

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

***Escherichia coli* (*E. coli*)**

DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsd17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> (Sambrook et al., 1989)
XL1 Blue	<i>supE44 hsd17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac</i> ⁻ F' <i>[proAB+ lacI^q lacZ</i> Δ M15 Tn10 (<i>tet</i> ^r)] (Sambrook et al., 1989)
One Shot [®] TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen, Karlsruhe)

***Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)**

EHA 105	C58 pTiBo542, T-region:: <i>aph</i> , Km(S), A281, super-virulent (Hood et al., 1993)
---------	---

2.1.2 Hefestämme

***Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)**

22574d	<i>Mata, ura3-1, gap1-1, put4-1, uga4-1</i> (Jauniaux et al., 1987)
22 Δ 6AAL	<i>Mata, ura3-1, gap1-1, put4-1, uga4-1, can1::hisG, lyp1/alp1::hisG, lys2::hisG</i> (Fischer et al., 2002)
JT16	<i>Mata, hip1-614, his4-401, can1, ino1, ura3-52</i> (Tanaka and Fink, 1985)
21.983c	<i>Mata, gap1-1, can1-1, ura3</i> (Hein and André, 1997)
30.537a	<i>Mata, gap1-1, dip5::kanMX2, ura3</i> (B. André, unveröffentlicht)
YDR544	<i>Mata, ura3-1, gap1-1, put4-1, uga4-1, ssy1::kanMX</i> (D. Rentsch, pers. Mitteilung)
LR2	<i>Mata, hip1-614, his4-401, can1, ino1, ura3-52, ptr2Δ::hisG</i> (Rentsch et al., 1995)

2.1.3 Pflanzenmaterial

Nicotiana tabacum L. cv SNN

Nicotiana plumbagenifolia L.

Arabidopsis thaliana cv Columbia

Vicia faba L. ssp. Minor cv Fribo

Pisum sativum L. cv Eiffel und Erbi

Hordeum vulgare cv Barke

2.1.4 Plasmide und Vektoren

pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Amp ^r (Invitrogen, Karlsruhe)
pCR [®] 4-TOPO [®]	Amp ^r (Invitrogen, Karlsruhe)
pUC18/19	Amp ^r (Yanisch-Perron et al., 1985)
pBluescript II SK(-)	Amp ^r (Stratagene, Heidelberg)
pRT103	Amp ^r
pGUS1	Amp ^r , basiert auf pUC19
pDR196	Amp ^r (Rentsch et al., 1995)
pFF19	Amp ^r (Timmermans et al., 1990)
pBAR	Spec ^r (von Dr. I. Saalbach [IPK Gatersleben] zur Verfügung gestellt)

Karten der aufgelisteten Plasmide befinden sich im Anhang (Abb. A 8).

2.1.5 Oligonukleotide

Die folgenden synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Die Sequenzen sind in 5'-3' -Orientierung dargestellt:

Sequenzierungsprimer

AtSUC2p_1961	CTA TGC CTC AAG GCT CTC TTA
ocs-term_100b	GAT CTG AGC TAC ACA TGC
PTR1p_1335a	ACG GAA GCA GAT CCA CTG CAA C
pDR196_94a	CTT TCC TAT AAC ACC AAT AGT G
VfPTR1_637a	CAA CAT AGG AGC CCT CAT ATC
pBAR_seq1	GTC ATA ACG TGA CTC CCT TA

Primer für die Überexpressionskonstrukte

AtSUC2p_a	CAA TTC TAG ACC TAA AAT CTG GTT TCA TAT TA
AtSUC2p_b	GAA TGG ATC CAT TTG ACA AAC CAA GAA AGT AAG
PTR1p_aBamHI	TGG TGG ATC CGG GAA AAC ACT TAC
PTR1p_bBamHI	CCA TGG ATC CGA GGC TTC AAA ATC C

Genome Walking Primer

AP1	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
AP2	ACT ATA GGG CAC GCG TGG T
VfPTR1_GSP1	GCC TCC CTT TAA AGT CGA CCG AGC CAT
VfPTR1_GSP2	TCC TGA ATA AGC GCT TCT TCC AAA CGC
PTR1PromA_GSP1	GCG TCT CAA TCT CAC TTT CTC CGA AGC A
PTR1PromA_GSP2	TTG CGG CGT AGT TGT ATT GAG CAT CCC A
PTR1PromB_GSP1	TGG GAG AGG TAG CTG CTA GGT GGA CTT
PTR1PromB_GSP2	GCA AAG CTT TAT GCT GCT GTC AGA AGG

Primer für Promotor-GUS und Promotor-GFP Konstrukte

PTR1pGUS_PstI	CCG GCT GCA GAT CAA AGG GAA AAA CAC
PTR1pGUS_SalI	GAA CGT CGA CAG CTA TGA GGC TTC
PTR1p_EcoRI	TGG TGA ATT CGG GAA AAA CAC TTA C
PTR1p_SacI	CCA TGA GCT CGA GGC TTC AAA ATC C
GFP_BamHI	GAC GGA TCC ATG GTG AGC AAG GGC
GFP_XbaI	CTT TCT AGA TTA CTT GTA CAG CTC G

Primer für GFP-Fusionskonstrukte

VfPTR1_BamHI	CAG GAT CCA TGG GTT CCG TAG AGG A
VfPTR1_XbaI	AGT GCC TGA AAA TCT AGA CGA AGC CT
HvGAP1_BamHI	AGG GGA TCC ATG GCA GGG CAG GGC A
HvGAP1_XbaI	CTT TGT CTA GAG CCG CTC AAA TTG G
HvAAP1_BamHI	ACG GAT CCA TGG AGA AGA AGC AGG C
HvAAP1_XbaI	ACT CTA GAG CCG CTG AAC GGC CGG T
HvAAP2_XbaI	ACT CTA GAA TGG GGC AGA ACG GCG T
HvAAP2_SalI	ACG TCG ACG TCG TGG AGA AAG GCT T

Primer für die Klonierung des c-myc-tags

c-myc_for CAA GGA GCT CTG AGC AAA AGT TGA TTT CTG AGG
 AGG ATC TTC TGA GCT CCA TG

c-myc_rev CAT GGA GCT CAG AAG ATC CTC CTC AGA AAT CAA
 CTT TTG CTC AGA GCT CCT TG

VfPTR1_Ncol TAC CAT GGG GCA CGA GCT ATG GGT T

VfPTR1_Xbal GGT CTA GAC ATA AAC TGC CAT CAC

Primer für Hefeexpressionskonstrukte

HvAAP1_Spela AAC TAG TAT GGA GAA GAA GCA GGC GAC TAC

HvAAP1_Spelb AAC TAG TTC AGC CGC TGA ACG GCC CGT ACT C

HvAAP2_Spela AAC TAG TAT GGG GCA GAA CGG CGT GGG CAA G

HvAAP1_Spelb AAC TAG TTC AGT CGT GGA GAA AGG CTT GTA G

GFP_Spelb CTT ACT AGT TTA CTT GTA CAG CTC G

HvGAP1_Spela AAA CTA GTA TGG CAG GGC AGG GCA GCT ACA

HvGAP1_Spelb AAA CTA GTC TAG CCG CTC AAA TTG GTG ACG GGT

Primer für RT-PCR und qRT-PCR

RT_VfPTR1_1527a TGC GAA GTT TAT GCA GTG CT

RT_VfPTR1_2010b TCA CAT CAA AGG GTA TCA AAC

RT_VfAAP1a TTG CTA ACG CCG CTC TCA TAA TTC ATC TTG

RT_VfAAP1b CAC TGA TCC AAC AAA AGC CAC AAC TGA TAC

RT_PsActin_1156a TGT CTG GAT CGG AGG CTC TA

RT_PsActin_1561b AGG CCA ATC AGA ACA TTG GA

qRT3'VfAAP1_a TTG TCA CCA GGA AAC TTA

qRT3'VfAAP1_b TGA GAG CGG CGT TAG CAA

qRT3'PsActin_a GCT CTA TTT TGG CAG CCC TCA

qRT3'PsActin_b GCC TTT GCA ATC CAC ATC TGT

PsActin_genom_a CCT TGT GCA GAT GTG GAT TGC

PsActin_genom_b TTG ATG GCC CAG ATT CAT CA

2.1.6 Medien

Die Anzucht der *E.coli*-Stämme erfolgte auf LB-Medium bzw. SOC-Medium nach Sambrook et al. (1989) mit dem entsprechenden selektiven Antibiotikum. *Agrobacterium tumefaciens* wurde auf YEB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums angezogen. Die festen Medien enthalten 1,5 % Agar.

