

**Franziska Huttenlocher**

**Biochemische und funktionelle  
Charakterisierung der Subtilase *S*/SBT3  
aus *Solanum lycopersicum* L.**

**Dissertation 2008**



**Cuvillier Verlag Göttingen**  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Aus dem  
Institut für Pflanzenernährung  
Universität Hohenheim  
Prof. Dr. Nicolaus von Wirén

und dem

Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen  
Universität Hohenheim  
Prof. Dr. Andreas Schaller

**Biochemische und funktionelle  
Charakterisierung der Subtilase *S*SBT3 aus  
*Solanum lycopersicum* L.**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Agrarwissenschaften

vorgelegt  
der Fakultät Agrarwissenschaften

von  
Franziska Huttenlocher  
aus Stuttgart

2008

## **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2008

Zugl.: Hohenheim, Univ., Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen,  
Diss., 2008, D100

978-3-86727-827-0

Die vorliegende Arbeit wurde am 10.11.2008 von der  
Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim  
als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“  
angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2008

1. Prodekan: Prof. Dr. W. Bessei

1. Prüfer und Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schaller

2. Prüfer und Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. von Wirén

3. Prüfer: Prof. Dr. G. Weber

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2008

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist  
es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg  
(Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2008

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-827-0

FÜR MEINE ELTERN



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>IV</b>
<b>Summary</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>X</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung.....	9
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1 Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide, Antikörper und Kits .....	10
2.2 Protease Spot-Test und Peptide.....	11
2.3 Verbrauchsmaterial .....	11
2.4 Biologisches Material.....	11
2.4.1 Zellkultur.....	11
2.4.2 Tomatenpflanzen.....	12
2.4.3 <i>Manduca sexta</i> .....	13
2.5 Anzucht des biologischen Materials .....	13
2.5.1 Zellkultur.....	13
2.5.2 Tomatenpflanzen.....	13
2.5.3 <i>Manduca sexta</i> .....	15
2.6 Methoden zur Proteinaufreinigung von <i>SSBT3</i> .....	15
2.6.1 Zellkulturente .....	15
2.6.2 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Präzipitation.....	15
2.6.3 Dialyse.....	16
2.6.4 Kationen-Austauschchromatographie im Batch-Verfahren.....	16
2.6.5 Anionen-Austauschchromatographie .....	16
2.7 Enzymaktivitätstests .....	17
2.7.1 Test mit fluorogenem Systemin-Peptid .....	17
2.7.2 MALDI-TOF-MS.....	17
2.7.3 Protease Spot-Test .....	18
2.8 Test auf Glykosylierung bzw. Phosphorylierung von <i>SSBT3</i> .....	19
2.9 Proteinanalytische Methoden .....	19
2.9.1 Proteinextraktion .....	19
2.9.1.1 Gesamt-Proteinextraktion .....	19

2.9.1.2	Proteinextraktion aus Kot von <i>Manduca sexta</i> -Larven.....	20
2.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	20
2.9.3	Western Blot-Analyse.....	20
2.9.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	20
2.9.3.2	Proteindetektion mittels Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung.....	20
2.9.3.3	Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen .....	21
2.9.3.4	Immunodetektion mit Hilfe des <i>SSBT3</i> -Antiserums.....	21
2.10	Molekularbiologische Methoden .....	22
2.10.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	22
2.10.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Prep) .....	22
2.10.1.2	Isolierung von genomischer DNA (CTAB-Methode).....	22
2.10.1.3	Isolierung von RNA.....	22
2.10.2	Gelelektrophorese.....	23
2.10.3	Auswahl transgener Linien auf Selektionsmedium .....	23
2.10.4	RT-PCR .....	23
2.10.5	Southern Blot-Analyse.....	24
2.10.5.1	Restriktionsverdau von genomischer DNA.....	24
2.10.5.2	Auftrennung der DNA-Fragmente und Transfer auf Nitrocellulose-Membranen.....	24
2.10.6	Northern Blot-Analyse .....	25
2.10.6.1	Auftrennung der RNA und Transfer auf Nitrocellulose- Membranen.....	25
2.10.7	Sonderherstellung und Hybridisierung .....	26
2.10.8	Strippen von Blots.....	26
2.11	Histochemischer GUS-Test.....	27
2.12	Dünnschnitte GUS-gefärbter Hypocotyle.....	27
2.13	Messung der Proteinaseinhibitoraktivität.....	27
2.14	Behandlung von Wildtyp-Tomatenpflanzen .....	28
2.14.1	Fusicoccin- und Salicylsäurebehandlung .....	28
2.14.2	Infektionsversuche mit <i>P. syringae</i> und <i>X. campestris</i> .....	28
2.14.3	Mechanische Verwundung .....	29
2.14.4	Verwundung durch <i>Manduca sexta</i> -Larven .....	29
2.15	Experimente mit <i>Manduca sexta</i> .....	30
2.15.1	Larvenentwicklung.....	30
2.15.2	"Choice"-Test .....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1	Biochemische Charakterisierung von <i>SSBT3</i> .....	32

3.1.1	Aufreinigung von <i>S</i> SBT3 .....	32
3.1.2	Kristallstruktur von <i>S</i> SBT3 .....	36
3.1.3	Bestimmung des Molekulargewichts von <i>S</i> SBT3 .....	37
3.1.4	Untersuchung der Phosphorylierung bzw. Glycosylierung von <i>S</i> SBT3 .....	38
3.1.5	pH-Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von <i>S</i> SBT3 .....	39
3.1.6	Temperaturstabilität von <i>S</i> SBT3 .....	40
3.1.7	Effekt verschiedener Proteaseinhibitoren und Zusätze auf die proteolytische Aktivität von <i>S</i> SBT3 .....	41
3.1.8	Effekt der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit von <i>S</i> SBT3 .....	43
3.1.9	Substratspezifität von <i>S</i> SBT3 .....	44
3.2	Expression von <i>S</i> SBT3 in Tomatenpflanzen .....	51
3.2.1	Reportergenanalyse der <i>S</i> SBT3-Expression .....	51
3.2.2	RT-PCR Analyse der Expression von <i>S</i> SBT3 .....	54
3.2.3	Expression von <i>S</i> SBT3 in Reaktion auf verschiedene Stimuli .....	56
3.2.3.1	Expression von <i>S</i> SBT3 nach Behandlung mit Fusicoccin .....	56
3.2.3.2	Expression von <i>S</i> SBT3 nach Behandlung Salicylsäure .....	58
3.2.3.3	Expression von <i>S</i> SBT3 nach Infektion mit <i>P. syringae</i> und <i>X. campestris</i> .....	59
3.2.3.4	Expression von <i>S</i> SBT3 nach mechanischer Verwundung .....	60
3.2.3.5	Expression von <i>S</i> SBT3 nach Verwundung durch <i>M. sexta</i> -Larven ...	60
3.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>S</i> SBT3-RNAi und -ÜE-pflanzen .....	62
3.3.1	Identifizierung unabhängiger Transformanten mittels Southern Blot-Analyse .....	62
3.3.2	Northern Blot-Analyse der Expression von <i>S</i> SBT3 in RNAi- und ÜE-Linien .....	63
3.3.3	Western Blot-Analyse der Expression von <i>S</i> SBT3 in RNAi- und ÜE-Linien .....	64
3.3.4	Induktion der Proteinaseinhibitor-Aktivität in Wt-, <i>S</i> SBT3-RNAi- und ÜE-Pflanzen nach Verwundung .....	66
3.3.5	Einfluss von <i>S</i> SBT3-RNAi-, -ÜE- und Wt-Pflanzen auf <i>M. sexta</i> -Larven .....	68
3.3.5.1	Larven- und Puppengewichte .....	68
3.3.5.2	Verbleiben der Larven auf den Pflanzen .....	69
3.3.5.3	"Choice"-Test .....	70
3.3.6	Stabilität von <i>S</i> SBT3 in Kot von <i>M. sexta</i> -Larven .....	71
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>102</b>

## Zusammenfassung

Subtilasen gehören zu der Familie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen und sind sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Organismen weit verbreitet. Im Tierreich steuern Subtilasen als Proprotein-Konvertasen wichtige physiologische Prozesse wie z.B. die Reifung von Peptidhormonen, Wachstumsfaktoren und Rezeptorproteinen. Die Rolle der den Proprotein-Konvertasen ähnlichen Subtilasen in Pflanzen ist erst in wenigen Fällen für einzelne Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Ihre Funktion in Tomatenpflanzen ist noch völlig ungeklärt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass Subtilasen in Tomatenpflanzen eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Wundantwort und Pathogenabwehr spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der Subtilase *SSBT3* aus Tomatenpflanzen mittels Aufreinigung und biochemischer Charakterisierung des rekombinanten Proteins, detaillierter Expressionsstudien in Tomatenpflanzen, sowie phänotypischer Analyse transgener Pflanzen mit veränderter Expression von *SSBT3* (*SSBT3*-RNAi- und *SSBT3*-Überexpressionspflanzen).

Die Subtilase wurde mittels fraktionierter Ammoniumsulfat-Fällung, Kationen-Austauschchromatographie im Batch-Verfahren und Anionen-Austauschchromatographie aus einer *SSBT3*-überexprimierenden Tomatenzellsuspensionskultur bis zur Homogenität gereinigt. Basierend auf der erfolgreichen Aufreinigung des Proteins aus einem homologen System konnte *SSBT3* am Chemical Genomics Centre (Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund) kristallisiert und strukturell analysiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte damit erstmalig die Kristallstruktur einer pflanzlichen Subtilase vorgelegt werden.

Die biochemischen Daten zeigen, dass *SSBT3* ungewöhnlich stabil und bei Temperaturen bis 60 °C vollständig aktiv ist. Bei pH 11 wies das Enzym immer noch über 60 % seiner proteolytischen Aktivität auf. Die aufgereinigte Subtilase war in der Lage *in vitro* das Systemin-Peptid, ein wichtiges Signalmolekül der Wundantwort in Tomatenpflanzen, an einer einzigen Stelle, C-terminal der Aminosäure Gln<sup>16</sup> zu spalten und dadurch zu inaktivieren. Detaillierte Untersuchungen zur Substratspezifität des Enzyms bestätigten die Präferenz der rekombinanten *SSBT3* für Glutamin in der P<sub>1</sub>-Position, sowie für basische Aminosäuren in den Positionen P<sub>2</sub> und P<sub>1</sub>' ihrer Substrate. Die eingeschränkte Substratspezifität von *SSBT3* legte nahe, dass dieses Enzym an selektiver Proteinprozessierung bzw. limitierter Proteolyse beteiligt ist und auf diese Weise spezifische Aufgaben in physiologischen Prozessen in der Pflanze erfüllt.

Die Expression von *SSBT3* konnte in allen untersuchten Organen vor allem im vaskulären Gewebe gezeigt werden. Detaillierte Analysen wiesen eine *SSBT3*-Expression in Xylemparenchym- und Phloemzellen nach, wo auch das Vorläuferprotein von Systemin exprimiert wird. Die Expression von *SSBT3* wurde durch mechanische Verwundung sowie durch Fraß von *Manduca sexta*-Larven

induziert. Diese Befunde, nämlich die Induzierbarkeit der *SSBT3* Expression durch Verwundung, die Co-lokalisierung von *SSBT3* und Prosystemin und die *in vitro* gezeigte Inaktivierung von Systemin durch *SSBT3*, deuteten auf eine mögliche Beteiligung der Subtilase an der Regulation der Wundantwort in Tomatenpflanzen hin. Diese Annahme konnte jedoch durch einen Vergleich der Aktivität wundinduzierter Proteinaseinhibitoren als Markerproteine der Insektenabwehr in *SSBT3*-RNAi-, *SSBT3*-Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen nicht bestätigt werden.

Anhand der Entwicklung von *Manduca sexta*-Larven auf *SSBT3*-RNAi-, *SSBT3*-Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen wurde eine mögliche Beteiligung von *SSBT3* an Abwehrreaktionen von Tomatenpflanzen im Hinblick auf eine Veränderung in der Resistenz der Pflanzen untersucht. Die Überexpression von *SSBT3* reduzierte die Verweildauer von *Manduca sexta*-Larven auf den Futterpflanzen. Darüber hinaus konnte im hoch alkalischen Milieu des Darmes von *Manduca sexta*-Larven, welche auf *SSBT3*-Überexpressionspflanzen gefressen hatten, intakte *SSBT3* nachgewiesen werden. Diese beiden Ergebnisse in Verbindung mit dem alkalischen pH-Optimum der Subtilase sind deutliche Hinweise darauf, dass *SSBT3* im Verdauungstrakt von Insekten wirksam ist und somit eine Rolle bei der pflanzlichen Abwehr gegenüber Herbivoren spielen könnte.

Die erzielten Ergebnisse bilden die Grundlage zur noch ausstehenden vollständigen Aufklärung der Funktion der Subtilase *SSBT3* bei der Abwehrreaktion von Tomatenpflanzen gegenüber Herbivoren. Die gewonnenen Erkenntnisse aus der Analyse der Kristallstruktur von *SSBT3* werden darüber hinaus auch für die Erforschung anderer pflanzlicher Subtilasen und ihrer physiologischen Rolle von entscheidender Bedeutung sein.

## Summary

Subtilases belong to the family of subtilisin-like serine proteases and are widely distributed in prokaryotic as well as eukaryotic organisms. Mammalian subtilases function as proprotein convertases in the formation of peptide hormones, growth factors, and receptor proteins and regulate important physiological processes. Little is known about the function of the related plant subtilases, except for a few enzymes in *Arabidopsis thaliana*. Their function in tomato plants is still unresolved. However, preliminary data suggest that subtilases may play essential roles in the regulation of the wound response and pathogen defense in tomato plants.

The present study was aimed at the elucidation of the function of the tomato subtilase *SSBT3* by purification and biochemical characterization of the recombinant protein, detailed expression analysis in tomato plants, as well as the phenotypical analysis of transgenic plants with altered expression levels for *SSBT3* (*SSBT3*-RNAi and *SSBT3*-overexpressing plants).

The subtilase was purified to homogeneity from a *SSBT3*-overexpressing tomato cell suspension culture using fractionated ammonium sulfate precipitation, cation exchange chromatography in a batch procedure, and anion exchange chromatography.

Based on the successful purification of the protein from a homologous expression system, *SSBT3* was crystallized and its structure analyzed at the Chemical Genomics Centre (Max-Planck-Institute for Molecular Physiology, Dortmund) resulting in the first crystal structure of a plant subtilase presented within the frame of the present study.

Biochemical data showed that *SSBT3* is a very stable protease, being fully active at 60 °C and retaining 60 % of its activity at pH 11. The purified subtilase was found to cleave the peptide systemin, an important signal molecule of the wound response in tomato plants, at a single site C-terminal of Gln<sup>16</sup> *in vitro*. This cleavage resulted in the inactivation of systemin. In-depth analysis of *SSBT3* substrate specificity confirmed the preference of the recombinant enzyme for glutamine in the P<sub>1</sub>-position, as well as for basic residues in the P<sub>2</sub> and P<sub>1</sub>' positions of its substrates. The narrow substrate specificity of *SSBT3* is consistent with a role in limited proteolysis and selective protein processing rather than general protein turnover, and suggests a function for *SSBT3* in specific physiological processes *in planta*.

*SSBT3* was found to be expressed in all tested organs particularly in the vasculature. Detailed analysis revealed *SSBT3*-expression in xylem parenchyma and phloem cells, where the precursor protein of systemin is expressed as well. Expression of *SSBT3* was induced by mechanical wounding as well as feeding of *Manduca sexta* larvae. These findings, namely the inducibility of *SSBT3*-expression by wounding, the co-localization of *SSBT3* and prosystemin *in vivo*, and the inactivation of systemin by *SSBT3* *in vitro*, collectively suggest a possible involvement of the subtilase in the regulation of the defense response of tomato plants. However, this assumption

was not supported by experiments comparing the activity of wound inducible proteinase inhibitors as marker proteins of herbivore defense in *SSBT3*-RNAi, *SSBT3*-overexpressing and wild-type plants.

While monitoring the development of *Manduca sexta* larvae on *SSBT3*-RNAi, *SSBT3*-overexpressing and wild-type plants a possible involvement of *SSBT3* in the defense response of tomato plants was investigated with regard to altered plant resistance.

Overexpression of *SSBT3* decreased the time period *Manduca sexta* larvae fed on the host plants. Furthermore, stable *SSBT3* could be detected in the highly alkaline environment of the midgut of *Manduca sexta* larvae fed on *SSBT3*-overexpressing plants. These two results together with the alkaline pH optimum of the subtilase indicate that *SSBT3* is active in the insect digestive tract and may thus play a role in the plant's defense against herbivores.

The results of the present study provide a basis for a more complete understanding of the function of *SSBT3* in herbivore defense of tomato plants. Findings obtained from the analysis of the crystal structure of *SSBT3* will also be crucial for the investigation of other plant subtilases and their physiological roles.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Klassifizierung der Subtilasen.....	2
Abb. 1.2	Phylogenetischer Baum der Subtilasefamilie in Tomate ( <i>S. lycopersicum</i> ).....	8
Abb. 2.1	Prinzip des Protease Spot-Tests .....	18
Abb. 2.2	Versuchsaufbau für das Verwundungs-Experiment mit <i>M. sexta</i> -Raupen.....	29
Abb. 2.3	Versuchsaufbau für das Larvenentwicklungs-Experiment 1 im Gewächshaus.....	30
Abb. 2.4	Versuchsaufbau für das Larvenentwicklungs-Experiment 2 im Gewächshaus.....	30
Abb. 2.5	Versuchsaufbau für den "Choice"-Test.....	31
Abb. 3.1.1	SDS-PAGE und Western Blot-Analyse des Batch-Verfahrens zur Vorreinigung von <i>SSBT3</i> .....	33
Abb. 3.1.2	Elutionsprofil von <i>SSBT3</i> - Chromatogramm der Anionen-Austauscher-Säule .....	34
Abb. 3.1.3	Aufreinigung von <i>SSBT3</i> aus dem Zellkulturüberstand von transgenen <i>S. peruvianum</i> -Zellen.....	35
Abb. 3.1.4	Schematische Darstellung der einzelnen Schritte des Aufreinigungsprotokolls für <i>SSBT3</i> .....	35
Abb. 3.1.5	Kristallstruktur von <i>SSBT3</i> . .....	36
Abb. 3.1.6	Molekulargewicht von <i>SSBT3</i> im Vergleich zu Proteinmarkern bekannter Größe .....	37
Abb. 3.1.7	Test von <i>SSBT3</i> auf Dephosphorylierung bzw. Deglykosylierung.....	38
Abb. 3.1.8	pH-Optimum von <i>SSBT3</i> .....	39
Abb. 3.1.9	Temperaturstabilität von <i>SSBT3</i> . .....	40
Abb. 3.1.10	Effekt verschiedener Proteinaseinhibitoren auf die Aktivität von <i>SSBT3</i> .....	41
Abb. 3.1.11	Effekt verschiedener Zusätze auf die Aktivität von <i>SSBT3</i> .....	42
Abb. 3.1.12	Einfluss der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit von <i>SSBT3</i> .....	43
Abb. 3.1.13	Bedeutung der Aminosäure in Position P <sub>1</sub> des Substrats für die Präferenz von <i>SSBT3</i> . .....	44
Abb. 3.1.14	MALDI-TOF-Analyse der Systeminspaltung mit rekombinantem <i>SSBT3</i> .....	45
Abb. 3.1.15	Zeitverlauf der Spaltung zweier Alanin-substituierter Systemin-Analoga .....	46
Abb. 3.1.16	Ergebnisse des Protease Spot-Tests .....	47
Abb. 3.1.17	Effekt der Substratkonzentration von Peptid 1 - 4 auf die Reaktionsgeschwindigkeit von <i>SSBT3</i> .....	49
Abb. 3.2.1	Histochemische Lokalisation der <i>SSBT3</i> Promotor-Aktivität in keimenden Samen, Keimlingen und verschiedenen Organen von <i>S. lycopersicum</i> .....	52
Abb. 3.2.2	Histochemische Lokalisation der <i>SSBT3</i> -Promotor-Aktivität im Hypokotyl einer X-Gluc-gefärbten Pflanze.....	53
Abb. 3.2.3	Spezifität der <i>SSBT3</i> -Primer. ....	54
Abb. 3.2.4	RT-PCR Analyse der <i>SSBT3</i> -Expression während der Samenquellung und -keimung sowie in Tomatenkeimlingen.....	55

Abb. 3.2.5	RT-PCR Analyse der <i>SISBT3</i> -Expression in verschiedenen Organen von <i>S. lycopersicum</i> .....	56
Abb. 3.2.6	<i>SISBT3</i> -Expression in Wt-Pflanzen nach Fusicoccin-Behandlung.....	57
Abb. 3.2.7	<i>SISBT3</i> Expression in Wt-Pflanzen nach Salicylsäure-Behandlung.....	58
Abb. 3.2.8	<i>SISBT3</i> -Expression in Wt-Pflanzen nach Behandlung mit <i>P. syringae</i> und <i>X. campestris</i> .....	59
Abb. 3.2.9	<i>SISBT3</i> -Expression in Wt-Pflanzen nach mechanischer Verwundung und Verwundung durch <i>M. sexta</i> -Larven .....	61
Abb. 3.3.1	Southern Blot-Analyse der <i>SISBT3</i> -Expression in RNAi- und Überexpressions-Linien ....	63
Abb. 3.3.2	Northern Blot-Analyse der <i>SISBT3</i> -Expression in RNAi- und Überexpressions-Linien ....	64
Abb. 3.3.3	Western Blot-Analyse der <i>SISBT3</i> -Expression in RNAi und Überexpressions-Linien .....	65
Abb. 3.3.4	Chymotrypsin-Aktivität in Wt-, RNAi- and Überexpressionspflanzen nach Verwundung.....	66
Abb. 3.3.5	Northern Blot-Analyse der Proteinase-Inhibitor-II-Expression in Wt-, RNAi- und Überexpressionspflanzen nach Verwundung mit <i>M. sexta</i> .....	67
Abb. 3.3.6	Einfluss von RNAi- und Überexpressionspflanzen auf <i>M. sexta</i> Larven- und Puppengewichte.....	68
Abb. 3.3.7	Verbleiben von <i>M. sexta</i> -Larven auf Wt-, RNAi- und Überexpressionspflanzen .....	69
Abb. 3.3.8	Futter-Präferenz von <i>M. sexta</i> -Larven für Wt-, RNAi- und Überexpressionspflanzen ....	70
Abb. 3.3.9	Stabilität von <i>SISBT3</i> in Kot von <i>M. sexta</i> -Larven .....	71
Abb. 6.1	Southern Blot-Analyse der <i>SISBT3</i> -Promotor:: <i>GUS</i> -Linien .....	104

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.....	10
Tab. 2.2	Aminosäuresequenzen der fluorogenen Peptide.....	11
Tab. 2.3	Alter und Wachstumsbedingungen der Tomatenpflanzen in den verschiedenen Experimenten .....	14
Tab. 2.4	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme .....	24
Tab. 3.1.1	Kinetische Parameter von <i>SISBT3</i> für die untersuchten fluorogenen Peptide.....	49
Tab. 6.1	Sequenzen der im Protease Spot-Test eingesetzten Peptide .....	102

## Abkürzungen

AEBSF	Aminoethyl-benzolsulfonylfluorid
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum-Albumin
BtpNA	N-Benzoyl-L-Tyrosin <i>p</i> -Nitroanilin
CaMV	cauliflower mosaic virus
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIGE	Differential in Gel Electrophoresis
ECL	Enhanced Chemo Luminescence
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FC	Fusicoccin
gDNA	genomische DNA
Gln <sup>16</sup>	die AS Glutamin an 16. Stelle der Peptid- bzw. Proteinsequenz
GUS	β-Glucuronidase
HCCA	α-Cyano-4-hydroxymizsäure
HP	hairpin
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase
LAP	Leucinaminopeptidase
LB	lysogeny broth
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of flight
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige & Skoog Medium
MWCO	molecular weight cut off
NB	nutrient broth
<i>npfI</i>	Gen für die Neomycin Phosphotransferase
ORF	open reading frame
PA-Domäne	proteaseassoziierte Domäne

PC	Protein-Konvertase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Proteinase Inhibitor
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNGase F	N-Glykosidase F
PPO	Polyphenoloxidase
PR	pathogenesis related
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuklease
rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SA	Salicylsäure
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>SSBTx</i>	Subtilisin-ähnliche Protease aus <i>Solanum lycopersicum</i>
TD	Threonin Deaminase
T-DNA	transfer DNA
TLCK	Tosyl-L-Lysinchloromethylketon
TMV	Tomaten Mosaik Virus
TNP	Tri-Natriumphosphat
TPCK	Tosyl-L-Phenylalaninchloromethylketon
UBQ	Ubiquitin
ÜE	Überexpressionspflanzen
<i>uidA</i>	Gen für die $\beta$ -D-Glucuronidase
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
Wt	Wildtyp
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-Indolylglucuronid

Aminosäuren werden in der Ein- oder Dreibuchstaben-Schreibweise dargestellt.



## 1 EINLEITUNG

Ein wichtiges Merkmal lebender Zellen ist ihre Fähigkeit, sowohl auf interne als auch auf externe Reize durch Feinabstimmung und Regulierung physiologischer Prozesse zu reagieren. Auf diese Weise kann sich der Organismus an Veränderungen anpassen, die sich während der individuellen Entwicklung oder aufgrund veränderter Umweltfaktoren ergeben. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass der kontrollierte Abbau von Proteinen, d.h. die Proteolyse, eine Schlüsselrolle in der zellulären Regulation aller Organismen spielt. Eine wichtige Aufgabe der Proteolyse ist die Eliminierung von defekten sowie fremdartigen Polypeptiden und Proteinen und sie stellt somit einen hochkontrollierten Protein-Qualitätskontrollmechanismus dar. Gleichzeitig stehen die auf diese Weise frei werdenden Aminosäuren wieder für die Proteinbiosynthese oder die Energiegewinnung zur Verfügung. Die Bandbreite proteolytischer Prozesse beschränkt sich jedoch nicht nur auf die mehr oder weniger unspezifische Zerlegung von Proteinen in ihre Grundbausteine. Proteasen sind in der Lage, durch limitierte Proteolyse Enzyme spezifisch zu inaktivieren oder Präproproteine zu prozessieren und so eine Vielzahl von zellulären Abläufen zu regulieren. Auf diese Weise sind Proteasen wahrscheinlich direkt oder indirekt an fast allen Prozessen innerhalb einer Zelle beteiligt (CALLIS 1995, SCHALLER 2004).

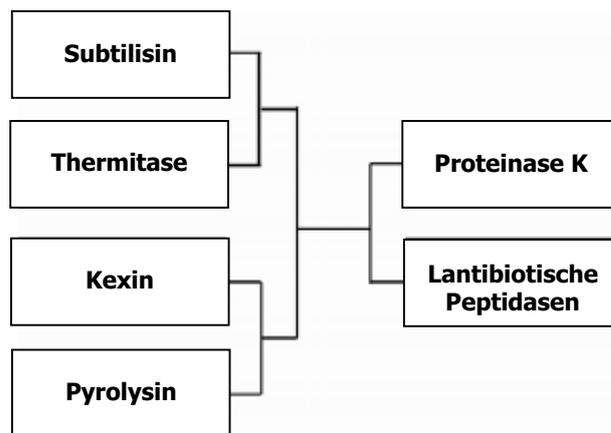
Eine der am intensivsten erforschten Klasse von Proteasen sind die Serinproteasen, welche durch eine spezielle Anordnung dreier reaktiver Aminosäurereste, einer davon der namensgebende Serinrest, im aktiven Zentrum gekennzeichnet sind. Ein Vergleich der Aminosäurereste dieser so genannten katalytischen Triade ist, zusammen mit dem der Kristallstrukturen einzelner Vertreter dieser Klasse, Grundlage für die Unterteilung in verschiedene Familien und Klans (RAWLINGS & BARRET 1994).

Die Subtilasen gehören nach dieser Klassifizierung zur S8 Familie innerhalb des SB Klans der Serinproteasen (MEROPS Proteindatenbank, <http://merops.sanger.ac.uk>; RAWLINGS ET AL. 2008). Sie haben ihren Namen von Subtilisin, einer alkalischen extrazellulären Protease aus *Bacillus subtilis* und verwandten Arten. Allen Subtilasen gemeinsam ist die gut konservierte, einzigartige Anordnung der Aspartat- (Asp), Histidin- (His) und Serinreste (Ser) in der katalytischen Triade. Lange Zeit wurde angenommen, dass Subtilasen nur in Prokaryoten vorzufinden sind. Die bakteriellen Subtilasen sind intensiv untersucht und aufgrund ihrer weltweiten Nutzung als Zusätze in Waschmitteln von großer wirtschaftlicher Bedeutung.

Mit der Entdeckung der Subtilisin-ähnlichen Kex2p-Protease (Kexin) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, wurde der Weg für die Identifizierung von Subtilasen in nahezu allen eukaryotischen Organismen bereitet (JULIUS ET AL. 1984, THORNER 1985). Aufgrund hoher Sequenzähnlichkeit mit

dem katalytischen Zentrum des Kexins, konnte 1989 die erste tierische Subtilase, das Furin, identifiziert werden (FULLER ET AL. 1989).

Das Interesse an Subtilasen wuchs in den 90er Jahren, als entdeckt wurde, dass die dem Kexin homologen tierischen Subtilasen die lange gesuchten Proprotein-Konvertasen (PC) sind. Diese sind in Säugern für die Reifung von Peptidhormonen, Neuropeptiden, Wachstumsfaktoren und Rezeptorproteinen verantwortlich (BARR 1991, SEIDAH ET AL. 2003). Typisch für die PCs, welche aufgrund der oben genannten Sequenzähnlichkeiten zu der Kexin-Familie gehören (Abb. 1.1), ist die hochspezifische Proteolyse ihrer Substrate C-terminal von dibasischen (Lys-Arg oder Arg-Arg) Motiven.



#### Abb. 1.1 Klassifizierung der Subtilasen

Die Verwandtschaft zwischen den Subtilasenfamilien ist in Form eines schematischen phylogenetischen Baumes dargestellt, der auf dem Sequenzvergleich der katalytischen Domänen einzelner Subtilasen basiert. Es besteht keine Proportionalität zwischen der Länge der Äste und der Sequenzähnlichkeit unter den Subtilasenfamilien (SIEZEN & LEUNISSEN 1997).

Ein weiterer Meilenstein in der Erforschung der Subtilasen war die Entschlüsselung der Kristallstrukturen von Kexin und Furin im Jahr 2003 (HOLYOAK ET AL. 2003, HENRICH ET AL. 2003), die Aufschluss über die molekulare Basis der ausgeprägten Substratspezifität der PCs brachte. Seitdem wurden weitere spektakuläre Entdeckungen bei den bakteriellen und tierischen Subtilasen gemacht.

Auf der Seite der prokaryotischen Subtilasen konnten PATON ET AL. (2004) mit der Subtilase Cytotoxin AB<sub>5</sub> (SubAB) eine neue Familie der AB<sub>5</sub> Cytotoxine identifizieren. Dieses Enzym, welches von bestimmten Stämmen Shiga Toxin-bildender *E. coli* Bakterien produziert wird, ist ein hoch wirksames Zellgift. Durch spezifische Proteolyse an einer einzigen Spaltstelle inaktiviert SubAB das essentielle molekulare Chaperon BiP (auch Immunglobulin-*heavy chain*-Bindeprotein genannt) des endoplasmatischen Retikulums (ER) (PATON ET AL. 2006). BiP ist ein hochkonservierter Hauptregulator des ERs, der für die Funktionsfähigkeit eukaryotischer Zellen, angefangen bei der Hefe bis hin zu den Säugern, lebensnotwendig ist (KIM & ARVAN 1998, HENDERSHOT 2004). Die zentrale Funktion des multifunktionellen Proteins BiP (HENDERSHOT 2004, LUO ET AL. 2006) in

eukaryotischen Zellen erklärt den starken Einfluss auf die physiologischen Prozesse, welche SubAB durch seine Spaltung ausübt. Aufgrund der außerordentlichen Substratspezifität von SubAB und der hohen evolutionären Konservierung des BiP-Proteins, wird SubAB als ein erfolgreiches Instrument gesehen, um die verschiedenen Funktionen von BiP in der Zelle zu untersuchen. Besonders vielversprechend wäre eine medizinische Anwendung der SubAB. So ist ein unerwünschter Nebeneffekt der Chemotherapie bei Krebserkrankungen die Induktion der BiP-Expression, die z.B. mit Resistenzen gegenüber den eingesetzten Medikamenten oder der erneuten Ausbreitung von Tumoren einhergeht (DONG ET AL. 2005). Möglicherweise könnte der Einsatz von SubAB solche Nebenwirkungen in der Krebstherapie mildern (MONTECUCCO & MOLINARI 2006).

Auch bei den tierischen Subtilasen steht deren Erforschung für den Einsatz in der Medizin im Vordergrund. Neben der bereits erwähnten Rolle der tierischen PCs bei der Reifung von Prohormonen, Rezeptoren, Wachstumsfaktoren u.a., werden diese Enzyme auch von verschiedenen Pathogenen ausgenutzt. Virale Hüllproteine und bakterielle Toxine werden von den PCs ebenso prozessiert wie endogene Proteine, auf diese Weise aktiviert und können so schwere Krankheiten, wie z.B. Grippe, Diphtherie oder Milzbrand auslösen (THOMAS 2002, SHIRYAEV ET AL. 2007). Eine genaue Kenntnis der Wirkungsweise der einzelnen PCs, ihre Substratspezifität und Spalteffizienz, ist dabei die Voraussetzung, um neue Anwendungen in der Medizin zu finden. REMACLE ET AL. (2008) untersuchten daher die Spaltung von über 100 Peptiden bestehend aus 10 Aminosäuren durch alle sieben bekannten PCs der Kexinfamilie aus *Homo sapiens* (Furin, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 und PC7). Ihre Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung von Medikamenten, z.B. weisen Ihre Daten darauf hin, dass PC2 am effizientesten von allen Mitgliedern der PC-Familie das Vorläuferprotein des Parainfluenza-Virus spaltet und somit ein gutes mögliches Angriffsziel für ein Medikament gegen diese Krankheit ist.

Zwei weitere Säuger PCs, die Site-1-Protease (S1P, auch Subtilisin/Kexin-Isoenzym 1 (SKI1) genannt) und die PCSK9 (Protein Convertase Subtilisin Kexin 9, auch NARC-1, Neural Apoptosis-Regulated Convertase-1 genannt) werden nicht der Kexin- sondern der Pyrolysin- bzw. Proteinase K-Familie zugeordnet und bilden daher eine Ausnahme (SAKAI ET AL. 1998, SEIDAH ET AL. 1999, SEIDAH ET AL. 2003). Beide spielen eine wichtige Rolle im Lipidmetabolismus.

PCSK9 inaktiviert den Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Rezeptor und ist auf diese Weise indirekt an der Regulierung des LDL-Cholesterin-Spiegels im Blut beteiligt (SEIDAH & PRAT 2007, KWON ET AL. 2008). S1P reguliert durch die Spaltung der so genannten SREBPs (Sterol regulatory element-binding proteins) wichtige Elemente des Fettstoffwechsels (DUNCAN ET AL. 1997, SAKAI ET AL. 1998). Inhibitoren der S1P können die Cholesterin- und Fettsäuresynthese herabsetzen und stellen somit potentielle Therapeutika z.B. für die Behandlung von erhöhten Cholesterinwerten dar, welche eine Reihe von Erkrankungen zur Folge haben (HAWKINS ET AL. 2008).

Eine weitere wichtige Funktion der S1P in Säugerzellen ist die Spaltung des Transkriptionsfaktors ATF6 (YE ET AL. 2000) während der ER-Stressantwort, allgemein auch als Unfolded Protein Response (UPR) bezeichnet. Dieser Signalweg wird durch die Akkumulation nicht oder fehlerhaft gefalteter Proteine im ER ausgelöst und führt zur verstärkten Expression von Genen, die für die Proteinfaltung wichtig sind (RUTKOWSKI & KAUFMANN 2004).

Ungeachtet der Tatsache, dass die pflanzlichen Subtilasen erst nach den prokaryotischen und den tierischen entdeckt wurden, übersteigt ihre Anzahl deren mittlerweile bei weitem. Allein das Genom von *Arabidopsis thaliana* weist die Sequenz von 56 Genen auf, welche für Subtilasen kodieren (RAUTENGARTEN ET AL. 2005). Die Proteinstrukturen der pflanzlichen Subtilasen weisen starke Gemeinsamkeiten auf. Sie besitzen vier funktionelle Domänen, die Prä-, Pro-, katalytische und proteaseassoziierte (PA)-Domäne und werden als große Vorläuferproteine synthetisiert. Ausnahmen stellen lediglich die beiden Arabidopsis Subtilasen *ASBT6.1* und *ASBT6.2* dar, welche keine PA-Domäne aufweisen.

Durch Proteolyse der Prä- und Prodomäne werden Subtilasen zur aktiven Protease prozessiert (BEERS ET AL. 2004). Die katalytische Domäne beinhaltet die schon erwähnte Ser-His-Asp-Triade, die durch ihre räumliche Faltung die hydrolytische Reaktion im aktiven Zentrum der Protease bewirkt. Unterbrochen wird die katalytische Domäne von der PA-Domäne. Diese Struktur konnte bisher ausschließlich bei Mitgliedern pflanzlicher und prokaryotischer Subtilasen nachgewiesen werden. Ihre Funktion ist bis heute gänzlich ungeklärt, ein Einfluss auf die Substratspezifität oder Protein-Protein-Interaktionen wird vermutet (BRUINENBERG ET AL. 1994, LAWRENCE ET AL. 1999, MAHON & BATEMAN 2000). Aufschluss über die Funktion der PA-Domäne könnte eine Kristallstrukturanalyse liefern, bis jetzt konnte jedoch noch keine pflanzliche Subtilase kristallisiert werden.

Alle bis jetzt entdeckten pflanzlichen Subtilasen wurden aufgrund ihrer Sequenz den Pyrolysinen zugeordnet. Diese Familie zeichnet sich im Gegensatz zu den Kexinen, welche die bereits erwähnten PCs umfasst, durch eine große Heterogenität sowohl im Hinblick auf die Herkunft der in ihr vertretenen Enzyme als auch bezüglich der Substratspezifität aus (SIEZEN & LEUNISSEN 1997). Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass pflanzliche Subtilasen ausschließlich an der unspezifischen Proteolyse von Proteinen beteiligt sind. Ein Beispiel dafür ist Cucumisin, die erste Subtilase, welche aus einer höheren Pflanze isoliert wurde. Diese extrazelluläre Protease aus *Cucumis melo*, welche bis zu 10 % des löslichen Proteingehalts der Melonenfrucht ausmacht, schneidet eine breite Palette an Substraten, was auf eine eher degradative Funktion hindeutet (KANEDA & TOMINAGA 1975, YAMAGATA ET AL. 1994, UCHIKOBA ET AL. 1995). Dasselbe gilt für die

Subtilasen Taraxalisin aus *Taraxacum officinale* (RUDENSKAYA ET AL. 1998), Macluralisin aus *Maclura pomifera* (RUDENSKAYA ET AL. 1995) und Plantagolisin aus *Plantago major* (BOGACHEVA ET AL. 2001). Es gab allerdings schon seit Beginn der 90er Jahre indirekte Hinweise für die Existenz von Subtilasen mit enger Substratspezifität in Pflanzen.

In transgenen Tabakpflanzen konnte ein Pilztoxin aus *Ustilago maydis* exprimiert, korrekt prozessiert und sekretiert werden, dessen Prozessierung im Pilz eine Kex2p-ähnliche Proteaseaktivität im sekretorischen System erfordert (TAO ET AL. 1990). Außerdem wiesen GU ET AL. (1996) nach, dass die Proform der Leucinaminopeptidase a (LAP-A) aus Tomate nahe der Spaltstelle des Propeptids zwei dibasische Aminosäuremotive aufweist, welche für die Subtilasen der Kexin-Familie typisch sind. Die Autoren vermuteten daher, dass LAP-A an dieser Stelle durch eine Kex2p-ähnliche Protease gespalten wird, bevor eine autokatalytische Verkürzung des N-Terminus zum reifen LAP-A führt. Als drittes Indiz für die Existenz von Subtilasen mit Kex2p-ähnlicher Spezifität in Pflanzen kann die Identifizierung des Proteins SBP50 (Systemin-binding-protein 50), welches spezifisch mit dem Wundsignalpeptid Systemin der Tomate interagiert, herangezogen werden (SCHALLER & RYAN 1994). Auch Systemin weist das typische dibasische Spaltnmotiv für Subtilasen der Kexin-Familie auf. Zudem konnte SBP50 mit einem Antiserum gegen eine PC aus *Drosophila* immunodetektiert werden (SCHALLER & RYAN 1994). Aufgrund dieser Daten wurde angenommen, dass es sich bei SBP50 möglicherweise um eine PC-ähnliche Protease handelt. SCHALLER (1998) konnte später nachweisen, dass Systemin *in vivo* tatsächlich C-terminal der beiden basischen Aminosäuren prozessiert wird.

In Anbetracht dieser Hinweise und vor dem Hintergrund der wichtigen Funktionen, die PCs in Tieren einnehmen, lag die Vermutung nahe, dass Subtilasen in Pflanzen ähnlich wichtige Aufgaben erfüllen und vergleichbar mit diesen möglicherweise an der Prozessierung von Vorläuferproteinen pflanzlicher Peptidhormone beteiligt sind. Dies und die Annahme, dass unter den physiologischen Substraten der pflanzlichen Subtilasen neue pflanzliche Peptidhormone bzw. deren Vorläufer entdeckt werden können, macht die Erforschung der pflanzlichen Subtilasen und die Aufklärung ihrer Funktionen zu einem wichtigen Forschungsziel.

Auch wenn alle bisher identifizierten pflanzlichen Subtilasen aufgrund ihrer Sequenz den Pyrolysinen und nicht den Kexinen zugeordnet wurden, so zeigt das Beispiel der Säugersubtilase S1P jedoch, dass auch Mitglieder der Gruppe der Pyrolysine als PC fungieren können.

Mit Hilfe der biochemischen Charakterisierung konnten inzwischen einige Subtilasen in Pflanzen mit vergleichbar hoher Selektivität für spezifische Spaltstellen wie sie die PCs aufweisen, identifiziert werden. Die Subtilase C1 aus Sojabohne beispielsweise, weist eine hohe Präferenz für Glu-Glu und Glu-Gln Bindungen auf (BOYD ET AL. 2002). Die Tomaten-Subtilasen *SSBT1* und *Ara 12*, eine Subtilase aus *Arabidopsis thaliana*, zeigen eine Präferenz für Gln oder Leu bzw. Phe oder Ala in der

P<sub>1</sub>-Position ihrer synthetischen Substrate (JANZIK ET AL. 2000, HAMILTON ET AL. 2003). Essentiell für die so genannten Saspasen aus Hafer ist Asp in der P<sub>1</sub>-Position ihrer Substrate. Ihre Rolle bei einer proteolytischen Signalkaskade während der Apoptose wird diskutiert (COFFEEN & WOLPERT 2004). Für einige wenige pflanzliche Subtilasen konnten *in vivo*-Substrate identifiziert werden. Das Tomatenprotein LRP, welches in der Zellwand lokalisiert ist, wird in Virus-infizierten Pflanzen von einer pathogen-induzierbaren Subtilase der P69-Subfamilie prozessiert (TORNERO ET AL. 1996).

Die Subtilase *AtS1P* ist durch die Prozessierung des Transkriptionsfaktors *AtbZIP17*, welcher die Expression verschiedener Salzstressgene induziert, an der Signalkaskade während der Salzstressantwort in *Arabidopsis* beteiligt (LIU ET AL. 2007).

Die Aufreinigung und biochemische Charakterisierung von pflanzlichen Subtilasen sowie die Untersuchung ihrer Substratspezifität sind daher wichtige Schritte bei der Aufklärung ihrer Funktion, auch wenn erst für wenige dieser Enzyme physiologische Substrate entdeckt werden konnten und daher weiterhin offen bleibt, ob sie ähnlich den PCs eine Rolle als prozessierende Enzyme spielen.

Für die meisten pflanzlichen Subtilasen wurde deren mutmaßliche physiologische Rolle hauptsächlich anhand von gewebe- oder entwicklungspezifischen bzw. stressinduzierten Expressionsmustern postuliert.

