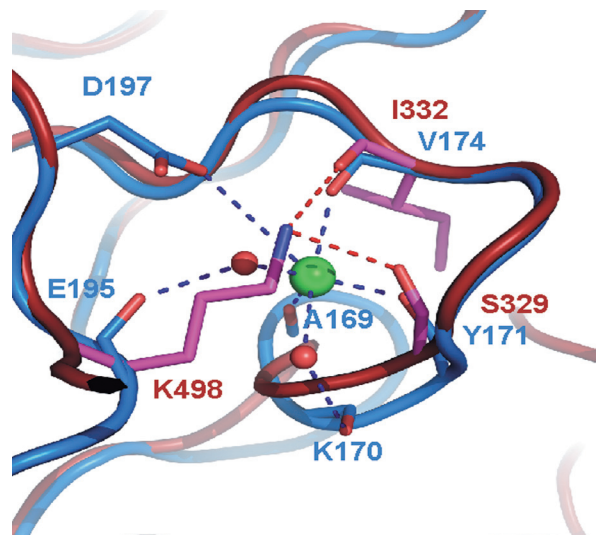




Die Rolle von Subtilisin-ähnlichen Proteasen in der Interaktion von Tomate (*Solanum lycopersicum*) und herbivoren Insekten

Diplomarbeit vorgelegt von Jasper Stroeder
Betreut von Dr. Annick Stintzi

Hohenheim, Juli 2009



Zusammenfassung

Im Vorfeld dieser Arbeit gab es eine Reihe von Indizien, die darauf hindeuteten, dass die Subtilase *S/SBT3* an der Interaktion mit herbivoren Insekten beteiligt sein könnte. Diesen Indizien wurde nachgegangen.

S/SBT3-Promotor-GUS Analysen zeigten keine räumliche Veränderung der *S/SBT3*-Expression in Folge Verwundung durch *M.sexta*, obwohl eine Induktion der Expression zuvor gezeigt worden war.

Die Stabilität der *S/SBT3* im Verdauungstrakt von *M.sexta* erhärtete den Verdacht einer Rolle in der Interaktion mit Insekten. In dieser Arbeit konnte *S/SBT3* sowohl im Darm als auch im Kot der Insekten nachgewiesen und damit ihre Stabilität im insektidären Verdauungstrakt bewiesen werden.

In Entwicklungsversuchen, in welchen das Gewicht von *M.sexta*-Larven regelmäßig bestimmt und ihr Gewichtszuwachs auf verschiedenen *S/SBT3*-Genotypen dokumentiert wurde, zeigten sich Entwicklungsunterschiede zwischen den auf verschiedenen stark *S/SBT3*-exprimierenden-Linien gewachsenen Larven.

Diese Befunde erhärten den Verdacht einer Funktion der *S/SBT3* im Darm der Fraßfeinde. Anhand von 2-D Gelelektrophoresen ließen sich Unterschiede im Proteom von Raupendärmen erkennen, die auf unterschiedlich stark *S/SBT3*-exprimierenden Tomatenlinien gefressen hatten. Dieser Ansatz könnte sich für die zukünftige Identifizierung eines Substrats der *S/SBT3* als hilfreich erweisen.

Die Ursache für die Stabilität der *S/SBT3* im Darm von *M.sexta* ist bisher unbekannt. Die Aufklärung der Kristallstruktur des Proteins im Vorfeld dieser Arbeit lieferte Hinweise darauf, dass ein in Position 498 des Proteins befindlicher basischer Lysinrest aufgrund seiner Positionierung die Stabilität des Proteins positiv beeinflussen könnte. Über eine Mutagenese des Lysinrests wurde diese Hypothese überprüft.

Durch die Mutagenese veränderte sich das Sekretionsverhalten des Proteins. Nach transienter Expression der mutierten *S/SBT3* in *N.benthamiana* ließ sich neben der korrekt prozessierten extrazellulären *S/SBT3* auch eine zweite *S/SBT3*-Bande größerer Masse nachweisen, die intrazellulär akkumulierte. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Mutation die Effizienz der Prozessierung im sekretorischen Weg beeinträchtigt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Interaktionen von Pflanzen und Insekten	1
1.1.1 Die Koevolution von Pflanzen und Insekten	1
1.1.2 Jasmonsäure und der Wundsignalweg	3
1.1.3 Erkennung von Herbivoren	6
1.1.4 Pflanzliche Abwehr	8
1.2 Subtilasen	10
1.2.1 Allgemeines	10
1.2.2 Tomaten-Subtilasen	12
1.2.3 S/SBT3	13
1.3 Ziele dieser Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Allgemeine Materialien	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Enzyme	18
2.1.3 Antikörper	18
2.1.4 Primer	18
2.1.5 Verwendete Medien	19
2.1.6 Antibiotika	19
2.1.7 Marker	20
2.1.8 Peptide	20
2.2 Biologisches Material	20
2.2.1 Pflanzen	
2.2.1.1 Tomatenpflanzen	20
2.2.1.2 S/SBT3-RNAi-Linien	20
2.2.1.3 S/SBT3-Überexpressions-Linien	21
2.2.1.4 S/SBT3-Promotor-GUS-Linien	21
2.2.2 <i>Nicotiana benthamiana</i>	21
2.2.3 <i>Manduca sexta</i>	21
2.2.3.1 Präparation von <i>M.sexta</i>	22
2.2.3.2 Kot von <i>M.sexta</i>	22
2.2.4 Bakterien	23
2.2.5 Plasmide	23
2.3. Anzucht des Biologischen Materials	
2.3.1 <i>Solanum lycopersicum</i>	23
2.3.2 <i>Nicotiana benthamiana</i>	23
2.3.3 Desinfektion der Samen	24
2.3.4 <i>Manduca sexta</i>	24
2.4. Proteinanalytische Methoden	25
2.4.1 Proteinextraktion	
2.4.1.1 Gesamt Protein Extraktion	25
2.4.1.2 Proteinextraktion aus Darm und Kot von <i>M.sexta</i>	25

2.4.2 Methoden zur Proteinkonzentrationsbestimmung	26
2.4.2.1 Bradfordtest	26
2.4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung von Proben in Harnstoffpuffer	26
2.4.3 Proteinanalytik	26
2.4.3.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	27
2.4.3.2 Proteindetektion mittels Coomassie Brilliant Blue	27
2.4.3.3 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran	27
2.4.3.4 Immunodetektion mit Hilfe des S/SBT3-Antiserum	28
2.4.3.5 Ponceau-Färbung	28
2.4.4 Infiltration von <i>Nicotiana benthamiana</i>	29
2.4.5 Isolierung apoplastischer Proteine	29
2.4.6 Enzymaktivitätstests	
2.4.6.1 Aktivitätsbestimmung mittels eines fluorogenen Systeminpeptids	20
2.4.6.2 S/SBT3-Aktivitätsbestimmung im Zymogramm	31
2.4.7 GUS Färbung	31
2.5 2-D Gelelektrophorese	
2.5.1 Probenaufreinigung	31
2.5.2 Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen	32
2.5.3 2-D Gelelektrophorese	
2.5.3.1 Isoelektrische Fokussierung	32
2.5.3.2 SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese als zweite Dimension	32
2.5.4 Detektion des Proteinmusters	33
2.6. Molekularbiologische Methoden	33
2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA (DNA Mini-Prep)	33
2.6.2 Gelelektrophorese von DNA	34
2.6.3 Restriktionsverdau	34
2.6.4 Generierung von ‚Blunt-ends‘ mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase	34
2.6.5 Vektor Dephosphorylierung	34
2.6.6 DNA Elution	35
2.6.7 Ligation	35
2.6.8 Transformation von <i>E.coli</i> und <i>A.tumefaciens</i>	35
2.6.8 PCR Techniken	
2.6.8.1 PCR-Mutagenese	36
2.6.8.2 Kolonie-PCR	37
2.7. Experimente mit <i>Manduca sexta</i>	38
2.7.1 Verwundung von Pflanzen durch <i>M.sexta</i>	38
2.7.2 <i>M.sexta</i> Larvenentwicklung	
2.7.2.1 Vorversuch/ <i>M.sexta</i> -Larvenentwicklung 1	38
2.7.2.2 <i>M.sexta</i> -Larvenentwicklung 2	39
3. Ergebnisse	40
3.1 S/SBT3-Genexpression nach <i>M.sexta</i>-Verwundung	40
3.2 <i>M.sexta</i>-Larvenentwicklung im Einfluss der S/SBT3	43
3.2.1 Selektion transgener Tomatenlinien mit S/SBT3-überexpressions- oder S/SBT3-RNAi-Konstrukten	43
3.2.2 <i>M.sexta</i> -Larvenentwicklung	44

3.3 Stabilität der S/SBT3 in Darm und Kot von <i>M.sexta</i>	50
3.4 Aktivität der S/SBT3 im Kot von <i>M.sexta</i>	51
3.4.1 Aktivitätsbestimmung mittels eines fluorogenen Systeminpeptids	51
3.4.2 S/SBT3-Aktivitätsbestimmung im Zymogramm	53
3.5 Analyse des Proteoms aus <i>M.sexta</i>-Darm- und -Kot- Proben zur S/SBT3-Substratsuche	55
3.6 Proteinstruktur und Stabilität	60
3.6.1 Mutagenese von S/SBT3	60
3.6.2 Agrobakterien vermittelte Expression von S/SBT3 in <i>N.benthamiana</i>	63
3.6.2.1 Stabilität transient in <i>N.benthamiana</i> exprimierter S/SBT3 im <i>M.sexta</i> Verdauunstrakt.	64
3.6.2.2 Infiltration der S/SBT3-Konstrukte K498A und K498E	65
3.6.3 Das Sekretionsverhalten der S/SBT3 und ihrer mutieren Formen	67
3.6.4 S/SBT3 im Apoplasten	68
3.6.6 Aktivität der apoplastischen S/SBT3 mit fluorogenem Systemin als Substrat	71
4. Diskussion	73
5. Literaturverzeichnis	84
6. Anhang	92
6.1 Datensätze zu <i>M.sexta</i> Larvenentwicklungen	92
6.1.1 Larvenentwicklung Vorversuch	92
6.1.2 <i>M.sexta</i> -Larvenentwicklung 1	92
6.1.3 <i>M.sexta</i> -Larvenentwicklung 2	93
6.2 Verwendeter Proteinmarker	95
6.3 Abbildungsverzeichnis	96
6.4 Tabellenverzeichnis	97
6.5 Abkürzungsverzeichnis	98
Danksagung	
Eidesstattliche Erklärung	

1. Einleitung

1.1 Die Interaktionen von Pflanzen und Insekten

1.1.1 Die Koevolution von Pflanzen und Insekten

Es gibt ungefähr eine Million beschriebene Insektenarten, wobei die geschätzte Gesamtzahl der Arten weit darüber liegt (Stork 2007). Die Anzahl der Pflanzenarten wird auf ca. 500.000 geschätzt (Sitte et al. 2002). Ungefähr 45 % der Insektenarten ernähren sich herbivor (Schoonhoven et al. 2005) und üben damit einen beträchtlichen Selektionsdruck auf die Blütenpflanzen aus. Kein pflanzliches Organ, ob über- oder unterirdisch, ist vor den Angriffen durch Insekten gefeit (Bezemer und van Dam 2005). Im Verlauf der Evolution haben Pflanzen sehr unterschiedliche Wege entwickelt, um sich gegen Herbivore zu wehren. Dazu gehören die Entwicklung mechanischer Barrieren, die Synthese direkter Abwehrsubstanzen und auch das gezielte Anlocken von Fraßfeinden des Angreifers. Da sich eine Pflanze aber meist nicht nur dem potentiellen Angriff eines bestimmten Herbivoren ausgesetzt sieht, sondern sich im Ernstfall gegen einen Zufälligen aus einer Reihe von Schädlingen verteidigen muss, ist es für die Pflanze wichtig, den Angreifer spezifisch zu erkennen und anschließend mit einer gezielten Antwort darauf zu reagieren. Eine konstitutive Aktivierung der Abwehrmechanismen als Abwehrmaßnahme im Gegensatz zu einer spezifischen Interaktion mit dem Angreifer könnte einen Wettbewerbsnachteil gegenüber anderen Pflanzen bedeuten, weil mit der Produktion von Abwehrstoffen auch immer ein Verbrauch von Energie einhergeht. Darüber hinaus bietet eine konstitutive Abwehrreaktion den Insekten die Chance zur Adaptation. Allerdings, so geben es Ian T. Baldwin und Martin Heil zu bedenken, benötigt auch die Aufrechterhaltung der zur Erkennung der Herbivoren benötigten Signalwege Energie, die bisher nicht zufrieden stellend in die Gesamtgleichung einbezogen werden konnte (Heil und Baldwin 2002).

Die Ausbildung von Schutzmechanismen auf Seiten der Pflanzen führte zu einer immer weiter fortschreitenden Spezialisierung der Insekten auf ihre Wirtspflanzen, so dass heute ca 90 % von ihnen Spezialisten sind, die entweder oligo- oder monophag leben (Schaller, Vorlesung (Pflanzenphysiologie II 2007)).

Bei Studien von Lepidopteren in der Interaktion mit Blütenpflanzen beobachteten Ehrlich und Raven, dass Darwins Evolutionsprinzip sich in einer Koevolution von Insekten und Blütenpflanzen beobachten lässt und sahen darin die Artenvielfalt beider begründet (Ehrlich und Raven 1964). In der Auslegung ihrer Theorie wird klar, dass diejenige Pflanze einen Wettbewerbsvorteil gegenüber ihren Artgenossen besitzt, die einen Abwehrstoff produziert,

welcher den angreifenden Herbivor abzuschrecken vermag. In der Insektenpopulation ist nun wiederum derjenige gegenüber seinen Artgenossen im Vorteil, der mit dem Gift umzugehen weiß und sich damit dem Futterdruck der Population entziehen kann. Damit übt er wiederum einen Selektionsdruck auf die Pflanze aus. Durch diesen Prozess kommt es schließlich zur Ausbildung von komplexen Abwehrreaktionen und Stoffen in der Pflanze, zur spezifischen Anpassungen spezialisierter Insekten an letztere und schließlich zur adaptiven Radiation. Der Begriff ‚survival of the fittest‘ von Herbert Spencer, bezeichnet diesen Kampf ums Überleben, der alle lebenden Organismen begleitet.

Ein gutes Beispiel für die Anpassung von Insekten und Pflanzen aneinander bietet die Tabakpflanze *Nicotiana attenuata*. Sie bildet in Reaktion auf herbivore Insekten in ihren Wurzeln das Nervengift Nikotin, einen zu der Klasse der Alkaloide gehörigen sekundären Pflanzeninhaltsstoff, welcher bei Verwundung in betroffene Blätter transportiert wird. Das Alkaloid und Neurotoxin ist eines der stärksten im Pflanzenreich bekannten Gifte und schreckt Herbivore von den Pflanzen ab (Baldwin 1995). Der Tabakschwärmer *Manduca sexta* hingegen macht sich das Gift selbst zu Nutzen, indem er es in seine Haut einlagert und das Nervengift für den eigenen Schutz gegen Parasitoide verwendet (Krischik et al. 1988). Dennoch ist die Pflanze diesem Spezialisten nicht schutzlos ausgesetzt. Sie erkennt den Fraßfeind und reagiert mit einem rapiden Anstieg der Ethylen- Konzentration, welche für die gesamte Zeit des Raupenangriffs erhalten bleibt. Diese hohe Ethylen- Konzentration verhindert zwar die durch Jasmonsäure gesteuerte Akkumulation von Nikotin, nicht jedoch die Aussendung von flüchtigen Signalstoffen, sogenannten Volatilen. Diese Volatile sind es, die Fraßfeinde der Insekten (parasitäre Wespen) anlocken und die Pflanze durch eine tritrophe Interaktion vor Fraß schützen (Kahl et al. 2000; Kessler und Baldwin 2001).

Damit sich eine Pflanze aber gegen einen Angriff schützen und darauf mit physiologischen Anpassungen reagieren kann, muss sie über einen biochemischen Mechanismus verfügen, der die Attacke registriert. Für die Auslösung unspezifischer Abwehrreaktionen reicht meist schon eine mechanische Verwundung der Pflanze aus, die über einen Signalweg zur Produktion von Abwehrsubstanzen führt. Der wichtigste Signalweg in diesem Zusammenhang ist der Wundsignalweg mit seinem Botenstoff Jasmonsäure, der in der Folge näher erläutert werden soll.

1.1.2 Jasmonsäure und der Wundsignalweg

Die Jasmonsäure (JA, Abb. 1.1) und ihre Derivate (auch Jasmonate genannt) bilden eine Klasse von Phytohormonen, die nicht nur im höheren Pflanzenreich ubiquitär verbreitet ist, sondern auch in Algen, Pilzen und Moosen nachgewiesen werden konnte. Als Strukturmerkmal der Jasmonate gilt der charakteristische Cyclopentanonring. Entgegen der ursprünglichen Annahme, die Aktivität der Jasmonsäure sei auf ihre freien Vertreter begrenzt, konnte gezeigt werden, dass auch ihre modifizierten Formen, wie z.B. das Methyljasmonat oder einige ihrer Aminosäurekonjugate biologisch aktive Formen darstellen (Turner et al. 2002). Neuere Erkenntnisse weisen sogar darauf hin, dass JA-Ile, ein Konjugat der Jasmonsäure und der Aminosäure Isoleucin, als das aktive Jasmonat anzusehen ist und nicht die Jasmonsäure selbst (Staswick und Tiryaki 2004; Thines et al. 2007). Entgegen ursprünglicher Annahmen wurde das (+)-cis-iso-JA-L-Isoleucin als die aktive Form der JA nachgewiesen (Fonseca et al. 2009).

Jasmonate haben in der Pflanze zahlreiche wichtige Funktionen, zu denen neben der Steuerung von Entwicklungsprozessen auch die Reaktion auf verschiedene abiotische und biotische Stressoren zählen (Wasternack 2007). Wie oben bereits angedeutet nehmen sie insbesondere bei der Antwort auf Verwundung oder Angriffe durch nekrotrophe Pathogene eine zentrale Rolle ein (Stintzi et al. 2001) und sind mit der Induktion von Abwehrmolekülen, der Ausbildung systemischer Antworten, sowie der Synthese und Freisetzung von Volatilen maßgeblich an der Abwendung von Angriffen beteiligt (Zhu- Salzman et al. 2005).

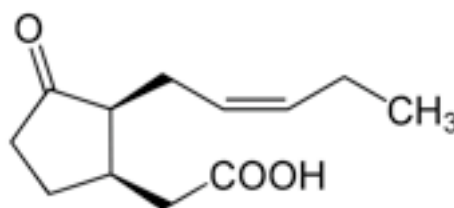


Abb. 1.1 (+)-7-iso -Jasmonsäure

Jasmonsäure wird über den Oktadecanoidweg gebildet, der in Tomatenpflanzen in der Interaktion des Systemin-Rezeptors SR160 mit dem Signalpeptid Systemin seinen Anfang findet (Scheer und Ryan 1999).

Systemin ist ein 18 Aminosäuren langes Oligopeptid, das 1991 von Pearce und Ryan entdeckt wurde. Es wird in Reaktion auf Verwundungen mittels proteolytischer Spaltung aus seinem 200 Aminosäuren langen Vorläuferpeptid, dem Prosystemin, freigesetzt und gilt als das erste pflanzliche Peptid mit hormoneller Wirkung (Ryan 2000). Prosystemin wird auf geringem Level konstitutiv exprimiert, wobei der Expressionsspiegel nach Verwundung der Pflanze deutlich ansteigt.

Wie zentral die Rolle von Systemin für den Ablauf der Abwehrreaktion ist, zeigt folgender Befund: Pflanzen mit Prosystemin-Antisense-Konstrukt sind nicht mehr in der Lage, Systemin herzustellen, und verlieren dadurch ihre Fähigkeit, eine systemische Wundreaktion auszulösen (McGurl et al. 1992). Umgekehrt führt die konstitutive Expression von Prosystemin zur konstitutiven Synthese von Proteinase-Inhibitoren, für die eine schädliche Wirkung auf die Larvenentwicklung von *M.sexta* nachgewiesen werden konnte (McGurl et al. 1994).

Nach seiner Freisetzung aus seinem Vorläufer bindet Systemin an seinen membranständigen Rezeptor SR 160, welcher der Klasse der LRR-RLK (Leucin-Rich-Repeat Receptor Like Kinase) zugeordnet wird (Scheer und Ryan 1999; 2002). Diese Interaktion setzt eine komplexe Signalkaskade in Gang (Abb. 1.2), welche die Depolarisierung der Plasmamembran, einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, sowie die Aktivierung einer MAP Kinase (mitogen-aktivierten-Protein Kinase) beinhaltet. Die Signalkaskade führt letztendlich zur Aktivierung einer Phospholipase, die für die Freisetzung von Linolensäure aus Membranlipiden von Chloroplasten verantwortlich ist (Farmer und Ryan 1992; Narváez-Vasquez et al. 1999). Letztere bildet den Ausgangsstoff für den Octadecanoidweg zur Bildung von Jasmonsäure in Peroxisomen.

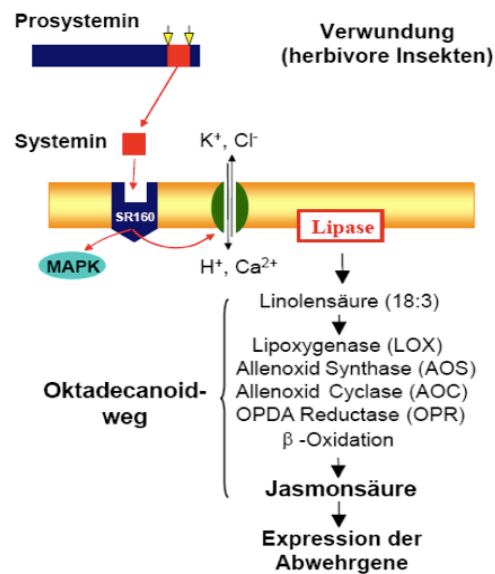


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Systemin vermittelten Abwehr über den Oktadecanoidweg bis hin zur Expression von Abwehrgenen (Schaller, Vorlesung, Pflanzenphysiologie II 2007)

Die Jasmonsäure gelangt anschließend ins Cytosol und kann dort in verschiedenen Positionen substituiert und konjugiert werden, was ihre Spezifität und ihr Wirkungsspektrum erweitert. Hier entstehen unter anderem durch die Jasmonsäure-Carboxylmethytransferase das flüchtige Derivat Methyl-Jasmonat (Seo et al. 2001) oder durch das Enzym JAR1 (Jasmonic acid resistant 1) eine Konjugation mit der Aminosäure Isoleucin (Staswick und Tiryaki 2004). Letzteres JA-Aminosäure-Konjugat ist im Speziellen an der Regulierung von Jasmonsäure abhängigen Genen beteiligt, die im unverwundeten Zustand reprimiert werden. Die Repressoren der durch Jasmonsäure induzierbaren Gene tragen eine JAZ- Domäne (Jasmonate ZIM Domäne), die in Anwesenheit von JA-Ile-Konjugaten von einem SCF^{Coil} Komplex erkannt, ubiquitinyliert und somit für den Abbau im 26s Proteasom markiert werden (Thines et al. 2007; Chini et al. 2007). So werden in Anwesenheit von Jasmonsäure die durch sie regulierten Gene von ihren Repressoren befreit und dadurch aktiviert.

Die Jasmonsäure hat also u.a. die Aufgabe, nach herbivorer Verwundung Abwehrgene zu aktivieren und die Bildung von Abwehrstoffen einzuleiten, die den Angriff stoppen. Hierzu zählt die Produktion von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie Alkaloiden und Terpenen, die Synthese von Abwehrproteinen und Proteinaseinhibitoren, wie auch die Produktion sogenannter Volatile-Organic-Compounds (VOCs) (Zhu- Salzman et al. 2005).

Die Fähigkeit, auf die Angriffe von Herbivoren gezielt zu reagieren, setzt einen ausgefeilten Erkennungsmechanismus des Angreifers in der Pflanze voraus.

1.1.3 Erkennung von Herbivoren

Wenn eine Pflanzenzelle verwundet wird, bricht ihre Kompartimentierung zusammen. Hierdurch kann es sein, dass Enzyme mit Substraten in Verbindung kommen, die sich unter physiologischen Bedingungen nicht begegnen, z.B. weil sie an unterschiedlichen Orten in der Pflanzenzelle gespeichert bzw. verstoffwechselt werden. Wird allerdings das Pflanzengewebe zerstört, kommt es zur Bildung toxischer und flüchtiger Substanzen wie z.B. von Senfölglykosiden im Myrosinase-Glukosinolat-System von Brassicaceen (Halkier und Gershenzon 2006). Diesen in Folge des Zusammenbruchs des pflanzlichen Gewebes entstehenden und freigesetzten Stoffen können Abwehr und Elicitorfunktionen zukommen. Diese Art der pflanzlichen Abwehr ist allerdings nicht herbivorspezifisch, sondern kann ebenfalls durch rein mechanische Verwundung hervorgerufen werden.

Herbivore Insekten fügen der Pflanze eine kontinuierliche Verwundung zu, die allerdings für die Erkennung des Fraßfeindes nicht ausreichend ist oder sein muss. Dieses wurde durch die Konstruktion von ‚MecWorm‘ bewiesen, einem Apparat, der einer Pflanze über einen längeren Zeitraum Verwundung zufügt und damit das Fraßverhalten einer Raupe simuliert. Untersucht und verglichen wurden hierbei die Produktion verschiedener Volatile bei mechanischer und insektidärer Verwundung. Zwar reagierten die Versuchspflanzen auf mechanische Verwundung mit der Produktion von Volatilen, jedoch nicht in der Komposition, wie sie nach einer tatsächlichen Insektenverwundung gebildet wird (Mithöfer et al. 2005; Maffai et al. 2007).

Auf der Suche nach Stoffen, welche die Erkennung von herbivoren Insekten auf Seiten der Pflanzen weiter spezifizieren, konnten aus dem Regurgitat von Insekten chemische Verbindungen isoliert werden, denen in der Pflanze eine Elicitorfunktion und damit eine Aufgabe in der Auslösung einer physiologischen Reaktion zukommt.

Wird eine Pflanze mit diesem Elicitor behandelt, reagiert sie u.a. mit der Aktivierung von Abwehrgenen (Korth und Dixon 1997) und der Aussendung eines herbivor spezifischen Volatile- Mixes in ihre Umgebung (Alborn et al. 1997, Halitschke et al. 2001). Genauere Untersuchungen dieser Verbindungen führten zu einer bemerkenswerten Entdeckung: Die Elicitoren entstammen nicht dem Insekt allein, sondern tragen immer auch eine pflanzliche Komponente – eine Fettsäure (FS). Diese Fettsäure wird über die Nahrung aufgenommen und im Darm des Insekts mit einer Aminosäure konjugiert.

Die am besten charakterisierte Verbindung dieser Stoffklasse ist das N-(17-hydroxylinolenoyl)-L-Glutamin (auch Volicitin), dessen Fettsäure-Komponente, die

Linolensäure, aus Pflanzen stammt und erstmals aus dem Regurgitat von *Spodoptera exigua* isoliert werden konnte (Alborn et al. 1997). Neben dem Volicitin konnten jedoch auch noch weitere dieser Fettsäure-Aminosäure-Konjugate identifiziert werden (Mithöfer und Boland 2008).

Diese Verbindungen haben die generelle Struktur N-Acyl- Glutamin, wobei sich der Fettsäureanteil meist von der Linolensäure (C18:3), Linolsäure (C 18:2) und ihren Derivaten herleitet, sich aber von Pflanze zu Pflanze unterscheiden kann (Alborn et al. 1997; Paré et al. 1998; Spiteller und Boland 2003; Spiteller et al. 2004). Der Aminosäureanteil besteht hingegen fast immer aus Glutamin; das konjugierte Glutamat bei *M. sexta* in der Interaktion mit Solanaceen bildet hier bislang die einzige Ausnahme (Paré et al. 1998). Doch die Fettsäure-Aminosäure-Konjugate sind nicht auf Lepidopteren beschränkt, sondern konnten bislang schon in 13 Nicht-Lepidopteren Insekten nachgewiesen werden (Yoshinaga et al. 2007), darunter auch in den Larven von *Drosophila melanogaster*.

Diese Fettsäure-Aminosäure Verbindungen wirken mit dem oben beschriebenen Octadecanoidweg zur Synthese von Jasmonsäure zusammen und lösen einerseits endogene Abwehrreaktionen und andererseits die Emission eines spezifischen Bouquets von Volatilen der Pflanze aus.

Ein eventueller Vorteil, der den Insekten aus der Produktion dieser Verbindung entsteht ist noch unbekannt. Ihre Verbreitung lässt allerdings auf eine wichtige Funktion schließen, da ihre Produktion ansonsten zweifelsohne nach Darwins Theorie einen Wettbewerbsnachteil bedeutet.

Darüber hinaus sind weitere Elicitoren pflanzlicher Abwehrreaktionen entdeckt worden. Erwähnenswert ist hier besonders das Inceptin, ein Peptid-Elicitor, der durch proteolytischen Abbau des ATP-Synthase Komplexes entsteht (Schmelz et al. 2006).

1.1.4 Pflanzliche Abwehr

Hinter der im ersten Absatz der Einleitung simplifiziert dargestellten Interaktion zwischen der Tabakpflanze und dem an sie angepassten Spezialisten *M.sexta* verbirgt sich bei näherer Betrachtung eine hoch komplexe physiologische Reaktion. Die Komplexität zeigt sich in der errechneten Anzahl von etwa 500 Genen auf Seiten der Pflanze, die ihr Expressionsniveau in Folge eines *M.sexta* Befalls ändern (Hermsmeier et al 2001). Darunter sind nicht nur solche Gene, die direkt mit der Abwehrreaktion in Verbindung gebracht werden, sondern auch solche, die für Photosynthese und Zellhomöostase zuständig sind.

Unter dem Begriff der pflanzlichen Abwehr lassen sich zwei generelle Wirkmechanismen unterscheiden: konstitutive und induzierte Abwehr. Unter dem Begriff der konstitutiven Abwehr sind zum Einen morphologische Barrieren und Merkmale, wie z.B. die Ausbildung von Dornen und Haaren, zum Anderen aber auch die permanente Bildung von Bitterstoffen und Alkaloiden zu verstehen. Unter den Begriff der induzierten Abwehr fallen alle physiologischen Änderungen, die erst nach Angriffen auf die Pflanze zur Abwehr des Aggressors unternommen werden.

Lange herrschte in der Biologie die wissenschaftliche Überzeugung, dass die pflanzliche Abwehrreaktion auf herbivore Insekten vorwiegend auf die Produktion sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe beschränkt sei (Berenbaum und Zangerl 2008). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass auch Proteine maßgeblich an der Abwehr von Fraßfeinden beteiligt sind.

Vor fast vierzig Jahren fanden Green und Ryan heraus, dass Tomatenpflanzen auf Verwundung durch herbivore Insekten mit der Akkumulation von Proteinaseinhibitoren reagieren. Sie schufen damit die Basis für die Betrachtung der pflanzlichen Abwehrreaktionen als dynamische statt als statische Prozesse (Green und Ryan 1972). Zudem entdeckten sie mit den Proteinaseinhibitoren erstmals Proteine mit anti-herbivorer Wirkung, die erst im Darm der Fraßfeinde wirksam sind, indem sie dort spezifisch die Verdauungsenzyme der Insekten hemmen und damit die Verwertbarkeit der Nahrung reduzieren. So hemmt beispielsweise der Proteinaseinhibitor II die Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin (Plunkett et al. 1982).

Seit dieser Entdeckung konnten zahlreiche weitere pflanzliche Proteine identifiziert werden, die entweder erst im Verdauungstrakt wirksam sind oder die Nährqualität anderwärtig beeinträchtigen. Eine Auswahl davon ist in Tabelle 1 dargestellt. So oxidiert die Polyphenoloxidase im Darm von Insekten Proteine und vernetzt diese miteinander, so dass sie für Insekten unverdaubar werden (Wang und Constabel 2005). Enzymatische Aktivitäten

wie die der Arginin- und Threonindeaminasen bauen spezifisch die für Tiere essentiellen Aminosäuren Arginin und Threonin ab (Chen et al. 2005; Chen et al. 2007). Andere Vertreter von Proteasen aus der Familie der Cystein-Proteasen attackieren vermutlich direkt Strukturen des insektidären Verdauungsapparates (Zhu-Salzman et al. 1998; Pechan et al. 2002). Bemerkenswerterweise sind diese Proteine und Metabolite nicht nur im Darm des Insekts stabil und weisen ein auf das alkalische Milieu des Insektendarms angepasstes Aktionsspektrum auf, es ist sogar bewiesen, dass in Folge herbivorer Verwundung einige Proteine anders prozessiert oder mit posttranslationalen Modifikationen ausgestattet werden, die ihre Stabilität und Aktivität im Insektendarm gewährleisten (Lippert et al. 2007; Chen et al. 2007). Ferner wird sogar vermutet, dass einige der Abwehrproteine aus dem Darm der Insekten heraus in die Hämolymphe der Tiere diffundieren können (Jeffers et al. 2005).

