

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Pflanzenmaterial

###### 3.1.1.1. *Mesembryanthemum crystallinum* L. (Eiskraut)

*M. crystallinum* L. kommt in der namibischen Wüste in Südafrika vor. Sie gehört zu der Familie der *Aizoaceae*, (Ordnung der *Caryophyllales*) und ist eine fakultative CAM-Pflanze (Winter *et al.*, 1978). Bei CAM-Induktion kodiert *M. crystallinum* eine cDNA der PPDK für ein Enzym von 94 kDa im aktiven Zustand (Fißlthaler, 1993). Es wird in das Stroma der Chloroplasten importiert (Winter *et al.*, 1982; Kondo *et al.*, 1998).

###### 3.1.1.2. *Nicotiana tabacum* L. (Tabak)

Die transgenen Tabaklinien wurden durch Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* von Sheriff (1994) und Stenzel (1997) hergestellt. Die transgenen Tabakpflanzen exprimieren die cDNA der Pyruvat, Phosphat Dikinase aus *M. crystallinum* in einen binären Expressionsvektor (Bevan, 1984). Sheriff (1994) überexprimierte das Gen für PPDK unter der Kontrolle des 35S Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV). Der 35S Promotor ist stark, konstitutiv und gewebeunspezifisch. Er ist gut charakterisiert (Benfy und Chua, 1990; Fang *et al.*, 1989; Odell *et al.*, 1985; Ow *et al.*, 1987; Lam, 1994) und für die Genexpression in monocotyledonen und dicotyledonen Pflanzen extensiv genutzt worden. In weiteren Konstrukten wurde der für die Chloroplastenerkennungssequenz kodierende Bereich deletiert, so dass auf diese Weise exprimierte PPDK sich im Cytosol befinden sollte.

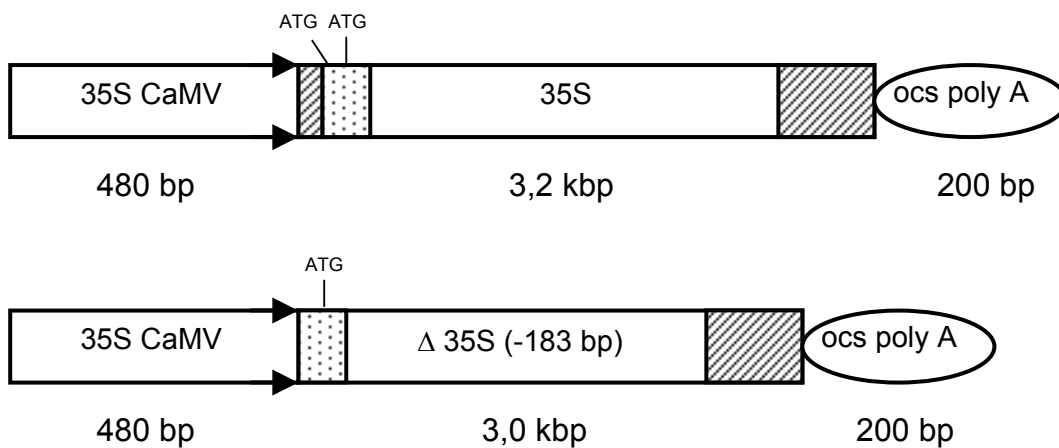
Um eine spezifische Expression der PPDK in Wurzeln zu erreichen, wurde die Expression unter der Kontrolle des wurzelspezifischen Promotors B33 durchgeführt

(Stenzel, 1997). B33 ist ein Promotor des Class I Patatin Gens aus Kartoffeln (Rocha-Sosa, *et al.*, 1989).

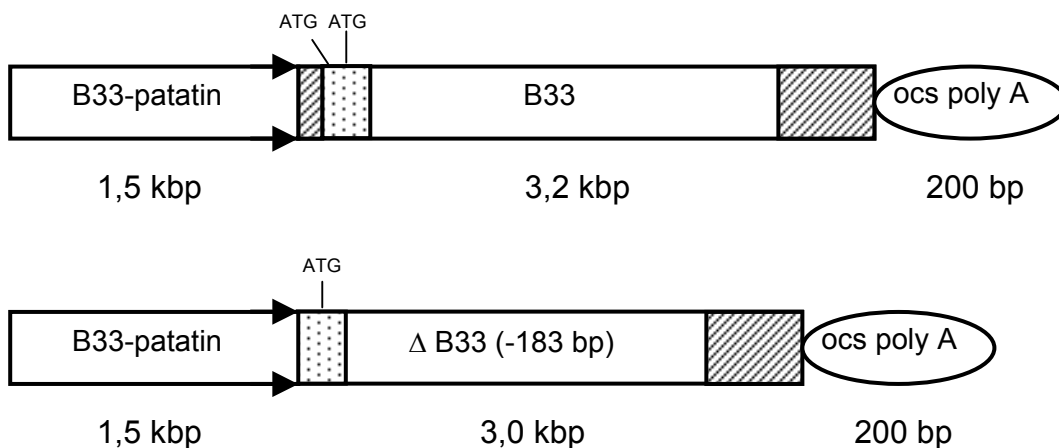
Für die Untersuchungen wurden WT- bzw. transgene Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. var. Samsun NN (SNN)) eingesetzt.

Die [Abb. 3-1](#) zeigt die schematische Darstellung der für die Transformation verwendeten Konstrukte mit den entsprechenden Promotoren.

A)



B)



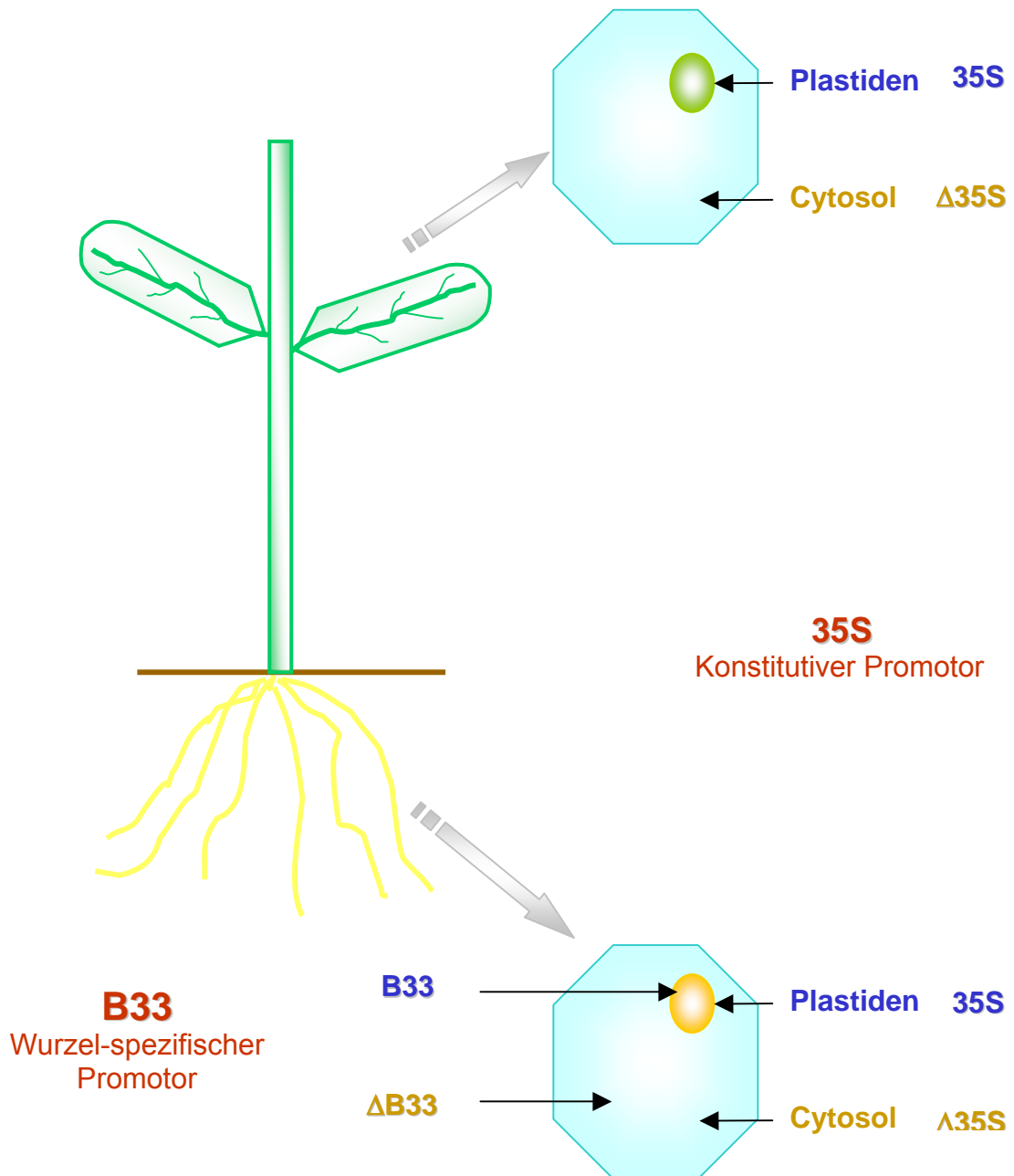
**Abb. 3-1:** Schematische Darstellung der cDNA-Konstrukte der PPDK.