Die Subtilase LIM9 aus *Lilium longiflorum* wird beispielsweise spezifisch während einer späten Phase der Microsporenentwicklung in Tapetumzellen exprimiert und ihr wird daher eine mögliche Beteiligung an der Pollenentwicklung zugesprochen (TAYLOR ET AL. 1997). Das Expressionsmuster zweier weiterer Subtilasen deutet auf eine Funktion bei der Knöllchenentwicklung im Rahmen der Symbiose mit Actinomyceten hin. Die mRNAs von ag 12 aus *Alnus glutinosa* und ihrem Homolog CG12 aus *Casuarina glauca*, eine in Australien endemische Art, werden nur in einem frühen Stadium der Nodulation gebildet (RIBEIRO ET AL. 1995, LAPLACE ET AL. 2000). Für zwei Subtilasen aus *Lotus japonicus* wurde eine Induktion in Wurzeln bei Ausbildung einer arbuskulären Mykorrhiza beobachtet und eine mögliche Funktion bei Ausbildung der Symbiose diskutiert (KISTNER ET AL. 2005). Als weiteres Beispiel kann die Subtilase SCS1 aus Sojabohne genannt werden, die ausschließlich in der Samenschale exprimiert wird (BATCHELOR ET AL. 2000). Ausführliche Expressionsstudien wurden auch an Subtilasen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der Subtilasen SLP2, SLP3 und ARA12 gewebe- und entwicklungspezifisch reguliert wird (GOLLDACK ET AL. 2003, HAMILTON ET AL. 2003). Die *Arabidopsis* Subtilasen XSP1 und AIR1 scheinen in Xylemdifferenzierung bzw. Seitenwurzelbildung involviert zu sein, wie die spezifische Expression in den jeweiligen Geweben andeutet (NEUTEBOOM ET AL. 1999, ZHAO ET AL. 2000).

Ein exakter Nachweis für die Verbindung zwischen dem beobachteten Expressionsmuster und der vermeintlichen Funktion der jeweiligen Subtilase fehlt jedoch in all den oben genannten Beispielen.

Expressionsstudien alleine reichen daher nicht aus, um die Funktionen von pflanzlichen Subtilasen zu identifizieren.

Genetische Daten lieferten die stärksten Argumente für die Hypothese, dass pflanzliche Subtilasen PC-ähnliche Funktionen innehaben. Mit Hilfe so genannter "loss-of-function"-Mutanten konnte einer Reihe von *Arabidopsis*-Subtilasen eine eindeutige Funktion in der hochspezifischen Regulation von Entwicklungsprozessen in der Pflanze zugewiesen werden. So ist SDD1 an der Steuerung der stomatären Dichte und Verteilung beteiligt (BERGER & ALTMANN 2000, VON GROLL ET AL. 2002). ALE1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Cutikula sowie bei der Differenzierung der Epidermis während der Embryogenese (TANAKA ET AL. 2001). LIU ET AL. (2007) konnten zeigen, dass die der schon erwähnten tierischen S1P Subtilase ähnliche *AtS1P* (entspricht *AtSBT6.2*) an der Salzstressantwort beteiligt ist. Die Autoren beobachteten, dass eine der T-DNA-Insertions-Mutanten empfindlich auf Salzstress reagierte und konnten demonstrieren, dass *AtS1P* im Golgi-Apparat lokalisiert und an einem durch Salzstress induzierten Signalweg beteiligt ist, der der ER-Stressantwort ähnelt.

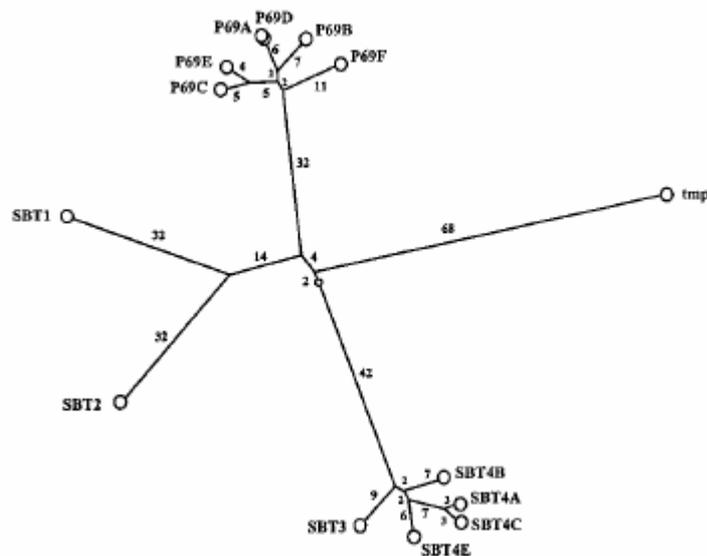
RAUTENGARTEN ET AL. (2008) untersuchten T-DNA-Insertions-Mutanten, welche veränderte Eigenschaften in der Samenschale aufweisen. So konnte der Subtilase *AtSBT1.7* eine Funktion bei der Freisetzung von Schleim aus der Samenschale während der Samenquellung und -keimung zugeordnet werden.

Die Subtilasen in Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) fanden Beachtung nachdem die bereits erwähnten Untersuchungen von SCHALLER & RYAN (1994) nahe legten, dass eine PC an der Regulation der Wundantwort und der Abwehr von herbivoren Insekten beteiligt sein könnte. Tomatenpflanzen reagieren auf Verwundung durch Insektenfraß mit der Akkumulation von Abwehrproteinen. Dabei spielt das Signalmolekül Systemin, das erste hormonähnliche Peptid in Pflanzen, eine wichtige Rolle (PEARCE ET AL. 1991). Inzwischen ist bekannt, dass Systemin die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Signalkaskade auslöst, welche zur Jasmonsäure-Biosynthese führt und Jasmonsäure schließlich die Expression von Abwehrgenen induziert (RYAN 2000). Systemin weist am C-Terminus ein Spaltmotiv auf, das typisch für die Substrate der Säuger PC Furin ist, was auf die Existenz einer PC-ähnlicher Proteasen in Tomatenpflanzen schließen lässt (SCHALLER & RYAN 1994). Auf der Suche nach Proteinen, die mit Systemin interagieren und möglicherweise in den Systemin-Signalweg involviert sind, konnte das schon erwähnte Protein SBP50 identifiziert werden, welches mit Antikörpern gegen eine PC aus *Drosophila* interagiert (SCHALLER & RYAN 1994, SCHALLER 1998). Diese Entdeckung war Auslöser für die Suche nach PCs in Tomatenpflanzen. Allerdings konnte bis heute für keine der Tomaten-Subtilasen eine den PCs vergleichbare Funktion nachgewiesen werden.

Die Subtilasefamilie in Tomate umfasst 15 Mitglieder und ist in fünf Subfamilien unterteilt (JORDÁ ET AL. 1999, MEICHTRY ET AL. 1999, Abb. 1.2). Für die meisten von ihnen liegen auf DNA- und RNA-Ebene detaillierte Daten vor (MEICHTRY ET AL. 1999).

Die P96-Familie ist die größte Subfamilie. Das Expressionsprofil von P69A und P69D ist stark entwicklungsabhängig und gewebespezifisch. Daher wird ihnen eine Rolle bei der Pflanzenentwicklung zugesprochen (JORDÁ ET AL. 1999). P69E und P69F werden sehr restriktiv in Wurzeln bzw. Hydathoden, also potentiellen Eintrittsorten für Pathogene, exprimiert. JORDÁ ET AL. (2000) diskutieren daher eine mögliche Rolle dieser Subtilasen bei der primären Pathogenabwehr. Die Expression von P69B und P69C wird erst durch Pathogenbefall bzw. Behandlung mit Salicylsäure oder dem Pilztoxin Fusicoccin induziert. Sie scheinen demzufolge in die Pathogenantwort der Tomatenpflanze involviert zu sein (JORDÁ ET AL. 1999, JORDÁ & VERA 2000, SCHALLER ET AL. 2000).

Tmp wurde wie ihr Ortholog in Lilie (Lim9) aufgrund ihrer spezifischen Expression in Antheren während später Phasen der Pollenentwicklung mit dieser in Verbindung gebracht (RIGGS & HORSCH 1995, TAYLOR ET AL. 1997).



**Abb. 1.2 Phylogenetischer Baum der Subtilasefamilie in Tomate (*S. lycopersicum*)**

Basierend auf dem Vergleich von Aminosäuresequenzen, die von der gDNA und cDNA abgeleitet wurden, ist die phylogenetische Beziehung der Tomaten-Subtilasefamilie dargestellt. Die Zahlen stellen die PAM-Distanzen (accepted point mutations per 100 residues) zwischen den Sequenzen dar. Die Sequenz von SBT4D, wurde nicht in die Analyse mit einbezogen, da diese aufgrund einer Insertion einer Retrotransposon-ähnlichen Sequenz zerschnitten wird (MEICHTRY ET AL. 1999).

Auch bei der *SSBT*-Subfamilie (früher *LeSBT*-Subfamilie) beschränkten sich die funktionellen Hinweise zunächst auf die Ergebnisse von Expressionstudien. Die Expression von *SSBT1* ist auf Blüten, Wurzeln sowie Blüten- und Blattabschissionszonen begrenzt (MEICHTRY ET AL. 1999, JANZIK 2000, CEDZICH, mündliche Mitteilung).

*SSBT2*-Transkripte waren anfänglich anhand von Northern Blot-Analysen nur in Blättern und Kotyledonen detektiert worden (MEICHTRY ET AL. 1999). Später konnte *SISBT2* anhand von RT-PCR-Analysen in allen untersuchten Organen, mit stärkster Expression in grünen, jungen Organen und in frühesten Stadien der Blütenentwicklung, nachgewiesen werden. Reporter-gen-Analysen ergaben eine spezifische Aktivität des *SSBT2*-Promotors in den Schließzellen der Stomata, was für eine mögliche Funktion der Subtilase bei Entwicklungsprozessen oder der Pathogenabwehr spricht (ULLRICH 2006). Transkripte von *SSBT4* wurden in Kotyledonen und Blättern detektiert (MEICHTRY ET AL. 1999). Im Falle von *SSBT3* lagen bis jetzt nur Northern Blot-Analysen vor, durch die *SSBT3*-Transkripte in allen untersuchten Geweben nachweisbar waren (MEICHTRY ET AL. 1999).

## 1.1 Zielsetzung

Die Rolle der Proprotein-Konvertasen ähnlichen Subtilasen in Pflanzen ist erst in wenigen Fällen für einzelne Enzyme aus *Arabidopsis* verstanden. Dagegen ist die Funktion von Subtilasen in Tomatenpflanzen (*SSBTs*) noch völlig ungeklärt. Da Erkenntnisse vorliegen, welche vermuten lassen, dass Subtilasen an der Regulation der Wundantwort und Pathogenabwehr in Tomatenpflanzen beteiligt sind und aufgrund der wichtigen Stellung der tierischen und bakteriellen Subtilasen für eine Vielzahl physiologischer Prozesse, ist die Aufklärung der Funktion der *SSBTs* von großem wissenschaftlichen Interesse. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, exemplarisch eine der Subtilasen aus Tomatenpflanzen zu charakterisieren und zur Aufklärung der Funktion dieser Subtilase im lebenden System beizutragen.

Dafür sollte die Subtilase *SSBT3* zunächst aus einer überexprimierenden Tomatenzellsuspensionskultur aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden, um dann aus den biochemischen Eigenschaften *in vitro* Rückschlüsse auf mögliche Aufgaben der Protease *in vivo* ziehen zu können. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei der Untersuchung der Substratspezifität zukommen, da diese essentiell für die Suche nach den physiologischen Substraten und somit auch von großer Bedeutung für die Aufklärung der Funktion von *SSBT3* ist. Außerdem war es beabsichtigt, die aufgereinigte Subtilase in Kooperation mit Dr. Christian Ottman (Chemical Genomics Centre, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund) zu kristallisieren und strukturell zu analysieren.

In Ergänzung der biochemischen Daten sollte in einem nächsten Schritt eine detaillierte Expressionsanalyse in Tomatenpflanzen durchgeführt werden, um weitere Hinweise auf die physiologische Rolle der Protease zu erhalten. Diesen Hinweisen sollte dann mit Hilfe von transgenen Pflanzen, die einen für *SSBT3* veränderten Expressionsspiegel aufweisen (*SSBT3*-RNAi- und *SSBT3*-Überexpressionspflanzen), nachgegangen werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide, Antikörper und Kits

Sofern nicht gesondert aufgeführt, stammten alle Chemikalien von Roth (Karlsruhe), Fluka und Sigma (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt). Die ungefärbten molekularen Marker Phosphorylase b, Albumin und Ovalbumin wurden von Pharmacia (Freiburg) bezogen. Falls nicht anders angegeben, handelt es sich bei den Prozentangaben um Volumenprozent (v/v), Gewichtsprozent (w/v) sind jeweils als solche angeführt.

Das Restriktionsenzym *SspI* (25 U/μl) sowie die N-Glykosidase F (PNGase F, 500 U/μl) stammten von New England BioLabs (Frankfurt a. M.). Alle anderen Enzyme stammten von Fermentas (St. Leon-Rot) und hatten eine Aktivität von 10 U/μl. Alle Enzyme wurden nach den Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Puffern verwendet.

Alpha [<sup>32</sup>P]-dCTP, 10 μCi/μl wurde von der Firma Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen. Das Sondenmarkierungskit, RadPrime Labelling System, stammte von der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Operon Biotechnologies (Köln) hergestellt (Tab. 2.1).

**Tab. 2.1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide**

T3	5'- ATTAACCCTCACTAAAGGGA -3'
T7	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'
P355	5'- CTGAATTTTATATTTTTTCATTTTCCCAACCTTTTCCG -3'
<i>SSBT3</i> forward	5'- ACTCCTCAAGATTACGTAAATCTCC -3'
<i>SSBT3</i> reverse	5'- CAATAATAGGAGATGTTACTATCGGAC -3'
<i>S</i> Aktin forward	5'- TGTGGGAGATGAAGCTCAATCG -3'
<i>S</i> Aktin reverse	5'- TCAAACATCAGTGAGGTCACG -3'
<i>SPR3a</i> forward	5'- TGAGGCTTTCTGAATTCCTAC -3'
<i>SPR3a</i> reverse	5'- CCTTGACAAGCATTGTCATTG -3'
NPTII forward	5'- AAGAAGGCGATAGAAGGCGAT -3'
NPTII reverse	5'- TATGACTGGGCACAACAGAC -3'

Ein polyklonales Antiserum gerichtet gegen ein heterolog in *E. coli* exprimiertes Fragment von *SSBT3* wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) erstellt (JANZIK 2000). Das anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat stammte von der Firma Calbiochem (Darmstadt/Schwalbach).

## 2.2 Protease Spot-Test und Peptide

Das synthetische Systemin-Peptid sowie die Alanin-substituierten Systeminanaloga stammten von Enzyme Systems Products (Livermore, CA, USA). Glucagon, oxidierte Insulin-B-Kette, Mellitin, Bradykinin, Neurotensin und Substance P stammten von Sigma (Taufkirchen) oder Enzyme Systems Products (Livermore, CA, USA). Der Protease Spot-Test sowie die fluorogenen auf der Aminosäuresequenz von Systemin basierenden Peptide (Tab 2.2) wurden von der Firma JPT (Berlin) bzw. Bachem (Weil am Rhein) bezogen.

**Tab. 2.2 Aminosäuresequenzen der fluorogenen Peptide**

Die rot markierten Aminosäuren stellen die Änderungen im Vergleich zur Systeminsequenz dar.

Systemin	(JPT)	SKRDPPKMQTD
P1	(JPT)	SKRDPPKM <sup>H</sup> TD
P2	(JPT)	SKRDPPK <sup>K</sup> HTD
P3	(JPT)	SKRDPPK <sup>K</sup> QTD
P4	(JPT)	SKRDPPK <sup>K</sup> HKD
P5	(Bachem)	SKRDPPK <sup>K</sup> Q <sup>K</sup> D

## 2.3 Verbrauchsmaterial

Plastikverbrauchsmaterial wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Petrischalen wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Alle nicht gesondert aufgeführten Materialien stammten von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (Taufkirchen).

## 2.4 Biologisches Material

### 2.4.1 Zellkultur

Eine *S*SBT3-überexprimierende Zellsuspensionskultur wurde aus transgenem Tomaten-Kallus angelegt, der durch Transformation des Wildtyps (*Solanum peruvianum* – früher *Lycopersicon peruvianum*) mit dem ORF der *S*SBT3-cDNA unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors erhalten wurde (SCHALLER, unveröffentlicht).

### 2.4.2 Tomatenpflanzen

Alle verwendeten Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum* – früher *Lycopersicon esculentum* Mill) waren vom Kultivar UC82B. Die Wt-Samen wurden von Royal Sluis (Enkhuizen, Niederlande) bezogen.

#### ***S*SBT3-Promotor::*G*US**

Die *S*SBT3-Promotor::*G*US Pflanzen wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit erstellt (SIEFERER & SCHALLER, unveröffentlicht). Hierfür wurde ein 1,9 kb großes Promotorfragment des *S*SBT3-Gens mit dem *uidA*-Gen in dem binären pBI101 Vektor (JEFFERSON ET AL. 1986) fusioniert und transgene Tomatenpflanzen unter Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation mit diesem Konstrukt hergestellt.

Zu Beginn dieser Arbeit standen Samen von Kanamycin-resistenten Linien der T<sub>0</sub>-Generation (GUS-5) und der T<sub>1</sub>-Generation (GUS-8, GUS-12, GUS-13, GUS-14) zur Verfügung.

#### ***S*SBT3-RNAi**

Die *S*SBT3-defizienten Pflanzen wurden mittels RNAi-Technik bereits im Vorfeld dieser Arbeit erstellt (SIEFERER & SCHALLER, unveröffentlicht). Dabei wurde ein ca. 250 bp großes Fragment vom 5'-Ende der *S*SBT3-cDNA in sense und in anti-sense Orientierung in pHANNIBAL (WESLEY ET AL. 2001) kloniert. Die RNAi-Expressionskassette wurde dann in den Expressionsvektor pART27 (GLEAVE 1992) kloniert und transgene Tomatenpflanzen unter Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation hergestellt.

Zu Beginn dieser Arbeit standen Samen der T<sub>1</sub>-Generation von insgesamt 5 Kanamycin-resistenten Linien zur Verfügung, nämlich *S*SBT3 HP-9, *S*SBT3 HP-12, *S*SBT3 HP-13, *S*SBT3 HP-14 und *S*SBT3 HP-21.

#### ***S*SBT3-Überexpressionspflanzen**

Die *S*SBT3-Überexpressionspflanzen wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit erstellt (FRASSON & SCHALLER, unveröffentlicht). Dazu wurde der ORF der *S*SBT3-cDNA unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors und Terminators in den binären Vektor pRD400, einem Derivat von pBIN19 (FRISCH ET AL. 1995), kloniert. Transgene Tomatenpflanzen wurden unter Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation hergestellt.

Zu Beginn dieser Arbeit standen Samen der T<sub>1</sub>-Generation von insgesamt drei Kanamycin-resistenten, homozygoten Linien zur Verfügung, nämlich G2f1D, G18A und G19g1.

### **2.4.3 *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](http://www.manducaproject.com) aufgelistet.

## **2.5 Anzucht des biologischen Materials**

### **2.5.1 Zellkultur**

Die *SSBT3*-Tomatenzellsuspensionskulturen wurden in sterilem Nover-Medium (NOVER ET AL. 1982) in Glas-Erlenmeyerkolben mit Schaumstoffstopfen in einem Schüttler bei einer konstanten Temperatur von 25 °C und einer Rotationsgeschwindigkeit von 100 upm angezogen. Die Zellerhaltungskulturen wurden wöchentlich umgesetzt, dabei wurden 4 ml der *SSBT3*-Erhaltungskultur mittels einer Sterilpipette in 50 ml frischem Nover-Medium resuspendiert. Der transgenen Erhaltungskultur wurden jeweils 50 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

Für die Hauptkulturen die als Ausgangsmaterial für die Reinigung von *SSBT3* dienten, wurden 20 ml der *SSBT3*-Erhaltungskultur unter Zugabe von 75 µg/ml Kanamycin in 200 ml frischem Nover-Medium resuspendiert. Die Hauptkulturen wurden in einem Gesamtvolumen von ca. 3 l angeimpft und nach acht Tagen geerntet.

### **2.5.2 Tomatenpflanzen**

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Tomatenpflanzen im Gewächshaus oder in Klimakammern bei einer Tageslänge von 16 h angezogen.

Ab einem Alter von vier Wochen wurden alle Pflanzen wöchentlich im Gießverfahren gedüngt (NPK-Dünger: GABI Plus® 12-8-11, 2 ml/l Gießwasser). Chemische und biologische Pflanzenschutzmaßnahmen wurden vor oder während der Experimente nicht durchgeführt. Ebenfalls wurde darauf verzichtet, die Pflanzen auszugeizen. Für die verschiedenen Experimente wurden Tomatenpflanzen aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien und unterschiedlichen Wachstumsbedingungen verwendet (Tab. 2.3).

### **Samenernte und -stratifikation**

Samen wurden aus reifen Früchten geerntet, gewaschen und getrocknet und bei Raumtemperatur (rt) in Papiertütchen aufbewahrt. Falls die verwendeten Samen jünger als ein halbes Jahr waren, wurden sie vor der Aussaat für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert.

**Tab. 2.3 Alter und Wachstumsbedingungen der Tomatenpflanzen in den verschiedenen Experimenten**

<b>Experiment</b>	<b>Pflanzenalter <sup>0)</sup></b>	<b>Pflanzenorgan</b>	<b>Wachstumsbedingungen</b>
Northern Blot-Analyse	3	Wurzel	Klimakammer <sup>1)</sup>
Southern Blot-Analyse	4-6	Blatt	Gewächshaus <sup>2)</sup>
Western Blot-Analyse	4-6	Blatt/Wurzel	Gewächshaus <sup>2)</sup>
FC-, SA-Behandlung	2	Blatt	Klimaraum <sup>3)</sup>
Bakterieninfiltrationsversuch	3	Blatt	Gewächshaus <sup>2)</sup>
Mechanische Verwundung	2	Blatt	Gewächshaus <sup>4)</sup>
Verwundung durch <i>M. sexta</i>	3	Blatt	Gewächshaus <sup>4)</sup>
Proteinaseinhibitor-Test	2	Blatt	Gewächshaus <sup>4)</sup>
<i>M. sexta</i> Larvenentwicklung	6	gesamte Pflanze	Gewächshaus <sup>4)</sup>
<i>M. sexta</i> "Choice"-Test	6	Blatt	Gewächshaus <sup>4)</sup>

Pflanzenalter <sup>0)</sup> in Wochen, zu Beginn des Experiments

Klimakammer <sup>1)</sup> Pflanzen steril auf MS-Medium gewachsen, Temperatur: 25° C ± 2° C, Lichtintensität: ~ 90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Gewächshaus <sup>2)</sup> Temperatur: 25 °C ± 2 °C, Lichtintensität: ~ 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Klimaraum <sup>3)</sup> Temperatur: 24 °C, Lichtintensität: 110  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Gewächshaus <sup>4)</sup> Temperatur: 28 °C ± 2 °C (Tag), 20 °C ± 2 °C (Nacht), Lichtintensität: 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

### Desinfektion der Samen

Um eine Virusinfektion der Tomatenpflanzen 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 3 h in 10 % TNP eingeweicht, anschließend fünfmal in einem großen Volumen H<sub>2</sub>O gewaschen und im Gewächshaus direkt auf Erde ausgesät.

Bei Samen, welche auf MS-Medium angezogen wurden, erfolgte zusätzlich eine Oberflächen-Sterilisation mit Natrium-Hypochlorit. Dazu wurden die Samen zunächst 3 min in 70 % Ethanol und dann 10 min in 1,5 % Natrium-Hypochlorit, versetzt mit fünf Tropfen Tween 20/100 ml, bei rt geschüttelt. Anschließend wurden die Samen fünfmal mit sterilem ddH<sub>2</sub>O unter der Sterilbank gewaschen und direkt auf das Medium ausgesät.

### **2.5.3 *Manduca sexta***

Nachdem die Larven geschlüpft waren, wurden sie zunächst auf Kunstfutter (Kap. 2.4.3) aufgezogen, bis sie das dritte Larvenstadium (L3) erreicht hatten. Dabei wurden jeweils 20 Larven in einer Petrischale mit vier ca. 2 cm<sup>3</sup> 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 Papierhandtücher gewickelt und in Plastikboxen mit Luftlöchern im Dunkeln bei 25 °C 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.

## **2.6 Methoden zur Proteinaufreinigung von *S/SBT3***

### **2.6.1 Zellkulturenernte**

In der verwendeten *S/SBT3*-überexprimierenden Zellsuspensionskultur wurde *S/SBT3* in hohem Maße in das Kulturmedium sekretiert, aus welchem das Protein leicht gewonnen werden konnte. Die Trennung von Zellen und Zelltrümmern von den im Kulturüberstand vorhandenen löslichen Proteinen erfolgte durch Filtration (Rundfilter, Macherey-Nagel, Düren) mittels Wasserstrahlpumpe. Das Volumen des gewonnenen Filtrats wurde bestimmt, auf 4 °C abgekühlt und unmittelbar einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen.

### **2.6.2 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Präzipitation**

Im ersten Schritt der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung wurden die bei 60 % Sättigung ausfallenden Proteine präzipitiert (Zentrifugation bei 10.800 x *g*, 45 min, 4 °C) und in einem weiteren Zentrifugationsschritt die Proteinfraktion gewonnen, welche bei 85 % Sättigung präzipitierte. Das Sediment des zweiten Fällungsschrittes wurde für weitere Reinigungsschritte bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.6.3 Dialyse

Für die Dialyse wurden die Sedimente der Ammoniumsulfat-Präzipitation aus ca. 6 l Kulturüberstand vereinigt und in 60 ml Puffer  $A_{\text{Kation}}$  (25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0; 5 mM EDTA) resuspendiert. Bei der nachfolgenden Zentrifugation (2.600 x g, 15 min, 4 °C) wurden Polysaccharide und restliche Zelltrümmer von den gelösten Proteinen getrennt. Die gewonnene Proteinlösung wurde in Dialyseschläuche (ZelluTrans, Roth, MWCO 12.000-14.000) überführt und bei 4 °C zweimal je 4 h und einmal über Nacht gegen je 4 l Puffer  $A_{\text{Kation}}$  dialysiert.

### 2.6.4 Kationen-Austauschchromatographie im Batch-Verfahren

Für das Batch-Verfahren wurde loses Kationen-Austauschermaterial (SP Sepharose fast-flow suspension, GE Healthcare, Freiburg) eingesetzt. Die Matrix wurde zunächst nach den Herstellerangaben mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Puffer  $A_{\text{Kation}}$  gewaschen, mit Puffer  $B_{\text{Kation}}$  (Puffer  $A_{\text{Kation}}$  + 1 M NaCl) aktiviert und schließlich mit Puffer  $A_{\text{Kation}}$  äquilibriert (Überkopfschüttler, 4 °C).

Die zuvor dialysierte Proteinlösung wurde dann mit der gewaschenen Matrix versetzt und 3 h bei 4 °C auf einem Wipptisch (WT12, Biometra, Göttingen) geschüttelt. Die Matrix wurde anschließend durch Zentrifugation (200 x g, 2 min, 4 °C) sedimentiert und der Überstand ( $\ddot{U}_1$ ) abgenommen. Nach einem Waschschrift ( $W_1$ ) mit Puffer  $A_{\text{Kation}}$  wurden die gebundenen Proteine in zwei Schritten mit Puffer  $B_{\text{Kation}}$  eluiert und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von der Matrix abgetrennt. Der Überstand ( $\ddot{U}_1$ ) aus der ersten Beladung der Matrix wurde mit einer frischen Matrix versetzt und das oben beschriebene Verfahren wiederholt.

Die aus dem Batch-Verfahren gewonnenen Eluate wurden in Dialyseschläuche (ZelluTrans, Roth, MWCO 12.000-14.000) überführt und bei 4 °C zweimal je 4 h und einmal über Nacht gegen 4 l Puffer  $A_{\text{Anion}}$  (25 mM Tris/HCl pH 9,2; 5 mM EDTA) dialysiert. Die auf diese Weise umgepufferte Proteinlösung wurde anschließend filtriert (Cellulose Acetat Filter, 0,45  $\mu\text{m}$ , Sartorius, Göttingen; Spritzenvorsatzfilter Swinnex 25, Millipore, Schwalbach) und so Reste der Matrix entfernt. Die dialysierten Eluate wurden anschließend vereinigt und mittels Zentrifugation (2.600 x g, 60 min, 4 °C) in 20 ml Konzentratoren (Vivaspin20, MWCO 10.000, Vivascience, Hannover) bis auf ein Volumen von 5 ml eingengt.

### 2.6.5 Anionen-Austauschchromatographie

Für die Anionen-Austauschchromatographie wurde das Chromatographiesystem ÄKTApurifier (Box-900, pH/C-900, UV-900, P-900, GE Healthcare, Freiburg) eingesetzt.

Die eingengte Proteinlösung aus dem Batch-Verfahren (5 ml) wurde zunächst auf eine mit Puffer  $A_{\text{Anion}}$  äquilibrierte Anionentauscher-Säule (Resource Q, 6 ml Säulenvolumen, GE Healthcare,

Freiburg) appliziert und anschließend mittels eines linearen Salzgradienten (bis 1 M NaCl in Puffer B<sub>Anion</sub> (Puffer A<sub>Anion</sub> + 1 M NaCl) über 20 Säulenvolumen eluiert. Die dabei gewählte Flußgeschwindigkeit betrug 3 ml/min. Alle Chromatographieschritte wurden bei rt durchgeführt. Fraktionen, welche die höchste Menge an aktivem (Kap. 2.7.1 und 2.9.2) *SSBT3* enthielten, wurden vereinigt, mittels Zentrifugation in 20 ml Konzentratoren bis auf ein Volumen von ca. 500 µl eingengt und gleichzeitig in einem Aufbewahrungspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5) umgepuffert. Die Proteinkonzentration der aufkonzentrierten Probe wurde anschließend gemessen (Kap. 2.9.2) und das aufgereinigte *SSBT3* für die weitere Verwendung bei - 80 °C aufbewahrt.

## **2.7 Enzymaktivitätstests**

### **2.7.1 Test mit fluorogenem Systemin-Peptid**

Für die Messung der *SSBT3*-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(NO<sub>2</sub>)) auf. Bei der Anregung der Abz-Gruppe kommt es zur Emission von Fluoreszenz, welche im ungespaltenen Peptid durch den in Nachbarschaft gebundenen Quencher abgefangen wird. Erst nach einer hydrolytischen Spaltung des Peptids durch die Aktivität der *SSBT3*-Protease kommt es zur räumlichen Trennung der Fluoreszenz- und der Quencher-Gruppe, so dass die Emission mittels Fluoreszenzphotometer gemessen werden kann.

Die Messung der *SSBT3*-Aktivität erfolgte in Mikrotiterplatten (white Microwell SI, Nunc, Wiesbaden) an einem Fluoreszenzphotometer (Cary Eclipse, Varian, Darmstadt) über einen Zeitraum von 30 min bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm. Wenn nicht anders angegeben, wurde der Aktivitätstest in einem Gesamtvolumen von 200 µl bei einer Substratkonzentration von 10 µM in einem Messpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0) und einer *SSBT3* Konzentration von 24 ng/µl durchgeführt.

### **2.7.2 MALDI-TOF-MS**

Alle Untersuchungen am MALDI-TOF-MS wurden am Functional Genomics Center (Protein Analysis Group) der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich (Schweiz) durchgeführt.

Die enzymatische Spaltung verschiedener synthetischer Peptide (Systemin, Glucagon, oxidierte Insulin-B-Kette, Mellitin, Bradykinin, Neurotensin und Substance P) durch *SSBT3* wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Ultraflex TOF/TOF, Bruker Daltonics, Bremen) untersucht. Diese Methode erlaubt es, entstandene Peptidfragmente nachzuweisen und zu identifizieren. Auf diese Weise können erste Hinweise auf die Präferenz von *SSBT3* für die Aminosäuren in der

$P_1$ - bzw.  $P_1'$ -Position (Aminosäuren auf der Amino-, bzw. Carboxyseite der Spaltstelle; SCHECHTER & BERGER 1967) abgeleitet werden.

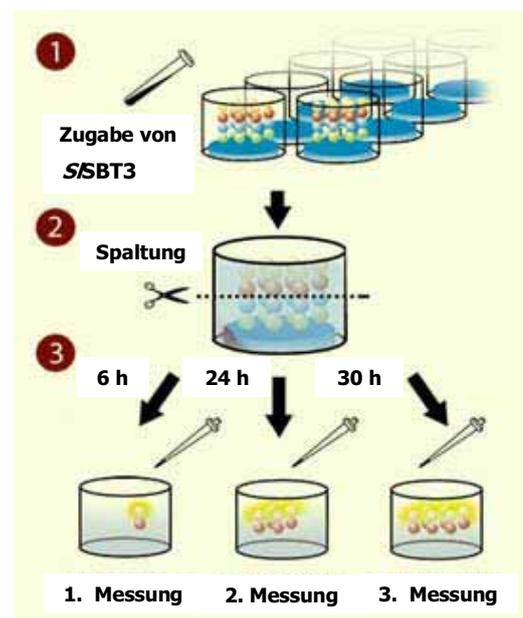
Wenn nicht anders angegeben, wurde die Reaktion in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l Reaktionspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5) mit 1-2 pmol *SSBT3* und 2,5 nmol des entsprechenden Peptids durchgeführt. Der Versuchsansatz wurde bei rt inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten ( $t_0$ ,  $t_{10\text{min}}$ ,  $t_{30\text{min}}$ ,  $t_{2\text{h}}$ ,  $t_{15\text{h}}$ ) wurden 0,8  $\mu$ l Aliquote entnommen und auf der MALDI-TOF-MS Probenplatte (Goldchip) mit gleichem Volumen der Kristallisationsmatrix (2 Teile gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäure mit 0,1 % Trifluoressigsäure, 1 Teil Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure) gemischt, was eine Co-Kristallisation von Matrix und Peptiden auf der Probenplatte bewirkt (BEAVIS ET AL. 1992). Die Kristalle wurden dreimal mit kaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet, bevor das Massenspektrum aufgenommen wurde.

### 2.7.3 Protease Spot-Test

Der Protease Spot-Test beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie der Enzymaktivitätstest mit fluorogenem Systemin-Peptid (Kap. 2.7.1). Allerdings waren hier die fluoreszenzmarkierten Abz (*o*-aminobenzoyl) Peptidsubstrate über den C-Terminus an Cellulose-Membranen gebunden. Diese wurden vom Hersteller (JPT, Berlin) als kleine ausgestanzte Scheiben in 96-well Mikrotiterplatten geliefert. Pipettierte man eine Lösung mit proteolytischer Aktivität zu den Peptidsubstraten hinzu, wurde der fluoreszenzmarkierte Teil von der Cellulose-Membran abgespalten, konnte in Aliquoten aus dem Überstand entnommen und die Fluoreszenz zu definierten Zeitpunkten in einer neuen Mikrotiterplatte am Fluoreszenzphotometer gemessen werden (Abb. 2.1).

Zu Beginn des Versuchs wurden die Cellulose-Membranen in der Mikrotiterplatte nach Herstellerangaben unter Schwenken einmal 5 min mit 200  $\mu$ l Methanol und viermal 10 min mit 200  $\mu$ l Messpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0) gewaschen. Anschließend wurden 200  $\mu$ l Reaktionsansatz

bestehend aus Messpuffer und einer *SSBT3*-Konzentration von 24 ng/ $\mu$ l auf die Cellulose-Membranen pipettiert und im Dunkeln bei rt inkubiert. Dabei wurde die Mikrotiterplatte mit Parafilm verschlossen, um einer Verdunstung vorzubeugen.



**Abb. 2.1 Prinzip des Protease Spot-Tests**  
(JPT Protocol, [www.jpt.com/products/enzyme\\_profiling/protease\\_profiling/proteasespots.htm](http://www.jpt.com/products/enzyme_profiling/protease_profiling/proteasespots.htm))

50 µl Aliquote wurden zu Beginn des Versuchs (0 h) sowie nach 6 h, 24 h und 30 h entnommen und in einer Mikrotiterplatte (white Microwell SI, Nunc, Wiesbaden) am Fluoreszenzphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm gemessen. Die ermittelten Umsatzraten wurden verglichen und in Relation zu der Umsatzrate von Systemin gesetzt. Die Umsatzrate von Systemin wurde gleich 1 gesetzt.

## **2.8 Test auf Glykosylierung bzw. Phosphorylierung von *S*SBT3**

Mittels Enzymverdau wurde die eventuelle Glykosylierung bzw. Phosphorylierung von *S*SBT3 untersucht. Sowohl die Deglykosylierung mittels N-Glykosidase F als auch die Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase wurde nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot, bzw. New England BioLabs, Frankfurt a. M) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Die verdauten und unverdauten Ansätze von *S*SBT3 wurden in einem 7 %-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und so das Laufverhalten von *S*SBT3 vor und nach Enzymbehandlung verglichen.

## **2.9 Proteinanalytische Methoden**

### **2.9.1 Proteinextraktion**

#### **2.9.1.1 Gesamt-Proteinextraktion**

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 % Triton X-100, 1 x Proteinaseinhibitor Cocktail) zugesetzt. Der Ansatz wurde abzentrifugiert (15.000 x *g*, 5 min, 4 °C) und die Proteinkonzentration im Überstand nach BRADFORD (1976) bestimmt (Kap. 2.9.2). Die Proben wurden mit Ladepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 100 mM Dithiothreitol; 2 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % Glycerin) versetzt, im Wasserbad bei 100 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und durch SDS-PAGE analysiert.

### **2.9.1.2 Proteinextraktion aus Kot von *Manduca sexta*-Larven**

Frischer Kot von *Manduca sexta*-Larven wurde gesammelt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und Proteine nach der Methode von CHEN ET AL. (2005) extrahiert. Dafür wurden ca. 300 mg gefrorener Kot vorsichtig gemörsert und mit 300 µl Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 % β-Mercaptoethanol; 1 x Proteinaseinhibitor Cocktail) versetzt.

Der Ansatz wurde zentrifugiert (15.000 x *g*, 10 min, 4 °C) und die Proteinkonzentration im Überstand nach BRADFORD (1976) bestimmt (Kap. 2.9.2). Die Proben wurden mit Ladepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 100 mM Dithiothreitol; 2 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % Glycerin) versetzt, der Ansatz 5 min bei 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und einer Western Blot-Analyse unterzogen.

### **2.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Bestimmung der Gesamtkonzentration an löslichem Protein wurde mittels einer photometrischen Methode nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Die Extinktion bei 595 nm wurde mit einem UV-Vis Spektrophotometer (DU530, Beckmann) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anschließend anhand einer BSA-Eichgeraden errechnet.

### **2.9.3 Western Blot-Analyse**

#### **2.9.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) im diskontinuierlichen Gelsystem nach LAEMMLI (1970) mit 7 bzw. 9 %-igen (w/v) Trenngelen in Mini-PROTRAN® 3 Cell-Apparaturen (BioRad, München). 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, # SM671, Fermentas, St. Leon-Rot).

#### **2.9.3.2 Proteindetektion mittels Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung**

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 % Essigsäure, 30 % Methanol) entfärbt.

### 2.9.3.3 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen

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

### 2.9.3.4 Immunodetektion mit Hilfe des *S/SBT3*-Antiserums

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden bei rt durchgeführt. 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 % Tween 20, 6 % Milchpulver, Regilait, Saint Martin Belle Roche, Frankreich) abgesättigt. Die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern (anti-*S/SBT3*, Verdünnung 1:2.000) erfolgte in frischer Blockierungslösung über 2 - 3 h.

Anschließend wurden unspezifisch gebundene Antikörper in zwei 10-minütigen Waschschritten (1x TBS, 0,1 % Tween 20) entfernt und die Membran erneut 10 min in frischer Blockierungslösung inkubiert. Die Inkubation der Membran mit den Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (Verdünnung 1:10.000) erfolgte in frischer Blockierungslösung über 1 h. Die Membran wurde danach erneut dreimal 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 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) geschwenkt und zwischen zwei Plastikfolien gelegt wurde. Anschließend wurde die Membran ca. 10 - 30 s gegen einen Röntgenfilm (CL-Xposure™ Films, Pierce, Bonn) exponiert.

## **2.10 Molekularbiologische Methoden**

### **2.10.1 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **2.10.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Prep)**

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von BIRNBAUM & DOLY (1979).

#### **2.10.1.2 Isolierung von genomischer DNA (CTAB-Methode)**

300 mg junges Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben und zügig 800 µl vorgewärmter (65 °C) CTAB-Extraktionspuffer (2 % (w/v) CTAB (Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid); 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl, 2% β-Mercaptoethanol) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 30 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurde ein Volumen Chloroform zugegeben, gut gemischt und anschließend zentrifugiert (15.000 x g, 5 min, rt). Die wässrige Phase wurde mit 1/10 Volumen vorgewärmtem CTAB-NaCl-Puffer (10 % (w/v) CTAB; 0,7 M NaCl) versetzt, mehrmals invertiert und ein weiteres Mal mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Nach der Zentrifugation (15.000 x g, 5 min, rt) wurde die wässrige Phase mit einem Volumen CTAB-Präzipitationspuffer (1 % (w/v) CTAB; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA) versetzt und vorsichtig invertiert. Nach der Zentrifugation (15.000 x g, 5 min, rt) wurde das DNA-Präzipitat in 300 µl high-salt-TE (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 M NaCl) gelöst. Mit 0,6-fachem Volumen Isopropanol wurde die DNA über Nacht bei rt erneut gefällt und das Präzipitat anschließend abzentrifugiert (15.000 x g, 5 min, 4 °C). Die gefällte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 60 µl TE/RNase (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 10 µg/ml RNase) gelöst. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und die DNA erneut mit 1/3 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 2,5-fachem Volumen 100 % Ethanol 30 min auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation (15.000 x g, 20 min, 4 °C) wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.10.1.3 Isolierung von RNA**

Für die RNA-Isolierung wurden ca. 300 mg Blatt- bzw. Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben und in 750 µl Extraktionspuffer (75 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 25 mM EDTA; 1 % SDS; 1 M β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Dann wurde ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50/24/1) zugegeben und der Ansatz gut gemischt. Nach der Zentrifugation (10.000 x g, 4 °C, 10 min) wurde die wässrige Phase abgenommen, zweimal mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50/48/2) extrahiert und erneut zentrifugiert. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase mit ¼ Volumen 10 M LiCl versetzt und 2 h bei 4 °C

auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde erneut abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 400 µl DEPC-Wasser (0,01 % Diethylpyrocarbonat) gelöst. Es folgte eine Ethanol-Fällung (1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4,8; 2,5-faches Volumen 100 % Ethanol) über ca. 2 h bei -20 °C. Danach wurde die gefällte RNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser gelöst.

### 2.10.2 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten wurden 0,8 bis 1,5 %-ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA) mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid unter Verwendung horizontaler Elektrophoresekammern benutzt. Als Größenstandard diente ein 1 kb-DNA- sowie ein 100 bp-DNA-Standard (Gene Ruler™ DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) als auch die mit *Pst*I verdaute DNA des λ-Phagen.

### 2.10.3 Auswahl transgener Linien auf Selektionsmedium

Zur Vorselektion wurden sämtliche transformierten Linien (*SISBT3*-Promotor::*GUS*-, *SISBT3*-RNAi- und *SISBT3*-Überexpressionspflanzen) auf Selektionsmedium (0,44 % (w/v) MSMO; 3 % (w/v) Saccharose, 6 % (w/v) Agar; 0,0075 % (w/v) Kanamycin; pH 5,8 (KOH)) ausgesät. Nach drei bis vier Wochen wurden die kanamycinresistenten Linien identifiziert und nur diese für weitere Analysen verwendet.

### 2.10.4 RT-PCR

2 µg RNA wurden mit Hilfe der Reversen Transkriptase "RevertAID™ M-MuLV" nach Protokoll des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot) in einem Gesamtvolumen von 20 µl in cDNA umgeschrieben. Die Standard-PCR wurde in einem Volumen von 25 µl in Gegenwart von 5 µl 5 x PCR-Puffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,08 % Triton X-100; 20 % DMSO; 250 mM KCl; 50 mM Tris/HCl, pH 8,3); 0,5 µl dNTPs (10 mM), jeweils 1 µl Taq-Polymerase und je 0,5 µl Forward und Reverse Primer (10 µM) verwendet. Die Menge an als Matritze eingesetzter DNA variierte je nach Ausgangsmaterial:

Für die Herstellung von DNA-Sonden wurde eine DNA-Konzentration von 1 ng/µl verwendet. Wurde die PCR benutzt, um cDNA nach erfolgter Reverser Transkription zu amplifizieren, dienten 2 ng/µl cDNA als Matritze.

