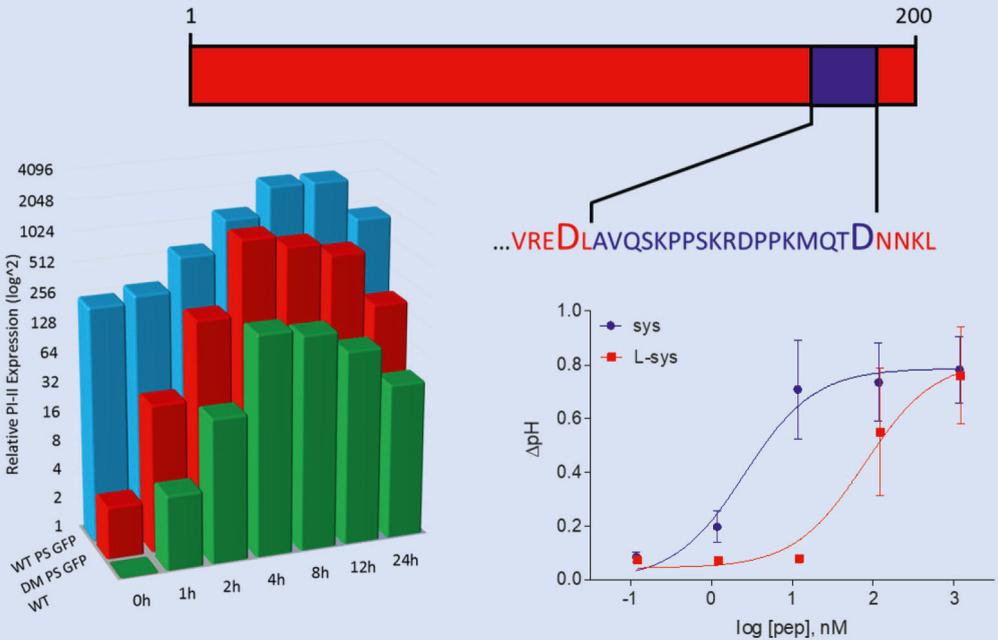


Schriftenreihe zur Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen



A. Schaller (Herausgeber) - Band 11

Konrad Dreizler

Die Reifung des Peptidhormons Systemin durch Phytaspasen und ihre Bedeutung für die Wundsignaltransduktion in der Tomate



Schriftenreihe zur Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen

Herausgeber: Prof. Dr. A. Schaller

Band 11/2018 Konrad Dreizler

Die Reifung des Peptidhormons Systemin durch Phytaspasen und ihre Bedeutung für die Wundsignaltransduktion in der Tomate

D 100 (Diss. Universität Hohenheim)





Die Reifung des Peptidhormons Systemin durch Phytaspasen und ihre Bedeutung für die Wundsignaltransduktion in der Tomate

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen

Vorgelegt von

Konrad Dreizler
aus Heidelberg

2018



Dekan: Prof. Dr. Uwe Beifuß

1. berichtende Person: Prof. Dr. Andreas Schaller

2. berichtende Person: Prof. Dr. Artur Pfitzner

Eingereicht am: 13.04.2018

Mündliche Prüfung: 24.07.2018

Die vorliegende Arbeit wurde am 04.07.2018 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2018

Zugl.: Hohenheim, Univ., Diss., 2018

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2018

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

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, 2018

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9847-6

eISBN 978-3-7369-8847-7



Inhaltsverzeichnis

Tabellen	VI
Abbildungen	VI
Abkürzungsverzeichnis	X
Summary	XIV
Zusammenfassung	XVI
Einleitung	1
1.1. Verteidigungsmechanismen von Pflanzen	1
1.1.1. Die konstitutive Pflanzenabwehr	1
1.1.2. Die induzierte Pflanzenabwehr	3
1.2. Die Pflanzenabwehr in der Tomate und die Entdeckung von Systemin	6
1.3. Die Rolle von Systemin bei der Wundantwort.....	8
1.4. Reifung von Peptidhormonen	14
1.5. Phytaspasen (plant-aspartate specific proteases).....	16
1.6. Ziel der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Material.....	19
2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
2.2.1. Antibiotika.....	19
2.2.2. Medien	19
2.2.3. Restriktionsenzyme	20



2.2.4.	Antikörper.....	20
2.2.5.	Peptide.....	21
2.2.6.	Oligonukleotide für die Genotypisierung und Klonierung.....	21
2.2.7.	Vektoren, Plasmide und Konstrukte.....	23
2.3.	Organismen.....	28
2.3.1.	Bakterienstämme.....	28
2.3.2.	Versuchspflanzen.....	29
2.3.3.	<i>Solanum peruvianum</i> Zellkultur.....	30
2.4.	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.4.1.	DNA-/Plasmid-Isolation (Mini-Präparation) aus <i>E. coli</i>	30
2.4.2.	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	31
2.4.3.	Elution der DNA-Fragmente aus dem Agarose Gel.....	32
2.4.4.	Analytischer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	32
2.4.5.	Dephosphorylierung der DNA-Fragmente.....	32
2.4.6.	TOPO®-Klonierung.....	32
2.4.7.	DNA-Sequenzierung.....	33
2.4.8.	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren.....	33
2.4.9.	Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	33
2.4.10.	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i>	34
2.4.11.	Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.4.12.	Kolonie-PCR.....	35
2.4.13.	Bakterienkulturen.....	35
2.4.14.	RNA-Isolation aus Pflanzengewebe.....	36
2.4.15.	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	36
2.4.16.	Reverse Transkriptase Reaktion.....	36
2.4.17.	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	37
2.5.	Proteinchemische Methoden.....	38
2.5.1.	Expression und Reinigung der Taq-Polymerase aus <i>E. coli</i>	38
2.5.2.	Heterologe Expression der PS-Proteine in <i>E. coli</i>	40
2.5.3.	Affinitätsreinigung von PS-Proteinen über Ni ²⁺ -NTA.....	40



2.5.4.	Dialyse der aufgereinigten PS-Proteine	41
2.5.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	42
2.5.6.	Extraktion der Gesamtproteine aus Tomatenblättern.....	42
2.5.7.	Extraktion apoplastischer Proteine aus Tabakblättern.....	43
2.5.8.	Extraktion symplastischer Proteine aus Tabakblättern	43
2.5.9.	Extraktion der Gesamtproteine aus Tabakblättern.....	44
2.5.10.	SDS (Sodiumdodecylsulfat) PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)	44
2.5.11.	Coomassie-Färbung	45
2.5.12.	Western Blot	45
2.5.13.	Konzentrationsbestimmung von Peptiden nach Lowry	47
2.5.14.	Ein-Schritt Immunopräzipitation von GFP-Fusionsproteinen..	47
2.5.15.	Enzymatischer In-Gel Proteinverdau mit Trypsin/Glu-C	48
2.5.16.	Enzymatischer In-Lösung-Verdau von Proteingemischen mit Trypsin.....	49
2.5.17.	Proteinverdau und Isolierung von Peptiden aus einem Proteingemisch	49
2.5.18.	Isolierung von Peptiden mit C ₁₈ -StageTips.....	50
2.5.19.	MALDI-ToF-ToF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight Massenspektrometrie).....	51
2.6.	Biologische Nachweisverfahren (Biotests) und Aktivitätsmessungen	51
2.6.1.	Proteinase Inhibitor II (PI-II) Genexpression in Tomatenpflanzen	51
2.6.2.	Zellkulturen und pH-Antwort Messungen	53
2.6.3.	Isolation transgener homozygoter Linien von WT und DM PS EGFP.....	53
2.6.4.	Zeitabhängige PI-II- Genexpression von WT-/DM-PS-EGFP überexprimierenden Pflanzen nach Verwundung.....	54
2.6.5.	Mikroskopie	55
2.7.	Statistik	55



3.	Ergebnisse	57
3.1.	Spaltung von Prosystemin durch <i>S</i> Phyt-1 und -2	57
3.1.1.	Heterologe Expression von PS und doppelt-mutiertem (DM) PS in <i>E. coli</i>	57
3.1.2.	Spaltung von WT-PS und DM-PS <i>in vitro</i>	60
3.1.3.	Identifizierung der N-terminalen Spaltstelle von PS <i>in vitro</i>	62
3.1.4.	Identifizierung der C-terminalen Spaltstelle und des freigesetzten Peptids <i>in vitro</i>	64
3.1.5.	Identifizierung der Spaltstellen <i>in vivo</i>	67
3.1.6.	Identifizierung der C-terminalen Spaltstelle <i>in vivo</i>	72
3.2.	Aktivität von Systemin, L-Systemin und Prosystemin	73
3.2.1.	Aktivität von PS und DM-PS <i>in vivo</i>	73
3.2.2.	Die Relevanz Spaltung nach D-2 für die Aktivität <i>in vivo</i>	76
3.2.3.	Die Relevanz der Spaltung nach D18 für die Aktivität <i>in vivo</i>	79
3.2.4.	Aktivität von PS in <i>S</i> Phyt-1-überexprimierenden und <i>S</i> Phyt- 1/2-defizienten Pflanzen.....	82
3.2.5.	Die Aktivität von sukzessive deletiertem PS ohne Sys.....	84
3.3.	Die Sekretionsprozesse von Systemin	87
3.3.1.	Die Bedeutung der repetitiven Elemente für die Sekretion von Systemin	87
3.4.	Charakterisierung von Tomatenpflanzen die WT- und DM-PS-EGFP konstitutiv exprimieren.....	92
3.4.1.	Die funktionelle Relevanz der Prozessierung von PS <i>in vivo</i>	92
4.	Diskussion	99
4.1.	Die Spaltung von PS durch <i>S</i> Phyt-1 und <i>S</i> Phyt-2 <i>in vitro</i> ist aspartatspezifisch.....	99
4.2.	Beide Aspartate sind notwendig für die Prozessierung von Prosystemin <i>in vivo</i>	101



4.3.	Die flankierenden Aspartate sind notwendig für die vollständige Aktivität von PS	102
4.4.	Weitere Signale in Prosystemin kompensieren die Systemin-induzierte Abwehr	106
4.5.	Das Sekretionssignal von Systemin liegt nicht im Peptidhormon ...	108
4.6.	Die Phytaspase-Spaltstellen sind notwendig für die Prozessierung von PS <i>in planta</i> und Systemin ist nicht das einzige wundinduzierende Signal in PS	112
4.7.	Schlussfolgerung und Ausblick	115
5.	Literatur	117
6.	Anhang	135
7.	Danksagung	139
8.	Eidesstattliche Erklärung	141
9.	Lebenslauf	143



Tabellen

Tabelle 2.1: Eingesetzte Antibiotika.	19
Tabelle 2.2: Systemin-Peptide und Derivate.	21
Tabelle 2.3: Oligonukleotide für den Nachweis der cDNA von PI-II und Ef1 α via qRT-PCR.	21
Tabelle 2.4: Oligonukleotide für den Nachweis von Prosystemin gDNA.	22
Tabelle 2.5: Oligonukleotide für die Deletionskonstrukte mit GFP.	22
Tabelle 2.6: Oligonukleotide für Sys- und DMSys- Δ Prosystemin-GFP.	22
Tabelle 2.7: Oligonukleotide für die Deletionskonstrukte mit OPR1.	23
Tabelle 2.8: Oligonukleotide für die reverse Transkriptase Reaktion.	23

Abbildungen

Abb. 1.1: Ein „Zick-Zack“-Modell veranschaulicht den quantitativen „Ausstoß“ des pflanzlichen Immunsystems.	4
Abb. 1.2: Die Aminosäuresequenz von Prosystemin.	9
Abb. 1.3: Primärstruktur von Systemin und Prosystemin. Schematische Darstellung des 200-Aminosäure Prosystemin Vorläuferproteins. .	10
Abb. 1.4: Die Jasmonatbiosynthese.	13
Abb. 1.5: Struktur der Pro-Phytaspase aus Tabak und das reife Enzym.	17
Abb. 2.1: PS-Konstrukte für die Expression in <i>E. coli</i>	24
Abb. 2.2: PS-Konstrukte für die Expression in <i>N. benthamiana</i> und <i>S. lycopersicum</i>	25
Abb. 2.3: PS-Deletionskonstrukte mit GFP für die Expression in <i>N. benthamiana</i>	25
Abb. 2.4: Sys-Konstrukte ohne PS für die Expression in <i>N. benthamiana</i>	26
Abb. 2.5: PS-Deletionskonstrukte mit OPR1 für die Expression in <i>N. benthamiana</i>	27



Abb. 2.6: PS-Deletionskonstrukte ohne Systemin für die Expression in <i>E. coli</i>	28
Abb. 2.7: Die Phytaspasen <i>S/Phyt-1</i> und -2 für die Expression in <i>N. benthamiana</i>	28
Abb. 2.8: Schematischer Aufbau der Western-Blot Apparatur.	46
Abb. 3.1: Schematische Darstellung von wildtypischem (WT) PS und seiner Doppelmutante (DM).	58
Abb. 3.2: Aufreinigung verschiedener PS-His Fusionsproteine durch Ni-NTA Chromatografie.	59
Abb. 3.3: Expression und apoplastische Extraktion von <i>S/Phyt-1</i> und -2 sowie Spaltung von PS-GFP Fusionsproteinen <i>in vitro</i>	61
Abb. 3.4: Massenspektrometrische Identifizierung der N-terminalen Spaltstelle von Prosystemin durch <i>S/Phyt-1</i> and <i>S/Phyt-2 in vitro</i> mittels NanoLC-ESI-MS/MS Analyse.	63
Abb. 3.5: MALDI-ToF-ToF-MS Analyse von L-Systemin als Spaltprodukt von Prosystemin durch <i>S/Phyt-1</i> and <i>S/Phyt-2</i>	65
Abb. 3.6: Identifizierung der C-terminalen Spaltstelle und von L-Systemin als Spaltprodukt von Prosystemin durch <i>S/Phyt-1</i> and <i>S/Phyt-2</i> mittels NanoLC-ESI-MS/MS Analyse.	67
Abb. 3.7: Koexpression von <i>S/Phyt-1/2</i> mit WT- bzw. DM-PS-GFP und Aufreinigung des C-terminalen Spaltprodukts über GFP- Immunopräzipitation.	69
Abb. 3.8: Keine Spaltung von mutiertem PS nach Ko-Expression von <i>S/Phyt-1/2</i> mit DM-PS-GFP.	71
Abb. 3.9: Identifikation der C-terminalen Spaltstelle von PS nach Ko- Expression von <i>S/Phyt-2</i> mit WT-PS-GFP.	72
Abb. 3.10: Die aspartat-spezifische Prozessierung von Prosystemin (PS) wird für die Systemin-induzierte Wundantwort benötigt.	75