A) Expression unter der Kontrolle des 35S Promotors.

B) Expression unter der Kontrolle des B33 Promotors.

Bei den mit  $\Delta$  PPDK gekennzeichneten Konstrukten wurde die Chloroplastenerkennungssequenz von 183 bp deletiert, um die PPDK im Cytosol über zu exprimieren. Die 5' (links) und 3' (rechts) untranslatierten Bereiche der cDNA sind als schraffierte Boxen dargestellt. Die gepunktete Box stellt die Chloroplastensignalsequenz mit dem ATG-Startcodon dar.

In [Abb. 3-2](#) ist die Expression der PPDK in der Pflanze in Abhängigkeit von dem verwendeten Konstrukt dargestellt.



**Abb. 3-2:** Organ und Zellkompartiment spezifisches „targeting“ der PPDK.

### 3.1.2. Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungen die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, hatten den Reinheitsgrad *p. a.* (pro analysi). Im Anhang 8.2 befindet sich die detaillierte Chemikalienliste.

### 3.1.3. Proteine

Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Casein	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt

### 3.1.4. Labormaterialien

Hybridization transfer membranes (Hybond™-N)	Amersham Biosciences, Freiburg
Nitrozellulose Membrane (Hybon™-c extra)	Amersham Biosciences, Freiburg
Petri-Schalen (Tissue culture dishes)	Greiner Labortechnik, Essen
Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP)	Amersham Biosciences, Freiburg
Sterile Plastikartikel	Falcon, Vertrieb durch Merck
Wathmann 3 MM	Whatman, Maidstone, UK

### 3.1.5. Geräte

Agarose-Elektrophorese Kammern	Eigenbau der Werkstatt der FU-Berlin
Binoculare Mikroskope	Leica ATC 2000, Germany
Brutschränke (UM400)	Memmert GmbH, Germany
Digitale Kamera	Olympus AX70 TRR-AF1
Eismaschine	Ziegra, Germany
Hybridisierungssofen (OV10)	Biometra, Germany

Magnetrührer (Drehzahl Electronic)	IKA Labortechnik, Germany
(MonoDirect)	H+P Labortechnik AG, Germany
(MR 3001)	Heidolph, Germany
Mikrowelle (Privileg)	Grossversandhaus Quelle, Germany
pH-Meter	Knick, Berlin
Protein-Gelelektrophorese- Apparaturen	Eigenbau der Werkstatt der FU-Berlin
Schüttler (KS 10)	Edmund Bühler. Tübingen
Spannungsgeräte (Electrophoresis Powersupply PHERO-stab. 300)	Biotec-Fischer, Germany
Spectralphotometer (Novaspec® II)	Pharmacia LKB Biochrom. England
(Ultrospec II 4050)	Pharmacia LKB Biochrom. England
Sterilbank	Gelaire, Germany
Strahlungsmessgerät (LB1210B)	Berthold, Germany
Tank-Blot-Kammer (2005Transphor Electroblotting Unit, Power Supply)	Pharmacia LKB Bromma, England
Thermostat (Blockthermostat BT 100)	Kleinfeld Labortechnik, Germany
(Thermostatplus)	Eppendorf, Germany
UV-Transilluminator	UVP, Inc., U. S. A.
Video Graphic Printer (UP-890CE)	Sony, Japan
Vortex	IKA Labortechnik, Germany
Wasserbäder (3042)	Köttermann, Germany
(Minitherm S)	Dinkelberg Labortechnik, Germany
(10S)	GFL, Germany
Waagen (GT 480)	OHAUS, U. S. A.
(H110)	Sartorius, Germany
Zentrifugen (Biofuge 28 RS)	Hereaus Sepatech. Berlin, Germany
(Tischzentrifuge 5415 C)	Eppendorf, Germany
(Zentrifuge 2K15)	Sigma, Daisenhof

### 3.1.6. Radioaktives Material

$\alpha$ <sup>32</sup>P-dCTP, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/mL

Hartmann Analytic GmbH

### 3.1.7. Enzyme und Kitsysteme

#### 3.1.7.1. Enzyme

Restriktionsendonucleasen

Boehringer Mannheim, Mannheim

#### 3.1.7.2. Kitsysteme

Citronensäure UV-Test

Boehringer Mannheim/R-Biopharm

HexaLabel Plus™ DNA Labeling Kit

MBI Fermentas, USA

L-Malic acid UV-Test

Boehringer Mannheim/R-Biopharm

Plasmidisolierungskit NucleoSpin®

Macherey & Nagel

Plasmid Midi Kit (25)

Quiagen, Hilden

### 3.1.8. Antikörper

Anti-PPDK

Schmitt *et al.*, 1989

Anti-PEPC

Höfner *et al.*, 1987

Anti-RUBISCO

Schmitt (unpublizierte Daten)

Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase (Anti-GAR-AP)

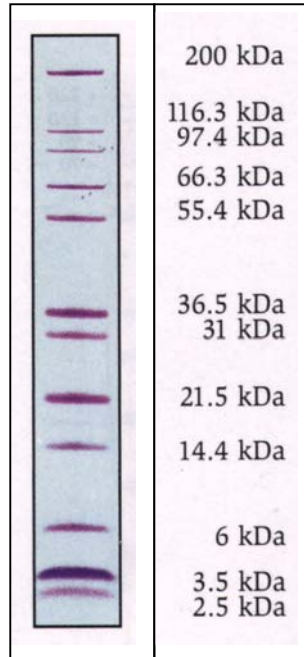
Bio Rad

### 3.1.9. Größenstandards

#### 3.1.9.1. Protein-Marker

„Mark 12™ Unstained Standard“

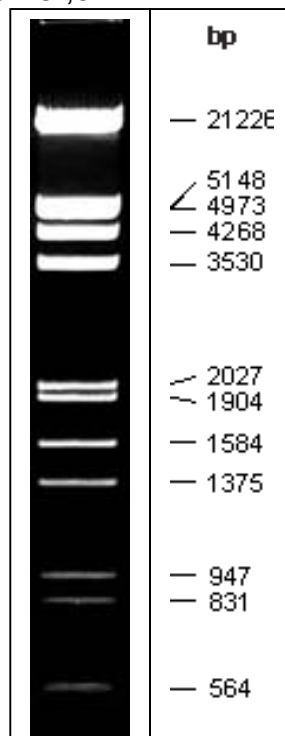
Invitrogen



#### 3.1.9.2. DNA-Marker

„Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker,3“

MBI Fermentas



### 3.1.10. Bakterienstämme

#### 3.1.10.1. *Escherichia coli*

XL1-Blue                      recA1,endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac,  
(F<sup>'</sup>proAB, lacI<sup>q</sup>ZDM15, Tn10(tet<sup>r</sup>)) (Bullock *et al.*, 1987).