Die verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1 aufgelistet. Es wurden folgende PCR-Programme verwendet (Tab. 2.4).

**Tab. 2.4 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme**

### Sondenherstellung

	<i>SSBT3</i> -Sonde	PR-3a-Sonde	NPTII-Sonde
Denaturierung	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min
	95 °C, 20 s	95 °C, 20 s	95 °C, 20 s
Annealing	55 °C, 40 s	54 °C, 40 s	57 °C, 40 s
Elongation	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s	72 °C, 60 s
	30 Zyklen	30 Zyklen	20 Zyklen

### RT-Reaktionen

	<i>SSBT3</i>	Aktin	PR-3a
Denaturierung	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min
	95 °C, 20 s	95 °C, 20 s	95 °C, 20 s
Annealing	64 °C, 40 s	58 °C, 30 s	58 °C, 30 s
Elongation	72 °C, 90 s	72 °C, 45 s	72 °C, 45 s
	35 Zyklen	30 Zyklen	30 Zyklen

## 2.10.5 Southern Blot-Analyse

### 2.10.5.1 Restriktionsverdau von genomischer DNA

Zur Fragmentierung der genomischen DNA wurden 10 µg DNA mit je 50 U des Restriktionsenzym und entsprechendem Puffer in einem Endvolumen von 100 µl bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden nochmals 50 U des gleichen Enzyms zugesetzt und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Die verdaute DNA wurde anschließend mit einem Volumen Isopropanol gefällt und das Präzipitat in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.10.5.2 Auftrennung der DNA-Fragmente und Transfer auf Nitrocellulose-Membranen

Die durch den Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einem 0,8 %-igen TAE-Agarosegel in Anwesenheit von Ethidiumbromid aufgetrennt. Vor dem Auftragen der Ansätze wurden diese mit Ladepuffer (5 % Glycerin; 0,1 mM EDTA; 0,003 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Als Größenmarker diente die mit *Pst*I verdaute DNA des λ-Phagen. Die Gele liefen über Nacht bei 20 V in 1 x TAE-Puffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert und für 20 min in 0,25 N HCl inkubiert. Anschließend folgten weitere Inkubationen für

30 min in Denaturierungs-Lösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) und zweimal 15 min in Neutralisierungs-Lösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris/HCl pH 7,2; 1 mM EDTA). Für den Blot-Aufbau wurde das Blotting-Papier (3MM, Whatman, Dassel) mit 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Tri-Na-Citrat-Dihydrat; pH 7,0) angefeuchtet, die Nitrocellulose-Membran (PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman, Dassel) gewässert und dann kurz in 20 x SSC inkubiert.

Der Blotaufbau erfolgte luftblasenfrei in leicht modifizierter Form nach THOMAS (1980). Der Unterschied zu der beschriebenen Methode bestand darin, dass die zwei Lagen Blotting-Papier, auf welchen der Blot aufgebaut wurde, auf einer Glasplatte lagen, welche quer über eine mit 20 x SSC gefüllte Glasschale platziert wurde. Die Enden des Blotting-Papiers tauchten in die 20 x SSC-Lösung ein, wodurch eine Flüssigkeitsbrücke gebildet wurde, welche den Kapillartransfer ermöglichte. Nach erfolgtem Transfer über Nacht in 20 x SSC wurde die Nitrocellulose-Membran kurz in 2 x SSC gespült, getrocknet und anschließend durch UV-Strahlung auf der Membran fixiert (120 mJ Stratalinker® 1800 Stratagene, La Jolla, CA, USA). Die Membran wurde bis zur Hybridisierung bei rt aufbewahrt.

### **2.10.6 Northern Blot-Analyse**

Für die Northern Blot-Analyse der *SSBT3*-RNAi und *SSBT3*-Überexpressionspflanzen wurden Tomatenpflanzen auf MS-Medium angezogen (0,44 % (w/v) MSMO; 3 % (w/v) Saccharose, 6 % (w/v) Agar; pH 5,8 (KOH)), die Wurzeln nach 3 Wochen geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für alle anderen Northern Blot-Analysen wurde RNA aus Blattmaterial extrahiert. Die Extraktion erfolgte wie unter Kapitel 2.10.1.3 beschrieben.

#### **2.10.6.1 Auftrennung der RNA und Transfer auf Nitrocellulose-Membranen**

Für die Northern Blot-Analysen wurde pro Ansatz 7,5 µg RNA mit Ladepuffer (1 x MOPS-Puffer (0,04 M 3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure; 10 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 7,0); 16 % Formaldehyd; 45 % Formamid; 5 % Glycerin; 0,1 mM EDTA; 0,003 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt, dann 15 min bei 65 °C inkubiert und anschließend in zwei identischen Formaldehyd/Agarosegelen (1 x MOPS-Puffer, 18 % Formaldehyd; 1,2 % (w/v) Agarose) aufgetrennt.

Die Elektrophorese erfolgte über 5 h bei 60 V in 1 x MOPS-Puffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zweimal 15 min in Wasser gewaschen. Das Gel für die Ethidiumbromidfärbung wurde anschließend 30 min in Wasser mit 1 µg/ml Ethidiumbromid inkubiert, über Nacht in einem großen Volumen Wasser entfärbt und dann unter UV-Licht photographiert. Das Gel für den Membrantransfer wurde 15 min in 10 x SSC inkubiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde gewässert, und dann ebenso wie das Blotting-Papier in 10 x SSC inkubiert. Der Blotaufbau für den

Transfer der RNA auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte wie unter Kapitel 2.10.5.2 beschrieben. Nach erfolgtem Transfer über Nacht in 10 x SSC wurde die Nitrocellulose-Membran kurz in 2 x SSC gespült, getrocknet und anschließend durch UV-Strahlung auf der Membran fixiert (Stratalinker, 120 mJ). Die Membran wurde bis zur Hybridisierung bei rt aufbewahrt.

### 2.10.7 Sonderherstellung und Hybridisierung

Die hier verwendeten Sonden für den Proteinase-Inhibitor-II (*SPI-II*) und Ubiquitin (*SUBQ*) wurden von KAROJET (2006) zur Verfügung gestellt.

Die *SSBT3*-Sonde und die *SPR3a*-Sonde wurden mittels PCR mit den Primerpaaren P355/T7 bzw. T3/T7 auf Plasmid-DNA amplifiziert (Kap. 2.1 und Kap. 2.10.4). Es folgte eine Aufreinigung mit zwei Volumen Phenol/Chloroform und anschließend eine Ethanol-Fällung. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurden die Sonden in je 20 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit dem RadPrime Labelling-Kit nach Protokoll des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe). Hierfür wurden 25 ng Template-DNA und α [<sup>32</sup>P]-dCTPs verwendet. Die radioaktiv markierte Sonde wurde durch Zentrifugation (1.000 x *g*, 3 min, rt) durch eine Säule (Bio-Spin-Column, Invitrogen, Karlsruhe) von freien Nucleotiden getrennt. Anschließend wurde die spezifische Aktivität der Sonde an einem Tischzintillationszähler (Bench-Count, Du Pont de Nemours, Dreieich) bestimmt.

Für die Hybridisierung wurden die Nitrocellulose-Membranen mit ddH<sub>2</sub>O angefeuchtet, kurz in 5 x SSC inkubiert und dann in eine Hybridisierungs-Röhre mit 20 ml Hybridisierungs-Lösung (50 % Formamid; 5 x SSC; 50 mM KPP pH 7,0; 0,5 % (w/v) SDS; 2 x Denhardts Reagenz (0,04 % (w/v) Ficoll 400; 0,04 % (w/v) PVP (Polyvinylpyrrolidon; 0,04 % (w/v) BSA); Lachssperma-DNA, partiell hydrolysiert, denaturiert, 100 µg/ml) überführt. Die Prähybridisierung erfolgte für mindestens 2 h bei 42 °C. Die Hybridisierungs-Lösung wurde erneuert, die Sonde, welche für 5 min auf 95° C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt wurde, zugesetzt und über Nacht bei 42 °C inkubiert. Zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Sonde erfolgte je ein Waschschrift für 30 min bei 60 °C mit Waschlösung 1 (1 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS) und Waschlösung 2 (0,2 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS). Die Auswertung der Blots erfolgte mittels PhosphoImager (Typhoon-Imager, GE Healthcare, Freiburg) und einer ImageQuant Software.

### 2.10.8 Strippen von Blots

Die Waschlösung (0,04 x SSC; 0,04 % SDS) wurde in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt, der Blot dann in die heiße Waschlösung überführt und für weitere 2 min in der Mikrowelle am Siedepunkt gehalten. Anschließend wurde die Waschlösung mit der Membran für 30 min unter Schütteln abgekühlt. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt.

### 2.11 Histochemischer GUS-Test

Das zu untersuchende Pflanzenmaterial wurde nach dem Abtrennen sofort in X-Gluc-Färbelösung (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2; 10 mM EDTA; 0,1 % Triton X100; 2 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ ; 2 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ ; 0,75 mg/ml X-Gluc) überführt und dreimal 2 min im Vakuum infiltriert. Anschließend wurde das Material über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag mit 70 % Ethanol entfärbt.

### 2.12 Dünnschnitte GUS-gefärbter Hypocotyle

Das Pflanzenmaterial (Kap. 2.11) wurde über Nacht in FAA-Lösung (50 % Ethanol, 5 % Eisessig, 3,7 % Formaldehyd) fixiert und danach mit ansteigenden Konzentrationen Ethanol (50 %, 70 %, 85 % und 100 %) jeweils 12 h sowie ein zweites Mal in 100 % Ethanol über Nacht dehydriert. Nach der Entwässerung folgte die Präinfiltration mit ansteigenden Konzentrationen Technovit-Lösung 7100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) (25 %, 50 % und 75 %) für je 12 h und in 100 % Technovit für 24 h. Im nächsten Schritt wurde über Nacht Technovit 7100 und Härter I (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) infiltriert und anschließend die Polymerisation mit Härter II (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) über Nacht im Deckel eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes durchgeführt. Mit Techovit 3040 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) wurde das Polymerisationsprodukt am Histobloc befestigt.

Am Rotationsmikrotom (RM 2255, Leica, Heidelberg) wurden ca. 5 - 8  $\mu\text{m}$  dicke Dünnschnitte erstellt, diese mit einem Pinsel auf einen mit  $\text{H}_2\text{O}$  benetzten Objekträger transferiert, bei 60 °C auf einer Heizplatte getrocknet und unter dem Lichtmikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss) im Hellfeld ausgewertet.

### 2.13 Messung der Proteinaseinhibitoraktivität

Aus Blättern mechanisch verwundeter Pflanzen (Kap. 2.14.3) wurden Proteinextrakte gewonnen und in ihnen die Proteinaseinhibitoraktivität bestimmt. Dazu wurde Blattmaterial von je 5 Pflanzen pro Probe sofort nach der Ernte gewogen, 3 ml kalter Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,8; 7 % (w/v) PVPP (Polyvinylpyrrolidon); 1,67 mM Phenyl-Thio-Harnstoff; 0,3 M KCl; 0,4 mM Ascorbinsäure) pro g Frischgewicht zugegeben und die Proben im Mörser zerrieben. Das Homogenat wurde abzentrifugiert (15.000  $\times g$ , 10 min, 4 °C) und der geklärte Überstand bei -20 °C aufbewahrt.

Der Proteinaseinhibitor-Test basiert auf der Hemmung der hydrolytischen Spaltung des chromogenen Substrats BtpNA (N-Benzoyl-L-Tyrosin *p*-Nitroanilin) durch Chymotrypsin. Das dabei entstehende *p*-Nitroanilin kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen

werden. Proteinaseinhibitoren aus dem pflanzlichen Enzymrohextrakt hemmen Chymotrypsin, was zu einer verringerten Bildung von *p*-Nitroanilin führt. Die gemessene Extinktion ist der Konzentration von gebildetem *p*-Nitroanilin proportional und dient als Maß für die Chymotrypsin-Aktivität.

Der gewonnene Proteinaseinhibitorextrakt wurde zunächst 10 min bei rt mit Chymotrypsin (0,1 mg/ml in 0,001 N HCl) inkubiert. Für den Kontrollansatz wurde der Extraktionspuffer mit Chymotrypsin inkubiert. Die Bindung des Inhibitors an die Protease wurde anschließend mit 66 mM Tris/HCl, pH 7,8; 80 mM CaCl<sub>2</sub> abgestoppt. BtpNA (0,25 µg/ml) wurde zugegeben und die Absorption bei 405 nm über einen Zeitraum von 20 min gemessen.

### **2.14 Behandlung von Wildtyp-Tomatenpflanzen**

#### **2.14.1 Fusicoccin- und Salicylsäurebehandlung**

Zwei Wochen alte Wt-Tomatenpflanzen wurden mit Phosphatpuffer (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,5), welcher Fusicoccin (3 µM, aus 1 mM Stammlösung in Ethanol) bzw. Acetyl-Salicylsäure (2 mM) enthielt, nach der Methode von SCHALLER ET AL. (2000) behandelt. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die nur mit Pufferlösung (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,5) behandelt worden waren. Blattmaterial von sechs Blättern wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung für spätere RNA-Extraktion geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **2.14.2 Infektionsversuche mit *P. syringae* und *X. campestris***

Drei Wochen alte Wt-Tomatenpflanzen wurden mit den pflanzenpathogenen Stämmen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Stamm 93-1 bzw. *Pseudomonas syringae* Stamm DC 3000, wie bei KATAGIRI ET AL. (2002) beschrieben, infiziert. Die Bakterien wurden für drei Tage bei 30 °C auf Nutrient Broth Medium (Fluka, Taufkirchen) (0,8 % (w/v) NB; 1,2 % (w/v) Agar) (*X. campestris*) bzw. auf Lysogeny Broth-Medium (2 % (w/v) LB; 20 µg/ml Rifampicin; 1,2 % (w/v) Agar) (*P. syringae*) kultiviert. Anschließend wurden ÜN-Kulturen von den Bakterien in flüssigem NB- (8 g NB/l) bzw. LB-Medium (20 g LB/l) bei 30 °C angezogen und die Bakteriensuspension am folgenden Tag auf einem OD<sub>600</sub> Wert von 0,4 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Suspension wurde dann nochmals 1:100, zu einer endgültigen Konzentration von 10<sup>6</sup> cfu/ml, mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Circa 50 - 100 µl dieser Suspension wurden mit einer Spritze in die Blattunterseite je eines Primärblattes der Pflanzen infiltriert. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die nur mit verdünntem Medium infiltriert wurden. Blattmaterial von vier infizierten Blättern wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infiltration für spätere RNA-Extraktion geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 2.14.3 Mechanische Verwundung

Zwei Wochen alte Wt-Tomatenpflanzen wurden mechanisch verwundet, indem ein Blatt pro Pflanze mit einer Arterienklemme leicht gequetscht wurde (CONSTABEL ET AL. 1995). Verwundet wurde senkrecht zur Mittelvene. Nach 1 h wurde erneut am selben Blatt parallel zur ersten Verwundung in Richtung Blattstiel verwundet. Blattmaterial von sechs verwundeten Blättern wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Verwundung für spätere RNA-Extraktion geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 2.14.4 Verwundung durch *Manduca sexta*-Larven

Für die Verwundung von Tomatenpflanzen durch *Manduca sexta*-Larven wurde die von KAROJET (2006) entwickelte Versuchsanordnung verwendet. Bei dieser Methode wurden Raupen im fünften Larvenstadium auf dünne Holzstäbe gesetzt, die dann in die Pflanzentöpfe gesteckt wurden (Abb. 2.2). Ein direktes Aufsetzen der Larven auf die drei Wochen alten Tomatenpflanzen war nicht möglich, da die L5-Larven 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 fünfte Larvenstadium erreicht hatten, nicht konstant an den Pflanzen fraßen, wodurch keine vergleichbaren Ergebnisse erzielt werden konnten (KAROJET 2006). 12 h vor dem Versuch wurde den eingesetzten Raupen jegliche Nahrungsquelle entzogen. Nach Versuchsbeginn wurden die Larven ca. 10 - 15 min an den Versuchspflanzen belassen, bis eine Blattfläche von ungefähr 1,5 - 2 cm<sup>2</sup> gefressen worden war. Nach 1 h wurden die Pflanzen nochmals wie beschrieben verwundet. Blattmaterial von vier verwundeten Blättern wurde zu den angegebenen Zeitpunkten für spätere RNA-Extraktion geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.



**Abb. 2.2 Versuchsaufbau für das Verwundungs-Experiment mit *M. sexta*-Raupen**

## 2.15 Experimente mit *Manduca sexta*

### 2.15.1 Larvenentwicklung

#### Experiment 1:

Larven von *Manduca sexta* wurden bis zu Beginn des dritten Larvenstadiums auf Kunstfutter aufgezogen (Kap. 2.5.3). Nachdem die zweite Häutung abgeschlossen war, wurden etwa gleich große, vitale Raupen auf sechs Wochen alte Tomatenpflanzen verschiedenen Genotyps aufgesetzt. Zum Einsatz kamen je 12 Wt-Pflanzen, *SSBT3*-RNAi Pflanzen der Linie HP 12-5 und *SSBT3*-Überexpressionspflanzen der Linie G2f1D, die randomisiert auf einem Tisch im Gewächshaus aufgestellt waren (Abb. 2.3). Pro Pflanze wurden ein bis zwei Raupen aufgesetzt, insgesamt 19 Raupen pro Genotyp. Die Raupen verblieben ca. 14 Tage, bis zum Erreichen des "wandering"-Stadiums, auf den Pflanzen. Larven, die während des Experiments von den Pflanzen gefallen waren oder die Pflanze verlassen hatten, wurden nicht wieder aufgesetzt. Nach 7 Tagen wurde das Gewicht der Larven bestimmt. Außerdem wurden die Raupen, welche bis zum Erreichen des "wandering"-Stadiums auf den Pflanzen verblieben waren, für jeden Genotyp ausgezählt. Dafür wurden die Raupen im fünften Larvenstadium mit verschiedenen Farbstiften markiert, so dass sie nach dem Verlassen der Pflanzen während des "wandering"-Stadiums noch den drei Pflanzen-Genotypen, auf welchen sie gefressen hatten, zugeordnet werden konnten. Nach der Verpuppung wurde das Gewicht der Puppen bestimmt.



**Abb. 2.3** Versuchsaufbau für das Larvenentwicklungs-Experiment 1 im Gewächshaus



**Abb. 2.4** Versuchsaufbau für das Larvenentwicklungs-Experiment 2 im Gewächshaus

### Experiment 2:

Bei der Wiederholung des Larvenentwicklungs-Experiments wurden pro Pflanzen-Genotyp je 50 *Manduca sexta*-Raupen (L3) auf die Pflanzen gesetzt. Für jeden Pflanzen-Genotyp (Wt, HP-12-5, G2f1D) wurde eine Gruppe von 12 Pflanzen verwendet. In diesem Versuch wurden die drei verschiedenen Pflanzen-Genotypen nicht randomisiert aufgestellt, sondern jeweils abgetrennt in drei einzelnen "Kabinen" (Abb 2.4). So konnten Raupen, die während des Experiments von den Pflanzen gefallen waren oder die Pflanze verlassen hatten, täglich gezählt werden und danach wieder zurück auf die Pflanzen gesetzt werden. Das Gewicht der Larven wurde nach 11 Tagen bestimmt. Alle anderen Parameter waren identisch mit denen des Experiments 1.

#### **2.15.2 "Choice"-Test**

Der Versuchsaufbau des "Choice"-Tests richtete sich in leicht modifizierter Form nach den Angaben von DE BOER & HANSON (1984). Die für den Versuch eingesetzten, auf Kunstfutter angezogenen, Larven befanden sich am Anfang des vierten Larvenstadiums und hatten 12 h vor dem Versuch keine Nahrungsquelle. In einer Glas-Petrischale mit 15 cm Durchmesser wurde ein 1 cm<sup>2</sup> großes Blattstück von jedem Genotyp (Wt, RNAi, ÜE), sowie ein feuchtes Filterpapier gleicher Größe auf einen Reißnagel gesteckt und in gleichmäßigen Abständen am äußeren Rand der Petrischale aufgestellt (Abb. 2.5). Eine Raupe wurde in die Mitte der Petrischale gesetzt und die Petrischale mit einem Glasdeckel abgedeckt.

Beobachtet und ausgewertet wurden 1) in welche Richtung die Raupe zuerst lief, 2) welches Blatt sie zuerst anfraß und 3) ob sie sich umorientierte und wenn ja 4) welches Blatt sie als nächstes fraß. Dabei wurde auch darauf geachtet, dass die jeweiligen Blattstücke bei den Wiederholungsversuchen immer in eine andere Himmelsrichtung orientiert waren. Als optische Hilfestellung bei der Versuchsbeobachtung wurden farbige Klebebänder außen an der Petrischale angebracht, wobei blau = Filterpapier, gelb = RNAi, pink = Wt und rot = ÜE bedeutete. Die Blattstücke wurden vor Versuchsbeginn mit H<sub>2</sub>O besprüht, um ein zu rasches Verwelken zu verhindern, das Filterpapier wurde genauso behandelt. Der Versuch wurde 18-mal wiederholt, bei jeder Wiederholung wurde eine neue Petrischale mit frischen Blattstücken, Filterpapieren und einer neuen Raupe verwendet.



**Abb. 2.5 Versuchsaufbau für den "Choice"-Test**

### 3 ERGEBNISSE

Für die Aufklärung der *in vivo*-Funktion von *S*SBT3 wurden drei Lösungsansätze gewählt:

- i) die biochemische Charakterisierung des aufgereinigten, rekombinanten Proteins,
- ii) die Expressionsanalyse in Tomatenpflanzen,
- iii) die phänotypische Analyse von *S*SBT3-RNAi- und *S*SBT3-Überexpressionspflanzen.

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse aus den drei Lösungsansätzen dargestellt.

#### 3.1 Biochemische Charakterisierung von *S*SBT3

Um eine detaillierte biochemische Charakterisierung auf Proteinebene durchzuführen, muss eine ausreichende Menge an aufgereinigtem, aktivem Protein zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit wurde daher zunächst ein Aufreinigungsprotokoll für homolog in Tomatenzellsuspensionen überexprimiertes *S*SBT3 erarbeitet und die Protease anschließend aus dem Kulturüberstand bis zur Homogenität aufgereinigt. Die Reinheit und die Aktivität wurden in jedem Aufreinigungsschritt anhand von SDS-PAGE und eines Enzymaktivitätstests kontrolliert.

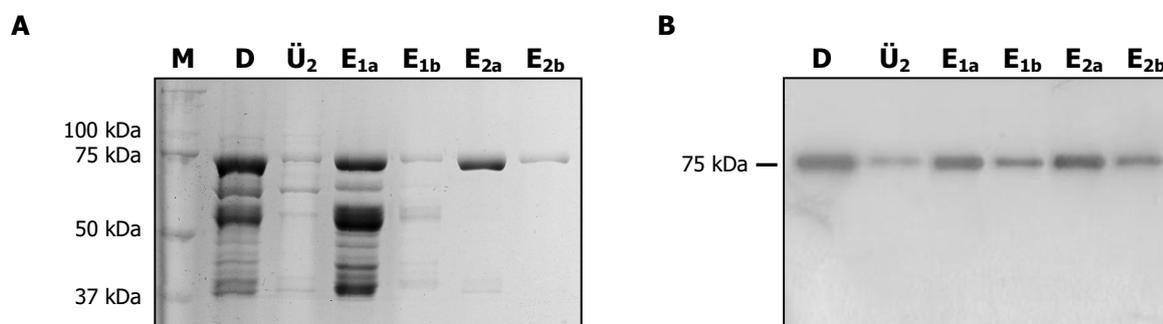
##### 3.1.1 Aufreinigung von *S*SBT3

Für die Erarbeitung eines geeigneten Aufreinigungsprotokolls konnte auf Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen von GABLER (2004) zurückgegriffen werden. Er identifizierte den achten Tag nach Subkultur als optimalen Erntezeitpunkt für die *S*SBT3-Zellkultur. Die im filtrierten Kulturmedium stark verdünnte Protease wurde mittels fraktionierter Ammoniumsulfat-Fällung aufkonzentriert. GABLER (2004) konnte zeigen, dass der größte Teil der sich in Lösung befindlichen *S*SBT3-Protease bei einer Ammoniumsulfat-Sättigung von 60 – 85 % präzipitiert. Das Präzipitat wurde in Dialysepuffer resuspendiert, mittels Dialyse entsalzt und für die nachfolgende Ionenaustauschchromatographie umgepuffert. Das von GABLER (2004) etablierte Puffersystem für die Anionen-Austauschchromatographie (25 mM Tris/HCl pH 9,2; 5 mM EDTA) bzw. Kationen-Austauschchromatographie (25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0; 5 mM EDTA) sowie der lineare Salzgradient (0 bis 1 M NaCl) für die Elution wurden übernommen. Nicht lösen konnte GABLER (2004) ein irreversibles Zusetzen der Chromatographiesäule durch die während des Wachstums der pflanzlichen Zellkultur in großen Mengen gebildeten Polysaccharide. Dies führte vor allem während der Elution zu einer stetig abnehmenden Durchflussrate.

Der erste Ansatz für eine Optimierung des bestehenden Aufreinigungsprotokolles war daher die Entfernung der Polysaccharide aus der Proteinlösung, die dann eine effizientere Proteinaufreinigung mittels Säulenchromatographie erlaubte. Eine Möglichkeit der Vorreinigung von Proteinlösungen ist die Zugabe eines losen Ionenaustauschermaterials zur dialysierten

Proteinlösung (Dialysat) im so genannten Batch-Verfahren (Kap. 2.6.4). Bei geeigneter Wahl des Austauschermaterials und des Puffersystems bindet vorrangig das zu isolierende Protein - in diesem Fall *S*SBT3 - an den Austauscher. Andere Bestandteile der Lösung, wie z. B. störende Polysaccharide bleiben in Lösung, so dass *S*SBT3 dann vorgereinigt vom Austauscher eluiert werden kann. *S*SBT3 band an die SP Sepharose FF und konnte sukzessive von diesem Kationen-Austauschermaterial eluiert und soweit von Polysacchariden befreit werden, dass diese keinen störenden Einfluss auf die nachfolgende Säulenchromatographie nahmen. Es stellte sich heraus, dass *S*SBT3 durch einmalige Elution ( $E_{1a}$ ) nicht vollständig von der Austauschermatrix eluiert werden konnte. Daher wurde ein zweiter Elutionsschritt ( $E_{1b}$ ) angehängt. Um eine möglichst hohe *S*SBT3-Ausbeute aus der dialysierten Proteinlösung zu erhalten, wurde ihrem Überstand aus der Beladung der ersten Matrix frisches Austauschermaterial zugegeben und dieses wieder in zwei Schritten eluiert ( $E_{2a}$ ,  $E_{2b}$ ).

*S*SBT3 band nahezu vollständig an das Kationen-Austauschermaterial (Abb. 3.1.1). Die höchste Menge an *S*SBT3 befand sich in den Eluaten nach Zugabe frischer Austauschermatrix ( $E_{1a}$ ,  $E_{2a}$ ). Im Überstand ( $\ddot{U}_2$ , aus der Beladung der zweiten Matrix) blieb nur wenig *S*SBT3 zurück. Wie das Coomassie-Brilliant-Blue gefärbte SDS-PAGE-Gel zeigt (Abb. 3.1.1A), banden neben *S*SBT3 eine große Anzahl weiterer Proteine aus dem Dialysat, die größtenteils im ersten Schritt ( $E_{1a}$ ) eluiert wurden. In den drei anderen Eluaten ( $E_{1b}$ ,  $E_{2a}$ ,  $E_{2b}$ ) lag *S*SBT3 bereits in nahezu reiner Form vor.



**Abb. 3.1.1 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse des Batch-Verfahrens zur Vorreinigung von *S*SBT3**

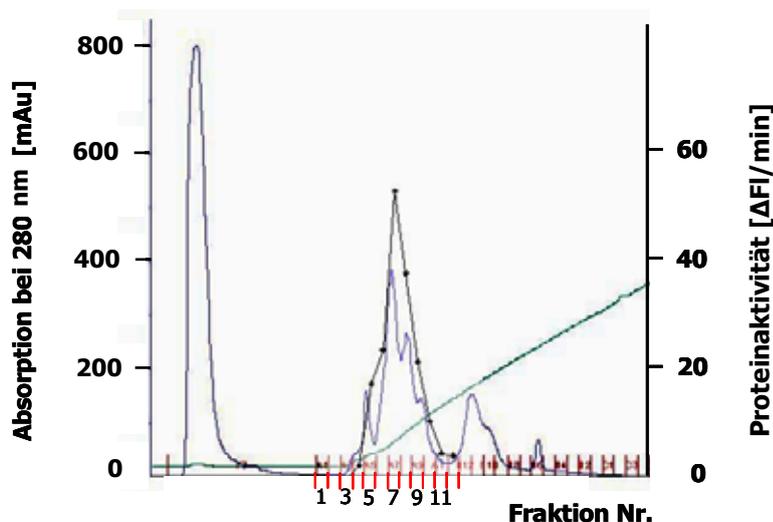
Die Proteinproben wurden in 9 %-igen SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt (**A**) bzw. auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, immunodetektiert und durch ECL (Enhanced Chemo Luminescence) entwickelt (**B**).

**A.** Vom Dialysat (D) wurden 7  $\mu$ g (von 22 mg Gesamtprotein) und vom Überstand ( $\ddot{U}_2$ , aus der Beladung der zweiten Matrix), welcher die ungebundenen Proteine repräsentiert, 4  $\mu$ g (von 22 mg Gesamtprotein) aufgetragen. Von Eluat  $E_{1a}$  wurde 16  $\mu$ g (von 10 mg Gesamtprotein), von  $E_{1b}$  4  $\mu$ g (von 3 mg Gesamtprotein) von  $E_{2a}$  4  $\mu$ g (von 3 mg Gesamtprotein) und von  $E_{2b}$  0,75  $\mu$ g (von 0,6 mg Gesamtprotein) aufgetragen. M bezeichnet den Proteinstandard.

**B.** Vom Dialysat (D) wurden 11  $\mu$ g (von 22 mg Gesamtprotein) und vom Überstand ( $\ddot{U}_2$ ) 7  $\mu$ g (von 22 mg Gesamtprotein) aufgetragen. Von Eluat  $E_{1a}$  wurde 25  $\mu$ g (von 10 mg Gesamtprotein), von  $E_{1b}$  7  $\mu$ g (von 3 mg Gesamtprotein) von  $E_{2a}$  7  $\mu$ g (von 3 mg Gesamtprotein) und von  $E_{2b}$  1  $\mu$ g (von 0,6 mg Gesamtprotein) aufgetragen. Der Western-Blot wurde mit dem primären *S*SBT3-Antiserum (1:2.000) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) behandelt.

In einem weiteren Dialyseschritt wurden die vier Eluate entsalzt und für die abschließende Anionen-Austauschchromatographie (Resource Q) umgepuffert. Es stellte sich heraus, dass durch den Vorreinigungsschritt mittels SP Sepharose FF störende Polysaccharide erfolgreich von der Proteinlösung abgetrennt werden konnten, so dass die Chromatographiesäule daraufhin nicht mehr zusetzte.

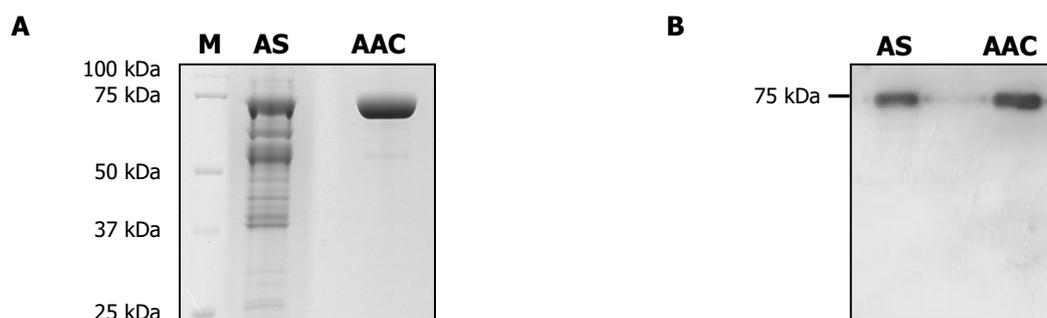
Proteine, die an die Resource Q-Säule gebunden hatten, wurden über 20 Säulenvolumen in 1,5 ml Fraktionen eluiert und die Enzymaktivität der einzelnen Fraktionen unter Verwendung des fluorogenen Systemin-Peptids (Kap. 2.7.1) bestimmt. Abbildung 3.1.2 zeigt das Elutionsprofil der Resource Q-Säule.



**Abb. 3.1.2 Elutionsprofil von *SSBT3* - Chromatogramm der Anionen-Austauscher-Säule (Resource Q)**

Die Proteine wurden über 20 Säulenvolumen mit einem linearen Salzgradienten (0 bis 1 M NaCl) in einem Tris/HCl Puffer (25 mM Tris/HCl pH 9,2; 5 mM EDTA) eluiert (grüne Linie ----) und in 1,5 ml Fraktionen (rot ----) gesammelt. Die blaue Linie (----) zeigt die Absorption bei 280 nm in mAU (Milli-Absorptionseinheiten) die schwarze Linie (----) die Proteinaktivität in ΔFI/min (Fluoreszenzänderung pro Minute), die unter Verwendung des fluorogenen Systemin-Peptids gemessen wurde. F3 repräsentiert die ungebundenen Bestandteile der Probe.

Der erste Peak (F3) repräsentiert die ungebundenen Bestandteile der applizierten Probe, er zeigt keine Enzymaktivität. Das bedeutet, dass *SSBT3* vollständig an die Säule gebunden hatte. Die höchste proteolytische Aktivität befand sich in den Fraktionen sechs bis neun. Diese wurden vereinigt, die Identität der *SSBT3*-Protease in der Western Blot-Analyse überprüft sowie mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit getestet. Die aufgereinigte Protease zeigte eine einzige Bande im SDS-PAGE (Abb. 3.1.3). Dies war zunächst erstaunlich, da das Chromatogramm in diesem Bereich drei Peaks aufweist. Offenbar handelt es sich um mehrere Formen von *SSBT3*, welche posttranslational modifiziert sind. Diese Modifikationen scheinen sich jedoch nur auf das ionische Verhalten und nicht auf das Molekulargewicht auszuwirken. Die Western Blot-Analyse bestätigte, dass es sich bei dem aufgereinigten Enzym um *SSBT3* handelte (Abb 3.1.3 B). *SSBT3* lag somit nach der Anionen-Austauschchromatographie als reines Protein vor.



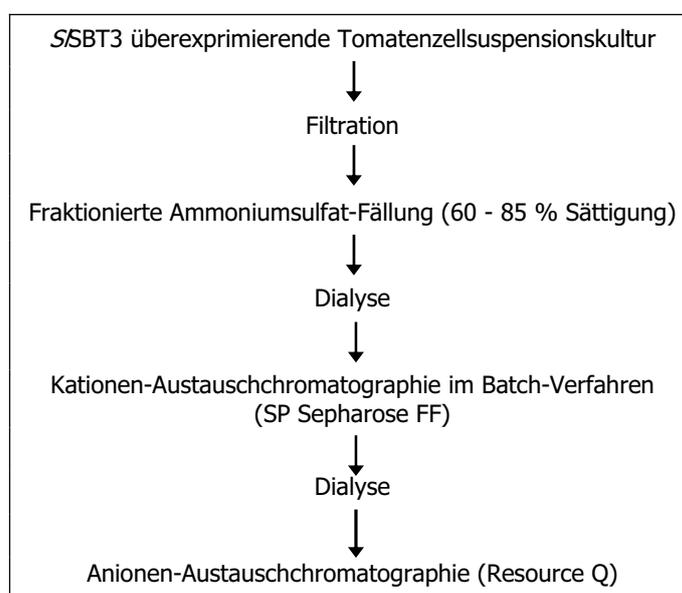
**Abb. 3.1.3** Aufreinigung von *SSBT3* aus dem Zellkulturüberstand von transgenen *S. peruvianum*-Zellen

Dargestellt ist ein Coomassie-Brilliant-Blue gefärbtes 9 %-iges SDS-PAGE-Gel (**A**) sowie ein Western-Blot (**B**).

Der Kulturüberstand (2 l) der *SSBT3*-überexprimierenden Tomatenzellensuspensionskultur wurde nach 8 d Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurden die löslichen Proteine im Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Präzipitation (AS) unterzogen (60 - 85 % Sättigung; 7  $\mu$ g von 22 mg Gesamtprotein aufgetragen). Das Präzipitat wurde dialysiert, mittels Kationen-Austauschchromatographie im Batch-Verfahren (SP Sepharose FF) weiter aufgereinigt, erneut dialysiert und mittels Anionen-Austauschchromatographie (AAC, Resource Q) bis zur Homogenität gereinigt (4  $\mu$ g von 2 mg Gesamtprotein aufgetragen) (**A**).

Für die Western-Blot Analyse wurden die Proteinproben (AS: 5  $\mu$ g von 22 mg Gesamtprotein; AAC: 100 ng von 2 mg Gesamtprotein) in einem 9 %-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Blot wurde anschließend mit dem primären *SSBT3*-Antiserum (1:2.000) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) behandelt und durch ECL (Enhanced Chemo Luminescence) entwickelt (**B**).

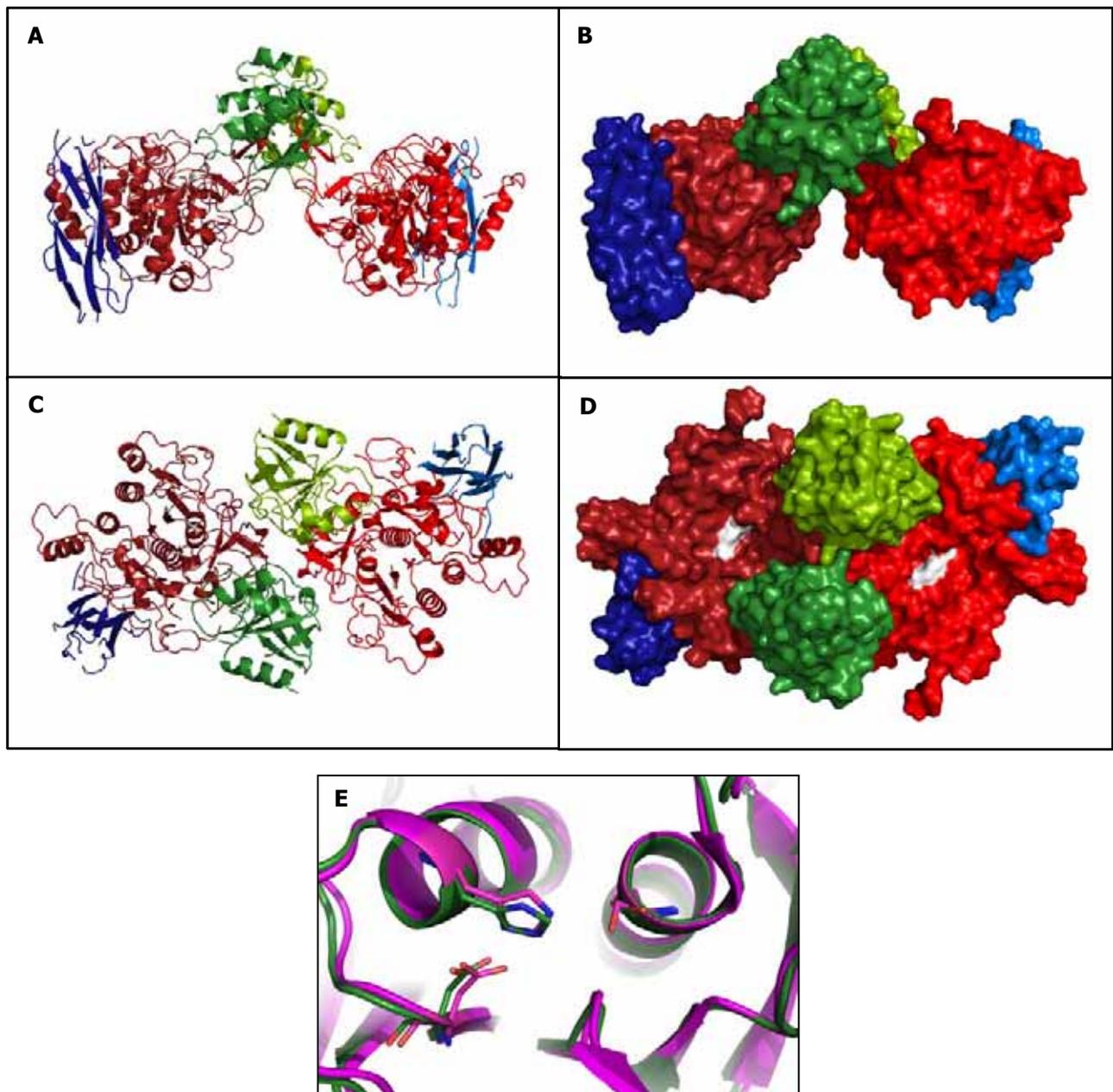
Ein weiterer Aufreinigungsschritt, wie ihn GABLER (2004) mit der Kationen-Austauschchromatographie durchführte, war nicht notwendig. Dieser Schritt wurde daher nicht in das weiterentwickelte Aufreinigungsprotokoll übernommen. Abbildung 3.1.4 zeigt eine schematische Darstellung der einzelnen Schritte des optimierten Aufreinigungsprotokolls für *SSBT3*. Die Ausbeute der Aufreinigung betrug 200  $\mu$ g *SSBT3* pro Liter Zellkultur.



**Abb. 3.1.4** Schematische Darstellung der einzelnen Schritte des Aufreinigungsprotokolls für *SSBT3*

### 3.1.2 Kristallstruktur von *S*SBT3

Die Aufklärung der Kristallstruktur von *S*SBT3 erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Christian Ottman vom Chemical Genomics Centre am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund. Das reine *S*SBT3 Protein wurde von mir bereit gestellt, die Kristallisation und die Analyse der Kristalle wurden am Chemical Genomics Centre durchgeführt. Insgesamt wurden dafür 15 mg *S*SBT3 benötigt. Dies entspricht einer Menge von 75 l Zellsuspensionskultur.



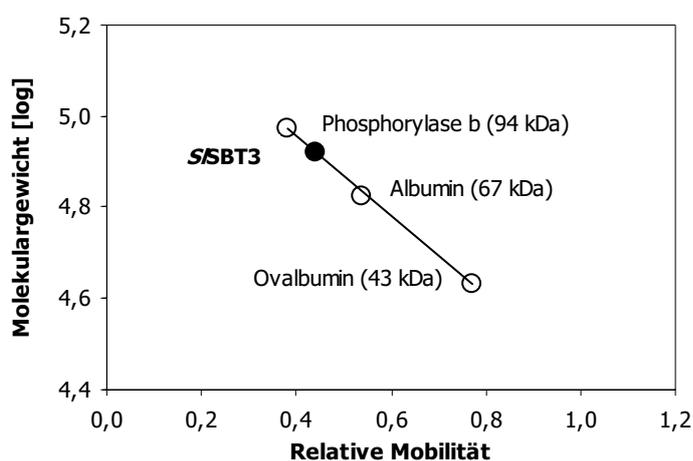
**Abb. 3.1.5 Kristallstruktur von *S*SBT3**

Dreidimensionale Gesamtstruktur des *S*SBT3-Dimers (**A-D**) in Frontalansicht (**A** und **B**) sowie Aufsicht (**C** und **D**), als Bänderdarstellung (**A** und **C**) sowie als Oberflächendarstellung (**B** und **D**). Zu sehen sind die Protease Domäne (rot), die PA-Domäne (grün) und die C-terminale  $\beta$ -Barrel Domäne (blau). Katalytische Triade von *S*SBT3 (Asp144, His215 und Ser538, grün) in Überlagerung mit der katalytischen Triade von Subtilisin BPN (Asp32, His64 und Ser221, magenta) (**E**). Die Proteine sind als Bändermodell, die katalytischen Reste als Stabmodelle dargestellt.