Abb. 3.11: L-Systemin ist weniger aktiv als Systemin.....	78
Abb. 3.12: Die Spezifität des C-terminalen Aminosäurerests und der spaltbaren C-terminalen Verlängerung für die Systemin Aktivität.80	
Abb. 3.13: <i>S</i> Phyt-1-überexprimierende oder <i>S</i> Phyt-1/2-defiziente Tomatenpflanzen sind in ihrer Reaktion auf PS unverändert.	83
Abb. 3.14: Systemin ist das alleinige wundinduzierende Signal in PS und notwendig für die Aktivierung der Wundantwort.....	86
Abb. 3.15: Schematische Darstellung der PS-Deletionskonstrukte, zum Nachweis der Prozessierung und Lokalisation <i>in planta</i>	88
Abb. 3.16: Immunospezifische Detektion der PS-Deletionskonstrukte mit GFP nach transienter Expression in Tabak.....	89
Abb. 3.17: Immunospezifische Detektion der PS-Deletionskonstrukte mit OPR1 nach transienter Expression in Tabak.	91
Abb. 3.18: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der PS-EGFP Überexpression in Wurzeln von jungen Tomatenpflanzen.	93
Abb. 3.19: Die Spaltung von PS an den Phytaspase-Spaltstellen wird für die Wundsignalweiterleitung benötigt.....	95
Abb. 3.20: Lokale und systemische Induktion von PI-II nach Verwundung in WT- und DM-PS-EGFP überexprimierenden Pflanzen im zeitlichen Verlauf.....	97
Abb. 4.1: Das Verhältnis von Struktur zu Aktivität synthetischer Systemin Fragmente.	104
Abb. 4.2: Aktivitätsreduktion bzw.-verlust durch Aminosäuresubstitutionen innerhalb von Systemin.	105
Abb. 4.3: Sekretionswege in Pflanzen.....	110



Abb. A 1: MALDI-TOF-MS Analyse der Spaltprodukte von WT-PS-GFP, die durch <i>S/Phyt-1</i> und <i>S/Phyt-2</i> prozessiert wurden.	135
Abb. A 2: MALDI-TOF-MS Analyse der Spaltprodukte von DM-PS-GFP, die durch <i>S/Phyt-1</i> und <i>S/Phyt-2</i> prozessiert wurden.	136
Abb. A 3: Lokale und systemische Induktion von PI-II nach Verwundung in WT- und DM-PS-EGFP überexprimierenden Pflanzen im zeitlichen Verlauf.	137



Abkürzungsverzeichnis

Anti-Flag	Monoklonaler anti-Flag® M2-Peroxidase IgG Antikörper
AOC	Alleneoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
AS	Aminosäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BRI1	brassinosteroid insensitive 1
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CT	threshold cycle
DM	Doppelmutante
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC50	half-maximal effective concentration
ECL	enhanced chemiluminiscence
EF1 α	elongation factor 1 α
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ETI	effector-triggered immunity
EtOH	Ethanol
ETS	effector-triggered susceptibility
EXPO	exocyst-positive organelle
GLV	green leaf volatiles
Glu-C	Glutamyl-Endopeptidase
GFP	green fluorescent protein
HIPV	herbivore-induced plant volatiles
HP	hairpin
HR	hypersensitive response



HRP	horse radish peroxidase
IDP	intrinsically disordered protein
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	induced resistance
JA	jasmonic acid
JAI1	jasmonic acid-insensitive 1
JAZ	jasmonate zim domain
kb	kilo base
LapA	leucine aminopeptidase A
lac	lactose
LB	lysogeny broth
LC-MS/MS	liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
LOX	Lipoxygenase
MAMP	microbe-associated molecular pattern
MeOH	Methanol
Mio	Millionen
MS	Massenspektrometrie
MVB	multivesicular body
MWCO	molecular weight cut-off
NB-LRR	nucleotide-binding leucine-rich repeat
OD	Optische Dichte
OPDA	12-oxophytodienoic acid
OPR1	12-oxophytodienoate reductase 1
OPR3	12-oxophytodienoate reductase 3
ORF	open reading frame
OX	overexpressor



PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCR	polymerase chain reaction
Phyt	phytaspase
PI-II	Proteinase inhibitor II
PLA2	Phospholipase A2
PR	pathogenesis-related
PRI	plant resistance inducers
PRR	pattern recognition receptors
PS	Prosystemin
PTI	PAMP-triggered immunity
RALF1	rapid alkalization factor 1
RNAi	RNA-Interferenz
qRT-PCR	quantitative polymerase chain reaction
Rcf	relative centrifugation forces
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur, reverse transcription
SA	salicylic acid
SAR	systemic acquired resistance
SDS	sodium dodecyl sulfate
<i>Sl</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
Sys	Systemin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TMV	Tobacco Mosaic Virus
U	unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp



X-Gal

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

UPS

unconventional protein secretion



Summary

Systemin, a key player in the activation of defense responses against herbivorous insects, was identified in 1991 as the very first peptide hormone in plants. Like most peptide hormones in plants and animals, it is synthesized as a larger precursor protein called prosystemin. The release of peptide hormones including systemin, is thought to occur via limited proteolysis of the precursor proteins. The proteases involved in this process are still completely unknown in plants, although there is evidence for the involvement of serine proteases from the subtilase family. Since the mature systemin peptide is flanked by aspartates (D) within prosystemin, the protease responsible for cleavage is likely specific for aspartate. Phytaspase, a plant aspartate-specific protease, was recently described in tobacco and rice. Phytaspase was purified from tomato leaves and shown to specifically cleave aspartates in prosystemin. A mutated form of prosystemin, in which the two aspartates were substituted with alanine, could not be cleaved, rendering the tomato plant unable to induce markers of the wound response. These findings led to a working hypothesis that phytaspases are involved in the prosystemin processing and thus wound signal transduction in tomatoes. Using mass spectrometry, the identity of the purified tomato phytaspase could be narrowed down to two of the 82 subtilases in tomato, SBT139 (SI04g078740) and SBT461 (SI12g088760), also known as *S*Phyt-1 and -2. The newly identified tomato phytaspases hydrolyzed prosystemin at two aspartate residues flanking the systemin peptide. Site-directed mutagenesis of the phytaspase cleavage sites in prosystemin abrogated not only the phytaspase-mediated processing of the prohormone *in vitro*, but also the ability of prosystemin to trigger the local and systemic wound responses *in vivo*. The peptide released from prosystemin contained an additional leucine at the N-terminus of the systemin peptide, making it significantly less potent in inducing the wound response. This corroborates the role of a leucine aminopeptidase in prosystemin processing during the maturation of systemin. Together with the wound response-induced exopeptidase LapA, phytaspases



are believed to be responsible for aspartate-specific processing at the N-terminus of systemin. Proper processing at the C-terminus was found to be equally essential, though the C-terminal amino acid had little effect on activity. The secretion signal of the mature systemin peptide in apoplasts is located in the precursor rather than in systemin itself. Successive truncations of prosystemin showed secretion of the C-terminus of prosystemin and of two reporter proteins, respectively. However, at least one repetitive element was necessary to ensure successful secretion of systemin in apoplasts, a smaller systemin-reporter fusion protein was not secreted. Mutation of the predicted phytaspase cleavage sites had no effect on secretions. Unlike systemin, the precursor prosystemin and successively truncated derivatives that did not contain systemin did not have pH-inducing.

Wounding of transgenic tomato plants overexpressing prosystemin, suggested that there must be further wound-inducing signals in prosystemin, as wound signaling was also triggered by a mutated form of prosystemin. The results show that prosystemin requires processing for signal biogenesis and biological activity. The identification of phytaspases as the proteases involved in prosystemin maturation provides insight into the mechanisms of wound signal transduction in tomatoes.



Zusammenfassung

Systemin, welches maßgeblich an der Aktivierung von Abwehrreaktionen insbesondere gegen herbivore Insekten beteiligt ist, wurde 1991 als erstes Peptidhormon in Pflanzen identifiziert. Wie die meisten Peptidhormone in Pflanzen und Tieren auch, wird es in Form eines größeren Vorläuferproteins synthetisiert, das als Prosystemin bezeichnet wird. Die Freisetzung von Peptidhormonen und auch Systemin erfolgt sehr wahrscheinlich durch limitierte Proteolyse der Vorläuferproteine. Die dafür erforderlichen Proteasen sind in Pflanzen noch gänzlich unbekannt, allerdings gibt es Hinweise auf die Beteiligung von Serinproteasen aus der Subtilasefamilie. Da die Systeminsequenz innerhalb des Vorläufers Prosystemin durch Aspartat (D) flankiert wird, wird für die prozessierende Protease eine entsprechende Spezifität erwartet. Mit der Phytaspase (plant aspartate-specific protease) wurde kürzlich eine solche Protease in Tabak und Reis beschrieben. Diese Aktivität wurde aus Tomatenblättern gereinigt und die D-spezifische Spaltung von Prosystemin nachgewiesen. Prosystemin-Varianten, in denen die beiden Ds durch Alanin ersetzt worden waren, konnten nicht mehr prozessiert werden und waren auch nicht mehr in der Lage, Marker der Wundreaktion in Tomaten zu induzieren. Diese Befunde führten zu der Arbeitshypothese, nach der Phytaspen an der Prozessierung von Prosystemin und damit an der Wundsignaltransduktion in Tomate beteiligt sind. Massenspektrometrisch konnte die Identität der gereinigten Tomatenphytaspase auf zwei der 82 Subtilasen in Tomate eingegrenzt werden, SBT139 (SI04g078740) und SBT461 (SI12g088760), auch als *S*Phyt-1 und -2 bezeichnet. Die neu identifizierten Phytaspen hydrolysierten Prosystemin an zwei Aspartatresten, die die Systeminsequenz flankieren. Zielgerichtete Mutagenese der Phytaspase-Spaltstellen in Prosystemin verhinderte nicht nur die Phytaspase-vermittelte Prozessierung des Prohormons *in vitro*, sondern auch die Fähigkeit von Prosystemin, die lokale und systemische Wundantwort *in vivo* auszulösen. Das Peptid, welches freigesetzt wurde, war Systemin mit einem zusätzlichen Leucin am N-Terminus und es war wesentlich inaktiver bei der Induktion der



Wundantwort. Dies bekräftigt die Rolle einer Leucin-Aminopeptidase im Verlauf der PS-Prozessierung, um das biologisch aktive Peptidhormon Systemin zu erhalten. Auf Grundlage mehrerer Beweise ist davon auszugehen, dass die Phytaspasen mithilfe der wundinduzierten Exopeptidase LapA für die aspartatspezifische Prozessierung am N-Terminus von Systemin verantwortlich sind. Eine korrekte Prozessierung am C-Terminus zeigte sich als genauso essentiell, wohingegen die terminale Aminosäure nur einen geringen Einfluß auf die Aktivität hatte. Das Signal für die Sekretion des reifen Peptidhormons Systemin in den Apoplasten befindet sich im Vorläufer und nicht in Systemin selbst. Sukzessiv deletierte Prosysteminproteine zeigten eine Sekretion des C-Terminus von Prosystemin bzw. der beiden Reporterproteine. Mindestens ein repetitives Element war allerdings notwendig, um eine erfolgreiche Sekretion von Systemin in den Apoplasten zu gewährleisten, wohingegen Systemin alleine, gekoppelt an ein Reporterprotein, zu keiner Sekretion führte. Eine Mutation der vorhergesagten Phytaspase-Spaltstellen hatte keinen Einfluß auf den Sekretionsvorgang. Der Vorläufer PS und seine sukzessiv verkürzten Derivate ohne Systemin hatten keine pH-induzierende Aktivität wie Systemin.

Nach Verwundung von transgenen Tomatenpflanzen, die PS überexprimieren zeigte sich aber, dass es noch weitere wundinduzierende Signale in Prosystemin geben muss, da auch bei der mutierten Form von Prosystemin eine spezifische Wundinduktion ausgelöst wurde. Die Daten zeigen, dass das Prohormon Prosystemin die Prozessierung für die Signalbiogenese und die biologische Aktivität benötigt. Die Identifikation der Phytaspasen als die gesuchten Proteasen, die in die Prosystemin Reifung involviert sind, liefert einen tiefen Einblick in den Mechanismus der Wundsignaltransduktion in der Tomate.





Einleitung

1.1. Verteidigungsmechanismen von Pflanzen

1.1.1. Die konstitutive Pflanzenabwehr

Die Ansiedlung von Pflanzen auf dem Land reicht bis zum mittleren Ordovizium (476-432 Mio. Jahren) zurück, als die ersten Sportetraden weite Gebiete bedeckten (Kenrick and Crane, 1997). Als sessile Organismen waren und sind Pflanzen sehr anfällig für Bedrohungen, jedoch kam es zu einer rasanten Entwicklung und Verbreitung und schon bald waren sie die vorherrschende Lebensform auf der Landoberfläche mit der größten Biomasse.