#### 3.1.10.2. *Agrobacterium tumefaciens*

pGV 2260                      C58C1, Rif<sup>r</sup>, Cb<sup>r</sup> (Deblaere *et al.*, 1985).

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Proteinchemische und immunologische Methoden

#### 3.2.1.1. Isolierung von Gesamt-Protein aus Tabakpflanzen

Das Pflanzematerial wurde mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Alle weiteren Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Von diesem Pulver wurde 1 g mit 2 mL Homogenisationspuffer versetzt, gut gemischt und bei 4 °C und 14 000 Upm für 10 Minuten abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit 500 µL Phenol und 1 % β-Mercaptoethanol 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation, unter gelegentlichem Schütteln, wurde bei 4 °C für 5 Minuten bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die untere Phenolphase wurde in ein neues Reagenzglas überführt und mit 1,25 mL Ethanol:Glycerin (95:5, v/v) und 20 µL 75 mM Ammoniumacetat versetzt. Die Fällung der Proteine erfolgte über Nacht bei –20 °C. Nach der Proteinfällung wurde die Probe durch 15 Minuten Zentrifugation bei 14.000 Upm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde



verworfen und das Pellet wurde mit 1 mL Ethanol:Glycerin (95:5) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100  $\mu$ L Probenpuffer und 2  $\mu$ L 5 mM Jodacetamid bei 100 °C für 5 Minuten aufgekocht. Abschließend wurden die Proben mit 5  $\mu$ L 5 mM DTT reduziert und der Proteinextrakt für die Gelelektrophorese verwendet (Höfner *et al.*, 1989).

#### Homogenisationspuffer

250 mM	HEPES/Tris pH=8
2 mM	DTT*
5 mM	$\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure
1 mM	Benzamidin
20 mM	Leupeptin
1 mM	PMSF*
1mM	PVP-40
1 mM	Natriumdithionit

\*Diese Substanzen wurden dem Puffer aus Stammlösungen zugesetzt.

DTT Stammlösung: 0,5 M in Wasser (bei – 20 °C gelagert)

PMSF Stammlösung: 0,1 M in Isopropanol (bei – 20 °C gelagert)

#### Probenpuffer

0,125 M	TRIS/HCl pH=6,8
0,025%	Bromphenolblau (w/v)
5%	SDS
4 M	Harnstoff

### 3.2.1.2. Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gehalts an löslichem Protein erfolgte mit Amidoschwarz nach einem modifizierten Protokoll nach Zlatanova *et al.* (1994). Die Proteinproben wurden in Probenpuffer aufgenommen, gekocht und je 5  $\mu$ L Probe wurden mittels Dot-Blot auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Die Membranen wurden 5 Minuten mit Amidoschwarz gefärbt und zur Entfärbung drei mal 5 Minuten mit 50 %

Methanol (v/v) gewaschen. Identische Membranflächen mit den Proben bzw. Leerflächen wurden ausgeschnitten und der gebundene Farbstoff wurden mit 1 mL 25 mM Natriumhydroxid in 50 % Methanol (v/v) eluiert. Die Extinktion wurde am Photometer bei 640 nm gemessen. Die Eichung erfolgte durch BSA-Standards von 5-75 µg, die in gleicher Weise behandelt worden waren.

**Amidoschwarz-Färbelösung**

0,1%	Amidoschwarz Farbstoff (w/v)
30%	MeOH (v/v)
10%	Essigsäure (v/v)

**3.2.1.3. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Molekülmasse erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in vertikalen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Es wurden Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 12,5 % (w/v) im Trenngel und 3,96 % (w/v) im Sammelgel verwendet. Die Dicke des Gels war 1 mm, die Länge des Sammelgels ca. 0,8 cm und die Länge des Trenngels 7 cm. Die Gele setzen sich folgendermaßen zusammen:

**Sammelgel (Upper Gel)**

3,96%	Acrylamid
0,20 M	TRIS/HCl pH=6,8
0,1% (w/v)	SDS
0,05% (w/v)	APS
3 µL	TEMED-Stock

**Trenngel (Lower Gel)**

12,5% (w/v) Acrylamid  
0,38 M TRIS/HCl pH=8,8  
0,1% (w/v) SDS  
0,05% (w/v) APS  
3  $\mu$ L TEMED-Stock

Zusammensetzung der Stammlösungen:

Lower Gel Stock: 0,75 M Tris/HCl pH=8,8  
0,2% (w/v) SDS

Upper Gel Stock: 0,25 M Tris/HCl pH=6,8  
0,2 % (w/v) SDS

APS: 10% (w/v) in Wasser

TEMED-Stock 99%

Der Einlauf der Proben erfolgte über 2 Stunden bei 30 V und die weitere Proteintrennung erfolgte über 3-4 Stunden bei 120 V.

**SDS-PAGE Laufpuffer**

0,025 M TRIS (pH nicht eingestellt)  
0,192 M Glycin (w/v)  
0,1% (w/v) SDS

#### 3.2.1.4. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Mit Hilfe des Nasser-Transfer-Blot-Verfahrens (Towbin *et al.*, 1979) wurden Proteine aus dem Gel auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 0,1 A über Nacht bei 4 °C.

##### Western-Blot Puffer

0,025 M TRIS/pH=8,3  
0,192 M Glycin (w/v)  
20% MeOH (v/v)

#### 3.2.1.5. Ponceau S-Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose

Die Nitrozellulosemembran wurde nach beendetem Protein-Transfer für fünf Minuten in der Ponceau S-Färbelösung inkubiert, und anschließend kurz in Wasser geschüttelt, bis die Proteinbanden sichtbar waren. (Salinovitch und Montelaro, 1986). Durch mehrmaliges kurzes Schütteln in Wasser wurde der Hintergrund entfärbt.

##### Ponceau S-Färbelösung

0,2% Ponceau S (w/v)  
3% TCA (w/v)

#### 3.2.1.6. Immunologische Detektion durch spezifischer Antikörper

Die Membranen wurden für 1 h bei RT in Blockierungslösung auf dem Schüttler inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Nach dem Blockierungsschritt wurde die Membran dreimal 5 min in TBST (TBS + 0,05 % Tween) gewaschen. Über Nacht wurden die Membranen mit dem entsprechenden primären Antikörper in frisch angesetztem Inkubationspuffer bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen

für je 5 min bei RT in TBST entfernt. Dann wurden die Membranen 4 h bei RT auf dem Schüttler mit dem sekundäre Antikörper (1:1000 Verdünnung) inkubiert. An den sekundäre Antikörper ist die alkalische Phosphatase gekoppelt. Anschließend wurde die Membrane dreimal 5 min bei RT in TBST gewaschen.

**TBS-Puffer**

25 mM TRIS/HCl pH=7,0  
150 mM NaCl

**Blockierungslösung**

5% Magermilchpulver (w/v)  
0,1% Tween 20 (v/v)  
in TBS

**Inkubationspuffer für Antikörper**

0,2% Casein (w/v)  
0,1% Tween 20 (v/v)  
0,01% Natriumazid (w/v)  
in TBS

**Verdünnungen der Antikörper**

**Primärer Antikörper**

Anti-PPDK (Everl 13)	1:3000
Anti-PEPC (Klausl 3)	1:3000
Anti-RUBISCO (Hasimir)	1:4000

**Sekundärer Antikörper**

Anti-GAR-AP	1:1000
-------------	--------

### 3.2.1.7. Colorimetrischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase

Dieser Nachweis benutzt als chromogenes Substrat BCIP zusammen mit NBT. Die alkalische Phosphatase (AP) katalysiert die Abspaltung des Phosphatrestes von BCIP und wandelt es in das entsprechende Indoxylderivat um. Dieses wird durch NBT oxidiert und dimerisiert zu dem tiefblauen, unlöslichen Farbniederschlag Indigo (Sambrook und Russell, 2001).

Nach Inkubation mit einem AP-konjugierten sekundären Antikörper wurde die Membran drei Mal für 15 min bei RT in AP-Puffer äquilibriert. Die Reaktionslösung, die die Substrate NBT und BCIP enthält, wurde so lange auf den Membranen belassen, bis eine Färbung (dunkelblauer Niederschlag) sichtbar war. Die Reaktion wurde durch Spülen der Membran in Wasser abgestoppt.