Protein	Durch Verwundung induziert	Stabilität im Insektendarm	Wirkungsweise
Polyphenoloxidase	Ja	Ja	Oxidation von Mono- und Dihydrophenolen, Quervernetzung von Proteinen
Cathepsin D	Ja	Ja	Inhibitor von Aspartat-Proteasen, verhindert Überproduktion von Proteasen
Threonin-Deaminase	Ja	Ja, dort aktiviert	Enzymatischer Abbau von Threonin
Cysteinproteaselinhibitor	Ja	Ja	Inhibiert Cystein-Proteasen
Arginase	Ja	Ja	Enzymatischer Abbau von Arginin
Lectine	Ja	Ja	Oxidativer Angriff auf Strukturen des Insektendarms
Leu- Aminopeptidase	Ja	ja	Freisetzung von Arginin aus N-Terminus von Proteinen

Tab.1 Eine Auswahl pflanzlicher Abwehrproteine mit potentieller oder erwiesener Funktion im Insektendarm und ihre Wirkungsweise. Liste unvollständig. Abgeleitet und modifiziert aus (Felton 2005; Zhu-Salzman et al. 2008)

1.2 Subtilasen

1.2.1 Allgemeines

Proteasen sind für alle Zellen ubiquitäre Enzyme, die an diversen essentiellen Funktionen wie Proteinreifung, -faltung und -degradation beteiligt sind. Auf der Suche nach den an der Prozessierung des pflanzlichen Wundsignals Systemin beteiligten Proteasen identifizierten Schaller und Ryan ein 50kDa großes, Systemin bindendes Protein in der Plasmamembran von Tomatenzellen. Dieses Protein, SBP50, konnte mit einem Antiserum gegen eine Prohormon-Konvertase (PK) aus *Drosophila melanogaster* immunodetektiert werden und stellte sich als ein pflanzliches Homolog zu Kex2 heraus, einer Subtilase (Schaller und Ryan 1994).

Kex2p ist die erste identifizierte Subtilase in Eukaryoten und verfügt über einen hochspezifischen Spaltmechanismus C-terminal von dibasischen Motiven. Sie ist in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* an der Prozessierung des α -mating-factors beteiligt. Auch die tierischen Homologe der Subtilasen verfügen über hochspezifische Spaltaktivitäten. Sie sind als Prohormonkonvertasen maßgeblich an dem Reifungs- und Prozessierungsprozess von Peptidhormonen beteiligt und nehmen weitere u. a. medizinisch relevante Funktionen ein. So sind Subtilasen durch ihre Beteiligung an der Prozessierung von viralen Hüllproteinen und Bakteriotoxinen an der Auslösung von Krankheiten wie z.B. Grippe, Milzbrand und Diphtherie beteiligt (Thomas 2002; Shiryayev et al. 2007).

Subtilasen werden in die Klasse der Serinproteasen und dort genauer in den S8-Klan eingeordnet (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Das aktive Zentrum der Subtilasen wird durch die Aminosäuren Asparagin (D), Histidin (H) und Serin (S) gebildet, die so genannte katalytische Triade. Der Name der Subtilasen leitet sich von den Subtilisinen in *Bacillus subtilis* und verwandten Arten ab.

Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten lassen sich Subtilasen in 6 verschiedene Familien einteilen (Abb 1.3). Pflanzliche Subtilasen gehören der Familie der Pyrollysine an, einer im Hinblick auf ihre Herkunft und Substratspezifität heterogenen Gruppe von Enzymen, die durch Insertionen und/oder C-terminale Erweiterungen in der katalytischen Domäne entstanden sind (Seidah und Chrétien 1997; Seidah et al. 1999).

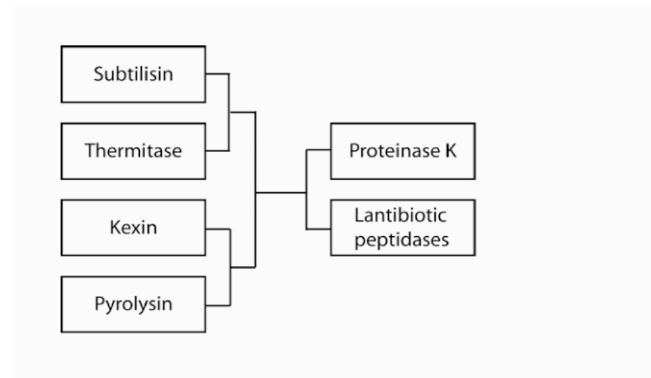


Abb. 1.3 Subtilasefamilien innerhalb der Gruppe der Subtilisin- ähnlichen Serinproteasen

Die Verwandtschaft zwischen den Familien ist durch einen phylogenetischen Baum dargestellt, basierend auf dem Sequenzvergleich der katalytischen Domänen einzelner Subtilasen (Siezen und Leunissen 1997).

Pflanzliche Subtilasen wurden später entdeckt als ihre tierischen Homologe und aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu der heterogenen Enzymklasse der Pyrolysine vorerst als unspezifische degradative Proteasen angesehen (Siezen und Leunissen 1997). So konnte für das Cucumisin, der ersten identifizierten pflanzlichen Subtilase, aus *Cucumis melo* eine breite Substratpalette nachgewiesen werden (Kaneda und Tominaga 1975; Kaneda et al. 1995). Die gleiche Vermutung bestätigte sich bei der Untersuchung von Taraxalisin aus *Taraxacum officinale* (Rudenskaya et al. 1998), Macluralisin aus *Maclura pomifera* und Plantagolisin aus *Plantago major* (Bogacheva et al. 2001).

Gleichzeitig mehrten sich jedoch auch die Hinweise auf Kexin-ähnliche Proteaseaktivitäten in Pflanzen. Beispielsweise konnte in transgenen Tabakpflanzen ein Pilz-Toxin von *Ustilago maydis* korrekt exprimiert werden, dessen fehlerfreie Prozessierung eine Kex2p-ähnliche Spaltung erfordert (Tao et al. 1990). Kürzlich entdeckte man die Beteiligung der Subtilase AtSBT1.1 aus *Arabidopsis*, bei der Freisetzung von Phytosulfokinen, kleinen Peptidhormonen, aus längeren Vorläufermolekülen (Matsubayashi und Sakagami 2006). Diese werden C-terminal eines dibasischen Spaltmotivs geschnitten und wirken als Liganden für Zellrezeptoren. Die AtSBT1.1 ist die erste pflanzliche Subtilase für die die Prozessierung eines Peptidhormons bewiesen ist (Srivastava et al. 2009).

Allein in *Arabidopsis* kodieren 56 Gene für Subtilasen (Rautengarten et al. 2005), denen, soweit bisher möglich, durch Mutantenanalysen unterschiedliche Aufgaben zugeordnet werden konnten. So ist beispielsweise SDD1 (Stomatal Density and Distribution 1) an dem Prozess von Stomata Verteilung und Dichte beteiligt (Berger und Altmann 2000), die

Subtilase ALE1 (Abnormal Leaf Shape 1) bei der Ausbildung einer Cuticula bzw. der Epidermis während der Embryogenese und Samenentwicklung von Nöten (Tanaka et al. 2001) und AtTPP2 kommt eine degradative Funktion zu (Book et al. 2005).

Für Subtilasen aus anderen Pflanzen als Arabidopsis wurden auf der Basis ihres Expressionsmusters mögliche Funktionen diskutiert. Beispielsweise wird die Subtilase LIM9 aus *Lilium longiflorum* in der späten Phase der Microsporenentwicklung in Tapetumzellen exprimiert und ihr damit eine Rolle in der Pollenentwicklung zugeschrieben (Taylor et al. 1997), die Subtilasen AG12 aus *Alnus glutinosa* und CG12 aus *Casurina glauca* sind wahrscheinlich an dem Prozess der Wurzelknöllchenbildung zur Symbiose mit Actinomyceten beteiligt (Laplace et al. 2000). Zwei Subtilasen aus Hafer wurde eine Rolle in der Auslösung des programmierten Zelltods nachgewiesen (Coffeen und Wolpert 2004).

1.2.2 Tomaten- Subtilasen

Seit ihrer Entdeckung wurden 15 Tomaten-Subtilasen identifiziert und aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in 5 Unterfamilien eingeteilt (Abb 1.4). Von diesen besitzen jedoch lediglich die P69 und S/STB3/4 mehrere Vertreter (Meichtry et al. 1999).

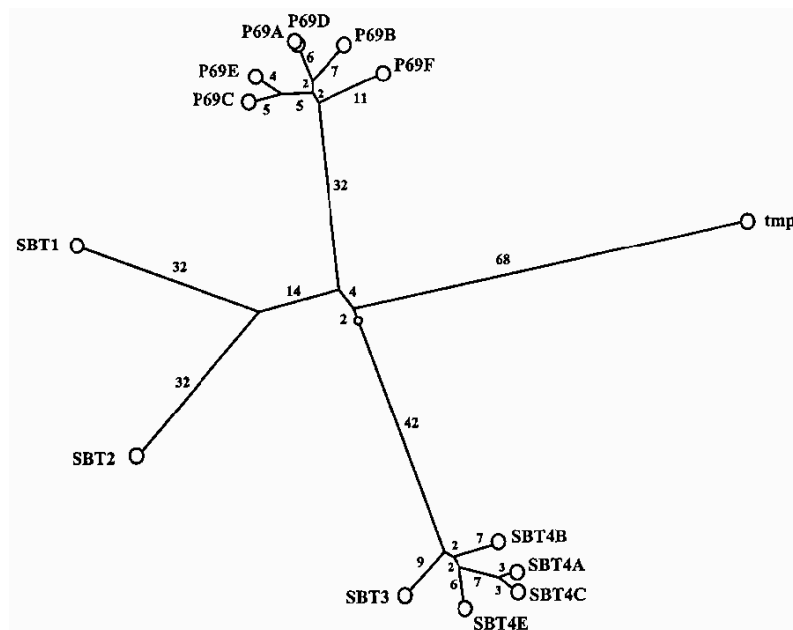


Abb. 1.4 Phylogenetischer Baum der Subtilase- Familie in Tomatenpflanzen

Dargestellt ist die phylogenetische Beziehung der Tomaten Subtilasefamilie, basierend auf dem Vergleich von Aminosäuresequenzen, die von der genomischen DNA und cDNA abgeleitet wurden. Die Zahlen stellen die PAM-Distanzen (accepted point mutations per 100 residues) zwischen den Sequenzen dar (Meichtry et al. 1999).

Wie in anderen Pflanzenarten wird auch bei den Tomaten-Subtilasen auf der Basis ihres Expressionsmusters über potentielle Funktionen diskutiert. Die Expressionsmuster von P69A und P69D sind stark entwicklungs- und gewebespezifisch, weshalb über ihre Rolle während der Entwicklung spekuliert wird (Jordá et al. 1999). Ähnliches gilt für P69E und P69F, deren Expression auf Wurzeln bzw. Hydathoden, und damit auf potentielle Eintrittsorte für Bakterien und Pilze, beschränkt ist. Eine Rolle bei der Pathogenabwehr ist hier denkbar (Jordá et al. 2000). Ebenfalls an der Pathogenantwort beteiligt scheinen die Subtilasen P69B und P69C zu sein, deren Expression u. a. durch Salicylsäure und Toxin-Applikationen induzierbar ist (Jordá et al. 1999, Schaller et al. 2000).

Auch die Mitglieder der *S/SBT*-Familie werden an verschiedenen Orten exprimiert (Meichtry et al. 1999). So konnte beispielsweise *S/SBT1* in Blüten und Wurzelgewebe detektiert werden und *S/SBT4A* in Blüten, Blättern und Kotyledonen. *S/SBT2* wird in allen grünen Organen und in den Schließzellen der Stomata exprimiert, wobei auch eine eventuelle Rolle in Reaktion auf Pathogene nicht auszuschließen ist (Ullrich 2006).

1.2.3 *S/SBT3*

Im Gegensatz zu der differentiellen Expression der anderen Mitglieder der *S/SBT* Familie konnte die Expression von *S/SBT3* in allen pflanzlichen Organen nachgewiesen werden.

Darüber hinaus ist bekannt, dass *S/SBT3* als Prä-Pro-Protein gebildet wird (siehe Abbildung 1.5). Die Prä-Domäne stellt das N-terminale das Signalpeptid für den sekretorischen Signalweg dar. Sie wird im endoplasmatischen Reticulum (ER) abgespalten. Durch einen autokatalytischen Mechanismus spaltet die *S/SBT3* während ihrer Reifung im sekretorischen Weg ihre Pro-Domäne ab, was zu einer Aktivierung des Proteins führt (Cedzich et al. 2009).

Als einen der grundlegenden Unterschiede zwischen Pflanzen- und Säugetier-Subtilasen verfügt *S/SBT3* wie die Mehrzahl der pflanzlichen Subtilasen zwischen dem Histidin und dem Serinrest der katalytischen Triade über die Insertion einer Protease-assoziierten (PA)-Domäne. Sie ist für die korrekte Prozessierung und Aktivität der Subtilase erforderlich (Cedzich et al. 2009).

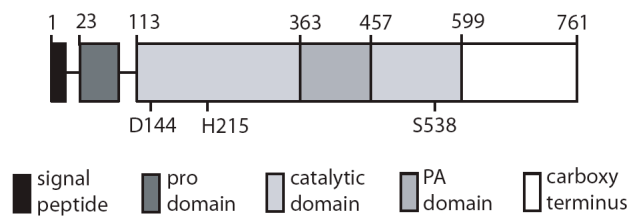


Abb. 1.5 Schematische Darstellung des Aufbaus des S/SBT3-Proteins aus verschiedenen Domänen

Unterschiedliche Domänen sind verschiedenfarbig gekennzeichnet. Die Nummern stehen für Aminosäuren, wobei die AS 1 den N-Terminus bildet. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind mit ihren Positionen (Nummern) im Einbuchstabenkode auf der Unterseite der Grafik dargestellt (Cedzich et al. 2009).

Die Kristallstruktur der S/SBT3 ist bekannt. Aus ihr lässt sich der generelle Aufbau der S/SBT3 aus drei Proteindomänen ableiten: der Subtilisin-Domäne, der PA-Domäne und der Fn III (Fibronectin- Domäne) (Ottmann et al. submitted).

S/SBT3 kristallisiert als Homodimer, die Dimerisierung wird durch die PA-Domäne im Protein bewerkstelligt. Die PA-Domänen zweier S/SBT3s treten in direkten Kontakt miteinander, interagieren dabei aber zusätzlich mit der Subtilisin-Domäne des anderen Monomers. Diese zweite Interaktion in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum des Proteins könnte insbesondere für die Aktivität der S/SBT3 wichtig sein. Im aktiven Zentrum wird bei der Dimerisierung zweier S/SBT3 Proteine eine bewegliche β -Schleife in der Subtilisin-Domäne gebunden, die in der Monomer-Form der S/SBT3 beweglich ist und autoinhibitorisch wirksam sein könnte, indem sie sich in das aktive Zentrum des Monomer legt. Durch die Dimerisierung der Proteine wird diese Schleife außerhalb des aktiven Zentrums fixiert. Somit könnte mit der Dimerisierung des Proteins eine Aktivierung einhergehen. Mutationsanalysen für diese Interaktionen wichtiger Aminosäuren haben ergeben, dass sich das Monomer-Dimer Verhältnis bei gestörten Interaktionen in Richtung des Monomers verschiebt (Ottmann et al. submitted).

Die Fn III-Domäne wird ebenfalls in einen direkten Zusammenhang zur Subtilisin- Domäne und der Aktivität der S/SBT3 gebracht. Die Oberfläche dieser Domäne besteht zum Großteil aus hydrophoben Aminosäuren wie die Subtilisin-Domäne selbst auch. Eine mögliche Funktion der Fn III-Domäne könnte es sein, die Subtilisin-Domäne durch Interaktion zu stabilisieren (Ottmann et al. submitted). Deletionsanalysen im C-Terminus der Fn III-Domäne ergaben, dass eine Deletion von fünf Aminosäureresten ausreichen, um die autokatalytische Prozessierung der S/SBT3 zu verhindern, was zur intrazellulären Akkumulation führt (Cedzich et al. 2009).

Weiterhin ergab die Kristallstrukturanalyse der *S*/SBT3, dass diese als erste Subtilase kein Calcium bindet und damit auch eine Calcium unabhängige Aktivität besitzen muss. Trotzdem ist der generelle Aufbau, der in anderen Subtilasen konservierten Ca^{2+} -Bindestellen, in der Struktur der *S*/SBT3 erhalten (Ottmann et al. submitted). Von diesen Regionen sind zwei, Ca-1 und Ca-2, hochkonserviert und können in zahlreichen weiteren Subtilasefamilien gefunden werden. Die dritte dieser strukturell konservierten Regionen, Ca-3, ist weniger verbreitet. Die Bindestellen sind in Abbildung 1.6 A grün dargestellt und beschriftet.

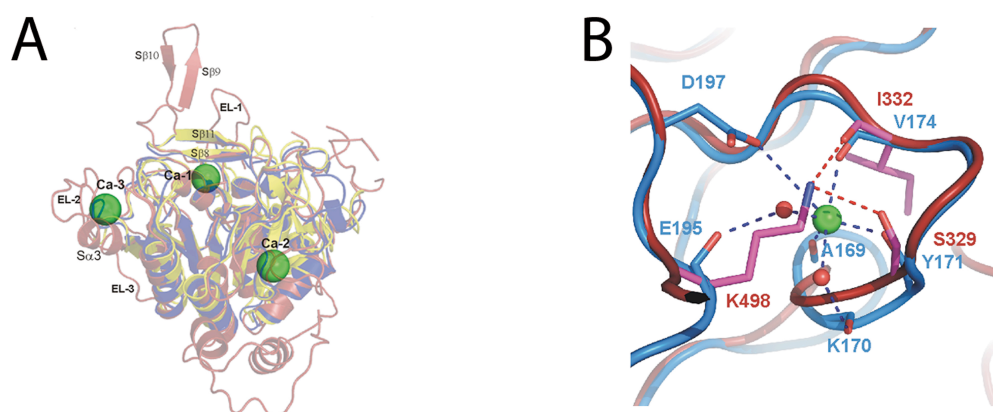


Abb. 1.6 Die Struktur der *S*/SBT3 enthält keine gebundene Ca^{2+} -Ionen (Ottmann et al, submitted).

A. Ribbon-Plot aus Überlagerungen von *S*/SBT3 (rot), Subtilisin BPN' (blau) und Thermitase (gelb). Konservierte Ca^{2+} -Bindestellen vieler Subtilasen sind als grüne Punkte dargestellt (Ca-1, Ca-2, Ca-3).

B. Detailansicht der Ca-2 Region. Die für die Ca^{2+} -Bindung in Subtilisin BPN' wichtige Aminosäurereste sind als blaue Stäbchen eingezeichnet. Lys498 und seine interagierenden Aminosäuren sind magenta-farben, Wassermoleküle sind rot dargestellt.

Bei genauerer Betrachtung dieser drei Strukturen der *S*/SBT3 wird klar, warum diese Regionen sich trotz des fehlenden Metallions positiv auf die Proteinstabilität auswirken könnten. Die Ca-1 und Ca-3 Regionen verfügen über Insertionen zusätzlicher Aminosäuren in den strukturegebenden Schleifen, die ihrerseits mit umgebenen Aminosäureresten interagieren.

Ein anderes Bild ergibt sich für die Ca^{2+} -Bindestelle Ca-2, die in Teil B der Abbildung 1.6 B genauer dargestellt ist. Hier ist ein Lysinrest in Position 498 (lila) zu finden, dessen positiv geladene Seitenkette in die mögliche Calcium- Bindestelle hineinragt und seinerseits mit den umliegenden Seitenketten benachbarter Aminosäuren interagiert (gestrichelte Linien). Damit imitiert er, zumindest zum Teil, die Funktion des Ca^{2+} -Atoms (grün). Es wird vermutet, dass dieser Lysinrest die Stabilität der *S*/SBT3 positiv beeinflusst (Ottmann et al. submitted).

In der Tat weist S/SBT3 ein hohes Maß an Thermostabilität auf. Der Schmelzpunkt des Proteins liegt bei 71 °C (Ottmann et al. submitted). Nach 20 Minuten bei 70 °C besitzt das Protein noch 50 % seiner Aktivität (Cedzich et al. 2009). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die S/SBT3 den Darm des Tabakswärmers *Manduca sexta* unverdaut verlassen kann, was ebenfalls auf eine hohe Stabilität insbesondere in einem stark alkalischen Milieu hindeutet (Huttenlocher 2008).

1.3 Ziele dieser Arbeit

Die zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse bieten Grund zu der Annahme, dass die S/SBT3 an der Interaktion mit herbivoren Insekten beteiligt ist. Diese Hypothese soll in dieser Arbeit überprüft werden.

Für viele Proteine ist eine anti-herbivore Wirkung im Darm der Schadinsekten bekannt. Sie sind im Darm des Insekts stabil und haben ein auf das proteinfreundliche Milieu des Darmes abgestimmtes Aktionsspektrum. Beides trifft für die S/SBT3 zu. Auch eine Induktion der Expression nach Verwundung konnte gezeigt werden.

Für eine solche Rolle der S/SBT3 in der Interaktion mit herbivoren Insekten spricht der vorläufige Befund ihrer Nachweisbarkeit in Darm und Kot von *M.sexta*-Larven, der zu Beginn dieser Arbeit noch nicht ausreichend erbracht ist. Viele dieser Proteine verlassen den Darm des Schadinsekts aktiv. Auch dieses könnte als weiterer Hinweis auf eine solche Funktion der S/SBT3 gewertet werden, ist jedoch bisher nicht untersucht worden, ebenso wenig wie die räumliche Veränderung der Expression in Folge von herbivorer Verwundung, die ebenfalls ein Indiz für eine Rolle in der Interaktion mit herbivoren Insekten gewertet werden könnte.

Bei der gezielten Untersuchung von schädlichen Effekten eines Proteins auf herbivore Insekten haben sich in der Vergangenheit Entwicklungsexperimente mit *M.sexta*-Larven als hilfreich erwiesen. Die Larven fraßen hierbei auf Pflanzen mit unterschiedlichem Gehalt des zu untersuchenden Proteins. Anhand von solchen Entwicklungsexperimenten soll hier der Frage nach einem Effekt der S/SBT3 auf die Larvenentwicklung der Schadinsekten nachgegangen werden.

Die S/SBT3 ist ein besonders stabiles Protein. Die Ursachen für die Stabilität sind bisher nicht ausreichend geklärt. Eine Metallionen-Bindung im Protein, die bei anderen Subtilasen bekannt ist und für eine hohe Stabilität verantwortlich gemacht wird, konnte in der kinetischen Analyse und der Kristallstruktur nicht bestätigt werden. Die Bedeutung eines Lysinrestes in der Calcium-Bindestelle 2 (Ca-2) für die Stabilität des Proteins soll hier durch zielgerichtete Mutagenese untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht gesondert aufgeführt, stammten alle Chemikalien von Roth (Karlsruhe), Fluka und Sigma (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt).

Die für die 2D- Gelelektrophorese verwendeten Chemikalien wurden von GE Healthcare (München) bezogen. Sie waren vorher auf ihre Funktionalität in der 2D- Gelelektrophorese geprüft und mit der Bezeichnung "PlusOne" versehen worden.

2.1.2 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme stammten von Fermentas (St. Leon-Rot) und hatten (soweit nicht anders angegeben) eine Aktivität von 10 U/μl. Alle Enzyme wurden nach den Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Puffern verwendet.

2.1.3 Antikörper

Ein polyklonales Antiserum, gerichtet gegen ein heterolog in *E.coli* exprimiertes Fragment von S/SBT3, wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) erstellt. Das anti- Kaninchen IgG Peroxidase- Konjugat stammte von der Firma Calbiochem (Darmstadt/Schwalbach).

2.1.4 Primer

→ **Tab 2.1** Primersequenzen für die S/SBT3-K498A und -K498E Mutagenese
Die von der nativen S/SBT3 Sequenz abweichenden Basen sind rot gekennzeichnet

Bezeichnung	Sequenz
SBTK498AF	5'– CCTTGGGAATTTCA ^{GC} GCCAGATATATTGGCAC – 3'
SBT3K498AR	5'– GTGCCAATATATCTGGCG ^{CT} GAAATTCCCAAG – 3'
SBT3K498EF	5' – CTTGGGAATTTCA ^G AGCCAGATATATTGGCAC – 3'
SBT3K498ER	5' –GTGCCAATATATCTGGCT ^{CT} GAAATTCCCAAG – 3'

→ **Tab. 2.2** Primersequenzen für die Sequenzierung von S/SBT3

Nummer	Bezeichnung	Sequenz
6	S/SBT3 473 for.	5'- TGCGAGTTTTCAAGATGATGG- 3'
7	S/SBT3 1701 rev.	5'- AAAGGATCAGCTGTGGTCATC- 3'
14	S/SBT3 1858 for.	5'- GATGCTACTCCTCAAGATTACG- 3'
66	S/SBT3 66 for.	5' CTGATTCTTGACGATATCCAC- 3'
77	S/SBT3 1794 rev.	5'-ACTCTAGAAAGCTTACCCTGCTCCCATGTCTAGG- 3'
89	S/SBT3 672 rev.	5'- AGCAGTAATGGAAGGAAGCACAAATGC- 3'
	SP6	5'- ATTTAGGTGACACTATAG- 3'
	pART7- 35S	5'- CTATCTGTCACTTCATCGAAAGG- 3'

2.1.5 Verwendete Medien

<i>YEB Medium:</i>	1g/l Hefeextrakt, 5g/l Bacto- Trypton, 5g/l Bacto- Pepton, 5g/l Saccharose
<i>LB Medium:</i>	LB Broth 20g/l für; feste Medien zusätzlich 1,2% (w/v) Agar
<i>SOB Medium:</i>	20g Bacto-Trypton/l, 5g Hefeextrakt/l, 0,584g NaCl/l, 0,186g KCl/l
<i>SOCS Medium:</i>	98 ml SOB-Medium, 1ml 2M Glucose, 1ml 2M MgCl ₂ - Lösung
<i>M.sexta Kunstfutter:</i>	15g Agar, 900ml ddH ₂ O, 161g Gypsi- Moth- Diet, 3ml Leinöl, 18ml Formaldehyd (4% (v/v)), 0,24g Chloramphenicol in 2 ml Ethanol, 2g Natronbenzoat

2.1.6 Antibiotika

Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
Spectinomycin	100 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
Kanamycin	50 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
Tetracyclin	12,5 mg/ml in 70 % Ethanol, Lagerung bei -20°C
Rifampycin	50 mg/ml in DMSO, Lagerung bei -20°C
Acetosyringon	150 mM in DMSO, Lagerung bei -20°C

Anwendungskonzentrationen der Antibiotika:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Rifampicin	100 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml

2.1.7 Marker

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas

2.1.8 Peptide

Fluorogenes Systemin Peptid:

Sequenz im Einbuchstabenkode: Abz- SKRDPPK**K**QTD – Y(NO₂)

Die rot gezeichnete Aminosäure stellt eine Abweichung zur Systeminsequenz dar. Diese Veränderung beeinflusst die Spaltpräferenz durch die S/SBT3 im positiven. Zudem trägt das Protein am N-Terminus (links) eine fluorogene Gruppe (Abz(o-aminobenzoyl)), am C-Terminus einen Quencher (Y(NO₂)).

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Pflanzen

2.3.1.1 Tomatenpflanzen

Die verwendeten Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*; *Sl*) waren vom Kultivar UC82B. Entsprechende Samen des Wildtyps wurden von Royal Suis (Enkhuizen, NL) bezogen.

2.2.1.2 S/SBT3- RNAi- Linien

In den RNAi-Linien wurde durch RNA-Interferenz- Technik eine Suppression der Expression der S/SBT3 erzielt. Dazu war von E. Sieferer (Sieferer und Schaller, unveröffentlicht) ein ca. 250 bp großes Fragment vom 5'-Ende der S/SBT3-cDNA in sense und antisense Orientierung in pHannibal kloniert worden und anschließend die

gesamte Expressionskassette in den binären Expressionsvektor pART27 unterkloniert worden. Durch Leaf- disk- Transformation von Tomatenblättern durch Agrobakterien mit diesem Konstrukt erfolgte die Modifikation der Tomatenpflanzen. Von den fünf zur Verfügung stehenden Linien wurden für die folgenden Versuche die Samen der T2- Generation der Linie S/SBT3 HP-21-7 verwendet.

2.2.1.3 S/SBT3-Überexpressions-Linien

Die S/SBT3-überexpremierenden-(OE)-Pflanzen wurden von Prof. Dr. A. Schaller zur Verfügung gestellt. Hier war der offene Leserahmen der S/SBT3-cDNA in den binären Vektor pRD400 unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors kloniert worden. Die Modifizierung der Pflanzen wurde mit Agrobakterien vermittelter Transformation erreicht. Für die durchgeführten Versuche wurde, die homozygote Linien, G2f1D und G19G1 verwendet.

2.2.1.4 S/SBT3- Promotor-GUS-Linien

Für die S/SBT3- Promotor- GUS Pflanzen ist von E. Sieferer, ein 1,9 kb großes Promoterfragment des S/SBT3-Gens mit dem uidA- Gen aus *E.coli*, das für die für die β -Glucuronidase (GUS) kodiert, in den binären Vektor pBI101 kloniert worden. Durch die Transformation der Tomaten-Wildtyppflanzen (UC82b) mit Agrobakterien wurde eine kanamycinresistente T0-Generation generiert, von der eine T1-Linie für die Versuche verwendet: GUS-14-2.

2.2.2 *Nicotiana benthamiana*

2.2.3 *Manduca sexta*

Die Eier von *Manduca sexta*, Johanson (Lepidoptera: Sphingidae) wurden vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie (Jena) zur Verfügung gestellt. Das Kunstfutter, das für die Aufzucht der Larven verwendet wurde, stammte vom "Manduca Project" (University of Arizona, AZ, USA). Die Zusammensetzung des Kunstfutters ist auf der Internetseite www.manducaproject.com aufgelistet.

2.2.3.1 Präparation von *M.sexta*

Die Raupen wurden bis zum Larvenstadium 5 auf Pflanzen belassen und vor Erreichen des ‚Wandering-Stadium‘ abgesammelt. Im Labor wurden die Larven mit Essigsäureäthylester (99,5%, Roth) betäubt, aufgeschnitten und ein ca. 1 cm langer Teil des Mitteldarms entfernt. Dieser wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

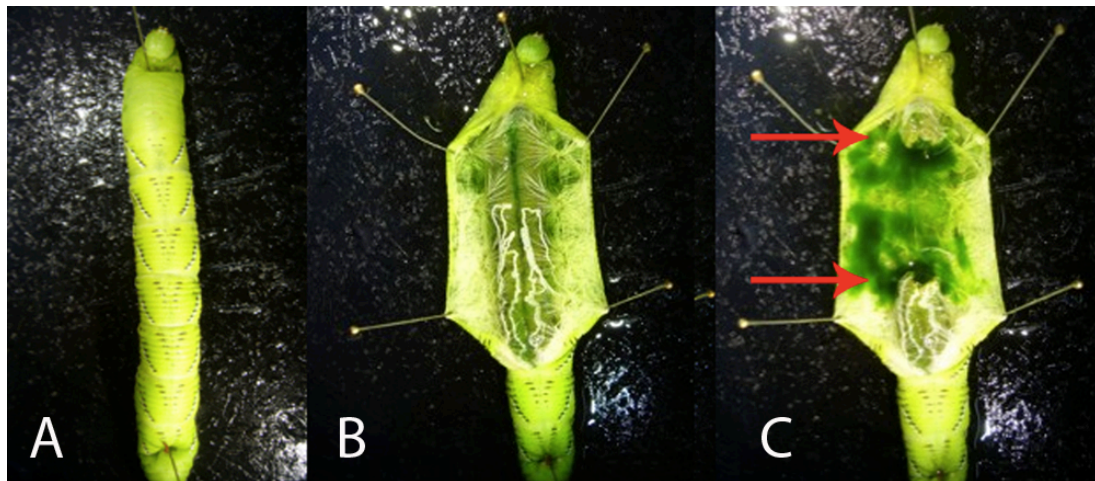


Abb. 2.1 Entfernung des Mitteldarms einer *M.sexta*-Larve im 5. Larvenstadium

- A. *M.sexta*-Larve an Kopf und Fußende aufgepinnt
- B. *M.sexta*-Larve nach Öffnung der Haut
- C. *M.sexta*-Larve nach Entfernung eines ca. 1 -2 cm langen Stückes des Darms, die Schnittstellen sind durch rote Pfeile angedeutet

2.2.3.2 Kot von *M.sexta*

Beim Transport vom Gewächshaus ins Labor wurden die Raupen in Plastikschrallen gesetzt, in welchem Pflanzenmaterial der jeweiligen transgenen Linien vorhanden war, auf denen sie aufgewachsen waren. Der anfallende Kot wurde aus den Schalen aufgesammelt. Somit konnte der Kot auf der einen Seite frisch, auf der anderen Seite sehr sauber, d.h. ohne anklebende Erde oder großer Feuchtigkeit gesammelt werden. Der Kot wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Bakterien

2.3.4.1 *E.coli* DH10-B, Invitrogen

2.3.4.2 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1

2.3.4.3 *A.tumefaciens* mit pART27/S/STB3 (erstellt von B.Rösing)

2.2.5 Plasmide

pSPT18/S/STB3 pUC Derivat, enthält die S/STB3-cDNA

pART7/ pART27 Binäres Vektorsystem (Gleave 1992); CaMV35S-Promotor, MCS, OCS, RK2 minimal Replikon, ColE1, origin of replication, chimäres Kanamycinresistenzgen

p19 Laborsammlung (Voinnet et al. 2003), Viraler Protein-Suppressor von ‚gene-silencing‘

2.3 Anzucht des Biologischen Materials

2.3.1 *Solanum lycopersicum*

Alle Tomatenpflanzen wurden im Gewächshaus bei einer Tageslänge von 16 Stunden bei 25 °C angezogen. Ab einem Alter von vier Wochen wurden alle Pflanzen wöchentlich im Gießverfahren gedüngt (NPK-Dünger: GABI Plus®, 2 ml/l Gießwasser). Chemische und biologische Pflanzenschutzmaßnahmen wurden vor oder während der Experimente nicht durchgeführt. Ebenfalls wurde darauf verzichtet, die Pflanzen auszugeizen. Die für die Versuche verwendeten Pflanzen waren ca. 2 Monate alt.

