlappen. Neben dem Atg-Code des kreuzreagierenden Gens ist noch die *Accession-Number* des kreuzreagierenden ESTs angegeben. Die Endung -PG kennzeichnet Pseudo-Gene.

3.1.3 Vergleich einer 3'-UTR-Sonde mit der entsprechenden cDNA-Sonde

Der Einfluss einer Homologie von mehr als 70 % über 70 bp auf eine etwaige Kreuzhybridisierung wurde anhand verschiedener Sonden überprüft. Zu diesem Zweck wurden die beiden homologen Gene *TIP1;1* und *TIP1;2* ausgewählt. Auf den Array wurden 3'-UTR-Sonden von *TIP1;1* und *TIP1;2* sowie ein cDNA-Sonde von *TIP1;2* aufgebracht. Hybridisiert wurde mit einer radioaktiv markierten *TIP1;1*-Probe. Die *TIP1;1*-Probe hatte eine Homologie von 100 % über 183 bp mit der *TIP1;1*-3'-UTR-Sonde, 71 % über 117 bp mit der 3'-UTR-Sonde von *TIP1;2* und 79 % Homologie über 645 bp mit der *TIP1;2*-cDNA-Sonde. Abb. 3.1 zeigt schematisch die Lagen der Sonden zur Probe, sowie das Ergebnis der Hybridisierung. Es zeigt sich, dass die *TIP1;1*-Probe mit der *TIP1;2*-cDNA-Sonde kreuzreagierte und ein deutliches Signal gab (Abb. 3.1C). Das schwache Signal der Hybridisierung mit der *TIP1;2*-3'-UTR-Sonde fiel nach Verrechnung unterhalb des lokalen Hintergrundwert (Abb. 3.1B). Wie zu erwarten zeigte die *TIP1;1*-3'-UTR-Sonde ein starkes Hybridisierungssignal (Abb. 3.1A). Wird das normalisierte Hybridisierungssignal der *TIP1;1*-3'-UTR-Sonde auf 100 % gesetzt, so beträgt das relative Hybridisierungssignal der kreuzreagierenden *TIP1;2*-cDNA-Sonde 40 %.

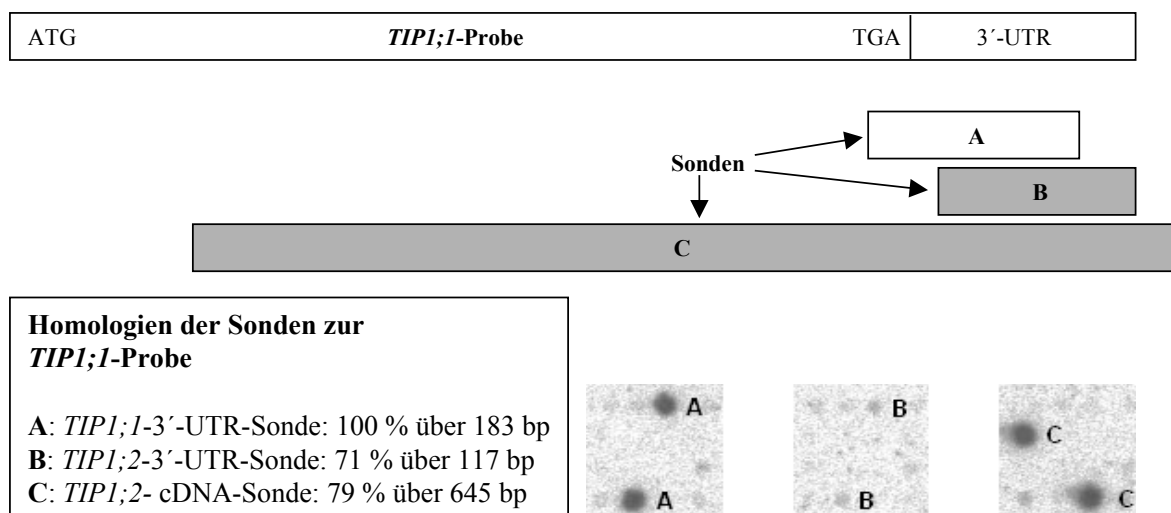


Abb. 3.1: Relative Lage der drei Sonden zur Hybridisierungs-Probe. Gezeigt ist auch das Ergebnis der Hybridisierung der Probe mit den drei Sonden (jeweils in Duplikaten aufgetragen). A *TIP1;1*-3'-UTR-Sonde, B *TIP1;2*-3'-UTR-Sonde und C *TIP1;2*-cDNA-Sonde.

3.2 MIP-Transkripte in Organen und Keimlingen von *A. thaliana*

Mit Hilfe dieses DNA-Microarrays wurden Transkriptionsprofile der in *A. thaliana* vorhandenen MIPs untersucht. Dies sollte Hinweise darauf geben, welche MIPs in welchen Organen bzw. Keimlingen bevorzugt transkribiert sind, bzw. welche MIPs ubiquitär in der Pflanze zu finden sind. Für die Untersuchung wurden Pflanzen (Ökotyp Col-R) hydroponisch angezogen und zu bestimmten Zeitpunkten Material geerntet: Blätter und Wurzeln wurden nach 3 Wochen, Stängel und Blüten nach 5 Wochen und noch grüne Schoten nach 6 Wochen geerntet.

In Abb. 3.2 sind die Ergebnisse der Transkriptionsuntersuchungen zusammengefasst. Zusätzlich werden Daten aus einem unabhängigen Experiment an 7 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen (Ökotyp *Ler*) dargestellt. Da es sich bei den Keimlingen um einen anderen Ökotyp handelt, wird dieses *MIP*-Transkriptionsprofil etwas gesondert dargestellt. Zur bessern Übersicht wurden die *MIPs* nach ihrer Sequenzhomologie auf Proteinebene geordnet (Vector-NTI Suit 6.0 (Informax); TreeView (Page, 1996)).

	Wurzel	Stängel	Blatt	Blüte	Schote	Keimling	
NIP	<i>NIP1;1</i>	1,09±0,41				0,09±0,04	
	<i>NIP1;2</i>	0,13±0,23		0,21±0,19		0,04±0,07	
	<i>NIP2;1-PG</i>						
	<i>NIP2;1*</i>						
	<i>NIP3;1-PG</i>	1,16±0,84					
	<i>NIP3;1</i>						
	<i>NIP4;1</i>						
	<i>NIP4;2</i>						
	<i>NIP5;1</i>	0,33±0,36					
	<i>NIP6;1*</i>	0,82±0,49	0,39±0,07		0,64±0,02	0,53±0,05	
<i>NIP7;1</i>							
TIP	<i>TIP5;1</i>						
	<i>TIP4;1</i>	1,54±0,79				0,03±0,06	
	<i>TIP1;3</i>						
	<i>TIP1;1</i>	39,31±30,58	3,44±0,18	2,01±1,07	3,91±0,73	0,79±0,14	0,25±0,06
	<i>TIP1;2</i>	30,17±5,4	7,28±1,35	8,90±3,32	8,18±3,65	0,72±0,25	0,78±0,21
	<i>TIP3;1*</i>					0,72±0,64	
	<i>TIP3;2*</i>					0,50±0,43	
	<i>TIP2;x-PG</i>						
	<i>TIP2;1</i>	6,09±3,87	3,17±0,21	1,73±0,52	4,31±2,63	0,34±0,15	0,21±0,03
	<i>TIP2;2</i>	27,03±6,02	1,36±0,11	1,34±0,55	0,54±0,47	0,53±0,05	0,11±0,09
<i>TIP2;3</i>	9,58±4,00						
PIP	<i>PIP1;5</i>	3,68±2,01	2,73±0,46	0,18±0,32	0,54±0,47	1,43±0,14	0,05±0,04
	<i>PIP1;1</i>	35,15±13,25	1,73±0,46	1,03±0,25	1,70±0,50	1,17±0,12	0,45±0,06
	<i>PIP1;2</i>	14,64±6,67	3,55±1,13	2,16±0,47	3,28±0,56	1,23±0,23	0,47±0,09
	<i>PIP1;3</i>	6,25±4,60					0,05±0,05
	<i>PIP1;4</i>	1,13±1,14	1,53±1,34		4,1±0,69	2,03±0,13	0,31±0,08
	<i>PIP2;4</i>	2,11±0,62					
	<i>PIP2;1</i>	15,76±6,04	4,36±1,06	2,96±2,96	2,12±0,28	1,72±0,16	0,10±0,09
	<i>PIP2;2</i>	26,21±13,88	0,69±0,18	0,12±0,22			0,28±0,07
	<i>PIP2;3</i>	1,73±0,71	0,12±0,21			0,71±0,09	0,07±0,08
	<i>PIP2;7</i>	3,16±1,23			5,44±1,28		0,13±0,12
<i>PIP2;8</i>	0,09±0,15						
SIP	<i>PIP2;5</i>			0,94±0,26	1,25±0,19	0,04±0,04	
	<i>PIP2;6</i>		1,36±0,21	1,57±0,58	2,38±0,43	0,99±0,17	0,71±0,24
	<i>SIP2;1</i>	0,98±0,44	0,27±0,05		0,37±0,01	0,61±0,12	0,13±0,04
	<i>SIP1;1</i>	0,70±0,17	0,51±0,10	0,05±0,09	0,56±0,07	1,16±0,58	0,22±0,01
	<i>SIP1;2</i>	0,05±0,09				0,18±0,17	

Abb. 3.2: Organ-spezifische Expression (Ökotyp Col-R) bzw. Expression in Keimlingen (Ökotyp *Ler*) aller in *A. thaliana* vorhandenen *MIPs*. Die Zahlen (Genaktivitätswerte) stellen Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente ± Standardabweichung dar und geben eine relative Expressionshöhe an. Die Unterlegung in Graustufen dient der Verdeutlichung der Expressionshöhen. Schwarz bedeutet nicht detektiert, weiß stark exprimiert. Sonden, die mit * markiert sind, können Kreuzhybridisierungen aufweisen. Die Endung -PG kennzeichnet Pseudo-Gene.

Obgleich ein direkter quantitativer Vergleich der Expressionen aufgrund der Unterschiede in den Sonden-Sequenzen vermutlich nicht möglich ist, können dennoch qualitative Expressions-Unterschiede bei verschiedenen *MIP*-Mitgliedern beschrieben werden.

Die Transkriptionsprofile der vier *MIP*-Subfamilien zeigten unterschiedliche Expressionsmuster. Mitglieder aus der *PIP*- bzw. *TIP*-Subfamilie waren die abundantesten *MIPs*. Die höchsten Expressionen wurden dabei in der Wurzel detektiert. *TIP1;1*, *TIP1;2* und *PIP1;1* waren die am stärksten exprimierten *MIPs*. Neun Gene inklusive zweier Pseudo-Gene konnten in keinem der untersuchten Organen bzw. Keimlingen detektiert werden. Darunter waren sechs *NIPs* und drei *TIPs*. Alle *PIPs* und alle *SIPs* konnten zumindest in einem Organ/Keimlingen detektiert werden. Die Wurzel war jenes Organ, in dem die meisten *MIPs* exprimiert wurden (24 von 38), im Blatt wurden hingegen die wenigsten *MIPs* detektiert (11 von 38). Hoch homologe Mitglieder einer *MIP* Subfamilie zeigten oftmals unterschiedliche Expressionsmuster (z.B. *PIP2;2* und *PIP2;3*), nur die beiden *TIP1*-Homologe *TIP1;1* und *TIP1;2*, sowie die beiden *PIP1*-Homologe *PIP1;1* und *PIP1;2* zeigten ähnliche Transkriptionsprofile.

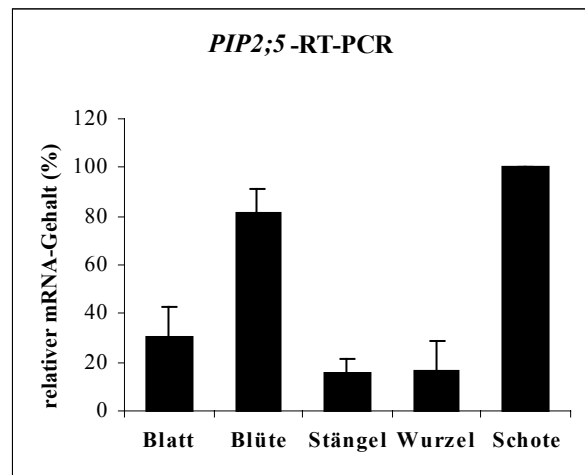
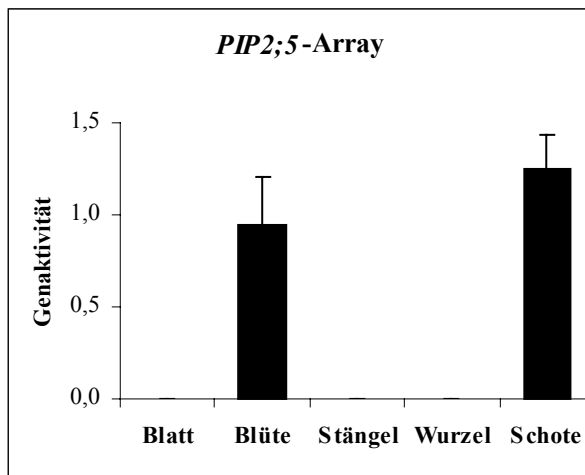
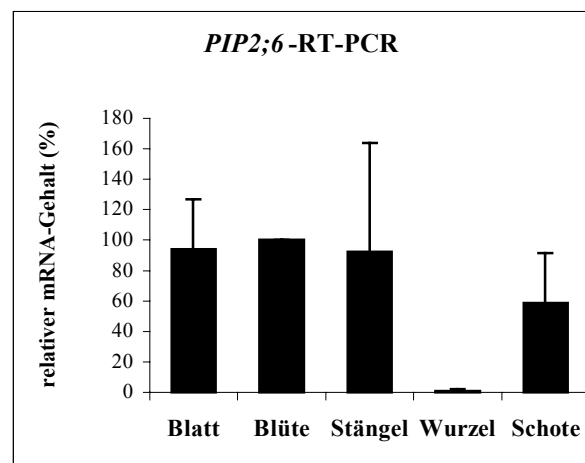
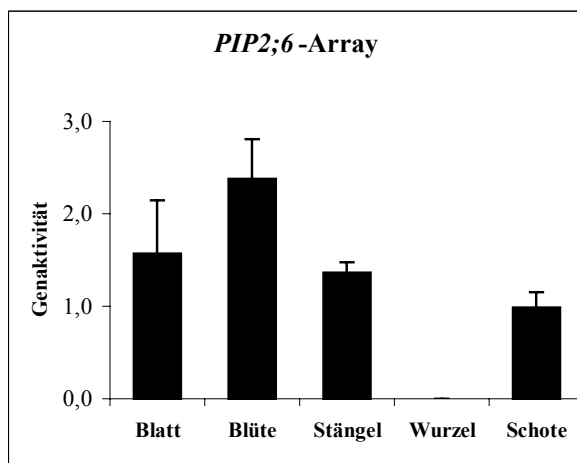
Einige Mitglieder aus der *TIP*-Subfamilie sind ubiquitär exprimiert. Transkripte für *TIP1;1*, *TIP1;2*, *TIP2;1* und *TIP2;2* wurden in allen Organen bzw. Keimlingen gefunden. Die höchsten Expressionen wurden dabei in der Wurzel festgestellt. In Keimlingen war *TIP1;2* das am höchsten exprimierte *MIP*. *TIP2;3* wurde nur in der Wurzel nachgewiesen, *TIP3;1** und *TIP3;2** (ursprünglich als α - bzw. β -*TIP* bezeichnet) nur in der Schote. *TIP3;1* ist als Samen-spezifisches *MIP* bekannt (Höfte et al., 1992). Keine Transkripte wurden für *TIP1;3*, *TIP2;x-PG* und *TIP5;1* detektiert. *TIP2;x-PG* kodiert nur für die transmembranen Helices H4 und H5 (Qigley et al., 2001), es ist somit unwahrscheinlich, dass dieses Gen in ein funktionelles Protein translatiert wird.

Transkripte für *PIP1;1*, *PIP1;2*, *PIP1;5* und *PIP2;1* wurden in allen Organen und in Keimlingen nachgewiesen. Alle *PIP*-Gene, mit Ausnahme von *PIP2;5* und *PIP2;6* konnten in der Wurzel gefunden werden. *PIP2;5* war nur in Blüten, Schoten und Keimlingen exprimiert, *PIP2;6* in Blättern, Blüten, Stängeln, Schoten und Keimlingen. In Keimlingen war *PIP2;6* das am höchsten exprimierte *PIP*-Gen. *PIP2;4*- und *PIP2;8*-Transkripte fanden sich nur in Wurzeln, *PIP1;3*-Transkripte in Wurzeln und Keimlingen. *PIP2;2* wurde stark in der Wurzel exprimiert, geringe Expressionen konnten zudem noch in Blättern, Stängeln und Keimlingen gezeigt werden. *PIP2;3* wurde in Wurzeln, Schoten und Keimlingen detektiert. *PIP1;4* und *PIP2;7* wurden hauptsächlich in Blüten exprimiert. Transkripte zu beiden Genen fanden sich noch in Wurzeln und Keimlingen. Zusätzlich zeigte *PIP1;4* noch eine Expression in Stängeln und Schoten.

Die Mitglieder der *NIP*-Subfamilie waren durchgehend schwach exprimiert. *NIP1;1* und *NIP1;2* Transkripte fanden sich in der Wurzel und in Keimlingen. *NIP1;2* konnte zusätzlich in Blüten nachgewiesen werden. *NIP5;1* war nur in der Wurzel exprimiert, *NIP6;1** zeigte in allen Organen bzw. in Keimlingen mit Ausnahme der Schote eine Expression. Die Expressionsdaten dieses Gens sind aufgrund der möglichen Kreuzhybridisierung der *NIP6;1*-Sonde mit einem anderen Gen nicht gesichert. Die beiden *NIP4*-Mitglieder *NIP4;1* und *NIP4;2*, sowie *NIP7;1*, *NIP3;1*, bzw. *NIP2;1** und *NIP2;1-PG* konnten in keinem untersuchten Organ bzw. Keimlingen detektiert werden. *NIP3;1-PG* zeigte in der Wurzel ein Hybridisierungssignal. Dem *NIP3;1-PG* fehlt ein internes Segment mit den Exons 3 und 4, sowie Teile des Introns 2 und 4 (Qigley et al., 2001). Um das Ergebnis der Array-Analyse zu verifizieren wurde eine RT-PCR Analyse an Wurzeln durchgeführt und dabei die Expression dieses Gens bestätigt (Näheres siehe Anhang, 7.2).

Alle Mitglieder der *SIP*-Subfamilie konnten detektiert werden. *SIP1;1*-Transkripte konnten in allen Organen und Keimlingen nachgewiesen werden, das nahe Verwandte *SIP1;2* nur in Wurzeln und Schoten. *SIP2;1*, das einen separaten Ast der *SIP*-Subfamilie repräsentiert, wurde in Blüten, Stängeln, Wurzel, Schoten und Keimlingen gefunden.

Zur Verifizierung der Daten aus der Array-Analyse wurde bei ausgewählten *MIPs* eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt: *PIP2;6*, da es nur in der Wurzel nicht exprimiert ist, *PIP2;5* und *PIP2;4*, da diese ganz spezifische Expressionsprofile zeigen. In Abb. 3.3 sind die Vergleiche der Array-Analyse mit der semi-quantitativen RT-PCR für die genannten *MIPs* dargestellt. Bei *PIP2;6* stimmen die Expressionsprofile, erzielt mit Array-Technik bzw. semi-quantitativer RT-PCR, gut überein. Unterschiede ergaben sich bei *PIP2;4* und *PIP2;5*. Mit Hilfe der sensitiveren semi-quantitativen RT-PCR wurden Transkripte noch in anderen Organen als in der Array-Analyse detektiert. Die bevorzugten Expressionen in Wurzeln (*PIP2;4*) bzw. Blüten und Schoten (*PIP2;5*) konnte aber mit Hilfe beider Techniken gezeigt werden.



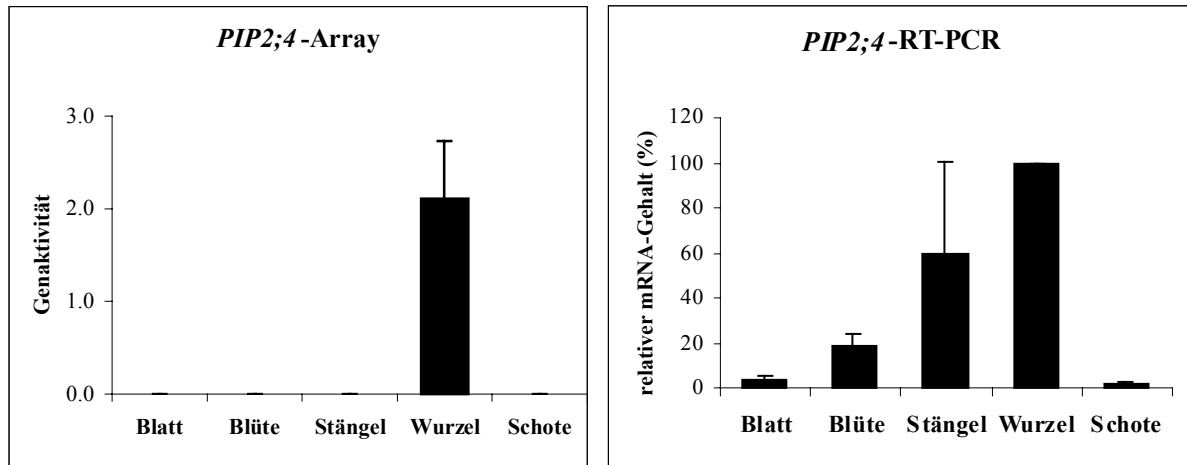


Abb. 3.3: Vergleich der Expressionsdaten von *MIPs* mittels Array-Technik und semi-quantitativer RT-PCR. Genaktivitätswerte bei der Array-Untersuchung stellen Werte relativ zur Expressionshöhe dar. Die Balken sind Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente \pm Standardabweichung. Die Werte aus der RT-PCR-Analyse (relativer mRNA-Gehalt, siehe Material und Methoden, 2.8.10) für die einzelnen Organe wurden prozentual auf jenes Organ bezogen, das für das jeweilige Gen die höchste Expression zeigte. Aus je vier Wiederholungen wurde dann der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet (relativer mRNA-Gehalt (%)).

3.3 Transkriptionsprofile unter Salz- und Sorbitolstress

3.3.1 Verhalten der *MIPs* unter Salz- und Sorbitolstress

Viele *MIPs* fungieren als Wasserkanalproteine (Aquaporine), die den passiven Durchtritt von Wasser über Biomembranen ermöglichen. Aus diesem Grund wurde untersucht, wie sich die Transkripte der *MIPs* bei Wasserstress verhalten und *MIPs* somit bei der Stress-Antwort beteiligt sein könnten. Um die Pflanzen einem Wasserstress auszusetzen, wurden NaCl und Sorbitol als Osmotika ausgewählt. NaCl ruft nicht nur einen osmotischen Stress für die Pflanzen, sondern auch einen ionischen Effekt durch die Toxizität von Na^+ - und Cl^- -Ionen für Proteine und Biomembranen hervor. Die parallele Sorbitol-Behandlung unter iso-osmotischen Bedingungen diente der Unterscheidung, ob NaCl einen ionischen oder osmotischen Effekt auf die Expression der *MIPs* besitzt.

In einem Vorversuch wurden drei Wochen alte Pflanzen, angezogen in hydroponischen Kulturen, mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl und Sorbitol versetzt. Diese waren 50, 100 und 150 mM NaCl bzw. 100, 200 und 300 mM Sorbitol. Dies entsprach iso-osmotischen Bedingungen von 115, 215 und 315 mOsmol/kg Wasser. Die Nährlösung ohne Osmotika besaß eine Osmolalität von 15 mOsmol/kg Wasser. Die Pflanzen mit 300 mM Sorbitol zeigten bereits nach 5 Stunden Welkeerscheinungen. Nach 48 Stunden waren die Pflanzen mit 300 mM Sorbitol welk, mit 200 mM Sorbitol zeigten manche Pflanzen erste Anzeichen von Welkeerscheinungen (eingerollte Blätter, Blätter nicht mehr voll turgeszent), die Pflanzen mit 100 mM Sorbitol zeigten keine Schäden. Bei allen drei NaCl-Konzentrationen zeigten die Pflanzen zu diesem Zeitpunkt keine Schäden. Erst nach 72 Stunden zeigten sich bei den Pflanzen aller drei Sorbitol-Konzentrationen Welkeerscheinungen, die Pflanzen bei 150 mM NaCl zeigten dann auch gelbliche Verfärbungen der Blätter. Für den folgenden Versuch wurde deshalb eine Konzentration von

100 mM NaCl bzw. 200 mM Sorbitol ausgewählt, da dabei keine drastischen phänotypischen, sekundären Schädigungen auftraten.

Arabidopsis-Pflanzen (Ökotyp Col-R) wurden hydroponisch angezogen, nach drei Wochen wurden NaCl und Sorbitol zur Nährlösung zugegeben und nach 5, 24 und 48 Stunden die Blätter und Wurzeln geerntet. Die Osmolalitäten der Nährlösungen blieben während des Versuchs konstant. In Abb. 3.4 sind Pflanzen der Kontrollen, NaCl- und Sorbitol-Behandlung nach 24 und 48 Stunden abgebildet. Die Pflanzen nach 48 Stunden Sorbitolstress zeigten an manchen Blättern leichte Welkeerscheinungen wie eingerollte und nicht mehr voll turgeszente Blätter (Abb. 3.4F).

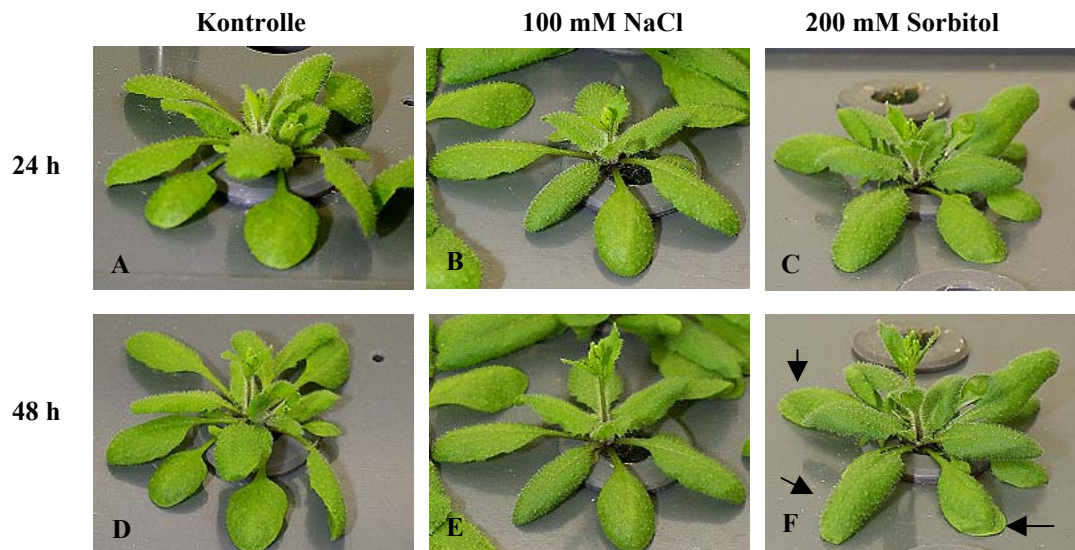


Abb. 3.4: *Arabidopsis*-Pflanzen während Wasserstress. A, B und C zeigen Pflanzen nach 24 Stunden-Behandlung mit 100 mM NaCl (B), 200 mM Sorbitol (C) bzw. Kontrollpflanzen ohne Behandlung (A). D, E und F zeigen Pflanzen nach 48 Stunden-Behandlung mit 100 mM NaCl (E), 200 mM Sorbitol (F) bzw. Kontrollpflanzen (D). Die Pfeile in F zeigen erste Anzeichen von Welkeerscheinungen (eingerollte Blätter) an (vgl. mit C, 24 Stunden Sorbitol).

Die Änderungen der *MIP*-Transkripte bei NaCl- bzw. Sorbitol-Behandlung sind in Abb. 3.5 dargestellt. Dargestellt sind nur jene Gene, die zu mindestens einem Zeitpunkt eine Induktion größer als 1,8 bzw. Repression kleiner 0,6 zeigen.

In der Wurzel sind mehr *MIP*-Gene durch die Behandlung mit NaCl und Sorbitol beeinflusst als im Blatt (21 Gene in der Wurzel, 5 im Blatt). Vergleicht man jene Gene, die in der Wurzel auf NaCl bzw. Sorbitol reagieren mit ihren Organ-Transkriptionsprofilen, so fällt auf, dass ihre Expressionswerte in der Wurzel am höchsten sind. Die Ausnahme bilden nur *PIP1;4*, *PIP2;7* und *SIP1;1*. *PIP1;4* und *PIP2;7* werden am höchsten in Blüten, *SIP1;1* am höchsten in Schoten exprimiert. Zu den durch NaCl/Sorbitolstress reprimierten Genen zählen auch die abundantesten *MIP*-Gene in *A. thaliana* (*TIP1;1*, *TIP1;2*, *TIP2;2*, *PIP1;1*, *PIP1;2*, *PIP2;1* und *PIP2;2*).

In der **Wurzel** steigt mit zunehmender Stress-Dauer die Anzahl der reprimierten Gene von einem nach 5 Stunden, vier nach 24 Stunden auf 20 nach 48 Stunden.

Mit Ausnahme der schwach exprimierten *TIP4;1*, *NIP5;1* und *PIP1;4* zeigten alle auf die Stressoren reagierenden *MIP*-Mitglieder eine Repression.

Vergleicht man die Induktions- bzw. Repressions-Profile der *MIPs* bei NaCl- und Sorbitolstress in der Wurzel, so fällt auf, dass die Reaktionen im Wesentlichen gleichartig sind. Bei *PIP1;4*, *NIP1;1*, *TIP4;1* und *TIP1;2* zeigten sich aber Unterschiede in den Kinetiken. Allerdings sind alle diese *MIP*-Mitglieder mit Ausnahme von *TIP1;2* schwach exprimiert und nur an der Nachweisgrenze detektiert.

Unterschiede bei den beiden Stressoren zeigten sich dadurch, dass bei der Sorbitol-Behandlung einige *MIPs* nach 48 Stunden eine deutliche Repression zeigten, die bei NaCl-Stress unbeeinflusst waren. Dies trifft insbesondere für die hoch exprimierten Aquaporine *PIP1;2* und *PIP2;1* zu. Daneben zeigten *PIP1;5* und die *SIP*-Mitglieder *SIP1;1* und *SIP2;1* ein ähnliches Verhalten.

Im **Blatt** zeigte sich ein anderes Bild. Sowohl bei NaCl- und Sorbitolstress waren die am höchsten exprimierten *TIP*-Mitglieder bereits nach 5 Stunden (mit Ausnahme von *TIP1;1* bei Sorbitol) reprimiert. Zu diesem Zeitpunkt traten in der Wurzel noch keine Transkriptionsänderungen der *MIPs* auf.

Alle hoch exprimierten *PIP*-Mitglieder waren im Blatt unverändert, lediglich die schwach exprimierten *PIP1;5* und *PIP2;7* waren reprimiert.

Gene aus der Subfamilie der *NIPs* bzw. *SIPs* zeigten im Blatt keine Reaktion auf die NaCl- bzw. Sorbitol-Behandlung.

Wurzel		100 mM NaCl			Genaktivität	200 mM Sorbitol		
		5 h	24 h	48 h		5 h	24 h	48 h
NIPs	<i>NIP1;1</i>	0,9 ± 0,5	0,5 ± 0,4	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,4	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,9	0,4 ± 0,2
	<i>NIP3;1-PG</i>	1,5 ± 0,5	2,0 ± 0,8	1,0 ± 0,4	0,4 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,8	0,5 ± 0,3
	<i>NIP5;1</i>	3,0 ± 2,2	1,0 ± 0,0	0,7 ± 0,4	0,4 ± 0,6	2,8 ± 2,8	3,8 ± 2,0	1,4 ± 1,0
TIPs	<i>TIP1;1</i>	1,0 ± 0,5	1,2 ± 0,5	0,6 ± 0,3	7,3 ± 3,5	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,3 ± 0,2
	<i>TIP1;2</i>	0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2	4,8 ± 3,0	0,9 ± 0,6	1,3 ± 0,3	0,4 ± 0,2
	<i>TIP2;1</i>	1,1 ± 0,6	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,3	1,2 ± 0,7	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,3	0,4 ± 0,2
	<i>TIP2;2</i>	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,5 ± 0,3	10,1 ± 6,3	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,4	0,2 ± 0,1
	<i>TIP2;3</i>	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,4	0,4 ± 0,3	2,7 ± 2,0	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,4	0,3 ± 0,1
	<i>TIP4;1</i>	1,8 ± 1,0	1,2 ± 0,7	0,9 ± 0,5	0,5 ± 0,5	2,0 ± 0,4	1,5 ± 1,3	0,5 ± 0,2
PIPs	<i>PIP1;1</i>	0,7 ± 0,5	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,1	21,7 ± 30,6	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,4	0,1 ± 0,0
	<i>PIP1;2</i>	0,7 ± 0,5	1,4 ± 0,3	1,0 ± 0,1	6,0 ± 3,0	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,3 ± 0,2
	<i>PIP1;3</i>	1,0 ± 0,7	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,6	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,3	0,5 ± 0,2
	<i>PIP1;4</i>	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,8	1,1 ± 0,9	0,5 ± 0,4	1,8 ± 0,5	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,3
	<i>PIP1;5</i>	0,7 ± 0,5	1,7 ± 0,8	0,8 ± 0,4	1,3 ± 0,9	1,1 ± 0,6	0,7 ± 0,4	0,3 ± 0,2
	<i>PIP2;1</i>	0,8 ± 0,5	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,6	5,0 ± 5,0	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,5 ± 0,2
	<i>PIP2;2</i>	0,8 ± 0,5	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3	6,6 ± 6,5	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,4
	<i>PIP2;3</i>	0,9 ± 0,6	1,2 ± 0,6	0,6 ± 0,4	1,3 ± 1,0	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,4	0,5 ± 0,3
	<i>PIP2;4</i>	0,7 ± 0,4	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,4	0,9 ± 0,1	1,6 ± 1,1	0,5 ± 0,3
<i>PIP2;7</i>	1,0 ± 0,7	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,3	1,1 ± 0,8	1,4 ± 0,5	1,2 ± 0,4	0,6 ± 0,4	
SIPs	<i>SIP1;1</i>	1,2 ± 0,7	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,6	0,4 ± 0,2	1,6 ± 0,6	0,9 ± 0,3	0,5 ± 0,2
	<i>SIP2;1</i>	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,5	0,8 ± 0,4	0,3 ± 0,3	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,4 ± 0,2

Blatt		100 mM NaCl			Genaktivität	200 mM Sorbitol		
		5 h	24 h	48 h		5 h	24 h	48 h
TIPs	<i>TIP1;1</i>	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,4	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,1
	<i>TIP1;2</i>	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2	2,4 ± 1,7	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,2
	<i>TIP2;1</i>	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,1
PIPs	<i>PIP1;5</i>	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,9 ± 0,5	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,0
	<i>PIP2;7</i>	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0

Abb. 3.5: Auf NaCl- bzw. Sorbitol-Behandlung reagierende MIP-Transkripte in Wurzeln und Blättern aus *A. thaliana*. Die Werte sind Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente ± Standardabweichung. Induktionen größer 2 sind rot unterlegt, Repressionen kleiner als 0,5 sind grün unterlegt. Zusätzlich wurden Gene, die eine Induktion von mindestens 1,8 bzw. Repression von 0,6 zeigen, hellrot bzw. hellgrün unterlegt. Die Genaktivitätswerte stellen Mittelwerte der Expressionswerte (Genaktivitäten) unbehandelter Kontrollpflanzen aller drei Zeitpunkte ± Standardabweichung dar. Die Absolutwerte der Genaktivitäten stimmen nicht mit denen aus Abb. 3.2 überein, da unterschiedliche Sätze an Kontrollgenen zur Normalisierung verwendet wurden. Dies hat aber keinen Einfluss auf die Bewertung zu hoch und niedrig exprimierten Mitgliedern. Zur besseren Übersicht wurden die Genaktivitäten in Graustufen unterlegt. Weiß deutet auf eine hohe Expression (hoher Genaktivitätswert), dunkelgrau auf eine niedrige Expression (geringer Genaktivitätswert) hin.

3.3.2 Unterschiede und Übereinstimmungen in der Reaktion von *A. thaliana* auf NaCl- und Sorbitolstress mittels bekannter Stress-Markergene sowie Gene des Sekundärmetabolismus

Die parallele Transkript-Analyse von Genen des Sekundärmetabolismus und bekannter Stress-Markergene ermöglichte weitergehende Aussagen zur Reaktion der Pflanze *A. thaliana* auf eine NaCl- und Sorbitol-Applikation.

In Abb. 3.6 sind die Reaktionen aller auf dem DNA-Array aufgetragener Gene während Salz- bzw. Sorbitol-Behandlung zusammengefasst. Es zeigte sich, dass zu jedem Zeitpunkt mehr als 75 % der Gene unverändert bleiben.