LB	1 % NaCl, 0,5 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt (pH 7,4)
SOC	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % NaCl, 20 mM Glukose, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ (pH 7,4)
YEB	0,5 % Fleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,1 % Hefeextrakt, 2 mM MgSO ₄

Die *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme wurden auf Vollmedium (YPD) und auf synthetischen Medien, minimal (SD) oder komplex (SC), angezogen. Der Drop-out Mix enthält eine Mischung verschiedener Aminosäuren und Nucleoside und wird als Zusatz für das SC-Minimalmedium verwendet. Je nach Selektionsbedingungen fehlen Uracil oder Uracil und Histidin. Alle festen Medien enthalten 2 % Agar.

YPD	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose
SD	0,17 % YNB w/o amino acids w/o NH ₄ , 0,5 % (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 % Glukose
SC	0,17 % YNB w/o amino acids w/o NH ₄ , 0,5 % (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 % Glukose, 0,2 % Drop-out Mix
MM	0,17 % YNB w/o amino acids w/o NH ₄ , 0,1 % Stickstoffquelle, 2 % Glukose

Für die Kultivierung der Pflanzen unter sterilen Bedingungen wurden folgende Medien verwendet:

B5	2070 mg/l KNO ₃ , 1029 mg/l CaCl ₂ x 2H ₂ O, 500 mg/l MgSO ₄ x 7H ₂ O, 134 mg/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 150 mg/l NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 1x MS Mikrosalze (Murashige and Skoog, 1962), 1x B5 Vitamine (Gamborg et al., 1968), 3 % Saccharose, 10 mg/l Glutathion, 800 mg/l Glutamin, 1 mg/l Adenin, 100 mg/l Serin, 1 mg/l 2,4D, 0,2 mg/l Kinetin, 2,5 mM MES, PPT (pH 5,8)
P1	1x MS Mikro-und Makrosalze, 1x B5 Vitamine, 3 % Saccharose, 2 mg/l BA, 2 mg/l NAA, 2,5 mM MES, 400 mg/l Ticarcillin, 10 mg/l PPT (pH 5,8)
MS	1x MS Mikro-und Makrosalze, 1x MS Vitamine, 3 % Saccharose, 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA, 300 mg/l Ticarcillin, 10 mg/l PPT, MES (pH 5,8)

MS1/2	1x MS Mikrosalze, 0,5x MS Makrosalze, 1x MS Vitamine, 1 % Saccharose (pH 5,7)
MS4	1x modifizierte MS4 Mikro-und Makrosalze, 1x MS Vitamine, 2 % Saccharose, NH ₄ NO ₃ , 4 mg/l BA, 100 mg/l myo-Inositol, 0,1 mg/l IBS, 400 mg/l Ticarcillin, 10 mg/l PPT, 10 mM MES (pH 5,8)
K3	1x K3 Mikro-und Makrosalze (Nagy and Maliga, 1976), 0,4 M Mannit, 3 % Saccharose, 1 mg/l BA, 2 mg/l NAA, 1 mg/l 2,4D

2.1.7 Chemikalien, Reagenzien und Kits

BioRad (Richmond CA, USA)	30% Acrylamid/Bis
Biozym (Oldendorf)	Saekem LE Agarose
Clontech (Mountain View CA, USA)	Universal Genome Walker Kit, Marathon™ cDNA Amplification Kit, Yeast Nitrogen Base w/o amino acids w/o ammonium sulfate, -Ura DO supplement, -Ura-His DO supplement
Difco (Detroit MI, USA)	Bacto®-Agar, Bacto®-Trypton, Bacto®-Pepton, Hefeextrakt, Fleischextrakt
Duchefa (Amsterdam, Niederlande)	Murashige Skoog Vollmedium Festsubstanz, Kanamycin, PPT, Spectinomycin
Dynal (Oslo, Norwegen)	Dynabeads® mRNA Purification Kit
Fermentas (St. Leon Rot)	GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Prestained Protein Ladder, Rapid DNA Ligation Kit
Fluka (Buchs, Schweiz)	DEPC, Aminosäuren
GE Healthcare (Braunschweig)	ECL Western blotting analysis system, [α^{32}]dCTP, RediPrimell Labeling System
Invitrogen (Karlsruhe)	EDTA, TOPO TA Cloning® Kit, Superscript™III First-Strand Synthesis System for RT-PCR
Merck (Darmstadt)	Di-Natriumhydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumsulfat, Polyethylenglykol
Qiagen (Hilden)	Qiagen Plasmid Mini Kit, Qiagen Plasmid Maxi Kit, Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiaquick Nucleotide Removal Kit, Qiaquick PCR Purification Kit, Qiaprep Spin Miniprep Kit
Roche (Basel, Schweiz)	BSA, dNTPs, Rapid DNA Ligation Kit, DIG-High Prime, DIG nucleic acid detection Kit

Roth (Karlsruhe)	Formaldehyd, Chloroform, Phenol, Glycerin, Phenol/Chloroform, Ethanol, Methanol, 2-Propanol, Essigsäure, Salzsäure, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumazetat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriumzitat, Tris, Ethanolamin, Diethanolamin, Glycin
Serva (Heidelberg)	BICINE (N,N-Bis(2-hydroxyethyl) Glycin), Ovalbumin, Aminosäuren
Sigma (Louis MO, USA)	Aminosäuren, Peptide, 4-Nitrophenylphosphat (pNPP)
Stratagene (Heidelberg)	Sonicated Salmon Sperm DNA Kit
Tropix (Bedford, USA)	GUS-Light™ Kit
Vector Laboratories (Burlingame CA, USA)	Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit

2.1.8 Speziallabormaterial

Applied Biosystems (Foster City, USA)	Optical Adhesive Covers, Abdeckfolien
Fujifilm (Düsseldorf)	Imaging Plate BAS-MS 2040
GE Healthcare (Braunschweig)	Nylonmembran (Hybond N ⁺), Hyperfilm™ ECL, Protein A Sepharose CL-4B, HiTrap NHS-activated HP (Affinitätssäulen), MicroSpin™ S-200 HR columns
G. Kisker GbR (Steinfurt)	Quali PCR Platten 384 Loch
Nalgene (Rochester NY., USA)	Syringe filters 0,2µm, 0,45µm (Sterilfilter), Kryokonservierungsröhrchen
Nunc (Roskilde, Dänemark)	96 Loch Mikrotiterplatten (Immuno Plate, Maxisorp)
Pierce (Rockford IL, USA)	iCON™ Concentrator (15 ml Zentrifugenröhrchen)
Schleicher und Schüll (Dassel)	Nitrozellulosemembran Protran®, Gel-Blotting-Papier

2.1.9 Enzyme und Antikörper

Ambion (Austin, TX, USA)	TURBO DNase™ (DNase)
Applied Biosystems (Foster City, USA)	Power SYBR® Green PCR Master Mix
Clontech (Mountain View, CA, USA)	Advantage® Genomic Polymerase Mix, Advantage™ 2 Polymerase Mix

Fermentas (St. Leon Rot)	Restriktionsendonukleasen, T4 DNA-Ligase, Shrimp Alkaline Phosphatase (alkalische Phosphatase)
GE Healthcare (Braunschweig)	Restriktionsendonukleasen, ECL™ Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody aus Esel
Roche (Basel, Schweiz)	Taq Polymerase, Restriktionsendonukleasen, Proteinase K, Amyloglucosidase
Sigma (Braunschweig)	Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase aus Ziege

Der *c-myc*-Antikörper wurde als Konzentrat nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse gegen PBS (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5) aus dem Überstand der Hybridomazellen 9E10 (Evan et al., 1985) gewonnen, die im Zellzuchtlabor der Arbeitsgruppe „Phytoantikörper“ (IPK) kultiviert wurden. Das Epitop umfasst einen Bereich des humanen Proto-Onkogens p62, *c-myc* (Bernard et al., 1983; Hilpert et al., 2001).