Die Kristalle wurden in einer Synchrotronstrahlungsquelle analysiert und beugten bis zu einer Auflösung von 2,5 Å. Zur Aufklärung der *S*SBT3-Struktur wurde der so genannte isomorphe Ersatz unter Verwendung von Caesiumchlorid und Zinkacetat eingesetzt (OTTMAN, mündliche Mitteilung). Die Struktur von *S*SBT3 konnte vor kurzem fertiggestellt werden, die abschließende Interpretation der Röntgenbeugungsdaten ist derzeit noch in Bearbeitung. Anhand der bisher vorliegenden strukturellen Daten lässt sich jedoch bereits postulieren, dass *S*SBT3 im aktiven Zustand als Dimer vorliegt. Diese Dimerisierung scheint von der PA-Domäne vermittelt zu werden (Abb. 3.1.5 A-D). Die Struktur der Protease-Domäne ist der bereits strukturaufgeklärter bakterieller Subtilasen sehr ähnlich. So überlagert z.B. die katalytische Domäne von Subtilisin BPN mit einem rmsd (root mean square deviation, Maß für die mittlere strukturelle Abweichung) von 2,0 Å über 281 Reste. Die Sequenzidentität liegt in diesem Bereich bei 29 % (Abb 3.1.5 E).

### 3.1.3 Bestimmung des Molekulargewichts von *S*SBT3

Das berechnete Molekulargewicht des prozessierten *S*SBT3 liegt bei 69,5 kDa. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings beobachtet, dass die der *S*SBT3 Protease zugeordnete Proteinbande in 9 %-igen mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbten SDS-PAGE-Gelen eine deutlich höhere apparente molekulare Masse aufweist. Diese Diskrepanz kann durch mögliche posttranslationelle Modifikationen des Proteins wie z. B. Glykosylierung zustande kommen, könnte aber auch auf die Kalibrierung der vorgefärbten Proteinstandards zurückzuführen sein.



**Abb. 3.1.6 Molekulargewicht von *S*SBT3 im Vergleich zu Proteinmarkern bekannter Größe**

Die molekulare Masse von *S*SBT3 wurde durch den Vergleich der relativen Mobilität von molekularen Markern (○) mit der relativen Mobilität von *S*SBT3 (●) während der SDS-PAGE auf einem 9 %-igen Polyacrylamidgel bestimmt.

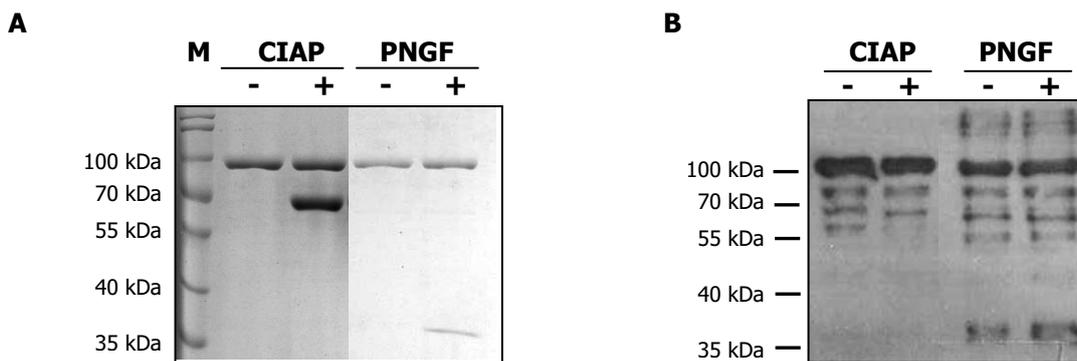
Um eine genauere Aussage über die molekulare Masse von *S*SBT3 treffen zu können, wurde daher das Molekulargewicht von *S*SBT3 durch den Vergleich seiner relativen Mobilität in einem

SDS-PAGE-Gel mit der relativen Mobilität von ungefärbten molekularen Markern berechnet. Als molekulare Marker wurden Phosphorylase b (94 kDa), Albumin (67 kDa) und Ovalbumin (43 kDa) verwendet. In Abbildung 3.1.6 wurde der Logarithmus des Molekulargewichts gegen die relative Mobilität aufgetragen. Auf diese Weise konnte eine apparente molekulare Masse von 83 kDa für *SSBT3* ermittelt werden, die deutlich über der errechneten Masse von 69,5 kDa liegt.

### 3.1.4 Untersuchung der Phosphorylierung bzw. Glykosylierung von *SSBT3*

Aufgrund des festgestellten Unterschieds zwischen dem berechneten und dem unter Kapitel 3.1.3 bestimmten Molekulargewicht von *SSBT3*, sowie der in der Aminosäuresequenz von *SSBT3* vorhandenen potentiellen Phosphorylierungs- und Glykosylierungsstellen, wurde *SSBT3* auf diese beiden möglichen posttranslationalen Modifikationen hin untersucht.

Eine mögliche Phosphorylierung bzw. Glykosylierung wurde mittels Verdau mit den Enzymen alkalische Phosphatase bzw. N-Glykosidase F getestet. Die verdauten und unverdauten Ansätze von *SSBT3* wurden in einem 7 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und miteinander verglichen. Im SDS-PAGE-Gel konnte weder beim Verdau mit alkalischer Phosphatase noch mit N-Glykosidase F ein Unterschied des Molekulargewichts von *SSBT3* im Vergleich zu den unverdauten Ansätzen nachgewiesen werden, wie er bei einer vollständigen Abspaltung aller Phosphatreste bzw. N-Glykane zu beobachten hätte sein müssen (Abb. 3.1.7). Mit den enzymatischen Tests konnte weder eine Phosphorylierung noch eine Glykosylierung von *SSBT3* belegt werden.



**Abb. 3.1.7 Test von *SSBT3* auf Dephosphorylierung bzw. Deglykosylierung**

1  $\mu$ g *SSBT3* wurde mit (+) und ohne (-) alkalische Phosphatase (CIAP, 10 u) sowie mit (+) und ohne (-) N-Glykosidase F (PNGaseF, 1000 u) 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend in 7 %-igen Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt (**A**) bzw. auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und dort immunodetektiert (**B**).

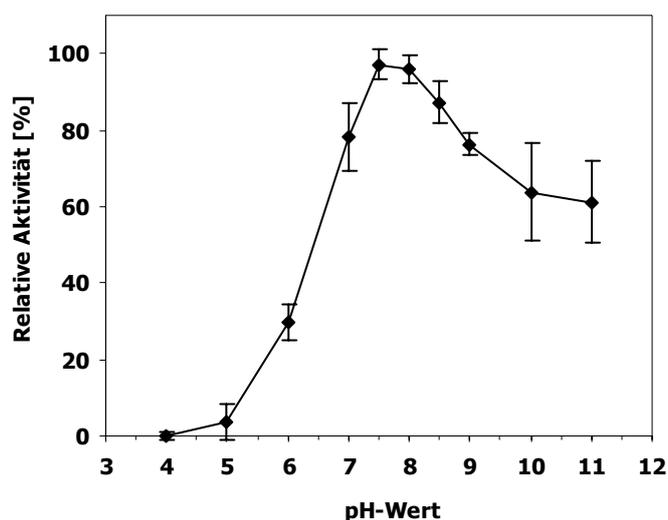
**A.** Neben den Banden von *SSBT3* (83 kDa) sind die Banden der CIAP (65 kDa) und der PNGF (36 kDa) zu erkennen. M bezeichnet den Proteinstandard.

**B.** Der Western Blot wurde mit dem primären *SSBT3*-Antiserum (1:2.000) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10000) behandelt und durch ECL (Enhanced Chemo Luminescence) entwickelt.

### 3.1.5 pH-Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von *S*SBT3

Die Bestimmung des pH-Optimums des aufgereinigten, aktiven *S*SBT3 wurde mittels des in Kapitel 2.7.1 beschriebenen Enzymaktivitätstests bei verschiedenen pH-Werten im Bereich von 4 - 11 durchgeführt.

Verwendet wurde hierfür ein 3-Komponenten-Puffer nach ELLIS & MORRISON (1982), welcher den Einsatz eines einheitlichen Puffersystems mit konstanter Ionenstärke über einen weiten pH-Bereich erlaubt. Der 3-Komponenten-Puffer bestand aus 50 mM Essigsäure, 50 mM MES und 100 mM Tris/HCl. Die Einstellung der verschiedenen pH-Werte erfolgte mit Essigsäure bzw. Tetraethylammoniumhydroxid. *S*SBT3 wurde in einer Konzentration von 24 ng/μl eingesetzt. *S*SBT3 zeigte ein Aktivitätsoptimum bei pH 7,5 und hohe Aktivität im alkalischen pH-Bereich bis pH 11. Bereits bei pH 6 war die Aktivität auf 30 % reduziert, bei pH 4 nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.1.8).

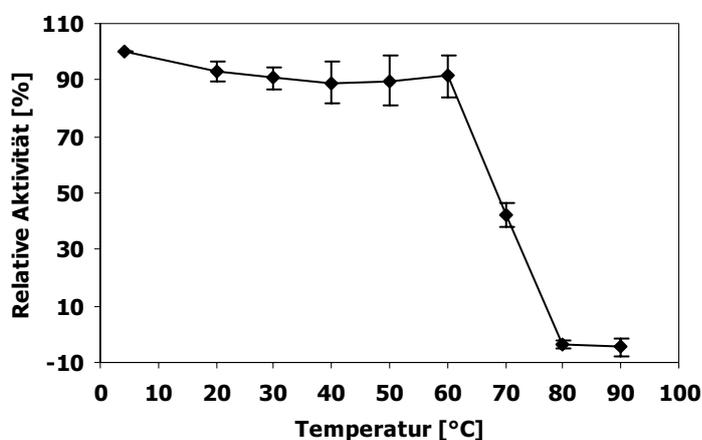


**Abb. 3.1.8** pH-Optimum von *S*SBT3

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität von *S*SBT3 wurde mittels Enzymaktivitätstest unter Verwendung des fluorogenen Systemin-Peptids bestimmt. Aufgereinigtes *S*SBT3 wurde in einer Konzentration von 24 ng/μl eingesetzt. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung dar.

### 3.1.6 Temperaturstabilität von *S*SBT3

Mittels des in Kapitel 2.7.1 beschriebenen Enzymaktivitätstests wurde die Stabilität von *S*SBT3 bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Die Ansätze, welche den Messpuffer und *S*SBT3 (24 ng/ $\mu$ l) enthielten wurden 20 min bei den entsprechenden Temperaturen vorinkubiert und auf Eis abgekühlt, bevor das Substrat zugegeben und die Messung gestartet wurde. Über einen weiten Bereich (4 °C - 60 °C) konnte keinerlei Einfluss der Temperatur auf die Aktivität von *S*SBT3 beobachtet werden. Erst eine Hitzebehandlung bei 70 °C führte zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität. Temperaturen  $\geq$  80 °C hatten den vollständigen Verlust der Aktivität zur Folge (Abb. 3.1.9).

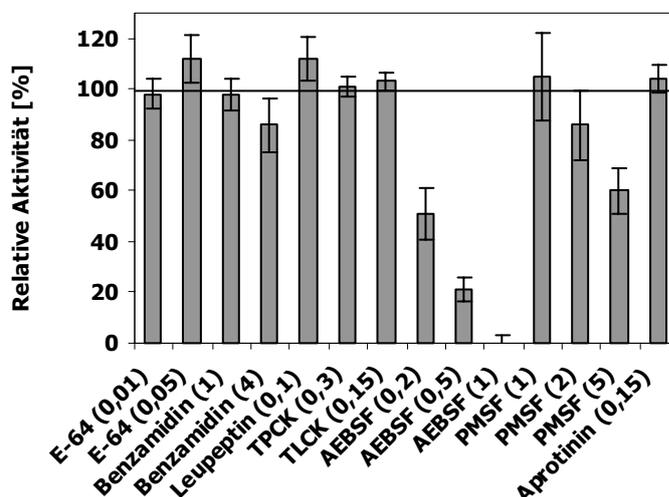


**Abb. 3.1.9** Temperaturstabilität von *S*SBT3

Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität von *S*SBT3 wurde mittels Enzymaktivitätstest unter Verwendung des fluorogenen Systemin-Peptids bestimmt. Aufgereinigtes *S*SBT3 wurde in einer Konzentration von 24 ng/ $\mu$ l eingesetzt. Die Ansätze wurden 20 min bei den entsprechenden Temperaturen vorinkubiert und auf Eis abgekühlt bevor das Substrat zugegeben und die Messung gestartet wurde. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung dar.

### 3.1.7 Effekt verschiedener Proteaseinhibitoren und Zusätze auf die proteolytische Aktivität von *S*SBT3

Der Effekt verschiedener Proteaseinhibitoren (E-64, Benzamidin, Leupeptin, TPCK (Tosyl-L-Phenylalaninchloromethylketon), TLCK (Tosyl-L-Lysinchloromethylketon), AEBSF (Aminoethylbenzolsulfonylfluorid), PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) und Aprotinin) und verschiedener Zusätze (CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, EDTA, EGTA, Tween 20 und DTT) auf die Enzymaktivität von *S*SBT3 wurde mittels Enzymaktivitätstest (Kap. 2.7.1) untersucht. Die Ansätze, welche den Messpuffer und *S*SBT3 (24 ng/μl) enthielten wurden 20 min mit den entsprechenden Inhibitoren bzw. Zusätzen inkubiert bevor das Substrat zugegeben und die Messung gestartet wurde. Der Einfluss, der verschiedenen Proteinaseinhibitoren auf die Aktivität von *S*SBT3 ist in Abbildung 3.1.10 dargestellt. Die Serinproteinaseinhibitoren AEBSF und PMSF hemmten die Aktivität von *S*SBT3 am stärksten. AEBSF inhibierte die Enzymaktivität bei einer Konzentration von 0,2 mM zu 50 %. Bei maximaler Konzentration von 1 mM AEBSF konnte keine *S*SBT3-Aktivität mehr gemessen werden. Auch der Einsatz von 5 mM PMSF führte zu einer 40 %-igen Hemmung der Enzymaktivität. Die gezeigte hemmende Wirkung der Serinproteaseinhibitoren war vor dem Hintergrund, dass es sich bei *S*SBT3 um eine Subtilase, also eine Serinprotease handelt (Proteindatenbank MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk>, RAWLINGS ET AL. 2008), zu erwarten. Dabei konnte die Annahme bestätigt werden, dass keiner der anderen getesteten Proteinaseinhibitoren einen nennenswerten Einfluss auf die Aktivität von *S*SBT3 hatte.



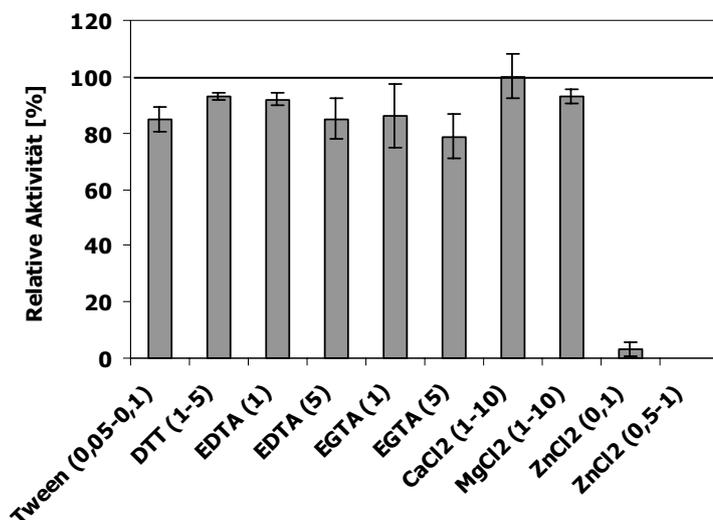
**Abb. 3.1.10** Effekt verschiedener Proteinaseinhibitoren auf die Aktivität von *S*SBT3

Die Wirkung verschiedener Proteinaseinhibitoren (PI) auf die Aktivität von *S*SBT3 wurde mittels Enzymaktivitätstest unter Verwendung des fluorogenen Systemin-Peptids bestimmt. Aufgereinigtes *S*SBT3 wurde in einer Konzentration von 24 ng/μl eingesetzt und die Ansätze vor der Messung 20 min mit den verschiedenen PI inkubiert. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung dar. Die Zahlen in Klammern geben die Konzentrationen der PI in mM an.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss verschiedener Zusätze wie der zweiwertigen Kationen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  sowie der Chelatbildner EDTA und EGTA auf die Aktivität von *S*SBT3 untersucht. Frühere Studien hatten gezeigt, dass andere eukaryotische Subtilasen wie z. B. Kex2 aus *Saccharomyces cerevisiae* und die tierische Proprotein-Konvertase Furin Calcium-abhängig sind (FULLER ET AL. 1989, MOLLOY ET AL. 1992). Ausserdem zeigten SIEZEN & LEUNISSEN (1997), dass  $\text{Ca}^{2+}$  für die Stabilität bakteriellen Subtilisins erforderlich ist. Darüber hinaus konnten über die Aufklärung der Kristallstruktur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen in den genannten Serinproteasen nachgewiesen werden (SMITH ET AL. 1999, ROCKWELL & THORNER 2004).

Zusätzlich wurde auch der Einfluss von DTT als reduzierende, enzymstabilisierende Verbindung, von  $\text{ZnCl}_2$  als Proteasehemmer und von Tween 20, welches als Detergenz unspezifische Hintergrund-Reaktionen unterdrückt, auf die *S*SBT3-Aktivität untersucht.

Die Komplexbildner EDTA und EGTA sowie die zweiwertigen Kationen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die Enzymaktivität (Abb. 3.1.11). Ebenso konnte keine veränderte *S*SBT3-Aktivität nach Zugabe von DTT mit maximaler Konzentration von 5 mM und nach Zugabe des Detergenz Tween 20 gemessen werden. Lediglich  $\text{ZnCl}_2$  hemmte die Enzymaktivität von *S*SBT3 ab einer Konzentration von 0,1 mM zu nahezu 100 %.



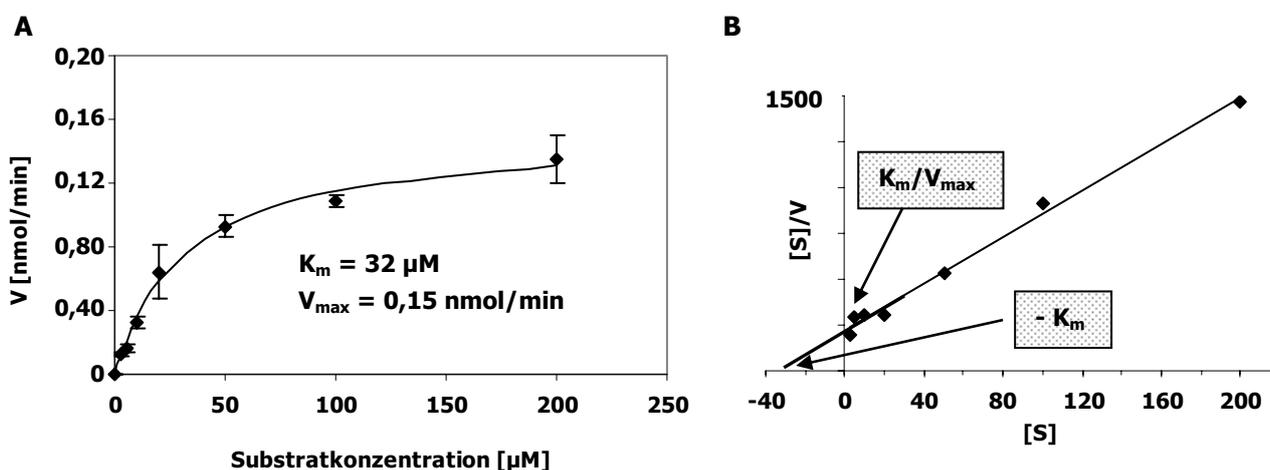
**Abb. 3.1.11 Effekt verschiedener Zusätze auf die Aktivität von *S*SBT3**

Die Wirkung verschiedener Zusätze auf die Aktivität von *S*SBT3 wurde mittels Enzymaktivitätstest unter Verwendung des fluorogenen Systemin-Peptids bestimmt. Aufgereinigtes *S*SBT3 wurde in einer Konzentration von 24 ng/ $\mu\text{l}$  eingesetzt und die Ansätze vor der Messung 20 min mit verschiedenen Zusätzen inkubiert. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung dar. Die Zahlen in Klammern geben die Konzentration der Zusätze in mM, bzw. bei Tween 20 in % an. Die Enzymaktivität von *S*SBT3 ohne jeglichen Zusatz wurde gleich 100 % gesetzt.

### 3.1.8 Effekt der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit von *S*SBT3

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von *S*SBT3 von steigenden Substratkonzentrationen wurde mittels Enzymaktivitätstest (Kap. 2.7.1) untersucht. Das fluorogene Systemin-Peptid wurde in einem Bereich von 2,5 – 200  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Um von relativen Fluoreszenzänderungen auf die Menge umgesetzten Substrats rückschließen zu können, wurde dieser Wert zur Fluoreszenzintensität in Bezug gesetzt, der bei vollständigem Umsatz einer bekannten Menge Substrates durch Trypsin beobachtet wurde. Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) wurden direkt aus den Messwerten der Michaelis-Menten-Kurve ermittelt. Dabei wird das Wertepaar  $K_m$  und  $V_{\max}$  berechnet, indem die experimentell ermittelten Werte für die Reaktionsgeschwindigkeit ( $V$ ) der Michaelis-Menten-Gleichung über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate angepasst werden. Eine genaue Beschreibung der Anwendung findet sich auf der Internetseite der Universität Paisley (England, [http://orion1.paisley.ac.uk/kinetics/Chapter\\_2/contents\\_chap2.html](http://orion1.paisley.ac.uk/kinetics/Chapter_2/contents_chap2.html)).

*S*SBT3 wies eine Michaelis-Menten-Kinetik auf (Abb. 3.1.12). Für das fluorogene Systemin-Substrat zeigte *S*SBT3 einen  $K_m$ -Wert von 32  $\mu\text{M}$  und eine  $V_{\max}$  von 0,15 nmol/min. Als weitere kinetische Parameter wurden die Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) und die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) berechnet, sie lagen für *S*SBT3 bezüglich des fluorogenen Systemin-Substrats bei 0,044  $\text{s}^{-1}$  bzw. 1,37  $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$  (Tab. 3.1.1).



**Abb. 3.1.12 Einfluss der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit von *S*SBT3**

Zwischen 2,5 und 200  $\mu\text{M}$  des fluorogenen Systemin-Peptids wurden als Substrat zu je 24 ng/ $\mu\text{l}$  *S*SBT3 zugegeben und die Enzymaktivität gemessen. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung dar.

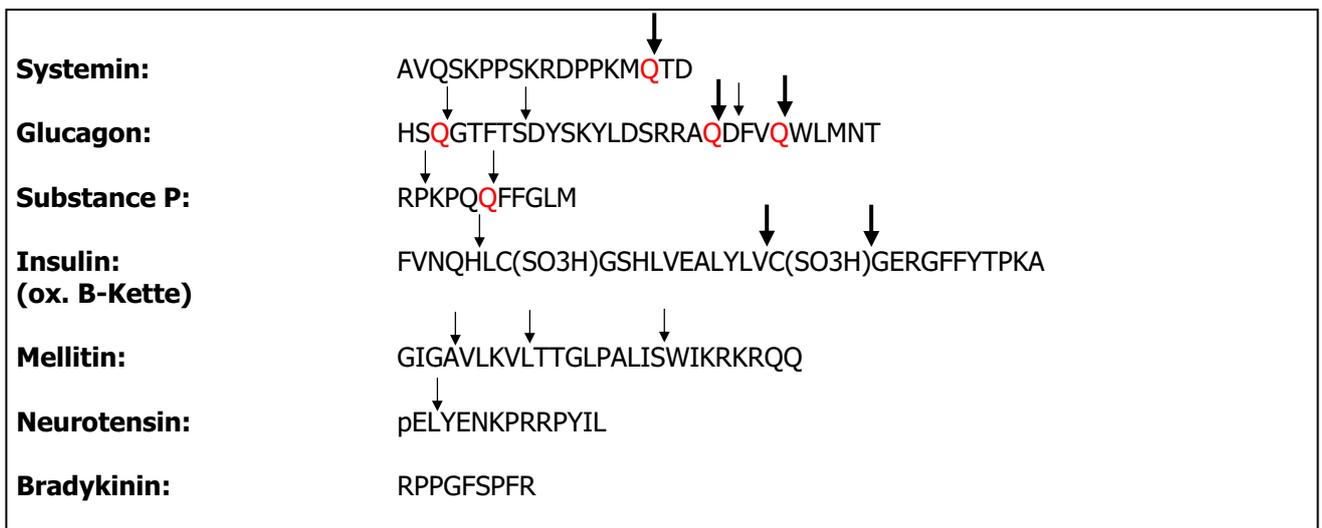
**A.** *S*SBT3 weist eine Michaelis-Menten-Kinetik auf.

**B.** Hanes Plot ( $y=6,3725x+225,83$ ).

### 3.1.9 Substratspezifität von *S*SBT3

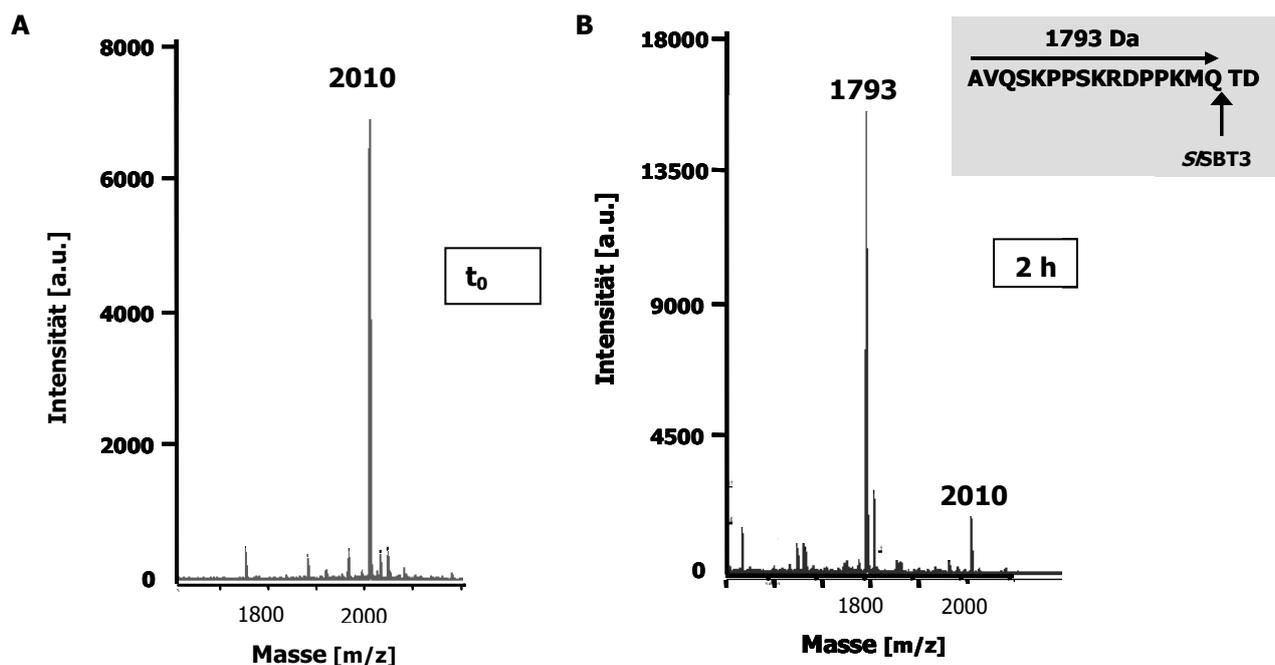
#### MALDI-TOF MS

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden verschiedene synthetische Peptide (Systemin, Glucagon, oxidierte Insulin-B-Kette, Mellitin, Bradykinin, Neurotensin und Substance P) als mögliche Substrate von *S*SBT3 untersucht (s. Kap. 2.7.2). Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte nach 2 und nach 15 h Inkubationszeit. Dabei konnte beobachtet werden, dass einige Substrate schneller gespalten wurden als andere. Außerdem gab es auch innerhalb eines Substrates Bindungen, die schneller gespalten wurden als andere. Die Substrate Systemin, Glucagon und die oxidierte Insulin-B-Kette wurden schon innerhalb von 2 h vollständig umgesetzt. Bei den anderen Substraten konnte ein Abbau erst nach 15 h nachgewiesen werden. Bradykinin wurde als einzig getestetes Substrat nicht von *S*SBT3 gespalten. Die Spaltprodukte konnten anhand ihrer Masse identifiziert und die jeweiligen Spaltstellen abgeleitet werden (Abb. 3.1.13). Rekombinante *S*SBT3 zeigte demnach eine Präferenz für Glutamin in der P<sub>1</sub>-Position des Substrates (Nomenklatur der Spaltstellen nach SCHECHTER & BERGER 1967). Beispielhaft ist in Abbildung 3.1.14 das Massenspektrum der MALDI-TOF-Analyse der Systeminspaltung mit rekombinanter *S*SBT3 dargestellt. Das 2010 Da große Systemin-Peptid wurde nach zweistündiger Inkubation mit *S*SBT3 in ein Produkt gespalten, dessen Masse mit 1793 Da den ersten 16 Aminosäuren des Systemin-Peptids entspricht. Die hydrolytische Spaltung erfolgte daher nach der Aminosäure Glutamin (Abb. 3.1.14).



**Abb. 3.1.13 Bedeutung der Aminosäure in Position P<sub>1</sub> des Substrats für die Präferenz von *S*SBT3**

Aminosäuresequenzen der Peptide, die als Substrat für *S*SBT3 eingesetzt wurden. Die in der P<sub>1</sub>-Position häufig vorkommende Aminosäure Glutamin (Q) ist rot gekennzeichnet. Die Pfeile markieren die identifizierten Spaltstellen. Dabei sind die bevorzugten Spaltstellen (Spaltung nach 2 h) mit größeren Pfeilen gekennzeichnet (↓). Die dünnen Pfeile (↓) markieren eine Spaltung nach 15 h Inkubation mit *S*SBT3. Die Aminosäuresequenzen der Substrate sind in der Einbuchstaben-Schreibweise dargestellt.



**Abb. 3.1.14 MALDI-TOF-Analyse der Systeminspaltung mit rekombinanter *SSBT3***

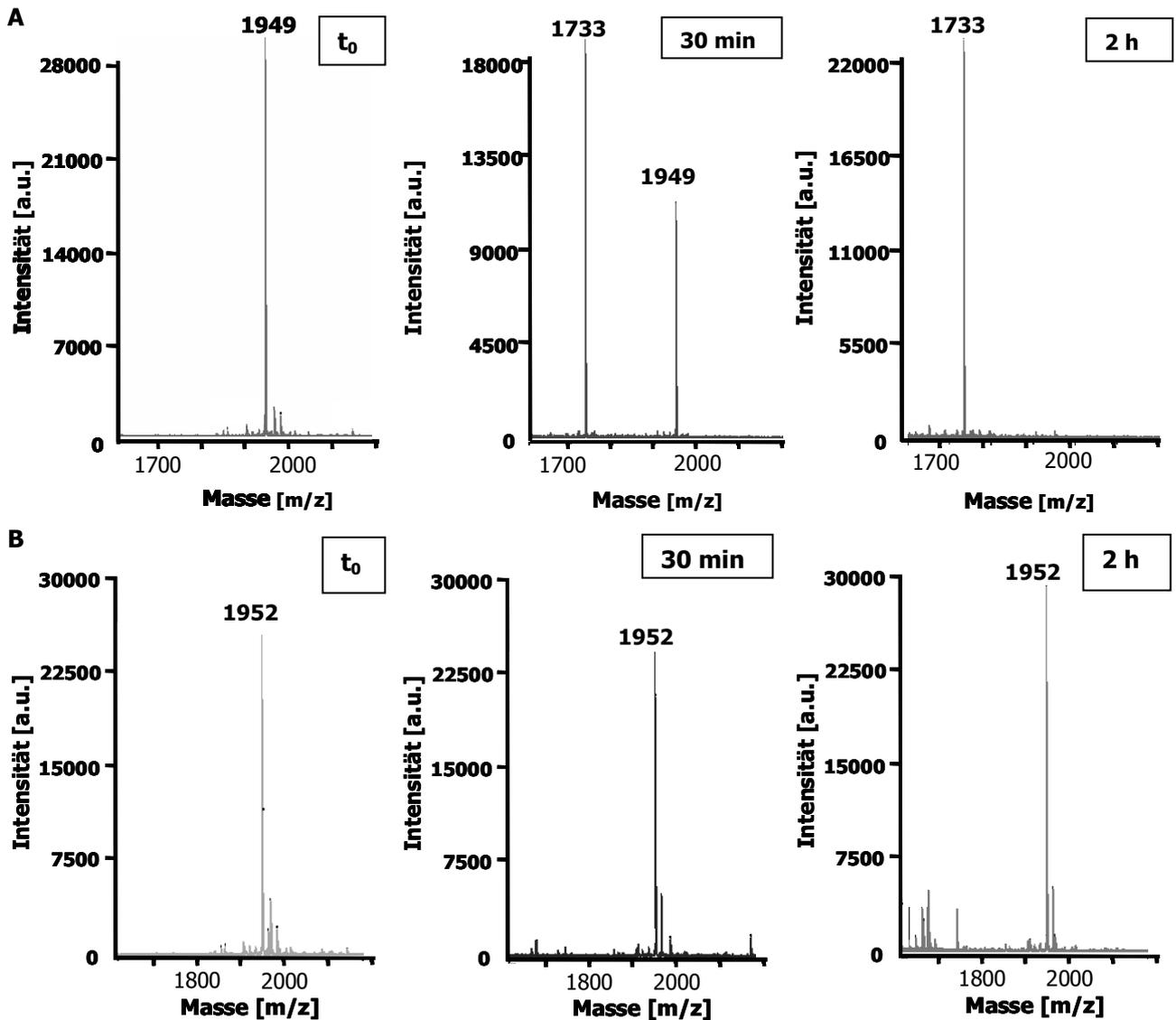
**A.** Massenspektrum des ungespaltenen Systemin-Peptids (2010 Da) im Kontrollansatz ( $t_0$ ).

**B.** Massenspektrum nach 2-stündiger Inkubation mit *SSBT3*. Das 2010 Da große Systemin-Peptid ist in ein 1793 Da großes Produkt gespalten worden.

Um die Rolle jeder einzelnen Aminosäure innerhalb der Primärstruktur des Systemin-Peptids auf die Substraterkennung und Spalteffizienz von *SSBT3* genauer zu analysieren, wurden Alanin-substituierte Systemin-Analoga im MALDI-TOF-MS untersucht. Dabei wurden Systemin-Analoga eingesetzt, bei denen jeweils eine Aminosäure in Position 9 - 18 der Aminosäuresequenz von Systemin durch Alanin ersetzt worden war. Bis auf die Kristallisationsmatrix (5 mg/ml HCCA) waren Versuchsbedingungen und -durchführung die gleichen wie unter Kapitel 2.7.2 beschrieben.

Die MALDI-TOF-MS Analyse ergab, dass von den getesteten Peptiden nur das Gln<sup>16</sup>Ala nicht von *SSBT3* gespalten werden konnte. Bei allen anderen Analoga konnten bereits nach 30 min Spaltprodukte detektiert werden. Abbildung 3.1.15 zeigt exemplarisch den Zeitverlauf der Hydrolyse zweier Alanin-substituierter Systemin-Analoga nach Inkubation mit *SSBT3*. Für das Met<sup>15</sup>Ala Analogon mit einer Masse von 1950 Da lässt sich bereits nach 30 min ein Spaltprodukt nachweisen, nach 2 h ist es vollständig hydrolysiert. Die Masse des Spaltproduktes entspricht mit 1733 Da den ersten 16 Aminosäuren des Systemin-Analogons.

Demzufolge fand die hydrolytische Spaltung auch hier nach der Aminosäure Glutamin statt (3.1.15A). Gln<sup>16</sup>Ala mit einer molekularen Masse von 1952 Da wurde von *SSBT3* nicht gespalten (3.1.15B). Die Aminosäure Glutamin in Position P<sub>1</sub> scheint somit eine wichtige Funktion für die Substraterkennung durch *SSBT3* zu erfüllen.



**Abb. 3.1.15** Zeitverlauf der Spaltung zweier Alanin-substituierter Systemin-Analoga

**A.** Spaltung des Met<sup>15</sup>Ala Derivates von Systemin. Nach 30-minütiger Inkubation mit *SSBT3* ist ein Spaltprodukt zu erkennen. Nach 2-stündiger Inkubation ist das Ausgangspeptid (1949 Da) vollständig hydrolysiert.

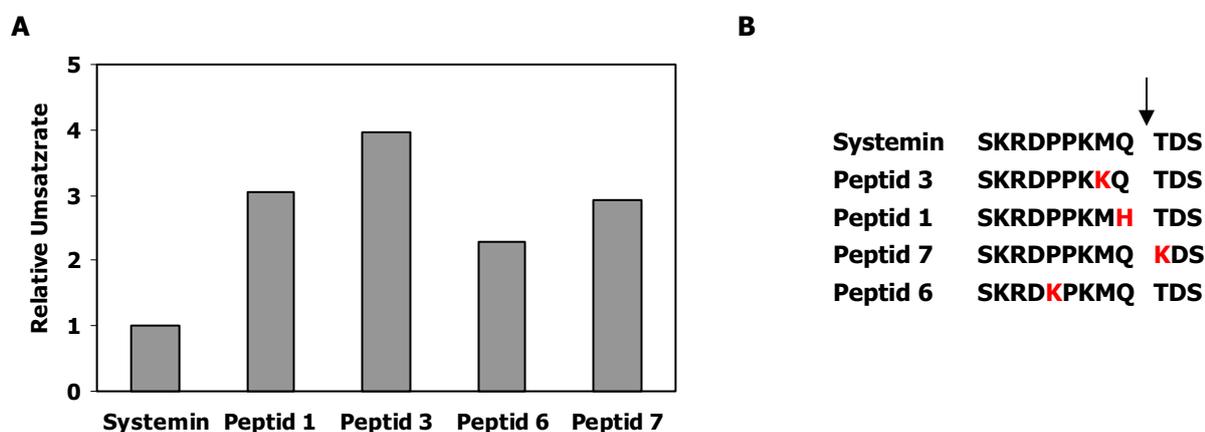
**B.** Spaltung des Gln<sup>16</sup>Ala Derivates von Systemin. Das Peptid mit einer Masse von 1952 Da wird von *SSBT3* nicht gespalten.

### Protease Spot-Test

Um die Ergebnisse aus den MALDI-TOF-MS Experimenten weiter zu spezifizieren, wurde die Bedeutung der Aminosäuren in Nähe der Spaltstelle ( $P_5$ ,  $P_4$ ,  $P_3$ ,  $P_2$ ,  $P_1$ ,  $P_1'$ ,  $P_2'$  und  $P_3'$ ) für die Substratspezifität von *SSBT3* mittels Protease Spot-Test untersucht (s. Kap. 2.7.3). Die im Protease Spot-Test eingesetzten fluorogenen Peptide basierten auf der Aminosäuresequenz des Systemin-Peptids (SKRDPPKMQTDS). Ausgehend davon wurden 60 Peptide synthetisiert, welche sich jeweils in einer Aminosäure vom ursprünglichen Systemin-Peptid-Fragment unterschieden. Dafür wurden die Aminosäuren an den Position  $P_5$  bis  $P_3'$  systematisch durch eine Aminosäure aus

je einer der folgenden Gruppen mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgetauscht: Alanin (aliphatisch), Phenylalanin (aromatisch), Asparagin und Serin (polar), Aspartat (sauer), Lysin (basisch) und Prolin (unpolar). Zusätzlich wurden die Aminosuren an den Position  $P_2$  bis  $P_1'$  systematisch durch eine der folgenden Aminosäuren ausgetauscht: Valin, Glycin (beide unpolar), Tryptophan, Tyrosin (beide polar), Leucin, Isoleucin (beide aliphatisch) und Histidin (basisch). Eine vollständige Liste aller im Protease Spot eingesetzten Peptide und ihre Sequenzen findet sich im Anhang (Tab. 6.1). Die Peptide waren C-terminal auf Cellulosemembranen fixiert und N-terminal fluoreszenzmarkiert.

Nach Zugabe der *S*SBT3-Protease zu den Peptiden, wurden nach 6 h, 24 h und 30 h Aliquote entnommen und die Zunahme der Fluoreszenz bei 420 nm im Reaktionsüberstand gemessen. Die gewonnene Steigung stellte ein Maß für die Umsatzrate des Enzyms dar. Zur Vereinfachung der Auswertung und Darstellung wurde die Umsatzrate von Systemin gleich 1 gesetzt und die anderen Substrate in Relation dazu betrachtet.



**Abb. 3.1.16 Ergebnisse des Protease Spot-Tests**

Nach Zugabe der *S*SBT3-Protease zu den Peptiden, wurden nach 6 h, 24 h und 30 h Aliquote entnommen und die Fluoreszenzzunahme bei 420 nm gemessen. Angegeben sind die relativen Umsatzraten im Vergleich zu Systemin, dessen Umsatzrate gleich 1 gesetzt wurde.

**A:** Ergebnisse für die vier Peptide, welche im Protease Spot-Test eine im Vergleich zu Systemin höhere Umsatzrate zeigten.

**B:** Aminosäuresequenzen der vier Peptide. Die geänderten Aminosäuren im Vergleich zu Systemin sind rot markiert. Die Spaltstelle von Systemin ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Von den 60 Peptiden wurde nur bei vier Peptiden eine relative Umsatzrate von größer als 2 festgestellt. Diese Peptide stellten somit deutlich bessere Substrate als das Systemin-Peptid-Fragment dar. Die meisten Peptide wiesen eine Umsatzrate zwischen 1 und 2 auf und wurden somit nicht als wesentlich besser als das Systemin-Peptid-Fragment gewertet. Nur zehn Peptide wurden langsamer hydrolysiert, die geringste relative Umsatzrate lag bei 0,6 (nicht gezeigt). In Abbildung 3.1.16 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Betrachtet man die Aminosäuresequenz des Peptids 3, welches sich als bestes der getesteten Substrate für *S*SBT3 erwies, scheint ein Lysin in der  $P_2$ -Position die Umsatzgeschwindigkeit zu erhöhen, das Peptid wird also zu einem

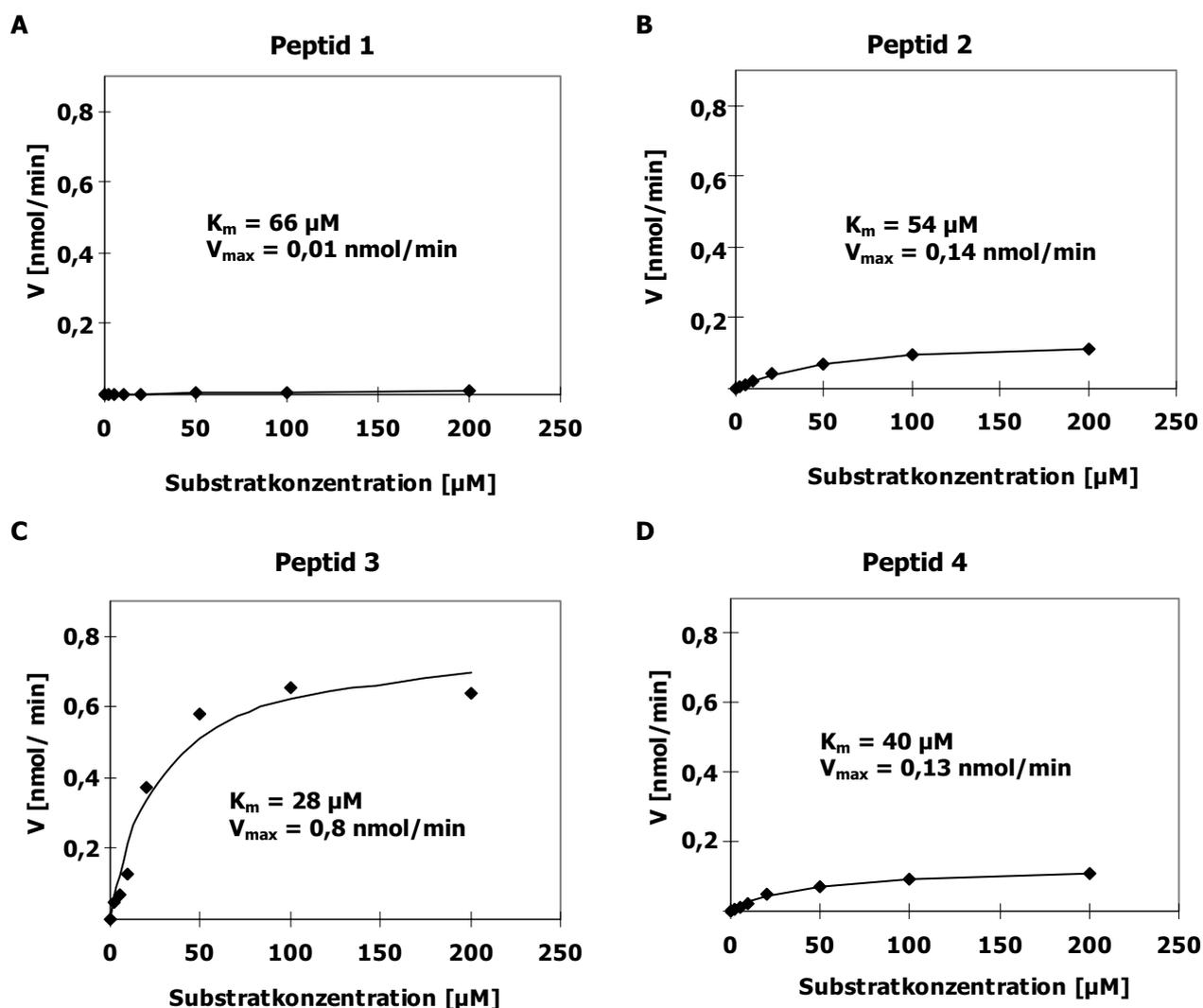
"besseren" Substrat für *S*SBT3. Auch der Austausch von Glutamin in Position  $P_1$  gegen Histidin verbessert das Substrat (Peptid 1), sowie eine Substitution von Threonin durch Lysin in Position  $P_1'$  (Peptid 7) und der Austausch von Prolin gegen Lysin in der Position  $P_5$  (Peptid 6).