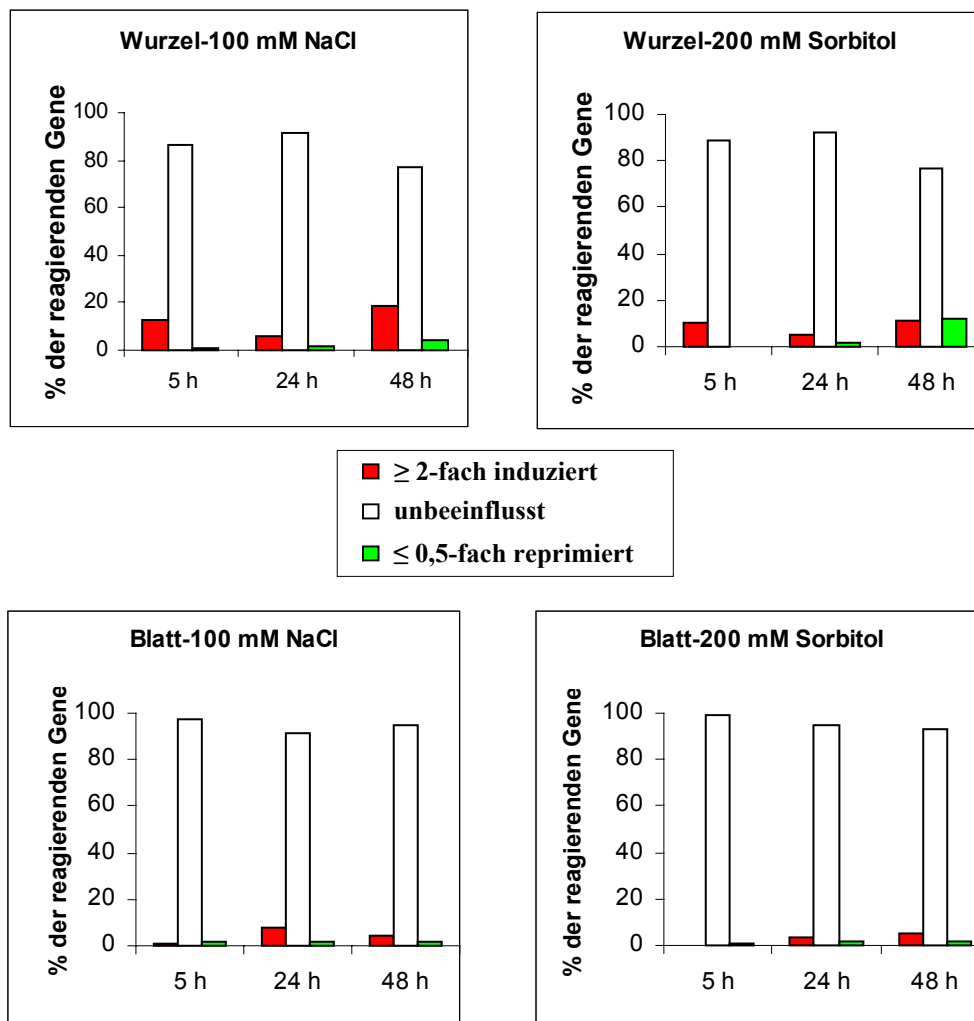


Abb. 3.6: Reaktionen aller auf dem DNA-Microarray aufgetragener Gene während NaCl- bzw. Sorbitolstress. Die Prozentangabe bezieht sich auf die Summe der gemessenen Transkriptions-Antworten aller auf dem DNA-Microarray befindlicher Gene zu den jeweiligen Zeitpunkten in Wurzeln bzw. Blättern bei NaCl- bzw. Sorbitolstress. Rote Balken kennzeichnen Gene, die mindestens 2-fach induziert sind, grüne Balken kennzeichnen Gene, die um mindestens die Hälfte reprimiert werden. Weiße Balken repräsentieren Gene, die weder induziert noch reprimiert werden (Induktion kleiner 2-fach, Repression größer 0,5-fach).

Von den insgesamt 533 untersuchten Genen reagierten 222 (rd. 40 %) zu mindestens einem Zeitpunkt in Blättern bzw. Wurzeln bei NaCl- bzw. Sorbitolstress. Davon waren 147 spezifisch in der Wurzel, 23 Gene spezifisch im Blatt und 52 sowohl in der Wurzel als auch im Blatt induziert/reprimiert. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch, wenn die

Transkriptionsänderungen der beiden Stressoren separat betrachtet werden: Bei der NaCl-Behandlung waren 103 Gene Wurzel-spezifisch, 22 Gene Blatt-spezifisch und 28 Gene in Wurzeln und Blättern gemeinsam induziert/reprimiert. Bei der Sorbitol-Behandlung waren 116 Gene Wurzel-spezifisch, 24 Gene Blatt-spezifisch und 26 Gene in Blatt und Wurzel gemeinsam induziert/reprimiert.

Innerhalb der untersuchten 48 Stunden Stress-Dauer reagierten von den 222 Genen 100 (45 %) sowohl auf den NaCl-Stress als auch auf den Sorbitolstress, 53 spezifisch auf den NaCl-Stress (24 %) und 69 spezifisch auf den Sorbitolstress (31 %).

Als Markergen diente *RD29A* (*cor78; lti78*), das vielfach durch Salz- bzw. osmotischen Stress induziert beschrieben wurde (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994; Kreps et al., 2002). Tab. 3.2 zeigt das Induktionsverhalten dieses Gens in Blättern und Wurzeln bei NaCl- und Sorbitol-Behandlung zu den drei untersuchten Zeitpunkten.

Tab. 3.2: Induktionsprofil von *RD29A*

Gen	Atg-Code	W, 5 h		W, 24 h		W, 48 h		B, 5 h		B, 24 h		B, 48 h	
		N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S
<i>RD29A</i> (<i>cor78; lti78</i>)	At5g52310												

Dargestellt ist die Induktion von *RD29A* bei NaCl (N)- bzw. Sorbitolstress (S) in Wurzeln (W) bzw. Blättern (B) nach 5, 24 und 48 Stunden Stress-Dauer. Rot unterlegt ist eine Induktion von mindestens 2-fach, weiß bedeutet weder induziert noch reprimiert.

In der **Wurzel** war *RD29A* nach 5 Stunden Stress-Behandlung sowohl durch NaCl als auch durch Sorbitol induziert. Nach 24 Stunden zeigte das Gen keine Induktion, nach 48h Stunden war es wieder durch Sorbitol induziert.

Im **Blatt** war *RD29A* zu allen Zeitpunkten durch die NaCl-Behandlung induziert. Die Induktion durch Sorbitol begann hingegen erst nach 24 Stunden und setzte sich nach 48 Stunden fort.

Einen ähnlichen Unterschied der Induktionskinetik von *RD29A* in Wurzeln und Blättern bei NaCl- und Mannitolstress konnten Kreps et al. (2002) anhand ihrer Transkriptom-Untersuchungen feststellen. *RD29A* war in Blättern und Wurzeln nach 3 Stunden NaCl- und Mannitol-Behandlung induziert, nach 27 Stunden Stress-Dauer war *RD29A* nur mehr in Blättern induziert, in Wurzeln hingegen nicht mehr. Referenzwerte für den späteren Zeitpunkt bei 48 Stunden wurden unter deren Versuchsbedingungen nicht erhoben. *RD29A* ist in vorliegenden Experimenten im Blatt nach Sorbitolstress später induziert als in den vergleichbaren Experimenten von Kreps et al. (2002) mit Mannitol.

Der Transkriptionsverlauf von *RD29A* zeigt auch, dass überlappende oder spezifische Stress-Reaktionen bei einer Untersuchung mit nur einem Zeitpunkt bzw. in nur einem Organ übersehen werden können (siehe auch: Kreps et al., 2002).

Anhand der spezifischen Reaktionen der untersuchten Gene bei NaCl- bzw. Sorbitolstress konnten Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Stress-Situationen herausgearbeitet werden. Dazu wurde anhand von Venn-Diagrammen (Abb. 3.7) untersucht, wie sich die Profile der induzierten/reprimierten Gene unter NaCl- bzw. Sorbitolstress mit der Stress-Dauer verändern, und wie sich Blätter und Wurzeln dabei unterscheiden. Im Anhang (7.3) sind die entsprechenden Gene aufgelistet.

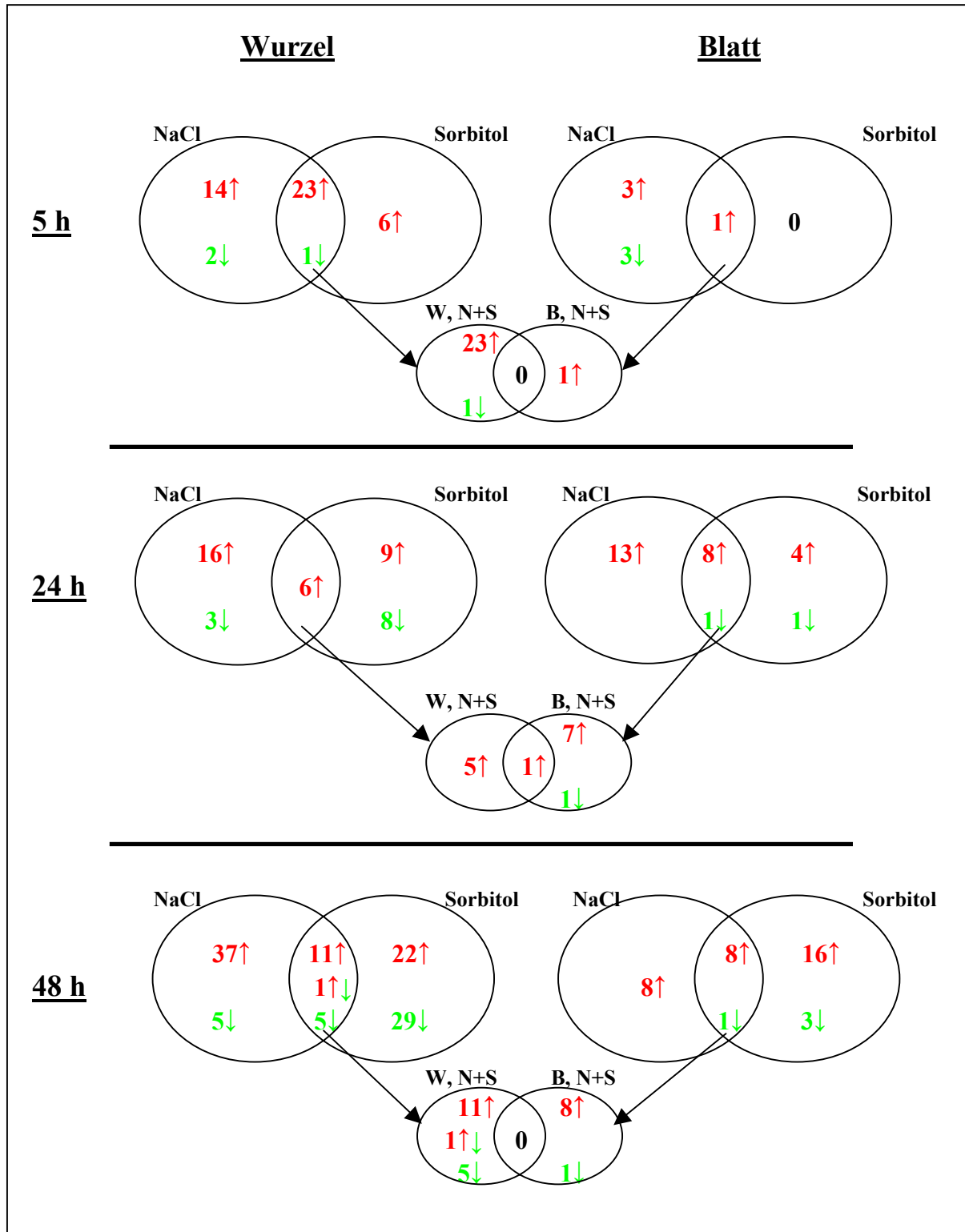


Abb. 3.7: Venn-Diagramme, die gemeinsame bzw. spezifische Stress-Antworten bei NaCl- (N) und Sorbitol-Behandlung (S) in der Wurzel (W) bzw. im Blatt (B) nach 5, 24 und 48 Stunden Stress-Dauer zeigen. Die Zahlen in den Diagrammen geben die Anzahl der reagierenden Gene zu den einzelnen Zeitpunkten an. Rote Zahlen kennzeichnen die Anzahl der induzierten (>2-fach), grüne die Anzahl der reprimierten (<0,5-fach) Gene.

In der **Wurzel** nimmt die Anzahl der Stressor-spezifisch reagierenden Gene mit der Stress-Dauer zu. Dabei ist gerade durch Sorbitol im Zeitraum zwischen 5 und 24 Stunden ein deutlicher Anstieg der beeinflussten Gene zu verzeichnen. Nach 48 Stunden kommt es nochmals zu einem deutlichen Anstieg an spezifisch durch NaCl bzw. Sorbitol induzierten/reprimierten Genen, wobei mehr Gene durch Sorbitol spezifisch verändert werden als durch NaCl. Parallel nimmt die Anzahl an Stressor-überlappenden Genen innerhalb von 24 Stunden zunächst ab. Nach 48 Stunden kommt es dagegen wieder zu einem Anstieg dieser Gengruppe.

Im **Blatt** zeigt sich ein etwas anderes Bild: Innerhalb von 48 Stunden nimmt die Anzahl an Sorbitol-spezifisch induzierten bzw. reprimierten Genen zu, die Anzahl an spezifisch durch NaCl beeinflussten Genen nimmt zwar innerhalb der ersten 24 Stunden auch zu, nach 48 Stunden verringert sich aber deren Zahl wieder. Wie in der Wurzel kommt die Sorbitol-spezifische Antwort im Vergleich zu NaCl, zumindest was die Quantität der reagierenden Gene betrifft, zeitlich verspätet. Nach 48 Stunden sind dann auch mehr Gene spezifisch durch Sorbitol als durch NaCl in ihrer Transkription beeinflusst. Im Gegensatz zur Wurzel kommt es innerhalb der ersten 24 Stunden zu einem deutlichen Anstieg an Stressor-überlappenden Genen, deren Anzahl nach 48 Stunden aber konstant bleibt.

Beim Vergleich von Blatt und Wurzel fällt auf, dass zu jedem Zeitpunkt mehr Gene in der Wurzel als im Blatt durch die beiden Stressoren beeinflusst werden. Anhand der fehlenden Überlappung von Blatt und Wurzel bei Stressor-überlappend reagierenden Genen ist weiters ersichtlich, dass in den beiden Organen unterschiedliche Gene in ihrer Transkription beeinflusst werden. Die einzige Ausnahme bildet *GSTF7*, das gemeinsam durch beide Stressoren in beiden Organen nach 24 Stunden induziert ist.

Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der beiden Stressoren NaCl bzw. Sorbitol in Wurzeln bzw. Blättern wurden auch anhand einzelner Gene bzw. Mitglieder von Gen-Familien deutlich.

Neben *RD29A* zeigten eine Glyoxalase II (*GLXII.4*) sowie die Glutathion-abhängige Peroxidase *GPXI* und die neutrale Peroxidase *PRXCB* sowohl in Wurzeln als auch in Blättern eine Induktion auf Salz- und Sorbitolstress. Wohingegen die genaue Funktion von *RD29A* noch nicht bekannt ist, deutet die Induktion von *GPXI* und *PRXCB* auf eine Beteiligung dieser Enzyme bei der Entgiftung von H_2O_2 hin, das bei osmotischem Stress als ROS gebildet wird (Jiang und Zhang, 2002).

Aus der GST- (Glutathion-S-Transferasen) Familie zeigten einige Gene eine Stressor-überlappende Reaktion (z.B. *GSTF10*, *GSTU9*, *GSTF2/3* und *GSTF6/7*), andere hingegen nur eine Reaktion bei Sorbitolstress (z.B. *GSTF8*, *GSTT1* und *GSTU19*). Für keine GST konnte allerdings eine exklusive Reaktion auf den NaCl-Stress festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den GSTs konnte für keines der untersuchten GLP- (*germin-like proteins*) Mitglieder eine exklusive Reaktion auf den Sorbitolstress festgestellt werden. *GLP1* war in Blättern bei NaCl- und Sorbitolstress reprimiert, *GLP4* in Wurzeln bei beiden Stressoren induziert. *GLP6* und *GLP9* waren NaCl-spezifisch in Wurzeln reprimiert. *GLP1*, das in Blättern eine Stressor-überlappende Repression zeigte, war in der Wurzel NaCl-spezifisch induziert und zeigte damit eine gegenteilige Reaktion auf den NaCl-Stress in Blättern und Wurzeln.

3.3.2.1 Überlappende Reaktionen in *A. thaliana* unter NaCl- bzw. Sorbitolstress

Einzelne Mitglieder aller untersuchten Gen-Familien (GSTs, P450-Monooxygenasen, ABC-Transporter, GLPs und UGTs) zeigten Stress-Antworten sowohl auf NaCl als auch auf Sorbitol. Die Reaktionskinetiken bei den beiden Stressoren waren dabei aber oftmals verschieden. So war z.B. *GSTU19* nach 5 und 24 Stunden bei NaCl-Stress induziert, bei Sorbitolstress aber nach 5 und 48 Stunden. *CYP81F4* war durch den NaCl-Stress in der Wurzel zu allen Zeitpunkten induziert, durch den Sorbitolstress war das Gen nach 5 Stunden induziert, nach 24 Stunden unbeeinflusst und nach 48 Stunden reprimiert. Auch *RD29A* war zwar durch NaCl- und Sorbitol induziert, zeigte bei beiden Stressoren aber unterschiedliche Reaktionskinetiken (siehe Tab. 3.2).

Einige Gene zeigten allerdings bei den beiden Stressoren gleiche Reaktionskinetiken auf den NaCl- und Sorbitolstress und stellen somit potenzielle Kandidaten dar, die primär auf den iso-osmotischen Stress reagieren bzw. über ähnliche Signalwege reguliert werden. In Tab. 3.3 sind diese Gene zusammengefasst.

Tab. 3.3: Gene mit gleichen Induktionsprofilen während Salz- bzw. Sorbitol-Behandlung

A: Gene, die in der Wurzel bei NaCl- bzw. Sorbitolstress gleiche Induktionsprofile zeigen

Wurzel		W, 5 h		W, 24 h		W, 48 h	
Gen	Atg-Code	N	S	N	S	N	S
<i>GSTF2</i>	At4g02520						
<i>GSTF3</i>	At2g02930						
<i>GSTF6</i>	At1g02930						
<i>GSTF7</i>	At1g02920						
<i>MRP11</i>	At1g30420						
<i>ATM3*</i>	At5g58270						
Basische Endochitinase*	At3g12500						
β -1,3-Glukanase 3 (<i>BG3</i>)*	At3g57240						
Germin-ähnliches Protein 4 (<i>GLP4</i>)*	At1g18970						
Adenin-Phosphoribosyltransferase (<i>APRT</i> ; <i>APT1</i>)*	At1g27450						
<i>UGT71B3P</i>	At4g15270						
<i>UGT72D1</i>	At2g18570						

B: Gene, die im Blatt bei NaCl- bzw. Sorbitolstress gleiche Induktionsprofile zeigen

Blatt		B, 5 h		B, 24 h		B, 48 h	
Gen	Atg-Code	N	S	N	S	N	S
<i>CYP81D1</i>	At5g36220						
Glyoxalase II (<i>GLX-II.4</i>)*	At1g53580						
β -1,3-Glukanase 2 (<i>BG2</i> ; <i>PR-2</i>)*	At3g57260						
<i>PRXCB**</i>	At3g49120						
<i>UGT74F2</i>	At2g43820						

Dargestellt sind die Induktionen/Repressionen von Genen bei NaCl (N)- bzw. Sorbitolstress (S) in Wurzeln (W) bzw. Blättern (B) nach 5, 24 und 48 Stunden Stress-Dauer. Rot unterlegt ist eine Induktion von mindestens 2-fach, weiß bedeutet weder induziert noch reprimiert und grün eine Repression um mindestens die Hälfte. *GSTF2* wurde trotz der grenzwertigen Induktion bei Wurzeln, NaCl, 5 Stunden (1,9 +/- 1,2) aufgeführt, da die beiden Sonden für *GSTF2* und *GSTF3* die beiden Transkripte nicht spezifisch unterscheiden. * Die Sonden dieser Gene waren ESTs; es ist daher nicht auszuschließen, dass damit Kreuzhybridisierungen möglich sind. ** Die Sonde von *PRXCB* besitzt eine Homologie von 91 % über 500 bp mit *PRXCA* (At3g49110).

In der **Wurzel** zeigten drei Vertreter aus der Familie der Glutathion-S-Transferasen Gemeinsamkeiten bei NaCl- bzw. Sorbitolstress: *GSTF2*, *GSTF6* und das zu diesem Gen hoch homologe *GSTF7*. Die „Reaktion“ von *GSTF3* ist vermutlich auf eine Kreuzhybridisierung der entsprechenden Sonde mit *GSTF2* zurückzuführen. Alle drei Gene waren während NaCl- bzw. Sorbitolstress zu jedem Zeitpunkt induziert.

Zwei weitere Gene zeigten eine Induktion zu allen drei Zeitpunkten bei NaCl- bzw. Sorbitolstress: Eine basische Endochitinase sowie das Germin-ähnliche Protein *GLP4*.

MRP11, ein ABC-Transporter aus der MRP- (*multidrug resistance-associated protein*) Subfamilie, sowie *ATM3*, ein halber ABC-Transporter, waren nach 5 Stunden transient induziert.

Eine β -1,3-Glukanase (*BG3*) zeigte erst nach 48 Stunden Stress-Behandlung eine Induktion.

Drei Gene waren nach 48 Stunden NaCl- bzw. Sorbitolstress reprimiert: Die UDP-Glycosyltransferasen *UGT71B3P* und *UGT72D1*, sowie eine Adenin-Phosphoribosyltransferase (*APT1*). *UGT71B3P* ist ein potenzielles Pseudo-Gen (Paquette et al., 2003).

Im **Blatt** zeigten insgesamt fünf Gene bei NaCl- und Sorbitolstress gleiche Induktionsprofile: Die Cytochrom P450-Monooxygenase *CYP81D1* war nach 24 Stunden transient induziert, eine Glyoxalase II (*GLX-II.4*) sowie das PR (*pathogenesis-related*)-Protein *PR-2* (eine β -1,3-Glukanase) waren nach 24 bzw. 48 Stunden induziert.

Eine Peroxidase (*PRXCB/PRXCA*) zeigte ein biphasisches Induktionsprofil nach 5 und 48 Stunden.

Die UDP-Glycosyltransferase *UGT74F2* war nach 48 bei NaCl und Sorbitol induziert.

3.3.2.2 Spezifische Reaktionen in *A. thaliana* unter NaCl- bzw. Sorbitolstress

Spezifische Reaktionen auf die beiden Stressoren zeigten sich zumeist nach 48 Stunden Stress-Dauer (68 % der spezifischen Stress-Antwort). Im Gegensatz zum NaCl-Stress waren zu diesem Zeitpunkt bei Sorbitol viele *CYPs* und *UGTs* reprimiert. Einige Gene zeigten allerdings auch frühzeitig (innerhalb von 24 Stunden Stress-Dauer) eine Stressor-spezifische Reaktion. Die meisten dieser Reaktionen waren allerdings nur transient.

Als „hoch-spezifische“ Reaktionen wurden Veränderungen definiert, die Stressor-spezifisch eine Induktion/Repression zu mindestens 2 Zeitpunkten oder zu mindestens einem Zeitpunkt in beiden Organen hervorriefen. Das erste Kriterium erfüllten nur 6 Gene. Für das zweite Kriterium wurden innerhalb des vorliegenden Datensatzes keine Beispiele gefunden.

In Tab. 3.4A sind die NaCl-spezifisch reagierenden Gene und in Tab. 3.4B die Sorbitol-spezifisch reagierenden Gene zusammengefasst.

Tab. 3.4: Hoch-spezifisch reagierende Gene

A: Hoch-spezifisch auf NaCl-Stress reagierende Gene

100 mM NaCl		W, 5 h		W, 24 h		W, 48 h		B, 5 h		B, 24 h		B, 48 h	
Gen	Atg-Code	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S
Chitinase, <i>PR3AIV</i> *	At3g54420	■		■		■							
Germin-ähnliches Protein 9 (<i>GLP9</i>)*	At4g14630			■		■							
<i>CXC750</i> *	At1g31580			■		■							
Vegetatives Speicher-Protein 1 (<i>VSP1</i>)*	At5g24780							■		■		■	

B: Hoch-spezifisch auf Sorbitolstress reagierende Gene

200 mM Sorbitol		W, 5 h		W, 24 h		W, 48 h		B, 5 h		B, 24 h		B, 48 h	
Gen	Atg-Code	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S
<i>CYP72A14</i>	At3g14680				■		■						
Tryptophan-Synthase β -Untereinheit (<i>TSB1</i>)*	At5g54810				■		■						

Dargestellt sind die Induktionen/Repressionen von hoch-spezifisch reagierenden Genen bei NaCl (N)- bzw. Sorbitolstress (S) in Wurzeln (W) bzw. Blättern (B) nach 5, 24 und 48 Stunden Stress-Dauer. Rot unterlegt ist eine Induktion von mindestens 2-fach, weiß bedeutet weder induziert noch reprimiert und grün eine Repression um mindestens die Hälfte. * Die Sonden dieser Gene waren ESTs; es ist daher nicht auszuschließen, dass damit Kreuzhybridisierungen möglich sind.

Hoch-spezifisch auf den **NaCl-Stress** reagierten insgesamt 4 Gene. Drei dieser Gene waren zudem Wurzel-spezifisch induziert: eine Chitinase (*PR3AIV*) war zu allen 3 Zeitpunkten induziert. Das Germin-ähnliche Protein *GLP9* und ein Zellwand-assoziiertes Protein (*CXC750*) waren nach 24 und 48 Stunden NaCl-spezifisch induziert.

In Blättern war vegetatives Speicherprotein (*VSP1*) zu allen untersuchten Zeitpunkten NaCl-spezifisch induziert.

Hoch-spezifisch auf den **Sorbitolstress** reagierten 2 Gene in der Wurzel: Die Cytochrom P450-Monooxygenase *CYP72A14* war nach 24 und 48 Stunden reprimiert, die β -Untereinheit der Tryptophan-Synthase *TSB1* nach 24 und 48 Stunden induziert.

3.4 Insertionsmutanten

Mit Hilfe zweier Insertionsmutanten in den *MIP*-Genen *PIP2;1* und *PIP1;4* wurde untersucht, ob das Ausschalten eines einzelnen MIPs Einfluss auf die Expression anderer *MIPs* hat bzw. andere Prozesse beeinflusst, die anhand veränderter Expressionsprofile von Stress-regulierten Genen sowie Genen des Sekundärmetabolismus (ABC-Transporter, UDP-Glycosyltransferasen, Cytochrom P450-Monooxygenasen und GSTs) erkannt werden können. Die beiden Linien wurden deshalb ausgewählt, da es sich bei *PIP2;1* um ein in *A. thaliana* hoch und ubiquitär exprimiertes *MIP* handelt und *PIP1;4* in der Literatur als ein Salz-induzierbares *MIP* beschrieben wurde (Pih et al., 1997). Die *pip2;1* knock-out-Linie wurde in Zusammenarbeit mit dem ZIGIA-Projekt des MPI Köln für Züchtungsforschung identifiziert, die *pip1;4*-Mutante stammt aus der Insertionsmutanten-Kollektion von Sundaresan et al. (1995). Das Ausschalten der Gene erfolgte bei beiden Linien durch Transposon-Insertion.

3.4.1 Die *pip2;1*-Insertionsmutante

Im Rahmen des ZIGIA Projekts des MPI Köln werden Insertionsmutanten in *Arabidopsis* erstellt (Wisman et al., 1998). Dazu wurden *Arabidopsis*-Pflanzen mit *En-1*, einem autonomen Transposon aus Mais (Cardon et al., 1993) transformiert, das ein vollständiges Gen für seine Transposase besitzt. Durch eine wiederholte Selbstung der Pflanzen sollte das Genom in *A. thaliana* mit *En-1*-Elementen gesättigt werden. Es entstanden Pflanzen, in deren Genom 1-20 *En-1*-Elemente inseriert sind. Mit Hilfe einer PCR-Durchmusterung und anschließender Southern-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit dem MPI Köln eine Mutanten-Linien ermittelt (Linie 6AAS98), die ein *En-1*-Element im Gen von *PIP2;1* besitzt. Diese Linie wurde hier weiter charakterisiert.

3.4.1.1 Charakterisierung der *pip2;1*-Mutante auf genomischer Ebene

Mittels einer PCR-Durchmusterung wurden Pflanzen der Linie 6AAS98 auf das Vorhandensein des Transposons im *PIP2;1*-Gen untersucht (Abb. 3.8; siehe auch Material und Methoden, 2.11.1.2). Für die weiteren Untersuchungen wurde Pflanze 15-0 (15 kennzeichnet eine individuelle Pflanze und 0 bedeutet, dass die Pflanze noch nicht in den Wildtyp eingekreuzt wurde) verwendet.

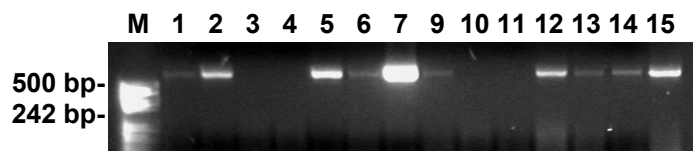


Abb. 3.8: Chimäre PCR-Produkte von verschiedenen Pflanzen der Linie 6AAS98 mit einem *PIP2;1*- und *En-1*-spezifischen Oligonukleotid (siehe Material und Methoden, 2.11.1.2). Die erwartete Produkt-Größe betrug 580 bp. M bezeichnet den DNA-Längenstandard, die Zahlen über den PCR-Produkten kennzeichnen einzelne Pflanzen der Linie 6AAS98.

Zur Ermittlung der genauen Insertionsstelle des Transposons im *PIP2;1*-Gen wurde in Pflanze 15-0 der Übergangsbereich zwischen *En-1* und *PIP2;1* in der genomischen DNA sequenziert (siehe Material und Methoden, 2.11.1.2). Neben der exakten Lage des Transposons im *PIP2;1*-Gen war dadurch auch seine relative Orientierung bestimmt. Abb. 3.9 zeigt schematisch die Insertion von *En-1* im *PIP2;1*-Gen und seine Orientierung. Es zeigte sich, dass das *En-1*-Element im 2. Exon nach Base 849 (Base 1 ist das Adenin des Start-Codons) des *PIP2;1*-Gens inserierte.

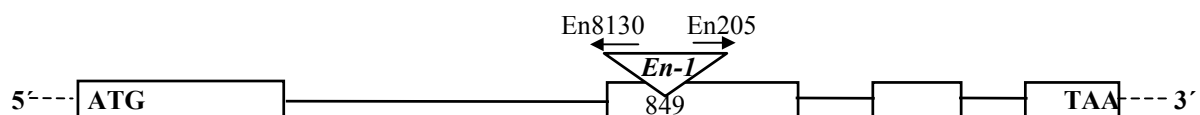


Abb. 3.9: Schematische Darstellung des *PIP2;1*-Gens mit *En-1*-Insertion. Kästchen stellen die Exons, die Linien dazwischen die Introns dar; die gestrichelten Linien deuten die 5'- und 3'-Bereiche des Gens an. ATG Start-Codon, TAA Stop-Codon. Das *En-1*-Element sitzt im 2. Exon nach Base 849 (Base 1 ist das Adenin des Start-Codons). En8130 und En205 bezeichnen *En-1*-spezifische Oligonukleotide. En205 bedeutet, dass das Oligonukleotid 205 bp von der linken Grenze des *En-1*-Elements entfernt bindet (<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~zigia/>).

Zur Bestimmung der Anzahl weiterer *En-1*-Elemente in der genomischen DNA wurde eine Southern-Analyse an Pflanze 15-0 durchgeführt (siehe Material und Methoden, Abb. 3.10, 2.11.1.3). Spur 1 in Abb. 3.10 zeigt, dass Pflanze 15-0 neben der für die *PIP2;1* im genomischen Kontext vorhergesagte 2,7 kb-Bande noch 11 weitere Transposons in seiner genomischen DNA besitzt. Da nicht bekannt ist, an welcher Stelle die 11 weiteren *En-1*-Elemente im Genom sitzen und ein etwaiger Phänotyp nicht nur auf ein fehlendes *PIP2;1*-Gen-Produkt zurückzuführen ist, sollten diese zusätzlichen *En-1*-Elemente weitgehend aus der Linie ausgekreuzt werden. Dazu wurde Pflanze 15-0 wiederholt in den Wildtyp eingekreuzt. Nach der vierten Rückkreuzung konnten 6 *En-1*-Elemente ausgekreuzt werden (Abb. 3.10, Spur 2). Nach der fünften Rückkreuzung waren neben der *En-1*-Insertion im *PIP2;1*-Gen noch drei weitere *En-1*-Elemente im Genom der *pip2;1*-Mutante enthalten (Abb. 3.10, Spur 3). Aus zeitlichen Gründen wurden keine weiteren Rückkreuzungen mehr durchgeführt. Diese Pflanzen wurden dennoch für die folgenden Untersuchungen herangezogen und als Kontrollen *PIP2;1*-wildtypische Pflanzen aus der gleichen Filialgeneration verwendet (siehe unten). Damit sollte gewährleistet werden, dass ein etwaig auftretender Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp auf das Fehlen von *PIP2;1* und nicht durch die zusätzlichen im Genom insertierten *En-1*-Elemente zurückzuführen ist.

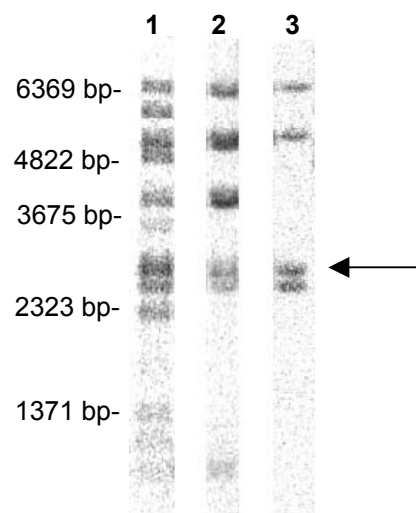


Abb. 3.10: Southern-Analyse zur Ermittlung der *En-1*-Insertionen in der genomischen DNA der Mutanten. Die genomische DNA wurde mit *Hind*III verdaut und mit einer radioaktiv markierten *En-1*-Probe hybridisiert (siehe Material und Methoden, 2.11.1.3). Die Anzahl der Hybridisierungssignale in den einzelnen Rückkreuzungen spiegelt die Anzahl der in der genomischen DNA insertierten *En-1*-Elemente wieder. 1 Pflanze 15-0 (Ausgangspflanze, noch nicht in Wildtyp rückgekreuzt), 2 Mutante nach 4-maliger Rückkreuzung in den Wildtyp, 3 Mutante (Pflanze 18-5) nach 5-maliger Rückkreuzung in den Wildtyp. Der Pfeil markiert die *En-1*-Insertion im *PIP2;1*-Gen (erwartete Größe von 2700 bp).

Nach der 5. Rückkreuzung wurden aus den segregierenden Nachkommen von Pflanze 18-5 homozygot mutante Individuen durch eine PCR-Analyse (siehe Material und Methoden, 2.11.1.4) identifiziert, die das Fehlen des Wildtyp-Allels bei vorhandenem mutanten Allel zeigen (Abb. 3.11).

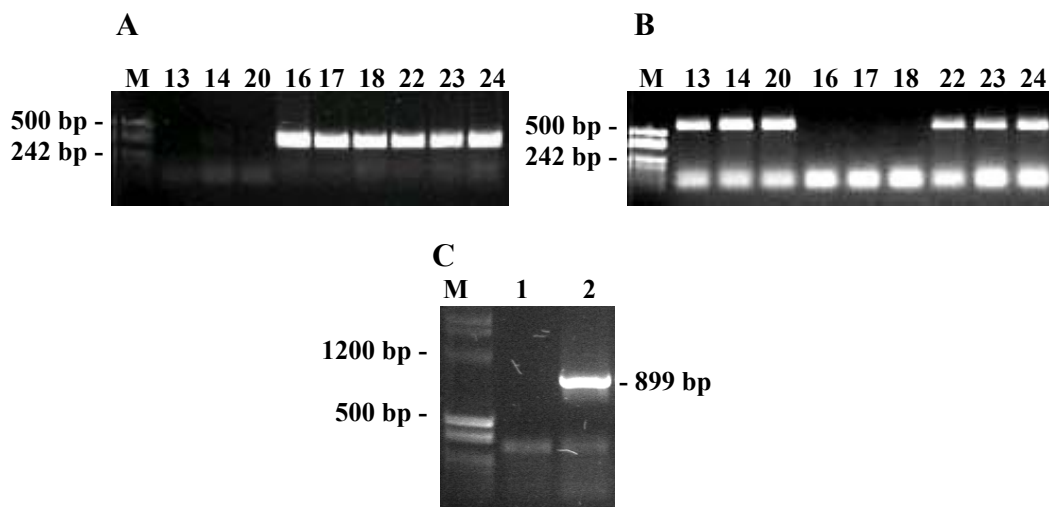


Abb. 3.11: Segregierende Nachkommen der F1-Generation von Pflanze 18-5. **A** PCR mit den *PIP2;1*-spezifischen Oligonukleotiden 6AA-f bzw. 6AA-r. Das PCR-Produkt (314 bp) zeigt, dass die Pflanzen das Wildtyp-Allel enthalten. **B** PCR mit dem *PIP2;1*-spezifischen Oligonukleotid 6AA-f bzw. dem *En-1*-spezifischen Oligonukleotid 6AA-En. Dieses PCR-Produkt (563 bp) zeigt, dass die Pflanzen eine *En-1*-Insertion in *PIP2;1* enthalten. Pflanzen 13-5, 14-5 und 20-5 sind demnach *En-1*-homozygot (nur *En-1*-PCR-Produkt), Pflanzen 16-5, 17-5 und 18-5 sind homozygot bezüglich des Wildtyp-Allels (nur Wildtyp-PCR-Produkt) und Pflanzen 22-5, 23-5 und 24-5 sind hemizygot bezüglich der *En-1*-Insertion. Die Zahlen bezeichnen verschiedene Pflanzen, die durch Selbstung der hemizygoten Pflanze 18-5 entstanden waren. **C** Fehlen des *PIP2;1*-Gen-Produkts bei Pflanze 13-5 (homozygot bezüglich der *En-1*-Insertion in *PIP2;1*). RT-PCR von Pflanzen 13-5 (Spur 1) und 17-5 (Spur 2) mit *PIP2;1*-spezifischen Oligonukleotiden. Spur 1 zeigt, dass Pflanze 13-5 *PIP2;1* nicht exprimiert und somit eine *knock-out*-Mutante darstellt, wohingegen Pflanze 17-5 (Spur 2) *PIP2;1* exprimiert. M DNA-Fragmentlängenstandard.