Damit stellt sich die Frage nach ihren Überlebensstrategien und Abwehrmechanismen (Howe and Schaller, 2008), die schon intensiv untersucht wurden, aber immer noch sehr viel Raum für Spekulationen bieten. Wegen ihrer sessilen Lebensweise entwickelten Pflanzen im Laufe der Evolution eine Vielzahl an effektiven Strategien, um sich gegen biotische und abiotische Stressformen zu verteidigen (Perez-Clemente et al., 2013). Da Pflanzen auch schon seit einigen Millionen Jahren mit ihren Fraßfeinden kompetitieren, führte dies zur Ausbildung komplexer Abwehrstrategien (Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

Den äußersten Schutzwall bilden mechanische Barrieren, die alle Pflanzenoberflächen einschließen. Die äußere Rinde, Dornen, Stacheln und Trichome sind nur einige Beispiele, die zeigen, dass Pflanzen sich wie eine Festung gegen Bedrohungen abkapseln (Horsfall and Cowling, 1980). Die Kutikula, die Epidermis, der Wurzelcortex, Zellulose, Hemizellulose, Lignin und die äußeren Membranen dienen zusätzlich nicht nur der mechanischen Stabilität, sondern sind auch sehr effektiv gegen biotische und abiotische Gefahren. Dies ist ein primärer Schutz gegen den Befall von herbivoren Fraßfeinden (Ryan 2000), aber auch gegen andere Pathogene wie Pilze, Viren



Einleitung

und Bakterien, die das Pflanzenwachstum behindern, die Entwicklung verändern und die Samenproduktion reduzieren (Brown and Tellier, 2011). Weiterhin wurde auch schon früh erkannt, dass Pflanzen sekundäre chemische Abwehrsubstanzen (Sekundärmetaboliten) und Proteine besitzen, die repellent auf Frassfeinde wirken (Thorsteinson et al., 1953). Hierbei wird differenziert zwischen konstitutiven (konstanten) und induzierbaren (regulierbaren) Pflanzenabwehrstoffen (Howe and Schaller, 2008). Die konstitutive Verteidigung wirkt vorbeugend, auch ohne Interaktion mit Frassfeinden, und es sind das Alter, die Lichtverhältnisse und andere Umweltfaktoren, die Einfluß auf die chemische Zusammensetzung von Pflanzen nehmen (Ehrlich and Raven, 1964). Diese Verteidigungsmechanismen müssen nicht erst durch bestimmte Faktoren wie Fraß oder Beschädigung aktiviert werden, sondern sie wurden durch Selektion und Ko-Evolution (Ehrlich und Raven, 1964; Brown und Tellier, 2011; War et al., 2012) präventiv bei der Pflanze ausgebildet. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei Terpenoide und Alkaloide, die toxisch auf Pathogene und herbivore Frassfeinde, aber auch auf Säugetiere wirken können (Gershenzon, 1994; Wittstock and Gershenzon, 2002). Terpenoide kommen in allen Pflanzen vor und repräsentieren die größte Klasse an Sekundärmetaboliten mit über 22,000 beschriebenen Verbindungen. Dazu gehört beispielsweise das Gossypol der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*), das starke antifungale und antibakterielle Eigenschaften besitzt (Freeman and Beattie, 2008). Trichome spielen bei der konstitutiven Abwehr eine wesentliche Rolle, da sie ein breites Spektrum dieser spezialisierten Sekundärmetaboliten produzieren und speichern, welche toxische oder repellente Effekte gegen Pathogene ausüben (Agren et al., 2008). Tatsächlich scheinen sie auch die Hauptproduktionsstätte von Terpenoiden auf kultivierten Tomaten zu sein (Schillmiller et al., 2009; Kang et al., 2010). Alkaloide sind eine weitere Klasse bitter-schmeckender, stickstoffhaltiger Verbindungen, die in vielen Pflanzen identifiziert wurden (Freeman and Beattie, 2008). Ein gut bekanntes Beispiel aus der Familie der *Solanaceae* ist der Tabak, welcher das für Insekten toxische Alkaloid Nikotin konstitutiv produziert. Wohlwissend, dass Nikotin in der Wurzel produziert wird, wurden schon Mitte der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts



Einleitung

Experimente durchgeführt, bei denen Kartoffelpflanzen auf die Wurzel von Tabakpflanzen aufgepfropft wurden. Diese Pflanzen waren nun vollständig resistent gegen Kartoffelkäfer, da das Nikotin aus der Wurzel in sämtliche Gewebe transportiert wurde (Fraenkel, 1959).

Chemische Abwehrstoffe wurden aufgrund der aufwendigen Biosynthese und ihrer Toxizität lange für kostspielig gehalten (Wittstock and Gershenzon, 2002). Dies bestätigt sich durch die Behauptung, dass Pflanzen, die aufgrund fehlender Feinde einem weniger kontinuierlichen Selektionsdruck ausgesetzt sind, eine ausgeprägtere induzierbare Abwehr besitzen (Wittstock and Gershenzon, 2002), und dass bestimmte abwehrbezogene Metabolite ausschließlich in Geweben vorhanden sind, die von Pathogenen und Frassfeinden attackiert werden (Hrazdina et al., 1982).

Die Pflanzenabwehr wird durch eine Reihe von Signaltransduktionswegen reguliert und kontrolliert. Diese sind auch Bestandteil der induzierten Abwehr, die erst durch Pathogenbefall oder Insektenfraß aktiviert werden muss (Howe and Schaller, 2008).

1.1.2. Die induzierte Pflanzenabwehr

Ein Weg für die Pflanze die kostspielige konstitutive Synthese von Abwehrkomponenten zu reduzieren ist, die Synthese erst nach Beginn durch Schäden von Herbivoren oder Pathogenen zu starten (Wittstock und Gershenzon, 2002). Im Gegensatz zu konstitutiven Verteidigungsmechanismen entstehen bei der sogenannten induzierbaren Abwehr keine Fitnesskosten, wenn kein Befall durch Schädlinge vorliegt (Purrington, 2000). Die induzierte Pflanzenabwehr steigert allerdings die Fitness, wenn die Pflanzen einer Vielzahl an Schädlingen ausgesetzt sind (Howe and Schaller, 2008).

Die erste Stufe der induzierten Pflanzenabwehr ist die Basalabwehr, auch angeborene Immunität genannt und sie findet am Ort des Befalls (lokal) statt (Sequeira, 1983). Sie ist zuständig, um die Pflanze gegen zahlreiche Gruppen von Pathogenen zu schützen und wird durch die Erkennung von

Pathogen/Mikroben-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs/MAMPs) induziert, welche zur PAMP-ausgelösten Immunität (PTI; PAMP-triggered immunity) führt (Jones and Dangl, 2006). Dabei dienen spezifische Proteine, Lipopolysaccharide und Zellwandbestandteile, welche häufig in mikrobiellen Organismen gefunden werden, als Botenstoffe oder Elicitoren. Sowohl Pathogene, wie auch Nicht-Pathogene, sind aufgrund der weiten Verbreitung dieser Bestandteile in der Lage die PTI auszulösen (Freeman and Beattie, 2008). Das wohl bekannteste Beispiel ist bakterielles Flagellin, welches die Abwehr in zahlreichen Pflanzen auslöst (Gomez-Gomez and Boller, 2002). Pathogene haben allerdings Mechanismen entwickelt, um die basale Antwort in bestimmten Pflanzen durch Effektoren zu unterdrücken, welche auch als Effektor-ausgelöste Empfindlichkeit (ETS, Effector-triggered susceptibility) bezeichnet wird (Jones and Dangl, 2006). Wenn die Pflanze allerdings die Effektoren spezifisch durch NB-LRR Proteine erkennt, antwortet sie mit einem weiteren Verteidigungsmechanismus, der Effektor-ausgelösten Immunität (ETI; Effector-triggered immunity), auf welchen gewöhnlich die hypersensitive Antwort (HR; hypersensitive response) folgt (Jones and Dangl, 2006) (Abb. 1.1).

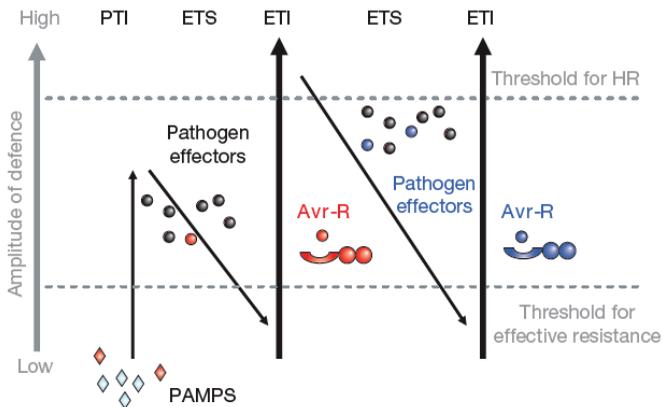


Abbildung 1.1: Ein „Zick-Zack“-Modell veranschaulicht den quantitativen „Ausstoß“ des pflanzlichen Immunsystems.

In diesem Modell ist die äußerste Amplitude der Krankheitsresistenz oder -empfindlichkeit proportional zu [PTI-ETS+ETI]. In Phase eins nimmt die Pflanze „microbial/pathogen-



Einleitung

associated molecular patterns (MAMPs/PAMPs, rote Diamanten)“ über „Pattern recognition receptors (PRRs)“ wahr, um die „PAMP-triggered immunity (PTI) auszulösen. In Phase zwei übermitteln Pathogene nach erfolgreicher Infektion Effektoren, die die PTI beeinträchtigen oder die Pathogenernährung und -ausbreitung ermöglichen, welche in der „Effector triggered susceptibility (ETS)“ resultiert. In Phase drei wird ein Effektor durch ein „NB-LRR“ Protein erkannt (rot dargestellt), welcher die „Effector triggered immunity (ETI)“ aktiviert. Dies ist eine verstärkte Version der PTI, die oft eine Feuerschwelle überschreiten muss um die „Hypersensitive response (HR)“ zu induzieren. In Phase vier werden Pathogenisolate selektiert, welche den roten Effektor verloren und möglicherweise neue Effektoren durch horizontalen Gentransfer erhalten haben (blau). Diese können Pathogenen helfen, die ETI zu unterdrücken. Selektion bevorzugt neue „NB-LRR“ Allele der Pflanze, die einen der neu erworbenen Effektoren erkennen können, was wiederum in der ETI endet (verändert nach Jones and Dangl, 2006).

Ein Charakteristikum der hypersensitiven Antwort ist der programmierte Zelltod an der Infektionsstelle, der durch die Perzeption von Effektormolekülen des Pathogens in Gang gesetzt wird (Greenberg, 1997; Heath, 2000). Dies löst eine Antwort auch in distalem Gewebe der Infektionsstelle (systemisch) aus, die als systemisch-erworbene Resistenz (SAR) bezeichnet wird (Sequeira, 1983). Sie ist das Resultat von Folgeinfektionen mit dem gleichen Pathogen und in manchen Fällen folgt die SAR direkt auf die lokale Antwort (Sequeira, 1983).

Das bekannteste Molekül als Auslöser der SAR ist das Pflanzenhormon Salicylsäure (SA) (Metraux et al., 1990; Pieterse et al., 2009; Gozzo and Faoro, 2013).

Sowohl lokal bei der Basalabwehr, wie auch systemisch in distalem Gewebe, durch die SAR, folgt die Induktion der Synthese von Abwehrproteinen, antimikrobiellen Sekundärmetaboliten (Phytoalexinen) und weiterer endogener Substanzen, die der Pflanzenabwehr dienen (Sequeira, 1983).

Bei der induzierten Antwort gegen herbivore Fraßfeinde spielen z.B. volatile Substanzen (HIPVs, herbivore-induced plant volatiles) eine wichtige Rolle, die die natürlichen karnivoren Fraßfeinde der Herbivoren anlocken (Arimura et al., 2009). Zu ihnen gehören volatile Terpene und Volatile aus grünen Blättern (GLVs, green leaf volatiles), deren Induktion durch Herbivorie



ausgelöst wird (Arimura et al., 2009). Jasmonsäure, ihre Vorläufer und nahverwandte Komponenten aktivieren hier bestimmte Genbereiche, die zur Induktion von Abwehrgenen führen, welche z.B. diese Terpenoidsynthese ankurbeln (Ament et al., 2004; Arimura et al., 2009). Bei Solanaceen werden aber auch Abwehrproteine, wie Proteinaseinhibitoren, die Enzyme im Verdauungstrakt von Herbivoren hemmen, induziert (Green and Ryan, 1972; Pearce et al., 1991; McGurl et al., 1992; McGurl et al., 1994).

Mechanische Verwundung, sowie chemische Bestandteile aus dem Speichel der Insekten lösen diese Reaktion aus (Green and Ryan, 1972; McGurl et al., 1992; Arimura et al., 2009).

Pflanzen sind daher in der Lage, Bedrohungen zu differenzieren (Fürstenberg-Hägg et al., 2013); dies zeigt, dass sowohl die konstitutive, wie auch die induzierte Abwehr zu einem optimalen Schutz der Pflanze gegen eine Vielzahl von herbivoren und mikrobiellen Feinden beitragen (Wittstock und Gershenzon, 2002).

1.2. **Die Pflanzenabwehr in der Tomate und die Entdeckung von Systemin**

Wie auch bei allen anderen Pflanzen befindet sich der primäre Schutz der Tomate gegen Fraßfeinde auf ihrer Oberfläche. Als erste Barriere der konstitutiven Abwehr dienen Trichome. Diese Differenzierungen der Epidermis fungieren als spezialisierte Strukturen gegen Pathogene und Herbivore und können außerordentlich in Form und Größe variieren (Kang et al., 2010; Tissier, 2012). Auf den Blättern und dem Stiel der Tomate befinden sich vier Haupttypen von glandulären Trichomen, die der Abwehr dienen. Typ 1 und 2, die sehr ähnlich sind und Acylzucker synthetisieren, Typ 3, der häufigste Typ, welcher unter anderem Terpene und Methylketone einlagert und Typ 4, der auch antifungale Phylloplatine produziert (Chatzivasileiadis and Sabelis, 1997; Shepherd et al., 2005; Schillmiller et al., 2009; McDowell et al., 2011; Li et al., 2014; Bergau et al., 2015).



Einleitung

Weiterhin reagieren Tomaten, wie alle anderen höheren Pflanzen auch, auf Insektenangriffe und Verwundung durch die Aktivierung von molekularen Abwehrmechanismen. Die Genexpression, die zuständig für Abwehrmaßnahmen und Regenerationsprozesse ist, wird verändert (Sun et al., 2011). Bei der gesamten Familie der Solanaceae ist zwar bekannt, dass durch eine Behandlung mit Auslösern der Pflanzenresistenz (PRI, plant resistance inducers) zahlreiche Abwehrmechanismen aktiviert werden, allerdings sind die Gene, welche in die induzierte Resistenz (IR) involviert sind größtenteils unbekannt (Alexandersson et al., 2016).

Green und Ryan zeigten 1972 (Green and Ryan, 1972), dass die Reaktion auf Verwundung durch herbivore Insekten, aber auch mechanische Verwundung, in Solanaceen, wie Tomate und Kartoffel, zur Synthese und Akkumulation von Proteinen führt, die schädlich für das Insekt sind. Sie fanden heraus, dass es lokal an der Verwundungsstelle zur Anreicherung eines Proteins, dem Proteinase Inhibitor I, führt. Dieser gut charakterisierte Inhibitor tierischer Endopeptidasen wie Trypsin und Chymotrypsin kommt sowohl in Kartoffeln, wie auch in Tomaten vor und wirkt effektiv im Verdauungstrakt von Herbivoren. Die Tatsache, dass es auch in distalem Gewebe, wie Speicherorganen, zur Anreicherung dieses Proteins kommt, führte zu der Annahme, dass es ein Signal in der Pflanze geben muss, das Proteinaseinhibitoren induziert (Green and Ryan, 1972). Auf der Suche nach dem systemischen Signal standen zuerst Zellwandbestandteile im Verdacht, dies konnte aber schnell widerlegt werden (Baydoun and Fry, 1985). Daraufhin zeigten Pearce et al. 1991, dass ein 18-Aminosäure langes Polypeptid, das aus Tomatenblättern isoliert wurde, zu einer Induktion und Akkumulation von Proteinaseinhibitoren führt. Auch das synthetisch produzierte identische Peptid löste diese Antwort aus. Da es auch aufgrund der Phloemmobilität in distalem Gewebe eine Akkumulation von Proteinaseinhibitoren auslöste und zunächst vermutet wurde, dass es das lang gesuchte systemische Signal ist, wurde es Systemin genannt (Pearce et al., 1991). Systemin war somit das allererste Peptidhormon, das in Pflanzen identifiziert wurde (Pearce et al., 1991). Heute ist bekannt, dass es eine essentielle Rolle in der Wundreaktion von Solanaceen spielt, die nach Befall



durch herbivore Insekten antinutritive Proteinaseinhibitoren akkumulieren, was eine induzierte Resistenz der Pflanze zur Folge hat (Green and Ryan, 1972; Pearce et al., 1991; McGurl et al., 1992; McGurl et al., 1994).