### Fluorogene Systemin-Analoga

Zur Bestätigung der Ergebnisse des Protease Spot-Test, wurden fluorogene Substrate, die Peptid 1, Peptid 3 sowie drei weiteren Peptiden entsprechen und die basierend auf der Primärsequenz des Systemin-Peptids in den Positionen  $P_2$ ,  $P_1$  und  $P_1'$  verändert wurden, in Auftragsynthese hergestellt (Tab. 2.2), und für enzymkinetische Messungen mit *S*SBT3 eingesetzt (Kap 3.1.8). Die Michealis-Menten-Konstante ( $K_m$ ), die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ), die Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_m$ ) wurden berechnet und den Werten des fluorogenen Systemin-Peptids gegenüber gestellt. Abbildung 3.1.17 zeigt die Michaelis-Menten-Kinetiken von Peptid 1, Peptid 2, Peptid 3 und Peptid 4. Für Peptid 5 konnten keine kinetischen Kenndaten erfasst werden, da es unter den gegebenen Testbedingungen nicht von *S*SBT3 gespalten wurde.

In Tabelle 3.1.2 sind die kinetischen Kenndaten der fünf Peptide und des Systemin-Peptids zusammengefasst. Bei Peptid 3 war eine sechsfache Verbesserung der katalytischen Effizienz im Vergleich zu Systemin zu beobachten. Dies stimmt mit dem Ergebnis des Protease Spot-Test überein. Auch bei diesem Test war Peptid 3 das beste Substrat für *S*SBT3. Betrachtet man die Werte für die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_m$ ) genauer, bestätigt sich die Annahme aus dem Protease Spot-Test, dass ein Lysin in Position  $P_2$  die Substraterkennung verbessert. Dies zeigte sich sowohl beim Vergleich von Systemin mit Peptid 3 als auch bei der Betrachtung von Peptid 1 und Peptid 2. Stellt man die  $k_{cat}/K_m$ -Werte von Peptid 4 und Peptid 2 gegenüber, lässt sich auch eine Verbesserung des Substrats durch ein Lysin in Position  $P_1'$  erkennen. Somit konnte ein weiteres Ergebnis des Protease Spot-Tests bestätigt werden. Im Gegensatz zum Protease Spot-Test wurde festgestellt, dass Peptid 1 eine schlechtere katalytische Effizienz aufwies als Systemin. Im Protease Spot-Test dagegen führte ein Austausch von Histidin in Position  $P_1$  zu einer Verbesserung des Substrates für *S*SBT3.

Betrachtet man die  $K_m$ -Werte fällt auf, dass die Unterschiede für alle vier Peptide relativ gering sind. Das heißt, dass die Affinität der untersuchten Peptide zu *S*SBT3 annähernd gleich ist. Die beobachteten Unterschiede in der katalytischen Effizienz sind daher vor allem auf die unterschiedlichen  $k_{cat}$ -Werte zurückzuführen.



**Abb. 3.1.17** Effekt der Substratkonzentration von Peptid 1 - 4 auf die Reaktionsgeschwindigkeit von *S*SBT3

Auf der Primärsequenz des Systemin-Peptids basierende fluorogene Peptide (1-5) wurden in einer Konzentration zwischen 2,5 und 200  $\mu\text{M}$  als Substrat zu je 24 ng/ $\mu\text{l}$  *S*SBT3 zugegeben und die Reaktionsgeschwindigkeit anhand der Fluoreszenzzunahme gemessen. Die Michealis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ ) wurden ermittelt, wie in Kapitel 3.1.8 beschrieben. Für Peptid 5 konnten keine kinetischen Kenndaten erfasst werden, da es unter den gegebenen Testbedingungen nicht von *S*SBT3 gespalten wurde.

**Tab. 3.1.1** Kinetische Parameter von *S*SBT3 für die untersuchten fluorogenen Peptide

Die kinetischen Daten wurden ermittelt wie in Abbildung 3.1.17 beschrieben.

	AS Sequenz	$K_m$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nmol/min]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_m$ [ $\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ]
Systemin	SKRDPPKMQTD	32	0,15	0,044	1,37
Peptid 1	SKRDPPKMHTD	66	0,01	0,003	0,05
Peptid 2	SKRDPPKKHTD	54	0,14	0,041	0,77
Peptid 3	SKRDPPKKQTD	28	0,8	0,230	8,25
Peptid 4	SKRDPPKKHKD	40	0,13	0,038	0,94
Peptid 5	SKRDPPKKQKD	---	---	---	---

**Kurzzusammenfassung I –  
Aufreinigung und biochemische Charakterisierung von *S*SBT3**

- ❖ Ein Aufreinigungsprotokoll zur Gewinnung von reinem, aktivem *S*SBT3 mittels Ammoniumsulfat-Fällung (60 – 85 % Sättigung), Kationen-Austauschchromatographie im Batch-Verfahren (SP Sepharose FF) und Anionen-Austauschchromatographie (Resource Q) wurde etabliert und mit diesem insgesamt über 15 mg *S*SBT3 aus einer transgenen Tomatenzellensuspensionskultur aufgereinigt.
- ❖ Die biochemische Charakterisierung zeigte, dass *S*SBT3 bis 60 °C thermostabil ist und mit pH 7,5 ein alkalisches pH-Optimum besitzt. Die Aktivität des Enzyms wurde durch die Serinproteinase-Inhibitoren AEBSF und PMSF gehemmt. *S*SBT3 wies eine Michaelis-Menten-Kinetik mit einem  $K_m$ -Wert von 32  $\mu$ M für ein fluorogenes Systemin-Peptid auf.
- ❖ Die Strukturanalyse von *S*SBT3 lieferte Kristalle, die im Synchrotron bis zu einer Auflösung von 2,5 Å beugten. Anhand der vorläufigen Interpretation der Röntgenbeugungsdaten kann postuliert werden, dass *S*SBT3 im aktiven Zustand als Dimer vorliegt. Die Struktur der Protase-Domäne ist der bereits strukturaufgeklärter bakterieller Subtilasen sehr ähnlich.
- ❖ Untersuchungen zur Substratspezifität ergaben eine Präferenz von *S*SBT3 für Glutamin in der  $P_1$ -Position des Substrats. Zudem scheint ein Lysin in Position  $P_2$  und  $P_1'$  die Substrateigenschaften für *S*SBT3 zu verbessern.

## 3.2 Expression von *SISBT3* in Tomatenpflanzen

Um Hinweise auf die *in vivo*-Funktion von *SISBT3* zu erhalten, wurde eine detaillierte gewebespezifische- und entwicklungsabhängige Expressionsanalyse durchgeführt, sowie die *SISBT3*-Expression in Reaktion auf verschiedene Stimuli untersucht. Für die Expressionsanalyse von *SISBT3* wurden transgene Pflanzen eingesetzt, die das *uidA*-Reportergen (GUS) unter Kontrolle des *SISBT3*-Promotors exprimieren, außerdem wurde RNA aus verschiedenen Pflanzenorganen, in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und nach verschiedenen Behandlungen isoliert und für semiquantitative RT-PCR- und Northern Blot-Analysen eingesetzt.

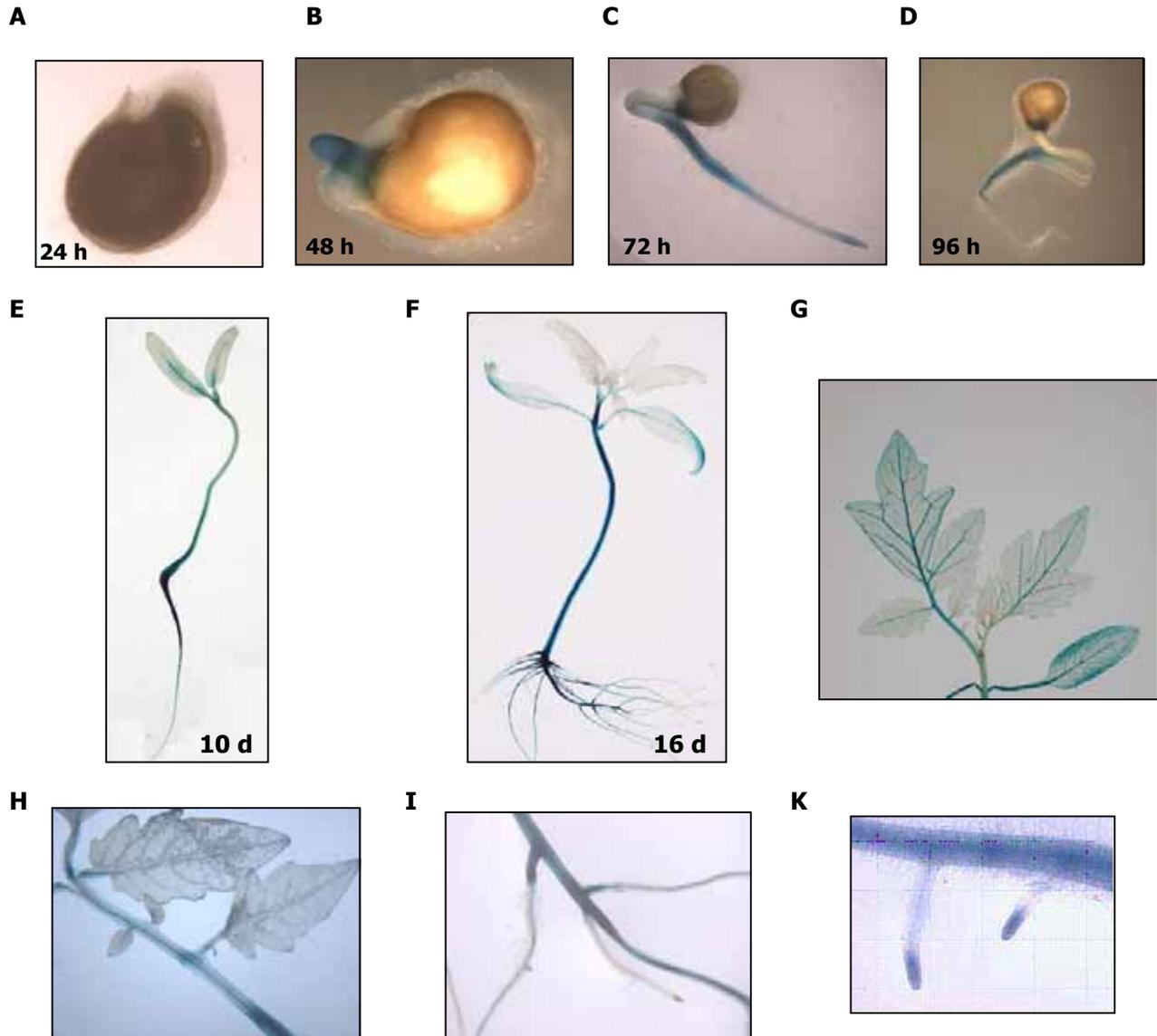
### 3.2.1 Reportergenanalyse der *SISBT3*-Expression

Eine histochemische Lokalisation der *SISBT3*-Promotor::*GUS*-Expression wurde in keimenden Samen, Keimlingen und verschiedenen Pflanzenorganen durchgeführt. Für diesen Versuch wurden homozygote Pflanzen der T<sub>2</sub>-Generation von drei Linien verwendet, die aus unabhängigen Transformationsereignissen hervorgegangen waren, was mittels Southern Blot-Analysen bestätigt werden konnte (siehe Anhang Abb. 6.1). Abbildung 3.2.1 zeigt exemplarisch die GUS-Färbung für Linie GUS 5-2. Alle drei Linien zeigten eine vergleichbare  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in den untersuchten Pflanzenteilen. Allerdings war sie in der gezeigten Linie am stärksten ausgeprägt.

In keimenden Samen war 24 h nach dem Beginn der Quellung noch keine GUS-Aktivität zu erkennen. Nach 48 h war eine GUS-Aktivität in der die Samenschale durchbrechenden Wurzel und am micropylaren Endosperm zu detektieren. Zu späteren Zeitpunkten beschränkte sich die Blaufärbung auf das micropylare Endosperm, die Wurzelspitze und die Abschnitte der Wurzel, die eine verstärkte Wurzelhaarbildung aufwiesen (Abb. 3.2.1 A-D).

In 10- bzw. 16-Tage alten Keimlingen war eine GUS-Aktivität in Wurzel, Hypokotyl und Kotyledonen zu erkennen. Die Blaufärbung war dabei jeweils im Leitgewebe der Keimlinge zu beobachten (Abb. 3.2.1 E-F). X-Gluc- (5-bromo-4-chloro-3-Indolyglucuronid) gefärbte Blätter zeigten ebenfalls eine deutliche Blaufärbung im Leitgewebe, die an der Basis der Blattstiele am stärksten war (Abb. 3.2.1 G-H). Eine starke GUS-Aktivität wurde außerdem in den Wurzeln beobachtet und dort vor allem an den Orten lateralen Wurzelwachstums und in den Wurzelspitzen (Abb. 3.2.1 I-K).

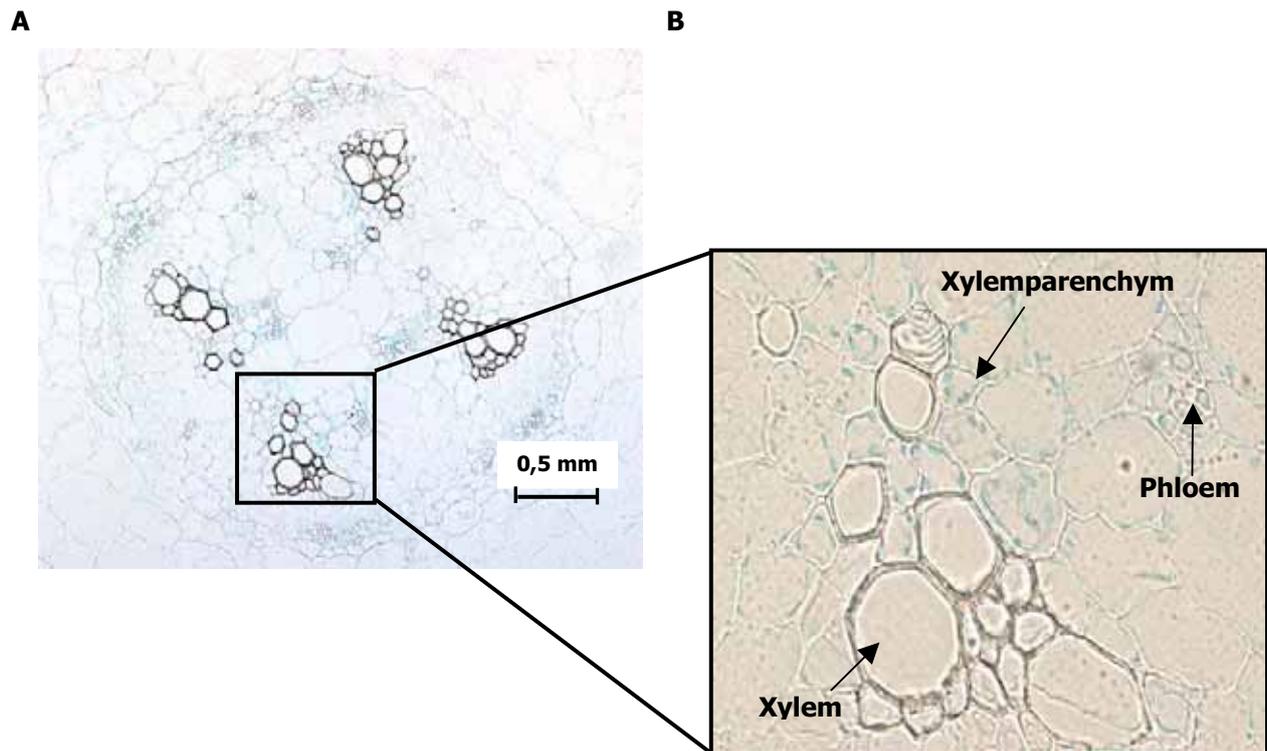
Blütenmaterial in verschiedenen Entwicklungsstadien (vor, während und nach der Anthese) wurde ebenfalls auf GUS-Aktivität untersucht. Dabei konnte in keinem der untersuchten Blütenstadien eine Blaufärbung nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abb. 3.2.1** Histochemische Lokalisation der *SSBT3* Promotor-Aktivität in keimenden Samen, Keimlingen und verschiedenen Organen von *S. lycopersicum*, mit Hilfe des *uidA* (GUS) Reportergens

GUS-Aktivität in keimenden Samen (**A-D**), in 10-Tage (**E**) bzw. 16-Tage alten Keimlingen (**F**), im Leitgewebe der Blätter (**G**), im Blattstiel (**H**), sowie in Wurzeln (**I** und **K**).

Um die *SSBT3*-Promotor::*GUS*-Expression auf Zellebene zu lokalisieren, wurden Querschnitte des Hypokotyls angefertigt. Hierfür wurden Keimlinge mit starker  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in Kunstharz eingebettet und 5 - 8  $\mu$ m dicke Querschnitte erstellt (Kap. 2.12). Blaufärbung war in den Leitbündelgeweben und bei stärkerer Vergrößerung im Phloem sowie in Xylemparenchymzellen nachweisbar (Abb. 3.2.2).



**Abb. 3.2.2** Histochemische Lokalisation der *SISBT3*-Promotor-Aktivität im Hypokotyl einer X-Gluc-gefärbten Pflanze

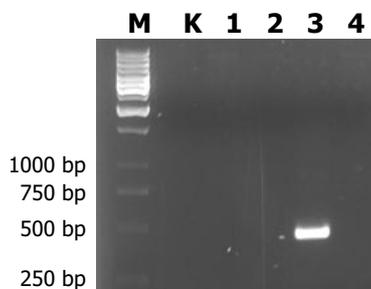
Hypokotyl-Querschnitt eines X-Gluc gefärbten, in Kunstharz eingebetteten Tomatenkeimlings (A) und Teilausschnitt (B). Die gefärbten Sektionen wurden mit dem Lichtmikroskop im Hellfeld bei 100 x Vergrößerung betrachtet.

### 3.2.2 RT-PCR-Analyse der Expression von *SISBT3*

Parallel zur histochemischen Lokalisation der *SISBT3*-Promotor::*GUS*-Expression in keimenden Samen, Keimlingen und verschiedenen Pflanzenorganen wurde eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR durchgeführt.

#### Spezifität der *SISBT3*-Primer

Die Spezifität der verwendeten *SISBT3*-Primer wurde zunächst durch PCR überprüft. Das erwartete PCR-Produkt mit einer Größe von 435 bp ließ sich nur mit der *SISBT3*, nicht aber mit den *SISBT1*, *2*, und *4* cDNAs als Matrize nachweisen (Abb. 3.2.3). Die Primer erwiesen sich damit als geeignet für den spezifischen Nachweis von *SISBT3*.



**Abb. 3.2.3 Spezifität der *SISBT3*-Primer**

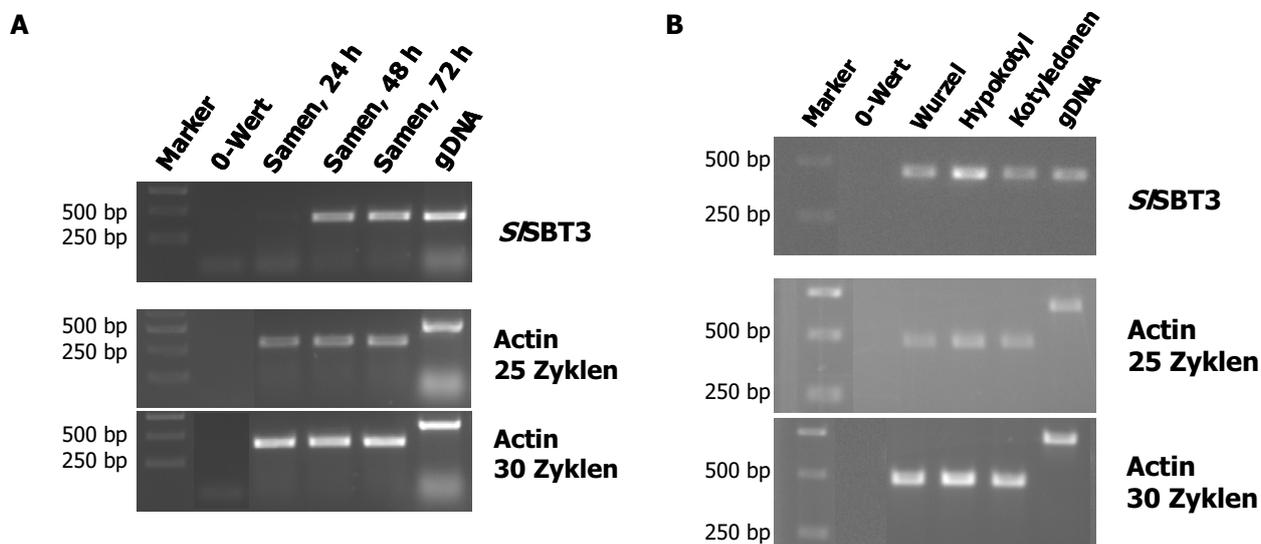
PCR auf cDNA von *SISBT1* (1), *SISBT2* (2), *SISBT3* (3) und *SISBT4* (4) mit der für *SISBT3* spezifischen Primerkombination. K bezeichnet die Kontroll-PCR ohne cDNA. Als Größenstandard diente ein 1 kb-DNA-Standard (M).

#### Expression von *SISBT3*-mRNA während der Samenquellung und -keimung sowie in Tomatenkeimlingen

Für die Analyse der *SISBT3*-mRNA-Expression während der Samenquellung und -keimung wurden 60 Samen, aufgeteilt auf drei Petrischalen, auf befeuchtetem Filterpapier ausgelegt und im Brutschrank bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Nach 24, 48 und 72 h wurden je 20 vorgequollene Samen geerntet. Aus den vorgequollenen Samen wurde RNA isoliert (Kap. 2.10.1.3), über Reverse Transkription die cDNA gewonnen und eine RT-PCR-Analyse durchgeführt (Kap. 2.10.4).

Desweiteren wurden Keimlinge 10 bzw. 16 Tage lang steril im Kulturraum bei 22 °C und einer Photoperiode von 12 h kultiviert. Die RNA wurde aus Wurzeln, Hypokotylen und Kotyledonen extrahiert und für die RT-PCR Analyse eingesetzt.

*S/STB3* wurde 48 h nach Beginn der Quellung sowie zu späteren Zeitpunkten (Abb. 3.2.4 A) und in allen untersuchten Organen exprimiert (Abb. 3.2.4 B). Die mittels histochemischer GUS-Lokalisation gewonnenen Ergebnisse konnten mittels RT-PCR bestätigt werden.



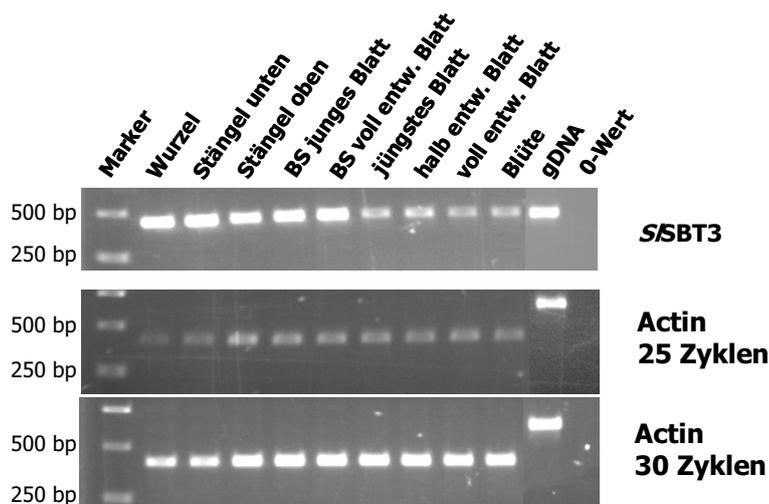
**Abb. 3.2.4 RT-PCR Analyse der *S/STB3*-Expression während der Samenquellung und -keimung sowie in Tomatenkeimlingen**

RNA aus Samen (**A**) und den angegebenen Organen (**B**) wurde revers transkribiert und die gewonnene cDNA für die PCR eingesetzt. Die Primerpaare waren spezifisch für *S/STB3* (35 Zyklen) und Actin (25 bzw. 30 Zyklen). Kontrollreaktionen enthielten 100 ng genomische DNA aus Tomate (gDNA) bzw. keine DNA-Matrize (0-Wert). Als Größenstandard diente ein 1 kb-DNA-Standard (Marker).

### Expression von *SISBT3*-mRNA in verschiedenen Tomatenorganen

Aus verschiedenen Organen (Wurzel, unterer und oberer Teil des Stängels, Blattstiele (BS), junge, halb entwickelte (halb entw.) und voll entwickelte (voll entw.) Blätter und offene Blüten) sechs Wochen alter Pflanzen wurde RNA isoliert und für die RT-PCR-Analyse eingesetzt.

*SISBT3* wurde in allen untersuchten Organen exprimiert (Abb. 3.2.5) Allerdings war die Expression in der Wurzel, im gesamten Stängel und Blattstielen deutlich stärker als in den anderen untersuchten Organen. In der offenen Blüte konnte im Gegensatz zur histochemischen Lokalisation eine *SISBT3*-Expression nachgewiesen werden. Von dieser Ausnahme abgesehen, konnten die Ergebnisse der histochemischen Lokalisation mittels RT-PCR bestätigt werden.



**Abb. 3.2.5 RT-PCR Analyse der *SISBT3*-Expression in verschiedenen Organen von *S. lycopersicum***

RNA aus den angegebenen Organen wurde revers transkribiert und die gewonnene cDNA für die PCR eingesetzt. Die Primerpaare waren spezifisch für *SISBT3* (35 Zyklen) und Actin (25 bzw. 30 Zyklen). Kontrollreaktionen enthielten 100 ng genomische DNA aus Tomate (gDNA) bzw. keine DNA-Matrize (0-Wert). Als Größenstandard diente ein 1 kb-DNA-Standard (Marker). BS bedeutet Blattstiele, entw. steht für entwickelt.

### 3.2.3 Expression von *SISBT3* in Reaktion auf verschiedene Stimuli

#### 3.2.3.1 Expression von *SISBT3* nach Behandlung mit Fusicoccin

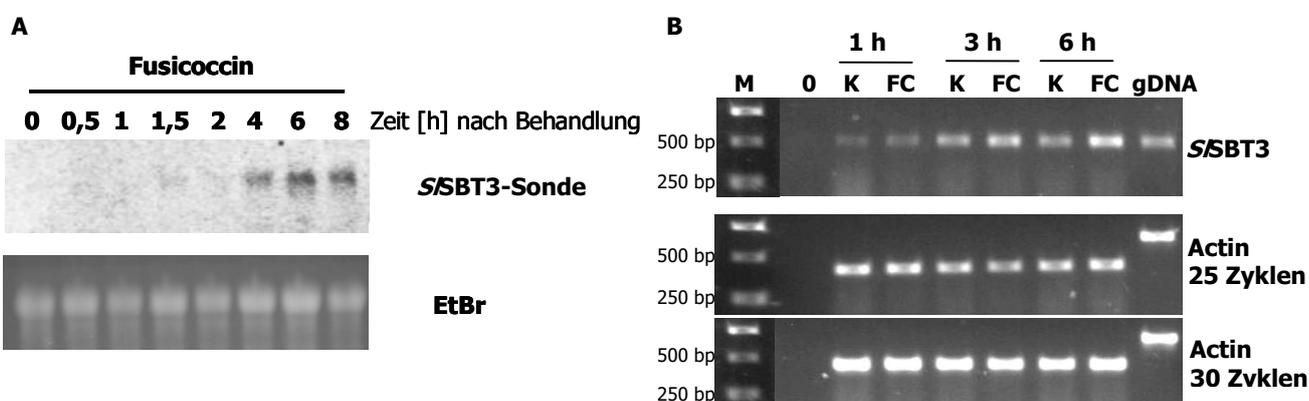
Für zwei der Tomaten-Subtilasen aus der P69-Unterfamilie konnte gezeigt werden, dass sie nach Pathogenbefall induziert werden (VERA & CONEJERO 1988, TORNERO ET AL. 1996, JORDÁ ET AL. 1999). Fusicoccin, ein Gift, welches vom Pilz *Fusicoccum amygdali* produziert wird, induziert verschiedene Gene pflanzlicher Pathogenabwehr, so genannte PR-Gene (FRICK & SCHALLER 2002, SINGH & ROBERTS 2004). Um eine mögliche Rolle von *SISBT3* bei der Pathogenabwehr zu untersuchen, sollte die Expression von *SISBT3* nach Fusicoccin-Behandlung analysiert werden. Hierfür wurden zwei Wochen alte Tomatenpflanzen wie unter Kapitel 2.14.1 beschrieben mit Fusicoccin behandelt.

Nach definierter Behandlungsdauer wurde Blattmaterial geerntet, RNA extrahiert (Kap. 2.10.1.3) und eine Northern Blot-Analyse (Kap. 2.10.6) durchgeführt.

Eine deutliche Induktion der *SISBT3*-Expression war 4 h nach Behandlung zu erkennen und konnte auch nach 8 h noch nachgewiesen werden (Abb. 3.2.6 A). Das Maximum der *SISBT3*-Expression war nach 6 h festzustellen.

In einem zweiten Versuch wurde die Induktion der *SISBT3*-Expression durch Fusicoccin in zwei Wochen alten Tomatenpflanzen im Vergleich zu pufferbehandelten Kontrollpflanzen mittels RT-PCR analysiert. Abbildung 3.2.6 B zeigt eine, wenn auch im Vergleich zur Kontrollgruppe schwache Induktion der *SISBT3*-Expression 3 h nach Behandlung, die sich nach 6 h etwas verstärkte. Die Induktion von *SISBT3* nach Behandlung mit Fusicoccin ist ein erster Hinweis auf eine mögliche Funktion der Protease bei der Pathogenantwort.

Die Northern Blot-Analyse mit Fusicoccin-behandelten Wt-Pflanzen wurde ein zweites Mal durchgeführt. Dieses Mal wurde eine Gruppe von Kontrollpflanzen parallel nur mit Pufferlösung behandelt. Bei diesem Versuch konnte keine Induktion der *SISBT3*-Expression nach Behandlung mit Fusicoccin im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (nicht gezeigt), was die Ergebnisse der beiden oben aufgeführten Versuchen nicht bestätigt. Dies könnte bedeuten, dass die in den ersten beiden Versuchen detektierte Induktion von *SISBT3* nicht von Fusicoccin ausgelöst wurde. Eine Möglichkeit wäre eine Induktion von *SISBT3* als Folge der Verwundung bei der Fusicoccin-Applikation. Dies würde auch die Induktion von *SISBT3* in der Kontrollgruppe bei der RT-PCR-Analyse erklären.



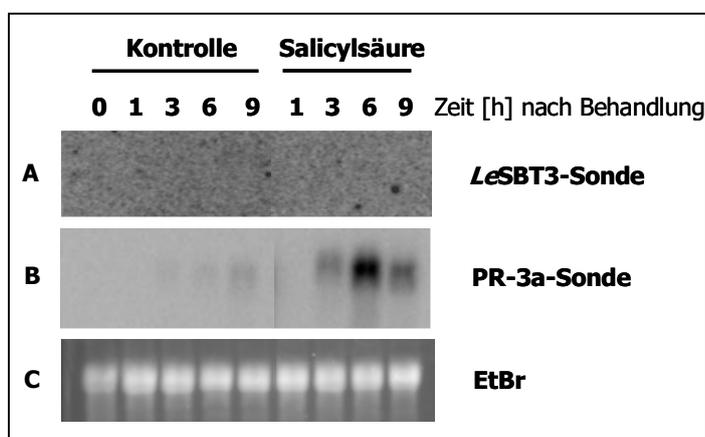
**Abb. 3.2.6** *SISBT3*-Expression in Wt-Pflanzen nach Fusicoccin-Behandlung

**A.** Zwei Wochen alte Wildtyp-Tomatenpflanzen wurden über den Transpirationsstrom mit  $3 \mu\text{M}$  Fusicoccin-Lösung (FC) behandelt und die Expression von *SISBT3* zu definierten Zeitpunkten mittels Northern Blot-Analyse bestimmt. In jeder Spur wurden  $5 \mu\text{g}$  RNA geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Blot wurde mit einer radioaktiv markierten *SISBT3*-Sonde hybridisiert (oben). Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA wurde das Gel mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt (unten).

**B.** Zusätzlich zur Fusicoccin-Behandlung (FC,  $3 \mu\text{M}$ ) wurden zwei Wochen alte Wildtyp-Tomatenpflanzen mit Pufferlösung (K) behandelt und die Expression von *SISBT3* zu definierten Zeitpunkten mittels RT-PCR bestimmt. Die Primerpaare waren spezifisch für *SISBT3* (35 Zyklen) und Actin (25 bzw. 30 Zyklen). Kontrollreaktionen enthielten  $100 \text{ ng}$  genomische DNA aus Tomate (gDNA) bzw. keine DNA-Matrize (0-Wert). Als Größenstandard diente ein  $1 \text{ kb}$ -DNA-Standard (M).

### 3.2.3.2 Expression von *SISBT3* nach Behandlung mit Salicylsäure

Im vorhergehenden Kapitel wurde bereits erwähnt, dass Mitglieder der Tomaten-Subtilase-Familie P69 nach Pathogenbefall induziert werden. Ein Signalmolekül, welches bei der Reaktion der Pflanze nach Pathogenbefall freigesetzt wird und bei der Signalübertragung sowie bei der Aktivierung von PR-Genen eine wichtige Rolle spielt, ist die Salicylsäure (DELANEY ET AL. 1994). Es lag daher nahe, eine mögliche Induktion von *SISBT3* durch Salicylsäure zu untersuchen. Hierzu wurde RNA von zwei Wochen alten, mit Salicylsäure behandelten (Kap. 2.14.1) Tomatenpflanzen extrahiert und eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurde der gleiche Blot zunächst mit der *SISBT3*-spezifischen Sonde und nach Entfernen derselben mit einer spezifischen PR-3a-Sonde hybridisiert. *PR-3a* kodiert für eine basische Chitinase. Dieses Protein gehört zur Klasse der PR-Proteine, welche nach Pathogenbefall induziert werden (LINTHORST 1991). Eine PR-3a-spezifische Sonde kann somit als Kontrolle für eine erfolgreiche Salicylsäure-Behandlung verwendet werden. Dabei muss eine Induktion des *PR-3a*-Gens nach Salicylsäurebehandlung zu erkennen sein. Es konnten keine *SISBT3*-Signale auf der Membran detektiert werden (Abb. 3.2.7 A). Das *PR-3a*-Gen wurde wie zu erwarten, durch die Salicylsäure-Behandlung induziert (Abb. 3.2.7 B). Die Expression von *SISBT3* wurde durch die Salicylsäure-Behandlung nicht beeinflusst. Somit scheint *SISBT3* keine Rolle in der durch Salicylsäure vermittelten Pathogenantwort zu spielen.



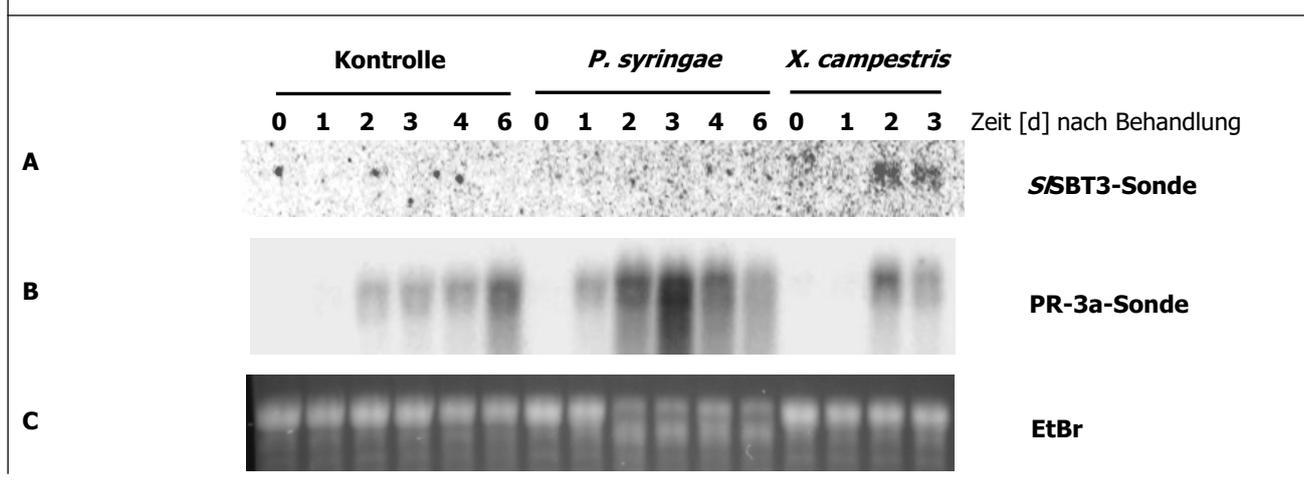
**Abb. 3.2.7** *SISBT3* Expression in Wt-Pflanzen nach Salicylsäure-Behandlung

Zwei Wochen alte Wildtyp-Tomatenpflanzen wurden über den Transpirationsstrom mit 2 mM Salicylsäure-Lösung bzw. mit Pufferlösung (Kontrolle) behandelt und die Expression von *SISBT3* zu definierten Zeitpunkten mittels Northern Blot-Analyse bestimmt. In jeder Spur wurden 5 µg RNA geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Blot wurde sukzessive mit radioaktiv markierten Sonden für *SISBT3* (**A**) und PR-3a (**B**) hybridisiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA wurde das Gel mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt (**C**).

### 3.2.3.3 Expression von *SISBT3* nach Infektion mit *P. syringae* und *X. campestris*

Nachdem eine Induzierbarkeit von *SISBT* mit dem Pilz-Elicitor Fusicoccin festgestellt wurde, sollte überprüft werden, ob *SISBT3* nach Pathogenbefall induziert werden kann und damit eine Rolle bei der Pathogenantwort von Tomatenpflanzen spielen könnte. Hierzu wurde RNA von zwei Wochen alten Tomatenpflanzen, welche mit *Pseudomonas syringae* und *Xanthomonas campestris* infiltriert wurden (Kap. 2.14.2), extrahiert und eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurde der gleiche Blot zunächst mit der *SISBT3*-spezifischen Sonde und anschließend mit der PR-3a-spezifischen Sonde hybridisiert, um sicher zu gehen, dass die Infiltration der Bakterien auch zu einer Pathogenese geführt hatte. Dabei muss eine Induktion des PR-3a-Gens nach Bakterieninfiltration zu erkennen sein.

Zwei Tage nach Behandlung mit *X. campestris* konnte eine Induktion von *SISBT3* beobachtet werden, die auch am dritten Tag noch anhielt (Abb. 3.2.8). Weitere Zeitpunkte (vier und sechs Tage nach Behandlung) konnten nicht untersucht werden, da die Pflanzen zu diesen Zeitpunkten schon starke Symptome der Bakterieninfektion aufwiesen – die Blätter waren fast vollständig nekrotisch, so dass keine intakte RNA isoliert werden konnte. Die Behandlung mit *P. syringae* hatte keinen Einfluss auf die Expression von *SISBT3* (Abb. 3.2.8 A). Die erwartete Induktion des PR-3a-Gens nach Bakterieninfektion konnte für beide Bakterienspecies gezeigt werden. Allerdings war auch bei den Kontrollpflanzen eine, wenn auch schwache, Induktion des PR-3a-Gens zu beobachten (Abb. 3.2.8 B). Bei der Infiltration der Lösungen in die Blattunterseite kann eine Verletzung der Pflanzen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Über diese Wunde könnten die Kontrollpflanzen mit Pathogenen infiziert worden sein.



**Abb. 3.2.8** *SISBT3*-Expression in Wt-Pflanzen nach Behandlung mit *P. syringae* und *X. campestris*

Zwei Wochen alte Wildtyp-Tomatenpflanzen wurden mit Bakteriensuspension bzw. mit Pufferlösung (Kontrolle) infiltriert und die Expression von *SISBT3* nach bestimmten Zeitpunkten mittels Northern Blot-Analyse bestimmt. In jeder Spur wurden 5 µg RNA geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Blot wurde sukzessive mit radioaktiv markierten Sonden für *SISBT3* (A) und PR-3a (B) hybridisiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA wurde das Gel mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt (C).

#### **3.2.3.4 Expression von *S/SBT3* nach mechanischer Verwundung**

In Kapitel 3.1.9 wurde gezeigt, dass *S/SBT3* in der Lage ist, Systemin *in vitro* zu spalten. Da Systemin ein Signalmolekül ist, welches in Tomatenpflanzen nach mechanischer Verwundung bzw. Insektenfraß freigesetzt wird und maßgeblich an der Induktion von Abwehrgenen gegen herbivore Insekten beteiligt ist (PEARCE ET AL. 1993), wurde vermutet, dass *S/SBT3* über die Inaktivierung von Systemin eine Rolle bei der Regulation der Wundantwort spielen könnte. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Verwundung auf die Expression von *S/SBT3* in zwei Wochen alten Wildtyp-Tomatenpflanzen anhand von Northern Blot-Analysen untersucht.

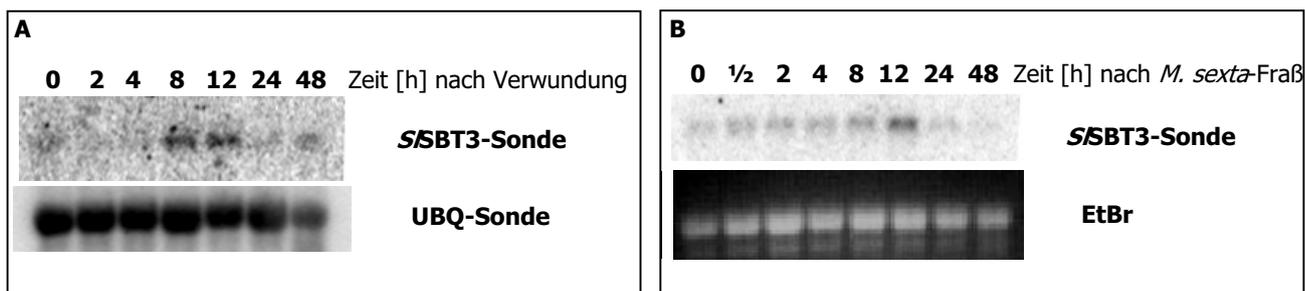
Eine deutliche Induktion der *S/SBT3*-Expression konnte 8 h nach zweifacher mechanischer Verwundung (Kap. 2.14.3) nachgewiesen werden (Abb. 3.2.9 A). Das Induktionsmaximum trat zwischen 8 und 12 h auf. Nach 24 h entsprach die Expression von *S/SBT3* wieder der Expression zum Zeitpunkt vor der Verwundung.