Für die Transkript-Untersuchungen wurden die Samen der geselbsteten Pflanze 13-5 (homozygot bezüglich der *En-1*-Insertion im *PIP2;1*-Gen; im Folgenden als *pip2;1*-Mutante bezeichnet) und als Kontrolle die Samen der geselbsteten Pflanze 17-5 (homozygot wildtypisch bezüglich der *En-1*-Insertion im *PIP2;1*-Gen; im Folgenden als *PIP2;1*-Wildtyp bezeichnet) verwendet.

3.4.1.2 Habitus-Vergleich und Bestimmung des Verhältnisses Blatt- zu Wurzel-Trockenmasse bei der *pip2;1*-Mutante und dem Wildtyp (Col-R)

Kaldenhoff et al. (1998) zeigten bei einer *PIP1-antisense*-Mutante, bei der *PIP1;1* und *PIP1;2* in ihrer Transkription gehemmt waren, dass diese eine 5-fach erhöhte Wurzelmasse im Vergleich zum Wildtyp besitzt. Um zu untersuchen, ob durch das Ausschalten von *PIP2;1* ein ähnlicher Phänotyp beobachtet werden kann, wurden die *pip2;1*-Mutante und der Wildtyp (Col-R) hydroponisch angezogen und nach 3 Wochen das Verhältnis der Blatt-Trockenmasse zur Wurzel-Trockenmasse bestimmt (Abb. 3.12A). Abb. 3.12B zeigt den Habitus-Vergleich der *pip2;1*-Mutante mit dem Wildtyp Col-R. Abb. 3.12A und B zeigen, dass keine makroskopischen Unterschiede zwischen der Mutante und dem Wildtyp festzustellen sind. Diese deutet darauf hin, dass *PIP2;1* scheinbar eine andere Funktion in der Pflanze besitzt, als *PIP1;1* und *PIP1;2*.

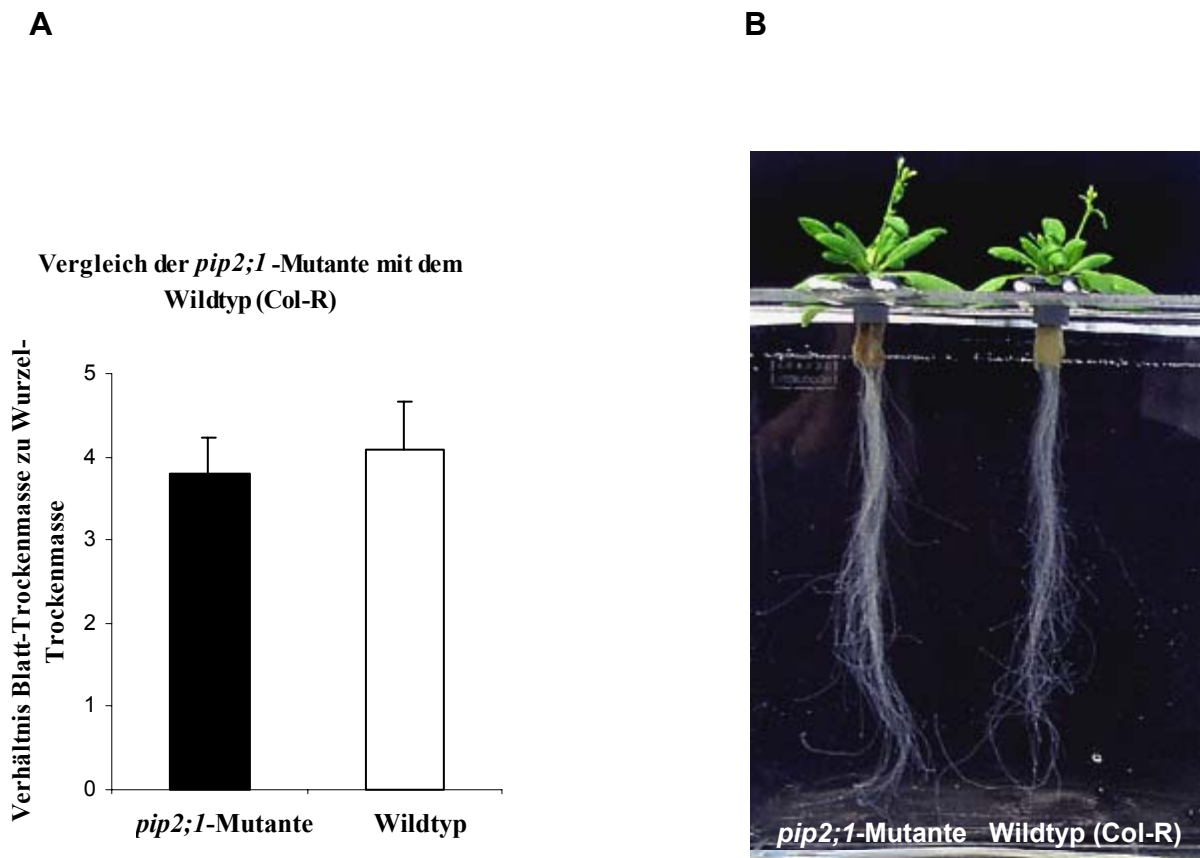


Abb. 3.12: Phänotypischer Vergleich der *pip2;1*-Mutante mit dem Wildtyp (Col-R). **A** Verhältnis der Blatt-Trockenmasse zur Wurzel-Trockenmasse von Mutante und Wildtyp bei hydroponischer Anzucht. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung zweier Wiederholungen mit je 7 Pflanzen an. **B** Habitus-Vergleich der *pip2;1*-Mutante mit Wildtyp (Col-R) (24 Tage alte Pflanzen).

3.4.1.3 Transkriptionsprofile der *pip2;1*-Mutante im Vergleich zum *PIP2;1*-Wildtyp

Vorrangiges Ziel dieser Untersuchung war herauszufinden, ob das Fehlen des Aquaporings *PIP2;1* einen Einfluss auf die Expression anderer *MIPs* hat, d.h. die Pflanze durch eine verstärkte Expression anderer *MIPs* die (vermutliche) Erniedrigung der Wasserpermeabilität der Plasmamembran von *PIP2;1*-exprimierenden Zellen kompensiert.

Anhand von Transkriptionsänderungen von Stress-regulierten Genen sowie Genen des Sekundärmetabolismus (ABC-Transporter, UDP-Glycosyltransferasen, Cytochrom P450-Monooxygenasen und GSTs) wurde der Frage nachgegangen, welche Prozesse durch das Fehlen von *PIP2;1* beeinflusst werden.

Die *pip2;1*-Mutante und der entsprechende *PIP2;1*-Wildtyp wurden hydroponisch angezogen, und nach 3 Wochen wurden ihre Wurzeln geerntet. Zur Untersuchung der *MIP*-Transkriptionsprofile wurde der DNA-Microarray verwendet. Abb. 3.13 zeigt die Transkriptionsprofile der *MIPs* in der *pip2;1*-Mutante im Vergleich zu den Transkriptionsprofilen im *PIP2;1*-Wildtyp. Aus Abb. 3.13A ist ersichtlich, dass in der *pip2;1*-Mutante ebenfalls ein schwaches Hybridisierungssignal bei der *PIP2;1*-Sonde detektiert wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das *En-1*-Element in der Lage ist, aus dem Gen wieder „herauszuspringen“. Dabei hinterlässt es aber einen „Abdruck“ im Insertionsbereich in Form von einigen Basenpaaren. Diese führen in den meisten Fällen zur Verschiebung des Leserahmens. Es wird dann kein funktionelles Protein mehr gebildet (Steiner-Lange et al., 2001). Es zeigte sich weiter, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) bei der

Expression der anderen *MIPs* in Wurzeln festzustellen waren. Die Expressionen von *NIP4;1* und *SIP1;2* waren nur in der *pip2;1*-Mutante sehr gering und aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Auch die zusätzlich zu den *MIPs* auf dem Array vertretenen Gene zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) in ihrer Expression in Mutante und Wildtyp.

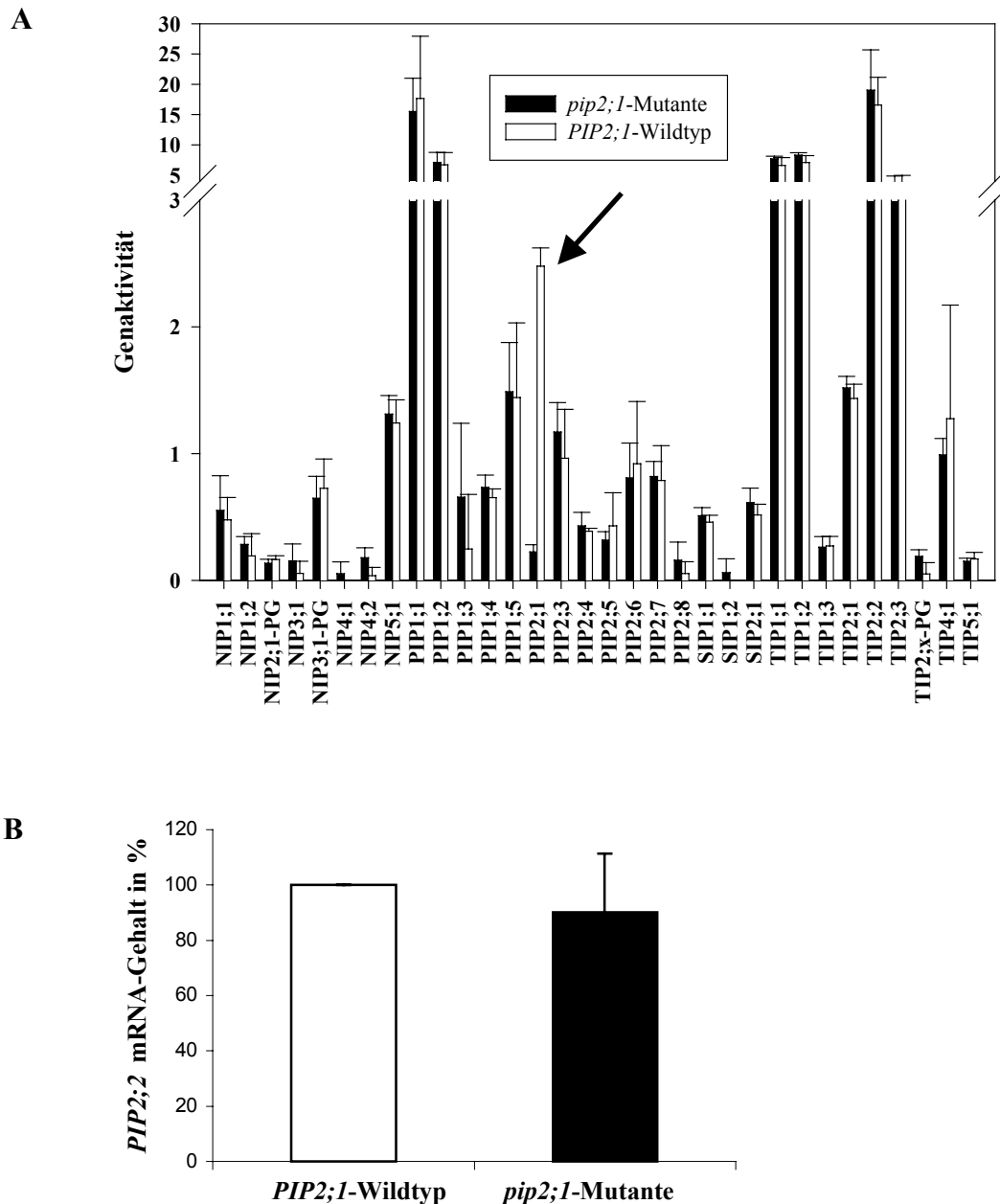


Abb. 3.13: Vergleich der *MIP*-Transkripte in Wurzeln der *pip2;1*-Mutante und im *PIP2;1*-Wildtyp. Da das *PIP2;2*-Signal auf dem verwendeten DNA-Microarray aus technischen Gründen nicht auszuwerten war, wurde dessen Expressionsniveau über RT-PCR bestimmt. **A** DNA-Microarray-Analyse. Die Genaktivitätswerte geben relative Expressionshöhen an. Dargestellt sind Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente \pm Standardabweichung. Schwarze Balken repräsentieren die *MIP*-Transkripte in der *pip2;1*-Mutante, weiße Balken die *MIP*-Transkripte im *PIP2;1*-Wildtyp. Der Pfeil markiert die Expression von *PIP2;1*. **B** Semi-quantitative RT-PCR-Analyse zur Bestimmung der relativen Expression von *PIP2;2* in der *pip2;1*-Mutante und im *PIP2;1*-Wildtyp. Die Werte beziehen sich auf die *PIP2;1*-Wildtyp-Pflanzen, deren mRNA-Gehalt von *PIP2;2* auf 100 % definiert wurde. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung vom Mittelwert dreier Wiederholungen an.

3.4.1.4 Vergleich der Transkriptionsprofile in der *pip2;1*-Mutante und im *PIP2;1*-Wildtyp bei NaCl-Stress

Da *PIP2;1* ein hoch exprimiertes Aquaporin ist, war das Ziel dieser Untersuchung herauszufinden, ob durch das Ausschalten von *PIP2;1* unter Wasserstress (NaCl-Applikation zur Nährlösung) andere *MIPs* oder weitere Gene des Sekundär- und Stressmetabolismus in der *pip2;1*-Mutante ein anderes Transkriptionsverhalten bei Stress in der Wurzel zeigen als im *PIP2;1*-Wildtyp.

Die *pip2;1*-Mutante sowie der entsprechende *PIP2;1*-Wildtyp wurden in hydroponischen Kulturen angezogen. Nach 3 Wochen erfolgte die Zugabe von NaCl (100 mM Endkonzentration). Die Wurzeln wurden 24 Stunden nach der Stress-Applikation geerntet. Dieser Zeitpunkt wurde aus 2 Gründen ausgewählt. Zum einem war das hoch und ubiquitär exprimierte Aquaporin *PIP1;1* zu diesem Zeitpunkt reprimiert, zum anderen war die Transkription des ebenfalls hoch im Bereich des vaskulären Systems exprimierten Aquaporins *PIP2;1* unverändert (siehe Abb. 3.5, 3.3.1). Die Transkriptionsänderungen wurden mit Hilfe der Array-Analyse bzw. mittels semi-quantitativer RT-PCR verfolgt. Wie aus Abb. 3.14 ersichtlich, gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) bei den Transkriptionsänderungen der *MIPs* in Wurzeln von Mutante und Wildtyp. Auch die weiteren auf dem DNA-Microarray befindlichen Gene zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) in ihrem Induktions-/Repressionsverhalten bei NaCl-Stress in Mutante und Wildtyp (ohne Abbildung).

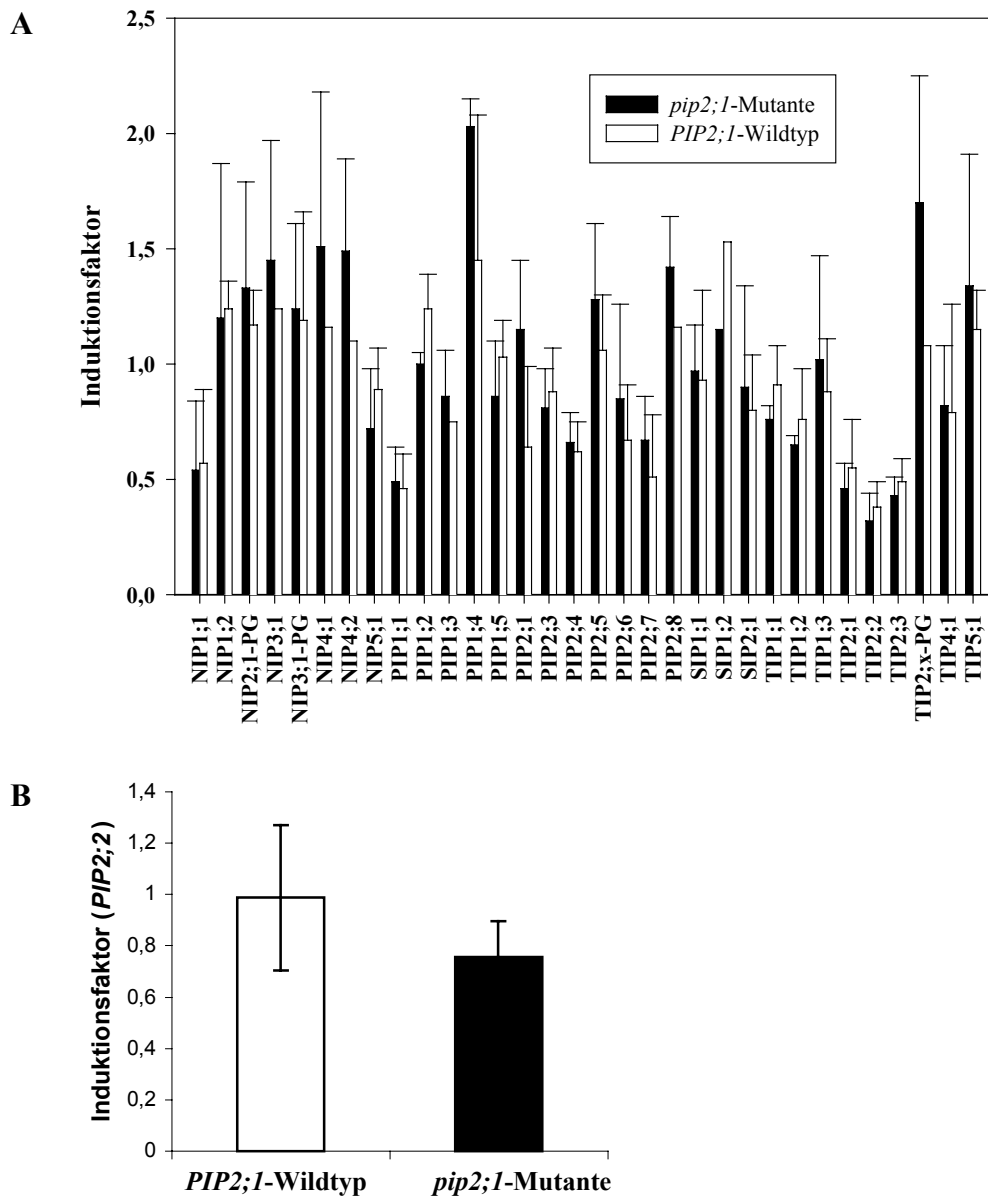


Abb. 3.14: Vergleich der Induktionen der MIPs in der Wurzel im *PIP2;1*-Wildtyp und in der *pip2;1*-Mutante nach 24 Stunden NaCl-Behandlung (100 mM). Da das *PIP2;2*-Signal auf dem verwendeten Array aus technischen Gründen nicht auszuwerten war, wurde dessen Transkriptionsänderung über eine semi-quantitative RT-PCR bestimmt. **A** DNA-Microarray-Analyse. Der Induktionsfaktor ergibt sich aus dem Quotienten der Genaktivitätswerte von Behandlung und Kontrolle. Die Balken spiegeln Mittelwerte dreier unabhängig gemessener Induktionsfaktoren \pm Standardabweichung wieder. Balken ohne Standardabweichung waren nur in einer der drei Versuche gemessen worden und blieben der Übersicht wegen erhalten. **B** Semi-quantitative RT-PCR zur Bestimmung der Transkriptionsänderung (Induktionsfaktor) von *PIP2;2* in der *pip2;1*-Mutante im Vergleich zum *PIP2;1*-Wildtyp. Der Induktionsfaktor ergibt sich aus dem Quotienten von Behandlung und Kontrolle. Die Balken spiegeln Mittelwerte dreier Wiederholungen \pm Standardabweichung wieder.

3.4.2 Die *pip1;4*-Insertionsmutante

PIP1;4 wurde als Salzstress-induziertes *MIP* beschrieben (Pih et al., 1997). In der *Dissociation-* (*Ds*) Elemente enthaltenden Insertionsmutanten-Kollektion, erstellt und beschrieben von Sundaresan et al. (1995), ist eine Insertionsmutante im *PIP1;4*-Gen vorhanden (Linie N100263; Parinov et al., 1999). Im Gegensatz zur *pip2;1*-Mutante wurden die Insertionsmutanten durch Transformation von modifizierten Mais *Ds*-Transposons in das Genom von *A. thaliana* hergestellt. Die so entstandenen *Ds*-Insertionslinien sind stabil und enthalten in der Regel nur ein einziges *Ds*-Element je Insertionslinie.

3.4.2.1 Identifikation der *pip1;4*-Mutante auf genomischer Ebene

Der Vorteil dieser Insertionsmutanten liegt darin, dass die Lage des *Ds*-Elements im Genom von *A. thaliana* bereits durch TAIL-PCR (Liu et al., 1995) bestimmt war. Linie N100263 enthielt eine *Ds*-Insertion im 2. Exon von *PIP1;4*. Eine PCR zur Überprüfung der *Ds*-Insertion im *PIP1;4*-Gen wurde durchgeführt (siehe Material und Methoden, 2.11.2.1). Abb. 3.15 zeigt schematisch das *PIP1;4*-Gen mit der *Ds*-Insertion.

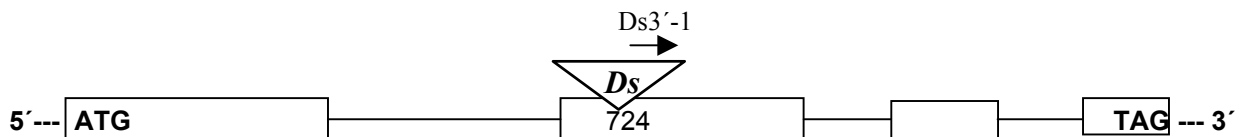


Abb. 3.15: Schematische Darstellung des *PIP1;4*-Gens mit *Ds*-Insertion. Kästchen stellen die Exons, die Linien dazwischen die Introns dar; die gestrichelten Linien deuten die 5'- und 3'-Bereiche des Gens an. ATG Start-Codon, TAG Stop-Codon. Das *Ds*-Element sitzt im 2. Exon nach Base 724 (Base 1 ist das Adenin des Start-Codons). *Ds*3'-1 kennzeichnet ein *Ds*-spezifisches Oligonukleotid, das an das 3'-Ende des *Ds*-Elements bindet.

Nach einer Rückkreuzung einer dieser positiven Pflanzen (Pflanze 2-0) in den parentalen Wildtyp *Ler* wurden in der segregierenden F2-Population homozygot wildtypisch und homozygot mutante Individuen mittels PCR-Analyse bestimmt (siehe Material und Methoden, 2.11.2.1, ohne Abbildung). Für die weiteren Untersuchungen wurden Pflanze 12-1 (homozygot wildtypisch; im Folgenden als *PIP1;4*-Wildtyp bezeichnet) und Pflanze 15-1 (homozygot *pip1;4*-Allel; im Folgenden als *pip1;4*-Mutante bezeichnet) verwendet.

3.4.2.2 Transkriptionsprofile in der *pip1;4*-Mutante im Vergleich zum *PIP1;4*-Wildtyp

Um zu erfahren, inwieweit ein Ausschalten von *PIP1;4* Einfluss auf die Expression anderer *MIP*-Mitglieder hat, wurden mit Hilfe des DNA-Microarrays die Transkriptionsprofile der *pip1;4*-Mutante und des *PIP1;4*-Wildtyps untersucht. Von besonderem Interesse war dabei, ob bei NaCl-Stress, durch den *PIP1;4* induziert wird (Pih et al., 1997), in der *pip1;4*-Mutante andere *MIP*-Mitglieder kompensatorisch reagieren, welche anhand transkriptioneller Änderungen erkannt werden können. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte dabei in Anlehnung an Pih et al. (1997) in Schüttelkulturen. Die Stress-Applikation erfolgte an 7 Tage alten Keimlingen durch Zugabe von NaCl (Endkonzentration von 150 mM). Nach 6 Stunden wurden die Pflanzen geerntet.

Abb. 3.16 zeigt das Transkriptionsprofil der *MIPs* von Mutante und Wildtyp in ungestressten Keimlingen. Darin ist zu erkennen, dass *PIP1;4* in der Mutante nicht exprimiert wird, es aber sonst keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) zwischen der Mutante und dem Wildtyp gibt. Die Expression von *TIP2;3* nur in der Mutante ist nahe am Detektionslimit und mit der hohen Standardabweichung nicht signifikant.

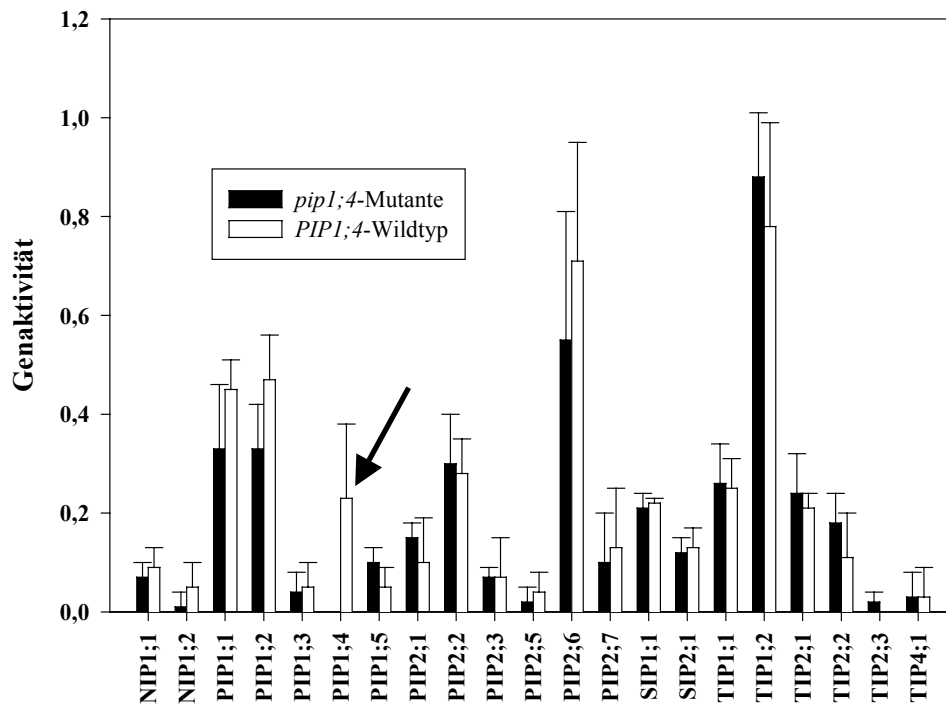


Abb. 3.16: Vergleich der *MIP*-Expressionsniveaus in *Ler* Keimlingen des *PIP1;4*-Wildtyps und der *pip1;4*-Mutante. Die Genaktivitätswerte stellen relative Werte zur Expressionshöhe dar. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente. Schwarze Balken repräsentieren die *MIP*-Transkripte in der Mutante, weiße Balken die *MIP*-Transkripte in der Kontrolle. Der Pfeil markiert das *PIP1;4*-Gen, das nur im Wildtyp exprimiert wird.

Der Vergleich der *MIP*-Transkriptionsprofile zwischen der *pip1;4*-Mutante und des *PIP1;4*-Wildtyps bei NaCl-Stress zeigt, dass im Wildtyp *PIP1;4* durch eine NaCl-Applikation induziert wird, es aber sonst keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) in den Reaktionen der anderen *MIPs* in der Mutante und im Wildtyp gibt (Abb. 3.17).

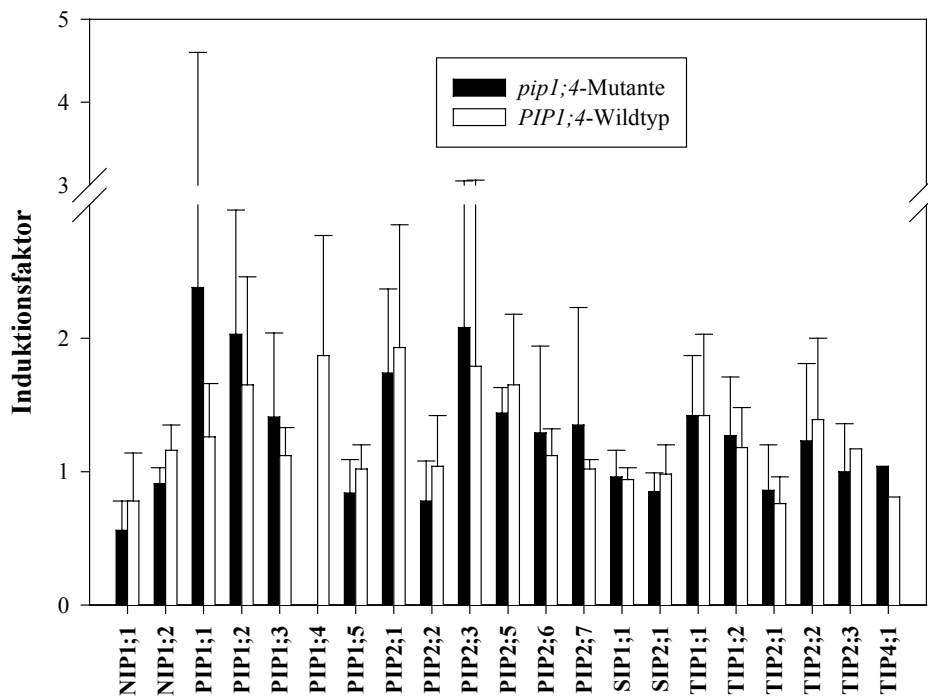


Abb. 3.17: Vergleich der Induktionen der *MIPs* in Keimlingen des *PIP1;4*-Wildtyps mit denen in der *pip1;4*-Mutante nach 6 Stunden NaCl-Behandlung (150 mM). Der Induktionsfaktor ergibt sich aus dem Quotienten der Genaktivitätswerte von Behandlung und Kontrolle. Die Balken spiegeln Mittelwerte dreier unabhängig gemessener Induktionsfaktoren \pm Standardabweichung wieder. Balken ohne Standardabweichung kennzeichnen Induktionsfaktoren von *MIPs*, die nur in einer Wiederholung gemessen wurden.

Die Transkript-Untersuchungen wurden auf Stress-Markergene sowie Gene des Sekundärmetabolismus ausgeweitet um herauszufinden, welche Prozesse durch das Fehlen von *PIP1;4* beeinflusst werden. Sowohl bei ungestressten als auch bei NaCl-gestressten Keimlingen waren in der *pip1;4*-Mutante bei den untersuchten Genen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) zum *PIP1;4*-Wildtyp festzustellen (ohne Abbildung).

4 Diskussion

Aquaporine sind Wasserkanal-Proteine die zur Gruppe der MIPs (*major intrinsic proteins*) gehören. Die Beteiligung eines MIPs (AQP1 aus Mammalia) im Transport von Wasser über zelluläre Membranen wurde zum ersten Mal von Preston et al. (1992) durch Schwellversuche mit *Xenopus* Oocyten gezeigt. Auch in Pflanzen sind bis heute einige Befunde einer Beteiligung von MIPs bei zellulären Wasserflüssen beschrieben. Im Gegensatz zu Mammalia besitzen Pflanzen oft eine große Anzahl von *MIP*-Genen. In *A. thaliana* existieren z.B. 38 *MIP*-Gene, darunter 3 Pseudo-Gene.

Vorrangiges Ziel der Untersuchungen war es, die gesamte MIP-Familie in *A. thaliana* näher zu charakterisieren. Dazu wurde ein DNA-Microarray entwickelt, der die Unterscheidung der oft hoch homologen Mitglieder zuließ und Transkriptionsprofile in der Pflanze und bei Wasserstress (Salz- und Sorbitolstress) erstellt.

Um Einblicke in überlappende und spezifische Reaktionen zu gewinnen, wurden parallel dazu die Transkript-Änderungen von Genen aus dem Stress- und Sekundärstoffwechsel bei Salz- und Sorbitolstress untersucht.

4.1 Spezifität der verwendeten 3'-UTR-Sonden zur Unterscheidung homologer *MIP*-Gene

Die DNA-Array-Technik stellt ein geeignetes Werkzeug zur parallelen Untersuchung einer großen Anzahl an Genen dar. Als Sonden werden häufig cDNAs verwendet. Anhand von Sequenzier-Projekten einzelner Organismen wurde aber immer deutlicher, dass in vielen Gen-Familien einzelne Mitglieder hoch homolog sind. Bei den *MIPs* in *A. thaliana* sind z.B. zwei *PIP*-Gene (*PIP2;2* und *PIP2;3*) zu 95 % im kodierenden Bereich homolog. Der Einsatz von cDNAs als Sonden ist daher zur Unterscheidung der Transkripte nicht geeignet.

Evertsz et al. (2001) konnten bei Glas cDNA-Arrays feststellen, dass die prozentuale Identität in den homologen Bereichen zweier Gene gut mit den kreuzreagierenden Signalintensitäten korrelierte. Bei einer Homologie von 80 % zeigten sich Kreuzhybridisierungen von 0,6 – 12 %. Die Länge der überlappenden homologen Bereiche spielte dabei keine große Rolle. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Xu et al. (2001) erzielt: Cytochrom P450-Gene mit einer Sequenzhomologie kleiner als 80 % ergaben Kreuzhybridisierungssignale von weniger als 20 %. Bei weniger als 70 % Homologie konnten keine Kreuzhybridisierungen mehr detektiert werden. Die Autoren stellten auch fest, dass kleinere Bereiche innerhalb der Sequenzen mit hoher Homologie Kreuzhybridisierungen noch zusätzlich beeinflussen können. Hybridisierungs-Experimente auf Nylonmembranen mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden (35-mer) ergaben ab einer Sequenzhomologie von 77-100 % Kreuzreaktionen (Vernier et al., 1996). Bei Verwendung von Oligonukleotiden mit einer Länge von 50 Basen als Sonden konnten Kane et al. (2000) zudem zeigen, dass eine Sequenzhomologie von 100 % über 15 bp eine Kreuzhybridisierung stark beeinflusst.

Ein weiterer wichtiger Befund ihrer Untersuchungen war, dass die 50-mer Sonden die gleiche Sensitivität zeigten wie PCR-Sonden mit einer Länge von 322-393 bp. Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verwendeten 3'-UTR-Sonden der *MIPs* besaßen Längen von 105-278 bp. Eine Beeinflussung der Sensitivität aufgrund der unterschiedlichen Sonden-Längen scheint daher vernachlässigbar.

Der Vergleich einer 3'-UTR-Sonde (172 bp) mit der entsprechenden cDNA-Sonde (774 bp) zeigte zudem, dass auch große Unterschiede in der Sonden-Länge zu keiner signifikanten Änderung ($P < 0,05$; Student t-test) in den Signalintensitäten führen (Abb. 4.1). Das tendenziell

höhere Hybridisierungssignal mit der cDNA-Sonde ist vermutlich auf die Kreuzhybridisierung der *TIP1;2*-cDNA-Sonde mit Transkripten des homologen *TIP1;1*-Gens zurückzuführen (s.a. Abb. 3.1, 3.1.3), das in allen untersuchten Organen ebenfalls exprimiert ist (s.a. Abb. 3.2, 3.2).

Vergleich einer cDNA- mit einer 3'-UTR-Sonde

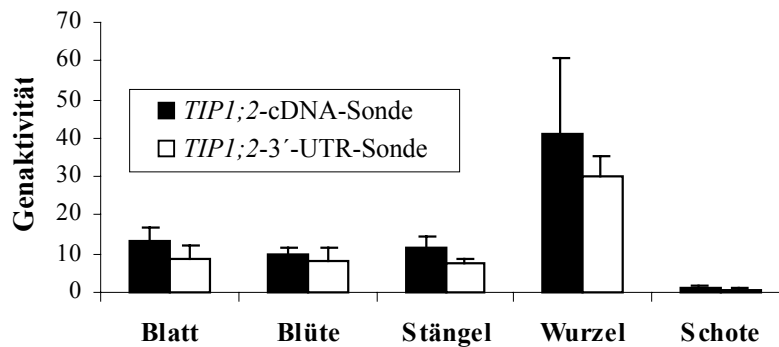


Abb. 4.1: Einfluss der Sonden-Länge auf das Hybridisierungssignal in verschiedenen Organen von *A. thaliana*. Der Genaktivitätswert entspricht dem normalisierten Hybridisierungssignal (siehe Material und Methoden, 2.10.7).

Zur Überprüfung, inwieweit eine Homologie größer als das festgesetzte Kriterium von 70 bp über 70 % Auswirkung auf eine mögliche Kreuzhybridisierung hat, wurde eine radioaktiv markierte Probe eines MIPs (*TIP1;1*) mit drei Sonden hybridisiert: Die 3'-UTR-Sonde zu *TIP1;1* war 100 % über 183 bp mit der *TIP1;1*-Probe identisch, die 3'-UTR-Sonde zu *TIP1;2* 71 % über 117 bp, die cDNA-Sonde zu *TIP1;2* 79 % über 645 bp. Dabei zeigte sich, dass die 3'-UTR-Sonde von *TIP1;2* mit einer Homologie von 71 % über 117 bp nur ein schwaches Hybridisierungssignal ergab, das unterhalb des 2-fachen Hintergrundsignals fiel. Dies bestätigt das stringente Auswahlkriterium von 70 % über 70 bp. Die cDNA-Sonde zu *TIP1;2* zeigte ein relatives Kreuzhybridisierungssignal von 40 % mit *TIP1;1*. Dieser Wert lag über den von Evertsz et al. (2001) bzw. Xu et al. (2001) beobachteten Kreuzhybridisierungssignalen von weniger als 20 % bei einer Sequenzhomologie kleiner als 80 %. Die Unterschiede könnten auf die Verwendung von unterschiedlichen Array-Methoden (Fluoreszenz-Hybridisierung auf Glas, Radioaktive-Hybridisierung auf Nylonmembran) zurückzuführen sein. Das relativ starke Kreuzhybridisierungssignal der *TIP1;2*-cDNA-Sonde scheint allerdings auch auf Bereiche zwischen der *TIP1;1*-Probe mit der *TIP1;2*-cDNA-Sonde zurückzuführen zu sein, die hoch homolog sind: 3 Bereiche waren mit je 17 bp Überlappung zu 100 % identisch, ein längerer Bereich zeigte 68 bp Identität über 71 bp.