2.1.10 Geräte und Apparaturen

Applied Biosystems (Foster City, USA)	Thermocycler 7900HT
Biometra (Göttingen)	Hybridisierungsöfen
BioRad (München)	Mini Protean® 3 (Minigel Elektrophoresesystem für vertikale PAA-Gelelektrophorese), Mini Trans Blot® (Mini Blot Apparatur)
Brand (Wertheim)	Transferpipette® -8
Dynax (Stuttgart)	Mikrotiterplattenlesegerät Dynatech MR7000
Elementar (Hanau)	Elementaranalysator Vario EL III
Eppendorf (Hamburg)	Thermomixer comfort, Thermomixer 5436/5437, Tischzentrifuge 5415R, Mastercycler „ep gradient“, Präzisionspipetten
GFL (Burgwedel)	Wasserbad, Schüttelinkubator
Gilson (Abimed Langenfeld)	Präzisionspipetten
Heraeus Holding GmbH (Hanau)	Brutschränke, Zentrifuge Sorvall RC5C Plus, Biofuge fresco, Vortex Genie 2™
Kontron Ag (Eching/München)	Uvikon Spectrophotometer 922
Liebherr (Ochsenhausen)	Kühlschränke, Tiefkühlschränke
Peqlab (Erlangen)	Horizontalelektrophoresen
Perkin Elmer (New Jersey, USA)	Thermocycler 9700
Raytest (Straubenhardt)	Phosphorimager FLA 5100, Eraser

Sanyo (Bad Nenndorf)	Ultratiefkühlschränke
Sartorius Ag (Göttingen)	Analysenwaage
Stratagene (Heidelberg)	Geldokumentation Eagle Eye™ II, UV Stratalinker® 2400, PicoFuge™
Zeiss (Göttingen)	konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510 Meta

2.1.11 Software, Datenbanken und interaktive Webprogramme

Software

Applied Biosystems (Foster City, USA)	SDS 2.2.1 Sequence Detection System, Primer Express 2.0
DNASTAR Inc. (Madison WI, USA)	Lasergene® Sequence Analysis
Microsoft Corporation (USA)	Microsoft Office® 2003
Raytest (Straubenhardt)	TINA 2.0, AIDA Image Analyzer v 4.06
Zeiss (Göttingen)	LSM Image Browser
Thomson (Stamford CT, USA)	Endnote 8.0.2

Datenbanken und interaktive Webprogramme

ARAMEMNON – öffentliche Datenbank für Membranproteine aus Arabidopsis und Reis (Schwacke et al., 2003)

(<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>)

BLAST – Basic local alignment search tool (Altschul et al., 1990)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

CR-EST – Crop-EST, öffentliche Datenbank mit Zugang zu Sequenz-, Klassifizierungs-, Clustering- und Annotationsdaten von Kulturpflanzen EST Projekten des IPK (Künne et al., 2005)

(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/>)

EMBL-EBI – European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute

(<http://www.ebi.ac.uk/>)

ExpASy – Expert Protein Analysis System, Proteomics Server des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)

(<http://us.expasy.org>)

NCBI – national center for bio**te**chnology information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

PlantCARE – öffentliche Datenbank von pflanzlichen *cis*-regulatorischen Elementen (Rombauts et al., 1999)

(<http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE/>)

PLACE – eine Datenbank von pflanzlichen *cis*-regulatorischen Elementen (Higo et al., 1999)
<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>

Promoter 2.0 – Programm für die Vorhersage von Transkriptionsstartpunkten (Knudson, 1999)

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>)

SoftBerry – öffentliche Datenbank für pflanzliche Promotorsequenzen (Shahmuradov et al., 2003)

(<http://www.softberry.com/berry.phtml>)

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierung und Sequenzierung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendeten Standardmethoden wie Bakterienanzucht, Restriktionsspaltungen, Klonierungsschritte, Auftrennung der DNA in Agarosegelen und DNA-Konzentrationsbestimmungen wurden nach den von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Protokollen durchgeführt.

PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem „Qiaquick Gel Extraction Kit“ nach Herstellervorschrift aus dem Agarosegel gereinigt. Die gereinigten Fragmente wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten, mit dem „PCR Purification Kit“ erneut aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt. Für Ligationen wurde der „Rapid DNA Ligation Kit“ (Fermentas) benutzt. Die direkte Subklonierung von Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten wurde mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Der ebenfalls in diesem Kit enthaltene Bakterienstamm TOP10 wurde für die anschließende Transformation verwendet. Für die Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA wurde der „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ oder der „Qiagen Plasmid Mini Kit“ verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und vor der Ligation gewöhnlich mit alkalischer Phosphatase (Fermentas) dephosphoryliert. Die Transformation der *E.coli*-Stämme wurde nach der Hitzeschock-Methode in Anlehnung an (Cohen et al., 1972) durchgeführt.

Die Sequenzierung von DNA wurde entweder am IPK Gatersleben oder kommerziell von der Firma Agowa (Berlin) ausgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Lasergene[®] Sequence Analysis (DNASTAR) ausgewertet.

2.2.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation von Agrobakterien wurde eine Modifikation der von Holsters et al. (1978) und Nishiguchi et al. (1987) beschriebenen Methoden verwendet. Kompetente Agrobakterien-Zellen (Stamm EHA105) wurden mit 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNA vermischt und nachfolgend 5 min auf Eis, 5 min in flüssigem Stickstoff und 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurden die Zellen für 2-4 h bei 28°C geschüttelt. 200 µl Aliquots wurden auf YEB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und für 2 Tage bei 28°C inkubiert.

2.2.3 Pflanzentransformation und Selektion

Transformation von Arabidopsis thaliana

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana* erfolgte durch den Stamm EHA105 (Hood et al., 1993) nach der Blütentauchmethode (floral dip; [Clough and Bent, 1998]). Als Ausgangsmaterial dienten *A. thaliana* Pflanzen im Blütenstadium, die zuvor drei Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Belichtung) und danach drei Wochen unter Langtagbedingungen (16 h Belichtung) kultiviert wurden. Von einer Agrobakterien-Vorkultur wurden zunächst je 2 ml in 4x 250 ml YEB-Medium mit Antibiotika überimpft. Diese Hauptkulturen wurden ü/N bei 28°C bis zu einer $OD_{600} > 2$ geschüttelt und die Bakterien anschließend zentrifugiert (6000 x g, 20 min). Die Pellets wurden in insgesamt 1 – 1,5 l Infektionsmedium (MS mit 0,5 % Saccharose und 0,04 % Silwet L-77) resuspendiert. Bei den zu transformierenden Pflanzen wurden bereits ausgebildete Schoten abgeschnitten und die Blütenstände dann für 1 min in die Agrobakterien-Suspension getaucht. Die behandelten Pflanzen wurden anschließend für 24 h liegend mit geschlossener Kunststoffhaube und danach offen unter Langtagbedingungen bis zur Samenreife im Pflanzenkulturraum kultiviert. Die Selektion transgener Pflanzen mit dem *bar*-Gen, welches Resistenz gegen Phosphinotricin vermittelt, erfolgte durch Aussaat von etwa 200 Samen in Erde. Die Pflanzen wurden im Keimblattstadium mit einer 1:5000 Verdünnung des Herbizids Basta® besprüht und diese Anwendung nach etwa einer Woche wiederholt, um eine ausreichende Selektion transgener Pflanzen zu erhalten. Resistente Pflanzen wurden getopft und unter Langtagbedingungen weiter kultiviert.

Transformation von Nicotiana tabacum

Für die Tabaktransformation wurden Blätter steril angezogener, 4 Wochen alter *N. tabacum* Pflanzen in 1x1 cm große Stücke geschnitten, auf MS-Medium gelegt und 2-3 Tage in diffusem Licht bei 21°C vorkultiviert. 0,5 ml einer *A. tumefaciens* Übernachtskultur, die den

entsprechenden Vektor für die Pflanzentransformation enthielt, wurden mit 10 ml MS-Medium verdünnt. Die Blattstücken wurden für 30 min in die Agrobakteriensuspension gelegt, danach auf MS-Medium überführt und für 2-3 Tage in diffusem Licht bei 21°C kokultiviert. Anschließend wurden die Blattscheiben auf Selektionsmedium (MS, 10 mg/L PPT, 200 mg/L Ticarcillin) gelegt, bei 21°C und 16 h Licht kultiviert und alle 10 Tage auf frisches MS-Medium umgesetzt (ca. 3 Mal). Regenerierte Sprosse wurden abgeschnitten, bis zur Wurzelbildung auf MS-Medium (+ 10 mg/L PPT, 200 mg/L Ticarcillin) kultiviert und letztlich in Erde überführt.