#### AP-Puffer

100 mM Tris/HCl pH=9,5  
5 mM Magnesiumchlorid  
100 mM Natriumchlorid

#### Reaktionslösung für eine Membran

10 mL AP-Puffer  
33 µL BCIP Stock  
66 µL NBT Stock

Zusammensetzung der Stammlösungen:

BCIP Stock: 50 mg BCIP  
1 mL 100 % DMF

NBT Stock: 50 mg NBT  
1 mL 70 % DMF

### 3.2.2. Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren

#### 3.2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial wurde eine modifizierte Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) verwendet.

1 g Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach Zugabe von 4 mL Lysispuffer wurde das Lysat in Röhrchen überführt. Das Lysat wurde mit 4 mL Phenol und 2 mL Chloroform:IAA (24:1, v/v) vergesetzt. Anschließend wurde kräftig geschüttelt bis ein milchiger Niederschlag erschien. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 12.000 Upm und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt und mit 4 mL Phenol:Chloroform (1:1, v/v) extrahiert. Zur Trennung der Phasen wurde dann für 10 min bei 12.000 Upm zentrifugiert und der Überstand wurde mit 4 mL Chloroform ausgeschüttelt und die gelöste RNA nach erneuter Zentrifugation mit 4 mL Isopropanol über Nacht bei – 20 °C gefällt. Die Proben wurden bei 12.000 Upm für 10 min bei 4 °C pelletiert und in 1 mL DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die gelöste RNA wurde mit 3 mL EtOH:NaAcetat 3M pH= 5,2 (30:1, v/v) über Nacht bei - 20 °C wieder gefällt. Nach Sedimentation der RNA bei 12.000 Upm für 10 min bei 4 °C und wurde das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete RNA-Pellet wurde in 50 µL DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und bei – 80 °C aufbewahrt.

#### Lysispuffer\*

100 mM TRIS/HCl pH=8,6  
2 % Natrium-Laurosylsarcosin  
25 mM EDTA  
25 mM EGTA  
100 mM β-Mercaptoethanol

\* Sterilisation durch Autoklavieren.  
Kurz vor der Verwendung wurde  
β-Mercaptoethanol zugegeben.

**DEPC-H<sub>2</sub>O\***

200 µL DEPC-Stock  
100 mL Wasser

\*DEPC-H<sub>2</sub>O wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließen autoklaviert.

Zusammensetzung der Stammlösung:

DEPC Stock  $\geq 97$  %

**3.2.2.2. Anzucht von *A. tumefaciens* zur DNA-Isolierung**

*A. tumefaciens* wurde in YEB-Medium mit Kanamycin (100 µg Kanamycin/mL YEB-Medium) in Erlenmeyer Kolben (Kulturvolumen: 50 mL) auf einem Schüttler für 4 Tagen bei 28 °C kultiviert.

**YEB-Medium\***

0,5% Fleischextrakt (w/v)  
0,1% Pepton (w/v)  
0,1% Hefeextrakt (w/v)  
0,5% Saccharose (w/v)  
2 mM Magnesium Sulfat  
pH 7,4/KOH

\*Sterilisation durch Autoklavieren

Zusammensetzung der Stammlösung:

Kanamycin Stammlösung: 50 mg/mL in Wasser



### 3.2.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* (Midi-Präparation)

Die Flüssigkultur wurde in ein Falcon-Tube überführt und 10 min bei 4.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Plasmide entsprechend den Angaben des Herstellers aus dem Bakterienpellet mit dem „Quiagen Plasmid Midi Kit“ isoliert.

### 3.2.2.4. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgt nach einer modifizierten Methode von Hanahan (1983). 50 mL LB-Medium mit 20 mM Glucose und 20 mM Magnesiumchlorid wurden mit 500 µL einer Übernachtskultur des *E. coli* Stammes XL1 Blue angeimpft, und die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 3.000 Upm pelletiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 25 mL (1/2 Ausgangsvolumen) eisgekühltem 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Eisbad wurde erneut 10 min bei 3.000 Upm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 3 mL (ca. 1/16 Ausgangsvolumen) kaltem FSB-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden wieder 30 min im Eisbad inkubiert. 200 µL Aliquots wurden in sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte bei -70 °C.

#### FSB-Puffer\*

10 mM Kaliumacetat/KOH pH=7,5  
1,1 M Glycerin  
45 mM Calciumchlorid Dihydrat  
100 mM Kaliumchlorid  
pH 6,3/HCl

\*Sterilisation durch Autoklavieren

### 3.2.2.5. Transformation von *E. coli*

Die zu transformierende Plasmid DNA wurde zu den kompetenten *E. coli* Zellen (XL1-Blue) gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden. Die Zellen wurden in 1 mL LB-Medium für 60 min bei 37 °C geschüttelt. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellen auf selektiven Agarplatten (100 µg Kanamycin/mL LB-Medium) ausplattiert (Hanahan, 1985).

LB-Medium*	
0,5%	Hefeextrakt (w/v)
1%	Trypton (w/v)
1%	Natriumchlorid
pH 7,2/NaOH	
*Sterilisation durch Autoklavieren	

### 3.2.2.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Midi-Präparation)

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte wie im Abschnitt 3.2.2.3. beschrieben. Dazu wurden eine Einzelkolonie von einer selektiven Agarplatte in 3 mL LB-Medium (100 µg Kanamycin/mL LB-Medium) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

### 3.2.2.7. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Quantifizierung von RNA und DNA wurden die Proben mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt und in einem Photometer bei 260 und 280 nm gemessen. Das Photometer wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf Null geeicht. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht 40 mg/mL RNA oder 50 µg/mL doppelsträngiger DNA. Eine reine RNA-Lösung besitzt einen OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Wert von 2,0 und eine reine DNA-Lösung von 1,8 (Sambrook und Russell, 2001).

### 3.2.2.8. Restriktionsanalyse

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Temperatur und Pufferbedingungen geschnitten. Ein Restriktionsansatz (40  $\mu$ L) wurde wie folgt angesetzt:

<b>Restriktionsansatz</b>	
0,2-1 mg	Vektor-DNA
1 $\mu$ L	10X Puffer
10 IU	Restriktionsenzym
X $\mu$ L	Bidest.

### 3.2.2.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurden horizontale 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer gelöst und mit 0,5 $\mu$ g/mL Ethidiumbromid versetzt. Die zu analysierende DNA wurde mit 1/10 Volumen 10fach konzentriertem DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese fand bei 100 V für 1 Stunde bei RT statt.

<b>TBE-Puffer</b>	
90 mM	Tris/Base
90 mM	Borsäure
2 mM	EDTA/NaOH pH 8,0

<b>10X DNA Probenpuffer</b>	
0,5%	BPB (w/v)
0,1 M	EDTA
50%	Glycerin (w/v)

EtBr-Stammlösung: 10 mg/mL

Nach der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin® Kit aus Agarosegelen isoliert. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Eluate wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3. Hybridisierungsmethoden

#### 3.2.3.1. RNA Agarosegelelektrophorese

Zur geoelektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden Agarosegele mit einer Endkonzentration von 1,7 % Agarose verwendet, und wie folgt hergestellt: 8,0 g Agarose wurden mit 400 mL Wasser aufgekocht und auf  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Dann wurden 27 mL 10fach konzentriertes MEN und 43 mL 37%iges Formaldehyd hinzugegeben und die Mischung in eine Flachbett-Gelapparatur (18 cm X 20 cm) gegossen. Die RNA wurde mit 1,5 Volumen RNA-Puffer versetzt, 10 min bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturiert und sofort auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei 100 V und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nach dem Lauf wurde das Gel im UV-Licht photographiert, 3 mal 10 min in sterilem Wasser gewaschen und 30 min in 20X SSC äquiliert.