Als Kriterium für die Spezifität der 3'-UTR-Sonden wurde aufgrund dieser Überlegungen und Experimente eine Homologie von 70 % über 70 bp festgelegt. 32 Gen-spezifische Sonden entsprachen diesem Kriterium und wurden daher als „zweifelsfrei“ spezifisch eingestuft. Zwei Sonden zeigten Homologien mit anderen MIPs. Da sich diese ebenfalls auf dem Array befanden, kann eine eventuell auftretende Kreuzhybridisierung unmittelbar aufgespürt werden. Vier Gen-Sonden (*NIP2;1*, *NIP6;1*, *TIP3;1* und *TIP3;2*) überlappten in einem Bereich größer als 50 bp mit den 3'-UTRs von benachbarten Genen. Für diese Gene wurden neue Sonden entworfen, die aber in vorliegender Arbeit noch nicht integriert sind.

4.2 Organ-spezifische Expression der *MIPs* in *A. thaliana*

Mit Hilfe der Gen-spezifischen Sonden der *MIPs* war es möglich, alle *MIPs* in *A. thaliana* auf ihr Expressionsprofil hin zu untersuchen. Diese Analyse sollte Aufschluss darüber geben, welche *MIPs* in welchen Organen bevorzugt exprimiert werden bzw. welche ubiquitär in der ganzen Pflanze zu finden sind, und ob hoch homologe *MIP*-Mitglieder auch ähnliche Expressionsprofile zeigen. Die mit der Array-Analyse erzielten Daten wurden mit bereits in der Literatur beschriebenen Expressions-Analysen verglichen, die mit anderen Methoden (z.B. β -Glucuronidase-Reporter-Gen-Analysen) durchgeführt wurden, um so die Validität der Array-Daten zu überprüfen.

Eine Organ-spezifische Expressions-Analyse einiger *MIP*-Mitglieder in *A. thaliana* war von Weig et al. (1997) durchgeführt worden. Als Sonden benutzten die Autoren cDNAs. Mit Beendigung des Sequenzierungsprojekts von *A. thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) wurde aber deutlich, dass die *MIPs* innerhalb der Subfamilien hoch homolog und damit Kreuzhybridisierungen sehr wahrscheinlich sind. In ihren Untersuchungen zeigten auch 3 EST-Sonden, die zu demselben *MIP* gehören, unterschiedliche Transkriptionsprofile für dieses *MIP*. Der Vergleich von Expressionsprofilen zweier homologer Gene unterschiedlicher Spezies gestaltet sich ebenfalls schwierig. So zeigen die Expressionsmuster der δ -TIP (TIP2-Familie) homologen Mitglieder in *Arabidopsis thaliana* (Daniels et al., 1996), in *Helianthus annuus* (Sarda et al., 1997), in Rettich (Higuchi et al., 1998) und im Spinat (Karlsson et al., 2000) Unterschiede (Karlsson et al., 2000). Anscheinend sind auch hoch homologe Mitglieder in verschiedenen Pflanzen nicht notwendigerweise ortholog.

4.2.1 *MIP*-Expression in verschiedenen Organen der adulten *A. thaliana* Pflanze

Wie aus Abb. 3.2 (siehe Ergebnisse, 3.2) ersichtlich, konnten *MIPs* in allen untersuchten Organen detektiert werden, die einzelnen Mitglieder zeigten jedoch unterschiedliche Expressionsprofile innerhalb der Pflanze.

Mitglieder aus der *PIP*-Subfamilie wurden in allen untersuchten Organen exprimiert. Zusätzlich konnte für jedes *PIP*-Mitglied eine Expression in mindestens einem Organ detektiert werden. Einige *PIPs* zeigen auch eine bevorzugte Expression in bestimmten Organen.

Zu den hoch und ubiquitär exprimierten *MIPs* zählen *PIP1;1*, *PIP1;2*, *PIP1;5* und *PIP2;1*. Diese Gene zeigen die höchste Expression in der Wurzel und diese Beobachtung deckt sich damit, dass die meisten ESTs zu *PIP1;1*, *PIP1;2* und *PIP2;1* aus Wurzeln stammen (Quigley et al., 2001). Anhand von β -Glucuronidase-Reporter-Gen-Analysen in unserem Labor (Franck, 1998) konnte bereits eine Expression von *PIP1;1*, und *PIP2;1* in Blättern, Wurzel, Blüten und Schoten detektiert werden. Keine Expression konnte in Stängeln nachgewiesen werden. Auch Kaldenhoff et al. (1995) konnten keine GUS-Färbung für *PIP1;2* in Stängeln nachweisen. Möglicherweise ist in Stängeln die GUS-mRNA nicht stabil bzw. kommt es dort zu einer Inhibierung der GUS-Enzymaktivität. Die ubiquitäre Expression von *PIP1;5* war bis dato noch nicht bekannt. Falls *PIP1;5* für ein Aquaporin kodiert, dürfte ihm, zusammen mit *PIP1;1*, *PIP1;2* und *PIP2;1* eine Aufgabe bei der Regulation der Wasserpermeabilität der Plasmamembran in allen Pflanzenteilen zukommen.

Interessant ist das ähnliche Expressionsprofil von *PIP1;2* und *PIP2;1* in *A. thaliana* Organen. Anhand einer β -Glucuronidase-Reporter-Gen-Analyse konnte aber gezeigt werden, dass *PIP2;1* bevorzugt in Zellen in und um das vaskuläre Gewebe exprimiert wird, *PIP1;2* jedoch ubiquitär in allen lebenden Zellen (Franck, 1998; Kaldenhoff et al., 1995). Damit scheinen

diese PIPs unterschiedliche Aufgaben innerhalb der Organe zu besitzen. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass zur Funktionsaufklärung eine zelluläre Lokalisation wichtig ist und für alle MIPs zur weiteren Charakterisierung durchgeführt werden sollte.

Zwei PIPs waren als bevorzugt in Blüten exprimierte Gene beschrieben: *PIP1;4* und *PIP2;7* (Utsugi et al., 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung bestätigt werden, da auch hier die Expression dieser beiden Gene in der Blüte am höchsten ist. Anhand der Array-Analyse der gesamten PIP-Familie wurde ein weiteres PIP-Mitglied identifiziert, das bevorzugt in Blüten exprimiert war: *PIP2;6*. Dieses Ergebnis konnte mittels semi-quantitativer RT-PCR bestätigt werden (siehe Ergebnisse, Abb. 3.3, 3.2). Auch das homologe *PIP2;5* zeigte ausschließlich eine Expression in reproduktiven Organen (Blüten und Schoten). Zu *PIP2;5* wurden ESTs nur in grünen Schoten beschrieben (Quigley et al., 2001). Mit der semi-quantitativen RT-PCR wurden auch Transkripte für *PIP2;5* in Blättern und Stängeln nachgewiesen (siehe Ergebnisse, Abb. 3.3, 3.2).

In Blüten ist Wasser an vielfältigen Prozessen beteiligt: Bei der Reifung der Pollenkörner (Dehydrierung und Rehydrierung), bei der Befruchtung (Versorgung des wachsenden Pollenschlauchs mit Wasser) und beim Öffnen und Schließen der Blüten (Sepalen und Petalen). In *Brassica campestris* wurde einem PIP1-Mitglied, MIP-MOD, eine wichtige Funktion bei der Verhinderung der Selbstbestäubung zugeschrieben (Ikeda et al., 1999). Eine Selbst-Inkompatibilitätsantwort ist in *A. thaliana* zwar nicht vorhanden, dennoch wäre umgekehrt eine Beteiligung von PIPs bei der Bildung und Reifung von Pollenkörnern, bei der Wasserversorgung von wachsenden Pollenschläuchen sowie beim Blühvorgang denkbar.

Drei PIPs waren ausschließlich in der Wurzel exprimiert: *PIP2;4*, *PIP2;8* und *PIP1;3*. Die exklusive Expression von *PIP2;4* in Wurzeln wird durch die Tatsache gestützt, dass ESTs nur aus diesem Organ bekannt sind (Quigley et al., 2001). β -Glucuronidase-Reportergen-Analysen in unserem Labor (Schäffner, pers. Mitteilung) bestätigten die Expression dieses PIP-Mitglieds in der Wurzel. Allerdings konnte mittels semi-quantitativer RT-PCR auch eine geringe Expression in Blüten und Stängeln nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse, Abb. 3.3, 3.2). Von *PIP2;8* und *PIP1;3* sind allerdings auch ESTs aus weiteren Organen bekannt. Möglicherweise werden diese Gene nur in ganz spezifischen Zellen exprimiert, oder sie zeigen eine entwicklungsabhängige Expression, die in vorliegender Analyse nicht erfasst wurde. Mit Ausnahme von *PIP1;3* (Kammerloher et al., 1994) ist für diese PIP-Mitglieder eine Funktion als Wasserkanäle nicht bekannt. Die bevorzugte Expression dieser Gene in der Wurzel lässt vermuten, dass sie eine relativ spezifische Aufgabe in diesem Bereich der Pflanze innehaben.

Auffallend ist, dass die zu bekannten Glycerin-Transportern homologen MIPs in *A. thaliana* bevorzugt in der Wurzel zu finden sind. *PIP1;3* ist der am höchsten homologe *A. thaliana* Vertreter zu NtAQP1 aus Tabak, für das gezeigt werden konnte, dass es neben Wasser noch in der Lage ist, Glycerin zu transportieren (Biela et al., 1999; Johanson et al., 2001). Glycerin kann auch von NIP1;1, einem NIP-Mitglied in *A. thaliana* transportiert werden (Weig und Jakob, 2000b). Auch dieses Gen zeigte eine bevorzugte Expression in Wurzeln (siehe unten). Nt-TIPa, ein TIP-Mitglied aus dem Tabak, ist permeabel für Glycerin und Harnstoff (Gerbeau et al., 1999). Das zu diesem TIP am höchsten homologe MIP in *A. thaliana* ist TIP4;1 (Johanson et al., 2001). Auch dieses TIP war nur in Wurzeln zu finden (siehe unten). Die Eigenschaft andere, ungeladene Moleküle wie Wasser zu transportieren, scheint mit Ausnahme der SIPs, zu denen es noch keine Transportstudien gibt, eine Funktion zu sein, die in allen MIP-Subfamilien vertreten ist. Für die *A. thaliana* MIPs, einschließlich *PIP1;3* und TIP4;1, gibt es allerdings noch keine experimentellen Nachweise einer Glycerin-Permeabilität.

Über die physiologische Bedeutung von Glycerin in *A. thaliana* und anderen Pflanzen ist allerdings bis *dato* wenig bekannt.

In der **TIP**-Subfamilie zeigen ebenfalls einige Mitglieder ein ubiquitäres Expressionsmuster in *A. thaliana*: *TIP1;1* (ehemals γ TIP), *TIP1;2*, *TIP2;1* (früher δ TIP) und *TIP2;2*. Wie die vier ubiquitär exprimierten *PIPs* zeigen auch die in allen untersuchten Organen detektierten *TIPs* in Wurzeln das höchste Expressionsniveau. Die bevorzugte Expression dieser *TIPs* in Wurzeln wird durch die hohe Anzahl an ESTs aus diesem Organ gestützt (Quigley et al., 2001).

Expressions-Analysen mit einer Sonde aus dem 3'-UTR von Höfte et al. (1992) bestätigen die ubiquitäre Expression von *TIP1;1* in allen untersuchten Organen. Allerdings war *TIP1;1* in ihren Untersuchungen gleichmäßig exprimiert. Da die Autoren keine Angaben zum Alter der untersuchten Organe machten, kann keine Erklärung der Unterschiede in den Expressions-Analysen gegeben werden.

Das homologe *TIP1;2* zeigt ein ähnliches Expressionsmuster auf Organ-Ebene, die Expressionen in Stängeln, Blättern und Blüten sind aber höher als die von *TIP1;1*. Das ähnliche Expressionsprofil der beiden homologen Mitglieder lässt im ersten Augenblick auf ähnliche Aufgaben in der Pflanze schließen. Erst zelluläre Expressionsstudien könnten Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten in der Verteilung dieser *TIPs* innerhalb der einzelnen Organe liefern.

Die Expression von *TIP2;1* (δ TIP) in den verschiedenen Organen deckt sich im Wesentlichen mit Analysen mittels einer Sonde aus dem 3'-UTR von Daniels et al. (1996). In deren Untersuchungen waren hohe Expressionen in Blüten und Stängeln zu finden, die Expression in Schoten hingegen war gering. In Rosetten von 3 Wochen alten Pflanzen war die Expression ähnlich der in Blüten und Stängeln. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde allerdings eine geringere Expression in Blättern von 3 Wochen alten Pflanzen gegenüber Blüten und Stängeln festgestellt. Die Expression in älteren Blättern ging dagegen bei Daniels et al. (1996) stark zurück, möglicherweise befanden sich deren Pflanzen in einem anderen Entwicklungsstadium als die in der vorliegenden Untersuchung. Die Unterschiede im Expressionsniveau könnten auch auf die Verwendung unterschiedlichen Pflanzenmaterials (Blätter anstatt Rosetten bei Daniels et al. (1996)) zurückzuführen sein. Große Unterschiede zeigten sich in der Expression in Wurzeln: Daniels et al. (1996) konnten *TIP2;1* nur in geringen Mengen in Wurzeln nachweisen, die Array-Analyse zeigte hingegen eine deutliche Expression in Wurzeln. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass Daniels et al. (1996) 6 Tage alte Wurzeln aus festem Substrat untersuchten, im Rahmen der vorliegenden Organ-spezifischen Expressions-Analysen aber 3 Wochen alte Wurzeln aus hydroponischer Anzucht verwendet wurden.

Das Expressionsprofil des homologen *TIP2;2* sieht hingegen etwas anderes aus: Dieses Gen ist stark in Wurzeln und eher schwach in Stängeln und Blüten exprimiert.

Die hohen und ubiquitären Expressionen dieser *TIP*-Mitglieder in allen Pflanzenorganen deuten auf konstitutive Funktionen in der Pflanze hin. *TIP1;1*, ein Aquaporin (Maurel et al., 1993), scheint dabei hauptsächlich in elongierenden Zellen exprimiert zu sein (Ludevid et al., 1992). Transkripte von *TIP2;1*, ebenfalls ein Aquaporin, finden sich verstärkt in sich entwickelnden vaskulären Geweben (Daniels et al., 1996).

Zwei *TIP* Mitglieder waren ausschließlich in der Wurzel zu finden: *TIP4;1* und *TIP2;3*. Für *TIP4;1* wurden ESTs nur in der Wurzel gefunden (Quigley et al., 2001). Für *TIP2;3* sind nur ESTs aus ganzen Pflanzen beschrieben (Quigley et al., 2001).

TIP3;1 und *TIP3;2* wurden hingegen nur in der Schote detektiert. Die Sonden dieser Gene können allerdings Kreuzhybridisierungen mit anderen Genen aufweisen. Die spezifische

Expression in Schoten stimmt aber gut mit Daten aus der Literatur überein, in denen *TIP3;1* als Samen-spezifisches α -*TIP* beschrieben wurde, das in Tonoplasten von Proteinspeichernden Vakuolen lokalisiert ist (Höfte et al., 1992).

Keine Expressionen wurden für *TIP1;3*, *TIP5;1* und *TIP2;x-PG* gefunden. Da weder in der vorliegenden Array-Analyse eine Expression, noch ESTs zu *TIP1;3* und *TIP5;1* in den Datenbanken gefunden wurden, wäre es möglich, dass diese beiden TIPs nur in ganz spezifischen Zellen lokalisiert sind bzw. erst durch äußere Stimuli eine Expression zeigen. *TIP2;x-PG* ist ein Pseudo-Gen, das für ein verkürztes TIP kodieren würde (Quigley et al., 2001).

Die *NIP*-Subfamilie in *A. thaliana* besteht aus 11 Mitgliedern mit zwei Pseudo-Genen. Eine Expression konnte nur von fünf Mitgliedern nachgewiesen werden: *NIP1;1*, *NIP1;2*, *NIP3;1-PG*, *NIP5;1* und *NIP6;1*. Die Expression von *NIP6;1* ist aber durch die mögliche Kreuzhybridisierung der entsprechenden Gen-Sonde mit einem anderen Gen nicht gesichert.

Drei *NIP*-Gene fanden sich ausschließlich in der Wurzel: *NIP1;1*, *NIP3;1-PG* und *NIP5;1*. Die spezifische Expression von *NIP1;1* in Wurzeln wurde schon bei Weig und Jakob (2000b) beschrieben. Zu dem Pseudo-Gen *NIP3;1-PG* gibt es in den Datenbanken keine ESTs (02/2003), trotzdem konnten Transkripte über RT-PCR nachgewiesen werden (siehe Anhang, 7.2). Für *NIP5;1* existiert nur ein EST aus der Wurzel in den Datenbanken (Quigley et al., 2001).

NIP1;2 konnte in Wurzeln und zusätzlich noch in Blüten nachgewiesen werden, ein EST findet sich in entwickelnden Samen (Quigley et al., 2001).

NIP7;1-Transkripte konnten in keinem untersuchten Organ detektiert werden, ein EST ist aber aus Blüten bekannt (Quigley et al., 2001). Zu den restlichen *NIP*-Mitgliedern, die in den untersuchten Organen keine Expression zeigten (*NIP2;1-PG*, *NIP3;1*, *NIP4;1*, *NIP4;2*) sind auch keine ESTs bekannt (Quigley et al., 2001).

Die bevorzugte Expression von *NIPs* in der Wurzel lässt auf eine Wurzel-spezifische Funktion schließen. Zwar sind die bisher untersuchten *NIPs* aus *A. thaliana* und anderen Pflanzen in der Lage, Wasser zu transportieren, diese *NIP*-Mitglieder können aber auch andere kleine, ungeladene Moleküle transportieren. Die heterologe Expression von *NIP1;1* und *NIP1;2* aus *A. thaliana* in der Hefe zeigte, dass diese *NIPs* als Glycerin-Permeasen fungieren können (Weig und Jakob, 2000b). Das namensgebende NOD26, das in der Peribakteroidmembran der Sojabohne lokalisiert ist, sowie das zu *NIP1;2* hoch homologe LIMP2 aus *Lotus japonicus* zeigen ebenfalls Wasser- und Glycerin-Transport-Aktivitäten (Rivers et al., 1997; Dean et al., 1999; Guenther und Roberts, 2000). *NIPs* in der Peribakteroidmembran von Leguminosen dürften beim Stoffaustausch zwischen Knöllchenbakterium und Wirt beteiligt sein. Von *Arabidopsis* ist allerdings nicht bekannt, dass sie eine Symbiose mit Knöllchenbakterien eingehen. Ihnen muss damit eine andere Aufgabe in der Wurzel zukommen. Auch ist bisher nicht bekannt, in welchen zellulären Membranen diese *NIPs* in *A. thaliana* lokalisiert sind. Damit ist es schwierig, den *A. thaliana* *NIPs* eine Funktion zuzuordnen. Weig und Jakob (2000a) vermuten aber, dass sie bei hypoxischen/anoxischen Bedingungen eine Rolle spielen könnten.

Die *SIPs* stellen die vierte *MIP*-Subfamilie dar. Über Mitglieder dieser Subfamilie ist bis *dato* weder bekannt in welchen Membranen sie lokalisiert sind, noch welche Moleküle sie transportieren. Mit Hilfe des DNA-Microarrays konnte zum ersten Mal ein Expressionsprofil in *A. thaliana* beschrieben werden.

Alle drei Vertreter aus der *SIP*-Subfamilie konnten zumindest in zwei Organen detektiert werden. *SIP1;1* wird in allen Organen exprimiert, allerdings ist die Expression in Blättern sehr schwach, die höchste Expression findet sich in Schoten. ESTs zu diesem Gen wurden in Wurzeln und oberirdischen Organen gefunden (Quigley et al., 2001). *SIP1;2* ist im Gegensatz zum homologen *SIP1;1* nur sehr schwach in Wurzeln und Schoten exprimiert. ESTs sind aus Wurzeln und oberirdischen Organen bekannt (Quigley et al., 2001). *SIP2;1* wird in allen Organen, außer in Blättern exprimiert. Die meisten Transkripte finden sich in Wurzeln und Schoten. ESTs sind nur aus Wurzeln bekannt (Quigley et al., 2001).

Da von den *SIP*-Mitgliedern in *A. thaliana* bzw. auch anderen Pflanzen noch nicht bekannt ist, welche Moleküle sie transportieren, ist es schwierig, eine Funktion abzuleiten. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde aber gezeigt, dass *SIPs* bevorzugt in Schoten exprimiert werden. Da hier noch grüne, unreife Schoten untersucht wurden, könnten sie unter anderem bei der Entwicklung der Samen beteiligt sein.

4.2.2 Fazit der Organ-spezifischen Expressions-Analyse

Die Validität der Array-Daten wurde durch Vergleiche mit einigen in der Literatur vorhandenen Daten bestätigt (siehe Text oben). In einigen Fällen zeigte sich aber dennoch, dass es Unterschiede bei den vorliegenden Untersuchungen zu EST-Anzahlen bzw. Slot-Blot Analysen gibt. Unterschiede könnten sich aus unterschiedlich alten Versuchsmaterialien ergeben. Eine entwicklungsabhängige Expression wurde bei *MIP*-Mitgliedern bereits beschrieben: Kaldenhoff et al. (1995) stellten fest, dass mit zunehmendem Alter der Organe die Expression von *PIP1;2* abnahm. Auch in unserem Labor konnte gezeigt werden, dass Transkripte von *PIP*-Mitgliedern in Blättern mit zunehmendem Alter (13 auf 29 Tage) abnahmen (Franck, 1998).

Die Überprüfung der Daten aus der Array-Expressions-Analyse von ausgewählten *MIPs* mittels semi-quantitativer RT-PCR (siehe Ergebnisse, 3.2) zeigte zudem, dass die Sensitivität des Arrays geringer als die der semi-quantitativen RT-PCR ist, schwach exprimierte Gene also unter dem Detektionslimit des Array-Systems liegen können. Durch die Verwendung ganzer Organe bei den Expressions-Analysen könnte es auch vorgekommen sein, dass *MIP*-Transkripte aus spezifischen Zellen verdünnt wurden und so unterhalb des Detektionslimits der Array-Analyse fielen.

Die im Rahmen der Organ-spezifischen Expressions-Analyse verwendeten *A. thaliana* Pflanzen wurden hydroponisch angezogen, somit könnten sich Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der *MIPs* in diesen Pflanzen zu jenen Pflanzen ergeben, die auf festem Substrat (z.B. Erde) wuchsen.

Die Expressions-Analyse aller *A. thaliana MIPs* zeigt ein sehr differenziertes Bild für die Mitglieder der *MIPs*: Neben ubiquitär exprimierten *MIPs* sind einige von ihnen nur in ganz bestimmten Organen zu finden oder sie zeigen eine bevorzugte Expression in bestimmten Organen. *MIPs* scheinen nicht nur zentrale Aufgaben wie Wassernachschub bei elongierenden oder sich teilenden Zellen, bzw. Be- und Entladen von Wasser in das vaskuläre System zu besitzen. Die bevorzugte Expression von *MIPs* in manchen Organen lässt auf ganz bestimmte Aufgaben schließen (z.B. *PIP1;4*, *PIP2;7* und *PIP2;6* bevorzugt in der Blüte, *NIPs* hauptsächlich in der Wurzel; siehe Text oben).

Für *AQP1*, ein Aquaporin aus dem Menschen, gibt es Hinweise, dass es permeabel für CO_2 ist (Prasad et al., 1998; Blank und Ehmke, 2003). Allerdings gibt es auch Befunde, die gegen eine Beteiligung von *AQP1* beim Transport von CO_2 über Membranen sprechen (z.B. Yang et al., 2000; Fang et al., 2002). CO_2 ist für Pflanzen von besonderer Bedeutung, da sie daraus bei der Photosynthese die benötigten Kohlenhydrate produzieren. Bei einem *MIP*, das spezifisch

für CO₂ permeabel ist, wäre demnach zu vermuten, dass es hauptsächlich in Blättern exprimiert wird. Bei vorliegender Organ-spezifischer Expressions-Analyse konnte aber für kein *MIP* eine bevorzugte Expression in Blättern festgestellt werden. Falls pflanzliche *MIPs* permeabel für CO₂ sind, scheint dies daher eine zusätzliche Funktion zu sein. Untersuchungen von Uehlein et al. (2003) zeigten, dass ein Aquaporin aus Tabak (NtAQP1) permeabel für CO₂ ist, und die Überexpression von NtAQP1 die Wachstumsrate der Blätter sowie die Photosyntheserate erhöhte. Damit ergeben sich Hinweise auf eine physiologische Relevanz des Aquaporin-vermittelten CO₂-Transports in der Pflanze. Für dasselbe Protein wurde allerdings auch eine Glycerin-Permeabilität beschrieben (Biela et al., 1999). Damit scheinen *MIPs* tatsächlich vielfältige Funktionen zu besitzen.

Für alle bis *dato* nicht näher untersuchten *MIP*-Mitglieder konnte erstmals ein Expressionsprofil erstellt und damit eine wichtige Grundlage für weitergehende Untersuchungen geschaffen werden. Zur genaueren Funktionsaufklärung müssten allerdings für die meisten *MIP*-Mitglieder noch zelluläre (bzw. subzelluläre) Lokalisationen, bzw. Transport-Untersuchungen durchgeführt werden.

Aufgrund der hohen Homologie einzelner *MIP*-Mitglieder wäre zu vermuten, dass es sich dabei um redundante Gene handelt. Ein auffallend ähnliches Organ-Expressionsprofil konnte für die beiden homologen *MIP*-Mitglieder *TIP1;1* und *TIP1;2* sowie *PIP1;1* und *PIP1;2* gezeigt werden. Von diesen reagierten nur die beiden *TIP*-Gene bei Wasserstress auch ähnlich (siehe Ergebnisse, Abb. 3.5, 3.3.1). Die Expressionsprofile weiterer homologer *MIP*-Mitglieder, wie z.B. *PIP1;3/PIP1;4*, *PIP2;2/PIP2;3*, *PIP2;7/PIP2;8* unterschieden sich aber stark. Die beiden *PIP*-Mitglieder *PIP1;3* und *PIP1;4* zeigten auch bei Wasserstress (siehe Ergebnisse, Abb. 3.5, 3.3.1) unterschiedliche Stress-Reaktionen auf Transkript-Ebene. Eine redundante Entwicklung scheint daher nicht immer stattgefunden zu haben und möglicherweise ist eine solche Redundanz genomisch nicht sehr stabil.

In der Wurzel zeigen sich nicht nur die meisten, sondern auch die am höchsten exprimierten *MIPs*. Dabei waren besonders jene *MIPs* stark exprimiert, von denen bekannt ist, dass sie Aquaporine sind (*PIP1;1*, *PIP1;2*, *PIP2;1*, *PIP2;2* (Kammerloher et al., 1994), *TIP1;1* (Maurel et al., 1993) bzw. *TIP2;1* (Daniels et al., 1996)). In der Wurzel, als primäres Organ zur Wasser-Aufnahme, scheinen Aquaporine eine vielfältige, wichtige Rolle zu spielen.

4.2.3 *MIP*-Expression in Keimlingen

Bei der Untersuchung der *MIP*-Expressionsprofile in Keimlingen (siehe Ergebnisse, Abb. 3.2, 3.2) zeigte sich, dass jene Gene, die in allen Organen detektiert wurden, schon im Keimlingsstadium exprimiert werden (*PIP1;1*, *PIP1;2*, *PIP1;5*, *PIP2;1*, *TIP1;1*, *TIP1;2*, *TIP2;1*, *TIP2;2* und *SIP1;1*). In der adulten Pflanze ubiquitär exprimierte *MIPs* scheinen schon im Keimlingsstadium eine essentielle Rolle beim Transport von Wasser (oder anderer Moleküle) zu besitzen.

Alle weiteren *MIPs*, die in Keimlingen detektiert wurden, waren in der adulten Pflanze bevorzugt in Wurzeln und Blüten/Schoten exprimiert.

4.3 Reaktion der *MIPs* auf Wasserstress

4.3.1 Transkriptionsänderungen von *MIPs* bei NaCl- und Sorbitolstress

Für ein optimales Wachstum sind Pflanzen auf die Verfügbarkeit von Wasser angewiesen. Trockenheit und hohe Salzkonzentrationen im Boden können zu Wassermangel führen. Als zumeist sessile Organismen ist es für Pflanzen deshalb wichtig, den Wasserhaushalt unter diesen Stressbedingungen genauestens zu regulieren. Untersuchungen zum Effekt von NaCl auf Organ-Ebene haben gezeigt, dass NaCl die Wasserleitfähigkeit von Mais- und *Arabidopsis*-Wurzeln senkt (Azaizeh und Steudle, 1991; Martínez-Ballesta et al., 2003). Eine Verminderung der Wasserleitfähigkeit zeigte sich auch auf zellulärer Ebene in Mais (Azaizeh et al., 1992). Die Beteiligung von Aquaporinen an Wasserstressreaktionen ist daher naheliegend.

Untersuchungen von *MIP*-Transkripten bei Wasserstress wurden unter anderem in *Mesembryanthemum crystallinum* (Kirch et al., 2000, Yamada et al., 1995), *Craterostigma plantagineum* (Mariaux et al., 1998), *Helianthus annuus* (Sarda et al., 1999) oder *Oryza* sp. (Malz and Sauter, 1999, Liu et al., 1994, Li et al., 2000) durchgeführt. In all diesen Pflanzen zeigte sich, dass *MIPs* bei Wasserstress in ihrer Transkription beeinflusst werden. Dabei ergab sich ein sehr differenziertes Bild, in dem innerhalb der untersuchten Pflanzen einige *MIPs* induziert, andere reprimiert wurden.

Durch die Array-Analyse mit den Gen-spezifischen Sonden war es möglich, alle *MIPs* in einer Pflanze unter Wasserstress auf ihr transkriptionelles Verhalten zu untersuchen. Diese Untersuchung an den *MIPs* wurde in Wurzeln und Blättern durchgeführt, um herauszufinden, inwieweit in diesen Organen differenzielle Stress-Antworten stattfinden.

Wasserstress wurde dabei in Form einer 100 mM NaCl- bzw. 200 mM Sorbitol-Applikation an Wurzeln ausgelöst und Transkriptänderungen nach 5, 24 und 48 Stunden in Wurzeln und Blättern gemessen.

4.3.1.1 Vergleich der beiden Stressoren NaCl und Sorbitol anhand der *MIP*-Induktions- bzw. Repressionsprofile

Salz und Sorbitol stellen nicht nur einen osmotischen Stress für Pflanzen dar, Na⁺ und Cl⁻-Ionen sind zudem in hohen Konzentrationen toxisch für die Pflanze (siehe Einleitung, 1.2.1). Anhand einer iso-osmotischen Sorbitol- und NaCl-Behandlung der Pflanzen wurde der Frage nachgegangen, inwieweit *MIPs* durch einen osmotischen Stress, bzw. Stressor-spezifisch in ihrer Transkription beeinflusst werden.

Beim Vergleich der beiden Stressoren NaCl und Sorbitol fällt auf, dass alle *MIP*-Gene, die bei der NaCl-Behandlung reagieren, auch bei der Sorbitol-Behandlung in ihrer Transkription beeinflusst werden. Besonders die *TIP*-Familie zeigte sowohl im Blatt als auch in der Wurzel große Ähnlichkeiten in ihrer Stress-Antwort auf NaCl und Sorbitol-Behandlung. Die Gemeinsamkeiten einiger *MIPs* im Verhalten ihrer Stress-Antwort auf NaCl bzw. Sorbitol lassen vermuten, dass die transkriptionellen Änderungen auch bei NaCl durch einen osmotischen Stress und nicht Stressor-spezifischen Effekt ausgelöst werden. Die Pflanze könnte über einen osmotischen Sensor (siehe Einleitung, 1.2.2) eine Reduktion des extrazellulären Wasserpotenzials erkennen und über verschiedene Signalmoleküle (ABA, Ca²⁺, etc., siehe auch Einleitung, 1.2.2, 1.2.3) die Regulation auf Transkript-Ebene steuern. Bis *dato* ist aber noch relativ wenig über die transkriptionelle Regulation von *MIPs* bekannt. Kaldenhoff et al. (1993) sowie Franck (1998) konnten regulatorische *cis*-Elemente in einigen Promotoren von *MIPs* identifizieren. Dies waren ABRE- und MYC-Elemente. Diese

Elemente spielen bei der Induktion von einigen Genen bei Wasserstress eine wichtige Rolle (siehe Einleitung, 1.2.3). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die stromaufwärts vom Start-Codon liegenden Bereiche (3000 bp) der durch NaCl- und Sorbitolstress induzierten *MIPs* auf regulatorische *cis*-Elemente überprüft (siehe Tab. 4.1). Das ABRE-Element in *PIP1;4*, sowie MYC- und MYB-Elemente in *TIP4;1* und *NIP5;1* deuten darauf hin, dass ABA bei der transkriptionellen Regulation dieser Gene bei Wasserstress beteiligt ist.

Tab. 4.1: Bei Wasserstress-Reaktionen beteiligte *cis*-Elemente in den stromaufwärts vom Start-Codon liegenden Bereichen der induzierten *MIP*-Mitglieder *PIP1;4*, *TIP4;1* und *NIP5;1*.

Gen	ABRE-Element ¹ PyACGTG(G/T)C	DRE-Element ¹ TACCGACAT	MYC ² - Bindedomäne CACATG	MYB ² - Bindedomäne TGGTTAG
<i>PIP1;4</i>	-1839-1846 ³ (W): CACGTGTC	-	-1645-1650 (C) -1862-1867 (W) -2110-2115 (W) -2720-2725 (W)	-
<i>TIP4;1</i>	-	-	-1410-1415 (W) -162-167 (C)	-1032-1038 (W) -1925-1931 (W)
<i>NIP5;1</i>	-	-	-806-811 (C)	-538-544 (C)

¹ Seki et al., 2002a

² Abe et al., 1997

³ Die Zahlen beschreiben den Nukleotid-Abstand der *cis*-Elemente zum Startcodon.
(W) Watson, (C) Crick kennzeichnen die Orientierungen der Sequenzmotive.

Die meisten *MIPs* zeigten allerdings im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen eine Repression in ihrem Transkriptgehalt. Es wäre daher möglich, dass auch Transkriptions-Repressoren oder der Ausfall von Aktivatoren bei der transkriptionellen Regulation von *MIPs* bei Wasserstress beteiligt sind.

Deutliche Unterschiede in der Transkriptionsantwort bei NaCl- und Sorbitol-Behandlung sind besonders in der Wurzel nach 48 Stunden zu verzeichnen. Zwar sind alle Gene, die durch die NaCl- und Sorbitol-Applikation reagieren reprimiert, Sorbitol beeinflusst allerdings mehr Gene in ihrer Transkription als NaCl. Zu den exklusiv bei der Sorbitol-Behandlung reprimierten *MIPs* zählen die hoch exprimierten *PIP*-Mitglieder *PIP1;2* und *PIP2;1*, sowie *PIP1;5* und die *SIP*-Mitglieder *SIP1;1* und *SIP2;1*. Die beiden *TIP*-Mitglieder *TIP1;1* und *TIP2;2* zeigen auch eine tendenziell stärkere Repression (≥ 2 -fach) bei der Sorbitol-Behandlung im Vergleich zur NaCl-Applikation (siehe Abb. 3.5, 3.3.1). Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Pflanzen bei Sorbitolstress auch leichte Welkeerscheinungen. Gesamt gesehen scheint Sorbitol einen stärkeren Einfluss auf den Wasserhaushalt in der Pflanze zu haben als NaCl.

In beiden Fällen kann die Aufnahme von NaCl als *compatible solute* zur raschen Turgorerholung führen, da auch bei Sorbitolstress die Aufnahme von Na⁺- und Cl⁻-Ionen zusammen mit K⁺ gezeigt wurde (Shabala und Lew, 2002). Die Aufnahme von Sorbitol selbst ist allerdings auch möglich (Hohl und Schopfer, 1991). Damit würde zwar in beiden Fällen das osmotische Potenzial in der Zelle gesenkt werden, die Aufnahme von Sorbitol könnte aber auch andere, von NaCl verschiedene, sekundäre Effekte auslösen. Möglicherweise ist in den Sorbitol-gestressten Pflanzen die Beladung des Xylems mit Ionen gestört und in der Folge der osmotisch getriebene Wasserfluss von den Wurzeln zu den Blättern erniedrigt. Es wäre allerdings auch denkbar, dass Sorbitol über das Xylem in die oberirdischen Pflanzenteile gelangt und dort direkt einen Einfluss auf den Wasserhaushalt in Blättern hat. Auch wurde ein

durch NaCl-Schockbehandlung ausgelöster programmierter Zelltod beschrieben, der aber morphologischen Änderungen und dadurch der Adaptierung an den Salzstress vorausgeht (Huh et al., 2002).