2.3.2 *Nicotiana benthamiana*

Alle Tabakpflanzen wurden im Wochenrhythmus von B. Rösing ausgesät und bei einer Tageslänge von 15 h bei 28 °C angezogen. Die Tabakpflanzen wurden einmal wöchentlich im Gießverfahren gedüngt (Wuxal® Universaldünger, 20ml/10l Gießwasser) und im Alter von 4 – 6 Wochen verwendet.

2.3.3 Desinfektion der Samen

Um eine Virusinfektion durch den Tabak Mosaic Virus der Tomaten und Tabakpflanzen zu vermeiden, wurden alle Samen einem Hitzeschritt und einer Trinatriumphosphat (TNP)-Behandlung unterzogen. Dazu wurden die Samen über Nacht bei 70 °C im Trockenschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Samen kurz mit 70% EtOH gespült, mit Wasser gewaschen und schließlich für 3 h in 10 % TNP eingeweicht. Abschließend wurden die Samen fünfmal in einem großen Volumen H₂O gewaschen und im Gewächshaus direkt auf Erde ausgesät.

2.3.4 *Manduca Sexta*

Nachdem die Larven geschlüpft waren, wurden sie auf Kunstfutter aufgezogen. Dabei wurden jeweils 20 Larven in einer Petrischale mit vier ca. 2 cm³ großen Stücken Kunstfutter im Labor bei RT gehalten. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen. Die Larven wurden täglich in neue Petrischalen mit frischem Kunstfutter umgesetzt, um ein Verderben des Kunstfutters zu verhindern.

Zur Verpuppung wurden die Larven am Ende des fünften Larvenstadiums, dem so genannten ‚Wandering- Stadium‘, in Papiertücher gewickelt und in Plastikboxen mit Luftlöchern in Dunkelheit bei 25 °C und hoher Luftfeuchtigkeit aufbewahrt. Nach erfolgter Verpuppung wurden die Papiertücher entfernt und die Puppen in Flugkäfigen zum Schlüpfen abgelegt. Die Flugkäfige bestanden aus Insektennetzen, die im Gewächshaus aufgehängt waren und in denen zwei ca. sechs Wochen alte Tomatenpflanzen für die Eiablage aufgestellt wurden. Die frisch gelegten Eier wurden einmal täglich abgesammelt, um gleich alte Larven für die nächsten Experimente zu erhalten. Die für Experimente verwendeten Raupen wurden der Zucht entzogen.

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Proteinextraktion

2.4.1.1 Gesamtprotein-Extraktion

Circa 75 mg gefrorenes oder frisches Pflanzengewebe wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit einem Plastikpistill homogenisiert und zügig 300 µl kalter Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 1 x Proteinaseinhibitor Cocktail) zugesetzt. Der Ansatz wurde abzentrifugiert (15.800 g, 5 min, 4 °C) und das entstehende Pellet verworfen.

2.4.1.2 Proteinextraktion aus Darm und Kot von *M.sexta*

Das Probenmaterial (Darminhalt oder Kot) wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert und in gekühlte Falcon- RöhrchenTM gefüllt, in welche das 2-fache Volumen Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,7 M Sucrose; 20 mM EDTA; 100 mM KCl; 2 % β-Mercaptoethanol; 1 mM PMSF) vorgelegt war. Nun erfolgte die erste Phenolextraktion mit einem Volumen Phenol (TE- Puffer equilibriert, Roth). Nach intensivem mischen wurde bei 11.000 g für 10 min zentrifugiert. Die phenolische Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die wässrige Phase wurde einer erneuten Phenolextraktion (1/2 Volumen Phenol, gut geschüttelt, 11.000 g für 10 min Zentrifugation) unterzogen, um sämtliche Proteine aus der Lösung zu erhalten. Beide phenolischen Phasen wurden vereint und einer Re-Extraktion mit 1x Volumen Extraktionspuffer unterzogen. Hierzu wurden die gepoolten Phasen mit einem Volumen Extraktionspuffer gründlich gemischt und anschließend bei 11.000 g für 10 min zentrifugiert. Wieder wurde die phenolische Phase abgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen (CorexTM) überführt und die Proteine mit dem 5-fachen Volumen 100mM eiskaltem Ammoniumacetat in Methanol über Nacht bei -20 °C gefällt.

Eine Zentrifugation von 20 min bei 25.000 g pelletierte die Proteine, der Überstand wurde abgenommen und verworfen; das Pellett in 4 ml 100mM Ammoniumacetat in Methanol gewaschen und für 3 Minuten im Wasserbad ultraschallbehandelt (Bandelin, Sonorex Super RK255 H). Nachdem der Überstand verworfen war, konnte das Pellet dreimal in 2 ml eiskaltem 80 %igen (v/v) Aceton gewaschen, getrocknet und in 2D-Sample Buffer (7M Harnstoff, 2M Thiourea, 30mM Tris (ohne eingestellten pH, 4% (w/v) CHAPS) gelöst werden.

2.4.2 Methoden zur Proteinkonzentrationsbestimmung

2.4.2.1 Bradfordtest

Die Bestimmung der Gesamtkonzentration an löslichem Protein wurde mittels einer photometrischen Methode nach Bradford (1976) durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anschließend anhand einer BSA-Eichgerade errechnet.

2.4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung von Proben in Harnstoffpuffer

Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden mit einem 2D Quant-Kit nach beigelegter Anweisung durchgeführt (GE- Healthcare, München).

2.4.3 Proteinanalytik

2.4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) im diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970) mit 10 %-igen (w/v) Trenngelen in Mini- PROTRAN® 3 Cell-Apparaturen (BioRad, München). Hierzu wurden die Proteinproben in 1x SDS-Ladepuffer (200mM Tris/HCl, 400mM Dithiothreitol, 8% (w/v) SDS, 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerin) auf eine bestimmte Konzentration verdünnt, bei 100 °C 5 min denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 2 h bei 100 V in Laemmli-Puffer. Zur späteren Molekulargewichtsbestimmung diente ein Protein-Standard (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot).

Gelrezeptur für zwei SDS- Gele von 1,5mm Dicke:

9 %(w/v) Trenngel	4,2 ml	40 % (w/v) Acrylamidstammlösung
	9,6 ml	ddH ₂ O
	4,6 ml	4x Trenngelpuffer
	200 µl	10 % (w/v) APS
	20 µl	TEMED

<i>4,5 % (w/v) Sammelgel</i>	1,1 ml	40 % (w/v) Acrylamidstammlösung	
	6,3 ml	ddH ₂ O	
	2,5 ml	4x Sammelgelpuffer	
	100 µl	10 % (w/v) APS	
	10 µl	TEMED	
<i>Trenngelpuffer</i>	1,5 M	Tris/HCl	pH 8.8
	0,4 %	SDS	
<i>Sammelgelpuffer</i>	0,5 M	Tris/HCl	pH 6.8
	0,4 %	SDS	

2.4.3.2 Proteindetektion mittels Coomassie Brilliant Blue

Nach der Elektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blue R250 angefärbt. Dafür wurden die Gele über Nacht in der Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R 250, 10 % Essigsäure, 45 % Methanol) unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Gele in mehreren Schritten in Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol) entfärbt.

2.4.3.3 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran

Der Transfer geleelektrophoretisch-aufgetrennter-Proteine aus SDS-PAGE Gelen auf Nitrocellulose-Membran (PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman, Dassel) wurde nach dem „semi-dry“ Verfahren durchgeführt. 6 Stücke Blotting-Papier (3MM, Whatman, Dassel) wurden in Anodenpuffer 2 (25 mM Tris/HCl, pH 10,4; 20 % (v/v) Methanol) angefeuchtet und auf die Graphitanode gelegt. Danach folgten 3 Lagen Blotting-Papier, welche in Anodenpuffer 1 (300 mM Tris/HCl, pH 10,4; 20 % (v/v) Methanol) angefeuchtet wurden. Die Nitrocellulose-Membran wurde als nächstes nach kurzem Schwenken in ddH₂O und Anfeuchten in Anodenpuffer 1 auf den Blotting-Papier-Stapel gelegt. Danach folgte das SDS-PAGE-Gel und 6 Lagen Blotting-Papier, welche in Kathodenpuffer (40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % (v/v) Methanol) angefeuchtet wurden. Die Graphitkathode wurde zum Schluss auf den Stapel platziert und die Übertragung bei 100 mA/Gel über 90 min durchgeführt.

2.4.3.4 Immunodetektion mit Hilfe des S/GBT3-Antiserum

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine mindestens zweistündige Inkubation der Nitrocellulose-Membran in Blockierungslösung (1x TBS (20 mM Tris/HCl pH 7,4; 135 mM NaCl); 0,1 % (v/v) Tween 20; 6 % (w/v) Milchpulver, Regilait, Saint Martin Belle Roche, Frankreich) abgesättigt. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (anti-S/GBT3, Verdünnung 1:2000) erfolgte in frischer Blockierungslösung über 2 – 3 h bei RT, oder ggf. über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln.

Anschließend wurden unspezifisch gebundene Antikörper in zwei 10- minütigen Waschschritten (1x TBS; 0.1 % (v/v) Tween 20) entfernt und die Membran erneut 10 min in frischer Blockierungslösung inkubiert. Die Inkubation der Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Verdünnung 1:10.000) erfolgte in frischer Blockierungslösung über 1 h. Die Membran wurde danach erneut 3-mal 10 min mit Waschlösung und einmal 2 min in 1x TBS gewaschen, bevor sie 1 min lang in ECL-Lösung (100 mM Tris/HCl, pH 8,5; 200 µM p-Coumarsäure; 1,25 mM Luminol; 0,01 % (v/v) H₂O₂) geschwenkt und zwischen zwei Plastikfolien gelegt wurde. Anschließend wurde die Membran ca. 1 - 30 s gegen einen Röntgenfilm (CL-Xposure™ Films, Pierce, Bonn) exponiert.

2.4.3.5 Ponceau-Färbung

Die zu färbende Membran wurde 5 min in Ponceau-Lösung (100ml 10x Lösung: 2g Ponceau S, 30g Trichloressigsäure, 30g Sulfosalicylsäure) inkubiert. Danach wurde die Membran mit H₂O entfärbt. Abschließend wurde die Membran eingescannt und getrocknet.

2.4.4 Infiltration von *Nicotiana benthamiana*

Mit einem gewünschten Konstrukt transformierte *A.tumefaciens* wurden über Nacht im Schüttler bei 28 °C in YEB-Medium (vergl. 2.1.5), mit den erforderlichen Antibiotika in geeigneter Konzentration, gezüchtet. Um die Expressionsrate deutlich zu erhöhen, war es notwendig, die Infiltration zusammen mit einem Stamm vorzunehmen, welcher Träger des p19-Plasmids war. Dieses trägt das Gen für das p19-Protein, einen Protein-Suppressor von „Genesilencing“, und erhöht somit die Expressionsrate des gewünschten Proteins um den Faktor 10 - 20 (Voinnet et al. 2003). Zunächst wurde die OD₆₀₀ einer jeden Kultur gemessen. Darauf hin folgte ein Abzentrifugieren bei 5500 g für 5 min bei RT. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Bakterienpellet mit 400 µl Infiltrationslösung (10mM MES pH 5,6; 10mM mgCl₂) resuspendiert. Nun wurde je eine Kultur, die Träger des gewünschten Konstrukts war, mit der p19 Kultur im Verhältnis ihrer jeweiligen optischen Dichte von 0,7 : 1 gemischt und der resultierende Ansatz mit Infiltrationslösung auf 4 ml aufgefüllt. Um die Virulenz der Agrobakterien zu induzieren wurden noch 4 µl einer 150 mM Acetosyringonlösung hinzugegeben. Danach wurde der Ansatz für 4 h bei RT inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz mit Hilfe einer 1 ml Spritze (Braun, Omnifix®) ohne Kanüle in die Blätter infiltriert. Nach 4-5 Tagen konnten die Blätter geerntet werden.

2.4.5 Isolierung apoplastischer Proteine

Die nach 2.4.4 infiltrierten Tabakblätter wurden nach 3 - 5 Tage geerntet, in 3 -5 cm² große Blattstücke geschnitten und 3 Mal mit kaltem 500 ml ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Blattstückchen in ca. 200 ml Infiltrationspuffer (300mM NaCl, 50 mM Na- Phopshat- Puffer pH 7) eingetaucht und 2-mal bis 75 mbar infiltriert. Die Infiltrierten Blätter wurden dann zur Entfernung größerer Flüssigkeitsrückstände kurz mit Einmalhandtüchern bedeckt, in eine (mit Glaswatte gefüllte) 20 ml Injektionsspritze überführt, und diese in einem 50 ml Falcon-TubeTM platziert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 7 min bei 2000 g. Die Auswaschungen des Apoplasten wurden in Eppendorfgefäße überführt.

2.4.6 Enzymaktivitätstests

2.4.6.1 Mittels fluorogenen Systemin Peptid

Für die Messung der S/SBT3-Aktivität wurde ein fluorogenes Peptid, basierend auf der Aminosäuresequenz des Systemin-Peptids (SKRDPPKMQTD), eingesetzt. Dieses weist am N-Terminus eine Fluoreszenz-Gruppe (Abz(o-aminobenzoyl)) und am C-Terminus eine Quencher-Gruppe (Y(NO₂)) auf. Bei der Anregung der Abz-Gruppe, kommt es zur Emission von Fluoreszenz; diese wird im ungespaltenen Peptid durch den in Nachbarschaft gebundenen Quencher abgefangen. Erst nach einer hydrolytischen Spaltung des Peptids durch die Aktivität der S/SBT3-Protease kommt es zur räumlichen Trennung der Fluoreszenz- und der Quencher-Gruppe, so dass die Emission mittels Fluoreszenzphotometer gemessen werden kann.

Die Messung der S/SBT3-Aktivität erfolgte auf Mikrotiterplatten (white Microwell SI, Nunc, Wiesbaden) an einem Spektralphotometer (Cary Eclipse, Varian, Darmstadt) über einen Zeitraum von 15 min bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm. Der Aktivitätstest wurde in einem Gesamtvolumen von 200 µl bei einer Substratkonzentration von 10 µM in einem Messpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5) und 20 bzw. 40 µl der unverdünnten Auswaschungen von apoplastischen Proteinen infiltrierter Tabakpflanzen, durchgeführt. Die Steigung der Reaktionsgeraden wurde im Zeitintervall von 2 – 13 Minuten berechnet, um Abweichungen wegen schlechter Substratverteilung am Anfang des Experiments oder Substratverbrauch am Ende des Experiments zu umgehen.

Die Aktivitätsmessung der S/SBT3 im Kot von *M.sexta* wurde mit 6 µl eines in 200 µl Proteinextraktionspuffer (vergl. 2.4.1.1) aufgeschlemmten Kotstückes durchgeführt. Zur Inhibierung weiterer evtl. aktiver Proteasen im Kot wurden Proteinaseinhibitoren eingesetzt (Endkonzentrationen: Benzamidin 1mM, Leupeptin 0,1 mM), die nachweislich keinen hemmenden Effekt auf die Aktivität der S/SBT3 besitzen (Cedzich et al. 2009).

2.4.6.2 Zymographie

Proteine wurde in Proteinextraktionspuffer (siehe 2.4.1.1) ohne Mercaptoethanol aufgeschlemmt und per Bradford-Assay ihre Konzentration bestimmt. Die gewünschte Menge an S/SBT3-Probe wurde mit 25 mM Tris pH 7,5 auf ein Volumen von 15µl aufgefüllt, mit dem gleichen Volumen 2-fach Probenpuffer (0,125 M Tris/HCl pH 8,8, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 0,04% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, dessen Trenngel 0,5 % (w/v) Gelatine enthielt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für mindestens 4 Stunden bei 100V. Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung wurde es erst 2 mal für 15 Minuten bei RT in Renaturierungspuffer (2,5% (v/v) Triton X-100) und dann über Nacht bei RT in Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 2,5% Triton X-100, 5 mM CaCl_2) inkubiert. Daraufhin wurde das Gel für 15 Minuten mit Coomassie-Entfärbelösung fixiert, und wie in Abschnitt 2.5.3.2 mit Coomassie ge- und anschließend mit Entfärbelösung (vergl. 2.4.3.2) wieder entfärbt bis helle Banden sichtbar waren.

2.4.7 GUS Färbung

Ein komplettes Fiederblatt wurde in es bedeckenden Mengen GUS-Färbelösung (100 mM NaPO_4 pH 7,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 3 mM, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$, 0,5 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/ml X-Gluc) 3x 1 min bei 100 mbar vakuuminfiltiert und im Dunkeln über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend Entfärbung zur besseren Sichtbarkeit des gebildeten Präzipitats erfolgte mit 70 % bzw. 100 % Ethanol bis zur völligen Entfernung des Chlorophylls aus dem Blattgewebe.

2.5 2-D Differentielle Gelelektrophorese

2.5.1 Probenaufreinigung

Um die Proteine möglichst vollständig im 2D-Probenpuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 30mM Tris, 4% (w/v) CHAPS) zu lösen, wurde das nach der Proteinextraktion nach 2.4.1.2 entstehende Pellet in dem Puffer mit einem Plastikpistill zerkleinert, anschließend mehrmals eingefroren und aufgetaut, sowie zahlreiche Male (3 – 5-Mal für 5 Minuten) ultraschallbehandelt (Bandelin SonoPlus, 97% Leistung), bis eine homogene Lösung entstand. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 15.800 g für 5 Minuten bei 4 °C, der Überstand wurde

abgenommen und in ein neues 2ml Plastikgefäß überführt. Erfolgte die Auftrennung mittels 2D- Gelelektrophorese, wurde der Überstand für 30 min bei 40.000 g ultrazentrifugiert und ggf. per 2D Clean- Up Kit (GE Healthcare, München) aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.5.2 Markierung der Proteinproben mit Fluoreszenzfarbstoffen

Um die Proteine eines Extraktes mit einem Cy-Farbstoff (CyDye DIGE Fluor minimal dyes, GE Healthcare, München) zu markieren, wurden 50 µg Protein mit 1 µl CyDye (400 pmol, in Dimethylformamid) versetzt, gut gemischt und für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Lysin (10 mM) und einer zehnminütigen Inkubation im Dunkeln auf Eis abgestoppt.

2.5.3 2-D Gelelektrophorese

2.5.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung wurden 7 bzw. 24 cm pH-Strips mit einem pH-Bereich von 3 bis 11 (BioRad, Hercules, München) gewählt. Die Strips wurden in DeStreak-Solution (als fertige Lösung von GE Healthcare) mit 0,5 % (v/v) IPG-Buffer (BioRad, Hercules) über Nacht rehydriert und die Proteinproben über anodisches Cup-Laden bei 150 V für 300 Vhr, 300 V für 1000 Vhr, einem Gradienten auf 1000 V für 6000 Vhr, einem weiteren Gradienten auf 10 000 V für 2 Vhr und bei einem letzten Schritt bei 10.000 V für 3 Vhr auf dem Strip im Ettan™ IPGphor™3 (GE Healthcare) fokussiert.

2.5.3.2 SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese als zweite Dimension

Die Strips mit den fokussierten Proteinproben wurden 15 Minuten in Equilibrierungspuffer 1 (75 mM Tris/HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS mit 1 % (w/v) Dithiothreitol), dann 15 Minuten in Equilibrierungspuffer 2 (75 mM Tris pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS mit 2,5 % (w/v) Iodacetamid) geschüttelt, anschließend wurden sie auf Acrylamidgele (375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 12,5 % (v/v) Acrylamid ((rotiphoress® Gel40), 0,04 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat, 0,05 % (v/v) TEMED) gelegt und mit Agarose-Lösung (0,5 % (w/v) Agarose, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau, 250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 2 % (w/v) SDS) überschichtet. Die Proteine wurden zunächst im Ettan™

Dalt6 (GE Healthcare) bei geringer Spannung (50 V für drei Stunden) in das Gel geladen, dann wurde die Spannung für 24 bis 48 Stunden auf 150 V erhöht.

2.5.4 Detektion des Proteinmusters

Sofern die im 2D-Gel getrennten Proteine zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen (2.8.2) markiert worden waren, wurden die Gele am Typhoon-Scanner (TyphoonTrio + Imaging System, GE Healthcare, München) mit Emissionsfiltern für 580 nm (Cy3) bzw. 670 nm (Cy5) gescannt.

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolierung von Plasmid- DNA (DNA Mini-Prep)

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von Birnbaum & Doly (1979).

Bakterien der Art *E. coli*, welche Träger eines gewünschten Plasmids waren, wurden über Nacht in 4 ml LB-Medium mit einer entsprechenden Antibiotikakonzentration bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurden von dieser Kultur 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 2 min bei 15.800 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet in 100 µl Lösung I (25mM Tris/HCl pH 7,5 ; 50 mM Glucose, 10 mM EDTA) resuspendiert. Es folgte eine Lyse der Zellen indem 150 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1 % (v/v) SDS) hinzugefügt wurden und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubierte. Durch Zugabe von 150 µl Lösung III (60ml 5M KAc, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml H₂O), kurzes Invertieren und eine fünfminütige Inkubationszeit auf Eis fielen Proteine und genomische DNA aus. Diese wurden anschließend für 10 min bei 4 °C und 15.800 g abzentrifugiert und der erhaltene Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es folgte die Zugabe des zweifachen Volumens an 100 % EtOH, 15 min Inkubation auf Eis und 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 15.800 g. Das so erhaltene DNA-Pellet wurde nach Entfernen des Ethanols in 200 µl TE-Puffer (10mM Tris/HCL pH 8, 1mM EDTA) gelöst. Zwecks Entfernung störender RNA folgte die Zugabe von 50 U RNase A und eine Reaktionszeit von 30 min bei 37°C. Die Plasmide wurde dann mittels Phenol-Chloroform- Extraktion gereinigt und mit 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und dem 2,5- fachen Volumen an 100 % EtOH für 30 min auf Eis präzipitiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt von 30 min. Das erhaltene Pellet wurde in 70 % EtOH gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 30 µl ddH₂O gelöst. Die soisolierten Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

2.6.2 Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA- Fragmenten wurden 1,5 %- ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) unter Verwendung horizontaler Elektrophorese- Kammern benutzt. Als Größenstandard diente ein 1 kb-DNA (Gene Ruler™ DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot)

2.6.3. Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurde ein Standardvolumen von 20 µl gewählt. In diesem befanden sich 2 µg Plasmid-DNA, 1 µl Restriktionsenzym (Fermentas) und 2 µl des dazugehörigen Restriktionspuffers. Nach einer Inkubationszeit von 1,5- 2 h bei 37 °C wurden 2-5 µl des Ansatzes nach der oben beschriebenen Methode gelelektrophoretisch analysiert. Bei Restriktionsverdaus für eine Klonierung wurde ein Volumen von 100µl verwendet und die Ansätze über Nacht bei 37 °C inkubiert, um einen vollständigen Verdau der DNA zu gewährleisten.

2.6.4 Generierung von ‚blunt-ends‘ mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase

Vollständig verdaute DNA für eine Klonierung wurde auf ein Volumen von 20µl aufkonzentriert. Anschließend wurde ein Reaktionsgemisch von 100µl Volumen aus 20µl 5x Reaktionspuffer (T4- Puffer, Fermentas), 5 µl der aufkonzentrierten, verdauten DNA, 5 µl 2mM dNTPs, 5 µl T4-DNA- Polymerase (5U/µl, Fermentas) und 65 µl H₂O angesetzt, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde für 10 min bei 70°C abgestoppt. Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.6.5 Vektor- Dephosphorylierung

Zu einem 100µl Verdau von DNA wurde 1 µl CIAP (Calf intestinal phosphatase, 1U/µl, Fermentas) pipettiert und das Ganze für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5nM EDTA und anschließender Inkubation bei 75°C für 10 min abgestoppt. Durch eine zweimalige Extraktion mit einem Volumen Phenol/Chloroform wurde das übrige Protein aus dem Reaktionsgemisch entfernt.

2.6.6 DNA Elution

Nach den präparativen Schritten folgte eine Reinigung des Reaktionsansatzes über eine gelelektrophoretische Trennung durch ein Agarosegel. Durch Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid wurde diese unter UV-Licht sichtbar gemacht. Mittels des Größenmarkers konnte das DNA-Fragment gewünschter Größe identifiziert und aus dem Gel herausgeschnitten werden. Die abschließende Elution der DNA aus dem Agarosegel wurde mit dem „DNA Elution Kit“ (Qiagen, Hilden) vorgenommen.

2.6.7 Ligation

Für eine Ligation wurden 10 µl Ansätze pipettiert, in den neben 1 µl T4 DNA- Ligase (10U/µl, Fermentas) und 1 µl 10x Ligase-Puffer pH 7,8 (400mM Tris- HCl; 100mM MgCl₂; 100mM DTT, 5mM ATP) ein Vektor Insert Verhältnis von 1:3 vorhanden war. Die Ansätze wurden mit ddH₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgt im Thermocycler.

Programm:	
8 h	16°C
1 h	30°C
10 min	65°C
∞	10°C

2.6.8 Transformation von *E.coli* und *A.tumefaciens*

Die verwendeten und bei -80 °C gelagerten Stämme (*E.coli* DH10B und *Agrobakterien* C58C1) wurden auf Eis aufgetaut. Zeitgleich wurden die Elektroporationsküvetten auf Eis gekühlt. 1 µl der zu transformierenden DNA wurde zu den 40 µl bakterieller Aliquots pipettiert, mit einer Pipette vorsichtig gemischt und in die kühle Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V, 12 µF und 335 Ω im Elektroporator (EquiBio, Easyjet Optima). Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 1 ml SOC Medium versetzt und 1h bei 37 °C bei *E.coli* und für 3h bei 30°C bei *Agrobakterium tumefaciens* im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB- Nährmedium, bzw. YEB Medium ausplattiert, welche die entsprechenden Antibiotika enthielten.

2.6.8. PCR Techniken

2.6.8.1 PCR-Mutagenese

Für die PCR-Mutagenese wurde ein synthetisches Primerpaar verwendet, welches die gewünschte Mutation trägt (2.1.4). *Ansatz 1* (s.u.) wurde zusammen pipettiert und mit einem Wachspellet für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Das Wachs begann bei dieser Temperatur zu schmelzen und bildete bei der anschließenden 10 Min. Inkubation auf Eis eine feste Phase über *Ansatz 1* aus. *Ansatz 2* (s.u.) wurde auf diese feste Phase pipettiert und das PCR-Programm gestartet. Durch dieses ‚Hot-Start‘ Verfahren treffen Primer und Template-DNA erst bei hohen Temperaturen aufeinander. Unspezifische Primerbindungen werden hierdurch vermieden. Nach Ablauf des Programms wurde 1 µl *DpnI* in das 200 µl PCR-Gefäß pipettiert (die Wachsschicht wurde hierbei durchstoßen) und für mindestens 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. *DpnI* verdaut methylierte DNA, entfernte also die ursprüngliche Template-DNA aus dem Reaktionsgemisch, so dass nur DNA mit der gewünschten Mutation im PCR-Gefäß übrig blieb.

Programm:

Funktion	Dauer	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	2 min	95°C	1
Denaturierung	30 sek	95°C	18 Zyklen
Annealing	1 min	56°C	
Extensionszeit	7 in	72°C	
Abschluss	10 min	72°C	1
	30 sek	4°C	1
	1 min	30°C	1

Ansatz 1			Ansatz 2	
ddH ₂ O		16,5 µl	ddH ₂ O	18,5 µl
10-fach Pfu-		2,5 µl	10-fach Pfu Puffer*	2,5 µl
dNTPs (10mM)		1,0 µl	DNA	3 µl
Primer	for	2,5 µl	Pfu- Polymerase*	1,0 µl
Primer	rev.	2,5 µl		

* Fermentas

2.6.8.2 Kolonie-PCR

Einzelkolonien von Agarplatten wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und kurz in einem 200µl PCR-Gefäß gedreht, in welches 3,5µl steriles Wasser vorgelegt waren. Der Zahnstocher wurde anschließend bei RT in 2 ml Reaktionsgefäßen inkubiert, in welche LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika vorgelegt waren. Die im Wasser des 200µl PCR-Gefäßes befindlichen Bakterienzellen wurden anschließend auf 95 °C erhitzt, kurz abgekühlt und mit einem Reaktionsgemisch bestehend aus 14,5 µl H₂O, 5µl 5x PCR Puffer (100 mM (NH₄)₂SO₄, 0,08 % Triton X-100, 20 % (v/v) DMSO, 250 mM KCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8,3)), 1µl Taq Polymerase, 0,5 µl dNTPs und je 0,5µl 10nM forward und reverse Primer versehen. Die PCR-Reaktion erfolgte im Thermocycler nach folgender Anleitung:

Programm

Funktion	Dauer	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	2 min	95°C	1
Denaturierung	30 sek.	95°C	25 Zyklen
Annealing	40 sek.	58°C	
Elongation	1 min	72°C	
Abschließend	∞	10°C	1

Von den positiven Kolonien wird eine über Nacht Kultur erstellt. Hierzu wurde die mit dem Zahnstocher angeimpfte LB-Kultur auf 3 ml mit LB- Medium aufgefüllt (2.1.5) und im Schüttler bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.7. Experimente mit *Manduca sexta*

2.7.1 Verwundung von Pflanzen durch *M.sexta*

Für die Verwundung von Tomatenpflanzen durch *Manduca sexta*-Larven wurde die von Karojet (2006) entwickelte Versuchsanordnung verwendet. Bei dieser Methode wurden Raupen im 5. Larvenstadium auf dünne Holzstäbe gesetzt, die dann in die Pflanzentöpfe gesteckt wurden. Ein direktes Aufsetzen der Larven auf die drei Wochen alten Tomatenpflanzen war nicht möglich, da die Larven im 5.Entwicklungsstadium zu groß und zu schwer für die kleinen Tomatenpflanzen waren und außerdem beim Abnehmen der Larven, durch deren Haftorgane, oft zusätzliche Verletzungen an den Pflanzen entstehen können. Der Einsatz jüngerer Larven zeigte sich nicht als praktikabel, da Larven, die noch nicht das 5.Larvenstadium erreicht hatten, nicht konstant an den Pflanzen fraßen, wodurch keine vergleichbaren Ergebnisse erzielt werden konnten (Karojet 2006). 4 h vor dem Versuch wurde den eingesetzten Raupen jegliche Nahrungsquelle entzogen. Nach Versuchsbeginn wurden die Larven so lange an der Pflanze belassen, bis ca. 1/3 der Blattfläche abgefressen war.

2.7.2 *M.sexta* Larvenentwicklung

2.7.2.1 Vorversuch/ ‚Larvenentwicklung 1‘

Bei diesem Experiment wurden Raupen auf *S/*SBT3-Überexpressions-, *S/*SBT3-RNAi- und wildtypischen- Tomatenlinien ausgesetzt, die innerhalb von zwölf Stunden geschlüpft waren. Hierzu wurden ggf. abends alle bereits vorhandenen Raupen aus einem Gelege entfernt und am nächsten Morgen alle in der Zwischenzeit geschlüpften Raupen für das Experiment verwendet, d.h. auf einer der drei verwendeten Tomatenlinien ausgesetzt, die drei Wochen vor Versuchsbeginn im Gewächshaus randomisiert aufgestellt wurden, um evtl. auftretende Positionseffekte zu minimieren. Die Pflanzen waren zu Versuchsbeginn zwischen 6 und 8 Wochen alt und wurden bei Bedarf gewechselt. Raupen mussten zu keinem Zeitpunkt hungern. Die Raupen wurden im Wochenrhythmus auf einer Feinwaage gewogen. Heruntergefallene Raupen wurden mehrfach täglich zurück auf die Pflanzen gesetzt.

2.7.2.2 *M.sexta*-Larvenentwicklung 2

Der Aufbau ist mit dem aus Experiment 1 vergleichbar mit dem Unterschied, dass die Pflanzen nicht zusammen in einem Zelt, sondern „offen“ im Gewächshaus standen und heruntergefallene Raupen aufgesammelt und aus dem Experiment entfernt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 S/SBT3-Genexpression nach *M.sexta*-Verwundung

Um den Verdacht einer möglichen Funktion der S/SBT3 in der Interaktion von Tomatenpflanzen mit herbivoren Insekten zu erhärten, wurde zunächst die Expression von S/SBT3 untersucht.

Für die Überprüfung eines direkten, durch *M.sexta* herbeigeführten, Effekts auf die Genexpression der S/SBT3, wurden transgene Tomatenpflanzen verwendet. Diese exprimierten das uidA Gen aus *E.coli* unter der Kontrolle eines 1,9 kb langen Fragments des S/SBT3- Promotors. Dessen Aktivität kann in diesen Linien, über die Infiltration eines Substrats der β -Glucuronidase und die Umwandlung dessen zu einem blauen Präzipitat, sichtbar gemacht werden.

Blätter der S/SBT3-Promotor-GUS Pflanzen wurden durch *M.sexta* verwundet, bis ca. 1/3 der Fläche eines Blattes abgefressen war und das Blattmaterial nach 8, 16, 24, und 48 Stunden nach der Verwundung geerntet (vergleiche Abschnitt 2.7.1). Die Färbung und Entfärbung der Blätter ist in Abschnitt 2.4.7 beschrieben. Die Blaufärbung der Blätter zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde fotografisch dokumentiert. Das Ergebnis ist Abb. 3.1 zu entnehmen.