#### **3.2.3.5 Expression von *S/SBT3* nach Verwundung durch *Manduca sexta*-Larven**

Um die Verletzung durch Insektenfraß mit einer mechanischen Verwundung hinsichtlich der Expression von *S/SBT3* vergleichen zu können, wurden drei Wochen alte Wildtyp-Tomatenpflanzen zweifach durch *M. sexta*-Larven verwundet (Kap. 2.14.4) und anhand von Northern Blot-Analysen untersucht. Der zeitliche Verlauf der *S/SBT3*-Expression nach Fraß von *M. sexta*-Larven war vergleichbar mit dem nach wiederholter mechanischer Verwundung (Abb. 3.2.9 B). Bis 12 h nach Fraß von *M. sexta*-Larven konnte eine langsame, aber stetige Zunahme der *S/SBT3*-Expression beobachtet werden. Nach 24 h war ein Rückgang der *S/SBT3*-Transkriptmenge festzustellen, nach 48 h entsprach die Höhe der *S/SBT3*-Transkriptmenge der zum Zeitpunkt vor der Verwundung.

Die zweifache Verwundung in einem zeitlichen Abstand von einer Stunde erwies sich als erforderlich für die Induktion der *S/SBT3* Expression. In einem zweiten Versuch, in dem auf die wiederholte Verwundung verzichtet wurde, ließ sich keine Induktion der *S/SBT3* Expression nachweisen (nicht gezeigt).

Die induzierte Expression von *S/SBT3* nach mechanischer Verwundung sowie nach Insektenfraß weist auf eine mögliche Rolle der Protease bei der Wundantwort hin.



**Abb. 3.2.9** *SISBT3*-Expression in Wt-Pflanzen nach mechanischer Verwundung und Verwundung durch *M. sexta*-Larven

In zwei Wochen alten mechanisch verwundeten Wildtyp-Tomatenpflanzen (**A**) sowie in drei Wochen alten durch *M. sexta*-Larven verwundeten Wildtyp-Tomatenpflanzen (**B**) wurde die Expression von *SISBT3* zu definierten Zeitpunkten mittels Northern Blot-Analyse bestimmt. In jeder Spur wurden 5 µg RNA aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Blot wurde mit einer radioaktiv markierten *SISBT3*-Sonde hybridisiert (**A** und **B** oben). Nach Entfernen der *SISBT3*-Sonde wurde der Blot mit einer Ubiquitin-Sonde (UBQ) hybridisiert (**A** unten). Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA wurde das Gel mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt (**B** unten).

### Kurzzusammenfassung II – Expressionsmuster von *SISBT3*

- ❖ Durch Reporteranalyse konnte die stärkste Aktivität des *SISBT3*-Promotors in der Wurzel, an Orten lateralen Wurzelwachstums, im Stängel, Blattstiel und im vaskulären Gewebe der Blätter nachgewiesen werden.
- ❖ *SISBT3* wurde 48 h nach Beginn der Quellung sowie zu späteren Zeitpunkten im keimenden Samen exprimiert.
- ❖ *SISBT3* wurde im gesamten Keimling sowie in allen untersuchten Tomatenorganen exprimiert.
- ❖ In Querschnitten von gefärbten *SISBT3*-Promotor::*GUS*-Pflanzen konnte eine *GUS*-Färbung in Xylemparenchym- und Phloemzellen nachgewiesen werden.
- ❖ Die *SISBT3*-Expression wurde nach Fusicoccin-Behandlung, Infektion mit *X. campestris*, mechanischer Verwundung sowie Verwundung durch *M. sexta*-Larven induziert.

### **3.3 Phänotypische Charakterisierung der *S/*SBT3-RNAi- und *S/*SBT3-Überexpressionspflanzen**

Zu Beginn dieser Arbeit standen homozygote Samen der T<sub>1</sub>-Generation von insgesamt sieben Kanamycin-resistenten RNAi-Linien, nämlich 1, 9, 12, 13, 14, 17 und 21, sowie von vier Kanamycin-resistenten Überexpressions-Linien, nämlich 2, 16, 18 und 19 zur Verfügung.

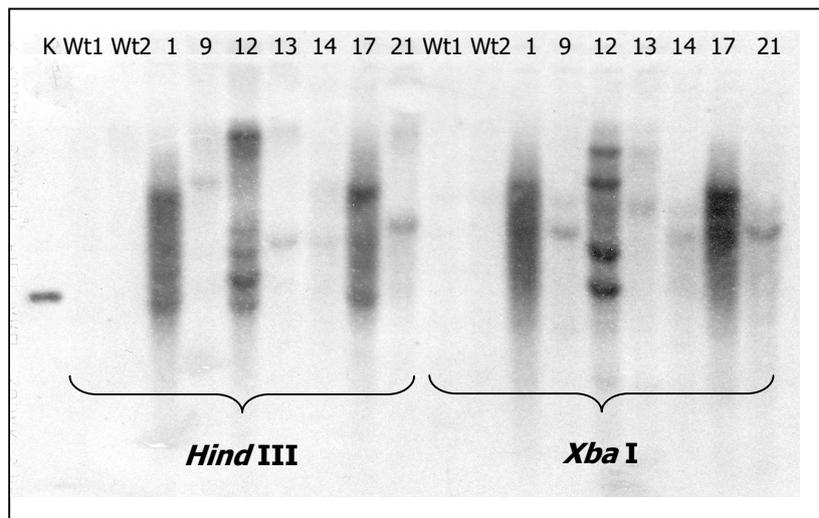
#### **3.3.1 Identifizierung unabhängiger Transformanten mittels Southern Blot-Analyse**

Die homozygoten RNAi- und Überexpressions-Linien wurden einer Southern Blot-Analyse unterzogen, um unabhängig transformierte Linien, sowie die Anzahl der *S/*SBT3-Gen-Kopien in den einzelnen Linien zu bestimmen. Dazu wurde die genomische DNA der einzelnen Linien mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Als Sonde wurde die radioaktiv markierte, für das Kanamycin-Resistenzgen spezifische, NPTII-Sonde eingesetzt. Als Positivkontrolle für die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten NPTII-Sonde wurde der binäre Vektor pART27 verwendet, welcher zuvor mit *Not*I linearisiert wurde.

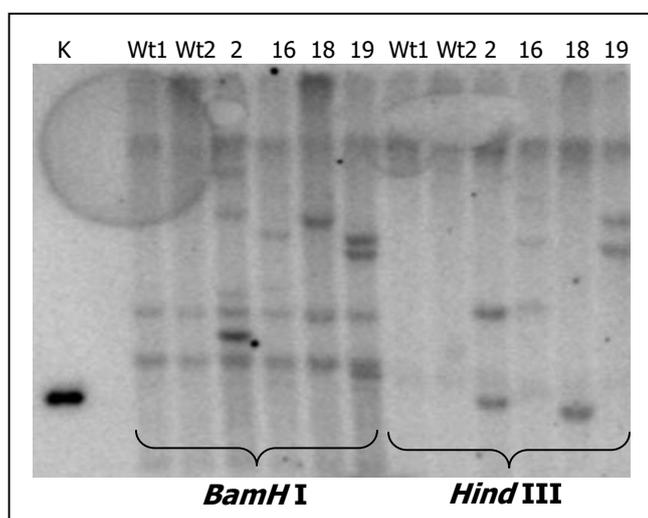
Abbildung 3.3.1 A zeigt das Ergebnis der Southern Blot-Analyse der RNAi-Linien. Darin sind für die Linien 9, 12, 13, 14 und 21 unterschiedliche Bandenmuster zu erkennen. Nur die Linien 1 und 17 wiesen das gleiche Integrationsmuster auf, was darauf schließen lässt, dass beide Linien aus demselben Transformationsereignis entstanden sind. Die anderen fünf Linien konnten aufgrund des unterschiedlichen Bandenmusters als unabhängige Linien identifiziert werden (9, 12, 13, 14 und 21). Anhand der auftretenden Bandenzahl konnte die Zahl der integrierten Genkopien bestimmt werden. Für alle sechs Linien wurden zwei oder mehr Genkopien nachgewiesen.

Alle vier Überexpressions-Linien zeigten unterschiedliche Integrationsmuster (Abb. 3.3.1 B). Somit handelt es sich bei allen vier Linien um unabhängige Transformanten. Die Linie 18 besaß nur eine Genkopie von *S/*SBT3. Für die anderen drei Linien wurden mehr als eine Genkopie nachgewiesen.

A



B



**Abb. 3.3.1 Southern Blot-Analyse der *SSBT3* Expression in RNAi- (A) und Überexpressions-Linien (B)**

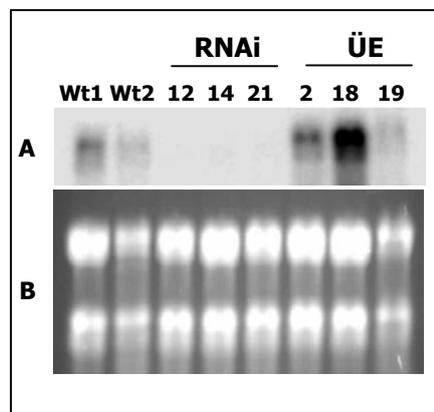
Je 10 µg genomische DNA der RNAi-, bzw. Überexpressions-Linien sowie zweier Wt-Linien wurden mit den Enzymen *Hind* III und *Xba* I (A) bzw. *Bam*H I und *Hind* III (B) verdaut. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten NPTII-Sonde hybridisiert. K zeigt die positiv Kontrolle (100 pg Plasmid-DNA, pART27, linearisiert mit *Not* I).

### 3.3.2 Northern Blot-Analyse der Expression von *SSBT3* in RNAi- und Überexpressions-Linien

Die in der Southern Blot-Analyse identifizierten unabhängigen RNAi- bzw. Überexpressions-Linien wurden dahingehend überprüft, ob die Transkriptmenge an *SSBT3* in den RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp tatsächlich reduziert bzw. in den Überexpressions-Linien erhöht war.

Da nicht von allen Linien genügend Samenmaterial für spätere Experimente zur Verfügung stand, wurden lediglich die RNAi-Linien 12, 14 und 21 bzw. die Überexpressions-Linien 2, 18 und 19

einer Northern Blot-Analyse unterzogen. Da *S**S**B**T**3* in hohem Maße in der Wurzel exprimiert wird, wurde die RNA für die Northern Blot-Analysen aus Wurzeln drei Wochen alter, auf sterilem Medium aufgezogener Tomatenpflanzen gewonnen (Kap. 2.10.1.3). In keiner der drei analysierten RNAi-Linien war das *S**S**B**T**3*-Transkript nachzuweisen (Abb. 3.3.2). Die Expression von *S**S**B**T**3* wurde also durch RNA-Interferenz vollständig unterdrückt. Bei den Überexpressionspflanzen war die Transkriptmenge von Linie zu Linie sehr unterschiedlich. Während bei Linie 18 die Expressionsrate von *S**S**B**T**3* im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen deutlich stärker war, wies die Linie 2 nur eine schwach erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen auf, während sich Linie 19 im Bezug auf die *S**S**B**T**3*-Transkriptmenge nicht von den Wildtyp-Pflanzen unterschied.



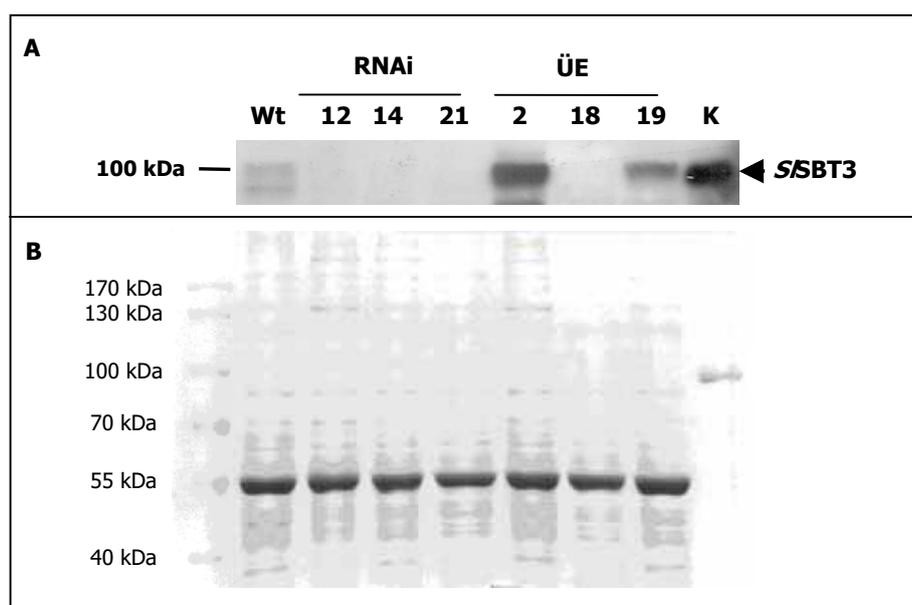
**Abb. 3.3.2** Northern Blot-Analyse der *S**S**B**T**3*-Expression in RNAi- und Überexpressions-Linien (ÜE)

In jeder Spur wurden 5 µg RNA aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Blot wurde mit einer radioaktiv markierten *S**S**B**T**3*-Sonde hybridisiert (A). Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA wurde das Gel mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt (B).

### 3.3.3 Western Blot-Analyse der *S**S**B**T**3*-Expression in RNAi- und Überexpressions-Linien

Um die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse auf Proteinebene zu bestätigen, wurden die gleichen RNAi- und Überexpressions-Linien einer Western Blot-Analyse unterzogen. Dafür wurden Gesamt-Proteine aus Blättern von vier bis sechs Wochen alten und aus Wurzeln von drei Wochen alten Tomatenpflanzen, die auf sterilem Medium aufgezogen wurden, extrahiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in einem 7 %-igen SDS-PAGE-Gel und anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurde *S**S**B**T**3* mit Hilfe eines polyklonalen *S**S**B**T**3*-Antiserums detektiert.

*SSBT3* konnte in keiner der drei RNAi-Linien nachgewiesen werden (Abb. 3.3.3). Somit ist in diesen drei Linien sowohl auf RNA-Ebene, als auch auf Proteinebene die *SSBT3*-Expression bis unter die Nachweisgrenze unterdrückt. Die Überexpressions-Linien zeigten wie schon in der Northern Blot-Analyse kein einheitliches Bild. In der Linie 2 war eine deutlich stärkere *SSBT3*-Proteinbande zu detektieren als im Wildtyp. Es handelt sich hier um eine echte Überexpressions-Linie. Linie 19 zeigt hingegen im Vergleich zum Wildtyp nur eine schwache Überexpression von *SSBT3*. In der Linie 18 konnte kein *SSBT3* nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war nicht unbedingt zu erwarten, da in der Northern Blot-Analyse *SSBT3*-Transkripte in dieser Linie stark überexprimiert waren (Abb. 3.3.2). Hier ist es offenbar zu einer Unterdrückung der Expression auch der endogenen *SSBT3* durch "Cosuppression" gekommen. Auffällig ist eine zweite Proteinbande beim Wildtyp etwas unterhalb der 100 kDa-Marke. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein Abbauprodukt von *SSBT3*. Möglich wäre auch eine unspezifische Bindung der polyklonalen anti-*SSBT3*-Antikörper. Western Blot-Analysen mit Proteinextrakten aus Wurzeln lieferten die gleichen Ergebnisse (nicht gezeigt).



**Abb. 3.3.3 Western Blot-Analyse der *SSBT3* Expression in RNAi und Überexpressions-Linien (ÜE)**

**A.** Proteinextrakte aus Blättern vier bis sechs Wochen alter Tomatenpflanzen (25 µg Protein) wurden mittels SDS-PAGE (7 %-ige Gele) aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und durch ECL (Enhanced Chemo Luminescence) entwickelt. Aufgereinigtes *SSBT3* (20 ng) wurde als Kontrolle (K) aufgetragen. Der Western Blot wurde anschließend mit dem primären *SSBT3*-Antiserum (1:2.000) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) inkubiert.

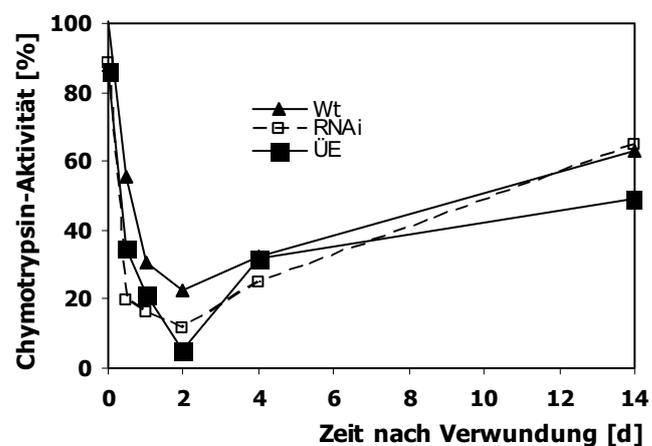
**B.** Zur Überprüfung des Proteinauftrags wurde ein zweites SDS-PAGE-Gel mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt. In jeder Spur wurden 15 µg Protein aufgetragen. Als Kontrolle (K) wurde 500 ng aufgereinigtes *SSBT3* aufgetragen.

### 3.3.4 Induktion der Proteinaseinhibitor-Aktivität in Wt-, *SSBT3*-RNAi- und Überexpressionspflanzen nach Verwundung

In MALDI-TOF MS-Experimenten wurde gezeigt, dass rekombinante *SSBT3* Systemin *in vitro* am C-terminalen Ende nach der Aminosäure Glutamin spaltet (Kap. 3.1.9). Eine Spaltung in dieser Position führt zu einer Inaktivierung des Systemin-Peptids (PEARCE ET AL. 1993). Weiterhin ist Prosystemin, das Systemin-Vorläufer-Peptid im Phloemparenchym exprimiert. Von dort aus wird es nach Verwundung in den Apoplasten des vaskulären Systems freigesetzt (JACINTO ET AL. 1997, NARVÁEZ-VÁSQUEZ & RYAN 2004). In Kapitel 3.2.1 wurde gezeigt, dass *SSBT3* ebenfalls im vaskulären System, genauer im Phloem und im Xylemparenchym exprimiert wird. Die Lokalisierung von *SSBT3* und Prosystemin im gleichen Gewebe deutet auf eine mögliche Rolle von *SSBT3* in der Spaltung und Inaktivierung von Systemin *in vivo* und damit auf eine Veränderung der Wundantwort hin. Diese würde sich dann in den RNAi-Pflanzen in einer verstärkten oder in den Überexpressionspflanzen in einer abgeschwächten Expression von Proteinen der Insektenabwehr widerspiegeln. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Expression von Proteinaseinhibitoren als Markerproteine der Insektenabwehr mittels eines biochemischen Tests untersucht (Kap. 2.13).

Für den Proteinaseinhibitor-Test (Kap. 2.13) wurden zwei Wochen alte Wt-, RNAi- und Überexpressionspflanzen mechanisch verwundet und die Proteinaseinhibitor-Aktivität in Proteinextrakten in einer Zeitreihe nach Verwundung gemessen. Hierzu wurde die Restaktivität von Chymotrypsin nach Inkubation mit den Proteinextrakten bestimmt.

In allen drei Genotypen wurde eine ähnliche Zunahme der Chymotrypsin-inhibierenden Aktivität nach Verwundung beobachtet (Abb. 3.3.4).

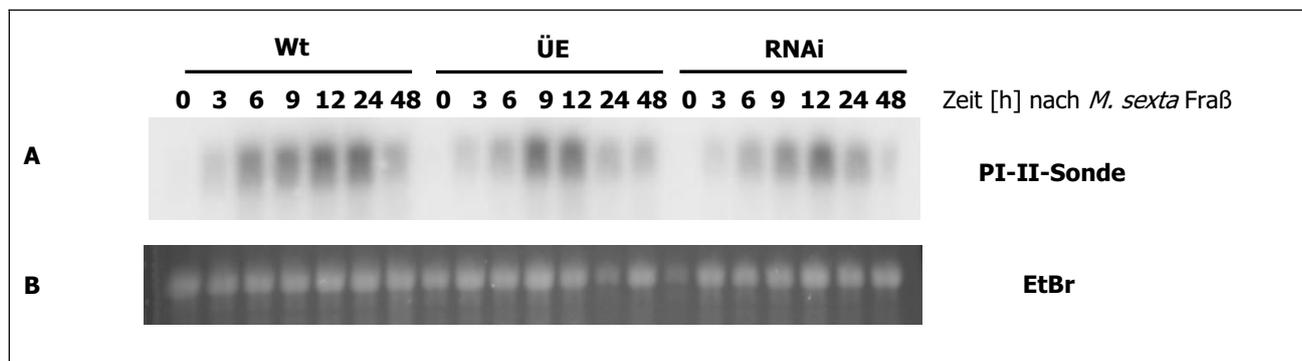


**Abb. 3.3.4 Chymotrypsin-Aktivität in Wt-, RNAi- und Überexpressionspflanzen nach Verwundung**

Zwei Wochen alte Wt-, *SSBT3*-RNAi- und *SSBT3*-Überexpressionspflanzen (ÜE) wurden mechanisch verwundet und die Proteinaseinhibitoraktivität gegen Chymotrypsin in Blattextrakten mit BtpNA als Substrat gemessen. Es ist die Restaktivität von Chymotrypsin in % der Ausgangsaktivität in Abwesenheit von Blattextrakten dargestellt.

Zum Zeitpunkt 0, also vor der Verwundung, ist die Proteinaseaktivität nahezu 100 %, d.h. die Proteinaseinhibitor-Aktivität sehr gering. Innerhalb von zwei Tagen nach Verwundung sinkt die Chymotrypsin-Aktivität dann auf 5 – 20 % je nach Genotyp ab, das heißt, die Proteinaseinhibitor-Aktivität steigt an. Im weiteren Verlauf nach der Verwundung scheint die Konzentration der Proteinaseinhibitoren wieder abzunehmen, wodurch die Chymotrypsin-Restaktivität steigt und zwei Wochen nach Verwundung wieder ca. 50 % der Ausgangsaktivität erreicht. Es konnte kein Unterschied in der zeitabhängigen Expression von Proteinaseinhibitoren zwischen den drei Genotypen festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass *SSBT3* nicht maßgeblich an der Regulation der Wundantwort durch die Inaktivierung von Systemin beteiligt ist.

Zusätzlich zum enzymatischen Test wurde mit Hilfe von Northern Blot-Analysen die zeitabhängige Expression des Proteinase-Inhibitors-II (PI-II) nach Verwundung durch *M. sexta*-Larven analysiert. Hierzu wurden drei Wochen alte Wt-, RNAi- und Überexpressions-Tomatenpflanzen wie in Kapitel 2.14.4 beschrieben durch *M. sexta*-Larven verwundet. 3 h nach Verwundung war das *PI-II*-Transkript in allen drei Genotypen nachzuweisen. Die *PI-II*-Expression stieg dann stark an mit einem Expressionsmaximum zwischen 12 und 24 h nach Verwundung. Nach 48 h wurde die *PI-II*-Transkript-Menge wieder geringer. Es konnten keine deutlichen Unterschiede im Verlauf der *Proteinase-Inhibitor-II*-Expression in den verschiedenen Genotypen festgestellt werden (Abb. 3.3.5). Diese Ergebnisse stimmen mit denen des Proteinaseinhibitor-Test überein und demonstrieren, dass *SSBT3* keine maßgebliche Rolle bei der Regulation der Systemin-vermittelten Wundantwort spielt.



**Abb. 3.3.5 Northern Blot-Analyse der Proteinase-Inhibitor-II-Expression in Wt-, RNAi- und Überexpressionspflanzen (ÜE) nach Verwundung mit *M. sexta***

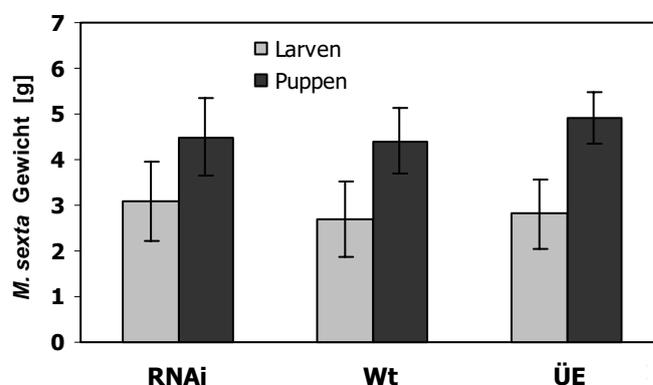
Drei Wochen alte Tomatenpflanzen (Wt, RNAi, ÜE) wurden durch *M. sexta*-Larven verwundet und die Expression von *PI-II* zu definierten Zeitpunkten mittels Northern Blot-Analyse bestimmt. In jeder Spur wurden 5 µg RNA aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Blot wurde mit einer radioaktiv markierten *PI-II*-Sonde hybridisiert (**A**). Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA wurde das Gel mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt (**B**).

### 3.3.5 Einfluss von *S*SBT3-RNAi-, *S*SBT3-Überexpressions- und Wt-Pflanzen auf *Manduca sexta*-Larven

Um eine mögliche Beteiligung von *S*SBT3 an Abwehrreaktionen von Tomatenpflanzen nicht nur auf Ebene der Genexpression, sondern auch im Hinblick auf die Resistenz der Pflanzen zu untersuchen, wurde die Entwicklung von *M. sexta*-Larven auf RNAi, Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen verglichen. OROZCO-CARDENAS ET AL. (1993) konnten beispielsweise zeigen, dass *M. sexta*-Larven, welche auf Prosystemin-defizienten Tomaten fraßen, eine erhöhte Körpermasse im Vergleich zur auf Wt-Tomaten aufgezogenen Kontrollgruppe aufwiesen. Daher wurde der Einfluss von Wt-, *S*SBT3-RNAi- und *S*SBT3-Überexpressionspflanzen auf *M. sexta*-Larven anhand verschiedener Parameter untersucht.

#### 3.3.5.1 Larven- und Puppengewichte

*M. sexta*-Raupen wurden zu Beginn des dritten Larvenstadiums auf sechs Wochen alte Wt-, *S*SBT3-RNAi- und *S*SBT3-Überexpressionspflanzen aufgesetzt und das Larven-Wachstum über den gesamten weiteren Entwicklungszyklus beobachtet (Kap. 2.15.1, Larvenentwicklung Experiment 1). Nachdem die Larven sieben Tage lang auf den Tomatenpflanzen der drei verschiedenen Genotypen gefressen hatten, wurden die Raupen gewogen, um eventuelle Unterschiede im Körpergewicht festzustellen. Anschließend wurden die Larven zurück auf die Pflanzen gesetzt, um nach der Verpuppung die Körpermasse der Puppen erneut zu bestimmen. Weder hinsichtlich der Raupen- noch der Puppengewichte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Insekten-Gruppen festgestellt werden (Abb. 3.3.6). Der Versuch wurde wiederholt und das Gewicht der Larven bestimmt, nachdem diese elf Tage auf den Pflanzen gefressen hatten. Es ergab sich auch hier kein signifikanter Unterschied im durchschnittlichen Larvengewicht zwischen den drei Genotypen (nicht gezeigt).



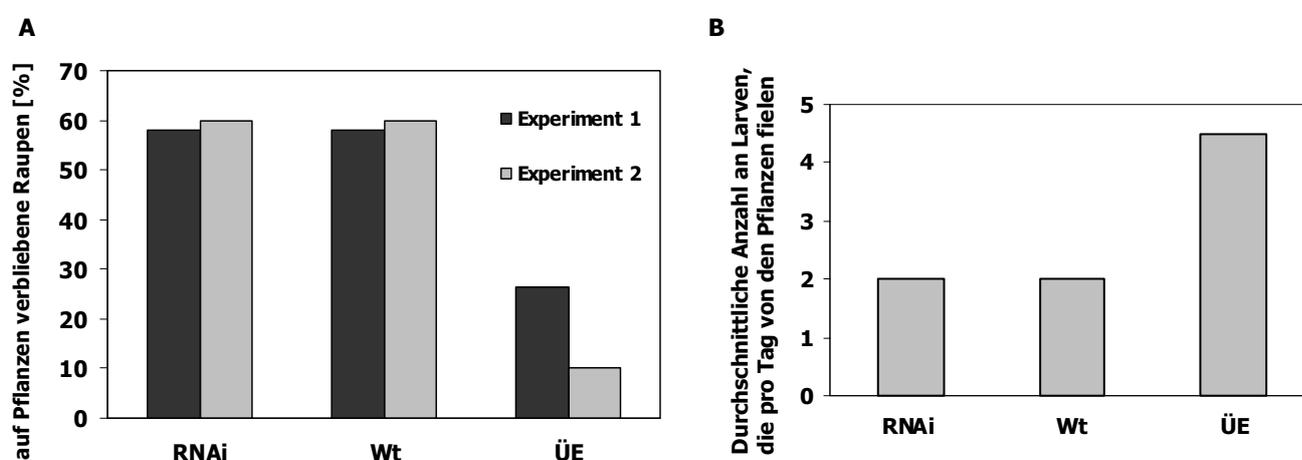
**Abb. 3.3.6 Einfluss von *S*SBT3-RNAi- und Überexpressionspflanzen auf *M. sexta* Larven- und Puppengewichte**

Larven, die ab dem dritten Larvenstadium sieben Tage lang auf Wt-, *S*SBT3-RNAi- und *S*SBT3-Überexpressionspflanzen (ÜE) gefressen hatten, wurden gewogen und die durchschnittlichen Gewichte verglichen. Nach der Verpuppung wurde das Gewicht erneut bestimmt.

### 3.3.5.2 Verbleiben der Larven auf den Pflanzen

Beim Vergleich der Larvenentwicklung auf *SSBT3*-RNAi-, *SSBT3*-Überexpressions- und Wt-Pflanzen wurden nicht nur die Larven- und Puppengewichte (Kap. 3.3.5.1) ausgewertet, sondern auch die Raupen pro Genotyp gezählt, welche bis zum Erreichen des "wandering"-Stadiums auf den Pflanzen verblieben waren (Abb. 3.3.7 A, Experiment 1) In diesem ersten Experiment waren die Futterpflanzen im Gewächshaus zufällig angeordnet worden. Die Raupen, welche von den Pflanzen gefallen waren oder diese verlassen hatten, konnten daher den drei Genotypen nicht mehr zugeordnet werden und wurden aus dem Versuch entfernt.

Das Experiment wurde ein zweites Mal mit einer größeren Anzahl von Tieren durchgeführt (Kap. 2.15.1, Larvenentwicklung Experiment 2). Dieses Mal wurden bei Versuchsbeginn pro Genotyp 50 Larven auf die Pflanzen gesetzt. Die Versuchsdurchführung wurde dahingehend geändert, dass die Futterpflanzen nicht mehr in zufälliger Anordnung im Gewächshaus arrangiert, sondern nach Genotypen getrennt in einzelnen Kabinen aufgestellt wurden. Somit konnten die Raupen, welche sich nicht mehr auf den Pflanzen befanden, ihren Futterpflanzen zugeordnet werden. Dabei wurde täglich notiert, wie viele Raupen von den Pflanzen gefallen oder diese verlassen hatten. Diese wurden wieder zurück auf die Pflanzen gesetzt (Abb. 3.3.7 B).



**Abb. 3.3.7 Verbleiben von *M. sexta*-Larven auf Wt-, *SSBT3*-RNAi- und -Überexpressionspflanzen**

In zwei unabhängigen Experimenten wurde der Anteil der bis zum Ende der Larvenentwicklung auf den Futterpflanzen verbleibenden Larven bestimmt. Nähere Erläuterungen zur Durchführung der beiden Experimente im Text.

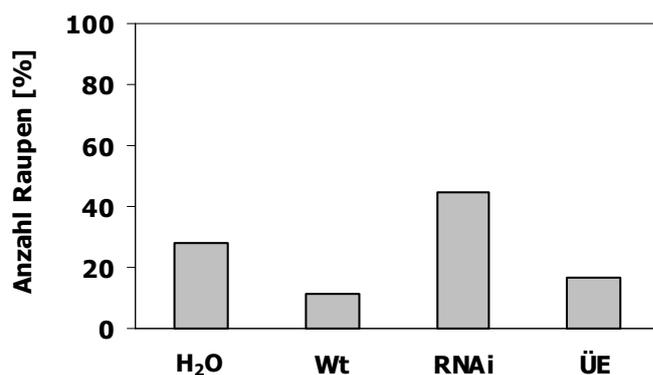
Am Versuchsende (zum Zeitpunkt des "wandering"-Stadiums) wurden alle "gefallenen" Raupen addiert und von der Raupenanzahl zu Beginn des Versuchs abgezogen. Die Differenz wurde als auf den Pflanzen verbliebene Raupen notiert. Von den jeweils 19 Raupen, die zu Beginn des ersten Versuchs pro Genotyp auf den Futterpflanzen verteilt worden waren, befanden sich am Versuchsende nur noch 5 (ca. 26 %) der Raupen auf den *SSBT3*-Überexpressionspflanzen,

wohingegen jeweils 11 (knapp 60 %) der Raupen auf den Wildtyp- und *S*SBT3-RNAi-Pflanzen verblieben waren. Beim zweiten Versuch verblieben nur fünf (10 %) Raupen auf den *S*SBT3-Überexpressionspflanzen, wohingegen sich jeweils 30 (60 %) Raupen auf den Wildtyp- und *S*SBT3-RNAi-Pflanzen befanden ( Abb. 3.3.7 A).

### 3.3.5.3 "Choice"-Test

Um zu überprüfen, ob *Manduca sexta*-Larven eine Präferenz für einen der drei Tomaten-Genotypen (Wt, RNAi, ÜE) als Futterpflanze zeigen, wurde der so genannte "Choice"-Test durchgeführt. Dabei wurde jeweils einer über Nacht ausgehungerten Raupe die Auswahl zwischen Wt-, *S*SBT3-RNAi- und *S*SBT3-Überexpressionspflanze als Nahrungsquelle gegeben. Als Kontrolle diente ein Stück angefeuchtetes Filterpapier. Insgesamt wurde der Test mit 18 Raupen im vierten Larvenstadium durchgeführt, die auf Kunstfutter aufgezogen worden waren und daher keine vorherige Erfahrung mit Wirtspflanzen hatten.

Acht von 18 Raupen (44 %) entschieden sich für die Blattstücke der *S*SBT3-RNAi-Pflanzen. Fünf Raupen (28 %) wählten aus dem Nahrungsangebot das angefeuchtete Filterpapier, nur zwei (11 %) bzw. drei (17 %) Raupen entschieden sich für das Wt- bzw. *S*SBT3-Überexpressions-Blattstück (Abb. 3.3.8). Somit zeigten *M. sexta*-Larven tendenziell eine Präferenz für die *S*SBT3-RNAi-Pflanzen. Aufgrund der relativ geringen Anzahl an Wiederholungen ist jedoch eine konkrete Schlussfolgerung schwierig, vor allem, da sich auch fast ein Drittel der Raupen für die Filterpapierkontrolle entschieden.



**Abb. 3.3.8** Futter-Präferenz von *M. sexta*-Larven für Wt-, *S*SBT3-RNAi- und -Überexpressionspflanzen (ÜE)

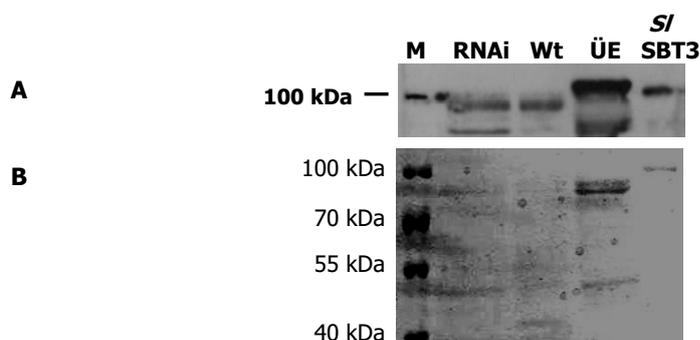
18 *M. sexta*-Larven im vierten Larvenstadium, welche auf Kunstfutter aufgezogen worden waren und daher keine vorherige Erfahrung mit Wirtspflanzen hatten, wurden auf ihre Präferenz für einen der drei Tomaten-Genotypen untersucht. Dabei hatte jeweils eine Larve die Auswahl zwischen einem Wt-, *S*SBT3-RNAi-, *S*SBT3-ÜE-Blattstück oder einem angefeuchteten Filterpapier (H<sub>2</sub>O).

Nicht von Bedeutung für die Auswahl der Larven war die Richtung, in die sie gesetzt wurden: In 40 % der Fälle liefen die Raupen in die Richtung, in die sie gesetzt wurden, in 60 % der Fälle liefen die Raupen in eine andere Richtung. Unbedeutend für die Auswahl der Larven war auch die Himmelsrichtung. Die Raupen liefen zu 22 % nach Norden, zu 39 % nach Süden, zu 17 % nach Osten und zu 22 % nach Westen. Festzustellen war ebenfalls, dass sich die Larven, sobald sie einmal an einer Pflanze zu fressen begonnen hatten, nicht mehr neu für eine andere entschieden, sondern bei der ursprünglich ausgewählten blieben. Dies galt in gleichem Maße für die Filterpapier-Kontrolle (nicht gezeigt).

### 3.3.6 Stabilität von *SSBT3* in Kot von *Manduca sexta*-Larven

Pflanzliche Abwehrproteine wirken nicht nur in der Pflanze, indem sie diese als Futterpflanze unattraktiv für den Schädling machen, sondern auch direkt im Körper des Schadinsektes – meist im Darm – negativ auf die Entwicklung des Tieres. Voraussetzung dafür ist, dass sie eine hohe Stabilität sowohl gegenüber dem stark alkalischen pH-Wert als auch gegenüber dem proteinasereichen Milieu des Insektendarms aufweisen (CHEN ET AL. 2007).

Mit Hilfe einer Western Blot-Analyse von Kot von *M. sexta*-Larven wurde daher untersucht, ob *SSBT3* unbeschadet den Insektendarm passieren kann. Abbildung 3.3.9 zeigt das Ergebnis der Western Blot-Analyse von Kot von *M. sexta*-Larven, welche auf *SSBT3*-RNAi-, *SSBT3*-Überexpressions- und Wt-Pflanzen gefressen hatten.



**Abb. 3.3.9 Stabilität von *SSBT3* in Kot von *M. sexta*-Larven**

**A.** Western Blot-Analyse. Proteinextrakte (7 µg Protein) aus Kot von *M. sexta*-Larven, welche auf Wt-, *SSBT3*-RNAi- und *SSBT3*-Überexpressionspflanzen (ÜE) gefressen hatten, wurden mittels SDS-PAGE (7 %-iges Gel) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Aufgereinigte *SSBT3* (20 ng) wurde als Kontrolle (K) aufgetragen. Der Western Blot wurde anschließend mit dem primären *SSBT3*-Antiserum (1:2.000) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) behandelt und durch ECL (Enhanced Chemo Luminescence) entwickelt.

**B.** Zur Überprüfung des Proteinauftrags wurde ein 7 %-iges SDS-PAGE-Gel mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt. In jeder Spur wurden 7 µg Protein aufgetragen. Zur Kontrolle wurden 500 ng aufgereinigte *SSBT3* aufgetragen.

Aufgereinigte, rekombinante *SSBT3* wurde als Kontrolle aufgetragen. Im Kot von *M. sexta*-Larven, welche auf *SSBT3*-Überexpressionspflanzen gefressen hatten, konnte intaktes *SSBT3*-Protein nachgewiesen werden. Bei der Protein-Bande mit niedrigerem Molekulargewicht, welche in allen drei Genotypen zu erkennen ist, könnte es sich um eine unspezifische Bindung der polyklonalen anti-*SSBT3*-Antikörper oder um ein Abbauprodukt von *SSBT3* handeln.

#### **Kurzzusammenfassung III – Charakterisierung der *in vivo*-Funktion von *SSBT3***

- ❖ Es konnten drei unabhängige, homozygote *SSBT3*-RNAi-Linien identifiziert werden, bei welchen *SSBT3* weder auf RNA-Ebene noch auf Protein-Ebene nachweisbar war, sowie eine homozygote *SSBT3*-Überexpressions-Linie, die sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene *SSBT3* überexprimierte.
- ❖ Die Proteinaseinhibitor-Aktivität nach Verwundung unterschied sich in Wt-, *SSBT3*-RNAi- und *SSBT3*-Überexpressionspflanzen nicht.
- ❖ Die Überexpression von *SSBT3* hatte einen negativen Einfluss auf die Verweildauer von *M. sexta*-Larven auf den Futterpflanzen.
- ❖ *SSBT3* war im Darm von *M. sexta*-Larven stabil und konnte in intakter Form durch Western Blot-Analysen im Kot von *M. sexta*-Larven nachgewiesen werden.

## 4 DISKUSSION

Die Funktion der Proprotein-Konvertasen (PC) ähnlichen Tomaten-Subtilase *SSBT3* im pflanzlichen System ist bisher ungeklärt, wenngleich auf DNA- und RNA-Ebene einzelne Informationen vorhanden sind (MEICHTRY ET AL. 1999). Vorliegende Erkenntnisse (SCHALLER & RYAN 1994) halten dafür, dass eine pflanzliche PC an der Regulation der Wundantwort in Tomatenpflanzen beteiligt ist. Daher ist die Aufklärung der Funktion von *SSBT3* von großem wissenschaftlichem Interesse.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war daher, wegweisende Resultate zu erlangen, die zur Aufklärung der Funktionen dieser Subtilase im lebenden System beitragen. Dies umfasste im Einzelnen die Aufreinigung und biochemische Charakterisierung des rekombinanten Proteins, eine Expressionsanalyse in Tomatenpflanzen sowie die phänotypische Analyse von *SSBT3*-RNAi- und *SSBT3*-Überexpressionspflanzen.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern erste Hinweise auf mögliche Funktionen von *SSBT3* im Hinblick auf die Interaktion zwischen Tomatenpflanze und phytophagen Insekten, die in den folgenden Abschnitten im wissenschaftlichen Kontext diskutiert werden.

### **Aufreinigung und Strukturanalyse**

Eine wichtige Voraussetzung für die biochemische Charakterisierung eines Proteins ist, dass dieses in ausreichender Menge, in reiner aber auch in aktiver Form vorliegt. Die meisten anderen pflanzlichen Subtilasen, die bisher biochemisch charakterisiert wurden, waren in großen Mengen in pflanzlichem Gewebe exprimiert und konnten so direkt aus diesem aufgereinigt werden (u.a. UCHIKOBA ET AL. 1995, RUDENSKAYA ET AL. 1987, 1995, 1998; POPOVIČ ET AL. 2002, PANDE ET AL. 2006). Ein anschauliches Beispiel dafür ist die Subtilase Cucumisin, welche bis zu 10 % des löslichen Proteingehalts der Melonenfrucht ausmacht (KANEDA & TOMINGA 1975, YAMAGATA ET AL. 1994). In diesem Fall war folglich eine Isolation einer genügenden Menge Protein aus dem pflanzlichen Gewebe möglich.

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Subtilase *SSBT3* war eine direkte Isolation des Proteins aus dem pflanzlichen Gewebe aus folgenden Gründen jedoch nicht möglich. Zum einen wird diese Subtilase nur in geringen Mengen in Tomatenpflanzen gebildet, und zwar vorwiegend in der Wurzel. Wurzelgewebe in ausreichender Menge als Ausgangsmaterial für eine Proteinreinigung zu gewinnen ist problematisch.

Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass die SBT-Genfamilie in Tomate neben *SSBT3* wenigstens weitere 14 Mitglieder umfasst (MEICHTRY ET AL. 1999). Eine direkte Aufreinigung aus pflanzlichem Material würde daher die Auftrennung einer großen Zahl sehr ähnlicher Proteine erfordern. Ohne ein spezifisches Testsystem, mit dem sich *SSBT3* eindeutig von anderen Subtilasen unterscheiden und durch die verschiedenen chromatographischen Reinigungsschritte

verfolgen lässt, ist das nicht möglich. Ein solches Testsystem lag aber zu Beginn dieser Arbeit nicht vor, da die Substrate und die Substratspezifität von *SSBT3* unbekannt waren. Im Vergleich zur Reinigung aus pflanzlichem Gewebe stellt ein Überexpressionssystem eine effizientere Methode dar. Da es sich bei pflanzlichen Subtilasen und den verwandten PCs in Tieren um Präproproteine handelt, die co-translationell ins endoplasmatische Retikulum eingeschleust und dort prozessiert werden, kam nur ein eukaryotisches Expressionssystem in Frage. Auf die Fusion mit einem "Tag" zur Erleichterung der Reinigung des rekombinanten Proteins wurde verzichtet, da nicht abzusehen war, welchen Einfluss ein solcher "Tag" auf Expression, Prozessierung und Aktivität von *SSBT3* haben würde.