4.3.1.2 Frühe Induktion von *MIPs* bei Wasserstress

Bei der transkriptionellen Änderung von *MIPs* bei Salz- und Sorbitolstress wurde innerhalb der ersten 24 Stunden eine Induktion von drei *MIP*-Genen, *NIP5;1*, *PIP1;4* und *TIP4;1*, in der Wurzel festgestellt. Im Blatt waren keine Induktionen von *MIPs* vorhanden. Nach 48 Stunden Stress-Behandlung mit Sorbitol zeigten *PIP1;4* und *TIP4;1* allerdings eine Repression, eine Induktion dieser *MIPs* scheint daher bei der frühen Stress-Antwort von Bedeutung zu sein. Sofern diese Gene für Aquaporine kodieren, stellt sich die Frage, warum die Pflanze die Wasserpermeabilität an den Biomembranen bei einer schockartigen Erniedrigung des osmotischen Potentials der Nährlösung erhöht. Allerdings sind alle drei Gene sehr schwach exprimiert. Die Proteine sind daher vermutlich wenig abundant und eine geringfügige Erhöhung wäre von geringer physiologischer Relevanz oder sie sind nur in wenigen, spezifischen Zellen exprimiert. Möglicherweise sind dies Zellen, bei denen es unter Wasserstress zu einer erhöhten Transportaktivität von Ionen bzw. anderer osmotisch wirksamer Stoffe kommt, und folglich eine hohe Wasserpermeabilität einen raschen Ausgleich osmotischer Unterschiede ermöglicht. Durch eine zelluläre Lokalisation der induzierten *MIPs* könnte festgestellt werden, um welche Zellen es sich dabei handelt, und ob diese *MIPs* in denselben Zellen exprimiert sind. Von keinem dieser *MIPs* wurde allerdings bis *dato* eine Aquaporin-Aktivität beschrieben. Das zu *TIP4;1* hoch homologe Nt-TIPa aus Tabak (Gerbeau et al., 1999) transportiert neben Wasser noch Glycerin und Harnstoff. Der *NIP*-Subfamilie, zu denen *NIP5;1* zählt, dürfte ebenfalls eine Aufgabe im Transport anderer Moleküle als Wasser zukommen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die bei Wasserstress induzierten *MIPs* andere Aufgaben als die Veränderung der Wasserpermeabilität von Plasmamembran bzw. Tonoplast besitzen, zumal auch die in *A. thaliana* bis *dato* bekannten Aquaporine eine andere Reaktion auf den Wasserstress zeigen (siehe 4.3.2).

4.3.2 Beteiligung von Aquaporinen bei Wasserstress

Xiong und Zhu (2002) zeigten, dass *A. thaliana* Pflanzen, die auf Erde wuchsen, bei einer Wässerung mit 100 mM NaCl ihr Wachstum ganz einstellten und starben. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden *A. thaliana* Pflanzen in hydroponischen Kulturen angezogen und 100 mM NaCl bzw. 200 mM Sorbitol zum Auslösen von Wasserstress zur Nährlösung zugegeben. Diese Pflanzen zeigten zwar nach 72 Stunden an manchen Blättern Ausbleichungen, die Pflanzen konnten allerdings bis zur Blüte und Samenreife weiter kultiviert werden. Der Wasserstress dürfte bei vorliegenden Untersuchungen „milder“ sein und zeigt, dass sich die Pflanzen an den Stress anpassen konnten.

Zu den auf beide Stressoren reagierenden *MIPs* zählen auch die abundanten Aquaporine *PIP1;1*, *PIP2;2*, *TIP1;1*, *TIP2;1* sowie *PIP1;3* (siehe Abb 3.5, 3.3.1). Alle diese Aquaporine zeigten im Rahmen der vorliegenden Wasserstress-Untersuchungen eine Repression auf Transkript-Ebene. Anhand dieser Befunde wird ein Modell zur Beteiligung von Aquaporinen bei (schockartigem) Wasserstress in *A. thaliana* in Wurzeln und Blättern vorgestellt (Abb. 4.2). Dabei wird angenommen, dass sich eine Verringerung im Transkriptgehalt in einer verminderten Proteinmenge widerspiegelt, die eine Erniedrigung der Wasserpermeabilität der Plasmamembran bzw. des Tonoplasten nach sich zieht. Einen

Zusammenhang der hydraulischen Leitfähigkeit mit der Expression von PIP1-Aquaporinen konnten Martínez-Ballesta et al. (2003) zeigen. Die hydraulische Leitfähigkeit von *A. thaliana* Wurzeln nahm mit steigender NaCl-Konzentration ab. Damit korrelierte eine Repression von PIP1-Transkripten, die mit einer *PIP1;1*-Probe kreuzhybridisierten. Zusätzlich wurde die verminderte hydraulische Wasserleitfähigkeit der NaCl-gestressten Wurzeln durch Zugabe von HgCl₂ nicht weiter beeinflusst.

Unter physiologisch optimalen Bedingungen mit einem hohen extrazellulären Wasserpotenzial kommt es zu einer Aufnahme bzw. Abgabe von Wasser aus der Zelle. Wasser kann dabei symplastisch über Plasmodesmata bzw. transzellulär über die Plasmamembran bzw. den Tonoplasten transportiert werden (siehe Einleitung, 1.1.1.1). Aquaporine können dabei den zellulären Wassertransport erleichtern, indem sie die Wasserleitfähigkeiten von Biomembranen erhöhen. Dies gewährleistet einen raschen Ausgleich von osmotischen Unterschieden zwischen der Zelle und ihrer Umgebung (Abb. 4.2A und D). Bei Wasserstress, ausgelöst durch eine Erniedrigung des osmotischen Potenzials in der Nährlösung kommt es in Blättern und Wurzeln zu unterschiedlichen Stress-Antworten:

4.3.2.1 Wurzel

Durch eine starke Erniedrigung des extrazellulären osmotischen Potenzials kommt es zu einer Veränderung des Wasserpotenzialgradienten zwischen der Zelle und ihrer Umgebung. Das führt dazu, dass Wasser aus dem Zytoplasma in den Apoplasten „gesaugt“ wird. Dadurch kommt es im Zytoplasma zu Konzentrationsänderungen, die möglichst rasch wieder ausgeglichen werden müssen. Um wieder einen Wassereinstrom in die Zelle zu ermöglichen, produziert die Zelle *compatible solutes* zur Senkung des innerosmotischen Potenzials bzw. erhöht die Aufnahme von anorganischen Ionen (z.B. K⁺, Na⁺ und Cl⁻; Shabala und Lew, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Transkriptuntersuchungen wurde festgestellt, dass innerhalb der ersten 24 Stunden nach Stress-Applikation auch hoch exprimierte PIP-Aquaporine (*PIP1;1*, *PIP1;3* und *PIP2;2*) reprimiert, TIP-Aquaporine wie *TIP1;1* und *TIP2;1* zu diesem Zeitpunkt unbeeinflusst sind. Die Pflanze verringert demnach bei Wasserstress zuerst die Wasserpermeabilität der Plasmamembran (Abb. 4.2B), sofern die transkriptionelle Suppression sich auf Proteinebene widerspiegelt. Zudem ist für ein PIP2-Mitglied aus Spinat eine posttranslationale Regulation durch Dephosphorylierung bei Wasserstress bekannt, die ebenfalls zu einer Reduktion der Wasserpermeabilität führen könnte (Johansson et al., 1996, 1998). Erst später werden auch hoch exprimierte TIP stark reprimiert.

Die anhaltende Verringerung der Wasserleitfähigkeit der Plasmamembran unter suboptimalen Wachstumsbedingungen (Abb. 4.2B u. C) könnte die Pflanze davor schützen, bei zusätzlichen Veränderungen in den wasserreibenden Kräften (hydraulisch/osmotisch) einen schnellen Wasserverlust der Zelle und damit auch der Wurzel entgegenzuwirken. Die Regulation der Wasserpermeabilität der Plasmamembran bei Wasserstress dürfte von zentraler Bedeutung für die Pflanze sein. Neueste Untersuchungen von Aharon et al. (2003) haben gezeigt, dass eine konstitutiv hohe Wasserpermeabilität der Plasmamembran bei gradueller Austrocknung einen negativen Effekt hat. Transgene Tabak-Pflanzen, die mit einem 35S-*AtPIP1;2*-Konstrukt transformiert wurden, begannen nach 19-20 Tagen ohne Wasserzufuhr zu welken, Wildtyp-Pflanzen hingegen erst nach 25 Tagen. Die Erniedrigung der Wasserpermeabilität der Plasmamembran scheint die Pflanze bei Wasserstress vor einem raschen Wasserverlust zu schützen, was durch die konstitutive Überexpression von *AtPIP1;2* vermindert bzw. verhindert wird. Dagegen konnten Siefritz et al. (2002) zeigen, dass Tabak-

Pflanzen, bei denen durch *antisense*-Technik zwei *PIP1*-Mitglieder reprimiert waren, nach Wässerung mit einer PEG-Lösung (-0,35 MPa) bereits nach 3 Stunden zu welken begannen. Wildtyp-Pflanzen zeigten zu diesem Zeitpunkt allerdings keine sichtbaren Effekte. Die Autoren vermuteten, dass in den *antisense*-Pflanzen mit verminderter *PIP1*-Expression ein kritisches Wasserpotenzial und Turgor-Druck schneller erreicht werden als in Wildtyp-Pflanzen. Diese scheinbar gegensätzlichen Befunde sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Arten des Wasserstresses (graduelle Austrocknung vs. osmotischer Schock bzw. Osmotikum) und die Untersuchung unterschiedlicher Aquaporine zurückzuführen (Aharon et al., 2003). Martre et al. (2002) konnten zudem zeigen, dass *PIP1* und *PIP2 antisense*-Pflanzen (*Arabidopsis*) nach Trockenheit und Wiederbewässerung ihre hydraulische Leitfähigkeit und Transpirationsrate langsamer und weniger vollständig regenerierten als Wildtyp-Pflanzen. Dies mag damit zusammenhängen, dass die *antisense*-Pflanzen nach der Wiederbewässerung weniger neue Blätter entwickelten als Wildtyp-Pflanzen. All diese Untersuchungen belegen die Bedeutung der Aquaporin-abhängigen Wasserpermeabilität der Plasmamembran bei Wasserstress.

Um einen kontinuierlichen Wasserfluss aus der Vakuole und einen damit verbundenen Abfall des Zell-Turgors entgegenzuwirken, akkumulieren in der Vakuole zur Senkung des osmotischen Potenzials organische bzw. anorganische Ionen wie z.B. Na^+ und Cl^- (Hasegawa et al., 2000). Osmotische Potenzialunterschiede zwischen Zytoplasma und Vakuole können somit ausgeglichen werden. Die vorliegenden Untersuchungen lassen zudem vermuten, dass bei anhaltendem Wasserstress auch die Wasserpermeabilität des Tonoplasten gesenkt wird. Nach 48 Stunden sind neben den oben erwähnten *PIP*-Aquaporinen auch die abundanten *TIP*-Aquaporine *TIP1;1* und *TIP2;1* in ihrer Transkription gehemmt. Die daraus möglicherweise resultierende Erniedrigung der Wasserpermeabilität des Tonoplasten lässt vermuten, dass sich die Pflanze bei anhaltendem Stress vor einem zu raschen Wasserausfluss aus der Vakuole, und damit vor einer rapiden Änderung des Zell-Turgors schützt (Abb. 4.2C).

Weiterführende Untersuchungen könnten zeigen, ob die festgestellten Repressionen von Aquaporinen auch bei längerer Stress-Dauer erhalten bleiben. In *Oryza sativa* konnte für ein *MIP*-Gen gezeigt werden, dass es bei NaCl -Stress in den ersten 6 Stunden nach Stress-Applikation reprimiert, nach 7 Tagen induziert wird (Kawasaki et al., 2001).

Die Repression der *PIP*- und *TIP*-Aquaporine in Wurzeln deutet jedenfalls auf einen reduzierten transzellulären Wasserfluss bei Wasserstress hin. Besonders die Repression von *PIP1;1*, das ubiquitär in allen lebenden Zellen der Wurzel exprimiert wird (Franck, 1998) lässt vermuten, dass dabei die gesamte Wurzel von einem verminderten transzellulären Wasserfluss betroffen ist. Damit stellt sich die Frage, welche Auswirkungen eine verminderte Wasserpermeabilität von Zellen auf den Wasserfluss der Nährlösung über die Wurzel zu den wasserführenden Gefäßen (Xylem) haben könnte.

Die Reduktion des transzellulären Wasserflusses führt zur Erhöhung des Anteils des apoplastischen Wasserflusses (Martínez-Ballesta et al., 2003). Der Wasserfluss im Apoplasten kann allerdings nur durch hydrostatische Gradienten getrieben werden. Die Transpiration müsste demnach auch bei Wasserstress ausreichend hoch sein, um den Wasserfluss im Apoplasten aufrecht zu halten. Bei Wasserstress schließen die Pflanzen ihre Stomata. Damit sinken aber auch hydrostatische Gradienten über dem Wurzelzylinder. Zusätzlich zu den hydrostatischen Gradienten bestimmen allerdings noch osmotische Gradienten zwischen dem Xylem und dem Boden bzw. der Nährlösung den Wasserfluss. Diese osmotische Gradienten können allerdings nur über die Gesamtheit der Zellschichten aufgebaut werden und sind deshalb nur beim transzellulären Wasserfluss von Bedeutung. Die Senkung des osmotischen Potenzials in der Nährlösung lässt auf eine Umkehr des osmotischen Potenzialgradienten

zwischen dem Xylem und der Nährlösung schliessen. Um wieder einen osmotisch getriebenen Wasserstrom vom Boden zu den Leitgefäßen zu ermöglichen, muss die Pflanze das osmotische Potenzial im Xylem senken. Untersuchungen von Carvajal et al. (1999) haben gezeigt, dass *Capsicum annuum* Pflanzen bei NaCl-Stress die Ionen-Konzentrationen von K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cl^- und Na^+ nach 48 Stunden im Xylem erhöhen. Die Wasserleitfähigkeit der Wurzel nahm parallel dazu ab. Javot et al. (2003) konnten zeigen, dass in *pip2;2 knock-out*-Mutanten die osmotische Wasserleitfähigkeit der Wurzel ($L_{p_{r-o}}$) um 14 % geringer war als in Wildtyp-Pflanzen. Aus der verminderten $L_{p_{r-o}}$ resultierte eine Erhöhung der Osmolalität im Xylem. Möglicherweise führt eine verminderte Wasserleitfähigkeit in Wurzeln unter Wasserstress dazu, dass die Osmolalität im Xylem zunimmt, und es dadurch zur Einregelung des osmotisch getriebenen Wasserflusses von der Nährlösung zum Xylem auf niedrigerem Niveau kommt. Nähere Einblicke zur Beteiligung von Aquaporinen bei Wasserstress könnten Untersuchungen mit Mutanten bei Wasserstress liefern. Die in vorliegender Arbeit identifizierten Aquaporine, die bei Wasserstress eine transkriptionelle Änderung zeigten (z.B. *PIP1;1*), stellen dafür potenzielle Kandidaten dar.

4.3.2.2 Blatt

Im Blatt zeigt sich ebenfalls eine Repression von Aquaporinen bei Wasserstress, allerdings sind hier nur die hoch exprimierte *TIP*-Aquaporine *TIP1;1* und *TIP2;1* in der Expression beeinflusst, die in der Wurzel reagierenden Aquaporine aus der *PIP*-Familie zeigen keine transkriptionellen Änderungen. Es ist interessant, dass *TIP1;1* und *TIP2;1* im Blatt früher auf den Stress reagierten als in der Wurzel, obwohl diese im direkten Kontakt zu NaCl bzw. Sorbitol stand. Diese frühen Repressionen von *TIP1;1* und *TIP2;1* lassen vermuten, dass es in Blättern wichtig ist, möglichst rasch bei Wasserstress die Wasserpermeabilität des Tonoplasten zu senken und damit den Wasserfluss in bzw. aus der Vakuole zu verringern und damit den Zell-Turgor zu stabilisieren (Abb. 4.2E). Diese Regulation könnte über das Phytohormon ABA vermittelt sein, das an der Signalvermittlung bei Wasserstress beteiligt ist (Sauter et al., 2001).

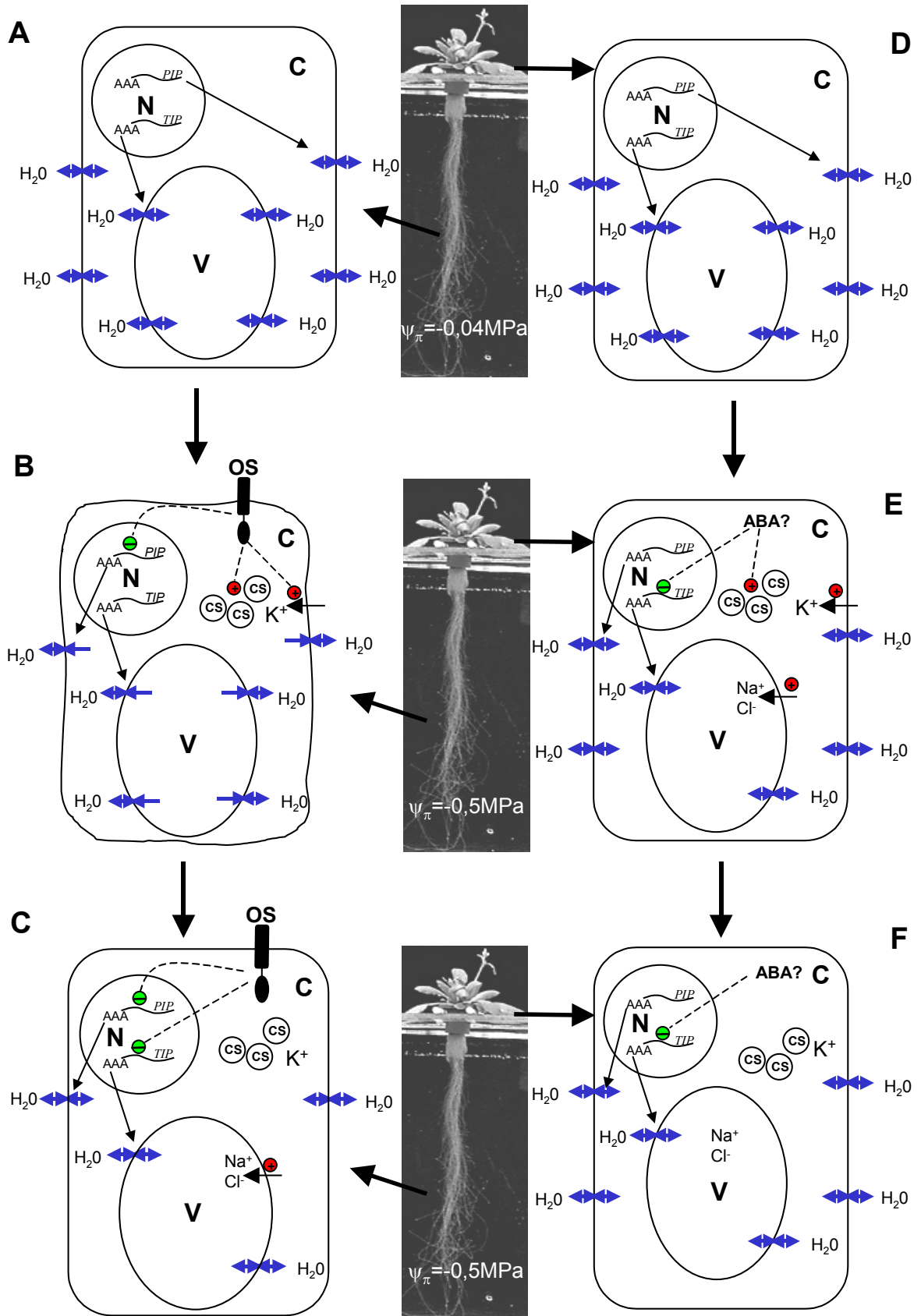
Ungewöhnlich ist der Befund, dass hoch exprimierte *PIP*-Aquaporine im Blatt, wie *PIP1;1*, *PIP1;2* und *PIP2;1* keine Reaktion auf den Wasserstress zeigen. Lediglich *PIP1;5* und *PIP2;7*, deren Funktion als Aquaporine noch nicht bekannt ist und die ein geringes Expressionsniveau im Blatt aufweisen, zeigten eine Repression. Entweder sind metabolische Prozesse bei der Regulation des Wasserhaushaltes in Blattzellen ausreichend (z.B. Bildung von *compatible solutes*) oder die Wasserpermeabilität der Plasmamembran wird über andere Wege (z.B. Phosphorylierung/Dephosphorylierung der Aquaporin-Proteine) reguliert oder in den Blättern wird ein akuter Wasserstress durch das Schließen der Stomata verhindert. Johansson et al. (1996; 1998) konnten zeigen, dass PM28A, ein *PIP2*-Mitglied aus Spinat unter Wasserstress in Blättern dephosphoryliert und dadurch inaktiviert wird. Die Autoren vermuteten, dass durch die Inaktivierung von PM28A der Wasserfluss aus dem Zytoplasma verlangsamt und dadurch einem schnellen Austritt von Wasser entgegengewirkt wird. Dies könnte der Pflanze Zeit für Adaptationsprozesse (z.B. Bildung von *compatible solutes*) geben. In ihrem Modell (Kjellbom et al., 1999) bleibt die Wasserpermeabilität des Tonoplasten unverändert (hoch) um einen raschen Ausgleich von Wasser zwischen der Vakuole und dem Zytoplasma zu gewährleisten. Der Wasserstress wurde bei deren Untersuchungen allerdings direkt an Blattstücken appliziert, indem diese mit einem Sorbitol-enthaltenden Medium infiltriert wurden. Die Reaktion könnte in diesem Fall der in dieser Arbeit beobachteten Repression von *PIPs* und *TIPs* in Wurzeln analog sein.

Die beiden TIPs *TIP1;1* und *TIP2;1* waren auch noch nach 48 Stunden Stress-Behandlung reprimiert. Die anhaltende Verringerung der Wasserpermeabilität des Tonoplasten könnte ein Indiz dafür sein, dass ein geringerer Wasseraustausch in und aus der Vakuole stattfindet. Möglicherweise schützt sich die Pflanze auch durch die Erniedrigung der Wasserpermeabilität des Tonoplasten vor einem Ausfließen des Wassers aus der Vakuole, um einem Verlust des Zell-Turgors und damit einem Welken entgegenzuwirken (Abb. 4.2F).

An Sorbitol-behandelten Pflanzen wurde beobachtet, dass die Blätter nach 48 Stunden Stress-Behandlung leichte Welkeerscheinungen zeigen, was auf einen reduzierten Zell-Turgor hindeutet. Dieser reduzierte Zell-Turgor könnte zu einer verlangsamten Zell-Expansion führen und somit die Wachstumsrate der Blätter beeinflussen. Physiologische Studien haben auch gezeigt, dass unter Wasserstress das Wachstum von Wurzeln im Vergleich zu dem der Blätter begünstigt wird, und Blätter sehr rasch bei geringen Änderungen des Wasserpotenzials ihr Wachstum verringern. Die bevorzugte Expression von *TIP1;1* in elongierenden Zellen (Ludevid et al., 1992) und die Induktion von *TIP1;1* durch das Wachstum-stimulierende Gibberelin in der Gibberelin-sensitiven Mutante *gal* (Phillips und Huttley, 1994) belegen eine Beteiligung dieses TIPs beim Elongationsprozess.

Wurzel

Blatt



vorherige Seite: **Abb. 4.2: Modell zur Regulation von PIP- und TIP-Transkripten bei Wasserstress in Wurzeln (A-C) bzw. Blättern (D-F).** N, Nukleus; V, Vakuole; C, Zytoplasma; OS, osmotischer Sensor; CS, *compatible solutes*; ABA, Abscisinsäure; ψ_{π} , osmotisches Potenzial der Nährlösung. Näheres siehe Text.

4.4 Reaktion von *A. thaliana* auf NaCl- bzw. Sorbitolstress anhand von transkriptionellen Änderungen bekannter Stress-Markergene sowie von Genen des Sekundärmetabolismus

Um einen tieferen Einblick in die Stress-Antwort der Pflanze bei NaCl- bzw. Sorbitolstress zu erhalten, wurden bekannte Stress-regulierte Gene, sowie Gene des Sekundärmetabolismus und des Redox-Stoffwechsels auf ihre transkriptionelle Änderungen untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die bei NaCl bzw. Sorbitol gemeinsam reagierende Gene bzw. Stressor-spezifisch reagierende Gene gelegt, sowie Unterschiede in den Transkriptionsänderungen in Blättern und Wurzeln herausgearbeitet.

4.4.1 Reaktion der Pflanze auf NaCl- bzw. Sorbitolstress

Für die Analysen war es von großer Bedeutung, dass zu jedem untersuchten Zeitpunkt in Blättern und Wurzeln jeder Stressor nur einen kleinen Teil der Gene in ihrer Transkription beeinflusste. Die Reaktion eines nur kleinen Teils der Gene lässt darauf schließen, dass die beiden Stressoren relativ spezifisch in den Stoffwechsel der Pflanze eingreifen. In technischer Hinsicht ist nur so eine Normalisierung der Filter möglich (siehe Material und Methoden, 2.10.7).

Anhand der Venn-Diagramme (siehe Ergebnisse, Abb. 3.7, 3.3.2) und Tab. 3.3 (3.3.2.1) ist deutlich, dass NaCl und Sorbitol nicht nur Stressor-überlappende Gene induzieren/reprimieren, zusätzlich zeigen einige Gene eine ganz spezifische Reaktion auf die NaCl- bzw. Sorbitol-Behandlung (siehe Ergebnisse, Tab. 3.4, 3.3.2.2).

Durch NaCl und Sorbitol waren auch verschieden viele Gene spezifisch induziert/reprimiert: In den ersten 5 Stunden der Stress-Behandlung sind in Blättern und Wurzeln mehr Gene durch NaCl als durch Sorbitol in ihrer Transkription beeinflusst. Möglicherweise liegt dies darin begründet, dass NaCl neben einen osmotischen auch einen ionischen Effekt besitzt (siehe Einleitung, 1.2). Nach 48 Stunden sind dann mehr Gene durch Sorbitol induziert/reprimiert als durch NaCl.

Unterschiede sind nicht nur bei den Stressoren zu finden, in Blättern und Wurzeln kommt es ebenfalls zu unterschiedlichen Stress-Reaktionen der untersuchten Gene. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Stress-Applikation scheint die Pflanze in der Wurzel von einer Stressor-überlappenden Antwort auf eine Stressor-spezifische Antwort umzuschalten. In Blättern hingegen steigt in diesem Zeitraum die Zahl an gemeinsam bei NaCl und Sorbitol induzierten/reprimierten Gene. Ein Umschalten von einer Stressor-überlappenden zu einer Stressor-spezifischen Reaktion konnten Kreps et al. (2002) ebenfalls in ihren Transkriptom-Untersuchungen bei NaCl- und Mannitolstress feststellen, allerdings zeigten dabei sowohl Wurzeln als auch Blätter eine Reduktion der überlappenden Stress-Antwort von 3 nach 27 Stunden. Die Unterschiede liegen vermutlich in der selektiveren (Stress-Gene, Gene des Sekundärmetabolismus) und geringeren Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Gene. In der Wurzel sind auch zu jedem Zeitpunkt mehr Gene in ihrer Transkription beeinflusst als im Blatt, möglicherweise liegt dies daran, dass die Wurzel im direkten Kontakt zu NaCl bzw.

Sorbitol stand. Anhand der fehlenden Überlappung von Blatt und Wurzel bei Genen, die sowohl bei NaCl als auch Sorbitol induziert/reprimiert werden ist weiters ersichtlich, dass in den beiden Organen unterschiedliche Stress-Gene in ihrer Transkription beeinflusst werden. Untersuchungen von Krepis et al. (2002) zeigten auch, dass bei NaCl-, Mannitol- und Kältestress ein Großteil der Transkriptionsänderungen Wurzel- bzw. Blatt-spezifisch stattfand.

4.4.2 Überlappende Reaktionen in *A. thaliana* auf NaCl- und Sorbitolstress

Die Zugabe von NaCl (100 mM) zur Nährlösung stellt nicht nur einen ionischen, sondern auch einen osmotischen Stress für die Pflanzen dar. Um diese osmotische Komponente des NaCl- Stresses näher zu charakterisieren wurde eine iso-osmotische Kontrollbehandlung (200 mM Sorbitol) an Pflanzen durchgeführt. Diese Analysen zeigten, dass 45 % der reagierenden Gene sowohl bei NaCl als auch bei Sorbitol in ihrer Transkription beeinflusst werden. Diese Reaktionen deuten darauf hin, dass die beiden Stressoren überlappende Stress-Antworten auslösen. Eine bekannte Reaktion auf Salz- und osmotischen Stress ist die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS; *reactive oxygen species*), die sowohl als Signalmoleküle fungieren, als auch Schädigungen verursachen können (z.B. Xiong et al., 2002). Die Induktionen der beiden Peroxidasen *GPXI* und *PRXCB* (*PRXCA*) in Blättern und Wurzeln deuten auf eine Beteiligung dieser beiden Peroxidasen bei Entgiftungsreaktionen von H_2O_2 bei Wasserstress hin.

Einige der Stressor-überlappend reagierenden Gene zeigten zudem gleiche Reaktionskinetiken bei NaCl- und Sorbitolstress und lassen vermuten, dass sie primär auf osmotische Änderungen reagieren und über überlappende Signalwege reguliert werden (siehe Ergebnisse, Tab. 3.3, 3.3.2.1).

Unter allen 47 *A. thaliana* GSTs zeigten nur *GSTF6/GSTF7* und *GSTF2/GSTF3* in Wurzeln zu allen untersuchten Zeitpunkten eine Induktion bei der NaCl- und Sorbitol-Behandlung. Glutathion-S-Transferasen katalysieren nicht nur den nukleophilen Angriff des Tripeptids Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinyl-L-Glycin) auf lipophile Moleküle, sie können auch als Glutathion-Peroxidasen fungieren (Edwards et al., 2000). Ihre Beteiligung bei verschiedenen Stress-Reaktionen wurde schon vielfach untersucht (z.B. Wagner et al., 2002; Kiyosue et al., 1993; Sharma et al., 1996; Yang et al., 1998). In all diesen Untersuchungen war *GSTF6* induziert (Wagner et al., 2002). In Tabak konnte auch eine Induktion einer *GST* bei NaCl-Stress gezeigt werden (Roxas et al., 1997). Da bei vielen dieser Stress-Reaktionen auch oxidativer Stress ausgelöst wird, wird vermutet, dass ROS als sekundäre Stress-Faktoren die Induktion von GSTs hervorrufen (Marrs, 1996). Da ROS auch bei Salz- und Trockenstress gebildet werden, könnten *GSTF6/GSTF7* und *GSTF2/GSTF3* ebenfalls durch ROS bzw. über ROS-abhängige Signalwege induziert werden, und möglicherweise auch an der Detoxifizierung von ROS-geschädigten Molekülen beteiligt sein.

Die Tatsache, dass alle weiteren GSTs entweder Stressor-überlappend bzw. nur durch Sorbitol in ihrer Transkription beeinflusst waren, könnte bedeuten, dass *GSTs* primär auf die osmotischen Änderungen reagierten und darüber auch ihre Induktion durch NaCl zu erklären ist.

Zwei Vertreter aus der Familie der ABC-Transporter, *MRP11* und *ATM3* zeigten nach 5 Stunden eine transiente Induktion durch NaCl und Sorbitol in der Wurzel. Bei der Untersuchung zur Verteilung von 28 ABC-Transportern in *A. thaliana*-Organen war *MRP11* das am stärksten exprimierte Mitglied (Glombitza, 2002). *MRP11* gehört zur Subklasse der

MRP-Proteine (*multidrug resistance-associated proteins*). Mitglieder dieser Familie sind häufig am Transport von Glutathion-Konjugaten beteiligt. In *A. thaliana* konnte dies für vier MRPs gezeigt werden (Gaedeke et al., 2001; Liu et al., 2001; Lu et al., 1998; Lu et al., 1997; Tommasini et al., 1998). Es wäre auch vorstellbar, dass pflanzliche MRPs neben anderen Molekülen oder Ionen auch am Transport von GSH-Konjugaten mit oxidativ geschädigten Molekülen beteiligt sind (Rea et al., 1998), und damit an Entgiftungsprozessen während oxidativem Stress eine Rolle spielen könnten.

Die genaue Funktion des halben mitochondrialen ABC-Transporters ATM3 ist nicht bekannt, möglicherweise spielt er bei der Regulation der intrazellulären Eisen-Homöostase eine Rolle (Kushnir et al., 2001). Die vorliegenden Untersuchungen lassen darauf schließen, dass ATM3 bei Reaktionen auf osmotischen Stress beteiligt ist.

Im Zuge dieser Arbeit konnten auch für drei PR-Proteine gleiche Induktionsprofile bei NaCl- und Sorbitolstress festgestellt werden. In der Wurzel sind dies eine basische Endochitinase sowie eine β -1,3-Glukanase (*BG3*) und in Blättern eine weitere β -1,3-Glukanase (*PR-2*; *BG2*). Diese Gene wurden auch durch andere abiotische Stressoren induziert. In Tabak wurde eine Induktion einer basischen Endochitinase sowie einer β -1,3-Glukanase durch Ozon gezeigt (Ernst et al., 1992). *PR-2* wurde durch Aluminium in Weizen (Cruz-Ortega und Ownby, 1993), durch Ozon in *A. thaliana* (Heidenreich, 1999), durch UV-B (*A. thaliana*; Surplus et al., 1998), und durch Mannitolstress (Kreps et al., 2002) induziert. Die Induktion der drei PR-Proteine unter diversen Stressbedingungen könnte bedeuten, dass ähnliche oder konvergierende Signalwege bei den verschiedenen Stressoren zur Induktion dieser PR-Proteine führen. Surplus et al. (1998) konnten zeigen, dass die Induktion von *PR-2* durch UV-B abhängig von ROS und Salicylsäure war. Salicylsäure scheint auch bei oxidativen Stressreaktionen, die durch NaCl und osmotischen Stress entstehen, beteiligt zu sein (Borsani et al., 2001). Möglicherweise sind ROS und Salicylsäure auch bei der Signaltransduktion der durch osmotischen Stress induzierten PR-Proteine beteiligt. Die drei PR-Proteine könnten Teil eines allgemeinen „Alarmprogramms“ sein, das die Pflanze bei unterschiedlichen Stress-Bedingungen anschaltet.

Ein zur Familie der Germin-ähnlichen Proteine (GLP) zählendes Mitglied, *GLP4*, war zu allen untersuchten Zeitpunkten in der Wurzel sowohl bei NaCl als auch Sorbitol induziert. Germin-ähnliche Proteine gehören zusammen mit Germinen zur Überfamilie der Cupine (Membre et al., 2000). *Arabidopsis* besitzt mindestens 12 *GLP*-Gene (Carter et al., 1998). Die bis *dato* näher untersuchten GLPs aus *A. thaliana* (*AtGER1* (=GLP1), *AtGER2* (=GLP2) und *AtGER3* (=GLP3)) sind apoplastidäre Proteine, die über ionische Bindungen mit der extrazellulären Matrix assoziiert sind (Membre et al., 2000). Die zelluläre Lokalisation von *GLP4* ist bisher aber noch nicht bekannt. Obwohl für einige GLPs aus anderen Pflanzen Oxalatoxidase-Aktivitäten beschrieben wurden, scheinen *AtGER1*, *AtGER2* und *AtGER3* diese Funktion nicht zu besitzen. Möglicherweise handelt es sich bei GLPs auch um Rezeptoren, die bei physiologischen, entwicklungsabhängigen und/oder Stress-relevanten Prozessen beteiligt sein könnten (Membre et al., 2000). Ohmiya et al. (1998) identifizierten in Pfirsichen ein GLP als ein Auxin-Bindeprotein mit einer hohen Peptidsequenz-Homologie zu ABP1, einem Auxin-Bindeprotein aus dem Mais. Die frühe und anhaltende Induktion von *GLP4* deutet jedenfalls auf eine konstitutive, bisher unbekannte Funktion bei osmotischem Stress in Wurzeln hin.

Im Gegensatz zu *GLP4* zeigte *GLP1* in Blättern eine Repression auf die beiden Stressoren und scheint damit eine andere Funktion als *GLP4* bei osmotischem Stress zu besitzen. Zusätzlich zu diesen beiden GLPs zeigten *GLP6* und *GLP9* eine spezifische Reaktion auf den NaCl-Stress und lassen somit auf spezifische Funktionen bei NaCl-Stress schließen. *GLP9*

war bei 2 Zeitpunkten (24 und 48 Stunden) induziert und zählte somit zu den hoch-spezifisch NaCl-induzierten Genen (siehe 4.4.3).

Eine putative Glyoxalase II (*GLX-II.4*) wurde in Blättern nach 24 und 48 Stunden sowohl bei NaCl als auch Sorbitol induziert. Dieses Protein ist wahrscheinlich in der mitochondrialen Matrix lokalisiert (Maiti et al., 1997). Glyoxalase I- und II-Proteine sind Teil des Glutathion-abhängigen Glyoxalase Detoxifizierungs-Systems, in dem cytotoxische 2-Oxo-Aldehyde, wie z.B. Methylglyoxal, das als unvermeidliches Nebenprodukt in der Glykolyse entsteht, entgiftet werden (Thornalley, 1990). Für eine andere Glyoxalase II, *GLX-II.3*, konnte eine Induktion bei einer Pathogen-Infektion (*Pseudomonas syringae*) bzw. Xenobiotika-Behandlung (Primisulfuron) in Blättern gezeigt werden (Glombitza et al., *submitted*). Glyoxalase IIs dürften somit bei verschiedenen Stress-Bedingungen eine Rolle spielen. Eine Induktion bei Stress konnte auch für Glyoxalase I gezeigt werden: NaCl, Mannitol und ABA induzierten eine Glyoxalase I (Espartero et al., 1995). Die Autoren vermuteten, dass der Anstieg der Expression von Glyoxalase I in Zusammenhang mit dem gesteigerten Bedürfnis für ATP und damit verbundener Erhöhung der Glykolyse in Salz-gestressten Pflanzen steht.

Die Stressor-überlappenden Reaktionen von *CYP81D1* und *UGT74F2* in Blättern sowie *UGT72D1* in Wurzeln lassen zudem vermuten, dass NaCl- bzw. Sorbitolstress spezifische Teile des Sekundärstoffmetabolismus ähnlich beeinflussen. UDP-Glycosyltransferasen transferieren Monosaccharide (z.B. Glucose) auf organische Moleküle um so ihre Aktivität zu regulieren. Viele dieser Moleküle, wie z.B. Phytoalexine und Pflanzen-Hormone spielen in Abwehrreaktionen eine wichtige Rolle. Auch Cytochrom P450-Monooxygenasen sind an der Biosynthese einer Vielzahl von Sekundärstoffen und Phytohormonen beteiligt (Werck-Reichhart et al., 2002). Wohingegen die spezifischen Funktionen von *CYP81D1* und *UGT72D1* nicht bekannt sind, haben *in vitro* Studien gezeigt, dass *UGT74F2* Salicylsäure glucosyliert (Lim et al., 2002). Salicylsäure verstärkt oxidative Stress-Reaktionen, die durch NaCl- und osmotischen Stress entstehen (Borsani et al., 2001). Möglicherweise deutet die Induktion von *UGT74F2* auf in diesem Kontext stehende Salicylsäure-Detoxifizierungs-Mechanismen hin.