1.3. Die Rolle von Systemin bei der Wundantwort

Wie die Forschung der letzten Jahre zeigte spielen neben den klassischen Phytohormonen auch Peptide als Botenstoffe für die Koordinierung zellulärer Funktionen und die Zell-Zell-Kommunikation eine wichtige Rolle (Murphy et al., 2012). So übernehmen Peptidhormone wichtige Funktionen in der Kontrolle von Pflanzenwachstum und -entwicklung, die von der Regulation der Zellteilung und Meristemerhaltung über die zelluläre Differenzierung und Organentwicklung bis zur Unterscheidung von Selbst/Nicht-Selbst reichen (Boller, 2005; Matsubayashi and Sakagami, 2006; Katsir et al., 2011).

Auf der Suche nach dem Ursprung von Systemin wurde eine cDNA-Bank aus Tomatenblättern gesichtet und das korrespondierende Gen identifiziert (McGurl and Ryan, 1992). Das aus 10 Introns und 11 Exons bestehende Gen wurde komplett sequenziert und es stellte sich heraus, dass der offene Leserahmen, aus 600 Basenpaaren bestehend, für ein 200-Aminosäure langes Protein codiert, dem Vorläufer Prosystemin (McGurl et al., 1992; McGurl and Ryan, 1992). Prosystemin enthält einen hohen Prozentsatz an geladenen Aminosäuren und ist deshalb sehr hydrophil. Die Primärstruktur von Prosystemin entstand vermutlich durch mehrere Gen-Duplikationsereignisse, wohingegen die Systemin Sequenz in seinem Vorläufer einzigartig ist (McGurl et al., 1992; McGurl and Ryan, 1992). Die ersten zehn Exons von PS sind paarweise organisiert und das letzte Exon, das sich von allen anderen völlig unterscheidet, codiert für Systemin. Die Nukleotidsequenz jedes Exonpaars ist homolog zu allen anderen. Wenn man nun den Vorläufer PS näher betrachtet, fällt auf, dass er deshalb aus zahlreichen, sich wiederholenden Elementen aufgebaut ist, die alle zwischen sechs und neun Aminosäuren lang sind (McGurl et al., 1992) (Abb. 1.3). Die Funktion der repetitiven Elemente in PS wurde aber bisher noch nicht geklärt und auch bei anderen Proteinen werfen



Einleitung

diese Strukturen noch viele Fragen auf (Katti et al., 2000; Andrade et al., 2001).

```
MGTPSYDIKNKGDDMQEFPKVKLHH  
EKGGDEKEKIIEKETPSQDINNKDT  
ISSYVLRDDTQEIPKMEHEEGGYVK  
EKIVEKETISQYIIKIEGDDDAQEK  
LKVEYEEEEYEKEKIVEKETPSQDI  
NNKGDDAQEKPKVEHEEGDDKETPS  
QDIIKMEGEGALEITKVVCEKIIVR  
EDLAVQSKPPSKRDPPKMQTDNNKL
```

Abbildung 1.2: Die Aminosäuresequenz von Prosystemin.

Die Systeminsequenz wird kursiv dargestellt. Jedes der fünf repetitiven Elemente der Polypeptidsequenz ist dick hervorgehoben (verändert nach McGurl et al., 1992).

In Prosystemin sind die 18 Aminosäuren des Systeminpeptids (Aminosäuren 179-196) nahe des C-Terminus lokalisiert. Wie Peptidhormone in tierischen Systemen werden auch die meisten pflanzlichen Peptidhormone als Vorläuferproteine synthetisiert, die im Laufe ihrer Reifung posttranslational modifiziert werden (Matsubayashi, 2011-b). Unter den posttranslationalen Modifikationen von Prohormonen finden sich neben der Ausbildung von Disulfidbrücken, Prolinhydroxylierungen, Glykosylierungen, Tyrosinsulfatierungen, vor allem auch proteolytische Prozessierungen (Matsubayashi, 2011-a, -b; Murphy et al., 2012). Proteolytische Prozessierungen sind auch für die Freisetzung von Systemin erforderlich (Pearce et al., 1991). Es wird angenommen, dass Systemin in Folge einer Verwundung durch limitierte Proteolyse aus dem Vorläufer freigesetzt wird (Abb. 1.2) (Schaller and Ryan, 1995).

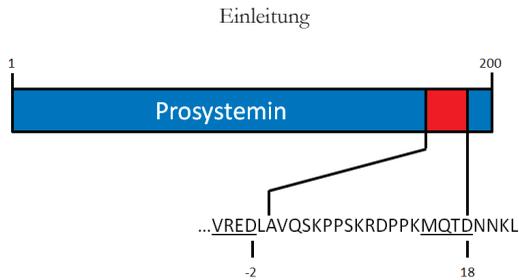


Abbildung 1.3: Primärstruktur von Systemin und Prosystemin. Schematische Darstellung des 200-Aminosäure Prosystemin Vorläuferproteins.

Die 18-Aminosäure Systemin Sequenz ist nahe des C-Terminus lokalisiert und rot dargestellt. Potentielle Erkennungsmotive für Reifungsenzyme sind unterstrichen. Potentielle Spaltstellen sind die Aspartate D-2 und D18 (verändert nach Schaller and Ryan, 1995).

Es ist aber durchaus möglich, dass noch weitere Polypeptide aus dem Vorläufer freigesetzt werden können, wie dies bei tierischen Prohormonen der Fall ist, auch McGurl und Ryan stellen diese Vermutung auf (McGurl and Ryan, 1992). Die Prosystemin RNA wurde in Tomatenpflanzen in allen Geweben, außer der Wurzel, identifiziert (McGurl et al., 1992) und es scheint so, als ob Prosystemin hauptsächlich in den Blütenorganen akkumuliert (Aviles-Arnaut and Delano-Frier, 2012). In *Arabidopsis* konnte heterolog gezeigt werden, dass eine sproß- und wurzelspezifische Expression von PS zu einer bidirektionalen Translokation der mRNA führt. Dies wurde auch durch Pfropfungsexperimente bestätigt (Zhang et al., 2017; Zhang and Hu, 2017). Ein Homolog von Prosystemin konnte auch bei einem nahen Verwandten der Tomate, der Kartoffel (*Solanum tuberosum*), nachgewiesen werden, wohingegen bei entfernteren Verwandten wie Tabak, Luzerne und *Arabidopsis* keines gefunden wurde (McGurl et al., 1992).

Zunächst wurde vermutet, dass es sich bei Systemin um das systemische Signal handelt, das über das vaskuläre Gewebe in distales transportiert wird und dort die Wundantwort induziert (Pearce et al., 1991; Narvaez-Vasquez and Pearce, 1995; Schaller and Ryan, 1995; Ryan, 2000). Es konnte jedoch bald gezeigt werden, dass Jasmonsäure oder ihre Derivate dafür verantwortlich sind, und dass Systemin nur lokal an der Verwundungsstelle



wirkt, um dort die Induktion der systemischen Abwehr zu verstärken (Ryan and Moura, 2002; Blee, 2002; Schillmiller and Howe, 2005). Im Jahr 1999 wurde eine 160-kDa Rezeptor kinase auf der Oberfläche von *L. peruvianum* Suspensionszellen als möglicher Systemin Rezeptor identifiziert (Scheer and Ryan, 1999), der in der Folge wieder in Frage gestellt wurde. In der Tat wurde kürzlich eine als SYRI bezeichnete Rezeptor kinase als der lang gesuchte Systemin-Rezeptor identifiziert (Wang et al., 2018). Weiterhin ist bekannt, dass es nach Rezeptorbindung von Systemin zu einer Membrandepolarisation kommt, die durch eine Änderung des Ionenflusses ausgelöst wird. Dies führt zu einer sehr schnellen Alkalinisierung des Apoplasten, der Induktion der Phenylalanin Ammonium-Lyase Aktivität und der Ethylenproduktion, sowie zu einem erhöhten Calciumspiegel im Cytoplasma (Felix and Boller, 1995; Schaller and Oecking, 1999; Schaller and Frasson, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Volllänge Systemin (Aminosäure 1-18) sowohl Bindungs- wie auch stimulierende Aktivität zeigte, wohingegen ein verkürztes Systeminpeptid (Aminosäure 1-14) antagonistisch wirkte und der C-Terminus (Aminosäure 15-18) keine Aktivität zeigte, was zu dem Schluss führte, dass es einen Zwei-Schritt Mechanismus der Wirkung von Systemin geben muss (Meindl et al., 1998). Zunächst bindet der N-terminale Teil an den Rezeptor, daraufhin findet die Aktivierung der Antwort durch den C-terminalen Teil statt (Meindl et al., 1998). Zusätzlich spielt die Konformation von Systemin sehr wahrscheinlich eine wesentliche Rolle bei der Bindungsaffinität. *In silico* Analysen der Systeminsequenz zeigten, dass die zwei Regionen, welche Diprolin-Segmente aufwiesen, tendenziell eine Polyprolin II Struktur annehmen (Chowdhury et al., 2016). Eine Substitution an Prolin 12 und 13 führt deshalb zu einem Bindungsverlust, da die Konformationsflexibilität verloren geht (Chowdhury et al., 2016). Auch das Threonin an Stelle 17 hat einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität, da eine Substitution an dieser Stelle zu einem Aktivitätsverlust führt. Chowdhury et al. stellten 2016 die Hypothese auf, dass dies möglicherweise auf den Wegfall einer bisher nicht nachgewiesenen Phosphorylierung zurückzuführen ist (Chowdhury et al., 2016).



Einleitung

Die Verwundung von Tomatenpflanzen an den Blättern führt zur lokalen aber nicht zur systemischen Induktion von Genen des Octadecanoidwegs, einer Signalkaskade, und lokal zu einem starken Anstieg des Jasmonsäure-Spiegels. Beides steht im Zusammenhang mit der Systemin-induzierten Wundantwort (Strassner et al., 2002; Schaller and Stintzi, 2008). Die Induktion von Abwehrgenen in systemischen Geweben hängt weiterhin von der Jasmonsäureperzeption und -signalweiterleitung und nicht von der Synthese der Jasmonsäure ab (Schaller and Stintzi, 2008). Ein Widerspruch zu den Ergebnissen von Ryan im Jahre 2000, der einen Transport von Systemin über die Siebzellelemente in distales Gewebe zeigte, wo erst dort eine Induktion der Jasmonsäure stattfand. Dies führt zu der Annahme, dass die Bindung von Systemin an seinen Rezeptor nur in Zellen der Verwundungsstelle oder benachbarten Zellen stattfindet. Allerdings befinden sich PS und die Enzyme des Octadecanoidsignalwegs in unterschiedlichen Zelltypen des Leitbündels, was den Verdacht erhärtet, dass Systemin nach Verwundung aus den Phloem Parenchymzellen freigesetzt und auf der Zelloberfläche der benachbarten Geleitzellen erkannt wird (Schaller and Stintzi, 2008). Die Membrandepolarisation (Schaller and Oecking, 1999) und möglicherweise andere Faktoren führen dann zur Aktivierung einer Lipase (PLA2), welche die Linolensäure (18:3) aus Plastidenmembranen freisetzt. Sie dient als Ausgangsstoff des lipidbasierten Octadecanoidwegs (Abb. 1.3) an dessen Ende es zur Bildung der Jasmonsäure (JA) kommt.

Einleitung

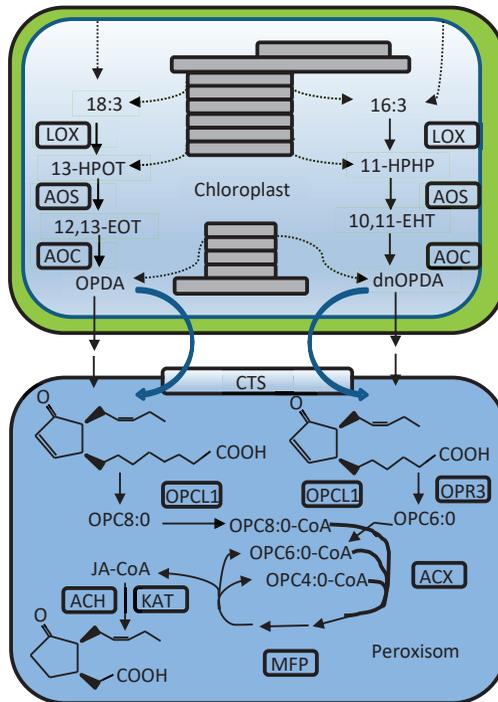


Abbildung 1.4: Die Jasmonatbiosynthese.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (18:3 und 16:3) werden durch das aufeinanderfolgende Wirken der plastidlokalisierten Lipoxygenase (LOX), der Allenoxidsynthese (AOS) und der Allenoxicyclase (AOC) zu OPDA und dnOPDA umgewandelt. In den Peroxisomen wird die Jasmonsäure durch die Oxophytodiennatreduktase 3 (OPR 3) gefolgt von drei Zyklen der β -Oxidation gebildet. Gestrichelte Pfeile zeigen die Lipase-vermittelte Freisetzung der Signalwegsubstrate und –zwischenprodukte aus den Membranen des Chloroplasts, was teilweise noch hypothetisch ist (verändert nach Schaller und Stützi, 2009).

Weiterhin kommt es zur Bildung des Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugats (JA-Ile). Diese Reaktion wird durch die Aminosäurekonjugatsynthetase JAR1 katalysiert (Staswick et al., 2002). Die Jasmonsäure und ihre Derivate sind für



die Abwehrgenexpression gegen Pathogene und Insekten verantwortlich (Farmer and Ryan, 1990; McConn et al., 1997; Turner et al., 2002) und diese systemischen Signale der Wundantwort werden für den Transport in distales Gewebe in die Siebzellelemente freigesetzt (Schaller and Stintzi, 2008).