Transformation von *Pisum sativum*

Für die Erbsentransformation wurde ein modifiziertes Protokoll der von Schroeder et al. (1993) beschriebenen Methode angewandt. Dazu wurden unreife Hülsen 2-5 Tage nach dem Erreichen des maximalen Frischgewichtes geerntet. Die Hülsen wurden nachfolgend in 70 % Ethanol (10 min) und 50 % „Domestos“ Haushaltsreiniger (10 min) sterilisiert und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen. Danach wurden die Samen aus den Hülsen entfernt und die Explantate für die Transformation aus der Embryoachse dieser Samen geschnitten. Für die Präparation der Explantate wurde das Wurzelende jedes Segmentes abgeschnitten und Bereiche des Epikotyls sowie des Apikalmeristems mit einer Rasierklinge in drei bis fünf Längsschnitte geteilt. Diese Scheiben wurden für 30-40 min mit der Agrobakteriensuspension inkubiert, auf festes B5-Medium gelegt und für 3-4 Tage bei 21°C und 16 h Licht mit den Agrobakterien kokultiviert. Danach wurden die Explantate 5x mit B5-Medium gewaschen und zur Kallusinduktion auf P1-Medium mit 10 mg/l PPT gesetzt. Nach 15 Tagen wurden die Explantate zur Sprossentwicklung auf MS4-Medium mit 10 mg/l PPT überführt und alle 20 Tage (3-4 Mal) auf frisches MS4-Medium umgesetzt. Primäre Sprosse, die sich aus bereits vorhandenen Meristemen entwickelten, wurden entfernt und verworfen. Nach etwa 2 Monaten wurde die Phosphinotricinkonzentration auf 5 mg/l PPT herabgesetzt. Regenerierte Sprosse wurden abgeschnitten und auf MS1-Medium überführt. Nach 6-12 Wochen Kultivierung wurden Sprosse >0,5 cm *in vitro* auf einen Wurzelstock von etiolierten, 5-7 Tage alten *P. sativum* Keimlingen gepfropft. Nach ca. 10 Tagen wurden die gepfropften Pflanzen in Erde gepflanzt und in der Phytokammer weiter gezogen. Die Pflanzen wurden zunächst unter transparenter Abdeckung gehalten und dann stufenweise an eine geringere Luftfeuchte angepasst bis zur vollständigen Entfernung der Abdeckung. Die Blätter der Primärtransformanten wurden mit Erreichen des 4-6 Knotenstadiums mit einer 0,5 %-igen Lösung des Herbizids Basta® (Hoechst) bestrichen, um eine entsprechende Resistenz festzustellen und somit transgene Pflanzen zu selektieren.

2.2.4 Pflanzenanzucht und Materialentnahme

A. thaliana

Arabidopsis-Pflanzen vom Columbia-Ökotyp wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h dunkel, 22°C) in einem Pflanzenkulturraum gezogen. Das Substrat bestand aus einem Gemisch aus Erde und Quarzsand.

N. tabacum

Tabakpflanzen (*N. tabacum* L. cv. SNN) wurden *in vitro* in Pflanzenkulturräumen bei 16 h Licht / 8 h dunkel und 22°C angezogen. Die Blätter 4 Wochen alter Pflanzen wurden für den Agrobakterien-vermittelten Gentransfer eingesetzt. Regenerierte Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 23°C und 16 h Licht weiter kultiviert.

Transgene Promotor/GUS-Tabakpflanzen wurden im Alter von 4 bis 6 Wochen aus der *in vitro*-Kultur genommen und hydroponisch weiter gezogen. Dazu wurden die *in vitro* Pflanzen zunächst für zwei Wochen in Sand ausgepflanzt und danach in Erlenmeyerkolben mit flüssigem MS-Medium überführt. In Flüssigmedium entwickeln die Pflanzen kräftigere Wurzeln als in Medium mit Agar.

H. vulgare

Gerstenpflanzen der Sorte „Barke“ (Sommergerste) wurden im Gewächshaus kultiviert.

Um die Expression von Aminosäuretransportern in sich entwickelnden Karyopsen und vegetativen Geweben zu analysieren, wurden die Ähren selbstbestäubter Blüten am Tag der Befruchtung etikettiert (0. DAF). Die Karyopsen wurden vom 0. DAF bis 20. DAF im Abstand von zwei Tagen geerntet. Dabei wurde das maternale Perikarp von den filialen Geweben (Endosperm und Embryo) getrennt präpariert. Ab dem 12. DAF wurden Endosperm und Embryo voneinander getrennt. Alle geernteten Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

P. sativum

Erbsepflanzen (*Pisum sativum* L. cv. Eiffel bzw. Erbi) für die Transformation wurden in Phytokammern bei 16 h Licht / 18°C und 8 h dunkel / 16°C angezogen. Die Hülsen wurden 2-5 Tage nach Erreichen des maximalen Frischgewichtes geerntet und die unreifen Samen für die Agrobakterien-vermittelte Transformation verwendet. Folgegenerationen der transgenen Pflanzen wurden zum Teil in Phytokammern (16 h Licht / 18°C und 8 h dunkel / 16°C) oder in Gewächshäusern ohne zusätzliche Licht- und Temperaturregulation (März bis Juli) angezogen.

Für die Inhaltsstoffanalyse und um die Expression von *VfAAP1* in sich entwickelnden Samen zu untersuchen, wurden selbstbestäubte Blüten am Tag der Befruchtung etikettiert (0. DAF). Die Samen wurden vom 15. DAF bis 35. DAF geerntet. Dabei wurde die Samenschale von den Kotyledonen entfernt und die Kotyledonen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Pro Entwicklungsstadium und Linie wurden Hülsen von fünf verschiedenen Pflanzen geerntet. Um die Expression von *VfAAP1* und *VfPTR1* unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors zu überprüfen, wurden zusätzlich *source*-Blätter geerntet und ebenfalls in Stickstoff eingefroren.

2.2.5 Kreuzung von Erbsenpflanzen

Für die Kreuzung der homozygoten Linie *sucAAP 5/8* mit der ebenfalls homozygoten Linie *LeB4AAP 14/10* wurden Samen dieser Linien gleichzeitig ausgelegt, um einen vergleichbaren Blühzeitpunkt zu gewährleisten. Von den Blüten einer Elternlinie wurden die unreifen Antheren entfernt und die Blüten dann mit dem fremden Pollen der anderen Elternlinie bestäubt. Dabei dienten sowohl *sucAAP*- und *LeB4AAP*-Pflanzen jeweils als Pollenspender und Pollenempfänger. Die resultierenden F_1 -Samen sind für beide Konstrukte heterozygot und können für weitere Nachkommenschaftsanalysen verwendet werden.

2.2.6 Isolierung genomischer DNA und Southern Blot

Für die Isolierung genomischer DNA wurde ca. 200 mg gefrorenes Blattmaterial in einer Schwingmühle zerkleinert und anschließend in DNA-Extraktionspuffer (1 % N-Lauryl-Sarcosin, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl) und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:50:1) suspendiert. Nach der Zentrifugation (5000 rpm, 3 min, RT) wurde der Überstand mit 3 M Natriumazetat pH 5,2 und Isopropanol gefällt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C), das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und letztlich in 10 mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert. RNA-Verunreinigungen wurden durch RNase-Behandlung (1 h, 37°C) entfernt.

Für den Southern Blot wurden 10 μg DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in einem 1 %-igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA) aufgetrennt. Danach wurde das Gel 5 min mit 0,25 M HCl behandelt, anschließend denaturiert (2x 15 min mit 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und neutralisiert (2x 15 min mit 0,5 M Tris-HCl pH 8, 3 M NaCl). Die DNA wurde dann unter Verwendung von 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumzitat) auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺) transferiert und durch UV-Quervernetzung (UV Stratalinker[®] 2400) auf der Membran immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit [α -³²P]dCTP radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten (RediPrimell Labeling

System) in modifiziertem Church Puffer (0,5 M Natriumphosphat, 7 % SDS, 1 % BSA, 2 mM EDTA; [Church and Gilbert, 1984]) bei 65°C in Anwesenheit von nicht-homologer „Salmon Sperm DNA“ (Stratagene). Die hybridisierten Membranen wurden 3x 20 min bei 65°C mit Spüllösung (40 mM Natriumphosphat pH 7,2, 1 % SDS, 2 mM EDTA) gewaschen und je nach Signalstärke unterschiedlich lange exponiert.

2.2.7 RNA-Isolierung und Northern Blot

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte wie in (Heim et al., 1993) detailliert beschrieben. Pflanzliches Gewebe wurde in RNA-Extraktionspuffer (1 M Tris-HCl pH 7, 10 mM EDTA, 1 % SDS) und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:50:1) homogenisiert. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase mit Phenol/Chloroform extrahiert, die Nukleinsäuren wurden mit 3 M Natriumazetat pH 5,2 und 96 % Ethanol gefällt und in Wasser gelöst. Die RNA wurde anschließend ü/N bei 4°C mit 4 M Lithiumchlorid gefällt, nacheinander mit 2 M Lithiumchlorid und 70 % Ethanol gewaschen und in Wasser gelöst.