Die Repression einer Adenin-Phosphoribosyltransferase (*APT1*) in Wurzeln bei Salz- und Sorbitolstress könnte in Zusammenhang mit einem veränderten Wachstum bei osmotischem Stress stehen. Adenin-Phosphoribosyltransferasen sind nicht nur für die Umwandlung und Wiederverwertung von Adenin in Adenylat verantwortlich, auch Cytokinine können als Substrate fungieren (Mok und Mok, 2001; Allen et al., 2002). Cytokinine sind prenylierte Derivate des Adenins, die das Pflanzenwachstum über eine Stimulierung der Zellteilung fördern.

4.4.3 Spezifische Reaktionen in *A. thaliana* auf NaCl- bzw. Sorbitolstress

Die Analysen von bekannten Stress-Markergenen sowie Genen des Sekundärmetabolismus identifizierten neben Stressor-überlappenden auch Stressor-spezifische Reaktionen.

Während für zwei *UGTs* und eine *CYP* überlappende Reaktionen auf NaCl- und Sorbitolstress festgestellt werden konnten (siehe 4.4.2), zeigten andere Mitglieder aus diesen Gen-Familien spezifische Reaktionen auf die beiden Stressoren. So waren in der Wurzel nach 48 Stunden Sorbitolstress viele *CYPs* und *UGTs* reprimiert. Die genauen Funktionen dieser einzelnen Mitglieder sind zwar noch nicht bekannt, die Pflanze scheint aber exklusiv bei Sorbitolstress spezifische Teile des Sekundärmetabolismus zu supprimieren. Die Repression von *CYP72A14*

deutet darauf hin, dass dabei auch die Biosynthese von Monoterpenen bzw. Indol-Alkaloiden betroffen ist (Werck-Reichhart, 2001).

Obwohl viele der Stressor-spezifischen Reaktionen nur transient waren bzw. nur nach 48 Stunden detektiert wurden, konnte für einige Gene eine hoch-spezifische Reaktion gezeigt werden, d.h. eine Stressor-spezifische Reaktion, die zu mindestens zwei Zeitpunkten erfolgte (siehe Ergebnisse, Tab. 3.4, 3.3.2.2). Die zweimalige Reaktion innerhalb der Kinetik stellte zudem eine wichtige Validierung der Reaktionen im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen dar.

Eine hoch-spezifische Induktion auf den **NaCl**-Stress in Wurzeln zeigten dabei zwei im Kontext mit einer Phytopathogen-Abwehr stehenden Gene, eine Chitinase (*PR3AIV*) und ein Zellwand-assoziiertes Protein (*CXC750*; Aufsatz et al., 1998). Neben überlappenden Reaktionen der Pathogen-Abwehr mit osmotischem Stress (siehe 4.4.2) scheint es auch ganz spezifische, überlappende Reaktionen mit NaCl-Stress zu geben.

Bei NaCl-Stress reagieren die Pflanzen auch mit einem verminderten Blatt-Wachstum (Xiong und Zhu, 2002). Die Repression des vakuolären Aquaporins *TIP1;1* könnte an diesem Prozess beteiligt sein (siehe 4.3.2.2). In vorliegenden Untersuchungen wurde zudem gezeigt, dass ein vegetatives Speicherprotein (*VSP1*) bei allen drei untersuchten Zeitpunkten in Blättern NaCl-spezifisch induziert wird. VSP1 ist eines von zwei VSP-Proteinen in *A. thaliana* (Utsugi et al., 1998). Im Gegensatz zu Speicherproteinen in Samen werden VSPs in vegetativen Geweben transient synthetisiert und stellen im Wachstum und in der Entwicklung von Organen wichtige Nährstoff-Lieferanten (hauptsächlich Stickstoff) dar (Utsugi et al., 1998). Ihnen wird auch eine wichtige Aufgabe während Stress-Bedingungen zugeschrieben. Zur Speicherung von ungenutztem Stickstoff durch ein vermindertes Wachstum werden bei Wasserstress *VSP*-Transkripte induziert (Mason und Mullet, 1990; Staswick, 1990).

Ein Germin-ähnliches Protein, *GLP9*, zeigte nach 24 und 48 Stunden eine spezifische Induktion auf NaCl-Stress in Wurzeln. Wie bereits bei der überlappenden Induktion von *GLP4* bei osmotischem Stress erwähnt (siehe 4.4.2), ist die genaue Funktion der GLPs in *A. thaliana* noch nicht geklärt. Die spezifische Induktion von *GLP9* bei NaCl-Stress könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieses Gen bei Reaktionen auf die ionische Komponente von NaCl oder auf einen NaCl-spezifischen Wasserstress beteiligt ist.

Eine hoch-spezifische Induktion bei **Sorbitolstress** zeigten eine Cytochrom P450-Monooxygenase *CYP72A14* (siehe oben) sowie die beta-Untereinheit der Tryptophan-Synthase *TSB1*.

Die beta-Untereinheit der Tryptophan-Synthase zeigt eine Induktion bei Sorbitol nach 24 und 48 Stunden in Wurzeln. In *A. thaliana* wird *TSB1* in der Wurzel hauptsächlich in der Wurzelspitze exprimiert (Pruitt und Last, 1993). Tryptophan ist u.a. auch Vorstufe von Phytoalexinen und eines Hormons, Indol-Glucosinolaten und Auxinen (Celenza, 2001). Ob damit eine Funktion bei Sorbitolstress abgeleitet werden kann, ist unklar.

Die hoch-spezifischen Reaktionen auf die beiden Stressoren waren entweder nur in Wurzeln oder nur in Blättern zu detektieren und zeigen, dass in den beiden Organen unterschiedliche Stress-Reaktionen stattfinden.

4.4.4 Fazit der Transkriptionsänderungen von Stress-regulierten Genen und Genen des Sekundärmetabolismus

Die NaCl- und Sorbitol-Behandlungen zeigen in der Pflanze nicht nur Stressor-überlappende Reaktionen, auch ganz spezifische Gene werden durch NaCl oder Sorbitol in ihrer Transkription beeinflusst. Die Pflanze reagiert somit auch ganz spezifisch auf die beiden Osmotika.

In Blättern und Wurzeln sind zudem unterschiedliche Gene induziert bzw. reprimiert. Dies zeigt, dass innerhalb der Pflanze die Stress-Antwort sehr differenziert abläuft.

Einige der Stressor-überlappend reagierenden Gene, wie z.B. *GSTs* und PR-Proteine sind auch durch andere abiotische und biotische Stressoren induzierbar und lassen auf ähnliche bzw. überlappende Signalwege zur Induktion bei Stress schließen. Da bei vielen dieser Stressoren auch die vermehrte Bildung von ROS gezeigt werden konnte, scheinen ROS, insbesondere H_2O_2 , auch an der Signaltransduktion bei Stress beteiligt zu sein (Pastori und Foyer, 2002). Zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Stress-Markergenen zählten auch 3 SODs (Superoxid-Dismutasen). Eine Mn-SOD (At3g10920), eine zytosolische Cu/Zn-SOD (At1g08830) sowie eine chloroplastidäre Fe-SOD (At4g25100). Keines dieser Gene zeigte allerdings eine Reaktion auf Salz- bzw. Sorbitol- Stress (siehe Anhang, 7.4). Möglicherweise sind andere SODs bzw. andere Enzyme an der Bildung von H_2O_2 bei Wasserstress, wie z.B. Oxalatoxidasen beteiligt.

Promotor-Analysen könnten zudem Aufschluss über regulatorische *cis*-Elemente in den durch NaCl- und Sorbitol induzierten/reprimierten Genen geben. Von einigen *cis*-Elementen, wie DRE- und ABRE-Elementen (siehe Einleitung, 1.2.3) ist bereits bekannt, dass sie bei der transkriptionellen Regulation von Genen bei Wasserstress beteiligt sind.

4.5 Insertionsmutanten

Durch das Ausschalten eines Gens können wichtige Einblicke zu dessen Funktion gewonnen werden. Im Gegensatz zur *antisense*-Technik, bei der auch homologe Gene in ihrem Transkriptionsniveau beeinflusst werden können, kann mittels *knock-out*-Mutanten ein Gen ganz spezifisch ausgeschaltet werden. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden zwei Insertionsmutanten im *PIP2;1*- und *PIP1;4*-Gen verwendet. *PIP2;1* ist ein in *A. thaliana* Organen ubiquitär und hoch exprimiertes Aquaporin (siehe Ergebnisse, Abb. 3.2, 3.2). *PIP1;4* wurde als ein durch NaCl induzierbares *PIP1*-Gen beschrieben (Pih et al., 1997 und Ergebnisse, Abb. 3.17, 3.4.2.2). Ziel dieser Untersuchungen war es, Einblicke in die Reaktion der Pflanze auf die Suppression dieser PIPs zu bekommen. Dazu wurden die Transkriptionsprofile aller PIPs und von Genen des Stress- und Sekundärmetabolismus in den Mutanten im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen während ungestressten Bedingungen sowie Salzstress untersucht.

4.5.1 Die *pip2;1*-Mutante

Durch die Suppression zweier Aquaporine in *A. thaliana* (*PIP1;1* und *PIP1;2*) mit Hilfe eines 35S-*PIP1;2-antisense*-Konstrukts konnten Kaldenhoff et al. (1998) einen Unterschied im Phänotyp von Mutante und Wildtyp feststellen. Die *antisense*-Mutante besaß gegenüber dem Wildtyp eine 5-fach erhöhte Wurzelmasse. Die Autoren vermuteten, dass die Erhöhung der

Wurzelmasse die reduzierte zelluläre Wasserpermeabilität kompensiert, um einen ausreichenden Wassernachschub in die Pflanze zu gewährleisten.

PIP2;1, das ebenfalls für ein Aquaporin kodiert (Kammerloher et al., 1994), besitzt ein ähnliches Organ-Expressionsmuster in *A. thaliana* wie *PIP1;1* und *PIP1;2* (siehe Ergebnisse, Abb. 3.2, 3.2). β -Glucuronidase-Reportergen-Analysen von Franck (1998) zeigten aber, dass *PIP1;1* in allen lebenden Zellen der Wurzeln exprimiert wird, *PIP2;1* hingegen bevorzugt in der Stele um das vaskuläre System. In Blättern setzt sich diese Differenz fort. Analysen an *PIP1;2* ergaben, dass dieses PIP1-Mitglied ebenfalls in allen lebenden Zellen des Blattes lokalisiert ist (Kaldenhoff et al., 1995). Die unterschiedlichen Expressionen von *PIP1;1/PIP1;2* und *PIP2;1* deuten auf unterschiedliche Funktionen dieser Aquaporine in der Pflanze hin. Durch Bestimmung des Verhältnisses Blatt- zu Wurzelmasse bei der *pip2;1*-Mutante und beim Wildtyp wurde untersucht, ob diese Mutante mit ähnlichen Veränderungen im Phänotyp reagiert wie die *pip1;1/pip1;2*-Mutante. Bei dieser Untersuchung konnte aber kein Unterschied zwischen der *pip2;1*-Mutante und dem Wildtyp festgestellt werden. Die Pflanze reagiert somit auf die Suppression von *PIP2;1* und eine dadurch verbundene, mögliche Erniedrigung der Wasserpermeabilität von Zellen des vaskulären Systems nicht mit einer Erhöhung der Wurzelmasse. Neben den unterschiedlichen zellulären Lokalisationen von *PIP2;1* und *PIP1;1/PIP1;2* könnte die Repression zweier PIPs durch die *antisense*-Technik einen ausgeprägteren Phänotyp hervorrufen. Zusätzlich könnten die verschiedenen Anzuchtbedingungen (in vorliegenden Untersuchungen wurden die Pflanzen hydroponisch angezogen, bei der *antisense*-Linie wuchsen die Pflanzen auf Erde) zu einer Beeinflussung der Phänotypen der Mutanten beitragen.

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass in der *pip2;1*-Mutante kein weiteres *MIP*-Mitglied im Vergleich zum Wildtyp eine Änderung in seiner Transkription zeigt. Auf Transkriptionsebene scheint jedenfalls keine Kompensationsreaktion auf das Fehlen von *PIP2;1* durch andere *MIP*-Mitglieder stattzufinden. Auch unter Salzstress-Bedingungen zeigten sich keine Unterschiede bei der Transkription der *MIPs* in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Möglicherweise ist die Wasserpermeabilität der Plasmamembran in den *PIP2;1*-exprimierenden Zellen bei vorliegenden Untersuchungen, trotz des Fehlens von *PIP2;1*, ausreichend hoch, oder *PIP2;1* besitzt eine spezifische Funktion, die von anderen *MIP*-Mitgliedern nicht kompensiert werden kann. Es wäre allerdings auch möglich, dass durch das Ausschalten von *PIP2;1* andere *MIP*-Mitglieder eine posttranslationale Änderung erführen (z.B. verstärkte Phosphorylierung), um dadurch der (vermutlichen) Erniedrigung der zellulären Wasserleitfähigkeit entgegenzuwirken. Messungen der hydraulischen Leitfähigkeit an Wurzeln und an Zellen der Mutante und des Wildtyps, in denen *PIP2;1* exprimiert ist, könnten zeigen, ob es durch das Ausschalten von *PIP2;1* tatsächlich Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp gibt. Untersuchungen an einer *pip2;2*-Insertionsmutante wurden von Javot et al. (2003) durchgeführt. Diese Mutante zeigte ebenfalls keine makroskopisch sichtbaren Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp, sowohl bei ungestressten Bedingungen als auch bei verschiedenen Stress-Situationen. Erst detailliertere Untersuchungen von Wasserflüssen in Zellen aus dem Cortex, in denen *PIP2;2* stark exprimiert war, ergaben Unterschiede. Die hydraulische Leitfähigkeit dieser Zellen war in der *pip2;2*-Mutante im Vergleich zu der aus Wildtyp-Zellen um 25-30 % reduziert. Die osmotisch getriebene Wasserleitfähigkeit ganzer Wurzeln war in der Mutante um 14 % gegenüber Wildtyp-Pflanzen reduziert. Aufgrund ihrer Befunde nahmen die Autoren an, dass kein anderes *MIP*-Mitglied kompensatorisch auf das Fehlen von *PIP2;2* reagierte.

Da keine veränderten Transkriptionsantworten anderer *MIPs* in der *pip2;1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp erkennbar waren, wurden die Transkriptionsprofile bekannter Stress-Markergene sowie von Genen des Sekundärmetabolismus (ABC-Transporter, Glukosyltransferasen, Cytochrom P450-Monooxygenasen sowie GSTs) unter ungestressten Bedingungen und unter NaCl-Stress untersucht. Dabei ergaben sich aber keine Unterschiede

zwischen der *pip2;1*-Mutante und dem *PIP2;1*-Wildtyp. Unter der Annahme, dass das Ausschalten von *PIP2;1* zu einer Verminderung der Wasserpermeabilität der Plasmamembran führt, scheint dies keinen Einfluss auf jene Prozesse auszuüben, an denen die untersuchten Gene beteiligt sind. Andererseits könnte die Wasserpermeabilität der Plasmamembran von *PIP2;1*-exprimierenden Zellen, trotz des Fehlens von *PIP2;1*, bei vorliegenden Untersuchungen ausreichend hoch sein, bzw. posttranskriptionelle Änderungen anderer *MIPs* die verminderte Wasserleitfähigkeit kompensieren. Weitere Untersuchungen an der *pip2;1*-Mutante in unserem Labor ergaben aber Hinweise, dass in der *pip2;1*-Mutante Kalium- und Mono-/Disaccharid-Transporter reprimiert sind (Schäffner, pers. Mitteilung). Dies könnte bedeuten, dass die Wasserpermeabilität der Plasmamembran Einfluss auf den Transport von Nährstoffen bzw. Metaboliten hat. Denkbar wäre, dass durch das Fehlen von *PIP2;1* die zelluläre Wasserleitfähigkeit verringert wird, dadurch osmotische Änderungen an der Plasmamembran nicht rasch ausgeglichen werden können, und deshalb die Pflanze auch den Transport von (osmotisch aktiven) Nährstoffen und Metaboliten reduziert.

4.5.2 Die *pip1;4*-Mutante

PIP1;4 wurde in Keimlingen als Salzstress-induzierbares *MIP* beschrieben (Pih et al., 1997). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *PIP1;4* bei der Stress-Anpassung bzw. bei Signalwegen unter NaCl-Stress von Bedeutung ist. Mit Hilfe des DNA-Microarrays konnte untersucht werden, ob durch das Ausschalten eines NaCl-induzierbaren *MIPs* andere *MIPs* und bekannte Stress-Markergene, sowie Gene des Sekundärmetabolismus in ihrem Transkriptionsprofil bei Salzstress eine Veränderung zeigen. Sowohl bei ungestressten als auch salzgestressten Keimlingen waren keine veränderten Transkriptionsantworten der untersuchten Gene erkennbar. Möglicherweise ist die Pflanze nicht in der Lage auf das Fehlen von *PIP1;4* zu reagieren, oder die Induktion von *PIP1;4* durch NaCl-Stress hat keine physiologische Relevanz in Keimlingen. In der *pip1;4*-Mutante könnte es allerdings auch zu Veränderungen kommen, die anhand der vorliegenden Transkript-Analysen nicht erkennbar waren.

Eine Induktion von *PIP1;4* konnte auch in Wurzeln von 21 Tage alten NaCl- und Sorbitol-gestressten Pflanzen festgestellt werden (siehe Ergebnisse, Abb. 3.5, 3.3.1). Zudem wurde gezeigt, dass *PIP1;4* bevorzugt in Blüten exprimiert ist (siehe Ergebnisse, Abb. 3.2, 3.2). Bis dato ist noch nicht bekannt, ob *PIP1;4* ein Aquaporin oder ein anderes Transport-Protein ist. Weiterführende Untersuchungen der *pip1;4*-Mutante, wie z.B. Messung von hydraulischen Leitfähigkeiten oder phänotypische Untersuchungen (Bestimmung der Wurzelmasse, Blühzeitpunkt, etc.) könnten zur Funktionsaufklärung beitragen.

4.6 Ausblick

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte DNA-Microarray zur Unterscheidung hoch homologer *MIP*-Mitglieder kann für weitere Untersuchungen der Transkriptionsänderungen von *MIPs* verwendet werden. So ist z.B. bekannt, dass Nährstoffmangel zu einer Reduktion der Wasserpermeabilität von Zellen bzw. ganzer Wurzeln führt (Caravajal et al., 1996). Es wird vermutet, dass *MIPs* an diesem Prozess beteiligt sind (Caravajal et al., 1996; Clarkson et al., 2000). Der DNA-Microarray bietet die Möglichkeit, bestimmte *MIPs* zu identifizieren, die bei Nährstoffmangel eine Veränderung in ihrem Transkriptniveau zeigen und daher möglicherweise an diesem Prozess beteiligt sind.

Die Organ-spezifische Expressions-Analyse der *MIPs* in *A. thaliana* lieferte einen umfassenden Einblick in die Verteilung der *MIP*-Mitglieder in der Pflanze. Organe sind allerdings komplexe Strukturen, die aus einer Vielzahl von Geweben und Zellen bestehen, deren Aufgaben häufig sehr verschiedenartig gestaltet sind. Ein wichtiger Beitrag zur Funktionsaufklärung wäre deshalb eine Analyse zur zellulären Lokalisation mittels z.B. *in-situ* RT-PCR oder *in-situ* Hybridisierung. Von 2 *MIP*-Subfamilien (NIPs und SIPs) ist auch noch nicht bekannt, wo sie innerhalb der Zelle lokalisiert sind. Zu den SIPs sind bisher auch keine Transportstudien veröffentlicht. Aufgrund der Komplexität der pflanzlichen Kompartimentierung wäre es nicht weiter verwunderlich, wenn einige *MIPs* auch an anderen Membranen ausser der Plasmamembran bzw. Tonoplast lokalisiert sind, und möglicherweise auch andere Funktionen als die Erhöhung der Wasserpermeabilität oder den Transport von Glycerin an Membranen besäßen.

Die Wasserstress-Untersuchungen (Sorbitol- und Salzstress) zeigten, dass hoch exprimierte Aquaporine unter diesen Bedingungen in ihrer Expression gehemmt werden. Als Anpassung an den Sorbitol- und Salzstress scheint die Pflanze mit einer Erniedrigung der Wasserpermeabilität der Plasmamembran und des Tonoplasten zu reagieren. Messungen der Wasserpermeabilität an Zellen, in denen diese *MIPs* bevorzugt exprimiert werden, könnten zeigen, ob sich eine Erniedrigung der Transkriptmenge auch tatsächlich in einer verminderten Wasserpermeabilität widerspiegelt.

Wenig ist bis *dato* über die transkriptionelle Regulation der *MIPs* bei Wasserstress bekannt. Zwar wurden in einigen *MIPs* regulatorische *cis*-Elemente identifiziert, anhand der transkriptionellen Änderungen der gesamten *MIP*-Familie durch die vorliegenden Wasserstress-Untersuchungen ist es möglich, *MIPs* mit ähnlichen Reaktionsverhalten auf Sequenzhomologien im Promotor-Bereich zu untersuchen, und mögliche weitere regulatorische Elemente zu identifizieren.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an *mip*-Insertionsmutanten zeigten auf transkriptioneller Ebene keine Unterschiede zu den Wildtypen. Diese Transkript-Analysen könnten auf weitere Gene ausgeweitet werden, um nähere Einblicke zur Funktion von *MIPs* bzw. davon abhängigen Prozessen zu erhalten. Interessant dabei wäre die Analyse von Membrantransportern und Kanälen.

5 Zusammenfassung

MIPs (*major intrinsic proteins*) sind eine Gruppe von Transport-Proteinen, die ubiquitär in Archaea, Pro- und Eukaryoten zu finden sind. Neben spezifischen Wasserkanalproteinen (Aquaporine) sind einige Mitglieder dieser Familie permeabel für andere kleine und ungeladene Moleküle, wie z.B. Glycerin. Als Grundlage zur Funktionsaufklärung der 38 MIP-Mitglieder in *A. thaliana* wurden ihre transkriptionellen Reaktionen untersucht. Dazu wurde ein DNA-Array mit Sonden aus dem 3'-untranslatierten Bereich dieser Gene entwickelt, der die Unterscheidung der oft hoch homologen Mitglieder auf Transkript-Ebene zuließ, wozu längere cDNA-Sonden nicht geeignet sind. Eine *TIP1;2* cDNA-Sonde, die Teile der kodierenden Sequenzen enthielt, zeigte in einem Hybridisierungsexperiment eine 40 %-ige Kreuzhybridisierung mit dem homologen *TIP1;1*. Die Spezifität der Sonden wurde in Zusammenarbeit mit dem *Munich Information Center for Protein Sequences* bioinformatisch überprüft. Das stringente Auswahlkriterium dieser Analysen, woraufhin eine Sonde bis zu einer 70 %-igen Homologie über 70 bp nicht kreuzhybridisiert, konnte auch experimentell gestützt werden. Der Vergleich der Signalintensitäten einer 172 bp langen, spezifischen Sonde mit einer 774 bp langen cDNA-Sonde ließ zudem darauf schließen, dass die Spezifität der verwendeten 3'-UTR-Sonden die Sensitivität nicht beeinträchtigte.

Eine Organ-spezifische Expressions-Analyse zeigte, dass MIPs in allen untersuchten Organen (Wurzeln, Blätter, Stängeln, Blüten und Schoten) exprimiert werden. Die meisten MIPs (24 von 38) und die höchsten Expressionsniveaus wurden in der Wurzel detektiert. In Blättern konnten hingegen nur 11 von 38 MIP-Mitgliedern nachgewiesen werden. Die geringsten Expressionen zeigten die Mitglieder aus der NIP- und SIP-Subfamilie. Zu den am höchsten und in der Pflanze ubiquitär exprimierten MIPs zählten die PIP-Mitglieder *PIP1;1*, *PIP1;2* und *PIP2;1* sowie die TIP-Mitglieder *TIP1;1* und *TIP2;1*, von denen bekannt ist, dass sie als Wasserkanal-Proteine fungieren. Die Möglichkeit, die Wasserpermeabilität von Membranen regulieren zu können, dürfte somit von zentraler Bedeutung in der ganzen Pflanze sein. Neben ubiquitär exprimierten MIPs sind einige nur ausschließlich oder bevorzugt in bestimmten Organen zu finden, z.B. *PIP1;4*, *PIP2;6* und *PIP2;7* in der Blüte und NIPs hauptsächlich in der Wurzel. Deren Funktion könnte neben einem Organ- oder Zell-spezifischen Wassertransport auch die Permeation anderer ungeladener Moleküle beinhalten, da die Transporteigenschaften dieser Mitglieder nicht geklärt sind.

Das Expressionsprofil der MIP-Genfamilie in verschiedenen Organen sowie die unterschiedliche Reaktion auf Wasserstress (s.u.) lassen auf differenzielle Funktionen der einzelnen MIP-Mitglieder schließen. Lediglich *TIP1;1* und *TIP1;2* konnten nach diesen Kriterien nicht eindeutig unterschieden werden.

Durch Zugabe von 100 mM NaCl und 200 mM Sorbitol zu hydroponisch angezogenen *A. thaliana*-Pflanzen wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden die transkriptionelle Reaktion der MIP-Familie auf diese Wasserstressbedingungen verfolgt.

In Wurzeln wurde festgestellt, dass innerhalb der ersten 24 Stunden bei beiden Stressoren die hoch exprimierten PIP-Aquaporine *PIP1;1* und *PIP2;2* sowie *PIP1;3* reprimiert, TIP-Aquaporine wie *TIP1;1* und *TIP2;1* zu diesem Zeitpunkt jedoch unbeeinflusst sind. Die Pflanze verringert demnach bei Wasserstress zuerst die Wasserpermeabilität der Plasmamembran, sofern sich die transkriptionelle Suppression auf Proteinebene widerspiegelt.

Interessanterweise zeigte sich im Blatt eine frühe Repression der hoch exprimierten TIP-Aquaporine *TIP1;1* und *TIP2;1*. Die in der Wurzel reagierenden Aquaporine aus der PIP-Subfamilie zeigten im Blatt jedoch keine transkriptionellen Änderungen.

Diese frühen Repressionen von *TIP1;1* und *TIP2;1* lassen vermuten, dass es in Blättern wichtig ist, möglichst rasch unter Wasserstress die Wasserpermeabilität des Tonoplasten zu senken. Dies könnte der Stabilisierung des Zell-Turgors dienen und/oder mit einem verringerten Blattwachstum einhergehen.

Die ähnlichen Transkriptionsantworten und Kinetiken der *MIPs* bei NaCl- und Sorbitolstress lassen zudem vermuten, dass *MIPs* auch unter NaCl-Stress primär auf die osmotische Veränderung in der Nährlösung reagieren bzw. über ähnliche Signalwege reguliert werden.

Die parallele Untersuchung transkriptioneller Änderungen von bekannten Stress-Markergenen und Genen des Sekundärmetabolismus unter NaCl- und Sorbitolstress ergab zusätzliche Hinweise auf überlappende und Stressor-spezifische Reaktionen in Wurzeln und Blättern.

Eine bekannte Reaktion auf Salz- und osmotischen Stress ist die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies, die sowohl als Signalmoleküle fungieren als auch Schädigungen verursachen können. Die Induktionen der beiden Peroxidasen *GPX1* und *PRXCB* in Blättern und Wurzeln deuten auf eine Beteiligung bei Entgiftungsreaktionen von H_2O_2 unter Wasserstress hin. Einzelne Mitglieder aus der Familie der UDP-Glycosyltransferasen und Cytochrom P450-Monooxygenasen, wie *UGT74F2* und *CYP81D1*, zeigten bei Salz- und Sorbitolstress überlappende Reaktionen, was darauf hindeutet, dass spezifische Teile des Sekundärstoffmetabolismus ähnlich beeinflusst werden. Daneben zeigten andere Mitglieder aus diesen Gen-Familien spezifische Reaktionen auf die beiden Stressoren. So waren in der Wurzel nach 48 Stunden Sorbitolstress viele *CYPs* und *UGTs* reprimiert. Die Pflanze scheint also exklusiv bei Sorbitolstress spezifische, in ihrer genauen Funktion noch unbekannte Teile des Sekundärmetabolismus zu supprimieren. Die unterschiedlichen Reaktionen einer Reihe weiterer Gene auf Salz oder Sorbitol in Blättern und Wurzeln identifizierten zudem differenzielle Stress-Antworten innerhalb der Pflanze.

Es wurden zwei Insertionsmutanten in den *MIP*-Genen *PIP2;1* und *PIP1;4* isoliert. Transkript-Untersuchungen dieser Mutanten zeigten, dass durch das Ausschalten dieser *PIPs* alle anderen *MIP*-Mitglieder, sowohl bei ungestressten als auch unter NaCl-Stress-Bedingungen, keine Änderungen in ihrer Transkriptionsantwort im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Möglicherweise besitzen die untersuchten *PIP*-Mitglieder eine spezifische Funktion, die andere *MIPs* nicht kompensieren können, oder möglicherweise kommt es in der Pflanze zu veränderten Reaktionen, die anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht erkennbar waren.

6 Literatur

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. and Shinozaki, K.** (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**, 1859-1868
- Agmon, N.** (1995) The Grotthuss mechanism. *Chem. Phys. Lett.* **244**, 456-462
- Agre, P., Bonhivers, M. and Borgnia, M.J.** (1998) The aquaporins, blueprint for cellular plumbing systems. *J. Biol. Chem.* **273**, 14659-14662
- Aharon, R., Shahak, Y., Wininger, S., Bendov, R., Kapulnik, Y. and Galili, G.** (2003) Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* **15**, 439-447
- Allen, M., Qin, W., Moreau, F. and Moffatt, B.** (2002) Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiol. Plant.* **115**, 56-68
- Aufsatz, W., Amry, D. and Grimm, C.** (1998) The ECS1 gene of *Arabidopsis* encodes a plant cell wall-associated protein and is potentially linked to a locus influencing resistance to *Xanthomonas campestris*. *Plant Mol. Biol.* **38**, 965-976
- Azaizeh, H. and Steudle, E.** (1991) Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiol.* **97**, 1136-1145
- Azaizeh, H., Gunse, B. and Steudle, E.** (1992) Effects of NaCl and CaCl₂ on water transport across root cells of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **99**, 886-894
- Baiges, I., Schäffner, A.R., Affenzeller, M.J. and Mas, A.** (2002) Plant aquaporins. *Physiol. Plant.* **115**, 175-182
- Barrieu, F., Chaumont, F. and Chrispeels, M.J.** (1998) High expression of the tonoplast aquaporin ZmTIP1 in epidermal and conducting tissues of maize. *Plant Physiol.* **117**, 1153-1163
- Barrieu, F., Marty-Mazars, D., Thomas, D., Chaumont, F., Charbonnier, M. and Marty, F.** (1999) Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1 in cauliflower cells. *Planta* **209**, 77-86
- Berridge, M.J.** (1993) Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* **365**, 388-389
- Biela, A., Grote, K., Otto, B., Hoth, S., Hedrich, R. and Kaldenhoff, R.** (1999) The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J.* **18**, 565-570
- Blank, M.E. and Ehmke, H.** (2003) Aquaporin-1 and HCO₃⁽⁻⁾-Cl⁻ transporter-mediated transport of CO₂ across the human erythrocyte membrane. *J. Physiol.* **550**, 419-429

- Borsani, O., Valpuesta, V. and Botella, M.A.** (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedling. *Plant Physiol.* **126**, 1024-1030
- Bray, E.A.** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* **2**, 48-54
- Cardon, G.H., Frey, M., Saedler, H. and Gierl, A.** (1993) Mobility of the maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **3**, 773-784
- Carter, C., Graham, R.A. and Thornburg, R.W.** (1998) *Arabidopsis thaliana* contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members. *Plant Mol. Biol.* **38**, 929-943
- Carvajal, M., Cooke, D.T. and Clarkson, D.T.** (1996) Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function. *Planta* **199**, 372-381
- Carvajal, M., Martinez, V. and Alcaraz, C.F.** (1999) Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. *Physiol. Plant.* **105**, 95-101
- Celenza, J.L.** (2001) Metabolism of tyrosine and tryptophan-new genes for old pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 234-240
- Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J.** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113-116
- Chaumont, F., Barrieu, F., Herman, E.M. and Chrispeels, M.J.** (1998) Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiol.* **117**, 1143-1152
- Choi, H.I., Hong, J.H., Ha, J.O., Kang, J.Y. and Kim, S.Y.** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* **275**, 1723-1730
- Clarkson, D.T., Carvajal, M., Henzler, T., Waterhouse, R.N., Smyth, A.J., Cooke, D.T. and Steudle, E.** (2000) Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *J. Exp. Bot.* **51**, 61-70
- Cruz-Ortega, R. and Ownby, J.D.** (1993) A protein similar to PR (pathogenesis-related) proteins is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Physiol. Plant.* **89**, 211-219
- Daniels, M.J., Chaumont, F., Mirkov, T.E. and Chrispeels, M.J.** (1996) Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell* **8**, 587-599
- Dean, R.M., Rivers, R.L., Zeidel, M.L. and Roberts, D.M.** (1999) Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry* **38**, 347-353
- DeWald, D.B., Torabinejad, J., Jones, C.A., Shope, J.C., Cangelosi, A.R., Thompson, J.E., Prestwich, G.D. and Hama, H.** (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 759-769

- Drøbak, B.K. and Watkins, P.A.C.** (2000) Inositol(1,4,5)trisphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyperosmotic stress. *FEBS Lett.* **481**, 240-244
- Droillard, M.-J., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H. and Laurière, C.** (2002) Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspension. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett.* **527**, 43-50
- Edwards, R., Dixon, D.P. and Walbot, V.** (2000) Plant glutathione *S*-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* **5**, 193-198
- Ernst, D., Schraudner, M., Langebartels, C. and Sandermann, H.** (1992) Ozone-induced changes of mRNA levels of β -1,3-glucanase, chitinase and "pathogenesis-related" protein 1b in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **20**, 673-682
- Espartero, J., Sanchez-Aguayo, I. and Pardo, J.** (1995) Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Mol. Biol.* **29**, 1223-1233
- Evertsz, E.M., Au-Young, J., Ruvolo, M.V., Lim, A.C. and Reynolds, M.A.** (2001) Hybridization cross-reactivity within homologous gene families on glass cDNA microarrays. *BioTechniques* **31**, 1182-1192
- Fang, X., Yang, B., Matthay, M.A. and Verkman, A.S.** (2002) Evidence against aquaporin-1-dependent CO₂ permeability in lung and kidney. *J. Physiol.* **542.1**, 63-69
- Franck, K.** (1998) Untersuchungen zur Lokalisation, Genexpression und physiologischen Rolle der Plasmamembran-Aquaporine aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, LMU München, Fakultät für Chemie und Pharmazie
- Froger, A., Tallur, B., Thomas, D. and Delamarche, C.** (1998) Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Science* **7**, 1458-1468
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L.J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J. and Stroud, R.M.** (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**, 481-486
- Gaedeke, N., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Forestier, C., Muller, A., Ansoerge, M., Becker, D., Mamnun, Y., Kuchler, K., Schulz, B., Mueller-Roeber, B. and Martinoia, E.** (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *Embo J.* **20**, 1875-87.
- Gerbeau, P., Güçlü, J., Ripoche, P. and Maurel, C.** (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J.* **18**, 577-587
- Gibeaut, D.M., Hulett, J., Cramer, G.R. and Seemann, R.** (1997) Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol.* **115**, 317-319

- Glombitza, S.** (2002) Expressionsprofile von ABC-Transportern in *Arabidopsis thaliana*: Reaktionen auf Xenobiotika im Kontext mit anderen Genfamilien der Entgiftung. Dissertation, LMU München, Fakultät für Chemie und Pharmazie
- Glombitza, S., Dubuis, P.-H., Thulke, O., Welzl, G., Bovet, L., Götz, M., Affenzeller, M., Geist, B., Hehn, A., Asnaghi, C., Ernst, D., Seidlitz, H.K., Martinoia, E., Werck-Reichhart, D., Mauch, F. and Schäffner, A.R.** (2003) Transcriptome of *Arabidopsis* gene families related to secondary metabolism differentiates responses to groups of abiotic and biotic stressors. *submitted*
- Gorin, M.B., Yancey, S.B., Cline, J., Revel, J.P. and Horwitz, J.** (1984) The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell* **39**, 49-59
- Grene, R.** (2002) Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. In: *The Arabidopsis Book* (Somerville, C.R. and Meyerowitz, E.M., eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0036, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Guenther, J.F. and Roberts, D.M.** (2000) Water-selective and multifunctional aquaporins from *Lotus japonicus* nodules. *Planta* **210**, 741-748
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K. and Bohnert, H.J.** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 463-499
- Hauser, N.C., Vingron, M., Scheideler, M., Krems, B., Hellmuth, K., Entian, K.-D. and Hoheisel, J.D.** (1998) Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1209-1221
- Heidenreich, B.** (1999) Transkriptionsänderungen von *Arabidopsis thaliana* bei Ozon-, UV-B- und HgCl₂-Behandlung. Dissertation, LMU München. Dissertationsverlag NG Kopierladen GmbH, München
- Heller, K.B., Lin, E.C. and Wilson T.H.** (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **144**, 274-278
- Henzler, T., Waterhouse, R.N., Smyth, A.J., Carvajal, M., Cooke, D.T., Schäffner, A.R., Steudle, E. and Clarkson, D.T.** (1999) Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *Lotus japonicus*. *Planta* **210**, 50-60
- Higuchi, T., Suga, S., Tsuchiya, T., Hisada, H., Morishima, S., Okada, Y. and Maeshima, M.** (1998) Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isoforms of radish vacuolar aquaporin. *Plant Cell Physiol.* **39**, 905-913
- Höfte, H., Hubbard, L., Reizer, J., Ludevid, D., Herman, E.M. and Chrispeels, M.J.** (1992) Vegetative and seed-specific forms of tonoplast intrinsic protein in the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **99**, 561-570