In der vorliegenden Studie wurde *SSBT3* aus einer transgenen Tomatenzellsuspensionskultur, in welcher die Subtilase in hohem Maße überexprimiert und ins Kulturmedium sezerniert wird, bis zur Homogenität aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurden eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung, eine Kationen-Austauschchromatographie im Batch-Verfahren und eine Anionen-Austauschchromatographie eingesetzt. Es wurde eine Ausbeute von ca. 200 µg homogenen Proteins pro Liter Zellkultur erzielt. Die aufgereinigte *SSBT3* war aktiv, wie Enzymaktivitätstests mit einem fluorogenen Systemin-Peptid bestätigten, und konnte daraufhin biochemisch charakterisiert werden.

Ein Beispiel für die erfolgreiche Expression einer Subtilase in einem heterologen System, deren anschließende Aufreinigung und biochemische Charakterisierung, ist die Tomaten-Subtilase *SSBT1*. JANZIK (2000) wählte für die heterologe Expression von *SSBT1* das Baculovirus/Insektenzell-System und konnte die Subtilase daraus bis zur Homogenität mit einer Ausbeute von 1,5 mg pro Liter Insektenzellsuspensionskultur reinigen und biochemisch charakterisieren.

Ein weiteres Beispiel für die gelungene Aufreinigung und biochemische Charakterisierung aus einer Zellsuspensionskultur ist die *Arabidopsis*-Subtilase Ara12. HAMILTON ET AL. (2003) verwendeten allerdings im Gegensatz zu der hier verwendeten Methode eine wildtypische *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskultur, welche die endogene Subtilase in das Kulturmedium sezernierte. Die Ausbeute lag bei diesem Verfahren mit 40 µg homogenem Protein pro Liter Zellsuspensionskultur deutlich unter der des Expressionssystems von *SSBT3*.

Die Resultate dieser Arbeit untermauern, dass sich sowohl das Expressionssystem als auch die Aufreinigungsmethode für *SSBT3* als hinreichend effizient erwiesen, um genügend Protein für die Kristallisierung und Röntgenstrukturanalyse zu gewinnen.

## Biochemische Charakterisierung

Die biochemische Charakterisierung der rekombinanten *S*SBT3 testierte, dass das Enzym bis 60 °C thermostabil ist. Dieses Resultat war zu erwarten, da auch die meisten anderen pflanzlichen Subtilasen in diesem Temperaturbereich stabil sind (HAMILTON ET AL. 2003, ROBERTS ET AL. 2003, PANDE ET AL. 2006). Darüber hinaus zeigte *S*SBT3 mit einem pH-Optimum von 7,5 die höchste proteolytische Aktivität im alkalischen Bereich. Dies ist zunächst hinsichtlich der Tatsache, dass *S*SBT3 in den Apoplasten sezerniert wird, der unter normalen Bedingungen einen pH-Wert von 5,5 aufweist, erstaunlich. Auf diese Diskrepanz wird an anderer Stelle noch genauer eingegangen werden.

Vergleicht man das pH-Optimum der untersuchten Subtilase mit dem anderer pflanzlicher Subtilasen, ergibt sich folgendes Bild. Fast alle früher untersuchten Subtilasen wiesen ebenso wie *S*SBT3 ein pH-Optimum im alkalischen Bereich auf (KANEDA & TOMINAGA 1975, CUROTTI ET AL. 1989, YADAV ET AL. 2006). Allerdings liegen auch einige wenige Beispiele für Subtilasen mit saurem pH-Optimum vor. So zeigte z.B. *S*SBT1 die höchste proteolytische Aktivität zwischen pH 4 und pH 6 (JANZIK 2000) und Ara12 wies ein Optimum um pH 5 auf (HAMILTON ET AL. 2003). Als drittes Beispiel kann hier die Gersten-Subtilase SEP1 genannt werden, für welche ein pH-Optimum zwischen 5,5 und 6,5 dokumentiert wurde (FONTANINI & JONES 2002).

Betrachtet man die Resultate zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der *S*SBT3-Subtilase, so fällt auf, dass eine Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen weder zu einer Stabilisierung noch zu einer Steigerung der *S*SBT3-Aktivität führte. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, da dies für die Klasse der Subtilasen eher untypisch ist. Frühere Studien hatten bereits die Calcium-Abhängigkeit für verschiedene Subtilasen belegt (FULLER ET AL. 1989, MOLLOY ET AL. 1992). Zudem konnten mit Hilfe von Kristallstrukturen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen bei verschiedenen Subtilasen nachgewiesen werden (SMITH ET AL. 1999, ROCKWELL & THORNER 2004).

Die nachgewiesene  $\text{Ca}^{2+}$ -Unabhängigkeit der Subtilase *S*SBT3 stellt allerdings keinen Einzelfall dar, da im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie die Unabhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  bereits für eine kleine Gruppe von Subtilasen gezeigt worden ist (NISHIKATA 1984, GUO ET AL. 1998, MESSDAGHI & DIETZ 2000, POPOVIČ ET AL. 2002).

Die Versuche mit verschiedenen Proteaseinhibitoren in dieser Arbeit dokumentierten, dass die proteolytische Aktivität von *S*SBT3 von klassischen Serinproteaseinhibitoren wie AEBSF und PMSF gehemmt wurde. Im Gegensatz dazu hatten andere Proteaseinhibitoren wie z.B. der Serin/Cystein-Proteaseinhibitor Leupeptin oder der Cysteinproteaseinhibitor E-64 keinen wesentlichen Einfluss auf die *S*SBT3-Aktivität. Diese Resultate stehen im Einklang mit der Tatsache, dass es sich bei

Subtilasen um Serinproteasen handelt und lassen vermuten, dass *SSBT3* über keine katalytisch wichtige Thiolgruppe verfügt.

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen wurde eine Diskrepanz zwischen dem anhand der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht der prozessierten *SSBT3* (69,5 kDa) und der apparenten Masse von *SSBT3* während der SDS-PAGE (83 kDa) festgestellt. Massenspektrometrisch konnte durch MALDI-TOF-MS für das gereinigte *SSBT3*-Protein eine Masse von 79,5 kDa bestimmt werden (PFANNSTIEL, mündliche Mitteilung), was ebenfalls deutlich über dem errechneten Molekulargewicht liegt.

Dieser Unterschied ist möglicherweise auf posttranslationelle Modifikationen des Proteins wie z.B. Glykosylierung oder Phosphorylierung zurückzuführen. Unterstützt wurde diese Annahme durch die anhand der Aminosäuresequenz von *SSBT3* postulierten Glykosylierungs- bzw. Phosphorylierungsstellen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

In der vorliegenden Studie wurde *SSBT3* enzymatisch auf Glykosylierung bzw. Phosphorylierung untersucht. Mit Hilfe von PNGaseF, welche unspezifisch die N-gebundenen Zuckerreste eines Glykoproteins entfernen kann (MALEY ET AL. 1989), konnte jedoch keine Glykosylierung von *SSBT3* nachgewiesen werden. Andererseits konnte aber KUHN (2007) unter Verwendung von Schiff's Reagenz die Glykosylierung von *SSBT3* nachweisen. Eine Erklärung für diese voneinander abweichenden Befunde liefert die Tatsache, dass fucosylierte Glykoproteine, wie sie in Pflanzen weit verbreitet sind (CHRISPEELS 1983, HORI ET AL. 1985), resistent gegen eine Deglykosylierung durch die PNGase F sind (FICHETTE-LAINE ET AL. 1994). Daher ist davon auszugehen, dass *SSBT3* im Falle der vorhergesagten N-Glykosylierung auch fucosyliert wurde. Welche der vorhergesagten acht N-Glykosylierungsstellen auch genutzt worden sind, ist weiterhin unklar. Andererseits ist auch eine O-Glykosylierung denkbar. Auch in diesem Falle wäre der enzymatische Nachweis mit PNGaseF ungeeignet eine Glykosylierung von *SSBT3* nachzuweisen.

Eine mögliche Phosphorylierung von *SSBT3* wurde in dieser Arbeit mittels Verdau durch alkalische Phosphatase untersucht. Mit diesem Test konnte keine Phosphorylierung von *SSBT3* nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit eine eventuelle Phosphorylierung von Proteinen zu untersuchen, bietet die "Pro-Q<sup>®</sup> Diamond Phosphoprotein Gel Stain" Technologie (Invitrogen, Karlsruhe). Mit dieser Methode lassen sich Phosphatgruppen, die an Tyrosin-, Serin- oder Threoninreste gebunden sind, direkt im SDS-PAGE Gelen mit einem fluoreszenten Farbstoff nachweisen. Auch dieser Test zeigte, dass *SSBT3* nicht phosphoryliert ist (CEDZICH, mündliche Mitteilung).

Der Unterschied zwischen experimentell ermitteltem und berechnetem Molekulargewicht von *SSBT3* kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Glykosylierung von *SSBT3* zurückgeführt

werden. Diese Annahme konnte anhand der vor kurzem fertiggestellten Kristallstruktur von *SSBT3*, die zwei Glykosylierungsstellen aufweist, bestätigt werden.

### Kinetik und Substratspezifität

Die kinetischen Parameter von *SSBT3* wurden anhand eines flurogenen Systemin-Peptids als Substrat untersucht. *SSBT3* wies eine Michaelis-Menten-Kinetik auf und zeigte bei pH 7,5 einen  $K_m$ -Wert von 32  $\mu\text{M}$ , eine Wechselzahl von 551  $\text{s}^{-1}$  und eine katalytische Effizienz von 17  $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ . PEARCE ET AL. (1991) konnten belegen, dass Systemin-Konzentrationen im femtomolaren Bereich in Tomatenpflanzen die Induktion von Proteaseinhibitoren auslösen können. VETSCH ET AL. (2000), die die Alkalinisierung von Zellkulturmedien nach Zugabe von Prosystemin bzw. Systemin untersuchten, erreichten bei Ihren Analysen eine Alkalinisierungsreaktion nach Zugabe von Systemin im nanomolaren Bereich. Das bedeutet, dass Systemin in der Pflanze in diesen Konzentrationsbereichen oder sogar darunter biologisch wirksam ist.

Im Vergleich zu diesen Konzentrationen ist der  $K_m$ -Wert von *SSBT3* sehr hoch, die Affinität des Enzyms also niedrig. Damit scheint es unwahrscheinlich, dass eine Spaltung von Systemin durch *SSBT3* physiologisch relevant ist. Andererseits ist es auch vorstellbar, dass *in vivo* eine höhere Affinität von *SSBT3* zu Systemin durch zusätzliche Faktoren bewirkt wird, die *in vitro* fehlen, und die Reaktionsbedingungen *in vitro* also nicht die Bedingungen in der Pflanze widerspiegeln.

Die Untersuchungen zur Substratspezifität von *SSBT3* wurden in dieser Studie mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie mit Hilfe von synthetischen Oligopeptidsubstraten durchgeführt. Durch einen Vergleich der Spaltstellen in den einzelnen Peptiden konnte eine Präferenz für Glutamin in der  $P_1$ -Position der untersuchten Oligopeptidsubstrate ermittelt werden. Als bestes Substrat für *SSBT3* stellte sich das aus 18 Aminosäuren bestehende Systemin-Peptid heraus. Es wurde nur an einer einzigen Stelle gespalten und zwar C-terminal von der Aminosäure Gln<sup>16</sup>. Eine Spaltung an dieser Stelle führt nachweislich zu einer Inaktivierung des Systemin-Peptids (PEARCE ET AL. 1993). *SSBT3* wäre damit potentiell in der Lage, Systemin nicht nur zu spalten, sondern auch zu inaktivieren.

Ein so genannter Alanin-Scan bestätigte Gln<sup>16</sup> als essentiell für die Substraterkennung durch *SSBT3*. Nur eines der Alanin-substituierten Systemin-Analoga, nämlich das Gln<sup>16</sup>Ala-Analogon wurde nicht von *SSBT3* hydrolysiert. Alle anderen Analoga wurden mit vergleichbarer Effizienz wie das nichtsubstituierte Systemin-Peptid gespalten.

Eine derartige Selektivität für spezifische Spaltstellen wurde den pflanzlichen Subtilasen noch vor einigen Jahren abgesprochen. Man ging vielmehr davon aus, dass sie ausschließlich an der unspezifischen Proteolyse von Proteinen beteiligt seien. Beispiele dafür sind die Subtilasen Cucumisin, Taraxalin und Macluralisin, welche eine breite Substratspezifität aufweisen (KANEDA ET AL. 1995, UCHIKOBA ET AL. 1995, RUDENSKAYA ET AL. 1998).

In der Zwischenzeit konnte diese Annahme jedoch durch mehrere Studien widerlegt werden. Die biochemischen Charakterisierungen der Subtilase C1 aus Sojabohne (BOYD ET AL. 2002), Ara12 (HAMILTON ET AL. 2003) und zweier Saspasen aus Hafer (COFFEEN & WOLPERT 2004) belegen eine hohe Selektivität der Subtilasen für jeweils spezifische Spaltstellen.

Für die C1 Subtilase, welche eine hohe Präferenz für Glu-Glu und Glu-Gln Bindungen aufweist, konnte gezeigt werden, dass sie den Abbau von Speicherproteinen in Sojabohnen durch eine determinierte Proteolyse am N-Terminus auslöst (BOYD ET AL. 2002). Ara12 hingegen spaltete bevorzugt synthetische Substrate mit Phe oder Ala in der P<sub>1</sub>-Position (HAMILTON ET AL. 2003), *in vivo*-Substrate konnten jedoch für dieses Enzym noch nicht identifiziert werden.

Essentiell für die Saspasen ist Asp in der P<sub>1</sub>-Position ihrer Substrate. Ihre Rolle bei einer proteolytischen Signalkaskade während der Apoptose wird diskutiert. Auch ein weiterer Vertreter der Tomaten-Subtilasen, die von JANZIK ET AL. (2000) biochemisch charakterisierte *SSBT1*, zeigte eine enge Substratspezifität und spaltete Polypeptid-Substrate bevorzugt C-terminal von Gln oder Leu. Zudem benötigte *SSBT1* zur Substraterkennung N-terminal von der Spaltstelle mindestens vier weitere Aminosäuren.

*SSBT3* ordnet sich somit in eine Reihe von Subtilasen ein, für die spezifische Aufgaben in physiologischen Prozessen *in planta*, aufgrund ihrer Substratspezifität, postuliert werden können.

Einen detaillierteren Einblick in die Substratspezifität von *SSBT3* gewährte in der vorliegenden Studie der Protease Spot-Test, bei welchem 60 fluorogene Peptide, welche auf der Aminosäuresequenz des Systemin-Peptids basierten, als Substrate für *SSBT3* getestet wurden. Systematische Substitutionen in den Positionen P<sub>5</sub> bis P<sub>2</sub>' der Peptide mit Ala, Phe, Pro, Ser, Asn, Asp, Lys, Val, Leu, Ile, Trp, Tyr, Gly bzw. His ergaben, dass *SSBT3* von allen getesteten Alternativen zu Gln in der P<sub>1</sub>-Position nur die Aminosäure His akzeptiert. Die Umsatzrate der Substrate wurde durch eine Substitution von Lys in Position P<sub>2</sub> und P<sub>1</sub>' verbessert. Die Präferenz von *SSBT3* für ihre Substrate konnte somit dahingehend spezifiziert werden, dass Gln in Position P<sub>1</sub> benachbart von basischen Aminosäuren wie z.B. Lys bevorzugt wurde.

Die aus dem Protease Spot-Test für *SSBT3* abgeleitete Substratspezifität konnte durch kinetische Analysen unter "steady state"-Bedingungen bestätigt werden. Für ein fluorogenes Peptidsubstrat mit Lys in Position P<sub>2</sub> und Gln in Position P<sub>1</sub> ergab sich eine sechsfach höhere katalytische Effizienz als für das Systemin-Peptid, in welchem Gln in Position P<sub>1</sub> N-terminal von einem Met flankiert wird. Auch wenn die *in vivo*-Substrate von *SSBT3* noch nicht identifiziert werden konnten, so scheint es im Hinblick auf seine Substratspezifität unwahrscheinlich, dass das Enzym eine unspezifische proteolytische Funktion im Proteinabbau *in planta* erfüllt, sondern vielmehr an selektiver Proteinprozessierung bzw. limitierter Proteolyse beteiligt ist. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass *SSBT3 in vitro* das Systemin-Peptid inaktiviert, welches ein wichtiges Signalmolekül

in der Wundantwort von Tomatenpflanzen in Folge von Insektenfraß ist, von besonderem Interesse. Auf eine mögliche Rolle von *S*SBT3 bei der Systemin-Inaktivierung *in planta* wird an anderer Stelle noch genauer eingegangen werden.

Bei der zukünftigen Suche nach den physiologischen Substraten von *S*SBT3 sollte auf die vielversprechende DIGE-Technik kombiniert mit einer Massenspektrometrie zurückgegriffen werden. Diese Technik konnte bereits erfolgreich zur Identifikation der Substrate verschiedener Proteasen, darunter die Subtilase Cytotoxin AB<sub>5</sub> (PATON ET AL. 2006) und die Serinprotease Granzyme B (BREDEMEYER ET AL. 2004) eingesetzt werden.

### **Reportergen- und RT-PCR-Analyse der gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression von *S*SBT3**

Neben der biochemischen Charakterisierung wurde eine detaillierte histochemische Lokalisierung der entwicklungsabhängigen und gewebespezifischen Expression von *S*SBT3 mit Hilfe von transgenen Pflanzen, die das *S*SBT3-Promotor::*GUS*-Reporter gen tragen und durch halbquantitative RT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Die stärkste *GUS*-Aktivität konnte im vaskulären Gewebe von Blättern, Blattstielen, Stängeln und Wurzeln beobachtet werden. In den Wurzeln zeigten besonders die Wurzelspitzen und Stellen lateralen Wurzelwachstums eine intensive Blaufärbung.

NEUTEBOOM ET AL. (1999) wiesen für die *Arabidopsis*-Subtilase AIR3 ebenfalls eine Expression an Stellen lateralen Wurzelwachstums nach. Allerdings war im Gegensatz zu *S*SBT3 die Expression der AIR3-Subtilase ausschließlich auf diesen Bereich beschränkt. Bei der Entstehung lateraler Seitenwurzeln, die sich aus den Perizykelzellen der Hauptwurzel entwickeln, müssen die Seitenwurzeln während des Wachstums die Endodermis, die Wurzelrinde und die Rhizodermis durchbrechen. Die Autoren diskutieren in diesem Zusammenhang, dass AIR3 möglicherweise Strukturproteine in den äußeren Zellschichten der Hauptwurzel proteolytisch, auf diese Weise die Gewebestruktur schwächt und so der Seitenwurzel das Durchbrechen dieser Zellschichten erleichtert.

Ob *S*SBT3 Zellwandstrukturen in der Wurzel verändert, indem es mit Strukturproteinen des Cortex bzw. der Epidermis interagiert, und so bei der Entstehung lateraler Seitenwurzeln eine Rolle spielt, ist momentan noch ungeklärt. Dieser Aspekt sollte in zukünftigen Funktionsstudien über die *S*SBT3-Subtilase berücksichtigt werden.

Ein Vergleich der Expression von *S*SBT3 mit *S*SBT1 und *S*SBT2 testierte ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster der drei Subtilasen aus der *S*SBT-Familie. Während *S*SBT3 in allen Tomatenorganen exprimiert wird, weisen *S*SBT1 und *S*SBT2 ein eingeschränktes Expressionsmuster auf. *S*SBT1-Promotor::*GUS*-Pflanzen zeigten lediglich eine *GUS*-Aktivität in Blüten und Wurzeln sowie in den Blüten- und Blattabscissionszonen (CEDZICH, mündliche

Mitteilung). Die Expression in Blüten konnte JANZIK (2000) schon in früheren Studien für *S/SBT1* in Blütenquerschnitten durch Immunodekorierung mit Hilfe eines *S/SBT1*-Antiserums nachweisen.

*S/SBT2*-Promotor::*GUS*-Pflanzen wiesen eine auffällige *GUS*-Aktivität in den Schließzellen der Stomata auf (ULLRICH 2006). Das spezifische Expressionsmuster der drei Tomaten-Subtilasen deutet darauf hin, dass diese unterschiedliche Funktionen in der Pflanze erfüllen. Eine funktionelle Redundanz ist hingegen unwahrscheinlich.

Eine Lokalisation der *S/SBT3*-Expression auf Zellebene war in Querschnitten von Hypokotylen von *S/SBT3*-Promotor::*GUS*-Pflanzen möglich. Sie zeigten eine Blaufärbung im Phloem und im Xylemparenchym, d.h. eine Expression von *S/SBT3* in diesem Bereich.

Die Ergebnisse der histochemischen Lokalisierung werden von den halb-quantitativen RT-PCR-Analysen gestützt, die ebenfalls eine *S/SBT3*-Expression in allen untersuchten Tomatenorganen nachwiesen. Dabei war *S/SBT3* in Wurzeln, Stängeln und Blattstielen stärker exprimiert als in Blättern und Blüten. Im Einklang damit stehen Expressionsanalysen der Tomaten-Subtilasen mittels Northern Blot-Analyse von MEICHTRY ET AL. (1999), die *S/SBT3*-Transkripte in allen Tomatenorganen mit stärkster Expression in Wurzeln nachwiesen.

Von besonderem Interesse ist die *S/SBT3*-Expression im vaskulären Gewebe, da in der vorliegenden Studie die Spaltung und Inaktivierung von Systemin durch *S/SBT3* *in vitro* demonstriert werden konnte. Es ist bekannt, dass das Systemin-Vorläufer-Protein Prosystemin in parenchymatischen Zellen des vaskulären Blattgewebes exprimiert und von dort das gereifte Systemin in den Apoplasten freigesetzt wird (JACINTO ET AL. 1997, NARVÁEZ-VÁSQUEZ & RYAN 2004). Auch *S/SBT3* ist ein sekretiertes Protein und konnte bereits im Apoplasten nachgewiesen werden (CEDZICH, mündliche Mitteilung). Die Tatsache, dass *S/SBT3* und Prosystemin *in planta* zum einen co-lokalisiert sind und zum anderen beide in den Apoplasten sekretiert werden, eröffnet die Möglichkeit, dass *S/SBT3* auch *in vivo* an der Spaltung und Inaktivierung von Systemin und somit an einer Regulation der Wundantwort beteiligt sein könnte.

Zusätzlich zur organspezifischen Expression von *S/SBT3* konnte dargelegt werden, dass die Expression von *S/SBT3* entwicklungsabhängig reguliert ist. In dieser Arbeit wurde die Expression von *S/SBT3* in verschiedenen Entwicklungsstadien des keimenden Samens untersucht. Hierbei konnte im keimenden Samen von *S/SBT3*-Promotor::*GUS*-Pflanzen eine starke *GUS*-Aktivität im Bereich des micropylaren Endosperms lokalisiert werden.

Dasselbe Expressionmuster konnte ULLRICH (2006) im keimenden Samen von *S/SBT2*-Promotor::*GUS*-Pflanzen nachweisen. Unterschiedlich war lediglich der Zeitpunkt der Expression. Während sich die Blaufärbung bei *S/SBT3* nach 48 h zeigte, trat sie bei *S/SBT2* bereits nach 24 h auf. Tendenziell wiesen die beiden Subtilasen jedoch das gleiche Expressionsmuster in diesem Entwicklungsstadium auf, was auf eine funktionelle Redundanz zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung hinweisen könnte.

GROOT ET AL. (1988), welche die Vorgänge bei der Keimung von Tomate untersuchten, demonstrierten, dass beim Aufbrechen der Samenschale zunächst eine Degradation des micropylaren Endosperms stattfinden muss, bevor die Wurzelspitze die Samenschale durchbrechen kann. Inwieweit eine mögliche Beteiligung von *S*SBT3 beim Aufbrechen der Samenschale diskutiert werden kann, bleibt momentan noch offen.

Denkbar wäre hier auch eine mögliche Funktion von *S*SBT3 bei der Pathogenabwehr, da beim Aufbrechen der Samenschale ein potentieller Angriffspunkt für Pathogene geschaffen wird und daher ein effektiver Schutz gegen Pathogene an dieser Stelle besonders wichtig ist. Es ist bekannt, dass während der Keimung hauptsächlich im Bereich des micropylaren Endosperms  $\beta$ -1,3-Glucanasen und Chitinasen (MOROHASHI & MATSUSHIMA 2000, WU ET AL. 2000) sowie Polyphenoloxidasen (MOROHASHI 2002) exprimiert werden. Vielfach belegt ist, dass diese Enzyme, entweder allein oder in Kombination mit anderen, in die Pathogenabwehr involviert sind (SIMMONS 1994, Jach et al. 1995, JONGEDIJK ET AL. 1995, LOZOVAYA ET AL. 1998, GOMEZ ET AL. 2002). Somit wäre auch eine Beteiligung von *S*SBT3 bei der Abwehr von Pathogenen in keimenden Samen nicht völlig ausgeschlossen, vor allem, da auch Mikroarraydaten über die Pathogeninduzierbarkeit von *S*SBT3 vorliegen (ZHAO ET AL. 2003). Inwiefern diese Hypothese haltbar ist, kann erst in weiterführenden Studien überprüft werden.

Bis jetzt konnte nur für zwei der 15 Tomaten-Subtilasen eine Funktion bei der Pathogenabwehr nachgewiesen werden. P69B und P69C, zwei von mindestens sechs eng verwandten Mitgliedern einer Subfamilie der Tomaten-Subtilasen wurden erwiesenermaßen infolge von Pathogenbefall sowie nach Salicylsäure- und Fusicoccin-Behandlung induziert (VERA & CONEJERO 1988, TORNERO ET AL. 1996, JORDÁ ET AL. 1999). In Shotgunproteomics-Experimenten konnten CHEN ET AL. (2007) inzwischen aufzeigen, dass unter anderem Peptide von P69B und P69C häufig im Darm von *M. sexta*-Larven, welche auf Tomatenpflanzen gefressen hatten, vorkommen. Dies deutet darauf hin, dass die Proteine im Verdauungstrakt sowohl stabil als auch abundant sind und bei der Abwehr von Fraßfeinden eine Rolle spielen.

### **Expression von *S*SBT3 in Reaktion auf verschiedene Stimuli**

In der vorliegenden Arbeit konnte dokumentiert werden, dass *S*SBT3 nicht nur entwicklungsabhängig exprimiert wird, sondern die Expression auch abhängig von bestimmten Stimuli ist. Northern Blot-Analysen zeigten eine schwach induzierte *S*SBT3-Expression in Tomatenpflanzen nach Fusicoccin-Behandlung und nach Infektion mit *Xanthomonas campestris* sowie eine deutlich induzierte *S*SBT3-Expression nach mechanischer Verwundung sowie nach Fraß von *Manduca sexta*-Larven.

Die Induktion der *S*SBT3-Expression nach Fusicoccin-Behandlung war im Vergleich zu den Kontrollpflanzen gering und konnte in wiederholten Versuchen nicht eindeutig reproduziert

werden. Auch nach Infektion mit *Xanthomonas campestris* konnte nur eine schwache Induktion der *S**S**B**T**3*-Expression beobachtet werden. Bei beiden Versuchen steht in Frage, ob die beobachtete *S**S**B**T**3*-Expression tatsächlich eine Folge der Fusicoccin-Behandlung bzw. der Bakterieninfektion war oder aber durch eine Verwundung der Pflanzen induziert worden ist.

Bei der verwendeten Methode für die Fusicoccin- bzw. Puffer-Applikation wurden die Pflanzen an den Stängeln abgeschnitten. Bei der Infiltration der Bakterien- und der Pufferlösung kann es zu einer unbeabsichtigten Verletzung der Blätter kommen.

Zur genaueren Überprüfung der Hypothese wäre eine Wiederholung der Northern Blot-Analysen mit Fusicoccin-behandelten Pflanzen notwendig. Sinnvoll wäre, dabei zusätzlich zu der Puffer-behandelten eine weitere Kontrollgruppe von gänzlich unbehandelten, also nicht abgeschnittenen Pflanzen, zu untersuchen. Ein Vergleich zwischen den beiden Kontrollgruppen könnte dann die Frage beantworten, ob die *S**S**B**T**3*-Expression eventuell als Folge der Verwundung bei Fusicoccin- bzw. Puffer-Applikation induziert worden ist.

Ob und in wie weit *S**S**B**T**3* zu einer Resistenz gegenüber Phytopathogenen beiträgt, sollte in weiterführenden Studien mit Hilfe von transgenen Pflanzen, die entweder *S**S**B**T**3* überexprimieren oder aber in der *S**S**B**T**3* Expression beeinträchtigt sind, getestet werden. Im Laufe der vorliegenden Studie wurde der Schwerpunkt nicht auf eine mögliche Rolle in der Pathogenresistenz, sondern auf die Interaktion von Tomatenpflanzen mit herbivoren Insekten gelegt.

Die Induktion der *S**S**B**T**3*-Transkripte nach mechanischer Verwundung konnte im *Manduca sexta*-Fraß-Experiment reproduziert werden. Die Induktion der *S**S**B**T**3*-Transkripte war in den beiden unabhängigen Versuchen vergleichbar und erreichte nach 8 - 12 h ihr Maximum. Das Maximum der *S**S**B**T**3*-Induktion nach Verwundung ist vergleichbar mit dem bekannter Proteine der Wundantwort, wie verschiedener Gruppen von Proteinaseinhibitoren, Polyphenoloxidase, Threonin Deaminase, Arginase und Leucinaminopeptidase. Allerdings ist für die Transkripte dieser bekannten Wundantwortproteine eine wesentlich stärkere Akkumulation zu beobachten und ein Anstieg des Transkriptspiegels schon nach drei Stunden deutlich nachweisbar (RYAN 2000, OROZCO-CARDENAS ET AL. 2001, STRASSNER ET AL. 2002, LEE & HOWE 2003, LI ET AL. 2004).

Die Vermutung, dass *S**S**B**T**3* eine Rolle bei der Wundantwort sowie der Abwehr von Fraßfeinden spielt, liegt daher nahe.

Die bisher vorgestellten Ergebnisse ließen aus dreierlei Gründen vermuten, dass *S**S**B**T**3* an der Regulation der Wundantwort in Tomatenpflanzen beteiligt sind. Erstens spaltet rekombinante *S**S**B**T**3* *in vitro* das Peptid Systemin C-terminal von Gln<sup>16</sup>. Bei Systemin handelt es sich um ein wichtiges Signalmolekül der Wundantwort von Tomatenpflanzen. Dieses 18-Aminosäure-Peptid löst die Induktion von Abwehrgenen nach Insektenfraß im verwundeten Blatt sowie in unverwundeten Geweben aus (PEARCE 1991, RYAN 2000). Eine Spaltung von Systemin C-terminal von Gln<sup>16</sup> führt

nachweislich zu seiner Inaktivierung (PEARCE ET AL. 1993). Zweitens werden sowohl das Systemin-Vorläuferprotein Prosystemin (JACINTO ET AL. 1997) als auch *SSBT3* im vaskulären Gewebe von Tomatenpflanzen exprimiert. Systemin wird von dort aus in den Apoplasten freigesetzt (NARVÁEZ-VÁSQUEZ & RYAN 2004), wo auch *SSBT3* nachgewiesen werden konnte. Drittens akkumulieren *SSBT3*-Transkripte 8 bis 12 h nach mechanischer Verwundung bzw. Insektenfraß.

Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen ergaben sich zwei Hypothesen zu möglichen Funktionen von *SSBT3* in der Pflanze/Insekten-Interaktion, die nachstehend diskutiert werden sollen.

**Hypothese 1: *SSBT3* ist durch die Inaktivierung von Systemin *in planta* an der Regulation der Wundantwort von Tomatenpflanzen beteiligt.**

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die wundinduzierte Proteinaseinhibitor-Aktivität in *SSBT3*-defizienten (RNAi), *SSBT3*-Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen verglichen. Die Proteinaseinhibitor-Aktivität im Zeitverlauf nach mechanischer Verwundung unterschied sich nicht in Wildtyp- und transgenen Pflanzen. Nach der Ausgangshypothese wäre aber in den Überexpressionspflanzen in Folge einer verstärkten Inaktivierung von Systemin durch *SSBT3* im Vergleich zum Wildtyp eine abgeschwächte Wundantwort und somit Proteinaseinhibitor-Aktivität zu erwarten gewesen. Andererseits sollte die Wundantwort in den RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp über längere Zeit aufrecht erhalten bleiben, da hier die Systemin-inaktivierende *SSBT3* fehlte.

Auch die zur Überprüfung der Hypothese durchgeführten Verwundungs-Experimente mit *Manduca sexta*-Larven zeigten in Northern Blot-Analysen keine Unterschiede in der Proteinase-Inhibitor-II-Expression in den transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.

Folglich konnte die oben aufgestellte Hypothese 1 nicht bestätigt werden. Auch wenn nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass *SSBT3* Systemin *in vivo* spaltet, so scheint diese Degradation keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Abwehrgenen zu nehmen.

In diesem Zusammenhang soll auf Untersuchungen von SCHALLER & RYAN (1994) und SCHALLER (1998) hingewiesen werden. Die Autoren analysierten die proteolytische Aktivität von membrangebundenen Proteasen im Hinblick auf die Spaltung von Systemin. Dabei konnten mehrere Spaltungsstellen in der Systemin-Sequenz identifiziert werden, die jedoch nicht alle zu einer Inaktivierung der biologischen Aktivität von Systemin führten. Weiterhin konnte HUET (2004), der die Systeminspaltung durch lösliche Proteasen untersuchte, demonstrieren, dass Systemin in Abhängigkeit des vorherrschenden pH-Wertes im Apoplasten unterschiedlich gespalten wird. Man geht davon aus, dass der pH-Wert im Apoplasten an Verwundungsstellen als Folge des von FELIX & BOLLER (1995) und SCHALLER & OECKING (1999) beschriebenen Systemin-induzierten Protonen-Influges in den neutralen bis alkalischen Bereich ansteigt. Dies würde bedeuten, dass

eine Verwundung zu einer Alkalinisierung des Apoplasten führt. So konnte gezeigt werden, dass Systemin als Wundsignalmolekül eine Alkalinisierung des Kulturmediums pflanzlicher Zellsuspensionen hervorruft (FELIX & BOLLER 1995, VETSCH ET AL. 2000). Diese Resultate demonstrieren, dass das alkalische pH-Optimum von *SSBT3* nicht im Widerspruch mit einer proteolytischen Aktivität im Apoplasten stehen muss. Allerdings läßt die Vielfältigkeit der beschriebenen Spaltereignisse von Systemin sowie der Einfluss des pH-Wertes auf die Spaltstellen darauf schließen, dass mehrere Proteasen an diesem System beteiligt sind. Zudem konnte HUET (2004) belegen, dass ein Systemin-degradierendes System konstitutiv sowohl im Apoplasten als auch im Zellkulturüberstand vorhanden ist.

Folglich reflektiert die Modellvorstellung von einem einzigen Systemin-abbauenden Enzym, das alleine für die Inaktivierung des Hormonsignals verantwortlich ist, mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht die Situation *in planta* (HUET 2004). Es ist daher wahrscheinlich, dass *SSBT3* als eine von mehreren Systemin-spaltenden Proteasen nicht maßgeblich an der Systemin-Degradation und damit Regulierung der Wundantwort beteiligt ist.

Vor dem Hintergrund, dass Hypothese 1 nicht bestätigt werden konnte, war nicht zu erwarten, dass *SSBT3*-Überexpressions-, *SSBT3*-RNAi- und Wildtyp-Pflanzen eine unterschiedliche Widerstandsfähigkeit gegen Fraß von *Manduca sexta*-Larven aufweisen würden. Überraschenderweise wurden dennoch in zwei unabhängigen Experimenten Unterschiede in der Larvenentwicklung auf den drei Genotypen beobachtet. Die Zahl der Raupen, die die Überexpressionspflanzen verließen, bzw. von diesen Pflanzen fielen war wesentlich höher als für Wildtyp- bzw. RNAi-Pflanzen. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine erhöhte Expression von *SSBT3* zu einer gesteigerten Resistenz gegen Insektenfraß beiträgt, welche jedoch über einen anderen Mechanismus als über die wundinduzierte Expression von Abwehrgenen vermittelt wird.

Zu diskutieren ist nun, wie eine solche Wirkweise von *SSBT3* aussehen könnte. Die außergewöhnliche Stabilität von *SSBT3* und das alkalische pH-Optimum der Protease sind beides Voraussetzung für eine proteolytische Aktivität im stark alkalischen sowie proteinasereichen Milieu eines Insektendarms (CHEN ET AL. 2007). Der pH-Wert im Darm von herbivoren Spezialisten wie *Manduca sexta*-Larven liegt zwischen 8 und 11 (FELTON 2005). In diesem Bereich weist *SSBT3* eine hohe Aktivität auf. Diese Eigenschaften von *SSBT3*, die durch Fraß von *Manduca sexta*-Larven induzierte Expression von *SSBT3*, wie auch die in den Experimenten zur Larvenentwicklung beobachtete erhöhte Resistenz der Überexpressionspflanzen, deuten auf eine Rolle von *SBST3* bei der Insektenabwehr hin und führten zur zweiten Hypothese.

**Hypothese 2: *SSBT3* wirkt sich über ihre proteolytische Aktivität im Insektendarm negativ auf die Entwicklung des Schadinsektes aus.**

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zunächst Western Blot-Analysen von Proteinextrakten aus Kot von *Manduca sexta*-Larven, welche auf Wildtyp-, RNAi- bzw. Überexpressionspflanzen gefressen hatten, durchgeführt. Es konnte verifiziert werden, dass *SSBT3* im Darm von *Manduca sexta*-Larven, welche auf Überexpressionspflanzen gefressen hatten, stabil war. Dies ist Voraussetzung dafür, dass die Protease ihre Wirkung im Insektendarm ausüben kann. Die Frage, ob die proteolytische Aktivität von *SSBT3* im Insektendarm aufrechterhalten bleibt, wurde nicht überprüft und muss zu diesem Zeitpunkt noch offen bleiben.

Das Wechselspiel der Pflanzen und ihrer Fraßfeinde im Kampf ums Überleben ist seit vielen Jahren Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe galten traditionell als hauptsächlicher Bestandteil pflanzlicher Abwehrstrategie gegenüber Herbivoren (BERENBAUM & ZANGERL 2008). Seit langem ist jedoch bekannt, dass auch Proteine maßgeblich an der pflanzlichen Verteidigung gegen phytopathogene Insekten beteiligt sind. Wegweisende Arbeiten wurden dazu schon vor über 35 Jahren von GREEN & RYAN (1972) an Tomatenpflanzen durchgeführt. Sie zeigten als Erste, dass Proteinaseinhibitoren (PI), welche nach Insektenfraß in Tomatenblättern akkumulieren, nachteilig auf die Entwicklung der Insekten einwirken. Durch Nahrungsaufnahme der Tiere gelangen sie in den Verdauungstrakt, wo sie die Umsetzung der in der Nahrung enthaltenen Proteine behindern und dadurch die Bioverfügbarkeit essentieller Aminosäuren herabsetzen.

Neben den sehr intensiv untersuchten Proteinaseinhibitoren wurde in den letzten Jahren ein immer größer werdendes Spektrum an Proteinen beschrieben, welche ebenfalls im Körper des Schadinsektes – meist im Darm – die Entwicklung des Tieres negativ beeinflussen (FELTON 2005). Dabei können Proteine direkt toxisch wirken oder aber indem sie – vergleichbar mit den PI – die Nahrungsverwertung beeinträchtigen und damit zu einer Mangelernährung des Insektes führen (CARLINI & GROSSI-DE-SA 2002).

ZHU-SALZMAN ET AL. (2008) geben eine Übersicht über potentiell toxische Abwehrproteine. Unter ihnen finden sich unter anderem Chitinasen und Lectine, welche vermutlich die peritrophische Matrix (PM), eine Art Schutzschicht der Insektendarmwand, beschädigen können. Ein Defekt in der PM könnte die Nahrungsverdauung und -aufnahme stören, sowie den Verdauungstrakt toxischen Substanzen und Pathogenen aussetzen (ZHU-SALZMAN ET AL. 1998).

Ein Beispiel für Proteine, welche über die Einschränkung der Nahrungsverwertung bzw. -verfügbarkeit in der pflanzlichen Abwehr wirken, sind Polyphenoloxidasen (PPOs), welche im Pflanzenreich weit verbreitet sind. In Tomaten- und Tabakpflanzen, aber auch in Pappeln konnte demonstriert werden, dass diese Enzyme nach Verwundung induziert werden und

PPO-Überexpressionspflanzen eine höhere Resistenz gegen Insektenfraß aufweisen (FELTON ET AL. 1989, WANG & CONSTABEL 2004). Die Wirkung der PPOs gegen Herbivoren wird ihrer Fähigkeit zugeschrieben, Phenole in ihre entsprechende Chinonform zu überführen (FELTON ET AL. 1989). Diese stark elektrophilen Chinone können kovalent an Proteine binden, wodurch schwer verdauliche komplexe Proteinenaggregate entstehen. Dies kann somit zu einer Verringerung der Nährstoffaufnahme und zu einem verzögerten Wachstum der Insekten führen (DUFFEY & STOUT 1996, KARBAN & BALDWIN 1997).

Auch den Leucinaminopeptidasen (LAPs) wird eine Rolle bei der Insektenabwehr zugesprochen. LAPs gehören zu den löslichen Aminopeptidasen, die die N-terminale Aminosäure Arginin von Proteinen und Peptiden freisetzen. Das Tomatenprotein LAP-A wird durch Insektenfraß induziert und ist nachweislich im Insektendarm stabil. Eine unabhängige Wirkweise von LAP-A eventuell aber auch in Ergänzung zu den Proteaseinhibitoren bei der Inaktivierung von Verdauungsenzymen im Insektendarm wird diskutiert (PAUTOT ET AL. 1993, GU ET AL. 1999).

In diesem Zusammenhang sind auch jüngste Ergebnisse von CHEN ET AL. (2005, 2007) von Interesse. Mit Hilfe eines neuen Ansatzes unter Verwendung von proteomischen Untersuchungen gekoppelt mit einer Massenspektrometrie analysierten die Autoren Darminhalte bzw. Kot von *Manduca sexta*-Larven, welche auf Tomatenpflanzen aufgezogen worden waren. Peptide von LAP-A sowie der Tomaten-Subtilasen P69B und P69C waren häufig in diesen Shotgunproteomics-Experimenten nachweisbar, was darauf hindeutet, dass diese Proteine im Verdauungstrakt stabil und abundant sind.

Dieselben Autoren konnten erst vor kurzem zeigen, dass die Enzyme Arginase und Threonin Deaminase (TD), welche nach Verwundung induziert werden, im Insektendarm sowohl stabil als auch aktiv waren. Die Untersuchungen legen eindrücklich dar, dass diese beiden Enzyme als pflanzliche Abwehrproteine wirken, indem sie im Insektendarm essentielle Aminosäuren wie Threonin und Arginin metabolisieren und dadurch für die Insekten wertlos machen. Auch Peptide der TD waren häufig in den bereits erwähnten Shotgunproteomics-Experimenten nachweisbar (CHEN ET AL. 2005, 2007).

Die Rolle der wundinduzierbaren *SSBT3* bei der pflanzlichen Abwehr im Verdauungstrakt von Insekten ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar und muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Hilfreich wäre dabei die Aufklärung der Substrate von *SSBT3* im Insektendarm. Einen interessanten Aspekt liefern hier erneut die Studien über TD von CHEN ET AL. (2007). TD ist das erste Enzym in der Isoleucin-Biosynthese von Pflanzen. Normalerweise wird TD durch negatives Feedback durch Isoleucin gehemmt, welches auf die C-terminale Regulierungsdomäne des Enzyms einwirkt. Es konnte jedoch aufgezeigt werden, dass die TD-Aktivität im Insektendarm auch in Anwesenheit hoher Isoleucin-Konzentrationen, aufgrund proteolytischer Prozessierung der

Regulierungsdomäne, verstärkt war (CHEN ET AL. 2005, 2007). Interessanterweise enthält die Domäne, welche die N-terminale katalytische Domäne mit der C-terminalen regulativen Domäne verbindet, das Aminosäuren-Motiv – KHK. Dieses Motiv, ein Histidin benachbart von basischen Aminosäuren, wie hier Lysin, stellt ein mögliches Substrat von *SSBT3* dar. Daher wurde postuliert, dass *SSBT3* für die Prozessierung und Aktivierung von TD im Insektendarm verantwortlich sein könnte. Diese Hypothese konnte bisher in *in vitro* Studien nicht bestätigt werden (HOWE, mündliche Mitteilung) und sollte daher in weiterführenden Studien genauer untersucht werden.