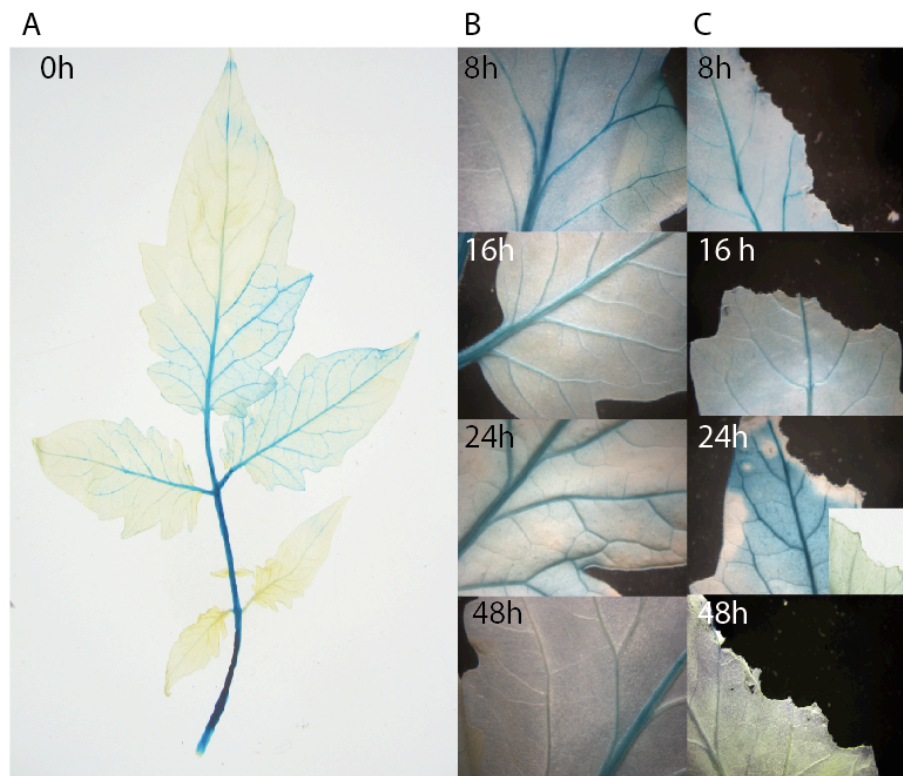


Abb. 3.1 S/SBT3-Promotoraktivität 8, 16, 24, und 48 Stunden nach *M.sexta*-Verwundung

- A. Unverwundetes Blatt
- B. Unverwundete Seitenfieder von Blättern, die durch *M.sexta* verwundet wurden
- C. Die Verwundungsstelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach *M.sexta* Verwundung

Es ergibt sich das Bild einer konstitutiven Aktivität des S/SBT3-Promotors in den Blattstielen und Blattadern aller untersuchten Blätter. Das in Abb. 3.1 A dargestellte unverwundete Fiederblatt zeigt neben der Blaufärbung der Blattadern eine zusätzliche Einfärbung mancher Bereiche zwischen den Blattadern der Blätter, die nicht durch eine Verwundung verursacht wurden. In Abb. 3.1. B sind die unverwundeten Fiedern eines durch *M.sexta* verwundeten Fiederblattes dargestellt. In ihnen ist die S/SBT3 zu jedem untersuchten Zeitpunkt nur in den Blattadern, nicht aber dem zwischen den Adern liegenden Blattgewebe exprimiert. Auch die in Abb. 3.1. C dargestellten verwundeten Fiedern zeigen keine auffälligen Blaufärbungen. Einzig 24 Stunden nach herbivorer Verwundung ist hier eine deutliche Einfärbung der Fressstelle zu beobachten. Dieser Befund konnte jedoch nicht bestätigt werden (kleines Foto unten rechts Abb. 3.1.C, 24h). Es ist daher anzunehmen, dass die dargestellte Einfärbung der 24-Stunden-Verwundungsstelle, ebenso wie die Einfärbungen des zwischen den Blattadern liegenden Gewebes des unverwundeten Blattes, nicht mit der *M. sexta* Verwundung in Zusammenhang zu bringen sind.

Die Aktivität des *S/SBT3*-Promotors änderte sich in Folge von *M.sexta*-Verwundung weder in den unverwundeten Fiedern von Blättern an denen der Fraßfeind gefressen hatte (Abb. 1B), noch an der Verwundungsstelle selbst (Abb 1C). Hieraus lässt sich ableiten, dass es keine durch *M.sexta* herbeigeführte räumliche und auch keine zeitliche Veränderung der *S/SBT3*-Genexpression gibt. Besitzt die *S/SBT3* eine für die Tiere schädliche Wirkung, so ist diese nicht auf ein verändertes *S/SBT3*-Expressionsmuster zurückzuführen.

3.2 *M.sexta*-Larvenentwicklung im Einfluss der S/SBT3

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die S/SBT3 das 18 Aminosäuren lange Wund-Signalpeptid Systemin *in vitro* schneiden und dem Enzym daher eine mögliche Rolle in der Interaktion mit Herbivoren zukommen kann, wurde ein Effekt der S/SBT3 auf die Larvenentwicklung von *M.sexta* untersucht. In diesen von F. Huttenlocher (2008) durchgeführten Experimenten wurden *M.sexta* Larven auf transgenen Tomatenpflanzen ausgesetzt, die S/SBT3 überexprimierten, oder in denen kein S/SBT3 nachgewiesen werden konnte. In diesen Arbeiten wurde eine negative Korrelation zwischen den Verweildauern der Larven auf den Pflanzen und dem S/SBT3-Gehalt beobachtet. Für diese Beobachtung gibt es verschiedene hypothetische Erklärungen. Es ist vorstellbar, dass der Nährstoffgehalt von S/SBT3-überexprimierenden-Pflanzen reduziert oder die Verdaubarkeit der Nahrung eingeschränkt ist. Auch können morphologische Gründe als Folge von Unterschieden in der Menge an gebildeten S/SBT3 nicht ausgeschlossen werden, die zum Beispiel zu einem geringeren Halt der Larven auf den Pflanzen führen könnten.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Verweildauern der Larven auf den Pflanzen als Folge von schlechterer Nährqualität der Futterpflanzen mit hohem S/SBT3-Gehalt, könnte durch eine Verzögerung der Entwicklung junger Larven überprüft werden, was von S. Hüppe (2007) untersucht wurde. Sie setzte drei Tage alte Larven, die vorher auf Kunstfutter gewachsen waren, auf 6 Wochen alte transgene Tomatenpflanzen und dokumentierte die Gewichtszunahme durch tägliches Wiegen. Der Versuch wurde nach 11 Tagen beendet. Es waren mit diesem Aufbau keine Gewichtsunterschiede zwischen den, auf verschieden stark S/SBT3-exprimierenden Tomatenpflanzen gewachsenen, Larven erkennbar.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden die Experimente hier mit einem modifiziertem Versuchsaufbau überprüft.

3.2.1 Selektion transgener Tomatenlinien mit S/SBT3-überexpressions- oder S/SBT3-RNAi-Konstrukten

Der Proteinexpressionsspiegel von S/SBT3 in transgenen Linien, in denen die S/SBT3-Expression unterdrückt ist (HP 21-7; RNAi) oder die das Protein überexprimieren (G19G1, G2f1D; OE (Overexpressor)) wurden mit dem Ziel untersucht, ihre Eignung für einen *M.sexta* Entwicklungsversuch zu überprüfen. Hierzu wurden aus wildtypischen (UC82b; wt) sowie den drei erwähnten transgenen Tomatenlinien Proteinextrakte erstellt und diese im Western-Blot, unter Verwendung eines gegen ein heterolog in *E.coli* exprimiertes Fragment der

S/SBT3 gerichtetes Antiserum aus Kaninchen, auf ihren *S*/SBT3-Gehalt hin untersucht (Abb. 3.2.1).

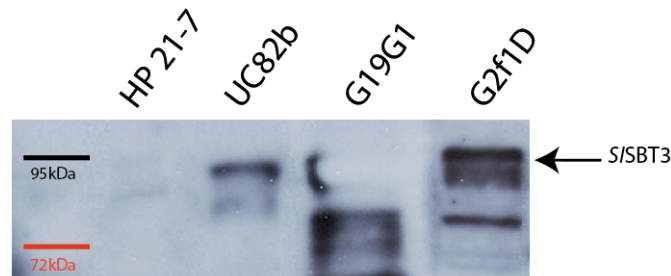


Abb. 3.2.1 Expressionsniveau der *S*/SBT3 in genetisch verschiedenen Tomaten-Linien

20 µg Gesamtproteinextrakt aus Blättern folgender transgener *S*/SBT3 Linien im Western- Blot: HP 21-7 (RNAi), UC82b (wt), G19G1 (OE), G2f1D (OE)

Detektion erfolgte mittels eines *S*/SBT3-Antiserums

Erwartungsgemäß zeigt sich in dem Proteinextrakt aus dem wildtypischen UC82b eine Bande bei ~90kDa, die die *S*/SBT3-Bande darstellt. In der *S*/SBT3-RNAi-Linie HP 21-7 ist kein Signal des Antikörpers sichtbar, was eine erfolgreiche Unterdrückung der *S*/SBT3-Expression in dieser Linie anzeigt. Die *S*/SBT3-Überexpressionslinien G2f1D und G19G1 zeigen beide starke *S*/SBT3-Signale bei ~90kDa, die mindestens 5 –10 -fach stärker sind als das *S*/SBT3-Signal in UC82b. Die Bande von G19G1 ist stark überbelichtet und erscheint weißlich.

3.2.2 Larvenentwicklung

In dem von uns ausgewählten Versuchsaufbau für die Untersuchung der *M.sexta*-Larvenentwicklung wurden die Larven kleinstmöglich, d.h. auch jüngstmöglich, auf verschiedenen Genotypen ausgesetzt, die *S*/SBT3 in unterschiedlichen Mengen exprimierten. Die Zeitperiode zwischen dem Wiegen der Larven wurde gegenüber den vorhergehenden Arbeiten vergrößert, um einen möglichen Stressor, der durch das Absammeln und Wiegen der Larven entsteht, gering zu halten, da dieser sich auf das Fraßverhalten der Tiere auswirken könnte. Die Tomatenpflanzen aller verwendeten Genotypen waren drei Wochen vor Versuchsbeginn randomisiert im Gewächshaus aufgestellt worden, um einen möglichen Positionseffekt zu vermeiden. Zu Versuchsstart waren sie sechs bis acht Wochen alt. Die Versuche sollte über den gesamten Zeitraum der Larvenentwicklung stattfinden. Die genaue Beschreibung der Versuche ist in Abschnitt 2.7.2. angegeben.

Vorversuch:

Zur Überprüfung, ob sich mit einem, im Vergleich zu den bereits durchgeführten Versuchen, veränderten Versuchsaufbau ein Effekt der *S/*SBT3 auf die Larvenentwicklung von *M.sexta* beobachten ließe, wurde ein Entwicklungsversuch im, gemessen an der Raupenzahl, kleinen Maßstab durchgeführt. Hierbei wurden 20 *M.sexta*-Larven auf wt-Pflanzen und je 30 Larven auf *S/*SBT3-RNAi- und OE-Pflanzen in ihrer Entwicklung verfolgt. Die Larven entstammten einem in der Nacht zuvor geschlüpften Gelege, wurden auf die verschiedenen Genotypen verteilt und nach 7, 14 und 17 Tagen gezählt, gewogen und das durchschnittliche Larvengewicht bestimmt. Larven, die während dieser Zeit die Pflanzen verließen, wurden mehrfach täglich zurück auf die Pflanzen gesetzt. Die durchschnittlichen Gewichte der Larven auf den verschiedenen Tomaten- Genotypen sind in Abb. 3.2.2 grafisch dargestellt.

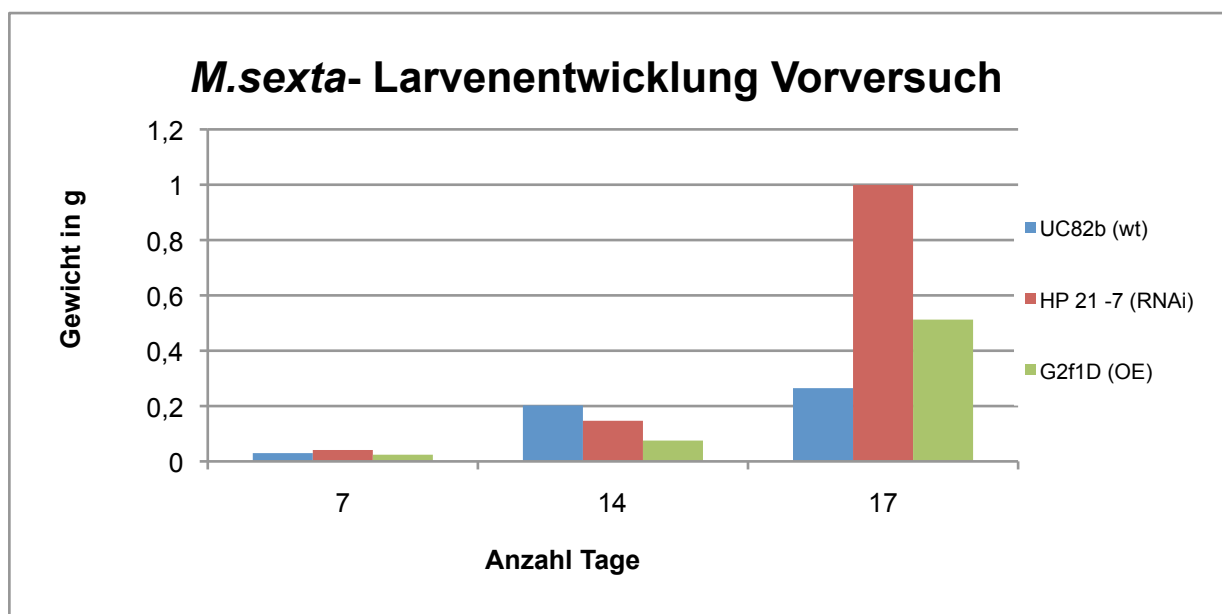


Abb. 3.2.2 Durchschnittliches Gewicht der auf *S/*SBT3- wildtyp-, -RNAi- und -OE-Pflanzen gewachsenen *M.sexta* Larven im Vorversuch

Die Abszisse gibt die Anzahl der Tage nach Versuchstart an, an welchen die Larven gewogen wurden

Die Ordinate zeigt das durchschnittliche Raupengewicht in g. Ausgesetzt wurden 30 Larven auf RNAi- und OE- und 20 Larven auf wt-Tomatenpflanzen. Bei Versuchsende lebten noch 11 der auf wt-, 15 auf RNAi- und 22 auf OE-Pflanzen ausgesetzten Larven.

Pflanzen wurden nach Bedarf gewechselt. Die Datensätze zur Abbildung sind im Anhang unter 6.1.1 zu finden.

Die auf UC82b-Pflanzen gewachsenen Larven entwickelten sich bis zum Tag 14 im direkten Vergleich zu den schwersten Larven, nahmen in den folgenden drei Tagen jedoch nur noch gering an Gewicht zu, während die G2f1D- und HP 21-7-Larven ihr Gewicht in diesem Zeitraum verfünffachten. Zu jedem Zeitpunkt waren die auf *S/*SBT3-RNAi-Pflanzen

gewachsenen Larven größer als ihre auf *S/GBT3*-Überexpressionspflanzen gewachsenen Artgenossen. Nach 17 Tagen etwa um den Faktor 2. Nach 17 Tagen waren die ersten Larven im ‚Wandering-Stadium‘ angelangt, so dass der Versuch an dieser Stelle beendet wurde, da Larven ab diesem Stadium das Fressen einstellen und damit die Gewichtszunahme stoppt. Es ist bei diesem Ergebnis zu beachten, dass sich bis zu diesem Zeitpunkt die Larvenzahl auf 11 Larven bei wt-Pflanzen und 15 bzw. 22 Larven bei RNAi- und OE-Pflanzen reduziert hatte.

In diesem, gemessen an der eingesetzten Larvenzahl pro pflanzlichen Genotyp, kleinen Versuchsaufbau konnten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung von *M.sexata*-Larven beobachtet werden, die auf *S/GBT3*-RNAi und OE-Pflanzen gefressen hatten. Dieses Ergebnis bekräftigte den Verdacht einer schädlichen Wirkung der *S/GBT3* auf Larven von *M.sexata* und war damit der Ausgangspunkt, den Versuchsaufbau beizubehalten, und den Versuch im größerem Maßstab, d.h. mit größerer Larvenzahl pro Genotyp, zu wiederholen.

Larvenentwicklung 1

Dieser Versuch wurde analog dem Vorversuch durchgeführt. Für das Experiment wurden pro Tomatenlinie 70 *M.sexata*-Larven ausgesetzt, nach 7, 13, 19, 23 und 26 Tagen gewogen und das Durchschnittsgewicht in Abbildung 3.2.3 grafisch dargestellt. Larven, die im Versuchszeitraum die Tomatenpflanzen verließen, wurden mehrfach täglich wieder auf diese aufgesetzt.

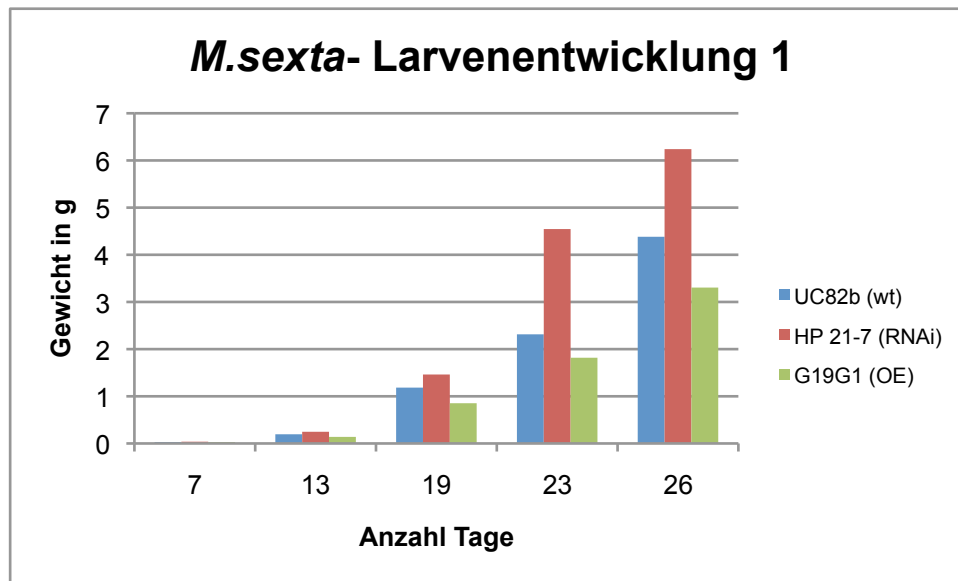


Abb. 3.2.3 Durchschnittliches Gewicht der auf *S/SBT3*- wildtyp-, -RNAi und -OE-Pflanzen gewachsenen *M.sexta* Larven in ‚Larvenentwicklung 1‘

Die Abszisse gibt die Anzahl der Tage nach Versuchstart an, an welchen die Larven gewogen wurden

Die Ordinate zeigt das durchschnittliche Raupengewicht in g

Ausgesetzt wurden 70 Raupen pro Genotyp. Am Ende des Experiment lebten noch 29 (wt), 21 (RNAi) und 16 (OE) der ausgesetzten Larven. Pflanzen wurden nach Bedarf gewechselt. Die Datensätze zu Abbildung sind im Anhang unter 6.1.2 zu finden

Der Gewichtsunterschied zwischen den auf verschiedenen *S/SBT3*-Genotypen gewachsenen *M.sexta*-Larven wurde in diesem Versuch wie schon im Vorversuch nach 2-3 Wochen deutlich. Zu jedem Zeitpunkt sind die *S/SBT3*-RNAi-Larven (HP- 21-7) schwerer, als ihre auf wt (UC82b) und Überexpressionslinien (G19G1) gewachsenen Artgenossen, gegen Ende um einen Faktor von 2. Die auf wt wachsenden Larven zeigten gegenüber dem Vorversuch ein den anderen Genotypen vergleichbares Wachstum. Ihr Gewicht ist zwischen *S/SBT3*-RNAi und Überexpressionsraupen befindlich und stützt damit die Hypothese eines schädlichen Effekts der *S/SBT3* auf die Larvenentwicklung von *M.sexta*. Bemerkenswerterweise benötigten die Larven in diesem Versuchsdurchlauf mit 26 Tagen deutlich länger bis zum Erreichen des ‚Wandering-Stadiums‘, verglichen mit den Larven des Vorversuchs. Ursachen für eine solche Schwankung könnten jahreszeitlich auftreten. So ändern sich beispielsweise die Wachstumsweisen der Pflanzen im Gewächshaus, je nachdem wie viel Kunst- und Naturlicht sie während ihrer Anzucht ausgesetzt sind. Auch ist ein direkter Effekt der Lichtverhältnisse oder Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus auf die Entwicklung der *M.sexta*-Larven nicht auszuschließen. Außerdem ist zu beachten, dass zum Endzeitpunkt des Versuches von den ursprünglich ausgesetzten 70 Larven pro Genotyp, noch 29 (wt), 21 (RNAi) und 16 (OE) vital waren.

Larvenentwicklung 2

Um auszuschließen, dass die beobachteten Gewichtsunterschiede der *M.sexta*-Larven in den unterschiedlichen Verweildauern der Tiere auf den Futterpflanzen begründet sind, wurde der Versuchsaufbau weiter modifiziert. In dieser Durchführung wurden alle Larven, die während des Versuchs die Pflanzen verließen, aus der Stichprobe entfernt.

Verwendet wurden 60 Raupen pro Genotyp. Messungen erfolgten nach 7, 14 und 19 Tagen. Die Durchschnittsgewichte der Larven sind in Abb.3.2.4 grafisch dargestellt.

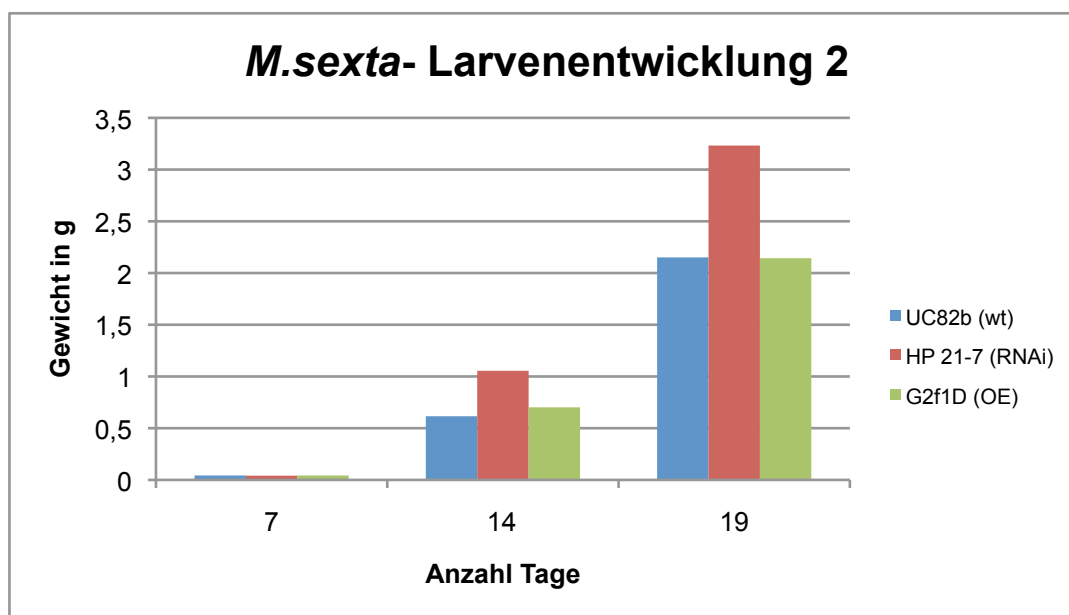


Abb. 3.2.4 Durchschnittliches Gewicht der auf *S/*SBT3- wildtyp-, -RNAi- und -OE-Pflanzen gewachsenen *M.sexta* Larven in „Larvenentwicklung 2“

Die Abszisse gibt die Anzahl der Tage nach Versuchstart an, an welchen die Larven gewogen wurden

Die Ordinate zeigt das durchschnittliche Raupengewicht in g

Ausgesetzt wurden 60 Raupen pro Genotyp. Bei der Beendigung des Versuchs befanden sich noch 25 (wt) bzw. 17

(RNAi, OE) Larven auf den Versuchspflanzen. Pflanzen wurden nach Bedarf gewechselt. Datensätze zur Abbildung sind im Anhang unter 6.1.3 dargestellt

Auch bei dieser Versuchsanordnung waren Gewichtsunterschiede zwischen den auf verschieden stark *S/*SBT3-exprimierenden-Linien gewachsenen *M.sexta*-Larven feststellbar. Nach sieben Tagen zeichneten sich noch keine erkennbaren Gewichtsunterschiede ab. Diese prägten sich in der folgenden Woche aus, so dass sie ab Tag 14 auch in der Grafik deutlich erkennbar werden und sich bis zum 19. Tag weiter verstärken. Das durchschnittliche Gewicht der auf wt-Pflanzen gewachsenen Larven lag hierbei deutlich unterhalb der *S/*SBT3-RNAi-Larven und zeigte keinen Unterschied zu den auf *S/*SBT3-OE-Linien gewachsenen

M.sexta-Larven. Am Ende des Experiment befanden sich von den ursprünglich 60 pro Genotyp ausgesetzten Larven noch 25 auf wt- und jeweils 17 auf RNAi- und OE-Pflanzen.

Anhand dreier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen wurde herausgearbeitet, dass es einen Gewichtsunterschied zwischen *M.sexta*-Larven gibt, deren Nahrung unterschiedliche Mengen *S/SBT3* enthält. Zu allen Zeitpunkten waren die auf *S/SBT3*-RNAi Linien gewachsenen Larven größer als ihre auf Überexpressionslinien gewachsenen Artgenossen. Die Gewichtsunterschiede prägen sich über die Zeit immer deutlicher aus. Dieses könnte auf einen geringeren Nährwert bzw. eine geringe Nahrungsmittelverwertung in bzw. bei den Pflanzen die *S/SBT3*-exprimieren oder überexprimieren zurückzuführen sein, da die Larven mit zunehmenden Wachstum auch mehr Nahrung zu sich nehmen, so dass sich ein solcher Effekt potenzieren könnte.

Auch könnte man die in der späteren Larvenentwicklung auftretenden Größenunterschiede auf eine erhöhte induzierte Abwehr in den *S/SBT3*-exprimierenden-Pflanzen werten. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass alle Pflanzen nach Bedarf gewechselt wurden und eine Versuchspflanze in höheren Larvenstadien nicht länger als drei Tage als Futterpflanze diente.

3.3 Stabilität der S/STB3 in Darm und Kot von *M.sexta*

Die Expressionsanalyse der S/STB3 mittels einer S/STB3-Promotor-Reporter-Gen-Analyse in Folge *M.sexta*-Verwundung zeigte keine auffälligen räumlichen oder zeitlichen Unterschiede im Expressionsmuster vor und nach der Verwundung. Die Gewichtsentwicklung der Larven zeigte einen Zusammenhang zwischen der Menge an S/STB3 in den Pflanzen und der Gewichtszunahme über die Zeit. Larven auf S/STB3-Überexpressionspflanzen waren kleiner, als ihre auf S/STB3-RNAi-Pflanzen gewachsenen Artgenossen. Die S/STB3 beeinflusst die Insekten in ihrer Entwicklung, indem sie diese verzögert.

Eine mögliche Wirkungsweise von anti-herbivoren Proteinen ist ihre Funktion im Darm, welche für die S/STB3 denkbar, jedoch bisher noch nicht untersucht ist. Für eine solche Funktion der S/STB3 spricht v. a. ihre Aktivität bei hohen pH-Werten (Cedzich et al. 2009), wie sie häufig im Darm von Arthropoden vorgefunden werden (Felton 2005). Dieses setzt allerdings die Stabilität des Proteins im Insektdarm voraus. Um diese zu überprüfen wurden Proteinextrakte aus *M.sexta*-Darm und -Kot gewonnen (vergl. 2.2.3.2), die zuvor auf den verschiedenen, im Entwicklungsversuch verwendeten, S/STB3-Genotypen gefressen hatten und je 10 µg Protein aus diesen Proben im Western-Blot analysiert. Zur Detektion wurde das S/STB3-Antiserum verwendet. Der Western-Blot ist in Abbildung 3.3.1 dargestellt.

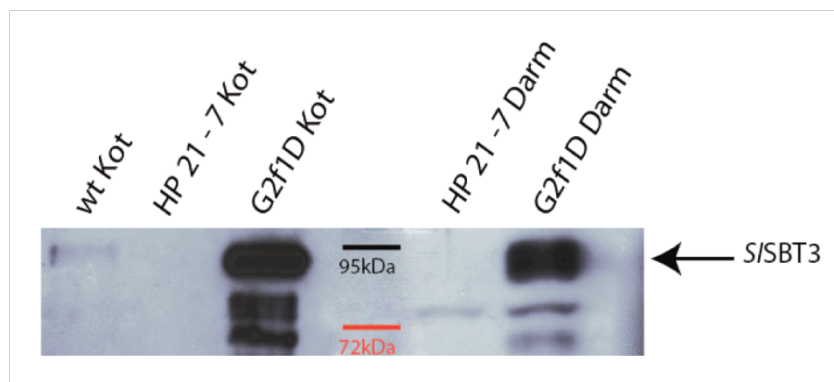


Abb. 3.3.1 S/STB3 in Kot und Darm von *M.sexta*

Western-Blot mit 10 µg aufgetragenem Protein aus Kot und Darm von *M.sexta*, die zuvor von S/STB3- RNAi (HP21-7) und -überexprimierenden (G2f1D), sowie wildtypischen (UC82b) Pflanzen aufgewachsen waren. Die Detektion erfolgt mittels eines S/STB3-Antiserums.

Im Kot von auf UC82b-Pflanzen aufgewachsenen *M.sexta*-Larven war eine schwache Bande bei ~90kDa sichtbar, die dem S/STB3 Protein zugeordnet wurde, da diese die einzige vom Antiserum detektierte Bande war. Der Proteinextrakt aus Kot von mit S/STB3-RNAi- Pflanzen gefütterten Larven zeigte kein Signal. Im Kot von auf Überexpressionspflanzen gewachsenen Larven wurde eine deutliche Bande bei ~90kDa detektiert. Die

Detektierbarkeit im Kot der *M.sexta*-Larven spricht für eine Akkumulation des Proteins während der Darmpassage. Im rechten Teil der Abbildung sind daher Proben aus einem *M.sexta*-Darm aufgetragen. Im Darm von auf RNAi-Linien aufgewachsenen Larven war kein S/SBT3-Signal detektierbar (HP 21-7 Darm), im Darm von auf Überexpressions-Linien gewachsenen Larven (G2f1D Darm) zeigte sich ein starkes Signal bei ~90kDa.

Die S/SBT3 ist in Darm und Kot von *M.sexta* detektierbar und passiert den Verdauungstrakt ohne feststellbaren Größenverlust. Sie ist gegenüber dem dort herrschenden proteinfeindlichen Milieu immun. Dieser Befund erhärtet den Verdacht einer möglichen Funktion des Proteins im Darm von Insekten. Die beobachteten Gewichtsunterschiede der *M.sexta*-Larven im Entwicklungsversuch, zusammen mit dem Befund der Akkumulation des Proteins im Durchlauf des Darms, decken sich mit der Hypothese. Die S/SBT3 könnte sowohl direkten Einfluss auf die Larvenentwicklung nehmen, indem sie selbst direkt auf Strukturen des Darms, essentielle Aminosäuren oder Nährproteine wirksam ist, oder aber auch indirekt, durch die gezielte Modifizierung pflanzlicher oder tierischer Proteine wirken.

3.4. Aktivität der S/SBT3 im Kot von *M.sexta*

3.4.1 Aktivitätsbestimmung mittels eines fluorogenen Systeminpeptids

Es wurde gezeigt, dass die S/SBT3 den Darm von *M.sexta* unverdaut verlassen kann und einen verzögernden Effekt auf die Larvenentwicklung von *M.sexta* ausübt. Jedoch ist nicht bekannt, ob die S/SBT3 zu diesem Zeitpunkt noch aktiv ist, was den Verdacht auf eine Funktion des Proteins im insektidären Verdauungstrakt weiter erhärten würde. Zur Überprüfung der S/SBT3-Aktivität im Kot von *M.sexta*-Larven wurden Aktivitätsmessungen durchgeführt.

Der durchgeführte Aktivitätstest beruhte auf der Fähigkeit der S/SBT3 zur Spaltung von Systemin. Das hierzu verwendete synthetische Systeminpeptid ist durch einen Aminosäureaustausch modifiziert, da dieses die Spaltgeschwindigkeit des Peptids durch die S/SBT3 im Positiven beeinflusst (Huttenlocher 2008). Zudem trägt es eine fluorogene Gruppe am N-Terminus und eine Quencher-Gruppe am C-Terminus. Über eine spezifische Anregungswellenlänge wird die fluorogene Gruppe angeregt, doch der C-terminale Quencher verhindert eine Fluoreszenz, sofern das Systemin Peptid intakt ist. Wird allerdings das Peptid gespalten, werden fluorogene Gruppe und Quencher getrennt und so kommt es nach Anregung bei 320 nm zur Fluoreszenz. Die Emission bei 420 nm wird im Fluorimeter detektiert. Mit fortschreitender Spaltung von Systemin in der Probe steigt die Fluoreszenz

fortwährend an. Die genaue Funktionsweise des Tests ist in Abschnitt 2.4.6.1 beschrieben worden.