#### 10X MEN

0,2 M MOPS  
10 mM EDTA  
50 mM NaOAc  
pH 7,0/NaOH

#### RNA-Puffer

65% Formamid (v/v)  
2 % Formaldehyd 37% (v/v)  
1% Ethidiumbromid Stammlösung (v/v)  
in 10X MEN

EtBr-Stammlösung: 10 mg/mL

**20X SSC**

3 M NaCl  
0,3 M Tri-NaCitrat  
pH 7,0/NaOH

### 3.2.3.2. Transfer von RNA auf Nitrozellulosemembranen (Northern-Blot)

Der Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte über Nacht in 10X SSC Lösung bei RT. Dabei lag das Agarosegel auf drei in 10X SSC Lösung getränkten Whatman 3 MM Papieren mit Kontakt zu einem 10X SSC-Lösungsreservoir. Das Gel wurde mit der in Wasser befeuchteten Nitrozellulosemembran, mit drei feuchten Whatman 3 MM Papieren und mit einem ca. 10 cm dicken Stapel Papier überschichtet und mit einem Gewicht beschwert. Nach dem Transfer wurde die Membran in 2 x SSC Lösung gewaschen, kurz getrocknet und 5 min zur Fixierung der RNA an den Filter mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt.

### 3.2.3.3. Herstellung der radioaktiven cDNA-Sonde

Die zur Hybridisierung verwendete DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten (s. Abschnitt 3.2.2.8.). Die Sonde wurde mit Hilfe des HexaLabel Plus™ DNA Labeling Kits (Fermentas) hergestellt. Es wurde ungefähr 25 ng DNA mit 10 µL Hexanucleotid 5X-Buffer versetzt und mit Wasser zu einem Endvolumen von 40 µL aufgefüllt. Die Sonde wurde 5 min bei 100 °C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 3 µL Mix C, 5 µL  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (50 µCi) und 1 mL Klenowfragment versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 µL dNTP zugegeben und nochmals 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µL 0,5 M EDTA (pH=8) gestoppt.

### 3.2.3.4. Hybridisierung

Die Membran wurde in einer Glashybridisierungsröhre für 2 Stunden mit 20 mL Hybridisierungslösung bei 65 °C in einem Röhrenofen geblockt. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde zur Hybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C. Danach wurde die radioaktive Sonde abgegossen und die Membran 5 min mit 5X Waschpuffer gewaschen und anschließend 5 min mit 1X Waschpuffer behandelt. Danach wurde die Membran in Polyethylen-Folie verpackt und ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei – 80 °C exponiert.

#### Hybridisierungslösung

250 mM	Natriumhydrogenphosphat
250 mM	Natriumdihydrogenphosphat
1 mM	EDTA
7%	SDS
1%	BSA

#### Waschpuffer 5X

25%	20X SSC (v/v)
0,5%	SDS (w/v)

#### Waschpuffer 1X

2,5%	20X SSC (v/v)
0,5%	SDS (w/v)

### 3.2.3.5. Detektion von Signalen

Die Detektion von Signalen erfolgte nach der Entwicklung des Röntgenfilm bei Rotlicht. Der Film wurde 10 min in Entwicklerlösung inkubiert, mit Wasser gut abgewaschen und weitere 10 min in Fixierlösung inkubiert.

### 3.2.4. Oberflächensterilisation von *N. tabacum*-Samen

Zur Sterilisation wurden die Samen für 3 min mit 70%igem EtOH behandelt und nachfolgend 20 min in einer 20%igen NaOCl-Lösung, die mit 0,15% Triton X-100 versetzt wurde, geschüttelt. Die Samen wurden anschließend dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und auf sterilem Filterpapier getrocknet.

### 3.2.5. Wachstumsversuch auf verschiedenen Stickstoff-Formen

#### 3.2.5.1. Pflanzenanzucht

Tabakpflanzen (*N. tabacum*) wurden auf Einheitserde-P (Fruhsdorfer Erde Typ P, Industrieerdenwerke Erich Archut, Lauterbach-Wallenrod) kultiviert. Die Kultur erfolgte in Gewächshäusern bei 24 °C am Tag und 19 °C in der Nacht in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 13 h/11 h. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen pikiert und nach zwei weiteren Wochen wurde eine Pflanze pro Topf in runde Plastiktöpfe (Ø=16 cm und 16 cm Höhe) ausgepflanzt.

#### 3.2.5.2. Dünge-Versuche

Die Tabakpflanzen wurden in diesen Versuchen mit unterschiedlichen Stickstoffformen gedüngt. Die Zusammensetzung der Nährlösungen (Makro- und Mikronährstoffe) erfolgte nach einem modifizierten Rezept von Arnon und Hoagland (Hewitt, 1966). Eisen wurde als Fe-EDTA nach Steiner und van Winden (1970) gegeben. Die Nährlösungen wurden unter weitgehend keimfreien Bedingungen hergestellt. Die genauen Bestandteile der Nährlösungen und Mikronährstoffe sind in der [Tabelle 3-1](#) und [3-2](#) aufgeführt. Als Kontrolle wurden ein Teil der Pflanzen mit einer Lösung mit 3 mM Stickstoff als  $\text{NO}_3^-$  gegossen, d.h. eine suboptimale Stickstoffmenge.

Der pH-Wert der fertigen Medien wurde mit 1N Schwefelsäure auf 5,5 eingestellt. Jede Pflanze wurde wöchentlich mit 200 mL Nährlösung versorgt.

**Tab. 3-1:** Salzkonzentrationen der verschiedenen Nährlösungen.

Salz	N-Form		
	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
Konzentration (mM)			
Calciumnitrat-Tetrahydrat	4,5	–	3,0
Kaliumnitrat	10,0	–	10,0
Kaliumdihydrogenphosphat	2,0	2,0	2,0
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2,0	2,0	2,0
Kaliumchlorid	–	3,0	–
Calciumchlorid	–	3,0	–
Ammoniumchlorid	–	5,0	–
Ammoniumdihydrogenphosphat	–	9,5	2,0

**Tab. 3-2:** Mikronährstoffe.

Salz	Konzentration ( $\mu\text{M}$ )
Borsäure	50,00
Manganchlorid-Dihydrat	10,00
Kupfersulfat-Pentahydrat	0,30
Zinksulfat-Heptahydrat	0,75
Molybdänoxid	0,60
Eisensulphat-Heptahydrat (als Fe-EDTA Chelat-Komplex)	90,00

### 3.2.6. Bestimmung von Wachstumsparametern

Zur Charakterisierung des Pflanzenwachstums wurden Wachstumsparameter bestimmt. Ermittelt wurde die Sprosslänge, die Blattfläche und das Gesamtfrischgewicht.



### 3.2.6.1. Wachstum

Für die Ermittlung der Wachstumsraten und des Entwicklungszustandes der Pflanzen während der Anzucht mit verschiedene N-Formen wurde ab dem Zeitpunkt der Auspflanzung in Töpfe alle 15 Tage die Sprosslänge ermittelt.

### 3.2.6.2. Ermittlung der Blattflächen

Für die Messung der Blattfläche wurde Länge und Breite der einzelnen Blätter 60 Tage nach der Pflanzung in Töpfe gemessen. Die Blattfläche errechnete sich aus:

$$A = \pi * a * b$$

A= Blattfläche in cm<sup>2</sup>

a= Länge/2 in cm

b= Breite/2 in cm

Bei der Verwendung dieser Formel setzt man eine Ellipsenform der Tabakblätter voraus (Walch-Liu *et al.*, 2000).

### 3.2.6.3. Bestimmung des Frischgewichts

Das Frischgewicht der Sprosse wurde 65 Tage nach der Pflanzung in Töpfe bestimmt.