1.4. Reifung von Peptidhormonen

Trotz ihrer Bedeutung für die Peptidhormonreifung sind Proteasen, die für die Freisetzung von Systemin und anderer pflanzlicher Peptidsignalmoleküle verantwortlich sind, bislang weitgehend unbekannt. In der tierphysiologischen Forschung lag eine vergleichsweise ähnliche Situation vor. Nach jahrelangen Bemühungen konnte das Mysterium der Prohormon- und Proprotein-prozessierenden Enzyme endlich aufgedeckt werden (Barr, 1991). Dibasische Sequenzmotive spielen hierbei eine entscheidende Rolle, da sie, im Vergleich zu mono-, tri-, tetra- und pentabasischen, am häufigsten auftreten und vor allem in sekretierten Proteinen und Peptidhormonvorläufern, wie Proinsulin, zu finden sind (Barr, 1991). In der Folge wurde für die prozessierenden Proteasen eine ausgeprägte Spezifität für dibasische Sequenzmotive vorhergesagt. Als erste Protease mit der vorhergesagten Spaltspezifität wurde Kexin (kex2p) in einem einzelligen Eukaryoten, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, identifiziert (Fuller et al., 1988). Kexin ist an der Prozessierung des α -Faktors und des Killertoxins durch Spaltung der Pro-Proteine an den dibasischen Stellen beteiligt (Fuller et al., 1988). Basierend auf dieser Entdeckung wurde die Identifikation von homologen Enzymen in Säugetieren vorangetrieben. Es folgte die Identifizierung von Pro-Protein Konvertasen, zu denen auch die Kexine in Säugetieren gehören, welche sich als die langgesuchten dibasisch-prozessierenden Endoproteasen herausstellten, (Barr, 1991; Schaller et al. 2017).

Diese Erkenntnis bei tierischen Zellen führte zu der Annahme, dass verwandte Proteasen auch für die Peptidhormonprozessierung in Pflanzen verantwortlich sein könnten. Pflanzliche Peptidhormonvorläufer besitzen jedoch keine dibasischen Sequenzmotive an ihren Spaltstellen (Matsubayashi,



2011-b). Außerdem gibt es in Pflanzen keine Kexine und auch sonst keine unmittelbaren Verwandten der tierischen Pro-Protein Konvertasen (Schaller et al. 2017). Die Pro-Protein Konvertasen gehören zu den Serinproteasen, genauer gesagt zur größten Familie, die der Subtilasen (S8). Serinproteasen sind die abundantesten Proteasen in Pflanzen (Schaller et al., 2017) und die Subtilasen werden durch ihre katalytische Triade, bestehend aus Aspartat-, Histidin- und Serin-Resten, charakterisiert (Smith et al., 1966). In der MEROPS Datenbank (Rawlings et al., 2010) werden zwei Unterfamilien unterschieden. Die S8A-Unterfamilie mit Subtilisin aus *Bacillus licheniformis*, dem Namensgeber der Subtilasen und die S8B-Unterfamilie mit den Pro-Protein Konvertasen, wie Kexin aus *S. cerevisiae*. Alle pflanzlichen Subtilasen gehören wie Subtilisin zur S8A-Unterfamilie (Schaller et al., 2017).

Aufgrund ihrer engen Verwandtschaft zu nicht-selektiven bakteriellen Subtilisinen (Schaller et al., 2017) schien eine Beteiligung der pflanzlichen Subtilasen an hochspezifischen Peptidhormonprozessierungen zunächst unwahrscheinlich. Eine der ersten aufgereinigten Subtilasen, Cucumisin aus der Melone (*Cucumis melo*), zeigte dementsprechend eine geringe Selektivität, aber eine hohe Prozessierungsrate (Kaneda and Tominaga, 1975). Diese Eigenschaften sprachen tendenziell für den unselektiven Proteinabbau.

Hinsichtlich der enormen Größe der Subtilase Genfamilie in Pflanzen (z.B. 56 Gene in *Arabidopsis* (Rautengarten et al., 2005) und mindestens 82 Gene in Tomate (Reichardt and Schaller, unpublished)) ist es jedoch unwahrscheinlich, dass diese ausschließlich für die Proteindegradierung zuständig sind.

Evolutionäre Gründe, wie der Erwerb neuer, pflanzenspezifischer Funktionen sprechen eher dafür, dass es zu einer Ausdehnung der Subtilase Genfamilie durch Adaption gekommen ist (Rose et al., 2010; Schaller et al., 2017; Taylor and Qiu, 2017). Diverse genetische Befunde in verschiedenen Pflanzen untermauern, dass sich verändernde Umweltbedingungen, neue Abwehrfunktionen und der Erwerb neuer spezifischer Funktionen in der Pflanzenentwicklung einen Einfluss darauf haben (Berger and Altmann, 2000; Tanaka et al., 2001; D'Erfurth et al., 2012; Meyer et al., 2016; Figueiredo et al., 2017). Mittlerweile gibt es aber auch zahlreiche Belege dafür, dass pflanzliche Subtilasen eine hohe Substratspezifität haben, die für die spezifische

Prozessierung von Vorläuferproteinen durch limitierte Proteolyse zu erwarten ist (Boyd et al., 2002; Coffeen and Wolpert, 2004; Cedzich et al., 2009; Srivastava et al., 2009; Chichkova et al., 2010; Meyer et al., 2016; Schardon et al., 2016; Ghorbani et al., 2016; Stegmann et al., 2017) und aktuelle Forschungen zeigen, dass die funktionelle Charakterisierung von Subtilasen schon weit vorangeschritten, aber noch nicht abgeschlossen ist (Schaller et al., 2017).

Sind also Mitglieder der pflanzlichen Subtilase-Familie auch an der Peptidhormonreifung und der Freisetzung von Systemin aus seinem Vorläufer beteiligt? Wenn das so wäre, dann müsste für diese Subtilasen eine Spezifität für die jeweiligen Spaltstellen angenommen werden. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen verschiedener Peptidhormonvorläufer untereinander (Matsubayashi, 2011-a, -b) stellt man fest, dass saure Reste, insbesondere Aspartat (Asp, D), mit großer Häufigkeit in unmittelbarer Nähe oder direkt an den vorhergesagten Spaltstellen auftreten. Auch die Systeminsequenz wird von Aspartaten in seinem Vorläufer Prosystemin, an den Positionen D-2 und D18, flankiert (Abb. 1.2). Eine Spaltung an diesen Aspartaten würde aber L-Systemin, zwar mit korrekter Prozessierung des C-Terminus, aber mit einer zusätzlichen Aminosäure am N-Terminus und nicht Systemin freisetzen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass L-Systemin das Spaltprodukt ist und, dass das zusätzliche Leucin in einem letzten Schritt der Systeminreifung entfernt wird. Vergleichbar mit der in tierischen Systemen vorhergesagten dibasischen Spezifität, die schlussendlich zur Identifizierung der Proprotein Konvertasen in Säugetieren führte, muss daher für die Protease(n), die für die Prozessierung von Prosystemin und möglicherweise anderer Peptidhormonvorläufer verantwortlich sind, eine Aspartat-Spezifität angenommen werden.

1.5. **Phytaspasen (plant-aspartate specific proteases)**

Der programmierte Zelltod (Programmed cell death, PCD) in tierischen Systemen wird ausschlaggebend durch Aspartat-spezifische Proteolyse

gesteuert. Die gut erforschten Caspasen sind hier sowohl für die Initiierung als auch für die Ausführung des PCD durch Asp-spezifische Proteolyse verantwortlich (Kerr et al., 1972; Black et al., 1989; Thornberry and Lazebnik, 1998). Da Caspasen eine Schlüsselrolle in der Ausführung des PCD bei tierischen Organismen spielen, wurde nach Orthologen in Pflanzen gesucht. Es konnten allerdings keine identifiziert werden. Daher blieb die Identität der beteiligten pflanzlichen Proteasen lange schleierhaft (Bonneau et al., 2008). Es wurde aber dennoch eine Protease in Tabak und Reis identifiziert, die typische Caspase-Substrate spezifisch nach Aspartat hydrolysiert und die demnach als Phytaspase (kurz für plant asp-specific protease, Abb. 1.6) bezeichnet wurde (Chichkova et al., 2004).

Überraschenderweise stellte es sich heraus, dass die Phytaspase nicht wie die Caspasen zu den Cysteinproteasen gehört, sondern eine Serinprotease innerhalb der Subtilase-Familie ist (Chichkova et al., 2010). Bei der Phytaspase handelt es sich um ein sekretiertes, extrazelluläres Protein, dessen physiologischen Wirkung gegenwärtig unbekannt ist (Chichkova et al., 2010; Chichkova et al., 2012; Vartapetian et al., 2011).

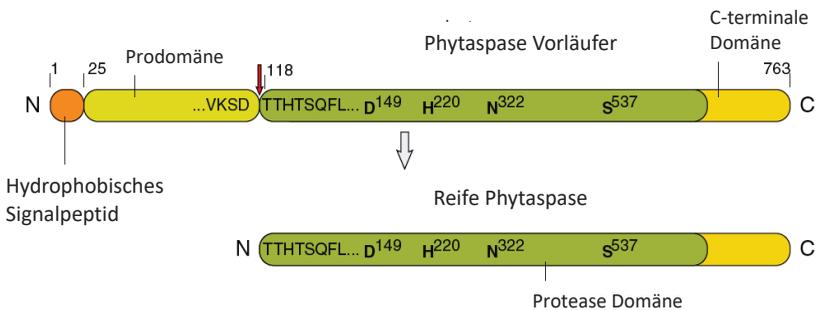


Abbildung 1.5: Struktur der Pro-Phytaspase aus Tabak und das reife Enzym.

D149, H220 und Ser537 bilden die kanonische, katalytische Triade der Subtilisin-ähnlichen Proteasen. Die autokatalytische Prozessierung des Proenzym beinhaltet die Abspaltung der Prodomäne, was nach D117 geschieht (roter Pfeil) (Verändert nach Chichkova et al., 2012).



Auf der Suche nach möglichen Substraten unter den in Abwehrreaktionen implizierten Peptidhormonvorläufern wurde auch die Prosysteminsequenz analysiert. Dabei zeigte sich, dass sich unmittelbar vor den Reifungsstellen die Sequenzmotive VRED und MQTD befinden, die stark den Motiven VEID und TATD ähneln, die von Vartapetian und Mitarbeitern als Phytaspase-Substrate identifiziert worden waren (Beloshistov et al., 2017). Auf diesen Beobachtungen gründet sich die Arbeitshypothese, wonach die Phytaspase in Tomate nicht nur am PCD beteiligt ist, sondern eine zusätzliche Rolle in der Peptidhormonprozessierung und in der Wundsignaltransduktion spielt.

1.6. Ziel der Arbeit

Die Spaltung von Prosystemin an den Aspartaten D-2 und D18 durch eine aus Tomatenblättern aufgereinigte Phytaspase-Aktivität ist bereits gezeigt worden (Beloshistov et al., 2017). Die massenspektrometrische Identifizierung führte zu zwei möglichen Proteinen aus der Familie der Subtilasen, SBT139 (SI104g078740) und SBT461 (SI12g088760), die im weiteren Kontext als *S*Phyt-1 und -2 bezeichnet werden. Diese Befunde führten zu der Arbeitshypothese, nach der Phytaspen an der Prozessierung von Prosystemin und damit an der Wundsignaltransduktion in Tomate beteiligt sind.

Im Rahmen der geplanten Arbeit soll die Funktion dieser beiden Subtilasen im Hinblick auf die Spaltung von Prosystemin *in vitro* und *in vivo*, die Aktivierung des Wundsignals, und eine mögliche Beteiligung des Vorläufers bei der Sekretion des Peptidsignalmoleküls untersucht werden. Weiterhin soll geklärt werden, ob Systemin das einzige wundinduzierende Signal in Prosystemin ist, oder ob es noch weitere gibt. Mit den geplanten Arbeiten soll die seit 20 Jahren ungeklärte Frage nach der Prozessierung von Prosystemin geklärt und die beteiligten Proteasen identifiziert werden. Es wird erwartet, dass Befunde wesentlich zu einem besseren Verständnis der Wundreaktion und Insektenresistenz in Pflanzen beitragen werden.



2. Material und Methoden

2.1. Material

2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

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

2.2.1. Antibiotika

Tabelle 2.1: Eingesetzte Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration und Lösungsmittel
Carbenicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{dd}
Chloramphenicol	34 mg/ml in 70% (v/v) Ethanol
Gentamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{dd}
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{dd}
Rifampicin	50 mg/ml in DMSO
Spectinomycin	100 mg/ml in H ₂ O _{dd}
Tetracyclin	12,5 mg/ml in 70% (v/v) Ethanol

2.2.2. Medien

LB Medium:

LB Broth 20 g/l, für feste Medien zusätzlich 1,2 % (w/v) Agar

Nover-Medium für Zellsuspensionskulturen:

3 % Saccharose, 4,41 g/l MS-Salts (Murashige & Skoog + Nitsch Vitamine, Duchefa), 0,34 g/l KH₂PO₄; 500µl/l Naphtylessigsäure (10 mg/ml in EtOH); 50 µl/l N-Benzyladenin (40 mg/ml in 2N KOH); pH mit KOH auf 5,5 einstellen.



MS Medium für die Selektion transgener WT/DM PS EGFP Pflanzen:

4,4 g/l MS+Vitamine (Murashige & Skoog, Duchefa), 30 g Saccharose, 6,5 g/l Agar, 50 mg/l Kanamycin, pH mit KOH auf 5,5 einstellen

SOC Medium:

20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 6,8

2.2.3. Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Alle Enzyme wurden nach den Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Puffern verwendet

2.2.4. Antikörper

Anti-rabbit IgG Peroxidase konjugiert (Calbiochem, Darmstadt/Schwalbach)

Anti-GFP, rabbit polyklonaler Antikörper unkonjugiert (Invitrogen, Karlsruhe)

Anti Prosystemin Antiserum rabbit 2.Blutung (Vetsch et al., 1999)

Anti-FLAG, mouse monoklonaler Antikörper, Peroxidase konjugiert (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Anti OPR1 Antiserum (Seraing, Belgien)

2.2.5. Peptide

Tabelle 2.2: Systemin-Peptide und Derivate.

Systemin (AVQSKPPSKRDPPKMQTD) Reinheit: >95 % (Pepmic Co., Ltd, Suzhou, China)
L-Systemin (LAVQSKPPSKRDPPKMQTD) Reinheit: >95 % (Genosphere Biotech, Paris, France)
Systemin (A18) (AVQSKPPSKRDPPKMQTA) Reinheit: >95 % (Pepmic Co., Ltd, Suzhou, China)
Systemin (E18) (AVQSKPPSKRDPPKMQTE) Reinheit: >95 % (Pepmic Co., Ltd, Suzhou, China)
SysteminNNKL (AVQSKPPSKRDPPKMQTDNNKL) Reinheit: >95 % (Pepmic Co., Ltd, Suzhou, China)
SysteminN(Me)NKL (AVQSKPPSKRDPPKMQTDN(Me)NNKL) Reinheit: >95 % (Pepmic Co., Ltd, Suzhou, China)

2.2.6. Oligonukleotide für die Genotypisierung und Klonierung

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma eurofins mwg/operon (Ebersberg) bezogen, die Random Hexamer Primer von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot).