Unter der Annahme, dass im Kot von *M.sexta*-Larven etwa gleichviel Protein enthalten ist, wurde ein Vorversuch durchgeführt mit dem Ziel die Eignung dieser Aktivitätsmessung für *M.sexta*-Kot zu überprüfen.

Frischer Kot von *M.sexta*-Larven, die auf Tomaten *S*/SBT3-RNAi und -Überexpressionslinien gewachsen waren, wurde auf seine Aktivität untersucht. Hierzu wurden jeweils ein Kot-Stück gleichaltrer *M.sexta*-Larven in gleichem Volumen Extraktionspuffer aufgeschlemmt und gleiche Volumina für den Test eingesetzt. Da im *M.sexta*-Kot vermutlich noch weitere Proteinasen enthalten sind, die aktiv sein könnten, wurden Proteinaseinhibitoren verwendet, welche erwiesenermaßen die *S*/SBT3-Aktivität nicht beeinflussen (Huttenlocher 2008).

Neben den Proben aus Kotextrakten von G2f1D und HP 21-7, wurden 37,5 ng reine *S*/SBT3 als Positivkontrolle verwendet. Die Änderung der Fluoreszenz über die Zeit ist in Abbildung 3.5.2 dargestellt. Für das Zeitintervall von 2 – 13 Minuten wurde für jede Probe eine Trendlinie errechnet, deren Steigung Aussagen über die Proteinaseaktivität in jeder Probe zulässt (Tabelle 3.1).

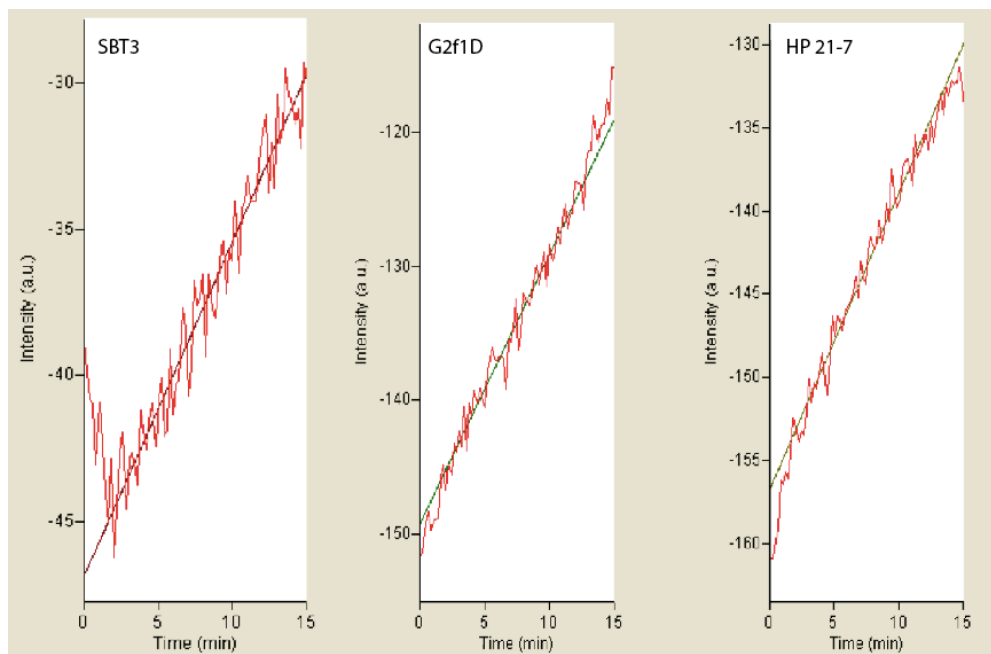


Abb. 3.4.1 Aktivitätsmessung von *S*/SBT3 aus dem Kot von *M.sexta*-Larven mittels eines fluorogenen Systemin- Peptids

Darstellung der Fluoreszenzzunahme (Anregung bei 320 nm, Emission bei 420nm) im Aktivitätstest von *S*/SBT3-Proben aus Kot von *M. sexta*. Dem Kot sind die Proteinaseinhibitoren Leupeptin und Benzamidin zugegeben. Für den Test wurden 6 µl Kotextrakt aus *S*/SBT3-RNAi (HP 21-7) und -Überexpressionslinien (G2f1D) verwendet. Als Positivkontrolle dienten 37,5 ng aufgereingte *S*/SBT3 (SBT3). Im Intervall von 2 –13 Minuten wurde eine Trendlinie erstellt, deren Steigung in Tab. 3.2 zu sehen ist.

Für die in Abb. 3.4.1 eingezeichnete Trendlinie zur Fluoreszenzunahme in der Probe über die Zeit wurden folgende Steigungen für das Zeitintervall 2 – 13 Minuten berechnet:

Probe	Steigung (Int/min)
S/SBT3 rein	1.14
G2f1D	2.02
HP21 -7	1.79

Tab. 3.1 Steigungen der Trendlinien aus Abb. 3.4.1 im Zeitintervall von 2 – 13 Minuten

Die Tabelle zeigt die Steigungen der in Abbildung 3.4.1 gezeigten Trendlinien an, die für die Fluoreszenzänderung im Zeitintervall von 2 bis 13 Minuten erstellt worden ist

Der in Abb. 3.4.1 dargestellte Aktivitätstest mit 37.5 ng reiner S/SBT3 zeigt eine Trendlinie mit einer Steigung von 1.14. Dieses zeigt, dass die beigemischten Proteinaseinhibitoren nicht hemmend auf die Aktivität der S/SBT3 wirken. Im Kot von mit G2f1D, einer S/SBT3-Überexpressionslinie, gefütterten *M.sexta*-Larven lässt sich eine vergleichbare Proteinaseaktivität feststellen, die das synthetische Systemin spalten kann und somit eine Aktivitätsmessung erlaubt. Auch im Kot von Raupen, die auf S/SBT3-RNAi-Linien gefressen hatten, war eine Fluoreszenzzunahme feststellbar, obwohl das S/SBT3-Antiserum hier kein Protein detektierte. Es muss folglich neben S/SBT3 mindestens eine weitere Protease im Insektenkot aktiv sein, welche die Kompetenz besitzt, Systemin zu spalten und die ebenfalls nicht durch die eingesetzten Proteinaseinhibitoren gehemmt wird.

Aus diesem Grund ist der Test zum Nachweis von S/SBT3-Aktivität im Kot von *M.sexta* nicht geeignet und erlaubt deshalb keine Aussage, über die Aktivität der S/SBT3 im Kot. Zur Feststellung der Aktivität der S/SBT3 im Kot von *M.sexta* muss ein anderes Verfahren zur Aktivitätsbestimmung angewendet werden.

3.4.2 S/SBT3-Aktivitätsbestimmung im Zymogramm

Die S/SBT3-Aktivitätsmessung mit Hilfe eines fluorogenen Systeminpeptids führte zu keinem Erfolg, da weitere Proteasen im Kot von *M.sexta* in der Lage sind das Systeminpeptid zu spalten und damit eine Fluoreszenz hervorzurufen. Ein weiterer Ansatz zur Messung der Aktivität eines Proteins ist der Aktivitätsnachweis mittels einer Zymographie.

Hierzu wird eine Polyacrylamidgel mit 0,5% Gelatine hergestellt und Proteine aus Kotextrakten im nativen Zustand in diesem elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Abschluss der Auftrennung wird das Protein bzw. die enthaltenen Proteine aktiviert. Proteasen, die in der Lage sind Gelatine als Substrat zu benutzen, verdauen die Gelatine dort, wo sie

vorhanden sind. Durch die anschließende Färbung mit Coomassie-Färbelösung werden proteinhaltige Bereiche blau angefärbt. Dort, wo die Gelatine verdaut ist, entstehen weitgehend farblose Bereiche.

Auf das Zymographiegel wurden 0,6 µg eines Gesamtproteinextrakts aus *M.sexta*-Larvenkot aufgetragen, die zuvor auf der *S/*SBT3-RNAi-Linie HP 21-7 und der -Überexpressionslinie G2f1D gefressen hatten. Als Positivkontrolle dienten 22,5 ng reine *S/*SBT3.

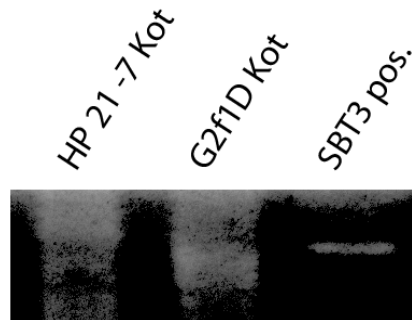


Abb. 3.4.2 Zymographie von *M.sexta*-Kotproben mit Gelatine als Substrat

Zymographie Polyacrylamid-Gel mit 0,5 % Gelatine. Aufgetragen sind 0,6 µg Protein aus Gesamtproteinextrakten von *M.sexta* Larvenkot, die zuvor auf *S/*SBT3-RNAi -(Hp 21-7)- und -OE-(G2f1D)-Pflanzen gefressen hatten, sowie 22,5 ng reine *S/*SBT3 als Positivkontrolle (SBT3 pos.).

Abbildung 3.4.2 zeigt das Ergebnis der Zymographie von *M.sexta*-Kot mit Gelatine als Substrat. Im Proteinextrakt aus Kot von Larven, die auf G2f1D-Linien gefressen hatten (G2f1D Kot), war im Zymogramm eine Bande sichtbar, die im Kot von *M.sexta*-Larven, die auf *S/*SBT3-RNAi Linien gefressen hatten nicht detektiert wurde (HP 21-7 Kot). Die reine *S/*SBT3 zeigte ein Signal auf der gleichen Höhe wie die Bande im G2f1D-Kot. Beides führt zu dem Schluss, dass die *S/*SBT3 im Kot *M.sexta*-Larven aktiv ist. Die *S/*SBT3-Bande im G2f1D-Kot erscheint jedoch nicht scharf abgegrenzt, was auf die Tatsache zurückzuführen sein könnte, dass in dem Gesamtproteinextrakt weitere Proteasen aktiv sind. Sie zeigen an anderen Stellen im Gel weitere Banden (nicht gezeigt).

Um die im G2f1D-*M.sexta*-Kot detektierte Bande als *S/*SBT3 zu identifizieren wäre eine Western-Blot-Analyse nötig, die bislang nicht erbracht wurde. Das gleichartige Laufverhalten mit der reinen *S/*SBT3 und die fehlende Bande in *S/*SBT3-RNAi-Kot an dieser Stelle lassen aber auf das gleiche Protein an dieser Stelle schließen. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses müssen die zymografischen Aktivitätsmessungen wiederholt werden.

Das Protein verlässt den Darm von *M.sexta* im aktiven Zustand. Dieser Befund erhärtet den Verdacht nach einer Funktion der *S/*SBT3 im insektidären Verdauungstrakt.

3.5 Analyse des Proteoms aus *M.sexta*-Darm- und Kot-Proben zur S/SBT3-Substratsuche

Zu dem jetzigen Zeitpunkt ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse davon auszugehen, dass die S/SBT3 eine Funktion im Darm von herbivoren Insekten besitzt. Demzufolge sollte das Substrat für die S/SBT3 im Darm zu finden sein. Unter der Annahme, dass ein Substrat in Anwesenheit der S/SBT3 gespalten wird, wäre das Substrat durch einen Vergleich des Darm- und Kot-Proteoms von *M.sexta*-Larven, die auf S/SBT3-RNAi und -Überexpressionspflanzen gefressen hatten, zu identifizieren.

Hierzu wurden Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der Gesamtproteinextrakte aus Darm und Kot eingesetzt. Proteinextrakte aus Kot von *M.sexta*, die zuvor auf S/SBT3-RNAi-Pflanzen gefressen hatten, wurden mit Cy3, einem grünen Fluoreszenzfarbstoff, markiert. Dagegen wurden Proteinextrakte aus *M.sexta*-Kot von S/SBT3-OE-Pflanzen mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekennzeichnet. Die unterschiedlich markierten Proteinextrakte wurden gemischt und gemeinsam in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese erst gemäß ihrer Ladung (isoelektrische Fokussierung) und dann aufgrund unterschiedlicher Masse im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das sich hieraus ergebende Proteinmuster wurde einzeln erfasst, und dann eine Überlagerung der beiden Bilder erstellt. So können Unterschiede im Proteingehalt der Proben durch Unterschiede in der roten bzw. grünen Intensitäten sichtbar gemacht werden. Die betreffenden Proteine können aus dem Gel herausgeschnitten, Trypsin verdaut und die hierdurch entstehenden Peptide massenspektrometrisch analysiert werden.

Auf das in Abbildung 3.5.1 gezeigte Gel wurden je 50 µg von Proteinextrakten aus *M.sexta*-Kot von S/SBT3-RNAi- und OE-Pflanzen aufgetragen und im pH-Bereich von 3 – 11 auf einer Länge von 7 cm isoelektrisch fokussiert.

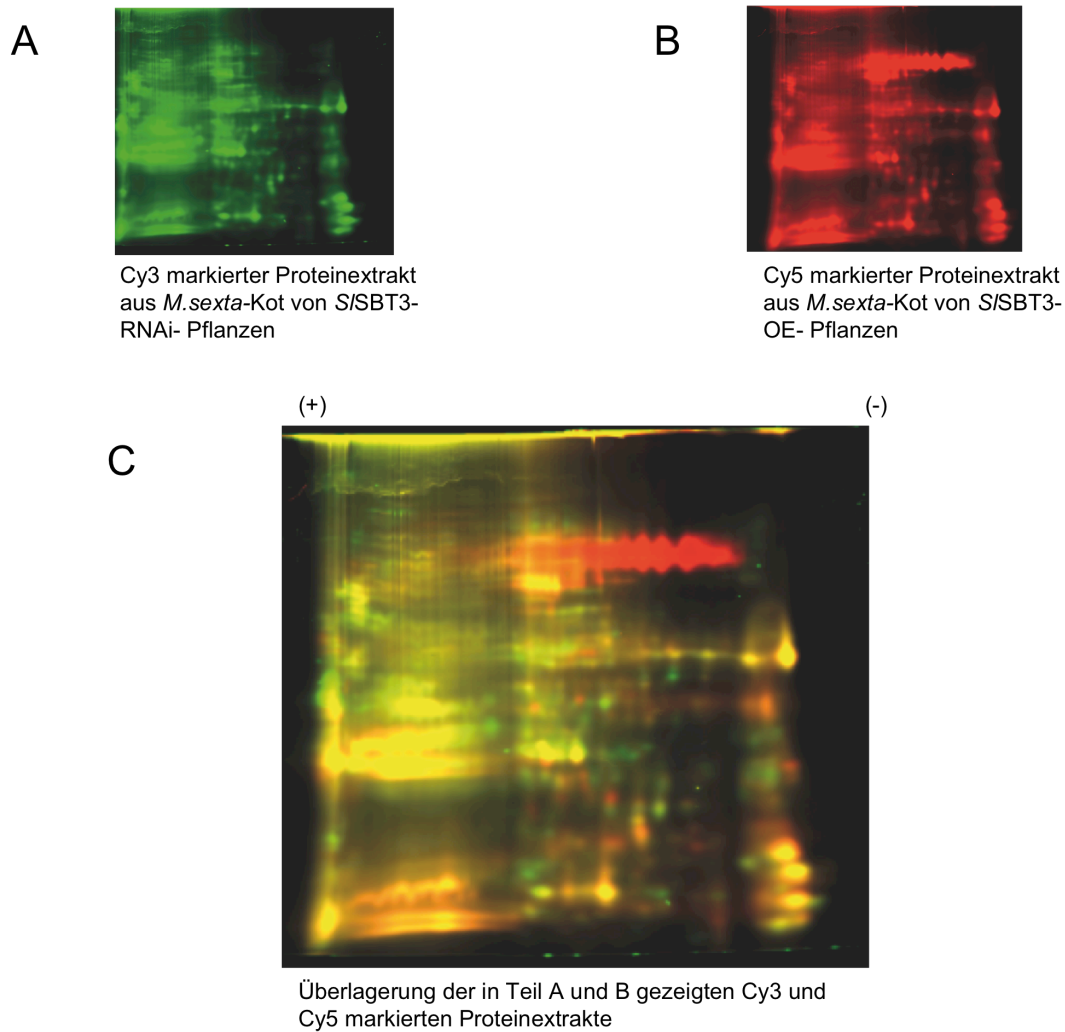


Abb. 3.5.1 2D- Gelelektrophorese fluoreszenzmarkierter Proteinextrakte aus *M.sexta*-Kot

Je 50 µg aus Gesamtproteinextrakten von *M.sexta*-Kot, die auf S/STBT3-OE- und -RNAi-Pflanzen gefressen hatten, wurden zuerst auf einem 7cm-Strip im pH-Bereich von 3 – 11 nach ihrer Ladung und anschließend im SDS-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Auswertung des Proteinmusters erfolgte im Gel durch die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe im Gel. Das Proteinmuster wird im Fluoreszenzscanner (Typhoon Trio + Imagine System, GE Healthcare; (Cy3: Anregung bei 550 nm, Emission bei 570 nm, Cy 5: Anregung bei 650 nm, Emission bei 670 nm)) aufgenommen.

- A. Proteinmuster Cy3-markierten Kots von *M.sexta* Larven, die auf S/STBT3-RNAi Pflanzen gewachsen waren, nach 2D-Gelelektrophorese.
- B. Proteinmuster Cy5-markierten Kots von *M.sexta* Larven, die auf S/STBT3-Überexpressions-Pflanzen gewachsen waren, nach 2D-Gelelektrophorese
- C. Overlay der in Teil A und B gezeigten Proteinmuster. Differenzen im Proteom erscheinen als rote bzw. grünliche Punkte. Gleiche Mengen von Proteinen in den zwei Proben erscheinen gelb.

Abbildung 3.5.1 zeigt das Ergebnis der 2D-DIGE (2-Dimensionale Differentielle Gelelektrophorese) von fluoreszenzmarkierten Kotproben von *M.sexta*. Der Proteinextrakt von Raupen, die auf *S/*SBT3-RNAi-Pflanzen gewachsen waren, ist mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff (Cy3) markiert (Abb. 3.5.1 A). Der Proteinextrakt aus Kot von Larven, die auf *S/*SBT3-Überexpressions-Pflanzen gewachsen waren, ist mit Cy5, einem roten Fluoreszenzfarbstoff, markiert (Abb. 3.5.1 B). In Abb. 3.5.1 Teil C ist die Überlagerung der Fluoreszenzen der beiden Proben gezeigt. Hier zeigen sich deutliche Differenzen im Proteom der beiden Proben. Im oberen Teil der Abbildung ist eine Reihe von roten Spots sichtbar, die alle die gleiche Masse, aber unterschiedliche Ladung aufweisen. Hierbei könnte es sich um unterschiedlich geladene Formen von *S/*SBT3 handeln, die im Cy3 markierten Proteinextrakt aus *S/*SBT3-RNAi-Kot nicht detektierbar sind. Außerdem sind zahlreiche einzelne grüne und rote Proteinspots zu erkennen, deren Analyse bei der Substratsuche für die *S/*SBT3 interessant sein könnten. Ihre Analyse ist ausstehend.

In Abbildung 3.5.2 ist ebenfalls das Ergebnis einer 2D-Gelelektrophorese zu sehen, die allerdings mit Proben aus *M.sexta*-Darm durchgeführt wurde. Als Futterpflanzen sind hierbei wiederum G2f1D als *S/*SBT3-Überexpressionslinie und HP 21-7 als *S/*SBT3-RNAi-Linie verwendet worden. Der pH-Bereich der isoelektrischen Fokussierung war lag zwischen 3 und 11, allerdings betrug die Länge des pH-Strips 24 cm. Geladen wurden 50 µg Protein aus jedem Proteinextrakt. Das Proteinmuster nach der 2D-Gelelektrophorese ist in Abb. 3.5.2 dargestellt.

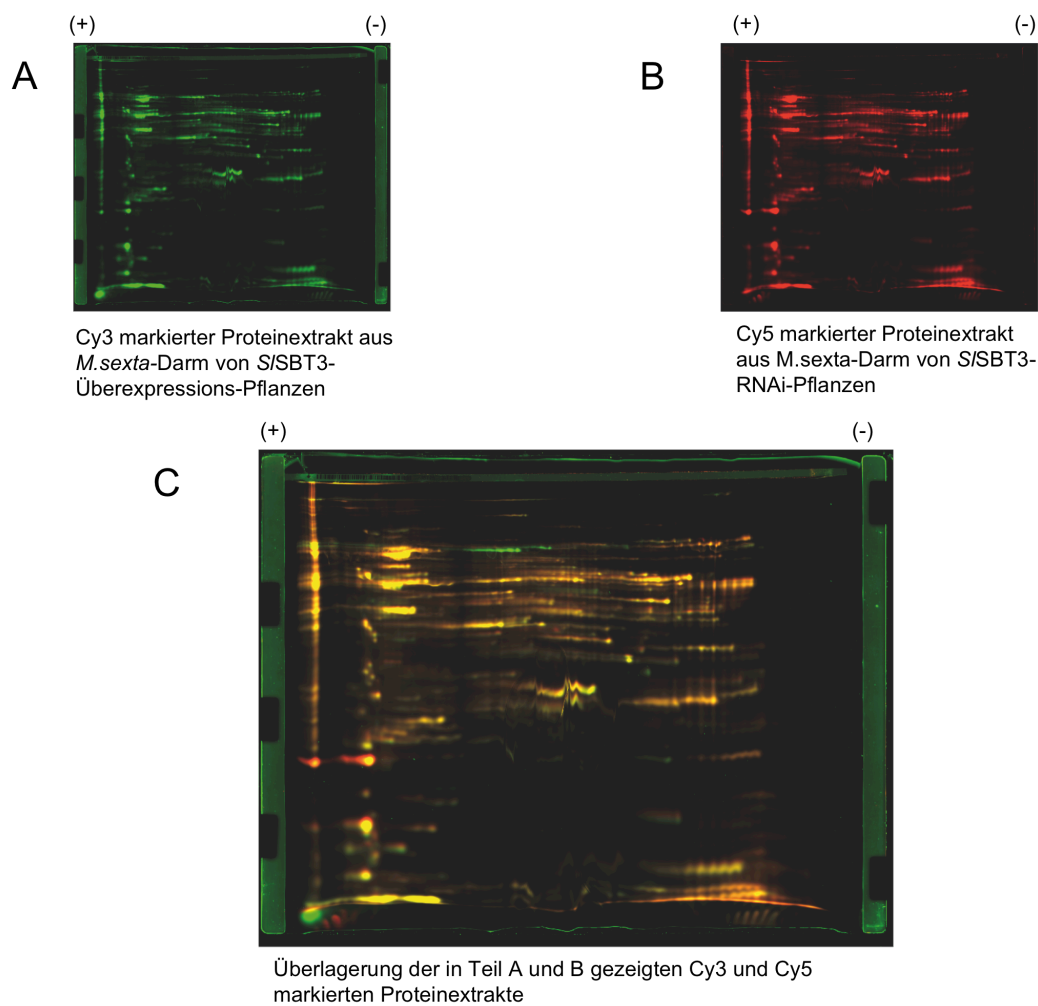


Abb. 3.5.2 2D- Gelelektrophorese fluoreszenzmarkierter Proteinextrakte aus *M.sexta*-Darm

Je 50 µg Protein von Gesamtproteinextrakten aus *M.sexta*-Darm, die auf *SSBT3*-OE und RNAi Pflanzen gefressen hatten, wurden zuerst auf einem 24cm-Strip im pH-Bereich von 3 – 11 nach ihrer Ladung und anschließend im SDS-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Auswertung des Proteinmusters erfolgte im Gel durch die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe im Gel. Das Proteinmuster wird im Fluoreszenzscanner (Typhoon Trio + Imagine System, GE Healthcare; (Cy3: Anregung bei 550nm, Emission bei 570 nm, Cy 5: Anregung bei 650 nm, Emission bei 670 nm)) aufgenommen.

- D. Proteinmuster Cy3-markierten Darms von *M.sexta*-Larven, die auf *SSBT3*-RNAi-Pflanzen gewachsen waren, nach 2D-Gelelektrophorese
- E. Proteinmuster Cy5-markierten Darms von *M.sexta*-Larven, die auf *SSBT3*-Überexpressions-Pflanzen gewachsen waren, nach 2D-Gelelektrophorese
- F. Overlay der in Teil A und B gezeigten Proteinmuster. Differenzen im Proteom erscheinen als rote bzw. grünliche Punkte. Gleiche Mengen von Proteinen in den zwei Proben erscheinen gelb.

Darmproteine von Larven, die auf *S/GBT3*-Überexpressionspflanzen gewachsen sind, sind mit Cy3 markiert und das Proteinmuster nach der 2D-Gelelektrophorese ist in Teil A abgebildet. Protein aus Larvendärmen, die auf *S/GBT3*-RNAi-Pflanzen großgeworden sind, ist mit dem Farbstoff Cy5 markiert und in Teil B der Abbildung zu sehen. Die Überlagerung der beiden Farbstoffe zeigt Teil C der Abbildung 3.5.2. Auch hier sind Unterschiede im Proteom beider Proben sichtbar.

Der Ansatz, die Substratsuche mittels 2D-DIGE Experimenten anzugehen, erscheint sinnvoll. Unterschiede im Proteom der Därme sind feststellbar. Über statistische Auswertung der Differenzen in verschiedenen Gelen könnten die sich unterscheidenden Proteinspots identifiziert, ausgeschnitten und analysiert werden. Auf diese Weise wäre die Identifizierung eines Substrats, oder aber zumindest die Einschränkung des Wirkungskreises der *S/GBT3* möglich. Das fehlende Substrat, oder auch ggf. die fehlenden Substrate sind der ausstehende ‚Missing-Link‘ zwischen der Funktion der *S/GBT3* und ihrer Wirkung.

3.6 Proteinstruktur und Stabilität

S/SBT3 ist ein sehr stabiles Protein, das bis 60°C seine volle Aktivität bewahrt (Cedzich et al. 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Protein den Verdauungstrakt von *M.sexta* intakt durchläuft. Die Ursache für die hohe Stabilität des Proteins ist bislang ungeklärt. In Subtilasen spielt die Bindung von Calcium-Ionen für die Thermostabilität dieser Enzyme eine entscheidende Rolle (Alexander et al 2001).

Die Kristallstruktur der *S/SBT3* zeigte, dass obwohl dieses Protein selbst kein Calcium bindet, es dennoch drei konservierte Domänen aufweist, die in anderen Subtilasen als Calcium- Bindestelle identifiziert werden konnten. In der zweiten dieser konservierten Regionen, Ca-2, findet sich eine mögliche Ursache für die beobachtete Proteinstabilität der *S/SBT3*. Ein Lysinrest an Position 498 ragt in die konservierte Region der Ca^{2+} -Bindestelle hinein. Es wird vermutet, dass seine positive Ladung mit den negativen Ladungen saurer Aminosäuren interagiert und somit zur Stabilität des Proteins beiträgt (Ottmann et al. submitted).

Zur Überprüfung dieser Hypothese, ob der Lysinrest sich auf die Proteinstabilität auswirkt, wurde der basische Lysinrest zur Glutaminsäure oder zum neutralen Alanin mutiert. Die Stabilität der so veränderten *S/SBT3* wurde über die Nachweisbarkeit im Darm und Kot von *M.sexta*, sowie ihre Aktivität im Apoplasten überprüft.

3.6.1 Mutagenese von *S/SBT3*

Zu Beginn dieser Arbeit lag die 2,3 kb lange *S/SBT3*-cDNA in dem Klonierungsvektor pSPT18 vor und wurde dort N-terminal von einer *Pst*I und C-terminal von einer *Sma*I Restriktionsschnittstelle flankiert.

Die Mutagenese des Lysinrestes 498 wurde in Form einer PCR-Mutagenese (siehe 2.6.8.1) durchgeführt. Die hierzu verwendeten Primer trugen Punktmutationen, welche das basische Lysin zur Glutaminsäure sowie zum neutralen Alanin umwandelten. Die bei der Mutagenese entstehenden PCR-Produkte wurden mit *Dpn*I behandelt und somit die ursprüngliche cDNA Matrize aus den Ansätzen entfernt. Das Vorhandensein des Inserts wurde durch Restriktionsverdau überprüft und im positiven Falle wurde das Insert sequenziert. Der Abgleich der Basensequenzen um die mutierte Aminosäure 498 ist Abbildung 3.6.1 dargestellt.

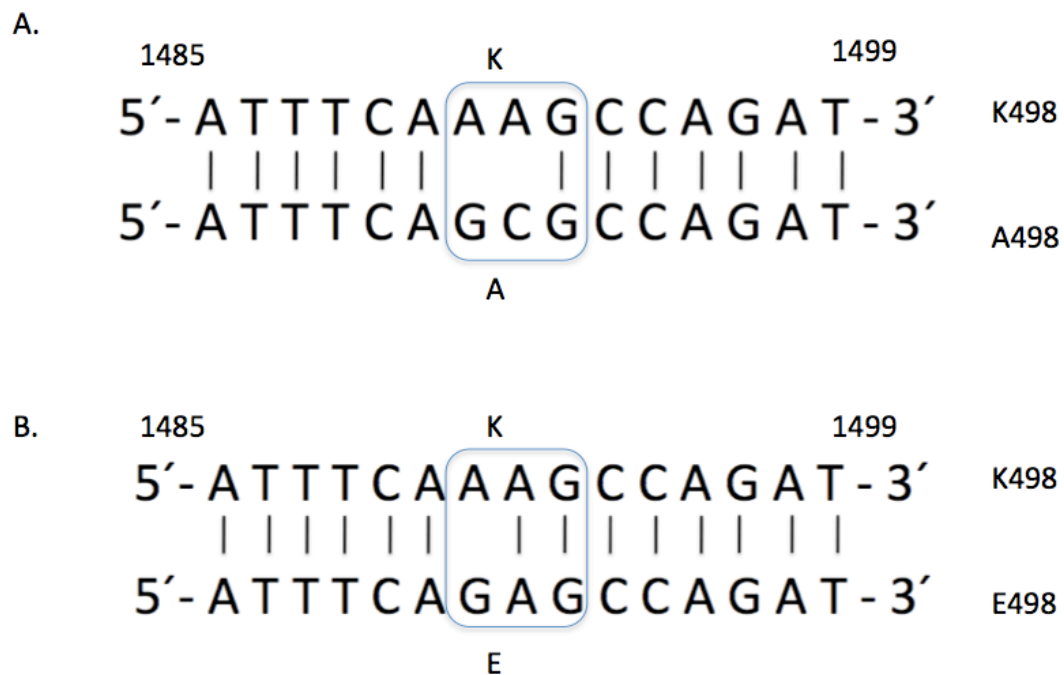


Abb. 3.6.1 Abgleich der Basensequenzen 1485 – 1499 vom Startcodon der *S/*SBT3-cDNA vor (obere Sequenz) und nach der Mutagenese (untere Sequenz).

Übereinstimmende Basen sind mit einem Strich gekennzeichnet. Die für die mutierte Aminosäure kodierenden Basen sind mit einem blau umrahmt.

A. Basenaustausch in Position 1491 und 1492 (K498A) **B.** Basenaustausch in Position 1491 (K498E)

Die positiven Klone für beide Mutanten wurden in ein Expressionssystem umklont, welches die durch Agrobakterien vermittelte Expression in Tabakpflanzen erlaubt. Hierzu wurden die mutierten *S/*SBT3-cDNAs zuerst in den Vektor pART7 eingebracht, in dem die mutierten Gene mit den regulatorischen Sequenzen des Blumenkohlmosaikvirus-35S (CaMV35S)-Promotors und dem Octopin-Synthase Terminator (ocs) ausgestattet wurden, um anschließend in den binären Vektor pART27, einem für Agrobakterium vermittelte Transformation von Pflanzen geeigneten Vektor, umklont zu werden. Die schematische Darstellung der Klonierung ist in Abbildung 3.6.2 zu sehen.