### 3.2.7. Probennahme

Die Probenentnahme für die Bestimmung von Chlorophyll, freien Aminosäuren und immunologische Proteinuntersuchung erfolgte 60 Tage nach der Pflanzung (90

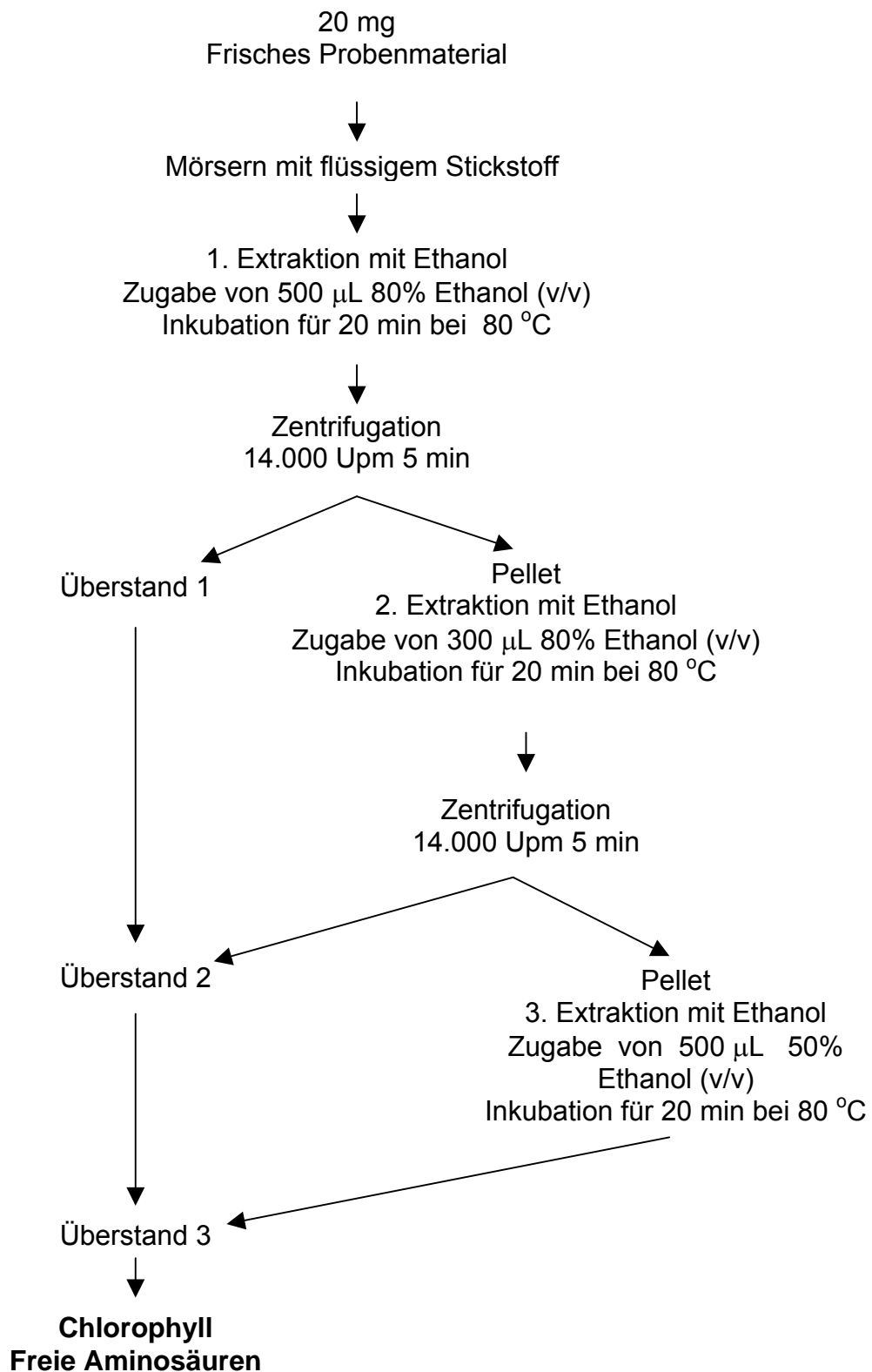
Tage nach der Aussaat). Es wurde Blätter und Wurzeln aus jeder Behandlung entnommen. Die verwendeten Blätter waren voll entwickelt, hatten photosynthetische Aktivität und befanden sich zwischen dem dritten und vierten Blattpaar. Die Proben wurden in jedes Mal aus einer Mischung von vier verschiedenen Wiederholungen hergestellt. Das Material wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei – 80 °C für die zukünftigen Bestimmungen gelagert.

### **3.2.8. Quantitative Bestimmung von Chlorophyll und freien Aminosäuren**

#### **3.2.8.1. Probennahme und Probenaufarbeitung**

Die Probenentnahmen erfolgte wie unter Punkt 3.2.7. beschrieben.

Die Extraktion erfolgte nach einer modifizierten Methode von Geiger *et al.* (1998) wie in [Abb. 3-3](#) schematisch dargestellt.



**Abb. 3-3:** Aufarbeitungsschema zur Untersuchung von Chlorophyll und freien Aminosäuren.

### 3.2.8.2. Chlorophyllbestimmung

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde von allen in den Versuchen genutzten Blättern vorgenommen und spektralphotometrisch durchgeführt. Die photometrische Bestimmung nach einer Beschreibung von Quick *et al.* (1991) erlaubte die Ermittlung der Gehalte an Chl a und b. Die Bestimmung der Chlorophyllgehalte erfolgte bei 645 und 665 nm gegen den Blindwert.

65 µL der extrahierten ethanolischen Überstände aus der Aufarbeitung in 3.2.8.1. wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 98% Ethanol (v/v) auf 170 µL aufgefüllt. Die Gehalte an Chl a und Chl b wurden anhand der Extinktionen bei 645 und 665 nm folgendermaßen berechnet:

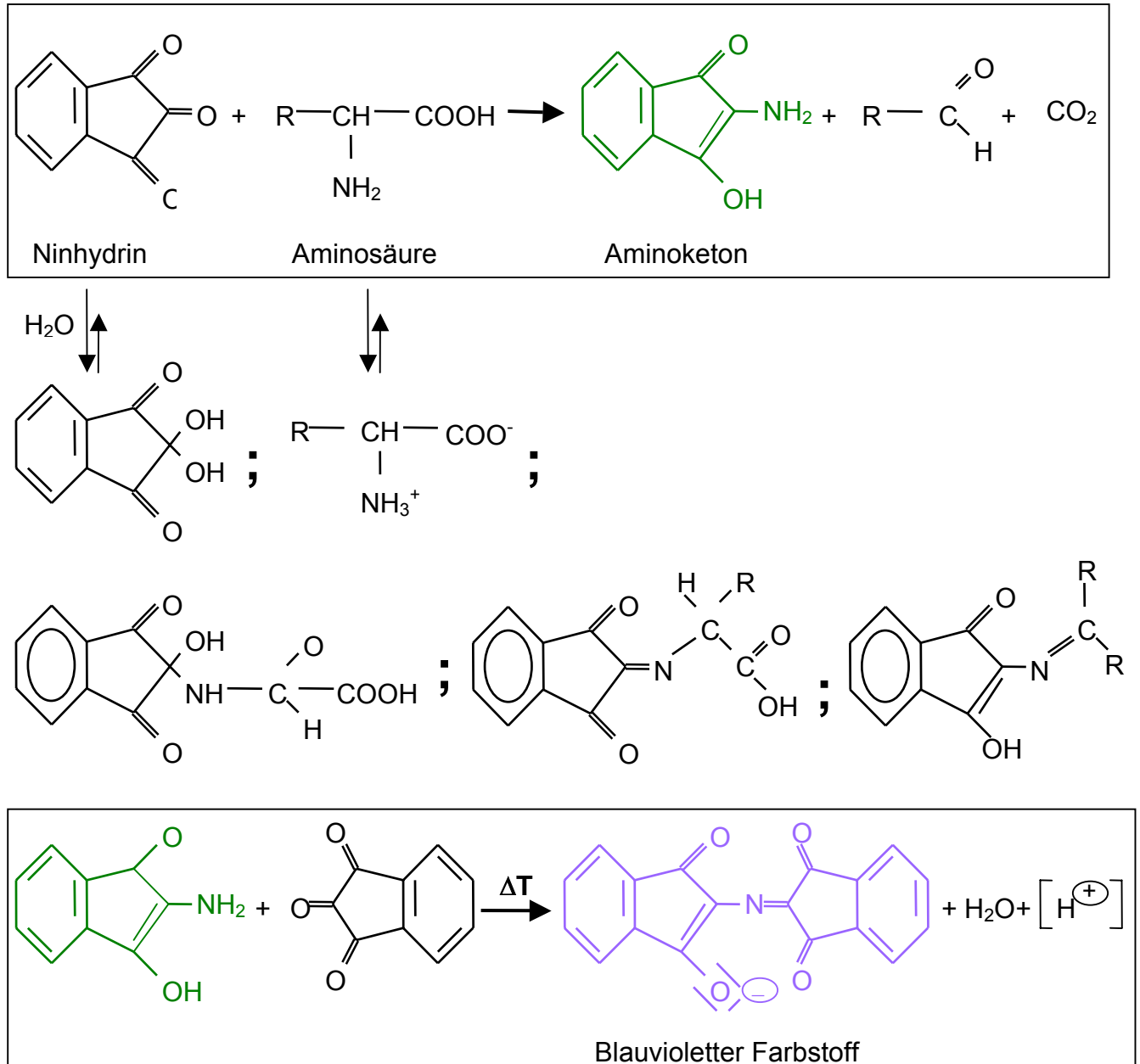
$$\text{Chl a} = (5,48 \times \text{OD}_{665}) - (2,16 \times \text{OD}_{645}) = \mu\text{g Chl a/mg FG}$$