Dabei stellt die Tatsache, dass in den von CHEN ET AL. (2007) durchgeführten Shotgunproteomics-Experimenten keine Peptide von *SSBT3* detektiert wurden, keinen Widerspruch für diese Hypothese dar. Die Autoren weisen darauf hin, dass ihnen nur ein limitierter Datensatz von ca. 2600 Proteinsequenzen zum Abgleich der MS-Daten zur Verfügung stand und es daher wahrscheinlich ist, dass weitere wundinduzierbare Tomatenproteine im Darm von *Manduca sexta*-Larven akkumulieren, die bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden konnten.

Über die Ursache, welche die *Manduca sexta*-Raupen dazu veranlassten, die *SSBT3*-Überexpressionspflanzen zu verlassen bzw. die dazu führte, dass sie von den Pflanzen herunterfielen, kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass herbivore Raupen versuchen, einen unausgewogenen Nährstoffgehalt bedingt durch die Heterogenität innerhalb einer Futterpflanze durch aktives Aufsuchen von Pflanzengewebe mit besserem Nährwert auszugleichen. Eine solche Larvenbewegung hin zu "besserem Futter" konnten ZAVALA & BALDWIN (2004) bei Trypsinproteinaseinhibitor (TPI)-Überexpressionspflanzen feststellen. Sie beobachteten, dass ab einem bestimmten Larvenstadium die Tiere Blätter mit hohem TPI-Gehalt verließen und bevorzugt an jungen Blättern, welche einen hohen Proteingehalt aufwiesen, fraßen. Damit kompensierten sie eine durch die verstärkte TPI-Konzentration bedingte verringerte Proteinaufnahme. Eine solche Veränderung der "Fraß-Position" mit dem Ziel eine bessere Futterquelle als die *SSBT3*-überexprimierenden Blätter zu finden, könnte die Ursache dafür sein, dass die Raupen diese Pflanzen verließen. Dies würde die Hypothese unterstützen, dass *SSBT3* über seine proteolytische Aktivität im Insektendarm, möglicherweise über die Aktivierung von TD negativ auf die Entwicklung des Schadinsektes einwirkt.

### **Fazit und Ausblick**

Die Resultate dieser Arbeit liefern wichtige Grundlagen und Meilensteine für eine weitere zielgerichtete Suche nach den Aufgaben von *SSBT3* in Tomatenpflanzen.

Ein Fokus der vorliegenden Studie lag in der Aufreinigung und detaillierten biochemischen Charakterisierung der rekombinanten *SSBT3*, welche auch Voraussetzung für die Aufklärung der Kristallstruktur des Proteins waren. Die Kristallstruktur von *SSBT3* wurde vor kurzem fertiggestellt. Die noch nicht abgeschlossene Interpretation der Röntgenbeugungsdaten wird wichtige Informationen zur Struktur der aktiven Domäne und der Protease-assoziierten Domäne (PA-Domäne) liefern. Besonders die PA-Domäne, welche bisher nur bei den Mitgliedern der pflanzlichen und prokaryotischen, nicht jedoch bei tierischen Subtilasen, nachgewiesen werden konnte, ist von großem wissenschaftlichem Interesse. Ihre Funktion ist bisher noch gänzlich ungeklärt, jedoch wurde ihr bisher eine Rolle bei der Substratspezifität oder bei Protein-Protein-Interaktionen zugesprochen (LAWRENCE ET AL. 1999, MAHON & BATEMAN 2000). Die Ergebnisse der Strukturanalyse von *SSBT3* deuten nun darauf hin, dass entgegen bisheriger Annahmen die PA-Domäne eine Dimerisierung der Protease vermittelt und dadurch an der Regulation der proteolytischen Aktivität beteiligt sein könnte. Diese Erkenntnisse werden bei der Suche nach der physiologischen Rolle von *SSBT3* und ihrer Substrate *in vivo* von entscheidender Bedeutung sein.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- BARR, P.J. (1991). Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell*, 66: 1 - 3.
- BATCHELOR, A.K., BOUTILIER, K., MILLER, S.S., LABBÉ, H., BOWMAN, L.A., HU, M., JOHNSON, D.A., GIJZEN, M. & B.L.A. MIKI (2000). The seed coat-specific expression of a subtilisin-like gene, *SCS1*, from soybean. *Planta*, 211: 484 – 492.
- BEAVIS, R.C., CHAUDHARY, T. & B.T. CHAIT (1992).  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 27: 156 - 158.
- BEERS, E.P., JONES, A.M. & A.W. DICKERMAN (2004). The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry*, 65: 43 - 58.
- BERENBAUM, M.R. & A.R. ZANGERL (2008). Facing the future of plant-insect interaction research: le retour à la 'raison d'être'. *Plant Physiology*, 146: 804-811.
- BERGER, D. & T. ALTMANN (2000). A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, 14: 1119 - 1131.
- BIRNBAUM, H.C. & J. DOLY (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7: 1513 - 1523.
- BOGACHEVA, A.M., RUDENSKAYA, G.N., DUNAEVSKY, Y.E., CHESTUHINA, G.G. & B.N. GOLOVKIN (2001). New subtilisin-like collagenase from leaves of common plantain. *Biochimie*, 83: 481 - 486.
- BOYD, P.M., BARNABY, N., TAN-WILSON, A. & K.A. WILSON (2002). Cleavage specificity of the subtilisin-like protease C1 from soybean. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1596: 269 - 282.
- BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 - 254.
- BREDEMEYER, A.J., LEWIS, R.M., MALONE, J.P., DAVIS, A.E., GROSS, J., TOWNSEND, R.R. & T.J. LEY (2004). A proteomic approach for the discovery of protease substrates. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 101 (32): 11785 - 11790.
- BRUINENBERG, P.G., DOESBURG, P., ALTING, A.C., EXERKATE, F.A., DE VOS, W.M. & R.J. SIEZEN (1994). Evidence for a large dispensable segment in the subtilisin-like catalytic domain of the *Lactococcus lactis* cell-envelope proteinase. *Protein Engineering*, 7: 991 – 996.
- CALLIS, J. (1995). Regulation of protein degradation. *Plant Cell*, 7: 845 - 857.
- CARLINI, C.R. & M.F. GROSSI-DE-SA (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40: 1515 - 1539.

- CHEN, H., WILKERSON, C.G., KUCHAR, J.A., PHINNEY, B.S. & G.A. HOWE (2005). Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 102 (52): 19237 - 19242.
- CHEN, H., GONZALES-VIGIL, E., WILKERSON, C.G. & G.A. HOWE (2007). Stability of plant defense proteins in the gut of insect herbivores. *Plant Physiology*, 143: 1954 - 1967.
- CHRISPEELS, M.J. (1983). Incorporation of fucose into the carbohydrate moiety of phytohemagglutinin in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledon. *Planta*, 57: 454 - 461.
- COFFEEN, W.C. & T.J. WOLPERT (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.
- CONSTABEL, C.P., BERGEY, D.R. & C.A. RYAN (1995). Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 92: 407 - 411.
- CUROTTO, E., GONZALEZ, G., O'REILLY, S. & G. TAPIA (1989). Isolation and partial characterization of a protease from *Cucurbita ficifolia*. *Federation of Biochemical Societies Letters*, 243 (2): 363 - 365.
- DE BOER, G. & F.E. HANSON (1984). Food plant selection and induction of feeding preferences among host and non-host plants in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae). *Entomologia experimentalis et applicata*, 35: 177 - 193.
- DELANEY, T.P., UKNES, S., VERNOOIJ, B., FRIEDRICH, L., WEYMANN, K., NEGROTTO, D., GAFFNEY, T., GUTRELLA, M., KESSMANN, H., WARD, E. & J. RYALS (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266 (5188): 1247 - 1250.
- DONG, D., KO, B., BAUMEISTER, P., SWENSON, S., COSTA, F., MARKLAND, F., STILES, C., PATTERSON, J.B., BATES, S.E. & A.S. LEE (2005). Vascular targeting and antiangiogenesis agents induce drug resistance effector GRP78 within the tumor microenvironment. *Cancer Research*, 65 (13): 5785 - 5791.
- DUFFEY, S.S. & M.J. STOUT (1996). Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 32: 3 - 37.
- DUNCAN, E.A., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. & J. SAKAI (1997). Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a Leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (19): 12778 - 12785.
- ELLIS, K.J. & J.F. MORRISON (1982). Buffers for studying pH-dependent processes. *Methods in Enzymology*, 87: 405 - 426.
- FELIX, G. & T. BOLLER (1995). Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *The Plant Journal*, 7 (3): 381 - 389.

- FELTON, G.W. (2005). Indigestion is a plant's best defense. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 102 (52): 18771 - 18772.
- FELTON, G.W., DONATO, K. & R.J. DELVECCHIO (1989). Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 2667 - 2694.
- FICHETTE-LAINE, A.C., GOMORD, V., CHEKKAFI, A. & L. FAYE (1994). Distribution of xylosylation and fucosylation in the plant golgi apparatus. *Plant Journal*, 5: 673 - 682.
- FONTANINI, D. & B.L. JONES (2002). SEP-1 - a subtilisin-like serine endopeptidase from germinated seeds of *Hordeum vulgare* L. cv. Morex. *Planta*, 215: 885 - 893.
- FRICK, U.B. & A. SCHALLER (2002). cDNA microarray analysis of fusaric acid-induced changes in gene expression in tomato plants. *Planta*, 216: 83 - 94.
- FRISCH, D.A., HARRIS-HALLER, L.W., YOKUBAITIS, N.T., THOMAS, T.L. & S.H. HARDIN (1995). Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Molecular Biology*, 27 (2): 405 - 409.
- FULLER, R.S., BRAKE A. & J. THORNER (1989). Yeast prohormone processing enzyme (*KEX2* gene product) is a  $Ca^{2+}$ -dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 86: 1434 - 1438.
- GABLER, L. (2004). Reinigung und Charakterisierung der Subtilase *LeSBT3* von Tomate. Diplomarbeit, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Universität Hohenheim.
- GLEAVE, A.P. (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.
- GOLLDACK, D., VERA, P. & K.J. DIETZ (2003). Expression of subtilisin-like proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiologia Plantarum*, 118: 64 - 73.
- GOMEZ, L., ALLONA, I., CASADO, R. & C. ARAGONCILLO (2002). Seed chitinases. *Seed science research*, 12: 217 - 230.
- GREEN, T.R., & C.A. RYAN (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves. Possible defense mechanism against insects. *Science*, 175: 776 - 777.
- GROOT, S.P.C., KIELISZEWSKA-ROCKIKA, B., VERMEER, E. & C. M. KARSEN (1988). Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta*, 174: 500 - 504.
- GU, Y.-Q., CHAO, W.S. & L.L. WALLING (1996). Localization and post-translational processing of the wound-induced leucine aminopeptidase proteins of tomato. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 25880 - 25887.

- GU, Y.-Q., HOLZER, F.M. & L.L. WALLING (1999). Overexpression, purification and biochemical characterization of the wound-induced leucine aminopeptidase of tomato. *European Journal of Biochemistry*, 263: 726 - 735.
- GUO, Z.-J., LAMB, C. & R.A. DIXON (1998). Potentiation of the oxidative burst and isoflavonoid phytoalexin accumulation by serine protease inhibitors. *Plant Physiology*, 118: 1487 - 1494.
- HAMILTON, J.M.U., SIMPSON, D.J., HYMAN, S.C., NDIRIMBA, B.K. & A.R. SLABAS (2003). Ara12 subtilisin-like protease from *Arabidopsis thaliana*: purification, substrate specificity and tissue localization. *Biochemical Journal*, 370: 57 - 67.
- HAWKINS, J.L., ROBBINS, M.D., WARREN, L.C., XIA, D., PETRAS, S.F., VALENTINE, J.J., VARGHESE, A.H., WANG, I.-K., SUBASHI, T.A., SHELLY, L.D., HAY, B.A., LANDSCHULZ, K.T., GEOGHEGAN, K.F. & H.J. HARWOOD, JR (2008). Pharmacologic inhibition of site-1 protease activity inhibits SREBP processing and reduces lipogenic enzyme gene expression and lipid synthesis in cultured cells and experimental animals. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Jun 24. Epub ahead of print.
- HENDERSHOT, L.M. (2004). The ER function BiP is a master regulator of ER function. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 71: 289 - 297.
- HENRICH, S., CAMERON, A., BOURENKOV, G.P., KIEFERSAUER, R., HUBER, R., LINDBERG, I., BODE, W. & M.E. THAN (2003). The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nature Structural Biology*, 10 (7): 520 - 526.
- HOLYOAK, T., WILSON, M.A., FENN, T.D., KETTNER, C.A., PETSKO, G.A., FULLER, R.S. & D. RINGE (2003). 2.4 Å resolution crystal structure of the prototypical hormone-processing protease Kex2 in complex with an Ala-Lys-Arg boronic acid inhibitor. *Biochemistry*, 42 (22): 6709 - 6718.
- HORI, H., KAUSHAL, G.P. & A.D. ELBEIN (1985). Fucosylation of membrane proteins in soybean cultured cells: effects of tunicamycin and swainsonine. *Plant Physiology*, 77 (3): 687 - 694.
- HUET, Y. (2004). Functional analysis of insulin-degrading enzyme in higher plants. Dissertation, Swiss Federal Institute of Technology, ETH Zürich. Doktor of Natural Sciences: 130.
- JACH, G., GORNHARDT, B., MUNDY, J., LOGEMANN, J., PINSDORF, E., LEAH, R., SCHELL, J. & C. MAAS (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 8: 97 - 109.
- JACINTO, T., MCGURL, B., FRANCESCHI, V., DELANO-FREIER, J. & C.A. RYAN (1997). Tomato prosystemin promoter confers wound-inducible, vascular bundle-specific expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene in transgenic tomato plants. *Planta*, 203: 406 - 412.
- JANZIK, I. (2000). Heterologe Expression und Charakterisierung von Subtilasen aus *Lysopersicon esculentum*. Dissertation, Institut für Pflanzenwissenschaften, Abteilung Biochemie und Physiologie der Pflanzen, ETH Zürich. Doktor der Naturwissenschaften: 91.

- JANZIK, I., MACHEROUX, P., AMRHEIN, N. & A. SCHALLER (2000). *LeSBT1*, a subtilase from tomato plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (7): 5193 - 5199.
- JEFFERSON, R.A., BURGESS, S.M. & D. HIRSH (1986). Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 83 (22): 8447-8451.
- JONGEDIJK, E., TIGELAAR, H., ROEKEL, J.S.C., BRES-VLOSMANS, S.A., DEKKER, I., ELZEN, P.J.M., CORNELISSEN, B.J.C. & L.S. MELCHERS (1995). Synergistic activity of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*, 85: 173 - 180.
- JORDÁ, L. & P. VERA (2000). Local and systematic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic *Arabidopsis* plants. Luciferin induction of *PR* gene expression. *Plant Physiology*, 124: 1049 - 1057.
- JORDÁ, L., COEGO, A., CONEJERO, V. & P. VERA (1999). A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (4): 2360 - 2365.
- JORDÁ, L., CONEJERO, V. & P. VERA (2000). Characterization of *P69E* and *P69F*, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. *Plant Physiology*, 122: 67 - 73.
- JULIUS, D., BLAIR, L., BRAKE, A., SPRAGUE, G. & J. THORNER (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell*, 37: 1074 - 1089.
- KANEDA, M. & N. TOMINAGA (1975). Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *Journal Biochemistry*, 78: 1287 - 1296.
- KANEDA, M., YONEZAWA, H. & T. UCHIKOBA (1995). Improved isolation, stability and substrate specificity of cucumisin, a plant serine endopeptidase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 22: 215 - 222.
- KARBAN, R. & I.T. BALDWIN (1997). *Induced responses to herbivory*. University of Chicago Press. Chicago
- 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, Universität Hohenheim.
- KATAGIRI, F., THILMONY, R.L. & S.Y HE (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. In *The Arabidopsis Book*, C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists).

- KIM, P.S. & P. ARVAN (1998). Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocrine Reviews*, 19: 173 - 202.
- KISTNER, C., WINZER, T., PITZSCHKE, A., MULDER, L., SATO, S., KANEKO, T., TABATA, S., SANDAL, N., STOUGAARD, J., WEBB, K.J., SZCZYGLOWSKI, K. & M. PARNISKE (2005). Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *The Plant Cell*, 17 (8): 2217 - 2229.
- KUHN, B. (2007). Untersuchungen über die Prozessierung und Sekretion der Subtilase *LeSBT3*. Diplomarbeit, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Universität Hohenheim.
- KWON, H.J., LAGACE, T.A., MCNUTT, M.C., HORTON, J.D. & J. DEISENHOFER (2008). Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 105 (6): 1820 - 1825.
- LAEMMLI, U.K. (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.B. & K. PAWLOWSKI (2000). Characterisation of a *Casuarina glauca* nodule-specific subtilisin-like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa* ag12. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 13: 113 - 117.
- LAWRENCE, C.M., RAY, S., BABYONYSHEV, M., GALLUSER, R., BORHANI, D.W. & S.C. HARRISON (1999). Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science*, 286: 779 - 782.
- LEE, G.I. & G.A. HOWE (2003). The tomato mutant spr1 is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *The Plant Journal*, 33 (3): 567 - 576.
- LI, L., ZHAO, Y., MCCAIG, B.C., WINGERD, B.A., WANG, J., WHALON, M.E., PICHERSKY, E. & G.A. HOWE (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *The Plant Cell*, 16 (1): 126 - 143.
- LINTHORST, H.J., DANHASH, N., BREDERODE, F.T., VAN KAN, J.A., DE WIT, P.J. & J.F. BOL (1991). Tobacco and tomato PR proteins homologous to win and pro-hevein lack the "hevein" domain. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4 (6): 586 - 92.
- LIU, J.-X., SRIVASTAVA R., CHE, P. & S. H. HOWELL (2007). Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *The Plant Journal*, 51: 897 - 909.
- LOZOVAYA, V.V., WARANYUWAT, A. & J.M. WIDHOLM (1998).  $\beta$ -1,3-glucanase and resistance of *Aspergillus flavus* infection in maize. *Crop science*, 38: 1255 - 1260.

- LUO, S., MAO, C., LEE, B. & A. LEE (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Molecular and Cellular Biology*, 26: 5688 - 5697.
- MAHON, P. & A. BATEMAN (2000). The PA-Domain: A protease associated domain. *Protein Science*, 9: 1930 - 1934.
- MALEY, F., TRIMBLE, R.B., TARENTINO, A.L. & T.H. PLUMMER, JR (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Analytical Biochemistry*, 180: 195 - 204.
- MEICHTRY, J., AMRHEIN, N. & A. SCHALLER (1999). Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Molecular Biology*, 39: 749 - 760.
- MESSDAGHI, D. & K.-J. DIETZ (2000). Characterization of an extracellular chymostatin-sensitive serine protease preferentially expressed in young plant tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1480: 107 - 116.
- MOLLOY, S.S., BRESNAHAN, P.A., LEPLA, S.H., KLIMPEL K.R. & G. THOMAS (1992). Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 16396 - 16402.
- MONTECUCCO, C. & M. MOLINARI (2006). Death of a chaperone. *Nature*, 443: 511 - 512.
- MOROHASHI, Y. (2002). Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1643 - 1650.
- MOROHASHI, Y. & H. MATSUSHIMA (2000). Development of  $\beta$ -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *Journal of experimental botany*, 51: 1381 - 1387.
- NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J. & C.A. RYAN (2004). The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta*, 218: 360 - 369.
- NEUTEBOOM, L.W., NG, J.M.Y., KUYPER, M., CLIJDESDALE, O.R., HOOYKAAS, P.J.J. & B.J. VAN DER ZAAL (1999). Isolation and characterization of cDNA clones corresponding with mRNAs that accumulate during auxin-induced lateral root formation. *Plant Molecular Biology*, 39: 273 - 287.
- NISHIKATA, M. (1984). Trypsin-like protease from soybean seeds. Purification and some properties. *The Journal of Biochemistry*, 95 (4): 1169 - 1177.
- NOVER, L., KRANZ, E. & K.-D. SCHARF (1982). Growth cycle of suspension cultures of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 177: 483 - 499.
- OROZCO-CARDENAS, M., MCGURL, B. & C.A. RYAN (1993). Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 90: 8273 - 8276.

- OROZCO-CARDENAS, M., NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J. & C.A. RYAN (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 13: 179 - 191.
- PANDE, M., VIKASH, K., DUBEY, V.K., YADAV, S.C. & M.V. JAGANNADHAM (2006). A novel serine protease cryptolepain from *Cryptolepis buchanani*: Purification and biochemical characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 10141 - 10150.
- PATON, A.W., SRIMANOTE, P., TALBOT, U.M., WANG, H. & J.C. PATON (2004). A new family of potent AB<sub>5</sub> cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *The Journal of Experimental Medicine*, 200 (1): 35 - 46.
- PATON, A.W., BEDDOE, T., THORPE, C.M., WHISSTOCK, J.C., WILCE, M.C.J., ROSSJOHN, J., TALBOT, U.M. & J.C. PATON (2006). AB<sub>5</sub> subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BIP. *Nature*, 443: 548 - 552.
- PAUTOT, V., HOLZER, F.M., REISCH, B. & L.L. WALLING (1993). Leucine aminopeptidase: An inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 90: 9906 - 9910.
- PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON S. & C.A. RYAN (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, 253: 895 – 898.
- PEARCE, G., JOHNSON, S. & C.A. RYAN (1993). Structure-activity of deleted and substituted systemin, an 18-amino acid polypeptide inducer of plant defensive genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (1): 212 - 216.
- POPOVIČ, T., PUIZDAR, V. & J. BRZIN (2002). A novel subtilase from common bean leaves. *Federation of Biochemical Societies Letters*, 530: 163 - 168.
- RAUTENGARTEN, C., STEINHAUSER, D., BÜSSIS, D., STINTZI, A., SCHALLER, A., KOPKA, A. & T. ALTMANN (2005). Inferring hypotheses on functional relationships of genes: analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *Public Library of Science Computational Biology*, 1, e40.
- RAUTENGARTEN, C., USADEL, B., NEUMETZLER, L. HARTMANN, J. BÜSSIS, D. & T. ALTMANN (2008). A subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Journal*, 54: 466 - 480.
- RAWLINGS, N.D. & A.J. BARRET (1994). Families of serine peptidases. Kap. 2: 19 – 61 in BARRET, A.J. Ed. (1994). *Proteolytic enzymes: Serine and Cysteine peptidases. Methods in Enzymology*, Vol. 244, Academic Press, San Diego.
- RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R., KOK, C.Y., KONG, J. & A. J. BARRETT (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, 36: D320 - D325.

- REMACLE, A.G., SHIRYAEV, S.A., OH, E.-S., CIEPLAK, P., SRINIVASAN, A., WEI, G., LIDDINGTON, R.C., RATNIKOV, B.I., DAY, R., SMITH, J.W., LEBL, M. & A.Y. STRONGIN (2008). Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases: a comparative study. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 20897 - 20906.
- RIBEIRO, A., AKKERMANS, A.D.L., VAN KAMMEN, A., BISSELIN, T. & K. PAWLOWSKI (1995). A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *The Plant Cell*, 7: 785 - 794.
- RIGGS, C.D. & A. HORSCH (1995). Molecular cloning of an anther specific gene from tomato. *Plant Physiology*, 108: (Suppl.) 117.
- ROBERTS, I.N., MURRAY, P.F., CAPUTO, C.P., PASSERON, S. & A.J. BARNEIX (2003). Purification and characterization of a subtilisin-like serine protease induced during the senescence of wheat leaves. *Physiologia Plantarum*, 118: 483 - 490.
- ROCKWELL, N.C. & J.W. THORNER (2004). The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveals secrets of precursor processing. *Trends in Biochemical Sciences*, 29 (2): 80 - 87.
- RUDENSKAYA, G.N., STEPANOV, V.M., ZAKHAROVA, Y.A., REVINA, L.P. & O.M. KHODOVA (1987). A thiol-dependent serine protease from sunflower leaves: a bacterial serine proteinase analog. *Biokhimiya*, 52: 1753 - 1755.
- RUDENSKAYA, G.N., BOGDANOVA E.A., REVINA, L.P., GOLOVKIN, B.N. & V.M. STEPANOV (1995). Macluralisin - a serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Planta*, 196: 174 - 179.
- RUDENSKAYA, G.N., BOGACHEVA A.M., PREUSSER, A., KUZNETSOVA A.V., DUNAEVSKY Y.E., GOLOVKIN B.N. & V.M. STEPANOV (1998). Taraxalisin - a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb s.l. *Federation of Biochemical Societies Letters*, 437: 237 - 240.
- RUTKOWSKI, D.T. & R.J. KAUFMANN (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends in Cell Biology*, 14: 20 - 28.
- RYAN, C.A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477: 112 - 121.
- SAKAI, J., RAWSON, R. B., ESPENSHADE, P. J., CHENG, D., SEEGMILLER, A. C., GOLDSTEIN, J. L. & M. S BROWN (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Molecular Cell*, 2: 505 - 514.
- SCHALLER, A. (1998). Action of proteolysis-resistant systemin analogues in wound signalling. *Phytochemistry*, 47 (4): 605 - 612.
- SCHALLER, A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220: 183 - 197.

- SCHALLER, A. & C. RYAN (1994). Identification of a 50-kDa systemin-binding protein in tomato plasma membranes having Kex2p-like properties. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 91: 11802 – 11806.
- SCHALLER, A. & C. OECKING (1999). Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *The Plant Cell*, 11: 263 - 272.
- SCHALLER, A., ROY, P. & N. AMRHEIN (2000). Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related gene expression by fusicoccin. *Planta*, 210: 599 - 606.
- SCHECHTER, I. & A. BERGER (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 27: 157 – 162.
- SEIDAH, N.G. & A. PRAT (2007). The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *Journal of Molecular Medicine*, 85: 685 - 696.
- SEIDAH, N.G., MOWLA, S.J., HAMELIN, J., MAMARBACHI, A.M., BENJANNET, S., TOURÉ, B.B., BASAK, A., MUNZER, J.S., MARCINKIEWICZ, J., ZHONG, M., BARALE, J.-C., LAZURE, C., MURPHY, R.A., CHRÉTIEN, M. & M. MARCINKIEWICZ (1999). Mammalian subtilisin/kexin isoenzyme SKI-1: a widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 96: 1321 - 1326.
- SEIDAH, N.G., BENJANNET, S., WICKHAM, L., MARCINKIEWICZ, J., BÉLANGER JASMIN, S., STIFANI, S., BASAK, A., PRAT, A. & M. CHRÉTIEN (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 100 (3): 928 - 933.
- SHIRYAEV, S.A., REMACLE, E.G., RATNIKOV, B.I., NELSON, N.A., SAVINOV, A.Y., WEI, G., BOTTINI, M., REGA, M.F., PARENT, A., DESJARDINS, R., FUGERE, M., DAY, R., SABET, M., PELLECCIA, M., LIDDINGTON, R.C., SMITH, J.W., MUSTELIN, T., GUINEY, D.G., LEBL, M. & A.Y. STRONGIN (2007). Targeting host cell furin proprotein convertases as a therapeutic strategy against bacterial toxins and viral pathogens. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (29): 20847 - 20853.
- SIEZEN, R.J. & J.A.M. LEUNISSEN (1997). Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science*, 6: 501 - 523.
- SIMMONS, C.R. (1994). The physiology and molecular biology of plant 1,3-β-glucanases and 1,3; 1,4-β-glucanases. *Critical reviews in plant sciences*, 13: 325 - 387.
- SINGH, J. & M.R. ROBERTS (2004). Fusicoccin activates pathogen-responsive gene expression independently of common resistance signalling pathways, but increases disease symptoms in *Pseudomonas syringae*-infected tomato plants. *Planta*, 219: 261 - 269.
- SMITH, C.A., TOOGOOD, H.S., BAKER, H.M., DANIEL, R.M. & E.N. BAKER (1999). Calcium-mediated thermostability in the subtilisin superfamily: the crystal structure of *Bacillus* Ak.1 protease at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 294: 1027 - 1040.

- STRASSNER, J., SCHALLER, F., FRICK, U.B., HOWE, G.A., WEILER, E.W., AMRHEIN, N., MACHEROUX, P. & A. SCHALLER (2002). Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductase reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *The Plant Journal*, 32: 585 - 601.
- TANAKA, H., ONOUCHI, H., KONDO, M., HARA-NISHIMURA, I., NISHIMURA, M., MACHIDA, C. & Y. MACHIDA (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. & J.A. BRUENN (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.A., HORSCH, A. RZEPczyk, A., HASENKAMPF, C.A. & C.D. RIGGS (1997). Maturation and secretion of a serine proteinase is associated with events of late microsporogenesis. *The Plant Journal*, 12 (6): 1261 - 1271.
- THOMAS, G. (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 3: 753–766.
- THOMAS, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 77: 5201 - 5205.
- THORNER, J. (1985). Pheromone-processing protease of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 314: 384 - 385.
- TORNERO, P., CONEJERO, V. & P. VERA (1996). Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 93: 6332 - 6337.
- UCHIKOBA, T., YONEZAWA, H. & M. KANEDA (1995). Cleavage specificity of Cucumisin, a plant serine protease. *Journal of Biochemistry*, 117: 1126 - 1130.
- ULLRICH, K. (2006). Charakterisierung der Subtilase *LeSBT2* aus *Lycopersicon esculentum*. Diplomarbeit, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Universität Hohenheim.
- VERA, P. & V. CONEJERO (1988). Pathogenesis-related proteins of tomato, P-69 as an alkaline endoprotease. *Plant Physiology*, 87: 58 - 63.
- VETSCH, M., JANZIK, I. & A. SCHALLER (2000). Charakterization fo prosystemin expressed in the baculovirus/insect cell system reveals biological activity of the systemin precursor. *Planta*, 211: 91 - 97.

- VON GROLL, U., BERGER, D. & T. ALTMANN (2002). The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *The Plant Cell*, 14: 1527 - 1539.
- WANG, J. & C.P. CONSTABEL (2004). Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta*, 220: 87 - 96.
- WESLEY, S.V., HELLIWELL, C.A., SMITH N.A., WANG M.B. ROUSE, D.T., LIU, Q., GOODING, P.S., SINGH S.P., ABBOTT, D., STOUTJESDIJK, P.A., ROBINSON, S.P., GLEAVE, A.P., GREEN, A.G. & P.M. WATERHOUSE (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 27 (6): 581 - 590.
- WU, C.-T., LEUBNER-METZGER, G., MEINS, F. & K.J. BRADFORD (2000). Class I  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiology*, 126: 1299 - 1313.
- YADAV, S.C., PANDE, M. & M.V. JAGANNADHAM (2006). Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochemistry*, 67: 1414 - 1426.
- YAMAGATA, H., MASUZAWA, T., NAGAOKA, Y., OHNISHI, T. & T. IWASAKI (1994). Cucumisin, a serine protease from melon fruits, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (52): 32725 - 32731.
- YE, J., RAWSON, R.B., KOMURO, R., CHEN, X., DAVE, U.P., PRYWES, R., BROWN, M.S. & J.L. GOLDSTEIN (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same protease that process SREBPs. *Molecular Cell*, 6: 1355 - 1364.
- ZAVALA, J.A. & I.T. BALDWIN (2004). Fitness benefits of trypsin proteinase inhibitor expression in *Nicotiana attenuata* are greater than their costs when plants are attacked. *BioMed Central Ecology* 4: 11 - 26.
- ZHAO, C., JOHNSON, B.J., KOSITSUP, B. & E.P. BEERS (2000). Exploiting secondary growth in *Arabidopsis*. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. *Plant Physiology*, 123: 1185 - 1196.
- ZHAO, Y., THILMONY, R., BENDER, C.L., SCHALLER, A., HE, S.Y. & G.A. HOWE (2003). Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *The Plant Journal*, 36: 485 - 499.
- ZHU-SALZMAN, K., SHADE, R.E., KOIWA, H., SALZMAN, R.A., NARASIMHAN, M., BRESSAN, I.A., HASEGAWA, P.M. & L.L. MURDOCK (1998). Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 95: 15123 - 15128.
- ZHU-SALZMAN, K., LUTHE, D. & G. FELTON (2008). Arthropod-inducible proteins: broad spectrum defenses against multiple herbivores. *Plant Physiology*, 146 (3): 852 - 858.

**Zitierte Internetquellen:**

<http://merops.sanger.ac.uk>

<http://www.manducaproject.com>

[http://www.jpt.com/products/enzyme\\_profiling/protease\\_profiling/proteasespots.htm](http://www.jpt.com/products/enzyme_profiling/protease_profiling/proteasespots.htm)

[http://orion1.paisley.ac.uk/kinetics/Chapter\\_2/contents\\_chap2.html](http://orion1.paisley.ac.uk/kinetics/Chapter_2/contents_chap2.html)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

## 6 ANHANG

Tab. 6.1a Sequenzen der im Protease Spot-Test eingesetzten Peptide (Nr. 1 – 29)

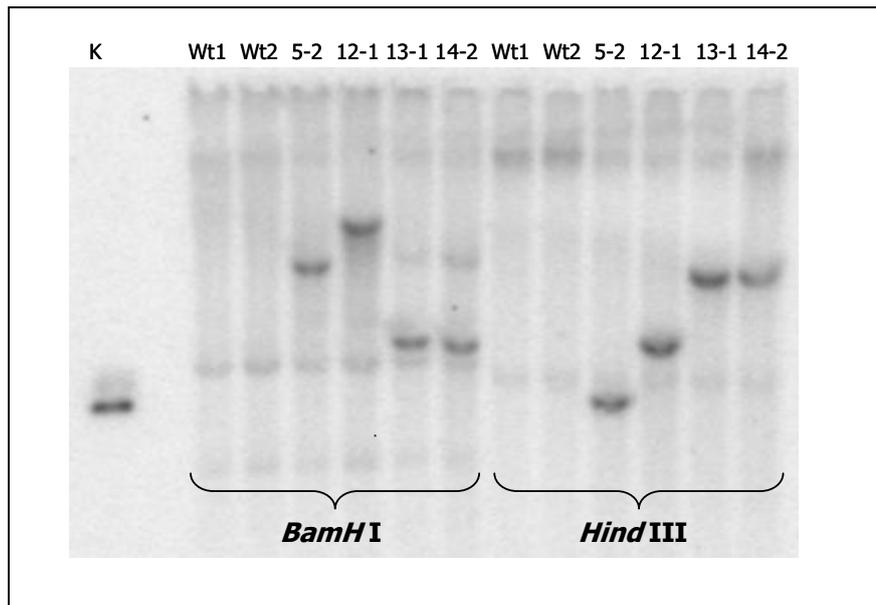
Die im Protease Spot-Test eingesetzten fluorogenen Peptide basierten auf der Aminosäureteilsequenz des Systemin-Peptids (Nr. 0). Ausgehend davon wurden Peptide synthetisiert, welche sich jeweils in einer Aminosäure (Nr. 1 - 60) vom ursprünglichen Systemin-Peptid-Fragment unterschieden. Dafür wurden die Aminosäuren an den Position P<sub>5</sub> bis P<sub>3</sub>' systematisch durch eine Aminosäure (AS) aus je einer der folgenden Gruppen mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgetauscht: Alanin (A, aliphatisch), Phenylalanin (F, aromatisch), Asparagin und Serin (N, S, polar), Aspartat (D, sauer), Prolin (P, unpolar) und Lysin (K, basisch). An den Positionen P<sub>2</sub> bis P<sub>1</sub> wurde zusätzlich eine AS gegen Valin (V, unpolar), Glycin (G, unpolar) Leucin (L, aliphatisch) bzw. Isoleucin (I, aliphatisch) (Nr. 19 - 39) sowie an der Position P<sub>1</sub>' gegen Tryptophan (W, polar) bzw. Tyrosin (Y, polar) ausgetauscht. Desweiteren Position P<sub>1</sub> durch ein Histidin (H, basisch). Die ausgetauschten AS sind rot, die Spaltstelle durch einen Doppelstrich markiert. Die Darstellung der Spaltstellen entspricht der Nomenklatur nach SCHECHTER & BERGER (1967). Die Aminosäuresequenzen der Peptide wurden in der Einbuchstaben-Schreibweise dargestellt.

Nr.	Peptidsequenz	Spaltstellen											
						P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> '	P <sub>2</sub> '	P <sub>3</sub> '
0	SKRDPPKMQTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	D	S
1	SKRDAPKMQTDS	S	K	R	D	A	P	K	M	Q	T	D	S
2	SKRDFPKMQTDS	S	K	R	D	F	P	K	M	Q	T	D	S
3	SKRDNPKMQTDS	S	K	R	D	N	P	K	M	Q	T	D	S
4	SKRDSPKMQTDS	S	K	R	D	S	P	K	M	Q	T	D	S
5	SKRDDPKMQTDS	S	K	R	D	D	P	K	M	Q	T	D	S
6	SKRDKPKMQTDS	S	K	R	D	K	P	K	M	Q	T	D	S
7	SKRDPAKMQTDS	S	K	R	D	P	A	K	M	Q	T	D	S
8	SKRDPFKMQTDS	S	K	R	D	P	F	K	M	Q	T	D	S
9	SKRDPNKMQTDS	S	K	R	D	P	N	K	M	Q	T	D	S
10	SKRDPSKMQTDS	S	K	R	D	P	S	K	M	Q	T	D	S
11	SKRDPKMQTDS	S	K	R	D	P	D	K	M	Q	T	D	S
12	SKRDPPKMQTDS	S	K	R	D	P	K	K	M	Q	T	D	S
13	SKRDPPAMQTDS	S	K	R	D	P	P	A	M	Q	T	D	S
14	SKRDPPFMQTDS	S	K	R	D	P	P	F	M	Q	T	D	S
15	SKRDPPNMQTDS	S	K	R	D	P	P	N	M	Q	T	D	S
16	SKRDPPSMQTDS	S	K	R	D	P	P	S	M	Q	T	D	S
17	SKRDPPDMQTDS	S	K	R	D	P	P	D	M	Q	T	D	S
18	SKRDPPPMQTDS	S	K	R	D	P	P	P	M	Q	T	D	S
19	SKRDPPKAQTDS	S	K	R	D	P	P	K	A	Q	T	D	S
20	SKRDPPKFQTDS	S	K	R	D	P	P	K	F	Q	T	D	S
21	SKRDPPKNQTDS	S	K	R	D	P	P	K	N	Q	T	D	S
22	SKRDPPKSQTDS	S	K	R	D	P	P	K	S	Q	T	D	S
23	SKRDPPKDQTDS	S	K	R	D	P	P	K	D	Q	T	D	S
24	SKRDPPKKQTDS	S	K	R	D	P	P	K	P	Q	T	D	S
25	SKRDPPKPQTDS	S	K	R	D	P	P	K	K	Q	T	D	S
26	SKRDPPKVQTDS	S	K	R	D	P	P	K	V	Q	T	D	S
27	SKRDPPKGQTDS	S	K	R	D	P	P	K	G	Q	T	D	S
28	SKRDPPKLQTDS	S	K	R	D	P	P	K	L	Q	T	D	S
29	SKRDPPKIQTDS	S	K	R	D	P	P	K	I	Q	T	D	S

**Tab. 6.1b Sequenzen der im Protease Spot-Test eingesetzten Peptide (Nr. 30 – 60)**

Die im Protease Spot-Test eingesetzten fluorogenen Peptide basierten auf der Aminosäureteilsequenz des Systemin-Peptids (Nr. 0). Ausgehend davon wurden Peptide synthetisiert, welche sich jeweils in einer Aminosäure (Nr. 1 - 60) vom ursprünglichen Systemin-Peptid-Fragment unterschieden. Dafür wurden die Aminosäuren an den Position P<sub>5</sub> bis P<sub>3</sub>' systematisch durch eine Aminosäure (AS) aus je einer der folgenden Gruppen mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgetauscht: Alanin (A, aliphatisch), Phenylalanin (F, aromatisch), Asparagin und Serin (N, S, polar), Aspartat (D, sauer), Prolin (P, unpolar) und Lysin (K, basisch). An den Positionen P<sub>2</sub> bis P<sub>1</sub> wurde zusätzlich eine AS gegen Valin (V, unpolar), Glycin (G, unpolar) Leucin (L, aliphatisch) bzw. Isoleucin (I, aliphatisch) (Nr. 19 - 39) sowie an der Position P<sub>1</sub>' gegen Tryptophan (W, polar) bzw. Tyrosin (Y, polar) ausgetauscht. Desweiteren Position P<sub>1</sub> durch ein Histidin (H, basisch). Die ausgetauschten AS sind rot, die Spaltstelle durch einen Doppelstrich markiert. Die Darstellung der Spaltstellen entspricht der Nomenklatur nach SCHECHTER & BERGER (1967). Die Aminosäuresequenzen der Peptide wurden in der Einbuchstaben-Schreibweise dargestellt.

Nr.	Peptidsequenz	Spaltstellen											
						P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> '	P <sub>2</sub> '	P <sub>3</sub> '
0	SKRDPPKMQTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	D	S
30	SKRDPPKMATDS	S	K	R	D	P	P	K	M	A	T	D	S
31	SKRDPPKMFTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	F	T	D	S
32	SKRDPPKMPTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	N	T	D	S
33	SKRDPPKMSTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	S	T	D	S
34	SKRDPPKMDTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	D	T	D	S
35	SKRDPPKMKTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	P	T	D	S
36	SKRDPPKMVTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	K	T	D	S
37	SKRDPPKMLTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	V	T	D	S
38	SKRDPPKMHTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	L	T	D	S
39	SKRDPPKMNTDS	S	K	R	D	P	P	K	M	H	T	D	S
40	SKRDPPKMQADS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	A	D	S
41	SKRDPPKMQFDS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	F	D	S
42	SKRDPPKMQNDS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	N	D	S
43	SKRDPPKMQSDS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	S	D	S
44	SKRDPPKMQDDS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	D	D	S
45	SKRDPPKMQKDS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	P	D	S
46	SKRDPPKMQPDS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	K	D	S
47	SKRDPPKMQWDS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	W	D	S
48	SKRDPPKMQYDS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	Y	D	S
49	SKRDPPKMQTAS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	A	S
50	SKRDPPKMQTFS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	F	S
51	SKRDPPKMQTNS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	N	S
52	SKRDPPKMQTSS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	S	S
53	SKRDPPKMQTPS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	P	S
54	SKRDPPKMQTKS	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	K	S
55	SKRDPPKMQTDA	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	D	A
56	SKRDPPKMQTDF	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	D	F
57	SKRDPPKMQTDN	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	D	N
58	SKRDPPKMQTDP	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	D	D
59	SKRDPPKMQTDD	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	D	P
60	SKRDPPKMQTDK	S	K	R	D	P	P	K	M	Q	T	D	K



**Abb. 6.1** Southern Blot-Analyse der *SISBT3*-Promotor::GUS-Linien.

Je 10 µg genomische DNA der *SISBT3*-Promotor::GUS-Linien sowie zweier Wt-Linien wurden mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten NPTII-Sonde hybridisiert. K zeigt die positiv Kontrolle (100 pg Plasmid-DNA, pART27, linearisiert mit *Not*I).

## Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Professor Dr. Andreas Schaller dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Institut zu promovieren. Für seine Unterstützung während meiner Promotionszeit bedanke ich mich ganz herzlich.

Professor Dr. Nicolaus von Wirén danke ich für die Mitbetreuung der Arbeit und die Übernahme der Zweitkorrektur.

Besonders danken möchte ich meiner Betreuerin Dr. Ania Cedzich für ihre außerordentliche fachliche Unterstützung, stete Diskussionsbereitschaft, Geduld und Freundschaft während meiner Promotionszeit.

Für die Kristallisierung von *SSBT3* und die Analyse der Kristallstruktur danke ich Dr. Christian Ottmann vom Chemical Genomics Centre am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund.

Bei Brigitte Rösingh möchte ich mich vor allem für die Unterstützung bei der Aufreinigung von *SSBT3* und bei Erika Wenzelburger besonders für die Erhaltung und Pflege der *SSBT3*-Zellkultur bedanken. Den Damen aus dem Gewächshaus, Monika Baum, Dagmar Heisler, Birgit Lemke und Anette Reif ein herzliches Dankeschön für die Aufzucht und Pflege der Tomatenpflanzen sowie die Betreuung der *Manduca sexta*-Zucht.

Für die vielen fachlichen Gespräche, Anregungen und Denkanstöße möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Yoann Huet bedanken.

Danke an alle LaborkollegInnen des Reitscheuerflügels für die gute Arbeitsatmosphäre, insbesondere an Mathias Knappenberger fürs Fachsimpeln, seine große Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

Mein abschließender ganz besonderer Dank gilt meiner Mentorin Dr. Heidrun Moser für einfach alles. Wenn es Dich nicht gäbe, müsste man Dich erfinden!