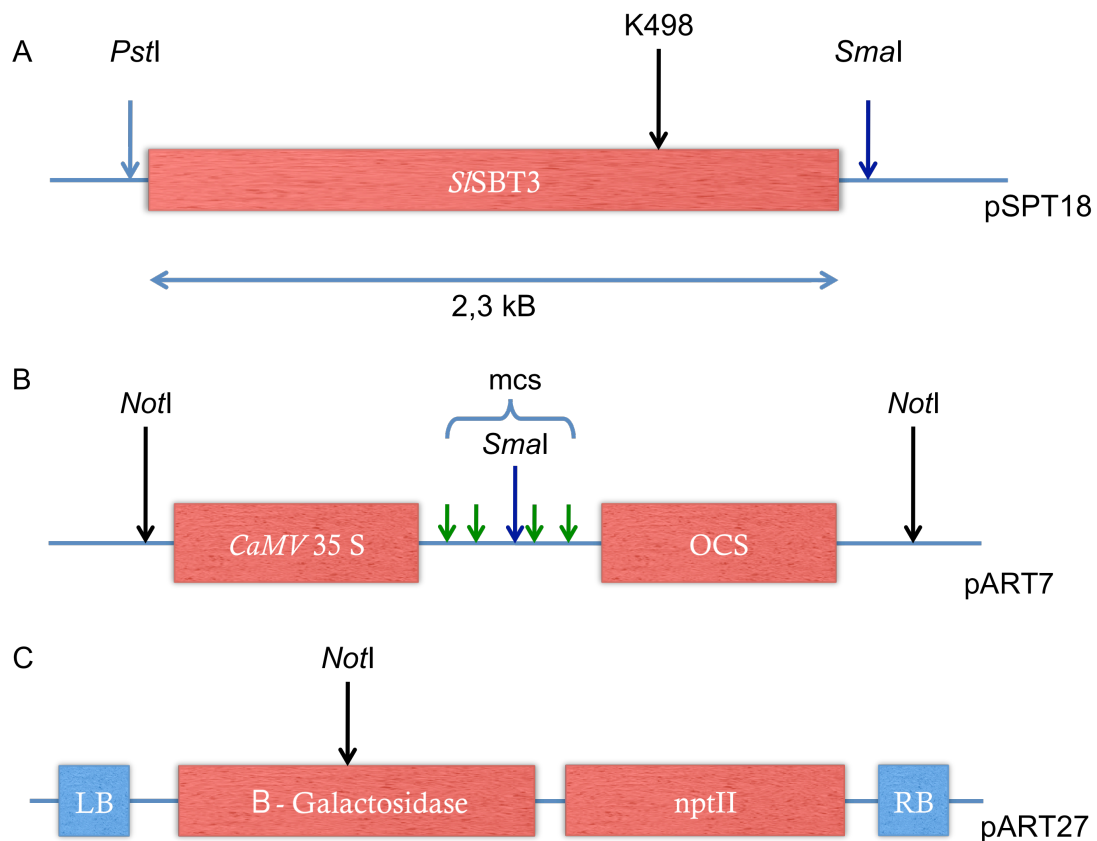


Abb. 3.6.2 Schematische Darstellung der für die Klonierung wichtigen Vektorbereiche

A. Schematische Darstellung der *S/GBT3*-cDNA im Vektor pSPT18, flankiert von einer *Pst*I und einer *Sma*I Schnittstelle. Der Ort der Mutation ist durch einen schwarzen Pfeil angegeben. **B.** Schematischer Aufbau der Expressionskassette des Vektors pART7 in dem Bereich der ‚multiple-cloning-site‘ (mcs). 5‘ aufwärts der mcs befindet sich der *CaMV35S*-Promotor, 3‘ abwärts die Octopine-Synthase-Terminator-Region. Die gesamte Expressionskassette wird von zwei *Not*I Schnittstellen flankiert. **C.** Schematische Darstellung des T-DNA Bereichs im Vektor pART27. Die T-DNA ist von ‚Left Border‘ (LB) und ‚Right Border‘ (RB) Sequenzen umgeben. Dazwischen befindet sich das Gen für die β -Galactosidase mit interner *Not*I Schnittstelle sowie das Nopaline-synthase-Promotor-neomycin-phosphotransferase (*nptII*)-nopaline-synthase-Terminator-Genchimär zur Kanamycin Resistenz.

Die 2,3 kb lange *S/GBT3*-cDNA liegt im Vektor pSPT18 flankiert von einer *Pst*I und einer *Sma*I Restriktionsschnittstelle vor. Der Zielvektor pART7 hingegen verfügt in seiner ‚multiple-cloning-site‘ lediglich über eine *Sma*I Schnittstelle, weshalb die durch *Pst*I-Verdau erzeugten Genenden denen der *Sma*I-Schnittstelle angeglichen werden müssen (2.6.4). Durch die 5‘-3‘ Exonukleaseaktivität der T-4-DNA-Polymerase wird der durch das *Pst*I generierte Überhang entfernt. Der Vektor pART7 wird in diesem Fall nur mit dem Enzym *Sma*I geschnitten und durch die ‚Calf intestinal phosphatase‘ dephosphoryliert (vergl. 2.6.5). Anschließend können Vektor und Insert ligiert werden (2.6.6).

Der Einbau der mutierten *S/GBT3*-cDNA in pART7 in der korrekten Orientierung wurde durch Kolonie-PCR mit einem ‚Reverse-Primer‘ am 5‘-Ende des *S/GBT3*-Gens und einem

‚Foreward-Primer‘ in der 35S-Promotorregion bestätigt. Jeweils ein positiver Klon wurde weiterverarbeitet (nicht gezeigt).

Im Vektor pART7 ist die Expressionskassette von zwei *NotI* Schnittstellen umgeben, so dass das eingebrachte Gen samt regulatorischer Elemente mit dem Restriktionsenzym *NotI* weiterkloniert werden kann (vergl. Abb. 3.3.3, Teil B).

Das Restriktionsenzym *NotI* hat seine Schnittstelle im Vektor pART27 im Gen für die β -Galactosidase, was den Einbau von längeren DNA Sequenzen an dieser Stelle durch ‚Blau/Weiß-Selektion‘ erkennbar macht, da hierdurch das offene Leseraster des Gens gestört wird. Weiterhin verfügt pART27 über ein Kanamycin-Resistenzgen, das für die Neomycin-Phosphotransferase II kodiert. Beide Gene werden von zwei tandemartigen DNA Sequenzen umgeben, den Grenzsequenzen der T-DNA, die von *A.tumefaciens* selektiv erkannt und geschnitten werden, um die dazwischen liegende DNA-Sequenz zu mobilisieren und ins Pflanzen-Genom zu integrieren. Hiermit können stabil transformierte Pflanzen erzeugt werden.

Die Klonierung von pART7 in pART27 wurde über die *NotI* Schnittstelle durchgeführt und der Einbau über Kolonie-PCR bestätigt (nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die Transformation des pART27 Vektors mit den mutierten *S/GBT3*-cDNAs in den Agrobakterienstamm C58C1 (siehe 2.6.8).

3.6.2 Agrobakterien vermittelte Expression von *S/GBT3* in *N.benthamiana*

Die in 3.6.1 erstellten Agrobakterien wurden in *N.benthamiana* infiltriert und die mutierten *S/GBT3*-Proteine transient exprimiert, um einen Effekt der eingeführten Mutation auf die Stabilität des Proteins untersuchen zu können. In Rahmen dieser Diplomarbeit war es nicht möglich eine stabile Transformation von Pflanzen durchzuführen, um die Stabilität der mutierten Proteine im Darm zu überprüfen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass auf Kunstfutter gewachsene *M.sexta*-Larven im 4. Entwicklungsstadium an mit *A.tumefaciens* infiltrierte *N.benthamiana*-Pflanzen fressen. Das System ist für diesen Versuch geeignet. Die Infiltration erfolgte nach Abschnitt 2.5.4.

Die mit Agrobakterien infiltrierten Tabakblätter wurden nach 4 – 5-Tagen für ca. 8 – 10 Stunden *M.sexta*-Larven im 3.- 4. Entwicklungsstadium zum Fressen gegeben. Nach 12 Stunden wurden Kot und Blattproben genommen, sowie die Larven entsprechend Abschnitt 2.2.3.1 seziiert. Aus Blatt, Darm und Kot wurden Proteinextrakte erstellt. Der Nachweis der *S/GBT3* erfolgte im Western-Blot mittels eines *S/GBT3*-Antiserums

3.6.2.1 Stabilität transient in *N.benthamiana* exprimierter S/GBT3 im *M.sexta*-Verdauungstrakt.

Um eine Eignung dieses Versuchsaufbaus weiter zu überprüfen, wurde *N.benthamiana* mit Agrobakterien infiltriert, welche die native S/GBT3-cDNA im Vektor pART27 trugen und die Expression des Proteins, sowie die Stabilität der S/GBT3 im Darm und Kot von *M.sexta* untersucht. Bisher war die S/GBT3-Stabilität nur in Larven nachgewiesen, die auf Tomatenpflanzen gefressen hatten.

Jeweils 1 µg Gesamtproteinextrakt von infiltrierten Tabakblatt, Raupendarm und Raupenkot wurden in einem SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt und per Western-Blot analysiert (Abb. 3.6.3). Als Positivkontrolle (GBT3 pos.) wurden 15 ng aufgereinigte S/GBT3 verwendet. Dabei ergab sich eine deutliche Bande bei ~90kDa.

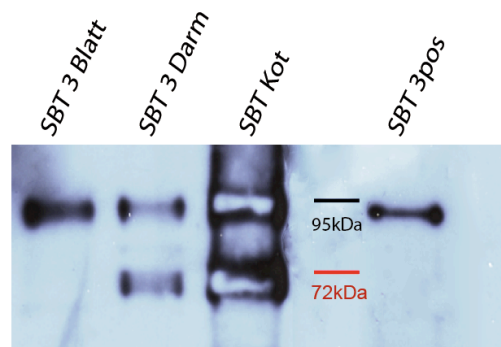


Abb. 3.6.3 Western-Blot zur Untersuchung der Proteinstabilität der S/GBT3 im *M.sexta*-Verdauungstrakt nach Tabakinfiltration

Aufgetragen sind je 1 µg von Blattgesamtextrakt (GBT3 Blatt), sowie Darm (GBT3 Darm) und Kot (GBT3 Kot) von *M.sexta* nach einem Fraßversuch auf mit S/GBT3-infiltrierten Tabakpflanzen. Als Positivkontrolle wurden 15 ng aufgereinigte S/GBT3 verwendet (GBT3 pos). Die Detektion erfolgte mit einem S/GBT3-Antiserum.

Der aus dem mit S/GBT3-infiltrierten Tabakblatt erstellte Gesamtproteinextrakt (GBT3 Blatt) zeigte eine deutlich Bande bei ~90kDa, die der S/GBT3-Positivkontrolle zugeordnet werden konnte. Banden auf gleicher Höhe konnten ebenfalls in Proteinextrakten aus Darm (GBT3 Darm) und Kot (GBT3 Kot) von *M.sexta* detektiert werden, die auf den S/GBT3-infiltrierten Blättern gefressen hatten. Im Kot zeigte sich ein deutlich stärkeres Signal als im Blattextrakt, was auf eine Akkumulation dieser S/GBT3-Form im Insektendarm hindeutet. Gleichzeitig wurde in den Darm- und Kotextrakten eine zweite, ausgeprägte Bande bei ungefähr 70kDa sichtbar, welche wahrscheinlich einem Abbauprodukt oder Prozessierungsstadium der S/GBT3 entsprach, die durch das Antiserum erkannt worden war.

Das Experiment zeigt, dass ein Großteil des nach Agrobakterien Infiltration in *N.benthamiana* exprimierten S/GBT3 den Verdauungstrakt von *M.sexta* intakt passiert.

3.6.2.2 Infiltration der S/SBT3-Konstrukte K498A und K498E

Zur Überprüfung eines Effekts der Mutationen K498A und K498E auf die Stabilität der S/SBT3 im *M.sexta*-Verdauungstrakt, wurden beide Konstrukte in *N.benthamiana* infiltriert. Der Versuch wurde wie zuvor in Teil 3.6.2.1 beschrieben durchgeführt, allerdings mit dem Unterschied, dass jeweils 10 µg Gesamtproteinextrakt für die Western-Blots verwendet wurde. Als ‚negativ‘-Kontrolle wurden 10 µg Gesamtproteinextrakt eines uninfiltrierten Tabakblatts verwendet (Tabak uninfil., Abb. 3.6.4). Das Antiserum detektiert keine Signale in uninfiltrierten *N.benthamiana*- Blättern. Daraus lässt sich schließen, dass sich *N.benthamiana* für den Versuch eignet, da alle vom S/SBT3-Antiserum detektierten Signale durch die Agrobakterium vermittelte Infiltrationen der S/SBT3-Konstrukte entstanden sein müssen.

K498A

Nach Agrobakterien-Infiltration von Tabakpflanzen mit dem S/SBT3-K498A Konstrukt (Abb 3.6.4) zeigte sich eine ~100kDa Bande im Blattextrakt (K498A Blatt) als einzig sichtbare Bande. Im Vergleich zur benachbarten Positivkontrolle war der Größenunterschied zur reinen S/SBT3 (SBT3 pos.) deutlich erkennbar. Die im Kot detektierte Bande (K498A Kot) entsprach der der Positivkontrolle. Im Darm von *M.sexta*-Larven, die auf den infiltrierten Tabakblättern gefressen hatten (K498A Darm), wurde nur eine Bande vom Antiserum detektiert, die zwischen der 70kDa und der 90kDa Bande zu laufen schien.

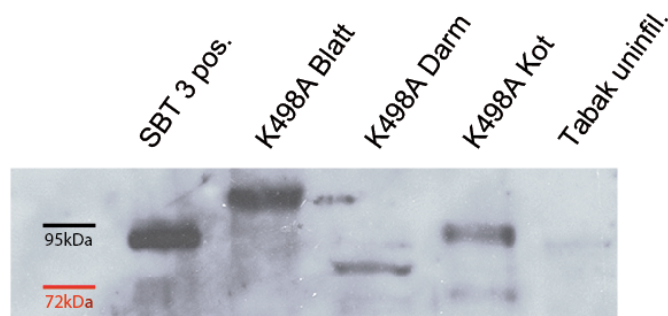


Abb. 3.6.4 Western-Blot zur Analyse der Proteinstabilität von S/SBT3-K498A im Verdauungstrakt von *M.sexta* nach Tabakinfiltration

Aufgetragen sind 10 µg Protein eines Blattgesamtextrakts (K498A Blatt), sowie Proteinextrakten aus Darm (K498A Darm) und Kot (K498A Kot) von *M.sexta* nach einem Fraßversuch auf mit S/SBT3-K498A infiltrierten Tabakpflanzen. Als Positivkontrolle (SBT3 pos) wurden 15 ng aufgereinigte S/SBT3 verwendet. Als Negativkontrolle (Tabak uninfil.) dienen 10 µg eines Gesamtproteinextrakts aus uninfiltrierten Tabakblättern. Die Detektion erfolgte mit einem S/SBT3-Antiserums.

K498E

Das Proteinmuster nach der Agrobakterien Infiltration des S/SBT3-K498E-Konstruktes zeigte in der Western-Blot Analyse Ähnlichkeiten mit dem der K498A Mutation und ist in den Abbildung 3.6.5 dargestellt.

Im Blattextrakt (K498E Blatt) war deutlich prominent eine Bande bei ~100kDa zu erkennen. Im *M.sexta*-Darm (K498E Darm) detektierte das S/SBT3-Antiserum zwei Banden knapp unterhalb der Bande der S/SBT3-Positivkontrolle (SBT3 pos). Andeutungsweise lässt sich im Darm auch die ~90kDa Bande erkennen. Diese ist im Kot (K498E Kot) deutlich sichtbar und stimmt in ihrer Größe mit der S/SBT3-Positivkontrolle überein.

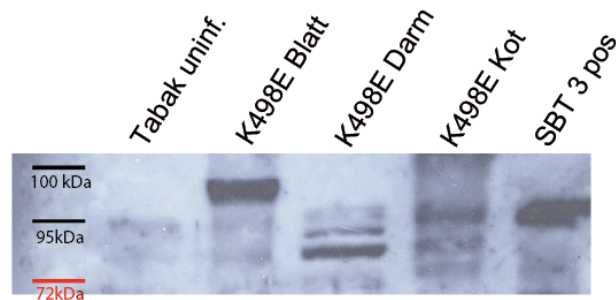


Abb. 3.6.5 Western-Blot zur Analyse der Proteinstabilität von S/SBT3-K498E im Verdauungstrakt von *M.sexta* nach Tabakinfiltration

Aufgetragen sind je 10 µg von Gesamtprotein Blattextrakt (K498E Blatt), sowie Darm (K498E Darm) und Kot (K498E Kot) von *M.sexta* nach einem Fraßversuch auf mit S/SBT3-K498E infiltrierten Tabakpflanzen. Als Positivkontrolle (SBT3 pos) wurden 15 ng aufgereinigte S/SBT3, als Negativkontrolle (Tabak uninfil.) 10 µg Protein aus Blattextrakten uninfiltrierter Tabakblätter verwendet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines S/SBT3-Antiserums.

Die Western-Blots nach der Infiltration der K498A- und K498E- Konstrukte in *N.benthamiana* gleichen dem Proteinmuster des Western-Blots mit infiltriertem nativem S/SBT3-Konstrukt, mit Ausnahme allerdings der jeweiligen Blattextrakte. In den mit nativem S/SBT3-Konstrukt infiltrierten Pflanzen konnte grundsätzlich eine starke Bande bei ~90kDa detektiert werden, während nach Einführung der Mutationen eine ~100kDa prominent war. Diese ~100kDa Bande repräsentiert eine unprozessierte Form der S/SBT3, von der man weiß, dass sie ein fehlerhaftes Sekretionsverhalten aufweist (Kuhn 2007; Cedzich et al. 2009).

Die Proteinmuster nach den Infiltrationen der Konstrukte von nativer S/SBT3, K498A und K498E in Darm und Kot von *M.sexta* zeigten keine auffälligen Unterschiede im direkten Vergleich. Im Kot der Raupen wurden bei allen infiltrierten S/SBT3-Konstrukten nur die ~90kDa Form sichtbar, die der nativen S/SBT3-Bande zugeordnet werden konnte, sowie

eine kleinere Form bei ~70kDa, die vermutlich ein Abbauprodukt oder eine weiter prozessierte Form der S/SBT3 darstellt. Die in Blätter akkumulierende ~100kDa Form scheint im Darm von *M.sexta* degradiert zu werden. Obwohl von der ~90kDa Bande in beiden Mutationen im Vergleich zur wildtypischen S/SBT3 nur weniger in Darm und Kot von *M.sexta* akkumulierte, ist die Stabilität dieser S/SBT3 Form nicht beeinträchtigt. Die Stabilität der nativen S/SBT3-Form im Insektendarm wurde durch die Einführung der Mutation des Lysinrests in Position 498 nicht verändert.

3.6.3 Das Sekretionsverhalten der S/SBT3 und ihrer mutierten Formen

In den Blättern von *N.benthamiana* wurden nach der Agrobakterien- Infiltration mit nativem S/SBT3-Konstrukt und ihren beiden mutierten Konstrukten (K498A, K498E) unterschiedlich große Formen der S/SBT3 detektiert. Die mit den mutierten S/SBT3-Konstrukten infiltrierten Blätter zeigten eine Bande bei ~100kDa, während die mit dem Konstrukt nativer S/SBT3 infiltrierten Blätter eine prominente Bande bei ~90kDa zeigten. Es ist bekannt, dass die S/SBT3 ein sekretiertes Protein ist, welches im Zuge seiner Reifung im sekretorischen Weg erst ihre Prä-Domäne und dann ihre Pro-Domäne verliert (Abb 1.6), was zu ihrer Aktivierung führt. Die Abspaltung der Prä-Domäne erfolgt obligatorisch während der Co-translationellen Sekretion ins ER. Die Abspaltung der Prä-Domäne erfolgt im sekretorischen Weg und ist für die Aktivierung der S/SBT3 und für die Sekretion erforderlich (Cedzich et al. 2009).

Um der Frage nachzugehen, ob durch die Mutation des Lysinrests 498 das Sekretionsverhalten der S/SBT3 gestört ist, wurden apoplastische Proteine von Tabakpflanzen (siehe 2.2.5) isoliert, die vorher mit den beiden Konstrukten K498A und K498E, sowie mit nativer S/SBT3 infiltriert worden waren.

Der Western-Blot-Analyse in Abbildung 3.6.6 zeigt Proteinextrakte aus den Apoplasten (K498A-, K498E Apoplast) und Symplasten (K498A-, K498E Symplast) infiltrierter Tabakpflanzen. Für das K498A Konstrukt ist das Proteinäquivalent von 0,2 mg, für das K498E Konstrukt 0,8 mg Blatt- Frischgewicht, verteilt auf sym- und apoplastisches Protein aufgetragen.

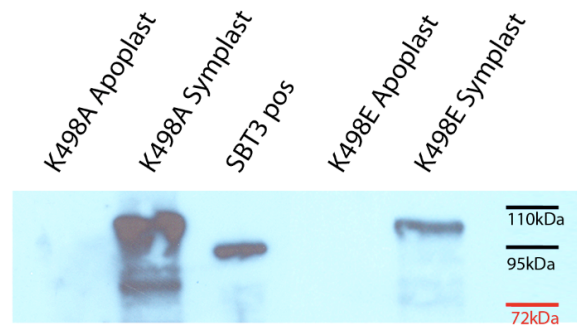


Abb. 3.6.6 Detektion der S/GBT3 in Sym- und Apoplasten infiltrierter Tabakblätter

Detektion der S/GBT3 in Sym- und Apoplasten infiltrierter Tabakblätter vier Tage nach der Infiltration mit K498A und K498E. Es wurde das Proteinäquivalent von 0,2 mg K498A und 0,8mg K498E Blattfrischgewicht aufgetragen, verteilt auf symplastisches und apoplastisches Protein. Als Positivkontrolle (SBT3 pos) wurden 15ng aufgereinigte S/GBT3 aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels eines S/GBT3-Antiserum.

Zu sehen waren die ~100kDa Formen der S/GBT3 im Sym- nicht aber im Apoplasten der Blätter. Dieses zeigt, dass die ~100kDa große, unprozessierte Form der S/GBT3 nicht sekretiert wird und intrazellulär akkumuliert, während die ~90kDa- Form, die in Darm und Kot von *M.sexta*-Larven detektiert werden konnte, hier nicht sichtbar war. Dieser Umstand weist darauf hin, dass diese reife S/GBT3-Form korrekt prozessiert wird und in den Apoplasten gelangt, jedoch nur einen kleinen Teil am gesamten S/GBT3-Protein ausmacht. Im Apoplasten war aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration in beiden Fällen kein Protein sichtbar. Die Positivkontrolle zeigte ein Signal bei ~90kDa.

3.6.4 S/GBT3 im Apoplasten

Bisher konnte im Apoplasten der infiltrierten Tabakpflanzen keine S/GBT3 nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob die in Darm und Kot detektierten ‚reifen‘ ~90kDa-Formen der S/GBT3-K498A und -K498E Konstrukte bereits in der Pflanze entstehen, oder erst im Darm der Insekten zu dieser Form prozessiert werden, wurde ein Western-Blot mit je 2µg apoplastischem Protein angefertigt (Abb. 3.6.7).

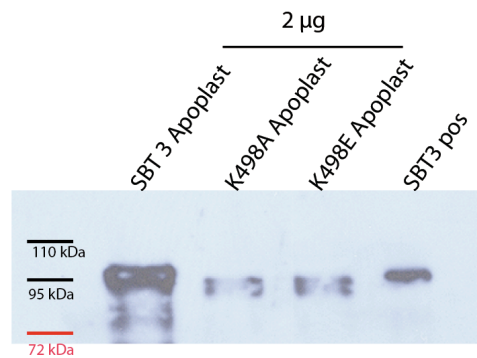


Abb. 3.6.7 Proteine im Apoplasten von Tabakpflanzen nach Agrobakterien-Infiltration

Je 2 µg Protein aus den Apoplasten von mit K498A, K498E und *S*/SBT3 infiltrierten Pflanzen wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Als Positivkontrolle (SBT3 pos) wurden 15 ng aufgereinigte *S*/SBT3 verwendet. Die Detektion erfolgt mittels eines *S*/SBT3-Antiserums.

Die Bande des apoplastischen Proteins aus mit wildtypischer *S*/SBT3 infiltrierten Pflanzen zeigte sich auf gleicher Höhe wie die reine *S*/SBT3 der Positivkontrolle. Dagegen fanden sich Signale von mit K498A und K498E infiltrierten Pflanzen aus jeweils zwei, kaum voneinander getrennten Banden, die tendenziell knapp unterhalb der ~90 kDa eingeordnet werden konnten. Zudem erschien die wildtypische *S*/SBT3-Bande intensiver als die beiden mutierten Formen, was auf eine stärkere Expression in diesen Blättern hindeutete. Um zu überprüfen, um welchen Faktor die *S*/SBT3-Bande stärker war als seine mutierten Formen, wurde ein Western-Blot erstellt, auf welchen eine Verdünnungsreihe der apoplastischen Proteine aus Tabakpflanzen mit infiltrierter wildtypischer *S*/SBT3 pipettiert wurde (Abb 3.6.8).

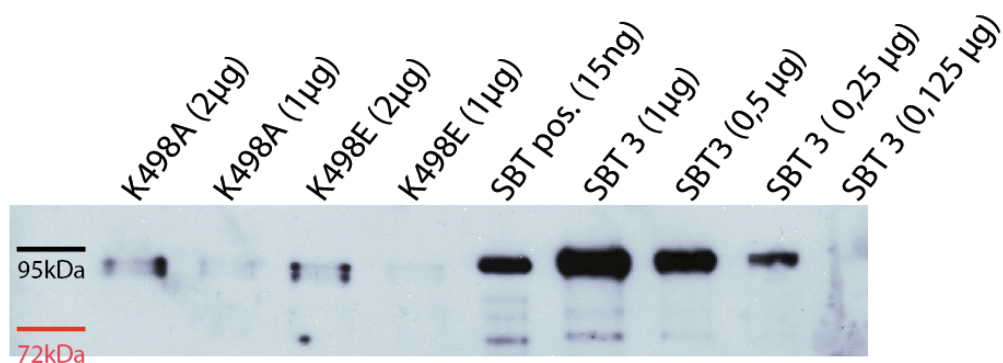


Abb. 3.6.8 Western-Blot von apoplastischen Proteinen Agrobakterien-infiltrierter Tabakpflanzen

Je 2 und 1 µg apoplastische Proteine, aus mit K498A und K498E infiltrierten Tabakpflanzen, wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit einem *S*/SBT3-Antiserum detektiert. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des Apoplasten aus mit nativer *S*/SBT3 infiltrierten Tabakpflanzen erstellt. Die Proteingehalte sind in Klammern angegeben. Als Positivkontrolle wurden 15 ng aufgereinigte *S*/SBT3 verwendet.

In Abbildung 3.6.8 sind die bereits in Abbildung 3.6.7 beschriebenen Banden der apoplastischen *S/SBT3* zu erkennen. Aus dem Vergleich der Bandenstärke im Western-Blot, lässt sich eine 8 – 10-fach stärkere Expression der wildtypischen *S/SBT3* gegenüber ihren mutierten Formen ableiten. Beide mutierten Formen, K498A und K498E, erscheinen gleichstark exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die ~100kDa Form der *S/SBT3*, die in mit mutierter K498 infiltrierten Tabakblättern akkumuliert, ein fehlerhaftes Sekretionsverhalten aufweist. Sie ist ausschließlich im Symplasten nachweisbar und kann im Apoplasten nicht detektiert werden. Stattdessen zeigt sich im Apoplasten beider infiltrierter Mutationen lediglich eine verminderte Akkumulation der ~90kDa Form der *S/SBT3*, die der nativen *S/SBT3* zugeordnet werden kann.

Dieses bedeutet, dass die in Position K498 mutierten Formen der *S/SBT3* mit geringer Häufigkeit korrekt prozessiert werden, was wahrscheinlich auf eine inkorrekte Faltung der Proteine zurückzuführen ist. Ist die Faltung jedoch korrekt, wird das Protein sekretiert. Über eine Verdünnungsreihe konnte herausgearbeitet werden, dass die mutierten *S/SBT3*-Formen mit etwa 10-fach geringer Konzentration im Apoplasten vorhanden sind im Vergleich zur nativen *S/SBT3*.

Interessanterweise ist die ~100kDa große, unprozessierte, unsekretierte Form der *S/SBT3* auf dem Weg durch den Verdauungstrakt von *M.sexta* nicht stabil. Sie wird höchstwahrscheinlich im proteinfeindlichen Milieu des Insektendarmes degradiert. In diesem akkumuliert ausschließlich die ~90 kDa Form, also die Form, die auch im Apoplasten der infiltrierten Tabakblätter vorhanden ist und die korrekt prozessiert wurde. Durch die korrekte Prozessierung, bzw. ihre korrekte Faltung erlangt das Protein die Stabilität zur Passage des insektidären Verdauungsapparates.

K498 ist somit für die korrekte Faltung und Prozessierung der *S/SBT3* im sekretorischen Weg wichtig. Dennoch hat die Mutation bei korrekter Faltung des Proteins keinen erkennbaren Einfluss auf die Stabilität des Proteins im Darm von *M.sexta*.

3.6.6 Aktivität der apoplastischen S/SBT3 mit fluorogenem Systemin als Substrat

Die Mutationen von Lysin 498 zur Glutaminsäure und Alanin haben Unterschiede im Sekretionsverhalten der S/SBT3 verursacht. Obwohl im Gesamtproteinextrakt aus mit nativer und mutierter S/SBT3-infiltrierten Tabakblättern Unterschiede in der Größe der prominenten Banden zu sehen waren, waren im Apoplasten lediglich S/SBT3-Formen im Bereich von ~90kDa nachweisbar (vergl. Abb. 3.4.3). Da die eingeführte Mutation sich auf die Aktivität der Protease auswirken könnte, wurden zur Prüfung die Aktivität der verschiedenen S/SBT3-Proteine gemessen.

Für den Aktivitätstest wurden identische Volumina der Auswaschungen aus den Apoplasten der infiltrierten Tabakpflanzen eingesetzt, die mit Konstrukten von S/SBT3, K498A und K498E infiltriert worden waren. Das Verhältnis der S/SBT3-Konzentrationen in den Proben ist mit der erstellten Verdünnungsreihe, die auf dem Western-Blot in Abb. 3.6.8 zu sehen ist, analysiert worden. Hierbei konnte für die native S/SBT3 eine ca. 8 – 10 fach höhere S/SBT3 Konzentration im Apoplasten ermittelt werden. Die Messung der Aktivität wurde wie schon in Abschnitt 3.4.1 auf der Basis eines fluorogenen Systeminpeptids durchgeführt. Die Aktivitätsmessung der Proben erfolgte dreifach und lief über einen Zeitraum von 15 Minuten. Durch die erhaltenen Grafen wurden Trendlinien für das Zeitintervall von 2 – 13 Minuten berechnet, und die Steigungen der Trendlinien gemittelt (Tab. 3.2).

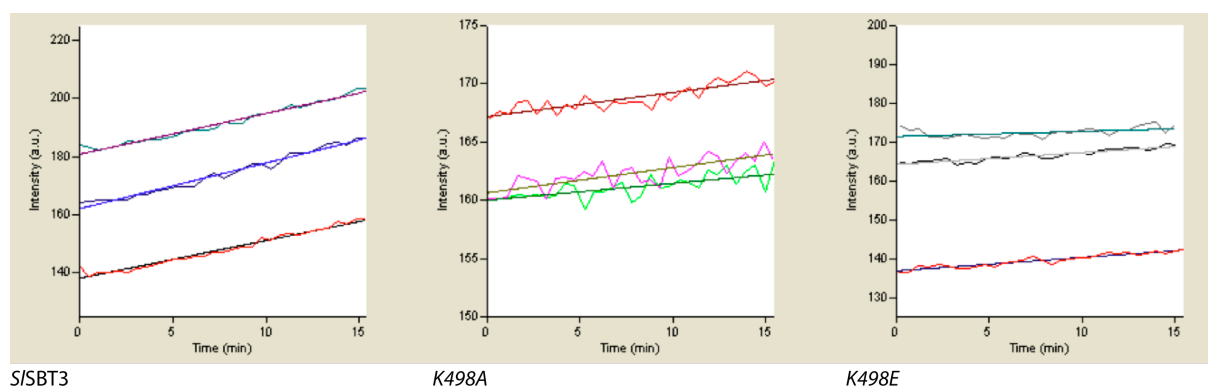


Abb. 3.6.9 Aktivität apoplastischer Proteine gegen Systemin nach Tabakinfiltration

Aktivitätstest mittels eines fluorogenen Systeminpeptids nach 2.5.6.1. Die grafischen Darstellung zeigen die Änderung der Fluoreszenz (Anregung bei 320 nm, Emission bei 420nm) über den Zeitraum von 15 Minuten. Für den Test wurden identische Volumina von Auswaschungen der Apoplasten aus mit S/SBT3 (links), K498A (Mitte) und K498E (rechts) infiltrierten Tabakblättern verwendet. Die für jeden Graf eingezeichneten Trendlinien beziehen sich auf die Steigung im Intervall von 2 – 13 Minuten. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Probe	Mittelwert der Steigungen (Int/min)
S/SBT3	1.50
K498A	0.18
K498E	0.31

Tab. 3.2 Gemittelte Steigungen der Trendlinien in Abb. 3.8.1

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der für die Trendlinien berechneten Steigungen der in Abbildung 3.6.9 gezeigten Geraden im Zeitintervall von 2 – 13 Minuten.

Die grafische Darstellung der Aktivität in Abb. 3.6.9 zeigt deutliche Steigungen der Geraden für S/SBT3, K498A und K498E. Die Steigungen der Ausgleichsgerade wurden im Mittel mit den Werten 1.50 für S/SBT3, 0.18 für K498A und 0.31 für die K498E-Mutation berechnet. Sie zeigen eine etwa 10-fach größere Aktivität der S/SBT3 gegenüber der K498A-Mutation und etwa 5-fach höhere Steigung gegenüber der K498E Mutation an. Allerdings ist bei der Interpretation dieser Ergebnisse zu beachten, dass der S/SBT3 Gehalt im Apoplasten von mit S/SBT3 infiltrierten Blättern ungefähr 8 – 10-fach höher liegt (3.7.3). Das vorliegende Ergebnis lässt in den beiden Mutanten, keine deutliche Veränderung der S/SBT3-Aktivität erkennen. Um diesen Befund zu erhärten müsste das Ergebnis in einem unabhängigen Experiment reproduziert werden. Auch wäre es für diesen Versuch sinnvoll die Mutationen stabil in Tomatenpflanzen einzubauen und eine konstante Expression der Proteine zu erreichen. Nur dann lassen sich sichere Aussagen über Expressionsniveaus und Aktivitäten der mutierten S/SBT3-Formen treffen.