Für die Northern Blot Analyse wurden 10 µg RNA in einem 1 %-igen Formaldehyd-Agarosegel in 1x MOPS-Puffer aufgetrennt, unter Verwendung von 20xSSPE (3,6 M NaCl, 0,2 M Natriumphosphat, 0,02 M EDTA pH 7,7) auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺) transferiert und durch UV-Quervernetzung auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung erfolgte nach Church and Gilbert (1984) wie unter 2.2.6 für den Southern Blot beschrieben. 25S rDNA wurde zur Hybridisierung eingesetzt, um die relativen RNA-Mengen zu bestimmen, die in jeder Spur aufgetragen wurden.

2.2.8 Transiente Expression von Reporterfusionen in Protoplasten

Isolation und Transformation von Protoplasten

Protoplasten für die transiente Genexpression wurden aus Suspensionszellkulturen von *A. thaliana*, *H. vulgare* und *V. faba* sowie aus Arabidopsis-Blättern isoliert. Die Suspensionszellen wurden dazu zunächst zentrifugiert (5 min, 800 rpm, RT), das Pellet in Enzymlösung (2 % Cellulase, 1 % Macerozyme in K3-Medium) aufgenommen und ü/N zum Zellwandabbau inkubiert. Die freigesetzten Protoplasten wurden mit W5 Waschlösung (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 5 mM KCl, 5,5 mM Glukose, pH 5,6) verdünnt, durch ein 80 µm Nygonsieb filtriert, zentrifugiert (10 min, 800 rpm, RT), mit W5 und MgMannit (0,45 M Mannitol, 15 mM MgCl₂, 0,1 % MES pH 5,6) gewaschen und letztlich in MgMannit aufgenommen (ca. 3x10⁶ Zellen/ml). Für die Isolation von Mesophyllprotoplasten wurden die Blätter von Arabidopsis-Pflanzen kleingeschnitten, eingeritzt und mit der genannten Enzymlösung behandelt. Die freigesetzten Protoplasten wurden analog zu den

Suspensionsprotoplasten behandelt. Für die Transformation wurden 10^6 Protoplasten/ml 5 min bei 42°C inkubiert, für 1 min ins Eisbad gestellt und mit 10-30 µg Plasmid-DNA sowie 160 µg Kalbsthymus-DNA versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert, mit 350 µl PEG 6000 (40 %) gemischt, 20 min bei RT inkubiert und unter Zusatz von 4 ml K3-Medium bis zur Aufarbeitung 24 – 48 h dunkel bei 22°C inkubiert.

Promotortestungen

Für die *VfPTR1* Promotortestungen wurde als Reporter gen das in Pflanzen nicht vorhandene bakterielle Gen der β -Glucuronidase (GUS), *uidA*, verwendet. Die putativen *VfPTR1*-Promotorfragmente wurden vor das *uidA*-Gen in den promotorlosen Vektor pGUS1 kloniert. Die β -Glucuronidase katalysiert die hydrolytische Spaltung vieler β -Glucuronide. In diesem Fall wird das Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG) zu 4-Methylumbelliferon (MU) hydrolysiert, welches durch seine Fluoreszenz nachweisbar ist. Über die Intensität der Fluoreszenz kann auf die enzymatische Aktivität der β -Glucuronidase geschlossen und diese quantifiziert werden. Die Protoplasten wurden nach der Transformation 24 h dunkel inkubiert und anschließend unter Verwendung des GUS-Light™ Kit nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die spezifische Aktivität der β -Glucuronidase wurde mit einem Luminometer gemessen.

Expression von GFP-Fusionsproteinen in Protoplasten

Um die intrazelluläre Lokalisierung verschiedener Proteine aufzuklären, wurden translationale Fusionen mit GFP (*green fluorescent protein*) erstellt. GFP stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* und fluoresziert grün bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht. Da GFP in nahezu allen eukaryontischen Zellen nicht toxisch wirkt, ist es sehr gut für *in vivo* Untersuchungen geeignet. Für diese Versuche wurde die Codon-optimierte Variante, das sogenannte *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) verwendet, welches im Vergleich zum Wildtyp eine 5-10fach stärkere Expression aufweist. Die transformierten Protoplasten wurden 1-2 Tage bei 22°C dunkel kultiviert und anschließend durch Anregung mit blauem Licht (488 nm) mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop auf GFP-Fluoreszenzsignale untersucht.

2.2.9 Genome Walking

Um die Promotorsequenz des *VfPTR1*-Gens zu isolieren, wurde *genome walking* mit dem Universal Genome Walker™ Kit der Firma Clontech nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, unbekannte genomische Sequenzen zu amplifizieren, die sich unmittelbar an eine bereits bekannte DNA-Sequenz anschließen. Für die Herstellung der

genome walking Bank wurden 2,5 µg genomische DNA von *V. faba* ü/N bei 37°C mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, die glatte Enden produzieren (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*). Nach der Reinigung der DNA wurde an das 5'- und 3'-Ende der genomischen Fragmente der *genome walker* Adaptor ligiert. Mit einem genspezifischen Primer (VfPTR1_GSP1) und dem Adaptorprimer AP1 wurde anschließend eine PCR-Reaktion durchgeführt, um genomische *VfPTR1*-Fragmente zu amplifizieren. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, folgte der ersten PCR eine *nested* PCR mit einem zweiten genspezifischen Primer (VfPTR1_GSP2) und dem Adaptorprimer AP2. Für die PCR wurde das Advantage[®] 2 Polymerase Enzyme System der Firma Clontech verwendet. Die erhaltenen Fragmente wurden aus dem Gel eluiert, in den Vektor pCR[®]4-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

2.2.10 Quantitative real-time (qRT) PCR

Zum Nachweis der Expression von *VfAAP1* unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors in Blättern transgener Erbsen, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurde aus Blättern (4. DAF) RNA isoliert und 2 µg Gesamt-RNA unter Verwendung des First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Für die PCR-Amplifikation wurden mit Hilfe des Programms Primer Express spezifische Primer aus den 5'- und 3'-Bereichen der *VfAAP1* cDNA abgeleitet, die Produkte von etwa 60 bp Länge liefern. Als Kontrolle wurden zusätzlich Primer aus den 5'- und 3'-Bereichen eines konstitutiv exprimierten *PsActin*-Gens abgeleitet. Um zu überprüfen, ob die eingesetzte RNA frei von genomischer DNA ist, wurde eine PCR mit Primern aus einem Intronbereich des *PsActin*-Gens durchgeführt. Alle Reaktionen wurden in 10 µl Endvolumen und unter Verwendung des Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Die qRT-PCR wurde standardmäßig nach folgendem Programm ausgeführt:

Schritt	Zeit	Temperatur
1	2 min	50°C
2	10 min	95°C
3-47	15 sek	95°C
	1 min	60°C
48	15 sek	95°C
49	15 sek	60°C
50	15 sek	95°C

Tab. 2.1: Schema für die quantitative real-time PCR

Die Auswertung der qRT-PCR Reaktion erfolgte mit der Software SDS 2.2.1 (Applied Biosystems).

2.2.11 Analyse von Promotoraktivitäten in Pflanzen

Um die putativen Promotorbereiche von *VfPTR1* auf eine Aktivität in pflanzlichen Geweben zu testen, wurden Fusionskonstrukte mit dem GUS-Gen (*uidA*) bzw. dem GFP-Gen (*eGFP*, *enhanced GFP*) erstellt.

GUS-Färbung transgener Promotor/GUS-Pflanzen

Die enzymatische Aktivität der β -Glucuronidase lässt sich im pflanzlichen Gewebe histochemisch mittels einer Farbreaktion nachweisen, da bei der hydrolytischen Spaltung des Substrates 5-Brom-4-chlorindolyl- β -D-glucoronid (X-Gluc) der schwer lösliche Indigo-Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo entsteht. Dieser Farbstoff fällt an den Orten der Enzymaktivität aus (Jefferson et al., 1987). Für die Analysen wurden Wurzel-, Stängel- oder Blattstückchen mit der Rasierklinge von transgenen Tabakpflanzen abgetrennt und in GUS-Färbelösung (50 mM NaPi pH 7,0, 0,5 mM X-Gluc, 1 mM EDTA, 0,05 % v/v Triton-X100, 0,1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$) ü/N bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgezogen und die Proben zur Extraktion des Chlorophylls in 70 %-igen Ethanol überführt. Die entfärbten Proben wurden am Stereomikroskop ausgewertet und fotografiert.