Tabelle 2.3: Oligonukleotide für den Nachweis der cDNA von PI-II und Efl α via qRT-PCR.

Bezeichnung	Sequenz
SLPI2-161	5'-GGATATGCCACGTTTCAGAAGGAA-3'
SLPI2-418R	5'-AATAGCAACCCCTTGTACCCTGTGC-3'
1ToEF1aqRTfw	5'-AGCCCATGGTTGTTGAGACCTTTG-3'
1ToEF1aqRTrv	5'-TTCGAAAACACCAGCATCACACTGC-3'

**Tabelle 2.4: Oligonukleotide für den Nachweis von Prosystemin gDNA.**

Bezeichnung	Sequenz
Prosys-193	5'-AAGATGGAACATGAGGAGGGAGGA-3'
Prosys-334 R	5'-CATCTCCTTCCTCATGTTCACCT-3'

Tabelle 2.5: Oligonukleotide für die Deletionskonstrukte mit GFP.

Bezeichnung	Sequenz
PS600-NcoFLAG	5'-ccCCATGGGACTACAAGGATGATG ACGACAAAGGCACGCCGAGCTATGAT-3'
PS482/242-NcoFLAG	5'-ccCCATGGGACTACAAGGATGATG ACGACAAAACCTCCATCCCAAGATATC-3'
PS353-NcoFLAG	5'-ccCCATGGGACTACAAGGATGATG ACGACAAAACCTATATCCCAATATAATCATC-3'
PS158-NcoFLAG	5'-ccCCATGGGACTACAAGGATGATG ACGACAAAACCTCCATCACAAGATATCATC-3'
PS3-NotR	5'-TGGCGGCCGCGAGTTTATTATTGT CTTGTTTGC-3'

Tabelle 2.6: Oligonukleotide für Sys- und DMSys-ΔProsystemin-GFP.

Bezeichnung	Sequenz
Sys-NcoFLAG	5'-ccCCATGGACTACAAGGATGATGA CGACAAAGTACGAGAAGATCTTGCT-3'
DmSys-NcoFLAG	5'-ccCCATGGACTACAAGGATGATGA CGACAAAGTACGAGAAGCGCTTGCT-3'
GFP-NcoR	5'-ccCCATGGAACAGGCAGTTTGCCA GTAGTGCAGATGAACTTCAGGGT-3'

Tabelle 2.7: Oligonukleotide für die Deletionskonstrukte mit OPR1.

Bezeichnung	Sequenz
PS600-OPR1-XhoI	5'-ccCTCGAGATGGGCACGCCGAG CTATGATATCAAAAAACAAA- 3'
PS482-OPR1-XhoI	5'-ccCTCGAGATGACTCCATCCCAA GATATCAACAACAAAGAT- 3'
PS353-OPR1-XhoI	5'-ccCTCGAGATGACTATATCCCAA TATATCATCAAGATTGAA- 3'
PS242-OPR1-XhoI	5'-ccCTCGAGATGACTCCATCCCAA GATATCAACAACAAAGGA- 3'
PS158-OPR1-XhoI	5'-ccCTCGAGATGACTCCATCACAA GATATCATCAAGATGGAA- 3'
PS-OPR1-innen	5'- AAAATGCAAACAGACAATAATAA ACTCATGGAAAACGGAGAAGCAAAA - 3'
PS-OPR1-innen-R	5'-TTTTGCTTCTCCGTTTTCCATGAG TTTATTATTGTCTGTTTGCATTTT- 3'
PS3-OPR1-HindIII	5'-GGAAGCTTTTAAGCTGTTGATTCG AGGAAAAGGGTAATCGGT- 3'

Tabelle 2.8: Oligonukleotide für die reverse Transkriptase Reaktion.

Bezeichnung	Sequenz
Random Hexamer Primer	5'-d(NNNNNN) -3' N=G, A, T oder C
Oligo (I) ₁₈₅ jeweils in der gleichen Konzentration	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTA -3'
	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTG -3'
	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTC -3'

2.2.7. Vektoren, Plasmide und Konstrukte

Um die Plasmide zu vervielfältigen wurden diese in den *E. coli* Stamm DH10B (Invitrogen) transformiert. Für die Expression in *E. coli* wurde der *E. coli* Stamm BL21+RIL (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Für die Expression

in *N. benthamiana* wurde der Bakterienstamm GV3101 oder C58C1 (Hamilton et al., 1971) verwendet.

Zunächst wurden die Konstrukte in pCR 2.1-TOPO® (Invitrogen, Darmstadt) kloniert, um für eine weitere Klonierung und Bestätigung über Sequenzierung eine hohe Plasmidvervielfältigung zu erhalten.

Für die Expression von PS in *E. coli* wurde der Vektor pET-33b (+) (Novagen, Darmstadt) verwendet. Als primärer Klonierungsvektor für die transiente Expression in *N. benthamiana* wurde pART7 (Gleave, 1992), als Expressionsvektor pART27 (Gleave, 1992) und pGreen0029 (Hellens et al., 2000) verwendet.

Für eine stabile Transformation von Tomatenpflanzen wurde der binäre Vektor pLH7000 (Hausmann und Töpfer, 1999) verwendet. Die im Rahmen der Arbeit erstellten bzw. verwendeten Expressionskonstrukte sind in den Abbildungen 2.1 bis 2.7 dargestellt.

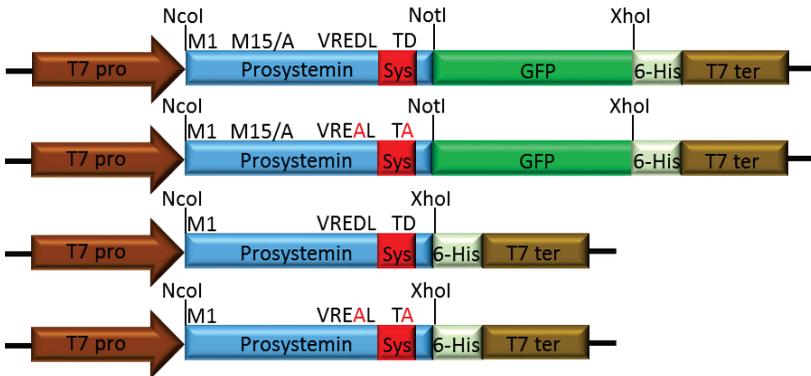


Abbildung 2.1: PS-Konstrukte für die Expression in *E. coli*

Die Konstrukte wurden von Prof. Vartapetian (Moscow State University) im Vektor pET-33b (+) (Novagen) zur Verfügung gestellt und in *E. coli* (DH10B, Invitrogen) transformiert und die Plasmide vervielfältigt. Anschließend wurden die Plasmide in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 RIL (Stratagene) transformiert, der für die Expression der PS-Proteine verwendet wurde (Masterarbeit Konrad Dreizler, 2012).

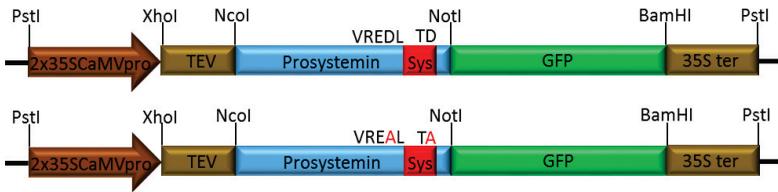


Abbildung 2.2: PS-Konstrukte für die Expression in *N. benthamiana* und *S. lycopersicum*.

Die Konstrukte wurden im Vektor pRTL2 von Prof. Vartapetian (Moscow State University) zur Verfügung gestellt und in den Vektor pLH7000delta überführt. Über PstI wurden sie vom Vektor pLH7000delta in den Vektor pGreen0029 kloniert und in *A. tumefaciens* GV3101+pSoup transformiert (Jutta Babo). Sie dienten entweder für die stabile Transformation von *S. lycopersicum* (Jutta Babo) oder für die transiente Expression in *N. benthamiana*.



Abbildung 2.3: PS-Deletionskonstrukte mit GFP für die Expression in *N. benthamiana*.

Als Matrize diente WT PS GFP im Vektor pGreen0029 in *E. coli* (DH10B) (Abb. 2.2 oben). Die Deletionskonstrukte PS158-GFP (1), PS242-GFP (2), PS 353-GFP (3), PS482-GFP (4) und PS600-GFP (5) wurden mittels PCR mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 2.3 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit NcoI/NotI wieder in den Ausgangsvektor pGreen0029 kloniert, um dort PS zwischen NcoI/NotI zu ersetzen. Die Konstrukte wurden in *E. coli* (DH10B) transformiert und die richtige Sequenz bestätigt. Danach konnten sie für die Expression in *N. benthamiana* in den *A. tumefaciens* Stamm GV3101+pSoup transformiert werden.

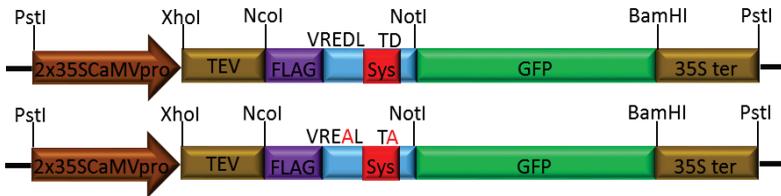


Abbildung 2.4: Sys-Konstrukte ohne PS für die Expression in *N. benthamiana*.

Als Matrize diente WT PS GFP im Vektor pGreen0029 in *E. coli* (DH10B). Die Konstrukte Sys Δ Prosys-GFP (Abb. 2.4 oben) bzw. DMSys Δ Prosys-GFP (Abb. 2.4 unten) wurden mittels PCR mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 2.4 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden wieder mit *NcoI/NotI* in den Ausgangsvektor kloniert, aus dem PS zwischen *NcoI/NotI* herausgeschnitten wurde. Die Konstrukte wurden in *E. coli* (DH10B) transformiert und die richtige Sequenz bestätigt. Danach konnten sie für die Expression in *N. benthamiana* in den *A. tumefaciens* Stamm GV3101+pSoup transformiert werden.

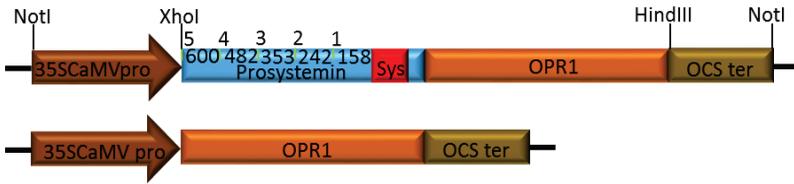


Abbildung 2.5: PS-Deletionskonstrukte mit OPR1 für die Expression in *N. benthamiana*.

Die Konstrukte wurden mit einer Overlap-Extension-PCR (Higuchi et al., 1988) erstellt. Dafür werden je Konstrukt drei PCRs benötigt. In den ersten beiden PCRs werden jeweils mit den flankierenden und den mutagenen Oligonukleotiden zwei Fragmente erstellt, die sich überlappen. In einer dritten PCR werden diese beiden Fragmente mit den beiden flankierenden Oligonukleotiden verknüpft. Als Matrizen dienten 1. PS600-GFP im Vektor pGreen0029 in *E. coli* (DH10B) und 2. 35S-OPR1 im Vektor TOPO (Abb. 2.5 unten). Die Deletionskonstrukte PS158-OPR1 (1), PS242-OPR1 (2), PS353-OPR1 (3), PS482-OPR1 (4) und PS600-OPR1 (5) wurden mittels PCR mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 2.5 amplifiziert. Hierzu wurde zunächst der N-terminale Teil mit den Oligonukleotiden PS158-OPR1-XhoI, PS242-OPR1-XhoI, PS353-OPR1-XhoI, PS482-OPR1-XhoI, PS600-OPR1-XhoI und PS-OPR1-innen-R aus Matrize 1., dann der C-terminale Teil mit den Oligonukleotiden PS-OPR1-innen und PS3-OPR1-HindIII aus Matrize 2. amplifiziert. Da die PCR-Produkte nun einen überlappenden Teil mit PS, wie auch mit OPR1 hatten, konnten sie mit einer weiteren PCR mit den flankierenden Oligonukleotiden verknüpft werden. Die Konstrukte wurden anschließend in den Vektor pCR 2.1-TOPO® kloniert, in *E. coli* (DH10B) transformiert und vervielfältigt. Nachdem sie aus pCR 2.1-TOPO® ausgeschnitten wurden, konnten sie mit *XhoI/HindIII* in den Vektor pART7 kloniert, wiederum in *E. coli* (DH10B) transformiert und vervielfältigt werden. In einem letzten Schritt wurden sie mit *NotI* aus pART7 mit Promoter und Terminator ausgeschnitten, in den Expressionsvektor pART27 kloniert und wiederum in *E. coli* (DH10B) transformiert und vervielfältigt. Die fertigen Konstrukte konnten nun in *A. tumefaciens*, Stamm C58C1, transformiert und für die Expression in *N. benthamiana* infiltriert werden.

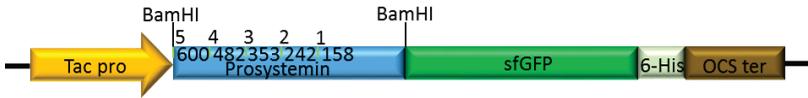


Abbildung 2.6: PS-Deletionskonstrukte ohne Systemin für die Expression in *E. coli*. Die Deletionskonstrukte PS158 Δ Sys-sfGFP (1), PS242 Δ Sys-sfGFP (2), PS 353 Δ Sys-sfGFP (3), PS482 Δ Sys-sfGFP (4) und PS600 Δ Sys-sfGFP (5) wurden von Andre Jorzick kloniert, in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt (Masterarbeit Andre Jorzick, 2015). Anschließend wurden sie für die Alkalinisierungsversuche verwendet.

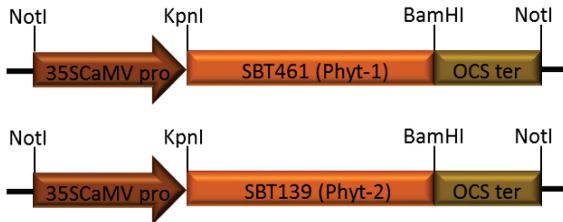


Abbildung 2.7: Die Phytaspasen *S/Phyt-1* und -2 für die Expression in *N. benthamiana*.