4. Diskussion

In ihren geschätzten 350 Millionen Jahren der Koexistenz haben Blütenpflanzen und Insekten sich auf viele Weisen aneinander angepasst. Diese Anpassungen können zum einen für die Pflanze von Vorteil sein, wie beispielsweise die Verbreitung von Samen oder die Insektenbestäubung, zum anderen aber auch von Nachteil, wenn ein Fraßfeind sich evolutionär auf die Abwehrsysteme der Pflanze einstellen konnte (Mithöfer und Boland 2008). Obwohl schon lange bekannt ist, dass neben sekundären Metaboliten auch Proteine an der Verteidigung gegen herbivore Insekten beteiligt sind, fand die Hypothese einer möglichen Aktivität im insektidären Verdauungstrakt lange Zeit nur wenig Beachtung (Felton 2005).

Es sind multiple Wege und Wirkungsweisen bekannt wie Proteine an der Abwendung von Angriffen durch Insekten beteiligt sind. Eine Hauptfunktion hierbei scheint die Herabsetzung der Nahrungsqualität und eine Beeinträchtigung der Verdaubarkeit des pflanzlichen Materials darzustellen (Felton 2005). Auch direkte Schädigungen des Verdauungstakts durch pflanzliche Proteine wurden bewiesen (Pechan et al. 2002). Während sich Proteinaseinhibitoren zu hohen Konzentrationen im Darm anreichern müssen, um die Verdaubarkeit der Nahrung effektiv zu beeinflussen, können beteiligte Enzyme schon in relativ geringen Konzentrationen wirksam sein (Chen et al. 2007). Manche von ihnen werden nach Insektenverwundung anders prozessiert als im unverwundeten Blatt, andere erlangen durch Proteaseaktivitäten im Darm erst ihre aktive Konformation (Ferreira-DaSilva et al. 2000; Chen et al. 2007; Lippert et al. 2007).

Über eine Funktion der S/SBT3 im Darm von *M.sexta* wurde spekuliert, da ihr pH-Optimum dem im Insektendarm herrschenden Milieu entspricht und darüber hinaus die S/SBT3 im Kot von *M.sexta*-Larven, die auf Tomatenpflanzen gefressen hatten, detektiert werden kann (Huttenlocher, 2008). Auch die Stabilität der S/SBT3 bei Temperaturen bis 60 °C kann ebenfalls als ein Hinweis auf eine anti- herbivore Aktivität gewertet werden, da Körpertemperaturen von Insekten leicht über 30 °C ansteigen können (Casey 1976).

Expressionsanalyse der *S/*SBT3 nach *M.sexata*-Verwundung

Ein Faktor, der für eine Beteiligung eines Proteins an der pflanzlichen Abwehrreaktion spricht, ist die Induzierbarkeit eines Proteins in Folge herbivorer Verwundung bzw. die Regulation durch Jasmonsäure.

RT-PCR-Analysen von mechanisch- und von *M.sexata*-verwundeten Tomatenpflanzen zeigten, dass das *S/*SBT3-Gen durch beide Verwundungsarten lokal induzierbar ist. Expressionsanalysen nach JA-Applikationen deckten sich mit der Hypothese einer Regulation der *S/*SBT3 durch den Wundsignalweg. Das Expressionsmaximum war bei mechanischer Verwundung nach 8 Stunden bei *M.sexata*-Verwundung und durch Besprühung der Pflanze mit Methyljasmonat nach 12 Stunden feststellbar. Unterschiede in der Expressionsstärke beider Verwundungsarten waren nicht zu beobachten (Hüppe 2007). In systemischen Blättern konnte keine Induktion der *S/*SBT3-Genexpression festgestellt werden. *S/*SBT3-Expressionsstudien mit Verwundungen durch *M.sexata*-Larven, die zuvor auf Tomatenpflanzen herangezogen worden waren, führten zu keiner verstärkten Induktion, was gegen die Ausbildung von *S/*SBT3-spezifischen Elicitoren spricht.

Im Vorfeld dieser Arbeit angefertigte *S/*SBT3-Promotor-GUS-Analysen zeigten eine konstitutive Expression der *S/*SBT3 in den Blattadern (Huttenlocher 2008)

Anhand von *S/*SBT3-Promotor-GUS-Analysen wurde daher der Frage nachgegangen, ob es in Folge von *M.sexata*-Verwundung zu Unterschieden im Expressionsmuster der *S/*SBT3 kommt. Hierbei konnten weder eine räumliche noch eine zeitliche Veränderung der Genexpression in den betroffenen Blättern beobachtet werden (siehe Abb. 3.1). Zu jedem untersuchten Zeitpunkt konnte die Aktivität des *S/*SBT3-Promotors lediglich in allen Blattadern nachgewiesen werden, nicht aber in den Geweben der Fiedern der verwundeten Blätter oder den Verwundungsstellen selbst. In Kombination mit den bekannten Expressionsanalysen bedeutet dieser Befund, dass *S/*SBT3 nach *M.sexata*-Verwundung in den Blattadern verstärkt gebildet wird, es aber zu keinem Zeitpunkt räumliche Veränderung der *S/*SBT3-Expression gibt. Es ist hierbei jedoch zu bedenken, dass das durch die Zugabe des Substrats zur Lokalisierung der β -Glucuronidase, entstehende blaue Präzipitat sehr stabil ist und sich über die Zeit anhäuft. Dieses führt dazu, dass eine Sättigung des Gewebes auftritt, in denen der *S/*SBT3-Promotor aktiv ist und sich daher keine Aussagen über eine evtl. Veränderung der Expressionsstärke in *S/*SBT3-exprimierenden Geweben treffen lassen.

Bemerkenswerterweise ist die beschriebene *S/*SBT3-Induktion zwölf Stunden nach Insektenbefall sehr spät zu beobachten. Nach zwölf Stunden ist ein attackiertes Blatt, zumindest bei Angriffen größerer Fraßfeinde, bereits vertilgt. Dennoch kann eine mögliche

Funktion der S/STB3 in der Wundheilung nicht ausgeschlossen werden, falls ein Blatt nur unvollständig verzehrt werden sollte.

Auch ist es bei der Lokalisation der S/STB3-Expression in den Leitgeweben der Pflanze denkbar, dass die S/STB3 ursprünglich nicht gegen kauend-beißende Insekten, sondern vielmehr gegen stechend-saugende Insekten wirksam ist, die sich von den in der Pflanze transportierten Nährstoffen ernähren. Untersuchungen von Proteinen in den Leitgeweben mit einer Funktion in der Pflanzen-Insekten Interaktion sind bislang noch unzureichend (Kehr 2006). Unter dem Einsatz von stechend-saugenden Insekten könnte dieser Hypothese nachgegangen werden.

Proteinstabilität der S/STB3 im Darm und Kot von *M.sexta*

Vorraussetzung für eine mögliche Funktion der S/STB3 im Insektendarm wäre die Stabilität des Proteins im insektivoren Verdauungstrakt. Chen et al beobachteten, in Shotgun-Proteomic-Ansätzen aus Darm und Kot von *M.sexta*, dass sich einige Proteine auf dem Weg durch den Verdauungstrakt anreichern, während andere degradiert werden. Auf diese Weise stießen sie u. a. auf das Enzym Threonin-Deaminase (TD), von dem sie die Existenz zweier Isoformen nachweisen konnten. Eine davon wird im Darm derart prozessiert, dass sie ihre regulatorische Domäne durch proteolytische Spaltung verliert und dadurch auch in Anwesenheit hoher Isoleucin-Konzentrationen im Insektendarm aktiv bleibt. In Larvenentwicklungsexperimenten konnte ein schädlicher Effekt der TD auf die Entwicklung von *M.sexta*-Larven nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise wurden in den von Chen et al. durchgeführten Untersuchungen häufig auch zwei Tomaten-Subtilasen entdeckt (Chen et al. 2007), P69B und P69C, die den Darm von *M.sexta* stabil passierten. Für beide konnte eine Rolle in der Pathogenantwort nachgewiesen werden. Sie sind u.a. durch Salicylsäure und in Folge von *Pseudomonas syringae* Befall induzierbar (Vera und Conejero 1988).

Auch bei den anderen Proteinen, für die später eine Rolle in der Abwehr von Herbivoren nachgewiesen werden konnte, ist die Stabilität in Darm und Kot der Insekten bewiesen. Hierzu zählen u.a. die Polyphenoloxidase, Leucinaminopeptidase oder Lectine (Felton 2005; Zhu-Salzman et al. 2008).

In Western-Blot-Analysen wurden *M.sexta*-Darm- und -Kot-Proben auf ihren S/STB3-Gehalt hin untersucht, um die Akkumulation des Proteins im Verdauungstrakt von *M.sexta* nachzuweisen. Sowohl im Darm, als auch im Kot ist S/STB3 feststellbar und reichert sich während der Passage des Verdauungstrakts an.

Bei den im Western-Blot untersuchten Proteinextrakten aus *M.sexta*-Darm könnte es sein, dass das Antiserum im *M.sexta*-Darm S/SBT3 ausschließlich in unverdautes Blattmaterial detektierte. Der für die Proteinextraktion verwendete vordere Darmabschnitt enthielt sichtbar viel grünes Blattmaterial, was auf das Vorhandensein von Chlorophyll in diesem Darmabschnitt hinweist. Bei ähnlichen Untersuchungen und gleicher Fragestellung stellten Chen et al. fest, dass die große Untereinheit der Rubisco, ein in Blättern sehr abundantes Protein, in Blattgewebe in deutlich höheren Konzentrationen nachweisbar ist als im Mitteldarm der Insekten, was für eine effektive Nahrungsmittelverwertung spricht, die sich bis in den Kot der Larven fortsetzt (Chen et al. 2005; Chen et al. 2007).

Aktivität der S/SBT3 im Kot von *M.sexta*

Die Stabilität des Proteins im Darm von *M.sexta* erhärtet den Verdacht einer Funktion der S/SBT3 im Verdauungstrakt der Insekten. Allerdings ist eine weitere Grundvoraussetzung für eine solche Funktion, dass das Protein auch aktiv ist. Dieses konnte beispielsweise für die Polyphenoloxidase nachgewiesen werden (Wang und Constabel 2004). Auch ist es bekannt, dass einige Proteine erst im Darm der Insekten ihre aktive Konformation erlangen. Bestes Beispiel bietet hier wieder die Threonin-Deaminase, welche nur nach Abspaltung ihrer regulatorischen Domäne im Darm von Schadinsekten aktiv sein kann (Chen et al. 2007). Ähnliche Phänomene sind aber auch von anderen Proteinen wie z.B. Canatoxin (Ferreira-DaSilva et al. 2000) bekannt.

Der Nachweis der Aktivität der S/SBT3 im Kot von *M.sexta* wurde in einer Zymographie erbracht. Dieses Ergebnis muss jedoch als vorläufig gewertet werden, da der Nachweis der S/SBT3 im korrespondierenden Western-Blot bislang erfolglos blieb. Die sichtbare Bande die sich im Kot von *M.sexta*-Larven detektieren lässt, die zuvor auf S/SBT3-Überexpressionspflanzen gefressen hatten, ist in Kot von Larven, die auf S/SBT3-RNAi-Linien gefressen hatten nicht detektierbar und befindet sich zudem auf gleicher Höhe wie reine S/SBT3. Beides kann als Indiz für die S/SBT3 an dieser Stelle gewertet werden.

Es bleibt festzuhalten, dass alles für eine Aktivität im Insektendarm spricht, diese Ergebnisse jedoch in weiteren Versuchen bestätigt werden sollten.

***M.sexta*-Larvenentwicklung unter dem Einfluss der S/SBT3**

Studien zur Untersuchung von schädlichen Effekten verschiedener Proteine und Botenstoffe auf herbivore Insekten wurden als Larvenentwicklungsversuche mit *M.sexta* durchgeführt. So konnten beispielsweise bei Untersuchungen des Einflusses von Threonin-Deaminase, Arginase, Proteinaseinhibitor-II oder auch Prosystemin ein Gewichtsunterschied zwischen *M.sexta*-Larven festgestellt werden, die auf Pflanzen mit verschiedenen Mengen der jeweiligen Proteine gewachsen waren (Johnson et al. 1989, Chen et al. 2005, Kang et al. 2006). Ihr schädlicher Effekt gilt mit der Verzögerung der Larvenentwicklung als bewiesen.

Im Vorfeld der Arbeit durchgeführte *M.sexta*-Larvenentwicklungsexperimente unter dem Einfluss der S/SBT3 kamen zu keinem eindeutigen Ergebnis. Bei Larven die im 3.Larvenstadium auf unterschiedlichen S/SBT3-Genotypen ausgesetzt wurden waren nach elf Tagen der Entwicklung keine Gewichtsunterschiede der Larven feststellbar (Hüppe 2007). F. Huttenlocher beobachtete eine geringere Verweildauer von *M.sexta*-Larven auf S/SBT3-Überexpressionspflanzen (Huttenlocher 2008) verglichen mit Larven auf S/SBT3-RNAi Pflanzen.

In den durchgeführten Larvenentwicklungsexperimenten auf S/SBT3-RNAi-, wt- und Überexpressionslinien konnten deutliche Gewichtsunterschiede zwischen den Larven der verschiedenen Linien festgestellt werden, ungeachtet der Tatsache, ob die von den Pflanzen gefallenen Larven wieder zurück auf die Pflanzen gesetzt oder dem Experiment entzogen wurden. Hierbei entwickelten sich in allen Durchführungen die Larven, die auf S/SBT3-RNAi Linien gewachsen waren, zu den durchschnittlich schwersten. Die Unterschiede nahmen im Versuchsverlauf immer deutlichere Formen an.

In der ‚Larvenentwicklung 2‘ sollte der Beobachtung, auf S/SBT3-Überexpressionspflanzen gewachsene Larven ließen sich häufiger von ihrer Futterquelle fallen, als ihre auf anderen S/SBT3-Linien gewachsenen Artgenossen, nachgegangen werden (Huttenlocher 2008). Es ließ sich jedoch lediglich ein Genotyp-abhängiger Unterschied in der Gewichtsentwicklung der verbliebenen Raupen beobachten, jedoch keine numerischen Unterschiede der bis zum Ende im Experiment verbliebenen Larven. Dieses spricht gegen den Befund von F. Huttenlocher.

Allerdings ist zu beachten, dass bei dieser Durchführung im Versuchszeitraum nur ca. 50 % der Larven, unabhängig von den Genotypen auf den Pflanzen verblieben, was die hohen Verlustraten während der Durchführung ‚Larvenentwicklung 2‘ erklärt.

Das Verlassen der Futterpflanzen im Zeitraum ihrer Entwicklung scheint bei diesem Versuchsaufbau der Regelfall zu sein. Ein Aufbau, der permanenten Zugang zur Nahrung im gesamten Zeitraum der Entwicklung gewährt, auch wenn die Larven die Futterpflanzen zeitweilig verlassen, wäre zur Überprüfung der Ergebnisse sinnvoll.

Bei diesen Ergebnissen ist weiterhin zu beachten, dass sich die Anzahl an Larven in allen durchgeführten Experimenten etwa halbierte. Die Ursache für die hohen Todesraten sind letzten Endes ungeklärt. Unter normalen Bedingungen einer *M.sexta*-Zucht nach Bell und Joachim, sind die Überlebensraten der Larven bei etwa 90 % (Bell und Joachim 1975). In den durchgeführten Experimenten können die hohe Insektendichte auf den Futterpflanzen (zu Beginn des Experiment jeweils 20 *M.sexta*-Larven pro Pflanze), der beobachtete Kannibalismus junger *M.sexta*-Larven, oder auch die Lebensbedingungen im Gewächshaus eine Rolle spielen (Luftfeuchtigkeit, Luftzirkulation, mögliche Pathogene) (Bell und Joachim 1975). Auch ist es möglich, dass die Todesrate junger *M.sexta* natürlicherweise auftritt oder durch einen eventuellen Inzucht Effekt der häuslichen *M.sexta*-Zucht erhöht ist. Bei Untersuchungen der Rolle der Polyphenoloxidase in der Interaktion mit *Malacosoma disstria* ließen sich unterschiedlich große Schwankungen der Sterblichkeitsraten der Larven im Rahmen zwischen 0 und bis zu 70 %, je nach Jahreszeit und alter des Geleges beobachten (Wang und Constabel 2004).

Auch sind die Größenunterschiede zwischen den auf einem Genotyp gewachsenen Larven beträchtlich (Daten unter 6.1). Die kleinen Stichproben und die großen Gewichtsschwankungen verhinderten die Berechnung einer aussagekräftigen Standardabweichung. Jedoch entstammten alle für das Experiment verwendeten Larven aus den gleichen Gelegen, weshalb die gesehenen Unterschiede in der Larvenentwicklung auf die Genotypen der Futterpflanzen zurückgeführt werden können.

Die Ursache für die großen Gewichtsunterschiede gleichalter *M.sexta*-Larven, die auf denselben pflanzlichen Genotypen aufgewachsen waren, ist nicht bekannt. Kingsolver beobachtete, dass *M.sexta*-Larven, die bei Eintritt des 5. Entwicklungsstadiums ein bestimmtes Gewicht nicht erreicht hatten, ein zusätzliches sechstes Larvenstadium durchleben können, bevor sie sich verpuppen (Kingsolver 2007). Es könnte sein, dass die *M.sexta*-Larven, die auf S/STB3-exprimierenden Pflanzen aufwachsen, in Folge von reduzierter Nährqualität ein verzögertes Wachstum gegenüber den S/STB3-RNAi-Larven aufweisen und hierdurch weitere Larvenstadien durchlaufen. Eine Überprüfung dieser Hypothese wäre sinnvoll.

Die für die Versuche verwendeten Futterpflanzen waren ca. zwei Monate alt. Die Wiederholungen dieser Experimente sollten mit Larvenzahlen größer 200 durchgeführt werden, um eine möglichst große Stichprobe und damit die Möglichkeit zur statistischen Auswertung der Larvengewichte zu haben. Zudem sollten hierbei ausschließlich Pflanzen entweder hohen oder niedrigen Alters verwendet werden, um einen möglichen Seneszenz-Phänotyp der transgenen *S/GBT3*-Pflanzen auszuschließen, der während der Versuche beobachtet wurde, bisher jedoch nicht untersucht ist. Hierbei schien es als alterten die *S/GBT3*-OE Linien schneller als die *S/GBT3*-RNAi-Linien, was einen potentiellen Nährstoffmangel in seneszierenden Blättern und damit eine verzögerte Entwicklung der Larven auf den Überexpressionspflanzen erklären könnte.

Mutagenese und Stabilität der *S/GBT3* im Insektendarm

Die *S/GBT3* ist ein Protein, dass bis 60 °C und pH-Werten bis 11 stabil ist. Zudem verlässt es den Darm von *M.sexta* unverdaut und scheint damit auch gegen proteolytische Angriffe gefeit. Die Ursachen der hohen Stabilität der *S/GBT3* sind bis heute unbekannt.

Proteinstabilität entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren und kann nicht auf ein universelles Strukturmerkmal zurückgeführt werden. Zu diesen Faktoren zählen u.a. Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen, Disulfidbrücken und die Bindung von Metall-Ionen in Proteinen. Letztere trägt zu Proteineigenschaften wie Thermostabilität, Immunität gegenüber proteolytischen Enzymen oder auch kinetischer Stabilität bei (Li et al. 2005). So wurde auch die Stabilität bekannter Subtilasen und thermostabiler Enzymen häufig durch die Bindung von Calcium-Ionen erklärt, was als Faktor allein nicht ausreichend sein kann (Voordouw et al 1976).

Mit der Kristallstruktur der *S/GBT3* wurde erstmals eine Subtilase identifiziert die Calcium unabhängig ist (Ottmann et al. submitted). Trotzdem besitzt dieses Protein eine bemerkenswerte Stabilität. In der Strukturanalyse der *S/GBT3* konnten drei konservierte Protein-Regionen gefunden werden, welche die Struktur der Calcium-Bindestellen anderer Subtilasen beibehalten. Bei näherer Betrachtung einer dieser Strukturen, Ca-2, gab ein in Position 498 befindlicher Lysinrest Grund zu der Annahme, die Proteinstabilität der *S/GBT3* positiv zu beeinflussen. Es wurde vermutet, dass der positiv geladene Lysinrest die Bindung eines Ca^{2+} -Ions in der Ca-2 teilweise imitiert und sich damit positiv auf die Proteinstabilität auswirkt (Ottmann et al. submitted).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Lysinrest 498 zum neutralen Alanin und zur Glutaminsäure mutiert. Beide eingebrachten Mutationen führten zu einer Akkumulation einer ~100kDa großen Proteinbande, die sich auf Western-Blots von Agrobakterien-infiltrierten

Tabakblättern, nicht aber im Verdauungstrakt von *M.sexata* nachweisen ließ. Sie wird wahrscheinlich von den dort wirkenden Proteasen degradiert. Im Darm und Kot von *M.sexata* war bei mutierter und nativer S/SBT3 ein identisches Bandenmuster im Western-Blot sichtbar. Diese Formen scheinen gegenüber proteolytischen Angriffen der Verdauungsproteasen immun.

Für eine sicherere Analyse der kinetischen Parameter, Expressionsspiegel oder Sekretionserfolge wäre die Generation stabil transformierter Tomatenpflanzen sinnvoll, die allerdings den Rahmen dieser Arbeit sprengte. Auch ist nicht auszuschließen, dass das Protein in *N.attenuata* und *Solanum lycopersicum* unterschiedlich modifiziert wird und daher für die korrekte Analyse der Mutation eine stabile Expression in Tomatenpflanzen notwendig ist.

Sekretionsverhalten der Mutationen

In den Blättern der mit nativem und mutierten S/SBT3-Konstrukten infiltrierten Tabakpflanzen zeigten unterschiedlich große Formen der S/SBT3 Abundanz. In mit dem nativen S/SBT3-Konstrukt infiltrierten Tabakpflanzen konnte eine Proteinbande bei ~90kDa detektiert werden, während das S/SBT3-Antiserum nach der Infiltration mit mutierten S/SBT3-Konstrukten eine Proteinbande bei ~100kDa detektierte. Diese Proteinbanden bei ~100kDa repräsentiert eine unprozessierte Form der S/SBT3 mit fehlerhaftem Sekretionsverhalten (Kuhn 2007; Cedzich et al. 2009). Die S/SBT3 wird als PräPro-Enzym gebildet und verliert im sekretorischen Weg erst seine Prä-Domäne, also sein Signalpeptid und spaltet anschließend in einem autokatalytischen Mechanismus seine Pro-Domäne ab (Cedzich et al. 2009). Hierbei ist zu beachten, dass die S/SBT3 für diesen Vorgang dimerisieren und eine intaktes katalytisches Zentrum aufweisen muss.

Eine Mutation der S/SBT3 in Position 538, bei welcher der Serinrest der katalytischen Triade zu Alanin mutiert worden war, um die Aktivität des Proteins gezielt zu beeinträchtigen, zeigte einen, verglichen mit unseren Beobachtungen, ähnlichen Phänotyp. Auch hier wurde in Blättern eine ~100kDa Bande detektiert. In der Untersuchung dieser Mutation wurde festgestellt, dass die S/SBT3-S538A einen Defekt in der Prozessierung der Prodomäne aufweist und nicht korrekt sekretiert wird (Cedzich et al 2009).

Zusätzlich ergaben Mutationsanalysen der C-terminalen Fn III-Domäne, dass schon eine Deletion von fünf Aminosäuren im C-Terminus dafür ausreichend ist, dass das Protein durch ausbleibende autokatalytische Prozessierung intrazellulär akkumuliert (Cedzich et al. 2009).

In den hier durchgeführten Untersuchungen zum Sekretionsverhalten der *S/*SBT3 und ihren mutierten Formen (K498A, K498E) konnte gezeigt werden, dass sich in allen Fällen nur die Form der *S/*SBT3 im Apoplasten finden lässt, die auch bei nicht- mutierter *S/*SBT3 sekretiert wird. Die ~100kDa Form verbleibt intrazellulär und ist im Apoplasten nicht nachweisbar. Die im Symplasten der Blätter abundanten Formen der *S/*SBT3 bei ~100kDa Masse, die nach Einführung der Mutationen K498A und K498E dort akkumulieren, deuten darauf hin, dass die autokatalytischen Spaltung nicht in der Effektivität erfolgt, wie sie bei nativer *S/*SBT3 normal wäre. In Blättern mit infiltrierter nativer *S/*SBT3 ist diese unprozessierte Form des Proteins im Western-Blot kaum detektierbar.

Eine mögliche Erklärung für diese fehlerhafte Prozessierung der mutanten *S/*SBT3 könnte in einer durch die Einführung der Mutation veränderten Struktur der *S/*SBT3 bieten, die sich negativ auf die Faltung und damit die Stabilität des Proteins auswirken könnte. So wäre es denkbar, dass das *S/*SBT3-Dimer nicht mehr stabil ist und in den meisten Fällen bereits zerfällt, bevor es zu der autokatalytischen Spaltung der Pro-Domäne gekommen ist. Damit ist die Sekretion des Proteins ausgeschlossen und es kommt zur Akkumulation der unprozessierten *S/*SBT3 im Symplasten der Pflanzenzellen. Auch wäre es möglich, dass nicht die Dimersisierung, sondern die Stabilität des katalytischen Domäne beeinträchtigt ist, wodurch diese sich mit geringerer Wahrscheinlichkeit in ihre aktive Konformation faltet, welche die korrekte Prozessierung des Proteins ermöglicht.

Aktivität der mutierten *S/*SBT3-Formen

Die Aktivität der mutierten *S/*SBT3-Formen, die in den Apoplasten gelangt waren, wurde untersucht. Es ist keine deutliche Veränderung der Aktivität der mutierten Formen im Vergleich zu der Aktivität nativer, sekretierter *S/*SBT3 feststellbar gewesen. Es ist möglich, dass sich die Mutation auf die Hitzeresistenz des Proteins auswirkt. Hierbei wäre es sinnvoll die Aktivität der mutierten *S/*SBT3 nach Hitzebehandlung mit der Aktivität der nativen *S/*SBT3 Formen zu vergleichen, für die eine Stabilität bei hohen Temperaturen bekannt ist (Cedzich et al. 2009).

Beachtet man die Tatsache, dass nur eine *S/*SBT3-Form im Apoplasten detektierbar ist, bedeutet dieses, dass die *S/*SBT3 mit den Mutationen K498A und K498E stabil und aktiv ist, wenn sie korrekt prozessiert und sekretiert wird.

Hierbei ist zu beachten, dass die Expression der *S/*SBT3 und ihrer Mutanten lediglich durch die transiente, Agrobakterien vermittelte Expression in Pflanzen exprimiert wurden. Eine stabile Expression in *S/*SBT3-defizienten-Tomatenpflanzen, also dem ursprünglichen Organismus dieses Proteins, wäre sinnvoll, um vergleichbare Werte in den Pflanzen zu

erlangen. Somit sind die vorliegenden Ergebnisse als vorläufig zu betrachten und müssen durch Wiederholungen der Untersuchungen bestätigt werden.

Ausblick

Alles deutet darauf hin, dass das *S/SBT3*-Protein an einer Interaktion mit herbivoren Insekten beteiligt ist. Zwar ist keine räumliche Änderung der Genexpression in Folge von *M.sexata*-Verwundung zu beobachten gewesen, jedoch wurde die Stabilität der *S/SBT3* in Darm und Kot bestätigt und die Aktivität des Proteins nach Verlassen des Darms bewiesen. Außerdem konnte in Entwicklungsexperimenten mit *M.sexata*-Larven ein schädlicher Einfluss des Proteins auf diese beobachtet werden, der mit der Menge an *S/SBT3* in den Pflanzen korreliert. Allerdings ist es schwer die Resultate in einen funktionellen Kontext einzuordnen, wenn kein Substrat für die *S/SBT3* bekannt ist. 2D- DIGE Untersuchungen des Proteoms von *M.sexata*-Därmen und -Kot, die auf *S/SBT3*-RNAi- und -Überexpressions-Linien gewachsen waren scheinen eine sinnvolle Herangehensweise an diese Suche zu sein.

Unklar ist hierbei jedoch, ob das Substrat der *S/SBT3* pflanzlichen oder tierischen Ursprungs ist. Es ist denkbar, dass tierische Proteasen, oder Teile der Mikroflora an der enteralen Prozessierung pflanzlicher Proteine beteiligt sind (Spiteller et al. 2000). Im Umkehrschluss wäre es folglich nicht auszuschließen, dass die *S/SBT3* an der Prozessierung eines tierischen oder mikrobiologischen Substrats beteiligt ist. Auch ist es im Bereich des Möglichen, dass eine Protease mehrere Substrate besitzt und damit mehrere Wirkungsweisen besitzen kann. Die Hypothese, dass sich das Substrat einer Protease in Tomatenpflanzen mit unterdrückter *S/SBT3*-Expression anreichern muss, wäre in diesem Fall nicht aufrecht zu erhalten.

Mit der kürzlichen Entdeckung des Substrats von *AtSBT1.1*, einer Subtilase aus *Arabidopsis thaliana* (Srivastava et al. 2008) ist erstmals eine Subtilase identifiziert worden, die für die Prozessierung von Phytosulfokinen (PSK) zuständig ist, kleinen Peptiden mit Signalwirkung. Die PSKs sind Wachstumsfaktoren, die in Zellkulturen zur Kallusbildung führen, und als große Vorläuferproteine gebildet werden (Matsubayashi und Sakagami 1996; Matsubayashi und Sakagami 2006). Die Spaltung nahe eines dibasischen Motivs, ließe den Verdacht nach der Beteiligung einer Subtilase aufkommen, für die in Säugertieren schon länger eine Funktion als Prohormonkonvertasen bekannt war (Barr 1991; Seidah et al. 1999).

Die *AtSBT1.1* ist, wie es für die meisten Subtilasen vermutet wird, ein sekretorisches Protein und besitzt ein pH-Optimum im leicht sauren Bereich, kann also im Apoplasten von Pflanzen wirken, wo ein solches Milieu herrscht. In *AtSBT1.1* knockout-Linien konnte keine Prozessierung der untersuchten PSK- Vorstufe beobachtet werden (Srivastava et al. 2008).

Damit ist die AtSBT1.1 die erste bekannte Subtilase für die die Prozessierung eines Signalpeptids *in vivo* nachgewiesen wurde. Allerdings beruht die vollständige Prozessierung der PSK auf weiteren proteolytischen Aktivitäten unter Beteiligung weiterer Proteasen (Matsubayashi und Sakagami 2006).

Man geht davon aus, dass der pH-Wert des Apoplasten, in Folge von Verwundung der Pflanze und damit ausgelösten Ionenströmungen, in den neutralen bis alkalischen Bereich ansteigt (Felix und Boller 1995; Schaller und Oecking 1999). Eine Funktion oder Aktivität der S/SBT3 nach von Verwundungen der Pflanze ist daher im Bereich des Möglichen. Über eine Funktion in der Wundheilung sollte weiterhin nachgedacht werden.

Auch eine Beteiligung der S/SBT3 in der Prozessierung von Peptidhormonen ist denkbar. Die Spaltpräferenzen der S/SBT3 sind bekannt (Huttenlocher 2008). Detaillierte Untersuchungen zur Substratspezifität des Enzyms bestätigten die Präferenz der rekombinanten S/SBT3 für Glutamin in der P1-Position, sowie für basische Aminosäuren in den Positionen P2 und P1' ihrer Substrate. Diese selektive Spaltpräferenz deutet eher auf eine spezifische Spaltung eines Substrats hin, als auf eine degradative Funktion.

Trotzdem ist bisher kein Phänotyp in S/SBT3-knockout-Linien bekannt, wenn die Pflanzen im Gewächshaus unter optimalen angezogen werden. Eine Phänotypen Analyse dieser Pflanzen unter abiotischen Stressbedingungen ist bisher nicht untersucht, erscheint jedoch sinnvoll.

Diese Arbeit deutet auf eine Rolle der S/SBT3 in der Interaktion mit herbivoren Insekten hin und erhärtet den Verdacht einer Beteiligung dieses Enzyms an der Abwehrreaktion von Fraßfeinden. Viele Indizien weisen auf eine Funktion der S/SBT3 im Darm von Insekten hin. Die Identifizierung des Substrats der S/SBT3 muss für den endgültigen Beweis dieser Funktion jedoch erbracht werden. Erst dann wird es möglich sein die Wirkungsweise dieses Enzyms im Detail zu verstehen.