Analyse transgener Promotor/GFP-Pflanzen

Wurzeln transgener Tabakpflanzen wurden mit der Rasierklinge abgeschnitten, mit GFP-Anregungslicht (488 nm) bestrahlt und am konfokalen Laserscanning Mikroskop ausgewertet. Von Stängeln wurden zunächst 200 μ m dicke Quer- und Längsschnitte mit dem Vibratom erzeugt und diese am Mikroskop betrachtet. Von sich entwickelnden Samen transgener Erbsenpflanzen (26. DAF) wurden ebenfalls mit dem Vibratom 200 μ m dicke Querschnitte erstellt und diese auf GFP-Fluoreszenz untersucht.

2.2.12 Inhaltsstoffanalyse von sich entwickelnden und reifen Samen

Extraktion von Speicherproteinen

Für die Bestimmung der Speicherproteinfraktionen (Albumine und Globuline) sowie des Gesamtkohlenstoff- und -stickstoffgehaltes wurden reife Erbsensamen in einer Schwingmühle zu feinem Pulver gemahlen und dieses ü/N bei 60°C getrocknet. Unreife Samen verschiedener Entwicklungsstadien wurden zunächst für drei Tage gefriergetrocknet und anschließend ebenfalls in der Schwingmühle gemahlen. Für die Extraktion der Albumine wurden 50 mg vom getrockneten Mehl zunächst mit Slytermann-Puffer (50 mM Azetat, 1 mM KCl, 10 % DMSO, 0,5 % Butanol, pH 4,5) versetzt, 15 min bei 4°C und 1000 rpm geschüttelt, zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C) und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt. Danach wurde das Pellet zur Extraktion der Globuline in

Phosphatpuffer (100 mM KH_2PO_4 , 100 mM Na_2HPO_4 , 500 mM KCl, pH 7) resuspendiert und wie für den Slytermann-Puffer beschrieben, behandelt. Die Konzentration der löslichen Proteine im Überstand wurde mit einem Spektrophotometer nach Bradford (1976) bestimmt, wobei BSA als Standardprotein diente.

Bestimmung des C- und N-Gehaltes

Der relative Gehalt an Gesamtkohlenstoff und –stickstoff in den Samen wurde mit einem Elementaranalysator nach Dumas Verbrennungsmethode bestimmt. Dazu wurden 3 mg des zuvor getrockneten Pulvers für die Messung eingewogen. Die Proben werden im Analysator unter kontrollierter Sauerstoffzufuhr bei hohen Temperaturen verbrannt.

Extraktion von Stärke, Saccharose und Aminosäuren

Stärke wird durch Amyloglucosidase bei pH 4,6 zu D-Glukose gespalten. Die gebildete D-Glukose wird durch die Enzyme Hexokinase und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) bestimmt. D-Glukose wird unter Verwendung von ATP durch die Hexokinase phosphoryliert, wobei D-Glukose-6-phosphat (G-6-P) und ADP entstehen. G-6-P wird durch NADP in Anwesenheit von G6P-DH zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert, wobei NADPH entsteht. Die gebildete Menge NADPH wird bei 340 nm gemessen und ist proportional zu der durch die Stärkehydrolyse gebildeten D-Glukose-Menge. Für die Bestimmung des Saccharosegehaltes wird der D-Glukosegehalt nach enzymatischer Hydrolyse der Saccharose bestimmt. Dabei werden zwei Messungen, vor und nach der enzymatischen Inversion, durchgeführt und die Differenz der Glukosekonzentrationen ergibt den Saccharosegehalt. Messgröße ist auch hier NADPH.

20 mg des getrockneten Mehls wurde eingewogen, mit je 20 μl der Standardlösungen Norleucin (5 mM) und $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (5 mg/ml) sowie 710 μl 80 % Ethanol versetzt und für 30 min bei 60°C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde erneut in 750 μl 80 % Ethanol resuspendiert, zunächst für 10 min bei RT und dann nochmals für 30 min bei 60°C geschüttelt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit dem ersten vereinigt. Für die Bestimmung der freien Aminosäuren mittels HPLC wurden 100 μl des Überstandes verdampft und die getrocknete Probe in 250 μl H_2O aufgenommen. Für die Bestimmung der Zucker wurde der gesamte Überstand verdampft und die Probe in 500 μl H_2O aufgenommen. Für die Stärkebestimmung wurde das Pellet in 1 - 2 ml 0,5 M KOH gelöst und für 1 h bei 95°C gekocht. 5 μl von der Probe wurden dann mit 100 μl Amyloglukosidase-Puffer (75 U/ml Amyloglukosidase in 100 mM tri-Natriumzitat x 2 H_2O pH 4,6) versetzt und 30 min bei 60°C geschüttelt. Zum gesamten Ansatz wurden 750 μl Bestimmungspuffer (100 mM Imidazol pH 6,9, 5 mM MgCl_2 x 6 H_2O , 2 mM NAD, 1 mM ATP) und 2 μl G6P-DH gegeben und die

Mischung für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 10 µl Hexokinase (1:1 verdünnt) zugegeben und die Extrakte weitere 25 min bei RT inkubiert. Die Vermessung der Proben erfolgte mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm. Für die Zuckerbestimmung wurden 10 µl der Probe eingesetzt, mit Bestimmungspuffer und G6P-DH versetzt, 10 min inkubiert, mit 5 µl Hexokinase versetzt, 10 min inkubiert und dann das erste Mal vermessen. Danach wurde den Proben 10 µl β-Fruktosidase zugefügt, diese für 30 min bei RT inkubiert und erneut bei 340 nm vermessen.

2.2.13 Arbeiten mit Hefe

Kultivierung, Transformation und Komplementation von *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen

Zur Erhaltung und Herstellung kompetenter Zellen wurden die Hefestämme auf Vollmedium (YPD) bei 30°C angezogen. Für die Stämme JT16 und LR2 wurde dem Vollmedium 2 mM Histidin zugesetzt. Die Transformation der Hefestämme erfolgte nach Dohmen et al. (1991): Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 50 ml YPD-Medium mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes inokuliert ($OD_{600} = < 0,1$). Bei einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml ($OD_{600} = 0,5-0,8$) wurden die Zellen zentrifugiert (3000 rpm, 5 min, RT), mit 20 ml Lösung A (10 mM BICINE pH 8,35, 1 M Sorbitol, 3 % Ethylenglykol) gewaschen, erneut zentrifugiert und in 2 ml Lösung A aufgenommen. Aliquots dieser Zellen wurden bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurden 1 µg Plasmid-DNA, 25 µg Carrier-DNA (*salmon sperm* DNA) und 5 µl 1 M Histamin gemischt, zu den gefrorenen Zellen gegeben und 5 min bei 37°C und 600 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml Lösung B (20 mM BICINE pH 8,35, 40 % PEG1000) versetzt, vorsichtig gemischt und 1 h bei 30°C inkubiert. Dann wurde die Mischung zentrifugiert (3000 rpm, 1 min, RT), das Pellet mit 800 µl Lösung C (10 mM BICINE pH 8,35, 150 mM NaCl) gewaschen und in 60-100 µl Lösung C aufgenommen. Die Zellen wurden zur Selektion positiver Transformanden auf SD-Medium ohne Uracil (SD-ura) plattiert und bei 30°C inkubiert. Das *ura3*-Gen dient als Selektionsmarker und ist Bestandteil des Hefeexpressionsvektors pDR196. Die eingesetzten Hefestämme tragen eine Mutation in dem für die Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase codierenden *ura3*-Gen, d.h. sie sind nicht in der Lage Uracil selbst zu synthetisieren. Erst durch die Aufnahme des Plasmids wird ein funktionelles *ura3*-Gen bereitgestellt.

Für die funktionelle Komplementation wurden je zwei unabhängige Kolonien der transformierten Hefestämme auf Minimalmedium (MM oder SC) ausgestrichen, welches je nach Stamm bestimmte Aminosäuren oder Dipeptide als einzige Stickstoffquelle enthält. In der Tabelle 2.2 sind die verschiedenen Medien für die einzelnen Stämme aufgelistet. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30°C für drei bis fünf Tage. Das nicht-selektive SD-

Medium enthält 0,5 % Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle. Für die Stämme JT16 und LR2 wurde auch dem Selektivmedium Ammoniumsulfat zugesetzt. NH_4^{2+} -Ionen hemmen bis zu einem gewissen Grad die generelle Aminosäurepermease GAP1 von *S. cerevisiae*, so dass über diesen Transporter kein Histidin aufgenommen werden kann. Erst in hohen Konzentrationen von 20 mM (nicht-selektive Bedingungen) kann Histidin eintransportiert werden.