Die Phytaspasen *S/Phyt-1* und -2 wurden von Sven Reichardt kloniert und in *A. tumefaciens*, Stamm C58C1, im Vektor pART27 zur Verfügung gestellt (Masterarbeit Sven Reichardt, 2012). Sie wurden für transiente Expression in *N. benthamiana* verwendet.

2.3. Organismen

2.3.1. Bakterienstämme

- E. coli* DH10 B mit WT-PS15 und DM PS15 (#2400/#2403)
- E. coli* DH10B mit WT-PS-GFP und DM-PS-GFP (#2434/#2435)
- E. coli* DH10B mit PS3, PS 118, PS 247, PS 358 und PS 442 (alle ohne Systemin + GFP) (#3863/#3864/#3865/#3866/#3867)
- E. coli* DH10B (mit PS158, PS 242, PS 353, PS 482, PS 600 (alle mit Systemin + GFP) (#3074/#3075/#3076/#3077/#3078)

- E. coli* DH10B mit SysΔProslys-GFP und DMSysΔProslys-GFP (#3447/#3436)
- E. coli* DH10B mit PS 158, PS 242, PS 353, PS 482, PS 600 (alle mit Systemin + OPR1) (#4519/#4639/#4640/#4641/#4642)
- E. coli* BL21 + RIL mit WT-PS15 und DM-PS15 (#2715/#2578)
- E. coli* BL21 + RIL mit WT-PS-GFP und DM-PS-GFP (#2574/#2575)
- E. coli* BL21 + RIL mit PS3, PS 118, PS 247, PS 358 und PS 442 (alle ohne Systemin + GFP) (#3868/#3869/#3870/#3871/#3872)
- A. tumefaciens* GV3101 mit WT-PS-GFP und DM-PS-GFP (#2436/#2437)
- A. tumefaciens* GV3101 mit SysΔProslys-GFP und DMSysΔProslys-GFP (#3444/#3443)
- A. tumefaciens* GV3101 mit PS158, PS 242, PS 353, PS 482, PS 600 (alle mit Systemin + GFP) (#3099/#3100/#3101/#3102/#3103)
- A. tumefaciens* C58C1 mit PS 158, PS 242, PS 353, PS 482, PS 600 (alle mit Systemin + OPR1) (#4553/#4711/#4712/#4713/#4714)
- A. tumefaciens* C58C1 mit *S*Phyt-1 und *S*Phyt-2 (#2602/#2693)

2.3.2. Versuchspflanzen

Solanum lycopersicum

Die WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP überexprimierenden Tomatenpflanzen (T_0 , Parentalgeneration) wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit erstellt. Die Konstrukte wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Andrey Vartapetian (Belozersky Institute of Physico Chemical Biology, Moscow State University) im Vektor pRTL2 zur Verfügung gestellt. Sie wurden dann über den Vektor pLH7000delta in den Transformationsvektor pGreen0029 transferiert und mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in die Tomatenpflanzen im UC82b Hintergrund eingebracht (Babo und Schaller, unveröffentlicht).

Die *S*Phyt-1 überexprimierenden und *S*Phyt-1/-2 defizienten Pflanzen wurden von Sven Reichardt erstellt.

Weitere Tomatenpflanzen: *S. lycopersicum* UC82b Wildtyp



Nicotiana benthamiana

Die Samen der verwendeten Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) wurden von Agrosience GmbH (Neustadt) bezogen.

2.3.3. *Solanum peruvianum* Zellkultur

Die Zellsuspensionskultur wurde aus Tomaten Kallus des Wildtyps (*Solanum peruvianum*) angelegt und von Prof. Georg Felix, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Kultur wurde in 50 ml Nover Medium bei 120 rpm und 26 °C angezogen. 1/10 des Kulturvolumens wurde wöchentlich in frisches Medium überführt (Ursula Glück-Behrens). Für die Alkalinisierungsversuche wurde die Kultur innerhalb von 7 Tagen eingesetzt.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. DNA-/Plasmid-Isolation (Mini-Präparation) aus *E. coli*

Eine Bakterieneinzelkolonie wurde über Nacht in 2 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C und 225 upm im Orbitalschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde von dieser Vorkultur 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien 2 min bei 16 000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Sediment in 100µl Mini-Präp. Lösung I (50 ml H₂O; 25 mM Tris/HCl, pH 7.5; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA pH: 8) resuspendiert. Die Zellyse erfolgte mit 150 µl Mini-Präp. Lösung II (0,2 N NaOH; 1% SDS) und der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl Mini-Präp. Lösung III (3 M Kalium Acetat; 100 ml: 60 ml 5 M Kaliumacetat; 11,5 ml Eisessig; 28,5 ml H₂O), kurzes Invertieren und eine fünfminütige Inkubationszeit auf Eis fielen Proteine und genomische DNA aus. Diese wurden anschließend für 10 min bei 4 °C und 16000 x g sedimentiert und der erhaltene Überstand mit der Plasmid-DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zugabe des zweifachen Volumens an 99 % (v/v) EtOH, 15 min Inkubation auf Eis



und 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 16 000 x g. Das so erhaltene DNA-Präzipitat, das die Plasmid-DNA, aber keine chromosomale DNA enthält, wurde nach Entfernen des Ethanols in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH: 8, in 100 ml H₂O_{dd}) gelöst. Die Plasmidlösung wurde 30 min bei 37 °C mit 50 U pankreatischer RNase (10 mg/ml in TE) inkubiert, um die RNA zu zersetzen. Anschließend wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1 v/v) ausgeschüttelt, 2 min bei 16 000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein unbenutztes Reaktionsgefäß überführt, in das 1 Volumen Chloroform vorgelegt wurde. Der Ansatz wurde erneut zu den gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Gefällt wurde die Plasmid-DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und dem 2,5-fachen Volumen an 99 % (v/v) EtOH für 30 min auf Eis. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 16 000 x g. Das Präzipitat wurde in 70 % (v/v) EtOH gewaschen, unter der Sterilbank getrocknet und in 20-30 µl H₂O_{dd} gelöst. Die so isolierten Plasmide wurden nun bei -20 °C gelagert.

2.4.2. DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der genomischen oder Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von 1-3%-igen TAE-Agarosegelen (50 x TAE Puffer: 242 g Tris/HCl; 57,1 ml Essigsäure; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8; 14 µg/l Ethidiumbromid; Für die Herstellung eines Gels 1x TAE Puffer mit 1-3 % (w/v) Agarose LE (Genaxxon, Ulm) versetzen) mit 1 µl (10 mg/ml) Ethidiumbromid/100 ml Gelvolumen. Als Größenstandard wurden 4-5 µl Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb oder 100bp, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Laufspannung von 8-12 Volt/cm. Nach Auftrennung der DNA konnte das Gel im GelDoc™ EZ Imager (BioRad, München) entwickelt und über Image Lab 4.0 (BioRad, Hercules, USA) fotodokumentiert werden.



2.4.3. Elution der DNA-Fragmente aus dem Agarose Gel

Die DNA-Fragmente wurden mittels QIAquick Gel Extraktions Kit (Qiagen, Hilden) aus den Agarose Gelen eluiert. Die Durchführung fand nach Angaben des Herstellers statt.

2.4.4. Analytischer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 3 μl Plasmid-DNA (ca. 100 ng/ μl), 2 μl 10x Puffer (Spezifisch für das jeweilige Enzym, Thermo Fisher Scientific) und 0,3 μl (3 U) Restriktionsenzym (Thermo Fisher Scientific) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit H_2O auf 20 μl Gesamtvolumen ergänzt. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 – 2 h bei 37 °C wurde der Ansatz gelelektrophoretisch analysiert.

2.4.5. Dephosphorylierung der DNA-Fragmente

Nach der Linearisierung des Vektors durch Restriktionsverdau (2.3.4) wurde 1 μl thermosensitive alkalische Phosphatase (FastAP, Thermo Fisher Scientific) dem Ansatz hinzugefügt. Dies diente zur Entfernung des 5' Phosphatrests, um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Die Reaktion wurde durch 5mM EDTA bei einer 10-minütigen Inkubation bei 75 °C abgestoppt.

2.4.6. TOPO®-Klonierung

Die PCR-Produkte wurden mit den Oligonukleotiden (Primern) aus 2.1.7 generiert. Sie wurden anschließend nach Angaben des Herstellers in pCR™ 2.1-TOPO® (Invitrogen) kloniert.



2.4.7. DNA-Sequenzierung

Die Plasmidproben wurde laut Firmenvorgaben (Macrogen, Korea) für die Sequenzierung vorbereitet. Die Ergebnisse wurden entweder über ClustalX (Larkin et al., 2007) oder BioEdit v7.0.5 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, US) analysiert.

2.4.8. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Der Ligationsansatz setzt sich zusammen aus Insert und Vektor in einem Verhältnis von 1:1-1:5, je nach Qualität der Isolation. Zusätzlich wurden 2 µl Ligationspuffer (10x), 1 µl ATP (10mM), 1 µl T4 DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) hinzugefügt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte bei:

8h	16 °C
1h	30 °C
5 min	70 °C
∞	10 °C

2.4.9. Transformation von elektrokompetenten *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die elektrokompetenten Zellen (40 µl) wurden auf Eis langsam aufgetaut. Sofort nach dem Auftauen wurde 1 µl Plasmid-DNA zugegeben, 1 min auf Eis inkubiert und dann in gekühlte Elektroporationsküvetten mit 0,1 cm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation (MicroPulser™, BioRad) wurde mit 2,5 kV (*E. coli*) oder 2,2 kV (*A. tumefaciens*) durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und eine (*E. coli*, 37 °C) bzw. drei (*A. tumefaciens*, 28 °C) Stunden bei 225 upm im Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika



ausplattiert. 500 μl der verbleibenden Flüssigkeit wurde 1 min bei 21 000 x g zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 50 μl verworfen, das Zellsediment in der verbleibenden Flüssigkeit suspendiert und ebenfalls ausplattiert.

2.4.10. Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

50 μl chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 1 μl Plasmid-DNA oder Ligationsprodukt wurden hinzugefügt, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde 1 min bei 42 °C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden anschließend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB-Medium Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Falls eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt wurde, wurden 20 μl (100 mM) IPTG für die Aktivierung des Lac-Promoters und 40 μl (20 mg/ml) 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal), die durch die β -Galactosidase in einen blauen Farbstoff gespalten wird, auf dem LB-Medium ausgestrichen.

2.4.11. Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 μl im MyCycler™ (BioRad) durchgeführt. Folgende Komponenten wurden für je einen Ansatz verwendet und in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß überführt.

Reaktionsmix:

5 μl 5x PCR-Puffer

0,5 μl dNTPs (10 mM)

1 μl (5 U) Taq-DNA-Polymerase

0,5 μl „Forward-Primer“ (10 μM)

0,5 μl „Reverse-Primer“ (10 μM)

15,5 μl H₂O

2 μl Matrizen-DNA



Der Ansatz wurde in eine PCR Maschine überführt und die Amplifikation bei den folgenden Bedingungen durchgeführt:

2 min	95 °C	1x	} x-mal
20 sek	95 °C		
40 sek	50-60 °C (je nach Primerkombination)		
x sek (1 min pro 1 kb)	72 °C		
10 min	72 °C	1x	
∞	10 °C	1x	

Die Amplifikation erfolgte mit 25-40 Zyklen.

2.4.12. Kolonie-PCR

Eine Einzelkolonie von *E. coli* (DH10B) wurde mit einem Zahnstocher oder einer Pipettenspitze aufgenommen und in 5 µl sterilem H₂O resuspendiert. Nach der Zugabe von 22 µl PCR- Reaktionsmix (2.3.11) wurden zunächst für 5 min bei 95 °C die Bakterienzellen aufgeschlossen und anschließend eine Standard-PCR durchgeführt (2.3.11). Die Klone, welche ein positives PCR-Produkt aufwiesen, wurden über Nacht bei 37 °C in 3 ml LB-Medium plus Antibiotika inkubiert und entweder als Dauerkultur bei -70 °C in Glycerin gelagert oder die Plasmide über eine Plasmid-Isolation (2.3.1) isoliert, um sie in andere Bakterienstämme zu transformieren oder um eine DNA-Sequenzierung (2.3.7) durchzuführen.

2.4.13. Bakterienkulturen

Transformierte *E. coli* oder *A. tumefaciens* wurden auf festem LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37 °C bzw. 2-3 Tage bei 28 °C kultiviert. Für die Plasmidisolierung oder die Proteinexpression wurde eine Einzelkolonie entnommen und in 3 ml LB (+Antibiotika) überführt. Für *E. coli* wurden die Flüssigkulturen bei 37 °C unter Schütteln (220 upm) für 24 h, für *A. tumefaciens* bei 28 °C für 48-72 h vorkultiviert.



2.4.14. RNA-Isolation aus Pflanzengewebe

Das Pflanzengewebe wurde in einen Mörser gegeben und unter Stickstoffzugabe vollständig mechanisch zerkleinert. Anschließend wird 50-100mg des Gewebes mit Trizol (peq GOLD TriFast™, VWR, Darmstadt) homogenisiert und die Proben für 10 min bei RT inkubiert, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 16.000 upm konnte man die RNA-haltige Lösung vom sedimentierten Gewebedebris trennen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen. Um ein vollständiges Entfernen von Proteinen zu gewährleisten wurden die Proben 5 min mit Chloroform ausgeschüttelt und 5 min bei 4 °C und 16.000 upm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt und jedes Mal die obere wässrige Phase entnommen. Dieser wurde anschließend ein Volumen Isopropanol (v/v) hinzugegeben und die RNA innerhalb 15 Minuten auf Eis gefällt. Die Sedimentierung der RNA erfolgt durch eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 16.000 upm. Um Salze und andere Kontaminationen zu entfernen wurde die RNA nun zwei Mal mit 75 % Ethanol (v/v) für 5 min bei 4 °C und 16.000 upm gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des Überstands wurde das RNA-Sediment 5-15 Minuten bei RT getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. Anschließend wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.4.15. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die gelöste RNA wurde 1:100 in Puffer (10 mM Tris/HCL pH 7,5) verdünnt und die Konzentration in UV-Küvetten bei OD₂₆₀=1= 40 µg/ml RNA photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bestimmt.