5. Literaturverzeichnis

- Alborn, T., Turlings, T. J., Jones, T. H., Stenhagen, G., Loughrin, J. H., & Tumlinson, J. H. (1997). An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 276, 945 - 949.
- Alexander, P., Ruan, B., & Philip, N. (2001). Cation- Dependent Stability of Subtilisin. *Biochemistry* , 40, 10634 - 10639.
- Baldwin, I. T. (1995). Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95, 8113 - 8118.
- Barr, P. (1991). Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* , 66, 1-3.
- Barret, A., Rawlings, N., & Woessner, J. (1998). *Handbook of proteolytic enzymes*. London, UK: Academic press.
- Bell, R., & Joachim, F. (1975). Techniques for Rearing Laboratory Colonies of Tobacco Hornworms and Pink Bollworms. *Annals of the entomological society of america* , 69, 365 - 373.
- Berenbaum, M., & Zangerl, A. (2008). Facing the future of plant-insect interaction research: le retour à la 'raison d'être'. *Plant Physiology* , 146, 804 -811.
- Berger, D., & Altmann, T. (2000). A subtilisin- like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Development.* , 14, 1119 - 1131.
- Bezemer, T. M., & van Dam, N. M. (2005). Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. *Trends in Ecological Evolution* , 20, 617 - 624.
- Birnbaum, H., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extravtion for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* , 7, 1513 - 1523.
- Bogacheva, A., Rudenskaya, G., Dunaevsky, Y., Chestuhina, G., & Golovkin, B. (2001). New subtilisin-like collagenase from leaves of common plantain. *Biochemie* , 83, 481 - 486.
- Bogre, L., Ligterink, W., Meskiene, W., Barker, P. J., Heberle-Bors, E., Huskisson, N. S., & Hirt H. (1997). Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* , 9, 75 - 83.
- Book, A., Yang, P., Scalf, M., Smith, L., & Vierstra, R. (2005). An oligomeric protease complex from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138, 1046 - 1057.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quanteties of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical Biochemistry* , 72, 248 - 254.
- Casey, T. (1976). Activity patterns, body temperature and thermal ecology in two desert caterpillars (Lepidoptera, Sphingidae). *Ecology* , 57, 485 - 497.

- Cedzich, A., Huttenlocher, F., Kuhn, B. M., Pfannstiel, J., Gabler, L., Stintzi, A., et al. (2009). The protease-associated (PA) domain and C-terminal extension are required for zymogen processing, sorting within the secretory pathway, and activity of tomato subtilase 3 (SISBT3). *Journal of Biological Chemistry*, 284, 14068 - 14078
- Chen, H., Curtis, W., Jason, K. A., Brett, P. S., & Howe, G. A. (2005). Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Science*, 102, 19237 - 19242.
- Chen, H., Gonzales-Vigil, E., Wilkerson, C. W., & Howe, G. A. (2007). Stability of Plant Defense Proteins in the Gut of Insect Herbivores. *Plant Physiology*, 143, 1954-1967.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J., Lorenzo, O., et al. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448, 666 - 673.
- Coffeen, W., & Wolpert, T. (2004) Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell*, 16, 857 - 873
- Ehrlich, P., & Raven, P. (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18, 586-608.
- Farmer, E., & Ryan, C. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound- inducible inhibitors. *Plant Cell*, 4, 129 - 134.
- Felix, G., & Boller, T. (1995). Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *The Plant Journal*, 7, 381 - 389.
- Felton, G. (2005). Indigestion is a plants best defense. *Proceedings of the National Academy of Science*, 102, 18771 - 18772.
- Ferreira-DaSilva, C., Gombarovits, M. E., Masuda, H., Oliveira, C. M., & Calini, C. R. (2000). Proteolytic Activation of Canatoxin, a Plant Toxic Protein, by Insect Cathepsin-Like Enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44, 162 - 171.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., et al. (2009). (+)-7-iso-Jasmonyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5, 344 - 350
- Fuller, R., Brake, A., & Thorner, J. (1989). Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca^{2+} -dependent serine protease. *Biochemistry* (86), 1434 - 1438.
- Glaeve, A. (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology*, 20, 1203 - 1207.
- Green, T. R., & Ryan, C. A. (1972). Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insect. *Science*, 175, 776-777.
- Hüppe, S. (2007). Insektenresistenz in *Solanum lycopersicum* und die Rolle von SISBT3. *Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Diplomarbeit*.
- Halitschke, R., Schittko, U., Pohnert, G., Boland, W., & Baldwin, I. T. (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera,

- Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiology*, 125, 711 - 717.
- Halkier, B., & Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 303 - 333.
- Heil, M., & Baldwin, I. T. (2002). Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *TRENDS in plant Science*, 7, 61 - 67.
- Hermesmeier, D., Schlittko, U., & Baldwin, I. (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiology*, 125, 683-700.
- Huttenlocher, F. (2008). Biochemische und funktionelle Charakterisierung der Subtilase SISBT3 aus *Solanum lycopersicum* L., Göttingen, D, Cuvillier Verlag
- Jeffers, L., Thompson, D., Ben-Yakir, D., & Roe, R. (2005). Movement of proteins across the digestive system of the tobacco budworm *Heliothis virescens*. *Entomology Experimental Applications*, 117, 135 - 146.
- Johnson, R., Narvaez, J., An, G., & Ryan, C. (1989). Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Science*, 86, 9871 - 9875.
- Jordá, L., Coego, A., Conejero, V., & Vera, P. (1999). A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *Biological Chemistry*, 274, 2360 - 2365.
- Julius, D., Brake, L., Blair, L., Kunisawa, R., & Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell*, 37, 1075 - 1089.
- Kahl, J., Siemens, D., Aerts, R., Gabler, R., Kuhnemann, F., Preston, C., & Baldwin I. (2000). Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not a putative indirect defense against an adapted herbivore. *Planta*, 210, 336 - 342.
- Kaneda, M., & Tominaga, N. (1975). Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *Biochemistry*, 78, 1287 - 1296.
- Kaneda, M., Yonezawa, H., & Uchikoba, T. (1995). Improved isolation, stability and substrate specificity of cucumisin, a plant serine endopeptidase. *Biotechnol. Appl. Biochemistry*, 22, 215 - 222.
- Kang, J. H., Wang, L., Giri, A. P., & Baldwin, I. T. (2006). Silencing threonine deaminase and the JAR1 homologue in *Nicotiana attenuata* impairs JA-isoleucine mediated defenses against the specialist herbivore, *Manduca sexta*. *Plant Cell*, 18, 3303 - 3320.
- Karojet, S. (2006). Molekulare Charakterisierung von IDE- defizienten Tomatenpflanzen. Ihre Reaktion auf Verwundung und ihre Interaktion mit *Manduca sexta*. *Diplomarbeit, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen*.
- Kehr, J. (2006). Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany*, 57, 767 - 775.

- Kessler, A., & Baldwin, I. (2001). Defensive function of herbivore- induced plant volatile emission in nature. *Science* , 291.
- Kingsolver, J. (2007). Variation in growth and instar number in field and laboratory *Manduca sexta*. *Proceedings of the Royal Society Biological Science* , 274, 977 - 981.
- Korth, K. L., & Dixon, R. A. (1997). Evidence for chewing insect specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. *Plant Physiology* , 115, 1299 - 1305.
- Krischik, V., Barbosa, P., & Reichelderfer, C. (1988). Three trophic level interactions: allelochemicals, *Manduca sexta* (L.), and *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki Berliner. *Environmental Entomology* , 17, 476 - 482.
- Kuhn, B. (2007) Untersuchungen über die Prozessierung und Sekretion der LeSBT3. *Universität Hohenheim, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Diplomarbeit*
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* , 227, 680 - 685.
- Laplace, L., Ribeiro, A., Franche, A., Duhoux, C., Auguy, E., Bogusz, D., Pawlowski D., & Pawlowski K. (2000). Characterization of a *Casuarina glauca* nodule- specific subtilisin- like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa* ag12. *Molecular Plant-Microbe Interaction* , 13, 113 - 117.
- Li, L., Li, C., Lee, G. I., & Howe, G. A. (2002). Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response in tomato. *Proceedings of the National Academy of Science*, 99, 6412 - 6421.
- Li, W., Zhou, X., & Lu, P. (2005). Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances* , 23, 271 - 281.
- Lippert, D., Chowrira, S., Ralph, S., Zhuang, J., Aeschliman, D., Ritland, C., Ritland K., & Bohlmann J. (2007). Conifer defense against insects: proteome analysis of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) bark induced by mechanical wounding or feeding by white pine weevils (*Pissodes strobi*). *Proteomics* , 7, 248 - 270.
- Maffai, M. E., Mithöfer, A., & Boland, W. (2007). Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry* , 68, 2946 - 2959.
- Matsubayashi, Y., & Sakagami, Y. (2006). Peptide hormones in plants. *Ann. Rev. Plant Biology* , 57, 649 - 674.
- Matsubayashi, Y., & Sakagami, Y. (1996). Phytosulfokines, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinale*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 93, 7623 - 7627.
- McGurl, B., Orozco-Cardenas, M., Pearce, G., & Ryan, C. (1994). Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91, 9799 - 9802.
- McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M., & Ryan, C. (1992). Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* , 255, 1570 - 1573.

- Meichtry, J., Amrhein, N., & Schaller, A. (1999). Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Molecular Biology*, 39, 749 - 760.
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2008). Recognition of Herbivory- Associated Molecular Patterns . *Plant Physiology* , 146, 825 - 831.
- Mithöfer, A., Wanner, G., & Boland, W. (2005). Effects on feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory- related volatile emission. *Plant Physiology* , 137, 1160 - 1168.
- Narváez- Vasquez, J., Florin- Christensen, J., & Ryan, C. (1999). Positional specificity of a phospholipase A2 activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* , 11, 2249 - 2260.
- Ottmann, C., Rose, R., Huttenlocher, F., Cedzich, A., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., Schaller, A. (2009). Structure of the first plant subtilase: SBT3 is Ca^{2+} - independent and activated by PA- domain- mediated homo-dimerization. *Submitted*
- Paré, P. W., Alborn, H. T., & Tumlinson, J. H. (1998). Concerted biosyntheses of an insect elicitor of plant volatiles. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95, 13971 - 13975.
- Pechan, T., Cohen, A., Williams, P., & Luthe, D. (2002). Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. *Proceedings of the National Academy of Science*, 99, 13319 - 13323.
- Plunkett, G., Senear, D., Zuroske, G., & Ryan, C. (1982). Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 213, 456 - 462.
- Rautengarten, C., Steinhauer, D., Büsses, D., Stintzi, A., Schaller, A., Kopka, J., & Altmann T. (2005). Inferring Hypotheses on Functional Relationships of Genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* Subtilase Gene Family. *PLOS Computational Biology* , 1, 297 - 312.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., & Farmer, E. E. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* , 12, 707 - 720.
- Rudenskaya, G., Bogacheva, A., Preusser, A., Kunznetsova, A., Dunaevsky, Y., Golovin, B., & Stapnov V. (1998). Taraxalisin -- a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale*. *Webb s.l. FEBS* , 437, 237 - 240.
- Rudenskaya, G., Bogdanova, E., Revina, L., Golovkin, B., & Stepanov, V. (1995). Macluralisin - a serin proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Scheid. *Planta* , 196, 174 - 179.
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochemica et Biophysica Acta* , 1477, 112- 121.
- Schaller, A., & Oecking, C. (1999). Modulation of plasma membrane H^+ -ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *The Plant Cell* , 11, 263 - 272.

- Schaller, A., & Ryan, C. (1994). Identification of a 50-kDa systemin-binding protein in tomato plasma membranes having Kex2p-like properties. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91, 11802 - 11806.
- Schaller, A., Roy, P., & Amrhein, N. (2000). Salicylic acid-independent induction of pathogenesis related gene expression by fusicoccin. *Planta*, 210, 599 - 606.
- Scheer, J., & Ryan, C. (1999). A 160 -kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell*, 11, 1525 - 1536.
- Scheer, J., & Ryan, C. (2002). The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Science*, 99, 9585 - 9590.
- Schmelz, E., LeClere, S., Phipps, S., Meredith, J., Chourey, P., Alborn, H., & Teal P. (2006). Fragments of ATP synthase mediated plant perception of insect attack. *Proceedings of the National Academy of Science*, 103, 8894 - 8899.
- Schoonhoven, L., van Loon, J., & Dicke, M. (2005). *Insect- Plant Biology*. Oxford: Oxford University Press.
- Seidah, N., & Chrétien, M. (1997). Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 602 - 607.
- Seidah, N., Mowla, S., Hamelin, J., Mamarbachi, A., Benjannet, S., Toure, B., & Basak A. (1999). Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proceedings of the National Academy of Science*, 96, 1321 - 1326.
- Seo, H., Song, J., Lee, Y., Lee, Y., Hwang, I., Lee, J., & Choi Y. (2001). Jasmonic acid carboxy methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Science*, 98, 4788 - 4793.
- Shiryaev, S., Remacle, E., Ratnikov, B., Nelson, N., Savinov, A., Wei, G., Bottini M., Rega M., Parent A., Desjardin R., Fugere M., Day R., Sabet M.,Pellecchina M., Liddington R., Smith J., Mustelin T., Guiney D., Lebl M., & Strongin A. (2007). Targeting host cell furin proprotein convertases as a therapeutic strategy against bacterial toxins and viral pathogens. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 20847 - 20853.
- Siezen, R., & Leunissen, J. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science*, 6, 501 - 523.
- Sitte, P., Weilter, E., Kadereit, J. W., bresinsky, A., & Körner, C. (2002). *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Begründet von E. Strasburger* (Vol. 35). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Spiteller, D., & Boland, W. (2003). N-(15,16-Dihydroxylinoleoyl)-glutamine and N-(15,16-epoxylinoleoyl)-glutamine isolated from oral secretions of lepidopteran larvae. *Tetrahedron*, 59, 135 - 139.
- Spiteller, D., Dettner, K., & Boland, W. (2000). Gut Bacteria May Be Involved in Interactions between Plants, Herbivores and their Predators: Microbial Biosynthesis of N-Acylglutamine Surfactants as Elicitors of Plant Volatiles. *Biological Chemistry*, 381, 755 - 762.
- Spiteller, D., Oldham, N. J., & Boland, W. (2004). N-(17-phosphonooxylinolenoyl)glutamin and N-(17-phosphonooxylinoleonyl)glutamin from

- insect gut: the first backbone-phosphorylated fatty acid derivatives in nature. *Journal Organic Chemistry*, 69, 1104 - 1109.
- Srivastava, R., Liu, J.-X., & Howell, H. (2008). Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 56, 219 - 227
- Staswick, P. E., Yuen, G. Y., & Lehman, C. C. (1998). Jasmonate signalling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant Journal*, 15, 747 - 754.
- Staswick, P., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 2117 - 2127.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., & Farmer, E. (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Science*, 98, 12837 - 12842.
- Stork, N. (2007). Biodiversity: world of insects. *Nature*, 448, 657 - 658.
- Tanaka, H., Onouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C., & Machida Y. (2001). A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development*, 128, 4681 - 4689.
- Tao, J., Ginsberg, I., Banerjee, N., Koltin, Y., Held, W., & Bruenn, J. (1990). The *Ustilago maydis* KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae* and relationship to other cellular toxins. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 1373 - 1381.
- Taylor, A., Horsch, A., Rzepczyk, A., Hasenkampf, C., & Riggs, C. (1997). Maturation and secretion of a serine proteinase is associated with events of late microsporogenesis. *Plant Journal*, 12, 1261 - 1271.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura K., Yang S., Howe G., & Browse J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF COI1 complex during jasmonate signaling. *Nature*, 448, 661 - 666.
- Thomas, G. (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 3, 753 - 766.
- Turner, J., Ellis, C., & Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 14, 153 - 164.
- Ullrich, K. (2006). Charakterisierung der Subtilase LeSBT2 aus *Lycopersicon esculentum*. *Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Diplomarbeit*.
- Vera, P., & Conejero, V. (1988). Pathogenesis-Related Proteins of Tomato. *Plant Physiology*, 87, 58 - 63.
- Vick, B. A., & Zimmermann, D. C. (1984). Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology*, 75, 458 - 461.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal*, 33, 949 - 956.

- Voordouw, G., Milo, C., & Roche, R. (1976). Role of bound Calcium Ions in Thermostable, Proteolytic Enzymes. Separation of Intrinsic and Calcium Ion Contributions to the Kinetic Thermal Stability. *Biochemistry* , 15, 3716 - 3724.
- Wang, J., & Constabel, P. C. (2004). Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta* , 220, 87 - 96.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction, and Action in Plant Stress response, Growth and Development. *Oxford Journals* , 100, 681 - 697.
- Yoshinaga, N., Aboshi, T., Ishikawa, C., Fukui, M., Shimoda, M., Nishida, R., Lait C., Tumlinson J., & Mori N. (2007). Fatty acid amides, previously identified in caterpillars, found in the cricket *Teleogryllus taiwanemma* and fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Chemical Ecology* , 33, 1376 - 1381.
- Zhu- Salzman, K., Jiang-Long, B., & Tong-Xian, L. (2005). Molecular strategies of plant defense and insect counter-defense. *Insect Science* , 3 - 15.
- Zhu-Salzman, K., Dawn, S., & Felton, G. (2008). Arthropod-Inducible Proteins: Broad Spectrum Defenses against Multiple Herbivores. *Plant Physiology* , 146, 852 - 858.
- Zhu-Salzman, K., Shade, R., Koiwa, H., Salzman, R., Narasimhan, M., Bressan, I., Hasegawa P., & Murdock L. (1998). Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. *Proceedings of the National Academy of Science* , 95, 15123 - 15128.

Zitierte Internetseiten:

<http://merops.sanger.ac.uk>
<http://www.manducaproject.com>

6. Anhang

6.1 Datensätze zu *M.sexta*- Larvenentwicklung

6.1.1 Larvenentwicklung Vorversuch

Tab. 6.1.1.1 Durchschnittsgewichte der *M.sexta*-Larven im Vorversuch

	7 Tage	14 Tage	17 Tage
UC82b	0.2990	0.2022	0.2647
HP 21-7	0.4119	0.1468	0.9993
G2f1D	0.2417	0.07529	0.5125

Tab. 6.1.1.2 Entwicklungen der Larvenzahlen im Vorversuch:

	7 Tage	14 Tage	17 Tage
UC82b	Je 10 gewogen	15	11
HP 21-7	Je 10 gewogen	19	15
G2f1D	Je 10 gewogen	30	22

6.1.2 ‚Larvenentwicklung 1‘

Tab. 6.1.2.1 Durchschnittsgewichte der *M.sexta*-Larven in der ‚Larvenentwicklung 1‘:

	4 Tage	7 Tage	13 Tage	19 Tage	23 Tage	26 Tage
UC82b	0,0777	0,0309	0,1948	1,184	2,3138	4,382
HP 21-7	0,1601	0,0375	0,2478	1,462	4,5455	6,24
G19G1	0,0573	0,0305	0,1394	0,853	1,8175	3,305

Tab. 6.1.2.2 Entwicklung der Larvenzahlen in der ‚Larvenentwicklung 1‘:

Raupenzahl	4 Tage	7 Tage	13 Tage	19 Tage	23 Tage	26 Tage
UC82b	70	39	31	31	-	29
HP 21-7	70	29	24	23	-	21
G19G1	70	29	24	18	-	16

Tab. 6.1.2.3 Gewichte der *M.sexta*-Larven in ‚Larvenentwicklung 1‘:

19 Tage			26 Tage		
wt	HP 21-7	G19	wt	HP 21-7	G19
0,43	0,37	0,11	1,44	1,28	0,81
0,56	0,48	0,16	1,57	1,51	0,93
0,57	0,58	0,35	1,9	2,86	1,33
0,6	0,62	0,44	2,02	2,86	1,37
0,66	0,85	0,45	2,12	3,39	1,61
0,7	0,92	0,47	2,24	3,94	1,99
0,85	1,1	0,56	2,76	4,43	2,04
0,97	1,16	0,62	2,77	5,14	2,34
1,02	1,18	0,74	2,96	5,2	2,69
1,13	1,24	0,79	3,17	6,26	3,11
1,14	1,27	0,97	3,56	6,35	3,52
1,16	1,39	1,1	3,57	6,51	4,47
1,18	1,4	1,17	3,78	6,99	6,04
1,19	1,48	1,2	3,78	7,45	6,08
1,21	1,51	1,31	3,85	7,48	6,82
1,24	1,54	1,41	4,07	8,38	7,73
1,25	1,6	1,69	4,63	8,86	
1,27	1,71	1,82	4,79	8,9	
1,28	1,79		4,83	10,99	
1,29	1,8		5,03	11,07	
1,31	1,83		5,37	11,19	
1,32	1,96		5,43		
1,32	5,85		5,49		
1,38			6,52		
1,43			6,81		
1,45			7,11		
1,5			7,31		
1,54			8,01		
1,55			10,2		
1,77					
2,44					

6.1.3 ‚Larvenentwicklung 2‘**Tab. 6.1.3.1** Durchschnittsgewichte der *M.sexta*-Larven in der ‚Larvenentwicklung 2‘:

Tage	7Tage	14 Tage	19 Tage
UC82b	0,0422	0,616	2,151
HP 21-7	0,0409	1,055	3,233
G2f1D	0,0394	0,702	2,143

Tab. 6.1.3.2 Entwicklung der Larvenzahlen in der ‚Larvenentwicklung 2‘

Raupenzahl	7 Tage	14 Tage	19 Tage
wt	49	36	26
HP	49	22	17
OE	46	24	17

Tab. 6.1.3.3 Gewichte der *M. sexta*-Larven in der ‚Larvenentwicklung 2‘

7 Tage			14 Tage			19 Tage		
UC82b	HP 21 -7	G2f1D	UC82b	HP 21-7	G2f1D	UC82b	HP 21-7	G2f1D
0,0188	0,0121	0,0151	0,0883	0,3222	0,0947	1,1184	1,0866	0,7268
0,0196	0,0128	0,017	0,1623	0,3658	0,2558	1,1297	1,3367	0,8483
0,0224	0,0166	0,0183	0,1867	0,4432	0,347	1,1574	1,5022	1,1052
0,0238	0,0166	0,0188	0,1937	0,4988	0,3893	1,1785	1,679	1,1887
0,0251	0,0178	0,0199	0,1993	0,621	0,3985	1,1859	2,5949	1,2451
0,0266	0,0214	0,0221	0,2249	0,7966	0,4185	1,2275	2,7154	1,3461
0,027	0,0247	0,023	0,2322	0,8432	0,4709	1,2931	2,7175	1,3465
0,0275	0,025	0,0245	0,2777	0,8614	0,4901	1,2957	2,9097	1,3781
0,0282	0,0288	0,0251	0,2821	1,0457	0,507	1,3301	2,9399	1,9224
0,0296	0,0291	0,0254	0,2866	1,1112	0,5246	1,3506	3,1692	2,0028
0,0297	0,0297	0,0268	0,2928	1,1215	0,5455	1,4512	3,442	2,2803
0,0303	0,0302	0,0275	0,2963	1,1382	0,641	1,4896	3,6118	2,68
0,0303	0,0308	0,0291	0,3187	1,183	0,6607	1,5073	3,9408	2,6918
0,0305	0,031	0,0298	0,3674	1,226	0,6863	1,5622	3,9426	3,1296
0,0305	0,0311	0,0303	0,3765	1,24	0,757	1,7796	4,4381	3,4997
0,0314	0,0318	0,0308	0,4119	1,4169	0,8046	1,9193	4,7221	4,054
0,0317	0,0332	0,0327	0,4545	1,4389	0,9347	1,974	8,2042	4,9896
0,0321	0,0335	0,0333	0,554343	1,4415	0,9962	2,146		
0,0342	0,0339	0,0345	0,5761	1,4503	1,0213	2,2116		
0,0346	0,0341	0,0347	0,578	1,5005	1,0238	2,53		
0,0347	0,035	0,0359	0,5834	1,5598	1,0335	2,8255		
0,0348	0,0354	0,0361	0,6492	1,5947	1,1493	3,0702		
0,0348	0,0355	0,0364	0,7025		1,1802	3,8056		
0,0351	0,0362	0,038	0,7599		1,5108	3,8706		
0,0352	0,037	0,0388	0,7655			5,1296		
0,0355	0,0375	0,0391	0,7673			6,4019		
0,0355	0,0392	0,0392	0,8687					
0,036	0,0394	0,0393	0,9607					
0,0365	0,0411	0,0403	0,9783					
0,0365	0,0412	0,0404	1,0839					
0,0372	0,0413	0,0408	1,1176					
0,0372	0,0418	0,0412	1,1234					
0,0376	0,0418	0,0414	1,1899					
0,0381	0,0423	0,0419	1,2714					
0,0382	0,0432	0,0432	1,4809					
0,0385	0,0446	0,0436	1,5005					
0,0388	0,0456	0,0442						
0,0405	0,0506	0,0442						
0,0413	0,053	0,0443						
0,0428	0,0535	0,0458						
0,0445	0,0559	0,0473						
0,045	0,061	0,0494						
0,0455	0,0644	0,0511						
0,0482	0,0666	0,0554						
0,0513	0,0699	0,0637						
0,0526	0,0712	0,378						
0,058	0,0714							
0,0779	0,0866							
0,391	0,1062							

6.2 Verwendeter Proteinmarker

Prestained Protein Ladder, Fermentas, St.Leon Roth

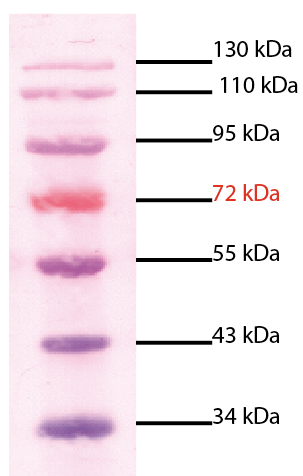


Abb. 6.1 Verwendeter Größenstandart für Western-Blots und Coomassie-Gele mit angegebener Bandengröße in kDa

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	(+)-7-iso-Jasmonsäure	3
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Systemin vermittelten Abwehr über den Oktadecanoidweg bis hin zur Expression von Abwehrgenen	5
Abb. 1.3	Subtilasefamilien innerhalb der Gruppe der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen	11
Abb. 1.4	Phylogenetischer Baum der Subtilase-Familie in Tomatenpflanzen	12
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des Aufbaus des S/SBT3-Proteins aus verschiedenen Domänen	14
Abb. 1.6	Die Struktur der S/SBT3 enthält keine gebundenen Ca^{2+} -Ionen	15
Abb.2.1	Entfernung des Mitteldarms einer <i>M.sexta</i> -Larven im 5. Larvenstadium	22
Abb. 3.1	S/SBT3-Promotoraktivität 8, 16, 24, und 48 Stunden nach <i>M.sexta</i> -Verwundung	41
Abb. 3.2.1	Expressionsniveau der S/SBT3 in genetisch verschiedenen Tomaten-Linien	44
Abb. 3.2.2	Durchschnittliches Gewicht der auf S/SBT3- wildtyp-, -RNAi- und -OE-Pflanzen gewachsenen <i>M.sexta</i> -Larven im Vorversuch	45
Abb. 3.2.3	Durchschnittliches Gewicht der auf S/SBT3- wildtyp-, -RNAi- und -OE- Pflanzen gewachsenen <i>M.sexta</i> -Larven in ‚Larvenentwicklung 1‘	47
Abb. 3.2.4	Durchschnittliches Gewicht der auf S/SBT3- wildtyp-, -RNAi- und OE -Pflanzen gewachsenen <i>M.sexta</i> Larven in ‚Larvenentwicklung 2‘	48
Abb. 3.3.1	S/SBT3 in Kot und Darm von <i>M.sexta</i>	50
Abb. 3.4.1	Aktivitätsmessung von S/SBT3 aus dem Kot von <i>M.sexta</i> -Larven mittels eines fluorogenen Systemin- Peptids	52
Abb. 3.4.2	Zymographie von <i>M.sexta</i> -Kotproben mit Gelatine als Substrat	54
Abb. 3.5.1	2D- Gelelektrophorese fluoreszenzmarkierter Proteinextrakte aus <i>M.sexta</i> -Kot	56
Abb. 3.5.2	2D- Gelelektrophorese fluoreszenzmarkierter Proteinextrakte aus <i>M.sexta</i> -Darm	58
Abb. 3.6.1	Abgleich der Basensequenzen 1485 – 1499 vom Startcodon der S/SBT3-cDNA vor (obere Sequenz) und nach der Mutagenese (untere Sequenz).	61
Abb. 3.6.2	Schematische Darstellung der für die Klonierung wichtigen Vektorbereiche	62
Abb. 3.6.3	Western-Blot zur Proteinstabilität der S/SBT3 im <i>M.sexta</i> -Verdauungstrakt nach Tabakinfiltration	64
Abb. 3.6.4	Western-Blot zur Proteinstabilität von S/SBT3-K498A im	

	Verdauungstrakt von <i>M.sexta</i> nach Tabakinfiltration	65
Abb. 3.6.5	Western-Blot zur Proteinstabilität von <i>S/</i> SBT3-K498E im Verdauungstrakt von <i>M.sexta</i> nach Tabakinfiltration	66
Abb. 3.6.6	Detektion der <i>S/</i> SBT3 in Sym- und Apoplasten infiltrierter Tabakblätter	68
Abb. 3.7.2	Proteine im Apoplasten von Tabakpflanzen nach Agrobakterien-Infiltration	69
Abb. 3.6.8	Western-Blot von apoplastischen Proteinen Agrobakterien-infiltrierter Tabakpflanzen	69
Abb. 3.8.1	Aktivität apoplastischer Proteine gegen Systemin nach Tabakinfiltration	71
Abb. 6.1	Verwendeter Größenstandart für Western-Blots und Coomassie-Gele mit angegebener Bandengröße in kDa	95

6.4 Tabellenverzeichnis

Tab.1	Eine Auswahl pflanzlicher Abwehrproteinen mit potentieller oder erwiesener Funktion im Insektendarm und ihre Wirkungsweise	9
Tab. 2.1	Primersequenzen für <i>S/</i> SBT3-K498A und -K498E Mutagenese	18
Tab. 2.2	Primersequenzen für die Sequenzierung von <i>S/</i> SBT3	19
Tab. 3.1	Steigungen der Trendlinien aus Abb. 3.4.1 im Zeitintervall von 2 – 13 Minuten	53
Tab. 3.2	Gemittelte Steigungen der Trendlinien in Abb. 3.8.1	72
Tab. 6.1.1.1	Durchschnittsgewichte der <i>M.sexta</i> -Larven im Vorversuch	92
Tab. 6.1.1.2	Entwicklungen der Larvenzahlen im Vorversuch	92
Tab. 6.1.2.1	Durchschnittsgewichte der <i>M.sexta</i> -Larven in der ‚Larvenentwicklung 1‘	92
Tab. 6.1.2.2	Entwicklungen der Larvenzahlen in der ‚Larvenentwicklung 1‘	92
Tab. 6.1.2.3	Gewichte der <i>M.sexta</i> -Larven in der ‚Larvenentwicklung 1‘	93
Tab. 6.1.3.1	Durchschnittsgewichte der <i>M.sexta</i> -Larven in der ‚Larvenentwicklung 2‘	93
Tab. 6.1.3.2	Entwicklungen der Larvenzahlen in der ‚Larvenentwicklung 2‘	93
Tab. 6.1.3.3	Gewichte der <i>M.sexta</i> -Larven in der ‚Larvenentwicklung 2‘	94

6.5 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Abz	o-aminobenzoyl
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine-Serum-Albumin
CaMV	Cauliflower Mosaik Virus
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
COI	Coronatin insensitive
D	Asparaginsäure
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIGE	Differential in Gel Elektrophoresis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
E	Glutaminsäure
ECI	Enhanced Chemo Luminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
Et al.	und andere
EtOh	Ethanol
Fn III-Domäne	Fibronectin- Domäne
for	Foreward
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GUS	β-Glucuronidase
H	Histidin

HP	Hairpin
IgG	Immunoglobulin G
Ile	Isoleucin
JA	Jasmonsäure
JAR 1	Jasmonic- Acid- Resistant 1
K	Lysin
kb	kilobase
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	lysogeny broth (Medium)
LB	Left Border (DNA Sequenz)
LRR	Leucin- Rich- Repeat
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
M	Molar
mcs	multiple- cloning- site
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
nptII	Neomycin- Phosphotransferase II
NTP	Nukleotid-Triphosphat
ocs	octopin-synthase
OE	Over Expression
PA-Domäne	Protein assoziierte Domäne
PAM	Accepted point mutations per 100 residues
PCR	Polymerase Chain Reaction
PK	Prohormon- Konvertase
PSK	Phytosulfokine
RB	Right Border
rev	Reverse
RNAi	RNA- Intefferenz
RNAse	Ribonuklease

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase Chain Reaction
Rubisco	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase
s	Sekunde
S	Serin
SBP50	Systemin-Bindendes-Protein 50
SCF	Skp1p- cullin- F-box protein
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>Sl</i>	<i>Solanum lycopersum</i>
SR160	Systemin-Rezeptor 160
T ₁ /T ₂	Tochergenerationen
TAE	Triacetat EDTA
TBS	Tris- buffered-Saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TD	Threonin- Deaminase
TMV	Tomaten Mosaik Virus
TNP	Trinatriumphosphat
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Units
Uid A	Gen für die β -Glucuronidase
VOCs	Volatile Organic Compounds
v/v	Volumenprozent
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-Indolylglucuronid

Danksagung

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Andreas Schaller, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seinem Institut meine Diplomarbeit anzufertigen und mir für meine ersten wissenschaftlichen Schritte solch ein interessantes Thema überließ.

Außerdem danke ich ganz herzlich Frau Dr. Annick Stintzi für die Geduld, sich mit mir und meinen beizeiten nervigen Fragen jederzeit zu beschäftigen, sowie die freundliche und konstruktive Art der Betreuung während dieser teilweise stressigen Lebensphase.

Als dritten im Bunde möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Arthur Pfitzner für die Übernahme meiner Zweitkorrektur bedanken.

Ich bin kein Freund großer Worte und werde an dieser Stelle keine Liste erstellen, in der sich Menschen unerwähnt oder über einen Haufen gekehrt fühlen müssen. Ich glaube, dass die Menschen, denen ich im Zuge dieser Arbeit und dem Prozess meiner Menschwerdung dankbar bin, dieses auch wissen. Danke!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, diese Arbeit selbstständig angefertigt und alle wörtlich sowie sinnlich entledigten Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner weiteren Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Hohenheim 2009)