Hefestamm	Selektivmedium	Nicht-selektives Medium
22574d	MM + 1 g/l Prolin, Citrullin oder GABA	SD
22Δ6AAL	MM + 1 g/l Urea, + 100 μM Lysin	MM + 1 g/l Urea, + 1 g/l Lys-Asp
21.983c	MM + 1 g/l Arginin	SD
30.537a	MM + 1 g/l Glutamat	SD
YDR544	MM + 1 mM Methionin, Phenylalanin, Valin bzw. Isoleucin	SD
JT16	SC + 5 mM Histidin	SC + 20 mM Histidin
LR2	SC + 10-20 mM His-Ala	SC + 20 mM Histidin

Tab. 2.2 : Übersicht über die verwendeten Hefestämme sowie die zugehörigen selektiven und nicht-selektiven Medien

Isolation von intakten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* und Messung der Atmungsrate

Die Isolation von intakten Mitochondrien wurde mittels differentieller Zentrifugation in Anlehnung an Daum et al. (1982) durchgeführt. Der Hefestamm 22574d wurde mit *HvGAP1* transformiert und positive Transformanten auf SD-ura Medium selektiert. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurde über eine Vorkultur eine 1 l-Kultur angelegt, und die Hefezellen bei Erreichen einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 5-6$ abzentrifugiert (10 min, 4500 rpm, 4°C). Es wurde das Feuchtgewicht bestimmt und die Zellen in Aufschlusspuffer (0,1 M Tris- SO_4 , 10 mM DTT) resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min bei 30°C geschüttelt, erneut zentrifugiert (4 min, 4000 rpm, 4°C), mit Sorbitlösung (1,2 M Sorbit, 20 mM KH_2PO_4) gewaschen und in Sorbitlösung aufgenommen. Zur Protoplastierung wurde 2 mg Zymolyase/g Feuchtgewicht zugegeben und die Suspension 1 h bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Protoplasten zur Lyse 1:40 mit H_2O verdünnt, zentrifugiert (4 min, 3000 rpm, 4°C), mit 1,2 M Sorbit gewaschen und in Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbit, 10 mM Tris-Cl pH 7,4, 0,5 % BSA, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Zellen wurden homogenisiert und Zelltrümmer sowie nicht aufgebrochene Protoplasten durch Zentrifugation (4 min, 4000 rpm, 4°C) abgetrennt. Für die Sedimentation der Mitochondrien wurde der Überstand 10 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7,4) gewaschen und die Mitochondriensuspension erneut sedimentiert (10 min, 12000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in

SEM-Puffer aufgenommen und von der Mitochondriensuspension eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Für die Bestimmung der Atmungsrate in der Suspension wurden die Mitochondrien mit Messpuffer (3 mM ADP, 2 mM K-Phosphat, 10 mM MgSO₄, 10 mM Tris-Azetat pH 7,3, 2 mM EDTA, 0,2 % BSA, 250 mM Saccharose) versetzt und 0,5 M Succinat bzw. GABA zugegeben. Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Suspensionsmedium ist ein Maß für die Atmung. Dabei wurde der Sauerstoffverbrauch in nmol pro mg Protein pro Minute berechnet. Die Zugabe von Gramicidin als Entkoppler bewirkt den Einstrom von Protonen in die Mitochondrien durch eine Erhöhung der Permeabilität für H⁺-Ionen. Die ATP-Synthese kommt trotz eines intakten nicht-zyklischen Elektronentransports mit NADH-Bildung zum Erliegen.

2.2.14 Herstellung und Reinigung polyklonaler Peptidantikörper

Herstellung von Peptidantikörpern

Die Herstellung der Peptidantikörper gegen VfPTR1 inklusive Peptidsynthese wurde von der Firma Pineda Antikörperservice (Berlin) durchgeführt. Für die Immunisierung wurde ein Peptidcocktail zweier 14 Aminosäuren langer Peptide vom N- bzw. C-Terminus verwendet. Die synthetischen Peptide wurden an das Carrier-Protein KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) konjugiert und drei Kaninchen mit dem Peptidcocktail immunisiert. Während der Immunisierungsphase wurden regelmäßig Serumproben auf ihre Antigen-spezifität im ELISA und Western Blot getestet. Am 120. Immunisierungstag wurde das gesamte Rohserum gewonnen.

Reinigung der Peptidantikörper

Für die Aufreinigung des Kaninchen-Rohserums wurden verschiedene Methoden angewandt. Um Lipide, Salze und Nukleinsäuren aus dem Rohserum zu entfernen, wurde zunächst eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Dazu wurden 50 ml Rohserum unter Rühren tropfenweise mit 50 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt, 2 h auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (4000 rpm, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde in 25 ml PBS (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5) gelöst und gegen PBS dialysiert.

Um die Immunglobulin G (IgG) Fraktion, die die antigenbindenden Antikörper enthält, zu erhalten, wurde das gefällte Serum über eine Protein A-Säule (Protein A Sepharose CL-4B, GE Healthcare) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Säule wurde zunächst mit PBS äquilibriert, mit 1 ml Serum beladen und die verschlossene Säule für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit PBS gewaschen und letztlich die IgG-Fractionen mit

0,1 M Glycin-HCl (pH 2,8) eluiert. Die Antikörperlösung wurde sofort mit 1 M Tris (pH 8) neutralisiert. Alle Antikörperfraktionen wurden unter Verwendung von „iCON Concentrator“ Röhren (Pierce) nach Herstellerangaben eingengt und gegen PBS dialysiert.

Das Serum wird spezifisch gereinigt, wenn sogenannte Antigen-Säulen verwendet werden, mit denen nur die antigenbindenden Antikörper aufgereinigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür NHS-aktivierte Affinitätsäulen nach Herstellervorschrift benutzt (HiTrap NHS-activated HP, GE Healthcare). Die Säulen wurden zunächst mit 1 mM HCl aktiviert, dann erfolgte die kovalente Ligandenkopplung über primäre Aminogruppen der Peptide. Dazu wurden 8 - 10 mg jedes Peptids in Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gelöst, auf die Säulen aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Um überschüssige aktive Gruppen zu deaktivieren und unspezifisch gebundenen Liganden zu entfernen, wurden die Säulen im mehrmaligen Wechsel mit Puffer A (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3) und Puffer B (0,1 M Natriumazetat, 0,5 M NaCl, pH 4) gewaschen. Die Äquilibrierung der Säulen sowie die Reinigung des Serums erfolgten wie oben für die Protein A Säulen beschrieben.

2.2.15 Proteinbiochemische Methoden

Herstellung pflanzlicher Proteinrohextrakte

Die Extraktion der Proteine aus Keimlingswurzeln und Suspensionsgewebekulturen von *V. faba* und *H. vulgare* erfolgte zunächst durch Homogenisierung unter flüssigem Stickstoff. 100 mg des erhaltenen Pulvers wurde dann in einem Reaktionsgefäß mit Hilfe eines Metallpistills unter Zugabe von ca. 300 µl 1x SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 % β-Mercaptoethanol, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 10 % Glycerin) weiter homogenisiert. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 95°C denaturiert und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Western Blot

Die Proteinrohextrakte und die an Ovalbumin konjugierten Peptide wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel nach (Laemmli, 1970) in SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels Elektrotransfer (~ 1,2 mA/cm², 16 h) in einer mit Transferpuffer (10 % SDS-Elektrophoresepuffer, 20 % Methanol) gefüllten Apparatur („Mini Trans Blot“, BioRad) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde anschließend für 2 h bei RT mit 5 %-iger Trockenmilch („Marvel“) in Marvelpuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) abgesättigt. Es folgte eine Inkubation (1,5 h, RT) mit dem affinitätsgereinigten anti-VfPTR1 Antikörper (1:1000 in 5 % Marvel). Danach wurde die Membran 3x 5 min mit 0,5 % Marvel

gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Esel anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-konjugiert, 1:2000 in 5 % Marvel) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 0,5 % Marvel erfolgte der Nachweis des VfPTR1 Proteins durch Chemilumineszenz mit dem ECL-System (Western Blotting Analysis System, GE-Healthcare).