- Hohl, M. and Schopfer, P.** (1991) Water relations of growing maize coleoptiles. *Plant Physiol.* **95**, 716-722
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J.-P., Hanafay, M.K., Tingey, S.V. and Chua, N.-H.** (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J. Cell Sci.* **115**, 4891-4900
- Huh, G.-H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M.** (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J.* **29**, 649-659
- Ikeda, S., Nasrallah, J.B., Dixit, R., Preiss, S. and Nasrallah, M.E.** (1997) An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science* **276**, 1564-1566
- Jauh, G.Y., Phillips, T.E. and Rogers, J.C.** (1999) Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**, 1867-1882
- Javot, H., Lauvergeat, V., Santoni, V., Martin-Laurent, F., Güçlü, J., Vinh, J., Heyes, J., Franck, K.I., Schäffner, A.R., Bouchez, D. and Maurel, C.** (2003) Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell* **15**, 509-522
- Jiang, M. and Zhang, J.** (2002) Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J. Exp. Bot.* **53**, 2401-2410
- Jofuku, K.D., den Boer, B.G., Van Montagu, M. and Okamura, J.K.** (1994) Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* **6**, 1211-1225
- Johanson, U. and 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., Frayse, L., Weig, A.R. and Kjellbom, 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., Shukla, V.K., Chrispeels, M.J., Larsson, C. and Kjellbom, P.** (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* **10**, 451-459
- Johansson, I., Larsson, C., Ek, B. and Kjellbom, P.** (1996) The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential. *Plant Cell* **8**, 1181-1191
- Jung, J.S., Preston, G.M., Smith, B.L., Guggino, W.B. and Agre, P.** (1994) Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* **269**, 14648-14654

- Kaldenhoff, R., Grote, K., Zhu, J.-J. and Zimmermann, U.** (1998) Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**, 121-128
- Kaldenhoff, R., Kölling, A. and Richter, G.** (1993) A novel blue light- and abscisic acid-inducible gene of *Arabidopsis thaliana* encoding an intrinsic membrane protein. *Plant Mol. Biol.* **23**, 1187-1198
- Kaldenhoff, R., Kölling, A., Meyers, J., Karmann, U., Ruppel, G. and Richter, G.** (1995) The blue light-responsive *AthH2* gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. *Plant J.* **7**, 87-95
- Kammerloher, W., Fischer, U., Piechottka, G.P. and Schäffner, A.R.** (1994) Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J.* **6**, 187-199
- Kane, M.D., Jatkoa, T.A., Stumpf, C.R., Lu, J., Thomas, J.D. and Madore, S.J.** (2000) Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4552-4557
- Karlsson, M., Johansson, I., Bush, M., McCann, M.C., Maurel, C., Larsson, C. and Kjellbom, P.** (2000) An abundant TIP expressed in mature highly vacuolated cells. *Plant J.* **21**, 83-90
- Katagiri, T., Takahashi, S. and Shinozaki, K.** (2001) Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLD δ , in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling. *Plant J.* **26**, 595-605
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. and Bohnert, H.J.** (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* **13**, 889-905
- Kirch, H.-H., Vera-Estrella, R., Gollmack, D., Quigley, F., Michalowski, C.B., Barkla, B.J. and Bohnert, H.J.** (2000) Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* **123**, 111-124
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1993) Characterization of two cDNAs (ERD11) and (ERD13) for dehydration-inducible genes that encode putative glutathione *S*-transferases in *Arabidopsis thaliana* L.. *FEBS Lett.* **335**, 189-192
- Kjellbom, P., Larsson, C., Johansson, I., Karlsson, M. and Johanson, U.** (1999) Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* **4**, 308-314
- Kozono, D., Ding, X., Iwasaki, I., Meng, X., Kamagata, Y., Agre, P. and Kitagawa, Y.** (2003) Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin. AqpM from *Methanothermobacter marburgensis*. *J. Biol. Chem.* **278**, 10649-10656
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.-S., Zhu, T., Wang, X. and Harper, J.F.** (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* **130**, 2129-2141

- Kushnir, S., Babiychuk, E., Storozhenko, S., Davey, M.W., Papenbrock, J., De Rycke, R., Engler, G., Stephan, U.W., Lange, H., Kispal, G., Lill, R. and Van Montagu, M.** (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Sta1* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. *Plant Cell* **13**, 89-100
- Li, L.-G., Li, S.-F., Tao, Y. and Kitagawa, Y.** (2000) Molecular cloning of a novel water channel from rice: its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. *Plant Sci.* **154**, 43-51
- Lim, E., Doucet, C.J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S.P., Ross, J. and Bowles, D.J.** (2002) The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *J. Biol. Chem.* **277**, 586-592
- Liu, G., Sanchez-Fernandez, R., Li, Z.S. and Rea, P.A.** (2001) Enhanced multispecificity of *Arabidopsis* vacuolar MRP-type ABC transporter, AtMRP2. *J Biol Chem* **276**, 8648-8656
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1391-1406
- Liu, Q., Umeda, M. and Uchimiya, H.** (1994) Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Mol. Biol.* **26**, 2003-2006
- Liu, Y.G. and Whittier, R.F.** (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**, 674-681
- Lu, Y.-P., Li, Z.-S. and Rea, P.A.** (1997) AtMRP1 of *Arabidopsis thaliana* encodes a glutathione *S*-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8243-8248.
- Lu, Y.-P., Li, Z.-S., Drozdowicz, Y.M., Hörtensteiner, S., Martinoia, E. and Rea, P.A.** (1998) AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter able to transport glutathione *S*-conjugate and chlorophyll catabolites: Functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell* **10**, 267-282.
- Ludevid, D., Höfte, H., Himmelblau, E. and Chrispeels, M..J.** (1992) The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein γ -TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Physiol.* **100**, 1633-1639
- Maiti, M.K., Krishnasamy, S., Owen, H.A. and Makaroff, C.A.** (1997) Molecular characterization of glyoxalase II from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 471-481
- Malz, S. and Sauter, M.** (1999) Expression of two PIP genes in rapidly growing internodes of rice is not primarily controlled by meristem activity or cell expansion. *Plant Mol. Biol.* **40**, 985-995

- Mariaux, J.-B., Bockel, C., Salamini, F. and Bartels, D.** (1998) Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* **38**, 1089-1099
- Marrs, K.A.** (1996) The functions and regulation of glutathione *S*-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 127-158
- Martínez-Ballesta, M.C., Aparicio, F., Pallás, V., Martínez, V. and Carvajal, M.** (2003) Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* **160**, 689-697
- Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G.B., Nobel, P.S. and Chrispeels, M.J.** (2002) Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol.* **130**, 2101-2110
- Mason, H.S. and Mullet, J.E.** (1990) Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. *Plant Cell* **2**, 569-579
- Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V. and Heyes, J.** (2002) Molecular physiology of aquaporins in plants. *International Review of Cytology* **215**, 105-148
- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J.I. and Chrispeels, M.J.** (1993) The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **12**, 2241-2247
- Membre, N., Bernier, F., Staiger, D. and Berna, A.** (2000) *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. *Planta* **211**, 345-354
- Mok, D.W. and Mok, M.C.** (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 89-118
- Moshelion, M., Becker, D., Biela, A., Uehlein, N., Hedrich, R., Otto, B., Levi, H., Moran, N. and Kaldenhoff, R.** (2002) Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *Plant Cell* **14**, 727-739
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hiral, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A. and Fujiyoshi, Y.** (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**, 599-605
- Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000) Organization and expression of two *Arabidopsis* *DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Biol.* **42**, 657-665
- Niemietz, C.M. and Tyerman, S.D.** (2000) Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett.* **465**, 110-114

- Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H.** (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173-182
- Ohmiya, A., Tanaka, Y., Kadowaki, K. and Hayashi, T.** (1998) Cloning of genes encoding auxin-binding proteins (ABP19/20) from peach: significant peptide sequence similarity with germin-like proteins. *Plant Cell Physiol.* **39**, 492-499
- Ozturk, Z.N., Talamé, V., Deyholos, M., Michalowski, C.B., Galbraith, D.W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. and Bohnert, H.J.** (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.* **48**, 551-573
- Page, R. D. M.** (1996) TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 357-358
- Paquette, S., Møller, B., L. and Bak, S.** (2003) On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* **62**, 399-413
- Parinov, S., Sevugan, M., Ye, D., Yang, W.-C., Kumaran, M. and Sundaresan, V.** (1999) Analysis of flanking sequences from *Dissociation* insertion lines. A Database for Reverse Genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 2263-2270
- Park, J.H. and Saier, Jr., M.H.** (1996) Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J. Membr. Biol.* **153**, 171-180
- Pastori, G.M. and Foyer, C.H.** (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* **129**, 460-468
- Phillips, A.L. and Huttley, A.K.** (1994) Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridization: expression of the tonoplast water channel, γ -TIP, is increased by GA₃. *Plant Mol. Biol.* **24**, 603-615
- Pih, K.T., Jang, H.J., Kang, S.G., Piao, H.L. and Hwang, I.** (1997) Isolation of molecular markers for salt stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cells* **7**, 567-571
- Pih, K.T., Kabilan, V., Lim, J.H., Kang, S.G., Piao, H.L., Jin, J.B. and Hwang, I.** (1999) Characterization of two new channel protein genes in *Arabidopsis*. *Mol. Cells* **9**, 84-90
- Prasad, G.V.R., Coury, L.A., Finn, F. and Zeidel, M.L.** (1998) Reconstituted aquaporin 1 water channels transport CO₂ across membranes. *J. Biol. Chem.* **273**, 33123-33126
- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B. and Agre, P.** (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* Oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**, 385-387
- Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shachar-Hill, Y. and Bohnert, H.J.** (2001) From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol.* **3**, research0001.1-0001.17
- Rea, P.A., Li, Z.-S., Lu, Y.-P. and Drozdowicz, Y.M.** (1998) From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC-transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 727-760

- Reizer, J., Reizer, A. and Saier, Jr., M.H.** (1993) The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 235-257
- Richmond, T. and Somerville, S.** (2000) Chasing the dream: plant EST microarrays. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 108-116
- Rivers, R.L., Dean, R.M., Chandy, G., Hall, J.E., Roberts, D.M. and Zeidel, M.L.** (1997) Functional analysis of Nodulin 26, an aquaporin in soybean root symbiosomes. *J. Biol. Chem.* **272**, 16256-16261
- Roxas, V.P., Smith, R.K., Allen, E.R. and Allen, R.D.** (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedling during stress. *Nat. Biotechnol.* **15**, 988-991
- Rubio, F., Gassmann, W. and Schroeder, J.I.** (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* **270**, 1660-1663
- Ruiter, R.K., van Eldik, G.J., van Herpen, M.M.A., Schrauwen, J.A.M. and Wullems, G.J.** (1997) Expression in anthers of two genes encoding *Brassica oleracea* transmembrane channel proteins. *Plant Mol. Biol.* **34**, 163-168
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sarda, X., Tousch, D., Ferrare, K., Cellier, F., Alcon, C., Dupuis, J.M., Casse, F. and Lamaze, T.** (1999) Characterization of closely related δ -TIP genes encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. *Plant Mol. Biol.* **40**, 179-191
- Sarda, X., Tousch, D., Ferrare, K., Legrand, E., Dupuis, J.M., Casse-Delbart, F. and Lamaze, T.** (1997) Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant J.* **12**, 1103-1111
- Sauter, A., Davies, W.J. and Hartung, W.** (2001) The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *J. Exp. Bot.* **52**, 1991-1997
- Schäffner, A.R.** (1998) Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta* **204**, 131-139
- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Yamaguchi-hinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K.** (2002b) Monitoring the expression pattern of around 7000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct. Integr. Genomics* **2**, 282-291

- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K.** (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA Microarray. *Plant Cell* **13**, 61-72
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K.** (2002a) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* **31**, 279-292
- Shabala, S.N. and Lew, R.R.** (2002) Turgor regulation in osmotically stressed *Arabidopsis* epidermal root cells. Direct support for the role of inorganic ion uptake as revealed by concurrent flux and cell turgor measurements. *Plant Physiol.* **129**, 290-299
- Sharma, Y.K., Leon, J., Raskin, I. and Davies, K.R.** (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5099-5104
- Sheen, J.** (1996) Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* **274**, 1900-1902
- Shen, B., Jensen, R.G. and Bohnert, H.J.** (1997) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.* **113**, 1177-1183
- Siefritz, F., Tyree, M.T., Lovisolo, C., Schubert, A. and Kaldenhoff, R.** (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* **14**, 869-876
- Staswick, P.E.** (1990) Novel regulation of vegetative storage protein genes. *Plant Cell* **2**, 1-6
- Steiner-Lange, S., Gremse, M., Kuckenberger, M., Nissing, E., Schächtele, D., Spenrath, N., Wolff, M., Saedler, H. and Dekker, K.** (2001) Efficient identification of *Arabidopsis* knock-out mutants using DNA-arrays of transposon flanking sequences. *Plant Biol.* **3**, 391-397
- Steudle, E.** (1993) Pressure probe techniques: basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue, and organ level. In: *Water deficits: plant responses from cell to community* (Smith, J.A.C. and Griffiths, H., eds), Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, 5-36
- Steudle, E.** (1994) Water transport across roots. *Plant Soil* **167**, 79-90
- Steudle, E. and Peterson, C.A.** (1998) How does water get through roots? *J. Exp. Bot.* **49**, 775-788
- Steudle, E., Murrmann, M. and Peterson, C.A.** (1993) Transport of water and solutes across maize roots modified by puncturing the endodermis. Further evidence for the composite transport model of the root. *Plant Physiol.* **103**, 335-349

- Stockinger, E.J., Gilmour, S.j. and Thomashow, M.F.** (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1035-1040
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., Ma, H. and Martienssen, R.** (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev.* **9**, 1797-1810
- Surplus, S.L., Jordan, B.R., Murphy, A.M., Carr, J.P., Thomas, B. and A.-H.-Mackerness, S.** (1998) Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant Cell Environ.* **21**, 685-694
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815
- Thimm, O., Essigmann, B., Kloska, S., Altmann, T. and Buckhout, T.J.** (2001) Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol.* **127**, 1030-1043
- Thornalley, P.J.** (1990) The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* **269**, 1-11
- Tommasini, R., Vogt, E., Fromentau, M., Hörtensteiner, S., Philippe, M., Amrhein, N. and Martinoia, E.** (1998) An ABC-Transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* **13**, 773-780
- Tyerman, S.D., Bohnert, H.J., Maurel, C., Steudle, E. and Smith, J.A.C.** (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J. Exp. Bot.* **50**, 1055-1071
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F. and Kaldenhoff, R.** (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* **425**, 734-737
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11632-11637
- Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N. and Shinozaki, K.** (1994) Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 331-340
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. and Shinozaki, K.** (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**, 1743-1754

- Utsugi, S., Sakamoto, W., Murata, M. and Motoyoshi, F.** (1998) *Arabidopsis thaliana* vegetative storage protein (VSP) genes: gene organization and tissue-specific expression. *Plant Mol. Biol.* **38**, 565-576
- Utsugi, S., Sakamoto, W., Ogura, Y., Murata, M. and Motoyoshi, F.** (1996) Isolation and characterization of cDNA clones corresponding to the genes expressed preferentially in floral organs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **32**, 759-765
- Verkman, A.S.** (1995) Optical methods to measure membrane transport processes. *J. Membr. Biol.* **148**, 99-110
- Vernier, P., Mastripiolito, R., Helin, C., Bendali, M., Mallet, J. and Tricoire, H.** (1996) Radioimager quantification of oligonucleotide hybridization with DNA immobilized on transfer membrane: application to the identification of related sequences. *Anal. Biochem.* **235**, 11-19
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P. and Mauch, F.** (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione *S*-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* **49**, 515-532
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L. and Fowke, L.C.** (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* **15**, 501-510
- Weig, A. and Komor, E.** (1996) An active sucrose carrier (Scr1) that is predominantly expressed in the seedlings of *Ricinus communis* L. *Plant Physiol.* **147**, 685-690
- Weig, A., Deswarte C. and Chrispeels, M.J.** (1997) The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol.* **114**, 1347-1357
- Weig, A.R. and Jakob, C.** (2000a) Functional characterisation of *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporins. In: *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport* (Hohmann, S. and Nielsen, S., eds), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 365-372
- Weig, A.R. and Jakob, C.** (2000b) Functional identification of the glycerol permease activity of *Arabidopsis thaliana* NLM1 and NLM2 proteins by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **481**, 293-298
- Werck-Reichhart, D., Bak, S. and Paquette, S.** (2002) Cytochromes P450. In: *The Arabidopsis Book* (Somerville, C.R. and Meyerowitz, E.M., eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0028, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Wisman, E., Cardon, G.H., Fransz, P. and Saedler, H.** (1998) The behaviour of the autonomous maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Mol. Biol.* **37**, 989-999

- Wyn Jones, R.G. and Pollard, A.** (1983) Proteins, enzymes and inorganic ions. In: *Encyclopedia of plant physiology* (Lauchli, A. and Pirson, A., eds.), New series, Vol.15B, Berlin, Springer, 528-562
- Xiong, L. and Zhu, J.-K.** (2002) Salt Tolerance. In: *The Arabidopsis Book* (Somerville, C.R. and Meyerowitz, E.M., eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0048, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Xiong, L., Schumaker, K.S. and Zhu, J.-K.** (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**, 165-183
- Xu, W., Bak, S., Decker, A., Paquette, S.M., Feyereisen, R. and Galbraith, D.W.** (2001) Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: the cytochrome P450 gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **272**, 61-74
- Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W.B., Michalowski, C.B. and Bohnert, H.J.** (1995) A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* **7**, 1129-1142
- Yamada, S., Komori, T., Myers, P.N., Kuwata, S., Kubo, T. and Imaseki, H.** (1997a) Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol.* **38**, 1226-1231
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1994) A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**, 251-264
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S. and Shinozaki, K.** (1992) Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* **33**, 217-224
- Yang, B., Fukuda, N., van Hoek, A., Matthay, M.A., Ma, T. and Verkman, A.S.** (2000) Carbon dioxide permeability of aquaporin-1 measured in erythrocytes and lung of aquaporin-1 null mice and in reconstituted proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **275**, 2686-2692
- Yang, K.-Y., Kim, E.-Y., Kim, C.-S., Guh, J.-O., Kim, K.-C. and Cho, B.-H.** (1998) Characterization of a glutathione *S*-transferase gene *AtGST1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* **17**, 700-704
- Zardoya, R. and Villalba, S.** (2001) A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **52**, 391-404
- Zhu, J.K.** (2000) Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **124**, 941-948
- Zhu, J.-K.** (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**, 66-71
- Zhu, J.-K.** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 247-273

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide

7.1.1 Oligonukleotide zur Amplifikation der 3'-UTR-Sonden (5' nach 3')

Gen-Name	forward-primer	Sequenz	reverse-primer	Sequenz
<i>NIP1;1</i>	NLM1_f	TTTCTAAAGACCGTGAGAAT	NLM1_r	AAATATACGATACAGTTACAC
<i>NIP1;2</i>	NLM2_f	TAAAGACAGTGCAGAAACGGTAG	NLM2_r	CCAAACTCGTTATAGATCAGTT
<i>NIP2;1</i>	NLM3_f	TTCAACCGAAATTGTAATAT	NLM3_r	ATTGTAAC TAATCATTATCA
<i>NIP2;1-PG</i>	NLM6_f	CATAAACGAGTTTCCGATCTTCCT	NLM6_r	GTAAAGAAGTGGAAAGCAATGT C
<i>NIP3;1</i>	AtNIP3-1_F2	CGATGTACTATTCAC TAAACTAGT TTACAA	AtNIP3-1_R2	TAAATTATTTTCGATATTGAGTT GATCAGT
<i>NIP3;1-PG</i>	NLM5_f	GGCAAATGTAATGTTACATGTAA G	NLM5_r	ATTGTATTACTATATAAAGTTG AG
<i>NIP4;1</i>	3'PSMIP1_f	CCACAAGGGTTCTAGTTCTAAGA C	3'PSMIP1_r	GCTCGTGGAGTATCTATAATAA ATCTTATCTAC
<i>NIP4;2</i>	3'PSMIP2_f	AGACAATGCTTCTAAATCAGATG GC	3'PSMIP2_r	ACTAATAGGTAACATATAGGTT TTTCGCTCTAA
<i>NIP5;1</i>	NLM4_f	CCTCGTCCGGTTAGGAGCT	NLM4_r	ACAATGACGAGACAAGTTCGC A
<i>NIP6;1</i>	NLM8_f	CAGAAGATGAAAAACACTCG	NLM8_r	AGCAGCAATCGTTGTAATCG
<i>NIP7;1</i>	NLM7_f	ATACAAATAAACACTTTTGA	NLM7_r	ATAAAATATATGTGACTAAA
<i>PIP1;1</i>	1a_f	AAGTCCAGAAGCTAAGTAAA	1a_r	TTTCGAAAATAGTTCTCCTT
<i>PIP1;2</i>	1b_f	TCCAGAAGCTAAAGCTGATTG	1b_r	TTCTGGGGCATGTCTTTGT
<i>PIP1;3</i>	1c_f	TCCAGATCCTGATTGATTT	1c_r	TAAATAAACACATGATCCAG
<i>PIP1;4</i>	1d_f	AGCAAGAGTTAGAGACACACAGA A	1d_r	GTTGAAAGGTCATTACATTC AAAACACA
<i>PIP1;5</i>	F16G20_f	GACATAAAGTTTCTACATA	F16G20_r	GCCATTGATACATAATAG
<i>PIP2;1</i>	2a_f	CTAAACACACCAAACCAGATT	2a_r	CACTCGATTA AAAAGCGAAA
<i>PIP2;2</i>	2b_f	TTGCCACACAAAAAAAACC	2b_r	AGGGCAAAAACAATTTGGTT
<i>PIP2;3</i>	2c_f	GAAAGAAAAAAGTGTGCCT	PIP2c_rm	GAAGAAAAAGTTGTCTTTCTC
<i>PIP2;4</i>	2e_f	TTTGCTTAATATACATTTATTTA A	2e_r	GATTTTATCTTAAAGCAACAT
<i>PIP2;5</i>	2f_f	CTCACGTTTAACTTTGATAT	2f_r	AGATTTAATCATAGAAGTAG
<i>PIP2;6</i>	2h_f	CAGCTTCATGAGCTCCAT	2h_r	TACAAATTGTTACACACAAAACC T
<i>PIP2;7</i>	2d_f	AATTAATGAAGGCTTTTTTT	2d_r	AGCCATTTTATAATTAACA
<i>PIP2;8</i>	2g_f	CCAACCAATTGATGATTCAT	2g_r	GTTTTAATTCGACTAAAGTAT A
<i>SIP1;1</i>	AtSIP1-1_3'_f	AGAATACCGTTCAGATTCTCACC G	AtSIP1-1_3'_r	TCTAAACCGAAGAGAGTCTG AATGAT
<i>SIP1;2</i>	AtSIP1-2_F2	ATGAATCATAATCCCATTGTGTG ATG	AtSIP1-2_R2	TCCTTCACGTACCGAACTTAAC C
<i>SIP2;1</i>	3'NLM9_f	GCCAAATCTGAGTGAGGAATGAG	3'NLM9_r	CTGCATATATTTGTCATATTGC GCA
<i>TIP1;1</i>	gammaTIP1_f	CACGAGCAGCTCCCAACC	gammaTIP1_r	CACTTGAACCAACGGACA
<i>TIP1;2</i>	gammaTIP2_f	TACCACCGATTACTGAAGAC	gammaTIP2_r	ACAACCTCCAACAACAAACC
<i>TIP1;3</i>	MIP1_f	ACCACCTCCTTCTAATGATTTCT	MIP1_r	AGTTTAACTAATTTAAATTAG TGT
<i>TIP2;1</i>	deltaTIP_f	ACATGTTCCTCTTGCTTCTGC	deltaTIP_r	ATATTCATACATCCATTAGTTA ATT
<i>TIP2;2</i>	F71442TIP_r	CAGCTCCCACCACAGAA	F71442TIP_r	GAGATATAAAATTTGAAAATA TAC
<i>TIP2;3</i>	MNJ7TIP_f	CGGTAGAAACCCGTGAG	MNJ7TIP_r	TATACGTTAAAAAAAAGGAGA
<i>TIP2;x-PG</i>	3'deltaTIP2_f	AGTTATCTACTCCAACGCTTTTAT CA	3'deltaTIP2_r	AATCAATTGATGATATTTCATAC AAATTAGC
<i>TIP3;1</i>	alphaTIP_f	AACTTTCCTCATGTCACCAC	alphaTIP_r	TAAAAGATATCGAGCATTGC
<i>TIP3;2</i>	betaTIP_f	TCCGGAAGATTACTAGACC	betaTIP_r	TATACAATACAAGAAAAACAGA T
<i>TIP4;1</i>	AC005395TIP_f	GACGACGAGCAACCATTGT	AC005395TIP_r	ATAATTGGAATTAATAGATTAA GG
<i>TIP5;1</i>	MIP2_f	TGGTGATGCCATTGGTGTG	MIP2_r	CAGAGTTATATGTAACAAAAT A

7.1.2 Oligonukleotide für die semi-quantitative RT-PCR (5' nach 3')

Gen-Name	forward-primer	Sequenz	reverse-primer	Sequenz
<i>pAW109</i>	DM151	GTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATC	DM152	CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC
<i>PIP2;1</i>	2af0*	AAGAAGTTAACTATGGCAAAGGA	2ar+890	TTGAGAAATCTGGTTTGGTGT
<i>PIP2;6</i>	2h_qRT_f	AGTTGACGGAGGAAGAGTCGCTC	2h_qRT_r	CCAACCCCAACGCCAACAT
<i>PIP2;4</i>	2e_qRT_f	TTGGATGTGAACGAGAGTGGACC	2e_qRT_r	CACCGAGTCCGGTACCTTTGT
<i>PIP2;5</i>	2f_qRT_f	GTGGTTGGTGATAAGAGATCTTCTCC	2f_qRT_r	CTGCAACACCCGGTGCCGA
<i>PIP2;2</i>	2bf0*	AAGTTATAGAAATGGCAAAGAC	2br+874	CTCAAAGCTTGGCTGCACCTTCTG
<i>NIP3;1-PG</i>	NLM5-qRT-f	CGAGTTCGTGGGGACATTCT	NLM5-qRT-r	GTACATCGATATAATTCACGCCAAC

7.1.3 Oligonukleotide zur Identifikation der Insertionsmutanten (5' nach 3')

Gen-Name	primer	Sequenz
<i>Ds</i>	Ds3'-1	GGTCCCCGTCCGATTTGACT
<i>En-1</i>	En26	CCTCCTTTGACGTTTTCTTGTAGTG
<i>En-1</i>	En8202	CCTCCTTACCTTTTTCTTGTAGTG
<i>En-1</i>	En205	AGAAGCACGACGGCTGTAGAATAGGA
<i>En-1</i>	En603	GGTTGGGCAGAAACATTTGCTTACG
<i>En-1</i>	En1	CACTACAAGAAAACGTCAAAGGAGTG
<i>En-1</i>	6AA-En	GGTGCTTGTGTATGTTATGTTGA
<i>PIP1;4</i>	1dExon2-f	GTGGACATCAACCCTGCT
<i>PIP1;4</i>	1dExon2-r	GTGTGAGTCACGGCGCTTC
<i>PIP2;1</i>	PIP2abw	CTATCGCAGTCCAATGAATGGTCC
<i>PIP2;1</i>	6AA-r	AGAGAAGACGGGTGTAGACAAGAAC
<i>PIP2;1</i>	6AA-f	GCTTGTGTACCTTAATTCTCAAGT

7.1.4 Oligonukleotide für die DNA-Microarray-Herstellung

Vektor	primer	Sequenz
pGEM [®] -T Easy	M13 (22)-f	TCACGACGTTGTA AAAACGACGG
pGEM [®] -T Easy	M13(25)-r	AAACAGCTATGACCATGATTACGCC
pGEM [®] -T Easy	SP6	TATTTAGGTGACACTATAG
pGEM [®] -T Easy	T7	TAATACGACTCACTATAGGG

7.1.5 Oligonukleotide zur Herstellung einer *TIP1;1*-Probe

Gen-Name	forward-primer	Sequenz	reverse-primer	Sequenz
<i>TIP1;1</i>	TIP1;1spec-f	ATGCCGATCAGAAACATCGC	TIP1;1spec-r	TTATATAGTCGAAATTGCAATGGCC

7.2 Expression von *NIP3;1-PG*

Bei der Organ-spezifischen Expressions-Analyse der *MIPs* konnten Transkripte für *NIP3;1-PG* in Wurzeln detektiert werden (siehe Ergebnisse, Abb. 3.2, 3.2) Um dies zu überprüfen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde mit einer cDNA aus Wurzeln und den *NIP3;1-PG*-spezifischen Oligonukleotiden (NLM5-qRT-f und NLM5-qRT-r) eine PCR durchgeführt. Als Kontrollen wurden genomische DNA und eine „cDNA“, die ohne Reverse Transkriptase synthetisiert wurde, verwendet. Abb. 7.1 zeigt die entstandenen PCR-Fragmente. Das RT-PCR-Produkt wurde aus dem Gel ausgeschnitten, in pGEM[®]-T Easy (Promega) kloniert und anschließend sequenziert.

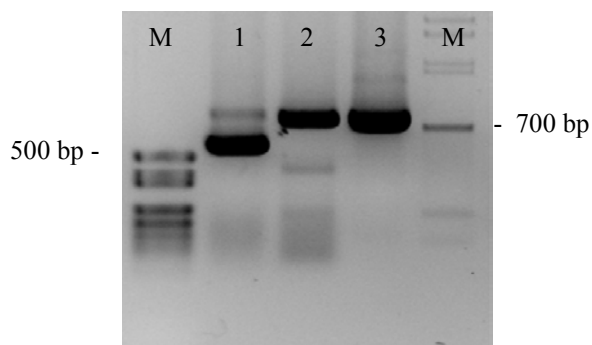


Abb. 7.1 RT-PCR mit *NIP3;1-PG*-spezifischen Oligonukleotiden. Invertierte Darstellung des Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels mit den PCR-Produkten. 1 cDNA (Wurzel), 2 „cDNA“ ohne Reverse Transkriptase, 3 gen. DNA als Vorlage für die PCR. Ms kennzeichnen DNA-Fragmentlängenstandards.

Wird die Nukleotidsequenz der cDNA in die Aminosäuresequenz übersetzt, entsteht eine MIP-ähnliche Aminosäuresequenz, die allerdings nur ein NPA-Motiv besitzt. Das für die MIP-Familie typische 2. NPA-Motiv liegt auf einem anderen Leserahmen (Abb. 7.2).

Leserahmen 2:

```

cgagttcgtggggacattctctatgatatgttgcggctgctcagccatcggtgtaaatgag
 E F V G T F S M I F A G C S A I V V N E
acgtacggtaaacgggtgacacttccccggatatagctttggatggggactagtcgtaacg
 T Y G K P V T L P G I A L V W G L V V T
gttatgatctactcaattgggtcatgtctccgggtgcacatttcaaccctgctgtttctatt
 V M I Y S I G H V S G A H F N P A V S I
gcctttgcctcttctaagaagttcccttttaatacaggccaatttcgggagcatctatgaa
 A F A S S K K F P F N Q A N F G S I Y E
tccagcaagaagcttagggcctgcacttatatggggatgttataaggatttatggttata
 S S K K L R A C T Y M G M L - G F M V I
catagtttcacccggagcattatcagggtgatggacttatggtttgttacgatcgacaac
 H S F T R S I I R C M D L W F V T I D N
gaaatcatatagttagattatacgtccaatttgcaataaagtatcttcgagagatcgcca
 E I I - - D Y T S N L Q - S I F E R S P
agaagcttcccaagatgagatttgggttttacgagtggttgatccgggctaatacaaaacta
 R S F P R - D L C F T S G - S G - S K L
ttttatagttcatcacctaccgatataatggcaaatgtaatggttacatgtaagttggc
 F Y M F I T Y R Y Q W Q M - C Y M - V G
gtgaattatatcgatgtac
 V N Y I D V

```

Leserahmen 3:

cgagttcgtggggacattctctatgatatttgccgggtgctcagccatcgtaggtaaatgaga
 S S W G H S L - Y L P A A Q P S W - M R
 cgtacggtaaaccgggtgacacttcccggtagctttggtaggggactagtcgtaacgg
 R T V N R - H F P V - L W Y G D - S - R
 ttatgatctactcaattgggtcatgtctccgggtgcacatttcaaccctgctggtttctattg
 L - S T Q L V M S P V H I S T L L F L L
 cctttgcctcttctaagaagttcccttttaacaggccaatttcggggagcatctatgaat
 P L P L L R S S L L I R P I S G A S M **N**
 ccagcaagaagccttagggcctgcacttatatggggatggtataaggatttatggttatac
P A R S L G P A L I W G C Y K D L W L Y
 atagtttcaccgggagcattatcaggtgcattgacttattggtttgttacgatcgacaacg
 I V S P G A L S G A W T Y G L L R S T T
 aatcatatagtgagattatcagtcgaatttgaataaagtatcttcgagagatcgccaa
 K S Y S E I I R P I C N K V S S R D R Q
 gaagcttcccaagatgagatttgtgttttacgagtggttgatccggctaatacaaaactat
 E A S Q D E I C V L R V V D P A N Q N Y
 tttatatgttcatcacctaccgatatcaatggcaaatgtaattgttacatgtaagttggcg
 F I C S S P T D I N G K C N V T C K L A
 tgaattatcgtatgtac
 - I I S M Y

Abb. 7.2 : Umschreibung der sequenzierten cDNA in die entsprechende Aminosäuresequenz. Gezeigt sind nur die beiden Leserahmen, die die beiden NPA-Motive (unterstrichen) enthalten.

Obwohl kein EST zu diesem Gen in den Datenbanken zu finden ist (05/2003), konnte mit vorliegenden Untersuchungen die Expression dieses Gens gezeigt werden. Ob *NIP3;1-PG* auch tatsächlich in ein funktionelles Protein translatiert wird, kann damit nicht geklärt werden. Das entstehende Protein würde ein „halbes“ MIP darstellen (Stop-Codon nach 1. NPA-Motiv) und damit möglicherweise eine andere Funktion als ein Aquaporin/Glycerin-Transporter besitzen.