$$\text{Chl b} = (9,67 \times \text{OD}_{645}) - (3,04 \times \text{OD}_{665}) = \mu\text{g Chl b/mg FG}$$

Die Faktoren, mit denen die Extinktionen multipliziert werden, berücksichtigen sowohl das Frischgewicht, als auch den Verdünnungsfaktor der Probe. Folglich wird das Ergebnis direkt in µg Chl x/mg FG angegeben.

### 3.2.8.3. Bestimmung der Konzentration freier Aminosäuren mit Ninhydrin

Die Aminosäurebestimmung erfolgte photomerisch mittels der Ninhydrinmethode nach Moore und Stein (1948 und 1954). Die Ninhydrinreaktion ist die bedeutendste Nachweis und Bestimmungsmethode für Aminosäuren. Das Prinzip dieser Methode ist wie folgt: Die α-Aminosäuren werden von Ninhydrin decarboxyliert und desaminiert und der Stickstoff der α-Amino-Gruppe bildet mit Ninhydrin einen typisch rot blauvioletten Farbkomplex. Der Mechanismus ist in [Abb. 3-4](#) dargestellt.



**Abb. 3-4:** Mechanismus der Ninhydrin Reaktion (Breuer, 1996).

50  $\mu\text{L}$  Zitratlösung und 50  $\mu\text{L}$  der extrahierten ethanolischen Überstände wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  Ninhydrinlösung hinzugefügt und die Mischung wurde 20 min bei 95 °C inkubiert. Nach der

Inkubation erfolgte die Aminosäurebestimmung bei 570 nm. Die Eichung erfolgte durch Leucin-Standards, die in gleicher Weise behandelt worden waren. Leucin wurde in 70%igem Ethanol (v/v) gelöst.

**Ninhydrinlösung**

1% Ninhydrin (w/v)  
in 70% Ethanol (v/v)

**Citratlösung**

0,2% Ascorbinsäure (w/v)  
in Citratpufferlösung/NaOH pH 5,2

### 3.2.9. Ertragsbestimmung

Die Anzahl der Kapseln per Pflanze und das jeweilige Samengewicht wurde bestimmt. Zur Schätzung des individuelle Samengewichts wurde anschließend das 1000-Samen-Gewicht bestimmt und das Gewicht durch 1000 dividiert.

### 3.2.10. Versuche zur Aluminium Toleranz

#### 3.2.10.1. Hydrokultur

Hydrokulturversuche wurden in schwarzen Polyethylenemern durchgeführt, um das Wachstum von Algen zu verhindern. Die Eimer waren mit Styroporplatten abgedeckt, in welche 50 Löcher mit 0,5 cm Durchmesser gebohrt waren. Die Luftversorgung jedes Eimers erfolgte individuell über eine Aquariumspumpe. Tabaksamen wurden in Erde vorgekeimt, bis die Keimlinge ein Wurzellänge von 3-

5- cm aufwiesen. Anschließend wurde das Hypokotyl der Keimling mit Schaumgummi umwickelt und je ein Keimling in die Löcher platziert.

### 3.2.10.2. Aluminium-Behandlungen

Die Aluminiumbehandlungen sind in [Tab. 3-3](#) dargestellt.

**Tabelle 3-3:** Aluminium-Behandlungen.

Al-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )
0
50
100
200

Für Versuchsvarianten mit Aluminium wurde der pH-Wert der Lösungen zuerst auf pH 5,0 abgesenkt, dann eine entsprechende Menge Aluminium-Stammlösung zugegeben und der pH-Wert auf 4,3 eingestellt. Die Stammlösungen enthielten 0,5 mM Calciumsulfat-Dihydrat und Aluminium in Form von Aluminiumchlorid.

### 3.2.10.3. Untersuchung des Wurzelwachstums

Zur Untersuchung des Wurzelwachstum wurden sterilisierte Samen auf festem MS-Medium ([Tab. 3-4](#)) mit 1 % (w/v) Agar unter sterilen Bedingungen in Petrischalen ausgesät. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und bei 25 °C inkubiert. Nach 7 Tage Inkubationszeit wurden die gekeimten Samen auf frisches MS-Medium in quadratischen Petri-Schale ohne und mit 100  $\mu\text{M}$  Al umgesetzt. Zu Versuchsbeginn wurden die Länge der Hauptwurzeln der Keimlinge gemessen, welche von Aluminium primär geschädigt wurden.

Der Zuwachs der Hauptwurzel wurde mit einem Lineal täglich bestimmt. Die Messungen erfolgten über 10 Tage im Abstand von 24 Stunden.

Um den Einfluss der Keimlingsvitalität zu minimieren, wurde das Wurzelwachstum unter Al-Stress auf das Wachstum der jeweiligen Sorte ohne Al bezogen.

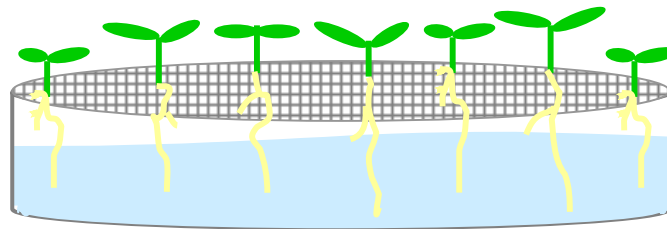
**Tabelle 3-4:** MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962).

<b>Makroelemente</b>	<b>mM</b>
Ammoniumnitrat	20,60
Kaliumnitrat	18,80
Magnesiumsulfat	1,50
Kaliumdihydrogenphosphat	1,24
Calciumchlorid	3,00
Eisensulfat Heptahydrat	0,10
Na <sub>2</sub> -EDTA	0,10
<b>Mikroelemente</b>	<b>µM</b>
Mangansulfat	112,00
Borsäure	100,00
Zinksulfat Heptahydrat	30,00
Kaliumjodid	5,00
Natriummolybdat Dihydrat	1,00
Cobaltchlorid Hexahydrat	0,10
Kupfersulfat Pentahydrat	0,10
<b>Vitamine</b>	<b>µM</b>
Myo-Inositol	275,00
Glycin	13,00
Nicotinsäure	2,00
Pyridoxal/Hydrochlorid	1,20
Thiamin/Hydrochlorid	0,15