Für Wettbewerbsversuche wurden die affinitätsgereinigten Antikörper (1:1000 in 5 % Marvel) 2 h bei RT mit den entsprechenden OVA-konjugierten Peptiden (20 µg/ml) vorinkubiert und dann auf die Membran gegeben.

ELISA

Die immunologische Spezifität der erhaltenen Peptidantikörper wurde in indirekten ELISA-Experimenten überprüft. Dazu wurde eine 96 *well* ELISA-Platte (MaxiSorp, Nunc) ü/N bei 4°C mit den OVA-konjugierten Peptiden (5 µg/ml in PBS, 100 µl pro *well*) beschichtet. Nach Verwerfen der Beschichtungslösung wurde die Platte für 2 h bei RT mit einer 3 %-igen BSA-Lösung in PBS abgesättigt (200 µl/*well*). Anschließend wurde die BSA-Lösung entfernt, die Platte 3x mit PBST gewaschen und für 90 min bei RT mit dem anti-VfPTR1 Antiserum (1:50000, 1:100000, 1:200000 in 3 % BSA/PBS, 100 µl/*well*) inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit PBST und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG konjugiert an alkalische Phosphatase, 1:2000 in 3 % BSA/PBS, 100 µl/*well*) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen (3x PBST, 1x PBS) wurde die ELISA-Platte mit Substratlösung befüllt (1 mg/ml pNPP in Substratpuffer [Diethanolamin, 0,1 g MgCl₂, 0,2 g NaN₃, pH 9,7]) und bis zur Vermessung der optischen Dichte 1 h bei 37°C inkubiert. Die Vermessung der Signale erfolgte in einem Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm.

2.2.16 Mikroskopische Techniken

Mikroskopische Techniken wurden teilweise von der Arbeitsgruppe „Strukturelle Zellbiologie“ am IPK durchgeführt.

***in situ* Hybridisierung**

Für die *in situ* Hybridisierung wurde ein 1200 bp großes Fragment der *HvGAP1*-cDNA mit DIG-11-dUTP unter Verwendung des „DIG-High Prime“ Kits der Firma Roche nicht-radioaktiv markiert. Nach der Markierungsreaktion wurde der Ansatz über MicroSpin-Säulen (GE Healthcare) zentrifugiert und die Effizienz der DIG-Markierung nach Herstellerangaben überprüft.

Karyopsen vom 0. und 10. DAF wurden in BMM (Butyl-Methyl-metacrylat) eingebettet, 5 µm dicke Querschnitte erzeugt und diese anschließend mit Aceton nach Warren (1998) wieder

entbettet und in einer Ethanol-Wasser Serie rehydriert. Nach einer Behandlung mit Proteinase K folgte die Hybridisierung wie bei De Block (1996), beschrieben. Nach dem Waschen wurden die Schnitte geblockt und anschließend mit einem anti-DIG Antikörper konjugiert mit alkalischer Phosphatase („DIG nucleic acid detection“ Kit, Roche) inkubiert. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde mit dem „Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate“ Kit (Vector Laboratories) nachgewiesen.

Chemische Fixierung und Einbettung

Zellsuspensionen von *V. faba* cv Fribo wurden auf zwei unterschiedliche Weisen chemisch fixiert. Bei einem Teil der Suspension wurde das Fixativ direkt in die Suspension gegeben zu einer Endkonzentration von 2 % Formaldehyd und 0,5 % Glutaraldehyd. Ein weiterer Teil der Zellsuspension wurde zuerst für 5 min bei 500 g zentrifugiert und das Pellet in Fixativlösung (2 % Formaldehyd, 0,5 % Glutaraldehyd in 20 mM PBS, pH 7,0) resuspendiert. Zur Fixierung wurden die Zellsuspensionen für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert (20 rpm). Danach wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 500 g) und in etwas Phosphatpuffer resuspendiert. 10 – 20 µl der Suspension wurden auf einem vorgewärmten Objektträger (40°C) 1:1 mit 40°C warmer *Low-Melting-Agarose* (3 %) gemischt. Nach der Verfestigung wurden 2 mm x 2 mm x 1 mm große Blöcke geschnitten, diese 3 x für 15 min mit PBS gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Für einen optimalen Erhalt der Struktur und der antigenen Bindungsstellen wurde die Entwässerung in einer Gefriersubstitutionseinheit (AFS, Leica AG, Wien) unter Absenkung der Temperatur durchgeführt. Die nachfolgende Infiltration mit HM20 Kunstharz erfolgte über vier Stufen bei RT. Ein detailliertes Ablaufschema ist in Tabelle 2.3 angegeben. Die vollständig infiltrierten Proben wurden dann in mit HM20 gefüllte Gelatine kapseln überführt und die Polymerisation des Harzes erfolgte in einer AFS bei -35°C für 48 h unter UV-Licht.

Lösung	Temperatur	Inkubationszeit
Fixativ	RT	1 h
PBS	RT	3 x 15'
30 % Ethanol	RT	15'
50 % Ethanol	4°C	15'
60 % Ethanol	4°C > -15°C	45'
75 % Ethanol	-15°C	45'
90 % Ethanol	-15°C > -35°C	45'
100 % Ethanol	-35°C > RT	40'
100 % Ethanol	RT	30'
25 % HM20	RT	ün
50 % HM20	RT	3 h
75 % HM20	RT	3 h
100 % HM20	RT	ün
100 % HM20	RT	3 h

Tab. 2.3 : Fixierung und Einbettung von *V. faba* Suspensionszellen in HM20.

Immunfluoreszenzmarkierung

Die polymerisierten Probenkapseln wurden zuerst grob mit einem Fräser angeschnitten. Anschließend wurden am Mikrotom mit Hilfe von Glasmessern Semidünnschnitte (1 µm) gemacht und auf einem Objektträger aufgenommen. Nach einer Färbung mit Methylenblau (1 % in 1 % Borax [Dinatriumtetraborat-Decahydrat]) wurden lichtmikroskopisch Bereiche mit vielen angeschnittenen Zellen ausgesucht und markiert und die Kapsel nochmals zurechtgeschnitten. Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden mit einem Histodiamantmesser 0,7 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Teflon-beschichtete 8-well Objektträger aufgenommen. Diese Semidünnschnitte wurden zunächst für 30 min in Blockierpuffer (3 % BSA, 0,05 % Triton X-100 in 20 mM PBS, pH 7,0) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Es folgte die einstündige Inkubation (RT) mit dem anti-VfPTR1 Antikörper (1:50 verdünnt in Blockierpuffer) bzw. dem Präimmunserum als Kontrolle. Nach 3-maligem Waschen für je 10 min mit Waschpuffer (0,1 % BSA, 0,05 % Triton X-100 in 20 mM PBS, pH 7,0) wurden die Proben für 45 min mit dem Sekundärantikörper (Alexa488 / Alexa568 *goat-anti-rabbit*) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben mit einem Deckglas abgedeckt und am konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht.

Immunogoldmarkierung

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden von den eingebetteten Proben ultradünne Schnitte (90 nm) mit einem Ultradiamantmesser hergestellt. Diese Schnitte wurden auf befilmte „75 Mesh hexagonal Kupfergrids“ aufgenommen. Die Immunogoldmarkierung fand in einer Tüpfelplatte statt, die *grids* wurden mit der Probe nach unten zeigend auf die jeweiligen Lösungen gelegt. Zuerst wurden die Proben für 20 min mit Blockierpuffer (Zusammensetzung wie bei Immunfluoreszenzmarkierung beschrieben) und anschließend 1 h mit dem anti-VfPTR1 Antikörper (1:50 bzw. 1:5 verdünnt in Blockierpuffer) bzw. dem Präimmunserum als Kontrolle inkubiert. Die Proben wurden 4 x gewaschen (Waschpuffer s. Immunfluoreszenzmarkierung) und dann für 45 min mit Protein A-Gold (Immunogoldkonjugat Protein A 10 nm) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit Waschpuffer (2 x 10 min) und destilliertem Wasser (2 x 10 min), wurden die Proben mit 4 % wässrigem Uranylacetat für 20 min kontrastiert. Nach dem Trocknen folgte die Untersuchung der *grids* an einem Tecnai20 Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigung von 80 kV. Digitale Bilder wurden mit einer SIS Mega-View III Kamera aufgenommen.

2.2.17 Statistische Auswertungen

Ob gemessene Unterschiede zweier Messreihen statistisch signifikant sind, wurde anhand des „Studentischen t-Tests“ mit Hilfe des Programms Microsoft Excel überprüft. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5 % (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Wenn der errechnete p-Wert der Analyse kleiner als 0,05 ist, liegt statistische Signifikanz vor.