7.3 Genlisten der Venn-Diagramme

Tab. 7.1: Überlappungen von Genen nach 5 Stunden NaCl- bzw. Sorbitol-Behandlung in Wurzeln

PLAT-TE	POS.	Gen	Genecode	WN 5h	SD	WS 5h	SD
D5	G12	ACC-synthase	At4g11280	2,30	1,33	1,69	1,86
D5	B06	Ascorbate peroxidase	At1g07890	1,97	0,91	1,68	0,54
D5	A01	CCH- copper chaperone	At3g56240	2,47	1,60	1,27	0,47
D6	C06	Chitinase	At3g54420	3,08	3,44	1,16	0,09
D6	D09	Proteinase inhibitor (similar to Glycine max)	At2g40880	2,36	1,94	1,17	0,26
D5	B08	Cyclooxygenase	At3g01420	3,52	4,51	1,30	0,44
D5	D10	Germin-like protein 1	At1g72610	1,98	0,10	1,87	0,86
D6	C11	Hydroxyproline-rich protein	At2g14890	1,96	1,78	1,30	0,71
D4	B05	GSH-RED2	At3g24170	3,54	3,40	1,80	1,03
D4	B09	GSH-POX4	At2g31570	2,05	1,50	1,38	0,26
D3	A04	CYP71B7	At1g13110	2,19	0,58	1,54	1,65
D1	B09	UGT73B3	At4g34131	3,78	3,58	1,92	1,20
D2	B03	MRP5	At1g04120	2,15	0,64	1,62	1,05

D2	D11	PDR7, EST	At1g15210	2,79	2,14	1,67	0,31
D4	E03	Nucleolar-like protein	At5g55915.1	0,47	0,40	0,80	0,37
D4	E05	ubiquitin-conjugating enzyme E2- 17kD (UBCAT4A)	At5g41700.1	0,46	0,17	0,63	0,15
D6	G03	Allene oxide synthase	At5g42650	2,37	1,72	2,09	1,71
D5	B11	Basic chitinase CHI1	At3g12500	2,12	0,83	3,99	2,55
D5	E10	COMT	At5g54160	2,08	0,83	2,13	0,82
D5	D12	Germin-like protein 4	At1g18970	5,39	5,23	2,67	1,78
D5	H10	pEARLI1	At4g12480	2,48	0,85	2,27	1,42
D6	F03	Pre-hevein-like protein (similar to PR 4)	At3g04720	2,25	1,13	2,01	1,81
D6	H04	RAD1, Nucleotide excision repair protein XP-F homolog	At5g41150	2,49	1,38	2,71	2,34
D5	A02	RD29A	At5g52310	6,46	5,87	3,40	2,76
D6	G04	WAK1, serine threonine kinase	At1g21250	5,01	2,24	5,60	6,24
D4	C06	GLYOX-II.4	At1g53580	2,12	0,37	2,14	1,67
D4	B06	GSH-POX1	At4g11600	6,81	5,80	3,77	1,74
D2	F03	GSTF2*	At4g02520	1,90	1,23	2,16	1,55
D2	G09	GSTF3	At4g02930	2,85	1,78	2,67	1,56
D2	F04	GSTF6	At1g02930	10,92	9,39	14,12	14,77
D2	G05	GSTF7	At1g02920	6,89	2,09	7,61	5,25
D2	G08	GSTU9	At5g62480	3,24	2,86	2,50	1,79
D2	G11	GSTZ1	At2g02390	2,59	1,08	2,95	2,19
D3	D07	CYP706A2	At4g22710	3,83	1,69	2,12	2,02
D3	A03	CYP71B6	At2g24180	5,30	2,80	4,04	4,49
D3	B06	CYP73A5 (C4H)	At2g30490	2,79	1,05	2,57	2,17
D3	C10	CYP81F4	At1g65190	4,56	1,46	2,54	1,08
D2	C06	MRP11	At1g30420	2,45	1,57	2,42	1,98
D2	C07	PDR11	At3g53480	2,73	0,74	2,31	1,98
D2	C10	ATM3, EST	At5g58270	3,86	2,50	2,06	1,02
D5	G01	Ethylene responding factor ERF1	At5g61590	0,48	0,26	0,42	0,07
D5	B10	PRXCB, Neutral peroxidase	At3g49120	1,87	0,40	2,16	0,74
D6	G05	NDR1, disease resistance protein	At3g20600	1,51	0,50	2,12	1,56
D2	F03	GSTF2	At4g02520	1,90	1,23	2,16	1,55
D2	G09	GSTF3*	At2g02930	2,85	1,78	2,67	1,56
D2	F07	GSTF8	At2g47730	1,39	0,85	2,92	0,66
D1	H09	UGT83A1	At3g02100	1,84	0,42	1,98	0,14
D2	D01	PGP1, EST	At2g36910	1,62	1,05	2,32	1,39

Tab. 7.2: Überlappungen von Genen nach 24 Stunden NaCl- bzw. Sorbitol-Behandlung in Wurzeln

PLAT-TE	POS.	Gen	Gencode	WN 24h	SD	WS 24h	SD
D6	E08	Basic peroxidase prxEa, POX	At2g38380	2,02	1,81	1,18	0,53
D5	B10	Neutral peroxidase, PRXCB	At3g49120	2,25	0,74	1,54	0,70
D5	B08	Cyclooxygenase, PIOX	At3g01420	2,42	1,28	1,02	0,80
D5	A12	Pathogen-inducible protein, CXC750	At1g31580	2,11	0,88	0,81	0,28

D6	C06	Chitinase	At3g54420	2,13	0,98	1,67	0,14
D5	E05	Germin-like protein 9	At3g14630	3,43	1,55	1,45	0,50
D5	H10	pEARL11	At4g12480	2,90	1,59	1,09	0,01
D6	F03	Pre-hevein-like protein (similar to PR 4), HEL	At3g04720	4,55	4,17	0,78	0,61
D4	B06	GSH-POX1	At4g11600	2,36	0,58	1,40	0,85
D2	G08	GSTU9	At5g62480	3,00	0,87	1,33	0,67
D2	G11	GSTZ1	At2g02390	2,55	0,88	1,22	0,91
D3	A03	CYP71B6	At2g24180	2,29	0,64	1,10	0,79
D3	C10	CYP81F4	At1g65190	3,35	1,70	1,20	0,81
D4	G06	UGT72E2	At5g66690	2,04	0,31	1,52	0,62
D1	D10	UGT76D1	At2g26480	2,28	0,70	1,18	0,16
D2	D09	MRP3, EST	At3g13080	3,49	1,39	1,14	0,76
D6	H05	CPD II photolyase	At1g12370	0,47	0,25	1,16	0,51
D3	F02	β -Glucosidase, 3'-Sonde	At1g66270	0,48	0,25	0,80	0,50
D2	D01	PGP1, EST	At2g36910	0,50	0,20	1,03	0,63
D5	B11	Basic chitinase	At3g12500	4,68	0,92	5,15	5,21
D5	D12	Germin-like protein 4	At1g18970	3,78	2,13	5,57	5,08
D2	F03	GSTF2	At4g02520	6,64	4,56	2,52	1,42
D2	G09	GSTF3	At2g02930	3,17	1,54	1,97	0,47
D2	F04	GSTF6	At1g02930	3,13	1,59	3,32	1,87
D2	G05	GSTF7	At1g02920	3,19	2,37	9,19	7,38
D5	G12	ACC-synthase, ACS6	At4g11280	1,57	0,66	3,78	4,24
D6	D04	AIG2-like protein	At3g28940	1,04	0,57	2,29	1,81
D6	G09	S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase, ELI14	At3g23810	1,68	0,21	2,53	1,06
D6	F12	Tryptophan synthase beta subunit	At5g54810	0,98	0,44	2,46	1,31
D6	F01	Isoflavonoid reductase homologue	At1g75280	0,88	0,15	2,10	1,82
D4	H09	UGT72E3	At5g26310	1,46	0,87	2,13	1,77
D1	H12	UGT76E10P	At3g46650	1,62	0,39	2,19	0,03
D4	H06	UGT79B5	At1g50580	1,29	0,54	2,25	1,72
D6	H12	UGT84A4, cDNA	At4g15500	1,02	0,26	3,16	0,79
D5	G01	Ethylene responding factor, ERF1	At5g61590	0,65	0,30	0,54	0,08
D4	E01	RAD32, isoform 1	At5g38470.1	0,60	0,27	0,54	0,10
D4	B02	GSTF13	At3g62760	0,59	0,34	0,45	0,22
D4	B01	GSTU23	At1g78320	0,62	0,23	0,41	0,32
D3	B02	CYP72A14	At3g14680	1,14	0,40	0,39	0,18
D2	B02	MRP1	At1g30400	1,06	0,45	0,43	0,20
D2	B01	MRP2	At2g34660	0,84	0,35	0,43	0,39
D2	B03	MRP5	At1g04120	0,97	0,49	0,44	0,19

Tab. 7.3: Überlappungen von Genen nach 48 Stunden NaCl- bzw. Sorbitol-Behandlung in Wurzeln

PLAT-TE	POS.	Gen	Gencode	WN 48h	SD	WS 48h	SD
D5	C05	Catalase, CAT1	At1g20630	2,70	2,27	1,37	0,13
D5	A01	CCH- copper chaperone, ATX1	At3g56240	2,05	2,18	1,78	0,43
D5	B10	Neutral peroxidase, PRXCB	At3g49120	3,29	2,21	1,75	0,85
D6	C06	Chitinase	At3g54420	3,61	3,06	1,18	0,31
D5	A12	Pathogen-inducible protein, CXC750	At1g31580	2,16	2,55	0,54	0,10
D6	D05	Harpin-induced gene, HIN1	At2g35980	2,05	1,95	1,70	0,57
D6	D09	Proteinase inhibitor (similar to Glycine max), PIN2	At2g40880	1,99	1,05	1,03	0,22
D5	D10	Germin-like protein 1	At1g72610	2,22	1,35	1,30	0,27
D5	D11	Germin-like protein 3a	At5g20630	2,39	1,24	1,26	0,46
D5	E01	Germin-like protein 5	At1g09560	2,05	1,45	1,34	0,58
D5	E02	Germin-like protein 6	At5g39100	3,69	2,48	1,69	0,29
D5	E05	Germin-like protein 9	At3g14630	2,36	1,14	1,16	0,33
D6	F03	Pre-hevein-like protein (similar to PR 4), HEL	At3g04720	5,74	2,23	1,03	0,48
D5	C06	Glutaredoxin (similar to castor bean), APR4	At5g40370	2,10	1,12	0,87	0,11
D5	C08	Glutaredoxin (5'-adenylylsulfate reductase), APR3	At4g21980	2,97	2,55	0,66	0,09
D4	C04	GLYOX-II.2	At3g10850	1,96	1,87	1,09	0,45
D4	C06	GLYOX-II.4	At1g53580	2,80	1,88	0,80	0,40
D4	B02	GSTF13	At3g62760	3,20	3,54	0,90	0,60
D5	H07	Proteasome subunit	At3g60820	2,34	2,12	0,73	0,26
D5	C11	GF 14 omega (14-3-3 protein), GRF2	At1g78300	2,30	1,35	0,93	0,08
D5	D05	Histidine kinase homolog 2, HDYH2	At2g01830	2,01	0,64	1,31	0,41
D5	D06	Response regulator 1, ARR1	At3g16857	2,16	1,43	1,22	0,33
D5	D08	Response regulator 5, ARR5	At3g48100	2,15	1,04	1,31	0,50
D4	E02	trihelix DNA-binding protein GT2	At1g76890.1	2,32	1,33	0,85	0,34
D4	E06	Proline-rich protein	At2g45180.1	1,99	1,28	0,61	0,18
D6	E06	rofl1; peptidylprolyl isomerase; FK506-binding protein	At3g25230	3,77	4,31	0,72	0,17
D5	D01	Histidine containing phosphotransfer protein, AHP2	At3g29350	2,10	1,00	1,82	0,50
D5	E10	O-methyl transferase, COMT	At5g54160	2,04	0,03	1,18	0,27
D5	B04	Nitrate reductase 1	At1g77760	2,19	2,62	1,10	0,07
D4	E10	sulfate transporter, putative	At1g77990.1	2,23	2,01	0,73	0,16
D6	F11	Tryptophan synthase alpha subunit	At3g54640	4,22	5,27	0,75	0,10

D6	E04	CYP705A22, EST	At3g20130	2,15	1,04	1,25	0,56
D3	D07	CYP706A2	At4g22710	2,93	3,39	1,17	0,34
D3	D02	CYP86A2, FattAcH	At4g00360	3,00	2,14	1,03	0,38
D1	C12	UGT74F2	At2g43820	2,22	1,56	0,55	0,18
D1	D08	UGT76C1	At5g05870	2,00	1,40	0,59	0,04
D1	D10	UGT76D1	At2g26480	3,31	3,12	0,73	0,10
D5	A03	PDF1.2, Defensin	At5g44420	0,40	0,27	0,93	0,74
D3	A02	CYP51A2, sterolDM	At1g11680	0,50	0,31	1,65	0,52
D1	A08	UGT71D1	At2g29730	0,44	0,21	0,86	0,18
D1	A05	UGT72B1	At4g01070	0,49	0,22	1,27	0,18
D1	B01	UGT73C5	At2g36800	0,44	0,34	0,82	0,36
D5	B11	Basic chitinase, CHI1	At3g12500	5,44	4,17	6,98	3,81
D6	C04	Beta - glucanase 3 (similar to Glycine max); BG3	At3g57240	2,15	1,36	2,73	0,95
D6	D04	AIG2-like protein	At3g28940	2,37	1,74	3,33	0,51
D5	D12	Germin-like protein 4	At1g18970	3,46	1,47	3,31	0,69
D4	E09	serine/threonine kinase- like protein	At4g23220.1	2,33	1,58	2,08	0,30
D2	F03	GSTF2	At4g02520	6,00	5,64	2,30	0,17
D2	G09	GSTF3	At2g02930	4,60	3,86	2,55	0,47
D2	F04	GSTF6	At1g02930	5,14	3,19	4,70	4,26
D2	G05	GSTF7	At1g02920	4,08	3,52	15,13	5,93
D2	D09	MRP3, EST	At3g13080	3,03	1,91	5,77	5,93
D2	D04	PDR8, EST	At1g59870	2,00	1,79	2,59	2,83
D6	A03	Adenine phosphoribosyl transferase	At1g27450	0,47	0,22	0,50	0,03
D4	B03	GSTU27	At3g43800	0,52	0,27	0,51	0,24
D1	A11	UGT71B3P	At4g15270	0,44	0,05	0,50	0,05
D1	A02	UGT72D1	At2g18570	0,50	0,37	0,39	0,09
D2	A06	PDR6	At2g36380	0,40	0,13	0,50	0,06
D3	C10	CYP81F4	At1g65190	3,36	0,27	0,31	0,13
D6	B01	Alternative oxidase, AOX1A	At3g22370	0,91	0,20	5,11	3,55
D6	B03	Catalase	At1g20620	1,09	0,54	2,15	0,22
D6	C05	Chitinase	At5g24090	1,74	0,98	2,07	0,94
D6	C01	PR-2, 1,3-beta-glucanase	At3g57260	1,12	0,20	2,21	1,90
D6	H09	NADPH oxidase	At1g09090	1,05	0,30	2,04	0,04
D6	G05	NDR1, disease	At3g20600	1,10	0,09	2,22	0,90
D5	A02	RD29A	At5g52310	1,03	0,20	2,18	0,44
D6	B02	Reticuline oxidoreductase, pEARLI5	At4g20860	0,78	0,71	2,75	0,87
D6	H05	CPD II photolyase	At1g12370	0,57	0,18	1,99	0,72
D5	B08	Cyclooxygenase, PIOX	At3g01420	1,73	0,74	2,51	1,06
D6	H04	Nucleotide excision repair protein XP-F homolog, ATRAD1	At5g41150	1,34	0,45	2,77	3,14
D6	G04	Serine threonine kinase, WAK1	At1g21250	1,62	1,13	5,43	4,99
D5	G02	Receiver-like protein 3	At1g67710	1,06	0,00	2,16	0,43
D5	G03	Receiver-like protein 5, (A)RP5	At4g16110	0,90	0,36	2,44	0,95
D2	G08	GSTU9	At5g62480	1,52	1,10	2,25	1,32

D6	A07	membrane related protein CP5	At1g64720	0,56	0,17	2,51	0,46
D6	D01	Pectin methyl esterase	At1g53840	0,95	0,02	2,71	0,42
D6	E05	Glucose 6-phosphate dehydrogenase, clone E5	At5g13110	1,06	0,42	2,22	0,09
D5	F09	Phosphatase, MP2C	At3g56860	1,30	0,77	1,95	0,92
D6	G01	Sulfotransferase , RAR047	At5g07010	1,23	0,17	2,98	1,30
D6	F12	Tryptophan synthase beta subunit	At5g54810	0,94	0,36	2,01	0,75
D2	E03	PGP4, EST	At2g47000	1,54	0,60	2,41	0,94
D6	C11	Hydroxyproline-rich protein	At2g14890	1,48	1,10	0,52	0,08
D4	C03	GLYOX-II.1	At2g43430	1,24	0,88	0,35	0,10
D4	B12	GSH-POX7	At3g63080	1,25	1,39	0,45	0,08
D2	F08	GSTF11	At3g03190	0,64	0,39	0,52	0,08
D2	H10	GSTF4	At1g02950	0,58	0,60	0,51	0,19
D2	G02	GSTT1	At5g41210	1,07	0,48	0,37	0,21
D2	H04	GSTU6	At2g29440	0,61	0,43	0,54	0,17
D3	D09	CYP706A4	At4g12300	1,17	0,31	0,43	0,02
D3	D12	CYP706A7	At4g12330	1,74	0,90	0,47	0,25
D3	E01	CYP708A2	At5g48000	0,78	0,71	0,35	0,12
D3	A07	CYP71B28	At1g13090	1,29	0,59	0,52	0,07
D3	A04	CYP71B7	At1g13110	1,08	0,94	0,39	0,38
D3	B02	CYP72A14	At3g14680	1,03	0,80	0,44	0,20
D4	A05	CYP79A2	At5g05260	1,12	0,89	0,31	0,09
D4	A06	CYP79B2	At4g39950	0,78	0,48	0,45	0,08
D3	C11	CYP81H1	At4g37310	1,58	1,39	0,51	0,13
D3	D04	CYP83B1	At4g31500	1,70	1,24	0,31	0,07
D3	E03	CYP98A8	At1g74540	0,90	0,67	0,19	0,08
D3	E04	CYP98A9	At1g74550	1,46	0,81	0,30	0,14
D3	F02	β -Glucosidase	At1g66270	0,58	0,42	0,45	0,28
D4	G11	UGT71C1	At2g29750	1,29	0,50	0,42	0,03
D1	D06	UGT74B1	At1g24100	1,26	0,90	0,19	0,03
D1	D05	UGT74D1	At2g31750	1,17	0,99	0,49	0,19
D1	H02	UGT85A5	At1g22370	0,96	0,81	0,51	0,26
D1	E06	UGT86A1	At2g36970	0,89	0,55	0,34	0,14
D2	C03	GCN3	At1g64550	1,02	0,23	0,45	0,25
D2	C02	AOH1	At2g41700	0,91	0,29	0,45	0,32
D2	B03	MRP5	At1g04120	0,86	0,73	0,40	0,15
D2	C01	WBC3	At2g28070	0,65	0,28	0,53	0,23

Tab. 7.4: Überlappungen von Genen nach 5 Stunden NaCl- bzw. Sorbitol-Behandlung in Blättern

PLAT-TE	POS.	Gen	Gencode	BN 5h	SD	BS 5h	SD
D5	A02	RD29A	At5g52310	2,80	1,16	1,57	0,78
D6	G11	Vegetative storage protein VSP	At5g24780	2,54	1,45	1,16	0,20
D6	F09	Anthranilate synthase alpha subunit	At5g05730	2,76	2,22	1,06	0,21
D5	D10	Germin-like protein 1	At1g72610	0,36	0,14	0,70	0,23
D5	D11	Germin-like protein 3a	At5g20630	0,43	0,12	0,65	0,23

D4	E06	Proline-rich protein	At2g45180.1	0,41	0,02	0,69	0,16
D5	B10	Neutral peroxidase, PRXCB	At3g49120	2,02	0,79	2,36	1,97

Tab. 7.5: Überlappungen von Genen nach 24 Stunden NaCl- bzw. Sorbitol-Behandlung in Blättern

PLAT-TE	POS.	Gen	Gencode	BN 24h	SD	BS 24h	SD
D5	F04	4-coumarate:CoA ligase	At1g51680	2,01	1,10	1,56	1,02
D6	G12	Blue light photoreceptor/ photolyase homolog, PHH1	At1g04400	2,78	0,04	1,35	1,17
D4	C04	GLYOX-II.2	At3g10850	2,08	0,78	1,34	0,55
D4	B06	GSH-POX1	At4g11600	2,42	1,02	1,67	0,62
D2	F05	GSTF10	At2g30870	2,02	0,74	1,67	0,17
D2	F04	GSTF6	At1g02930	2,93	1,10	1,74	0,29
D6	G11	Vegetative storage protein VSP	At5g24780	2,03	1,02	1,52	0,76
D6	A05	Starch metabolism involved protein (potato)	At1g10760	2,46	1,43	1,94	1,03
D3	B06	CYP73A5, C4H	At2g30490	2,26	1,39	1,11	0,82
D1	A05	UGT72B1	At4g01070	2,49	0,49	1,58	0,30
D1	C04	UGT75C1	At4g14100	3,60	1,96	1,53	0,52
D6	H11	UGT84A3	At4g15490	2,26	0,30	1,14	0,56
D2	C11	GCN1, EST	At5g60790	2,24	0,95	1,16	0,29
D6	B01	Alternative oxidase	At3g22370	1,96	0,46	2,33	1,58
D6	C01	PR-2, 1,3-beta-glucanase	At3g57260	2,77	1,60	4,74	5,36
D6	D08	Proteinase inhibitor (similar to Glycine max), PIN1	At5g47550	4,58	1,39	2,35	0,58
D5	A02	RD29A	At5g52310	2,18	1,83	2,65	1,86
D4	C06	GLYOX-II.4	At1g53580	2,37	0,97	2,40	1,29
D2	F04	GSTF6*	At1g02930	2,93	1,10	1,74	0,29
D2	G05	GSTF7	At1g02920	2,96	1,75	3,13	0,49
D2	H06	GSTF12	At5g17220	2,04	0,43	1,97	0,57
D3	B11	CYP81D1	At5g36220	2,75	1,61	2,00	1,06
D5	D10	Germin-like protein 1	At1g72610	0,33	0,14	0,31	0,21
D6	D04	AIG2-like protein	At3g28940	1,25	0,24	2,28	0,64
D2	F03	GSTF2	At4g02520	1,35	0,89	2,08	0,31
D2	G09	GSTF3*	At2g02930	n.d.	n.d.	1,43	0,91
D6	F02	Flavanone-3-hydroxylase, F3H	At3g51240	1,77	1,63	2,28	1,04
D4	E05	ubiquitin-conjugating enzyme 8 (UBC8)	At5g41700.1	1,72	0,47	2,04	0,51
D1	C11	UGT84A2	At3g21560	1,22	0,23	0,51	0,18

Tab. 7.6: Überlappungen von Genen nach 48 Stunden NaCl- bzw. Sorbitol-Behandlung in Blättern

PLAT-TE	POS.	Gen	Gencode	BN 48h	SD	BS 48h	SD
D6	B12	PR1	At2g14610	2,26	1,10	1,60	0,70
D6	B03	Catalase	At1g20620	2,88	0,52	1,80	0,49
D2	G11	GSTZ1	At2g02390	2,96	2,62	1,82	0,39
D6	G11	Vegetative storage protein VSP	At5g24780	2,44	1,23	1,24	0,36
D5	B09	Blue copper binding protein	At5g20230	1,99	0,98	1,46	0,56
D6	F09	Anthranilate synthase alpha subunit	At5g05730	2,50	1,60	1,23	0,46
D3	B06	CYP73A5, C4H	At2g30490	2,14	0,77	1,81	0,49
D1	D12	UGT76E2	At5g59590	2,18	1,31	1,10	0,23
D5	B10	Neutral peroxidase, PRXCB	At3g49120	3,67	2,31	2,87	1,11
D6	C01	PR-2, 1,3-beta-glucanase	At3g57260	3,01	1,57	2,65	0,09
D5	A02	RD29A	At5g52310	2,08	0,58	2,95	0,74
D4	C06	GLYOX-II.4	At1g53580	2,86	1,80	3,39	1,29
D4	B06	GSH-POX1	At4g11600	3,18	2,09	2,66	0,96
D1	B01	UGT73C5	At2g36800	2,34	0,38	2,88	2,63
D1	C12	UGT74F2	At2g43820	4,91	5,07	2,02	1,23
D1	C04	UGT75C1	At4g14100	2,55	0,56	2,40	0,51
D5	D10	Germin-like protein 1	At1g72610	0,50	0,03	0,27	0,18
D6	B01	Alternative oxidase 1A	At3g22370	1,72	0,68	2,10	0,46
D6	D08	Proteinase inhibitor (similar to Glycine max), PIN1	At5g47550	1,74	0,23	3,13	1,60
D5	A01	CCH- copper chaperone, ATX1	At3g56240	1,54	0,11	1,96	0,23
D6	A11	EDS1, Lipase, R gene	At3g48090	0,61	0,43	1,95	1,40
D4	B04	GSH-RED1	At3g54660	1,32	0,60	1,99	0,93
D2	F05	GSTF10	At2g30870	1,36	0,36	2,96	0,55
D2	F03	GSTF2	At4g02520	1,55	0,52	2,59	0,51
D2	G09	GSTF3*	At2g02930	1,00	0,24	1,55	0,29
D2	F04	GSTF6	At1g02930	1,66	0,66	2,58	1,04
D2	G05	GSTF7	At1g02920	1,84	0,45	3,76	0,35
D2	F10	GSTU19	At1g78380	1,30	0,10	2,57	0,39
D6	E10	Delta-12 desaturase, Fad2	At3g12120	1,92	0,47	2,37	1,18
D3	A07	CYP71B28	At1g13090	1,90	0,59	2,12	0,67
D3	A03	CYP71B6	At2g24180	1,61	0,38	2,47	1,91
D3	A09	CYP72A8	At3g14620	1,57	0,04	2,21	0,03
D3	B08	CYP76C2	At2g45570	1,50	0,30	2,37	1,09
D1	A05	UGT72B1	At4g01070	1,91	0,94	2,26	1,43
D6	B05	Chloroplastic FeSOD	At4g25100	1,04	0,43	0,44	0,19
D6	G02	Omega-3-desaturase, FAD7	At3g11170	0,62	0,39	0,53	0,28
D1	B12	UGT75D1	At4g15550	1,10	0,10	0,48	0,16

Tab. 7.7: Überlappung von Genen in Wurzeln und Blättern, die sowohl bei NaCl- als auch bei Sorbitolstress nach 5 Stunden reagierten

PLAT-TE	POS.	Gen	Gencode	WN 5h	SD	WS 5h	SD	BN 5h	SD	BS 5h	SD
D6	G03	Allene oxide synthase	At5g42650	2,37	1,72	2,09	1,71	1,30	0,12	1,17	0,60
D5	B11	Basic chitinase CHI1	At3g12500	2,12	0,83	3,99	2,55	0,92	0,01	0,93	0,63
D5	E10	COMT	At5g54160	2,08	0,83	2,13	0,82	1,12	0,20	0,95	0,05
D5	D12	Germin-like protein 4	At1g18970	5,39	5,23	2,67	1,78	1,22	0,41	1,09	0,32
D5	H10	pEARL11	At4g12480	2,48	0,85	2,27	1,42	0,76	0,17	0,91	0,06
D6	F03	Pre-hevein-like protein (similar to PR 4)	At3g04720	2,25	1,13	2,01	1,81	1,00	0,39	0,84	0,32
D6	H04	RAD1, Nucl. excision repair XP-F homolog	At5g41150	2,49	1,38	2,71	2,34	1,05	0,13	1,01	0,14
D4	C06	GLYOX-II.4	At1g53580	2,12	0,37	2,14	1,67	1,84	0,07	1,57	0,23
D4	B06	GSH-POX1	At4g11600	6,81	5,80	3,77	1,74	1,17	0,46	1,44	0,48
D2	F03	GSTF2*	At4g02520	1,90	1,23	2,16	1,55	0,89	0,39	0,80	0,23
D2	G09	GSTF3	At2g02930	2,85	1,78	2,67	1,56	0,90	0,19	1,20	once!!
D2	F04	GSTF6	At1g02930	10,92	9,39	14,12	14,77	1,18	0,11	1,22	0,23
D2	G05	GSTF7	At1g02920	6,89	2,09	7,61	5,25	1,18	0,37	1,14	0,38
D2	G08	GSTU9	At5g62480	3,24	2,86	2,50	1,79	0,71	0,08	1,12	once!!
D2	G11	GSTZ1	At2g02390	2,59	1,08	2,95	2,19	0,84	0,01	1,29	0,11
D6	G04	Serine threonine kinase	At1g21250	5,01	2,24	5,60	6,24	1,30	0,02	1,18	0,71
D3	D07	CYP706A2	At4g22710	3,83	1,69	2,12	2,02	1,02	0,25	1,36	0,25
D3	A03	CYP71B6	At2g24180	5,30	2,80	4,04	4,49	1,34	0,31	1,27	0,13
D3	B06	CYP73A5, C4H	At2g30490	2,79	1,05	2,57	2,17	0,99	0,68	1,33	0,07
D3	C10	CYP81F4	At1g65190	4,56	1,46	2,54	1,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D2	C10	ATM3, EST	At5g58270	3,86	2,50	2,06	1,02	0,86	0,02	1,16	0,14
D2	C06	MRP11	At1g30420	2,45	1,57	2,42	1,98	1,33	0,44	1,52	0,36
D2	C07	PDR11	At3g53480	2,73	0,74	2,31	1,98	0,98	0,08	1,18	once!!
D5	A02	RD29A	At5g52310	6,46	5,87	3,40	2,76	2,80	1,16	1,57	0,78
D5	G01	Ethylene responding factor ERF1	At5g61590	0,48	0,26	0,42	0,07	1,05	0,32	0,89	0,33
D5	B10	Neutral peroxidase, PRXCB	At3g49120	1,87	0,40	2,16	0,74	2,02	0,79	2,36	1,97

Tab. 7.8: Überlappung von Genen in Wurzeln und Blättern, die sowohl bei NaCl- als auch bei Sorbitolstress nach 24 Stunden reagierten

PLAT-TE	POS.	Gen	Gencode	WN 24h	SD	WS 24h	SD	BN 24h	SD	BS 24h	SD
D5	B11	Basic chitinase	At3g12500	4,68	0,92	5,15	5,21	0,73	0,06	1,06	0,13
D5	D12	Germin-like protein 4	At1g18970	3,78	2,13	5,57	5,08	0,99	0,87	0,84	0,17
D2	F03	GSTF2	At4g02520	6,64	4,56	2,52	1,42	1,35	0,89	2,08	0,31
D2	G09	GSTF3	At2g02930	3,17	1,54	1,97	0,47	n.d.	n.d.	1,43	0,91
D2	F04	GSTF6	At1g02930	3,13	1,59	3,32	1,87	2,93	1,10	1,74	0,29
D2	G05	GSTF7	At1g02920	3,19	2,37	9,19	7,38	2,96	1,75	3,13	0,49
D6	B01	Alternative oxidase	At3g22370	0,77	0,32	1,31	0,60	1,96	0,46	2,33	1,58
D6	C01	PR-2, 1,3-beta-glucanase	At3g57260	1,16	0,34	0,95	once!!	2,77	1,60	4,74	5,36
D6	D08	Proteinase inhibitor (similar to Glycine max), PIN1	At5g47550	1,21	0,46	1,19	0,29	4,58	1,39	2,35	0,58
D5	A02	RD29A	At5g52310	1,53	0,11	0,95	0,05	2,18	1,83	2,65	1,86
D4	C06	GLYOX-II.4	At1g53580	1,81	0,12	1,00	0,33	2,37	0,97	2,40	1,29
D2	H06	GSTF12	At5g17220	1,67	once!!	1,15	once!!	2,04	0,43	1,97	0,57
D3	B11	CYP81D1	At5g36220	1,44	once!!	1,41	once!!	2,75	1,61	2,00	1,06
D5	D10	Germin-like protein 1	At1g72610	1,42	0,52	1,36	0,68	0,33	0,14	0,31	0,21

Tab. 7.9: Überlappung von Genen in Wurzeln und Blättern, die sowohl bei NaCl- als auch bei Sorbitolstress nach 48 Stunden reagierten

PLAT-TE	POS.	Gen	Gencode	WN 48h	SD	WS 48h	SD	BN 48h	SD	BS 48h	SD
D5	B11	Basic chitinase, CHI1	At3g12500	5,44	4,17	6,98	3,81	1,18	0,01	1,47	0,46
D6	C04	Beta - glucanase 3 (similar to Glycine max); BG3	At3g57240	2,15	1,36	2,73	0,95	1,22	0,16	1,15	0,10
D6	D04	AIG2-like protein	At3g28940	2,37	1,74	3,33	0,51	1,05	0,04	1,84	0,88
D5	D12	Germin-like protein 4	At1g18970	3,46	1,47	3,31	0,69	1,24	0,16	1,28	0,35
D4	E09	serine/threonine kinase- like protein	At4g23220.1	2,33	1,58	2,08	0,30	1,16	0,21	1,24	0,30
D2	D09	MRP3	At3g13080	3,03	1,91	5,77	5,93	1,10	0,28	1,10	0,00
D2	D04	PDR8, EST	At1g59870	2,00	1,79	2,59	2,83	1,31	0,40	1,74	0,17
D2	F03	GSTF2	At4g02520	6,00	5,64	2,30	0,17	1,55	0,52	2,59	0,51
D2	G09	GSTF3	At2g02930	4,60	3,86	2,55	0,47	1,00	0,24	1,55	0,29
D2	F04	GSTF6	At1g02930	5,14	3,19	4,70	4,26	1,66	0,66	2,58	1,04
D2	G05	GSTF7	At1g02920	4,08	3,52	15,13	5,93	1,84	0,45	3,76	0,35
D3	C10	CYP81F4	At1g65190	3,36	0,27	0,31	0,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

D6	A03	Adenine phosphoribosyl transferase	At1g27450	0,47	0,22	0,50	0,03	0,83	0,10	0,87	0,17
D4	B03	GSTU27	At3g43800	0,52	0,27	0,51	0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D2	A06	PDR6	At2g36380	0,40	0,13	0,50	0,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D1	A11	UGT71B3P	At4g15270	0,44	0,05	0,50	0,05	0,96	0,16	1,16	0,12
D1	A02	UGT72D1	At2g18570	0,50	0,37	0,39	0,09	1,04	0,08	0,92	0,04
D5	B10	Neutral peroxidase, PRXCB	At3g49120	3,29	2,21	1,75	0,85	3,67	2,31	2,87	1,11
D6	C01	PR-2, 1,3-beta-glucanase	At3g57260	1,12	0,20	2,21	1,90	3,01	1,57	2,65	0,09
D5	A02	RD29A	At5g52310	1,03	0,20	2,18	0,44	2,08	0,58	2,95	0,74
D4	C06	GLYOX-II.4	At1g53580	2,80	1,88	0,80	0,40	2,86	1,80	3,39	1,29
D1	C12	UGT74F2	At2g43820	2,22	1,56	0,55	0,18	4,91	5,07	2,02	1,23
D1	B01	UGT73C5	At2g36800	0,44	0,34	0,82	0,36	2,34	0,38	2,88	2,63
D4	B06	GSH-POX1	At4g11600	1,84	0,73	1,44	0,78	3,18	2,09	2,66	0,96
D1	C04	UGT75C1	At4g14100	1,41	once!!	n.d.	n.d.	2,55	0,56	2,40	0,51
D5	D10	Germin-like protein 1	At1g72610	2,22	1,35	1,30	0,27	0,50	0,03	0,27	0,18

Angegeben sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche und die Standardabweichung. Ein „once“ in der Standardabweichung bedeutet, dass die Induktion/Repression nur in einer der drei Wiederholungen gemessen wurde, „n.d.“ bedeutet, dass in keinem Experiment eine Expression dieses Gens in der Kontrolle oder der Behandlung gemessen wurde. Falls nicht gesondert darauf hingewiesen wird, enthielten Platten D1-D4 Gen-spezifische Sonden, Platten D5 und D6 EST-Sonden. * Da die Sonde für *GSTF3* mit *GSTF2* und die Sonde für *GSTF7* mit *GSTF6* kreuzreagieren kann, wurden bei diesen Genen die Induktionen der potenziell kreuzreagierenden Sonden aufgelistet.

7.4 Reaktionen von SODs auf NaCl- und Sorbitolstress

Reaktionen der SODs in Wurzeln

PLATTE	POS.	Gen	MIPS Atg-Code	WN5h MW	SD	WN24h MW	SD	WN48h MW	SD	WS5h MW	SD	WS24h MW	SD	WS48h MW	SD
D6	B04	Cytosolic Cu/Zn SOD	At1g08830	0,89	0,06	1,00	0,21	4,64*	4,82	0,88	0,09	1,03	0,11	1,24	0,04
D6	B05	Chloroplasmic FeSOD	At4g25100	1,29	0,47	1,07	0,88	1,86	1,31	0,96	0,12	1,81	0,60	1,70	0,54
D5	C03	MnSOD	At3g10920	1,09	0,31	1,11	0,26	1,47	0,49	1,16	0,24	0,85	0,30	0,77	0,11

Reaktionen der SODs in Blättern

PLATTE	POS.	Gen	MIPS Atg-Code	BN5h MW	SD	BN24h MW	SD	BN48h MW	SD	BS5h MW	SD	BS24h MW	SD	BS48h MW	SD
D6	B04	Cytosolic Cu/Zn SOD	At1g08830	0,84	0,07	0,97	0,41	0,85	0,26	1,00	0,36	1,20	0,35	0,74	0,06
D6	B05	Chloroplasmic FeSOD	At4g25100	0,85	0,26	1,32	0,47	1,04	0,43	0,92	0,33	0,97	0,34	0,44	0,19
D5	C03	MnSOD	At3g10920	1,02	0,16	1,29	0,32	0,91	0,01	0,96	0,17	1,11	0,25	0,90	0,24

Angegeben sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche und die Standardabweichung. * Die Induktion dieses Gens ist nicht gesichert, da sie nur in einer Wiederholung gemessen wurde.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Anton R. Schäffner für die Betreuung meiner Arbeit am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit sowie die immerwährende Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Patrick Cramer danke ich für das Anfertigen des zweiten Gutachtens dieser Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Heidrun Gundlach und Klaus F. X. Mayer (MIPS, GSF) bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Datenbank-Analysen zur Herstellung der Gen-spezifischen Sonden.

Ein Dankeschön geht auch an Dr. Gerhard Welzl (IBB, GSF) für die Durchführung der statistischen Analysen.

Ich bedanke mich auch bei Sabine Steiner-Lange (MPI für Züchtungsforschung in Köln) für die Hilfestellungen bei der Isolierung der Insertionsmutante.

Sebastian Kloska (MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm) danke ich für die Benutzung der „Haruspex“-Datenbank.

Oliver Thulke (BIOP, GSF), Sabine Glombitza (BIOP, GSF), Felix Mauch (Institute de Biologie Végétale, Université Fribourg), Enrico Martinoia (Laboratoire de physiologie végétale, Université de Neuchâtel) und Danièle Werck-Reichhart (Institute of Plant Molecular Biology, Strasbourg) danke ich für die Bereitstellung der Gensonden.

Ein ganz besonderer Dank geht an die „Mannschaft“ der Arbeitsgruppe Schäffner: Burkhard Messner, Oliver Thulke, Elisabeth Schindler, Elke Gerstner, Susanna Holzinger, Chuanfeng Zhu, Robert Fischbach und Henrik Buschmann danke ich für Ihre hohe Akzeptanz für den „Quoten-Österreicher“, ihre vielen hilfreichen Tipps und die schöne Zeit im Labor. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Birgit Geist, die mit Ihrer humorvollen Art und steten Hilfsbereitschaft den Laboralltag entscheidend erleichtert hat.

Allen Arbeitskollegen des Instituts für Biochemische Pflanzenpathologie danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Sabine Glombitza, die mit Ihrer fachlichen Kompetenz, offenen und herzlichen Art sowie ihrem motivierenden Engagement einen Grossteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Heidi und Renate danke ich für die Korrektur des Manuskripts.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern und meinen Geschwistern Nikola und Simon, sowie meinen Freunden Edgar, Maria, Heidi und Renate, die mir in jeder Situation zur Seite standen und mich immer unterstützen. Thomas danke ich für die Pflege meiner Psychohygiene.

Zu guter letzt danke ich meiner Großtante Laura, die in meinem Herzen immer einen ganz besonderen Platz einnehmen wird.

Name Affenzeller Matthias
Geburtsdatum/Ort 10.04.1973 in Linz/OÖ
Staatsbürgerschaft Österreich

Schulausbildung

1979-1983 Volksschule Linz
1983-1991 BRG Auhof, naturwissenschaftlicher Zweig
1991 Matura

Studium

1991 Beginn des Studiums der Biologie (Studienzweig Botanik), Universität Salzburg
1994 1. Diplomprüfung
1996-1998 Diplomarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie bei Prof. Friedrich-Wilhelm Bentrup mit dem Thema „Molekularbiologische Untersuchungen an der vakuolären Pyrophosphatase aus einer heterotrophen Zellsuspensionskultur von *Chenopodium rubrum* L.“
11/1998 2. Diplomprüfung

Zivildienst

1998-1999 LKA Salzburg in einem Speziallabor (PCR-Diagnose) bei Dr. Barbara Kofler

Promotion

Seit 06/1999 Anfertigung der Dissertation am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, München-Neuherberg
Betreuung: PD Dr. Anton R. Schäffner

Publikation

Baiges, I., Schäffner, A.R., Affenzeller, M.J. and Mas, A. (2002) Plant aquaporins. *Physiol. Plant.* 115, 175-182