#### 3.2.10.4. Gewinnung von Exsudaten aus Tabakwurzeln

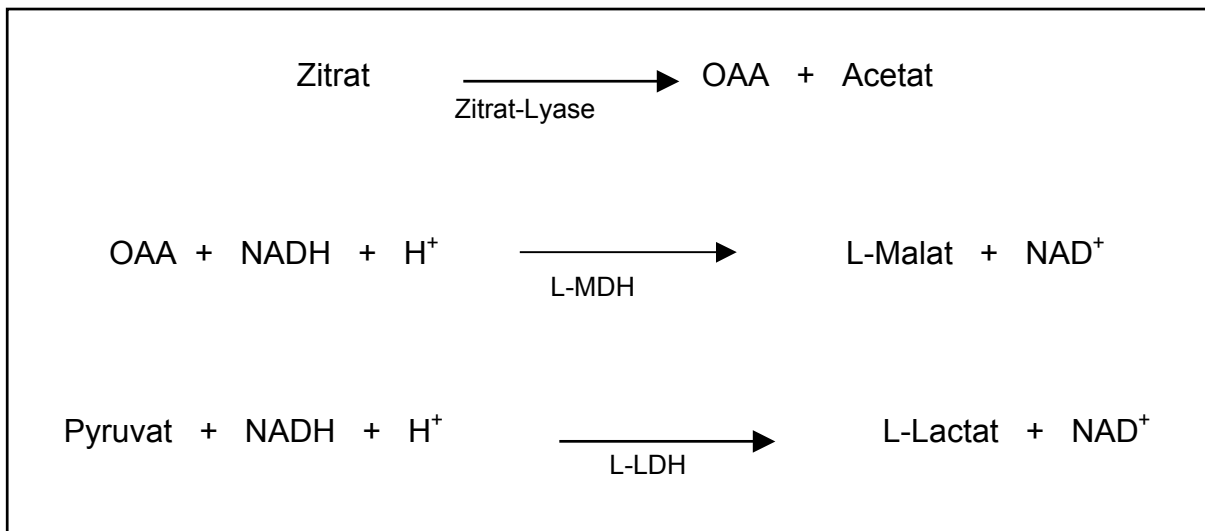
Die Gewinnung der Exsudate erfolgte aus Hydrokulturen in Petrischalen (Abb. 3-5). Die Samen wurden auf Verbandmull angezogen und eine Woche wachsen gelassen. Danach wurden die Keimlinge 24 h mit Lösungen ohne und mit 100  $\mu\text{M}$  Aluminium behandelt. Nach der Inkubationszeit wurde jeweils ein Aliquot abgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.



**Abb. 3-5:** Schematische Darstellung der Kulturmethode zur Gewinnung von Wurzelexsudaten.

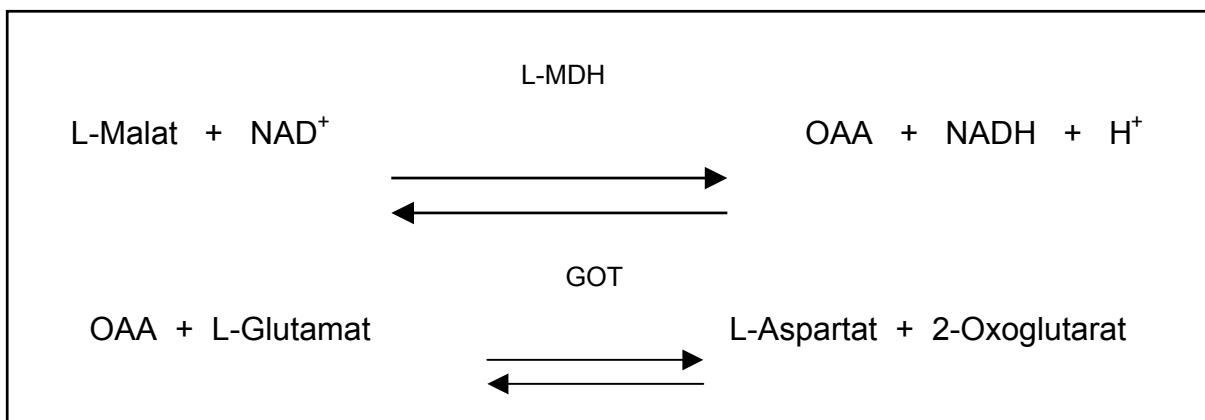
#### 3.2.10.5. Messung der Extrusion von organischen Säuren

Zitronensäure wurde in der durch das Enzym Zitrat-Lyase katalisierten Reaktion in Oxalacetat und Acetat überführt. In Gegenwart der Enzyme L-Malat-Dehydrogenase und L-Lactat-Dehydrogenase wurden Oxalacetat und dessen Decarboxylierungsprodukt Pyruvat durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) zu L-Malat bzw. L-Lactat reduziert. Die Summe der während der Reaktionen verbrauchten NADH war der Zitrat-Menge äquivalent (Abb. 3-6). NADH wurde bei 340 nm bestimmt.



**Abb. 3-6:** Reaktionen zur enzymatischen Bestimmung der Zitronensäure.

Äpfelsäure wurde durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart von L-Malat-Dehydrogenase zu Oxalacetat oxidiert. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von L-Malat. Es wurde durch Abfangen des Oxalacetats mit Hilfe der nachgeschalteten Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) in Gegenwart von L-Glutamat auf die Seite von Oxalacetat und NADH verschoben. Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der Äpfelsäure-Menge äquivalent ([Abb. 3-7](#)). NADH wurde photomerisch bei 340 nm bestimmt.



**Abb. 3- 7:** Reaktionen zur enzymatischen Bestimmung der Äpfelsäure.

### **3.2.10.6. Wurzelfärbung mit Eriochrome Cyanine-R (ECR)**

Bei ECR handelt es sich um einen histochemischer Aluminium-Indikator welcher zum Anfärben von Aluminium in pflanzlichen Geweben verwendet wird. ECR bildet in Gegenwart von Al einen roten Komplex, wobei die Farbintensität abhängig von dem Al-Gehalt ist (Aniol, 1995; Slaski, 1995).

Die Färbung der Wurzeln mit Eriochrome Cyanine-R wurde durchgeführt, um die Absorption der Al-Ionen in den Wurzeln zu bestimmen.

Sieben Tage alte Keimlinge aus Hydrokultur (s. 3.2.11.1) wurden für 24 Stunden in einer Lösung mit unterschiedlichen Al-Konzentrationen inkubiert (0 und 100  $\mu\text{M}$  Aluminium (als  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , pH 4,3) ausgesetzt, gefolgt von einer 5-minütigen Waschung mit bidestillierten Wasser. Dannach wurden die Wurzeln 30 Minuten in einer 0,1 % ECR-Lösung (w/v) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Wurzeln wieder 5 Minuten mit bidestillierten Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Färbungsmuster mit Hilfe eines Licht-Mikroskops beobachtet.

### **3.2.11. Computer-Auswertungen**

#### **3.2.11.1. Statistische Berechnungen**

Die Versuche wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander wiederholt. Die Anzahl der Wiederholungen je Variante (n) wurde bei den entsprechenden Ergebnisdarstellungen angegeben. Die dargestellten Ergebnisse entstammen jeweils einem repräsentativen Experiment. Die Daten der Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen wurden mit dem Computerprogramm Excel 2000 für Windows (Microsoft Corporation, Redmond, USA) nach den in Sachs (1999) beschriebenen Methoden generiert. Zum Vergleich der Mittelwerte der untersuchten Parameter wurde der t-Test für unabhängige Stichproben (t-Test nach Student) angewendet. Das Signifikanzniveau lag bei 95% (Tab. 3-5). Die

Irrtumswahrscheinlichkeit P wird im Ergebnisteil neben der Standardabweichung der Mittelwerte angegeben.

**Tabelle 3-5:** Definition der Signifikanz und deren Symbol.

<b>Irrtumswahrscheinlichkeit</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Symbol</b>
$P > 0,05$	nicht signifikant	
$P \leq 0,05$	signifikant	*
$P \leq 0,01$	sehr signifikant	**
$P \leq 0,001$	höchst signifikant	***

### 3.2.11.2. Densitometrische Bestimmungen

Die Blots und Autoradiogramme wurden mit einem Scanner (UTA II Power Look, Fa. UMAX Data System Inc.) digitalisiert (Graustufenscan, Auflösung 500 dpi, Photoshop-Format). Die densitometrische Auswertung erfolgte nach Burcham (1989) mit einem darauf spezialisierten Computerprogramm (Scan Analysis Version 2.1 für Macintosh).