2.4.16. Reverse Transkriptase Reaktion

Pro Reaktionsansatz wurden 1µl Random Hexamer Primer (10 µM, Thermo Scientific), 1 µl RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/µl, Thermo

Scientific), 4 μ l 5x Reaktionspuffer für RT (Thermo Scientific), 2 μ l dNTPs (dNTP Set, Biotin GmbH, Luckenwalde), 7 μ l H₂O und 2 μ g RNA in 5 μ l H₂O gut durchmischt und im Thermozykler (T100™ Thermo Cycler, BioRad) für 10 min bei 25 °C, für 60 min bei 42 °C und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Die erhaltene cDNA in einem Gesamtvolumen von 20 μ l wurde anschließend bei -20 °C für weitere analytische Zwecke zunächst eingefroren.

2.4.17. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Real-Time PCR zur Detektion der Abwehrgenexpression erfolgte mittels Nachweis des Transkriptlevels von Proteaseinhibitor II (PI –II, McGurl et al., 1992), beschrieben wie in Beloshistov et al., 2017 mit den Primern aus Tabelle 2.3. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBRGreen (10,000x Konzentrat in DMSO, Cambrex, Rockland, USA) durchgeführt, welcher unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Detektion des Fluoreszenzanstiegs wurde nach der Anlagerungsphase gemessen. Der exponentielle Anstieg der PCR-Produkte liefert den sogenannten Schwellenwert (CT-Wert). Dieser CT-Wert ist der zyklenabhängige Zeitpunkt, bei dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt. In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung verwendet. Bei dieser Methode wird die Expression des Zielgens auf ein Haushaltsgen (House-Keeping Gene) bezogen. Es gibt mehrere dafür häufig verwendete Gene bei der Tomate. In diesem Fall wurde der Elongationsfaktor 1 α (*Ef1 α*) benutzt, Primer Tabelle 2.3. Für die Durchführung der Real Time-PCR wurde das CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad) verwendet. Die PCR-Reaktion erfolgte in 96-Well-Platten unter Verwendung zweier Eichkurven von PI II und *Ef1 α* aus cDNA von verwundeten Tomatenblättern. Die Eichkurven starteten bei 1:10 verdünnter cDNA und wurden in 1:10 Schritten bis zu einer Verdünnung von 1:10000 angesetzt. Die Eichkurven ergaben eine Effizienz zwischen 90 % -110 %. Die RNA der Proben (je 2 μ l) wurde zunächst in cDNA umgeschrieben (2.3.16) und 1:10 in H₂O verdünnt, sowie die Negativ-Kontroll-cDNA aus Pflanzen, die nicht



behandelt wurden. Das Expressionslevel des Zielgens der Proben wurde relativ zur unbehandelten Kontrolle quantifiziert.

Die Reaktionsansätze wurden wie folgt vorbereitet:

4 μ l 5x PCR-Puffer

0,5 μ l dNTPs (10 mM)

1 μ l (5 U) Taq-DNA-Polymerase

2 μ l „Forward-Primer/ReversePrimer“ (1 μ M) zu gleichen Teilen gemischt

2 μ l SYBRGreen (1/4000)

5,5 μ l H₂O

5 μ l Matrizen-DNA (1:10 verdünnt)

Der Ansatz wurde in das CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad) überführt und bei den folgenden Bedingungen die Reaktion durchgeführt:

5 min	95 °C	1x	
30 sek	95 °C	}	x-mal
40 sek	59 °C		
40 sek	72 °C		

Die Amplifikation erfolgte für 40 Zyklen und das Resultat wurden mit dem Bio-Rad CFX Manager 3.1 (BioRad) ausgewertet

2.5. Proteinchemische Methoden

2.5.1. Expression und Reinigung der Taq-Polymerase aus *E. coli*

Für die Expression der Taq-Polymerase (PEQLAB, Erlangen, 5 U/ μ l) wurde eine Hauptkultur von *E. coli* mit einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀=0,03 von angeimpft. Um eine ausreichende Reproduktion der Bakterien zu ermöglichen wurden diese für ca. 4 h bei 37°C unter Schütteln (220 upm) inkubiert. Nachdem die OD₆₀₀= 0,8 war, wurde die Proteinexpression durch 125 mg/l IPTG (Endkonzentration) induziert. Anschließend wurde die Bakterienkultur

für 5 h bei 30°C inkubiert. Für die Bakterienерnte wurde die Kultur in Zentrifugenbecher überführt und bei 4 °C für 15 min (3,900 x g) sedimentiert. Das Sediment wurde in 15 ml Puffer A (50 mM Tris-HCl pH: 8; 50 mM Glucose; 0,1 mM EDTA) resuspendiert und bei 4 °C für 15 min (27,000 x g) gewaschen. Anschließend wurde Prä-Lyse-Puffer (Puffer A mit Lysozym) hinzugefügt und die Bakterienlösung darin aufgenommen. Die Bakterien wurden nun darin für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit 15 ml Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH: 8; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; 0,5% Tween 20; 0,5% IGEPAL CA-630), 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und einer Spatelspitze DNase I versetzt. Die Lyse erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Um den Bakterienaufschluß zu verbessern wurden sie zusätzlich 6x für 30s unter Kühlung ultraschallbehandelt (Sonoplus HD2070, Bandelin, Berlin). Nach der wiederholten Zugabe von zwei Spatelspitzen DNase I folgte der DNase-Verdau bei 37 °C für 30 min und die Inaktivierung der DNase I bei 70 °C für 30 min. Das Bakterienlysate wurde anschließend zentrifugiert (27,000 x g) und der proteinhaltige Überstand wurde in ein Becherglas überführt. Für die Präzipitation der Taq-Polymerase wurde 0,3 mg/ml Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ unter ständigem Rühren auf Eis zugegeben. Das präzipitierte Protein wurde durch Zentrifugation (25,000 x g) für 20 min bei 4°C sedimentiert. Das Protein wurde anschließend in Dialyse-Puffer, 0,2 ml/ml Lysat, (100 mM Tris-HCl pH: 8; 100 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 2mM DTT frisch zugegeben) gelöst. Das gelöste Protein wurde nun dreimal für 2h, dann über Nacht und 4 h gegen 2 l Dialyse Puffer mit DTT bei 4 °C in einem Dialyseschlauch (12,0S; 20 µM Wandstärke, ZelluTrans, Roth, molekulare Ausschlussgrenze 12 kDa), wie in 2.5.4 angegeben, dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde danach für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (15000 x g), um Schwebstoffe zu entfernen. Die Taq-Polymerase konnte nun in einem Volumen 100%-igem Glycerin aufgenommen und bei -20 °C gelagert werden.



2.5.2. Heterologe Expression der PS-Proteine in *E. coli*

Eine Einzelkolonie des jeweiligen PS-Konstrukts (pET33+) im *E. coli* Expressionsstamm BL21+RIL wurde für eine Vorkultur in 3 ml LB-Medium inklusive der notwendigen Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 230 upm im Orbitalschüttler inkubiert. Gleichzeitig wurde 1 l LB-Medium für die Hauptkultur mitgeschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur mit 2 ml der Vorkultur angeimpft und die Bakterien wurden bis zu einer $OD_{600} = 0,8-1,0$ angezogen. Zur Induktion der Proteinexpression wurde 1 ml IPTG (1 M) zugegeben und mindestens fünf Stunden bei 30 °C und 225 upm im Orbitalschüttler inkubiert. Dann wurde die Hauptkultur 20 min bei 6084 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment bei -70 °C gelagert.

2.5.3. Affinitätsreinigung von PS-Proteinen über Ni²⁺-NTA

Das Bakteriensediment wurde auf Eis aufgetaut, in Binde-Puffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8, 300 mM NaCl) gewaschen und 10 min bei 6084 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment in 10 ml Lysepuffer (50mM Natriumphosphatpuffer pH 8; 300 mM NaCl Lysozym 1mg/ml; PMSF 1 mM; DNase I 1 Spatelspitze) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 6 x 30 Sekunden sonifiziert. Danach wurde das Volumen der Suspension nach der Lyse bestimmt, 45 µl Probe (Fraktion 1; Rohextrakt) relativ zu 10 ml entnommen und auf Eis gestellt. Die Suspension konnte nun für 20 min bei 20483 x g zentrifugiert werden, der Überstand wurde abgenommen, in ein Reaktionsröhrchen überführt und das Sediment verworfen. Das Volumen des Überstands wurde bestimmt und wiederum eine Probe anhand des Volumens wie zuvor entnommen (Fraktion 2; Überstand Rohextrakt) und auf Eis gestellt. Es wurde Nickel-NTA-Agarose der Firma Qiagen verwendet. Für das Beladen der Säule wurde 1 ml 100 mM Nickelsulfat in die Säule gegeben, die

Agarose mehrere Minuten darin resuspendiert und die überflüssige Flüssigkeit ablaufen gelassen. Dann wurde 8 ml Binde-Puffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 4 mM Benzamidin) dazu gegeben, die Agarose ebenfalls darin resuspendiert und dann der Puffer entfernt. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Auf diese nun äquilibrierte Säule wurden 10-12 ml lysierte Proteinsuspension gegeben, die Agarose darin resuspendiert, die Säule oben und unten verschlossen und im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurde der Durchfluss abgelassen und aufgefangen. Die Säule wurde anschließend dreimal mit 10 ml Binde-Puffer gewaschen. Die Waschlösungen 1-3 wurden separat gesammelt. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde für die Eluate 1-3 je 1 ml Elutionspuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8; 300 mM NaCl; 200 mM Imidazol auf die Säule gegeben und die Eluate 1-3 aufgefangen. Zum Schluss wurde die Säule erneut dreimal mit 8 ml Binde-Puffer gewaschen und für die Konservierung 8 ml 30 % (v/v) igen Ethanol eingefüllt und davon einige ml abgelassen. Es wurde bei allen Schritten darauf geachtet, dass das Säulenmaterial nie austrocknete. Wie bei den beiden Fraktionen der Lyse wurden für den Durchfluß, Waschlösung 1-3 und Eluat 1-3 (Fraktionen 3-9) Proben nach demselben Volumenanteil, wie bei der Lyse beschrieben, entnommen und auf Eis gestellt. Alle Proben, auch die der Lyse, konnten anschließend mit 4 x SDS Puffer (0,2 M Tris/HCl; 0,4 M DTT; 8 % (w/v); SDS 0,4 % (w/v) Bromphenolblau (Serva, Heidelberg); 40 % (v/v) Glycerin) versetzt und 5 min bei 90° C denaturiert werden. Zuletzt wurden die Proben für spätere analytische Zwecke bei -20 °C eingefroren.

2.5.4. Dialyse der aufgereinigten PS-Proteine

Einige cm Dialyseschlauch (12,0S; 20 µM Wandstärke, ZelluTrans, Roth, molekulare Ausschlussgrenze 12 kDa) wurden 15 min in Wasser eingeweicht, in ein großes Volumen (ca. 400 ml) 10 mM Natriumhydrogencarbonat überführt und bei 80 °C 10 min unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde der Schlauch in H₂Odd für weitere 10 min und 80 °C unter Rühren inkubiert.

Das Eluat 2 der Nickelagarose-Chromatografie wurde in den vorbereiteten Schlauch gefüllt, mit zwei Klammern verschlossen und 3 x 6 h gegen 500x Volumen 50 mM Kaliumphosphatpuffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4) pH 6,5 über Nacht im Kühllabor dialysiert. Zum Schluss wurde die Proteinlösung in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

2.5.5. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford erfolgt durch die Bindung von Proteinen an Coomassie Brilliant Blue R-250, was eine Farbänderung verursacht, die bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden kann. Dazu wurden 200 µl Bradford-Reagenz (Roti®-Quant; Bradford, 1976) zu einem Gesamtvolumen von 800 µl Proteinlösung gemischt mit H_2O gegeben, 5-10 min inkubiert und am Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde dann anhand einer BSA-Standardkurve (für einen Bereich 1-15 µg/ml Protein) ermittelt.

2.5.6. Extraktion der Gesamtproteine aus Tomatenblättern

Pflanzenmaterial mit 200-400 mg Frischgewicht von *S. lycopersicum* wurde in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Stahlkugel überführt und sofort in flüssigem Stickstoff gefrosten. Um das Gewebe für den Extraktionspuffer besser zugänglich zu machen musste es für 3 x 15 Sekunden im Tissue-Lyser (TissueLyser LT, Qiagen) zerkleinert werden. Danach wurde 150-200µl Proteinextraktionspuffer (5 x: 500 mM NaCl; 250 mM Tris/HCl pH 7.5; 2,5 % (v/v) Triton X 100; 50 mM β-Mercaptoethanol; in H_2O + 10 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich, Steinheim)), hinzugegeben und mit dem Gewebe 30 s gut gemischt. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe für 15 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit dem Pflanzenprotein in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach der Protein-Bestimmung nach Bradford (2.5.5) wurde das Gesamtprotein auf 1 µg/µl in H_2O eingestellt und mit 4 x SDS-Ladepuffer Puffer (2.5.3) versehen. Es



wurde nun bei 95 ° C 10 min denaturiert und für analytische Zwecke bei -20 °C eingefroren.

2.5.7. Extraktion apoplastischer Proteine aus Tabakblättern

Das geerntete infiltrierte Blattmaterial wurde in 3-5 cm² große Stücke geschnitten. Nachdem das Pflanzengewebe dreimal mit je 500 ml eiskaltem H₂Odd in einem Becherglas gewaschen wurde, wurde 200 ml Infiltrationspuffer (10 mM MES pH:5,6; 10 mM MgCl₂) zugesetzt und 2 min bei 70 mbar vakuuminfiltriert. Anschließend wurde das Blattmaterial vorsichtig trocken getupft und in eine 20 ml Injektionsspritze deren Ausgang mit Glaswolle bedeckt war überführt. Diese wurde in ein 50 ml Reaktionsröhrchen gehängt und 7 min bei 4 °C und 1200 x g zentrifugiert. Das erhaltene apoplastische Extrakt wurde in ein bis zwei 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 3 min bei 24000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort für Aktivitätstests verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.5.8. Extraktion symplastischer Proteine aus Tabakblättern

Aus dem Pflanzenmaterial nach der apoplastischen Extraktion wurden Scheiben mit einem Durchmesser von 1cm ausgestanzt, in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Stahlkugel überführt und sofort in flüssigem Stickstoff gefrosten. Anschließend wurde das Blattmaterial im Tissue-Lyser (TissueLyser LT, Qiagen) homogenisiert. Dann wurde sofort 300 µl denaturierender Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5; 100 mM NaCl; 10 mM β-Mercaptoethanol; 0,5 % Triton X-100; 1x Proteinaseinhibitor Cocktail, SERVA Electrophoresis GmbH) hinzugefügt. Nach gutem Durchmischen wurde für 5 min bei 4 °C und 24000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, eine Proteinbestimmung nach Bradford (2.5.5) durchgeführt und via SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Western Blot analysiert.



2.5.9. Extraktion der Gesamtproteine aus Tabakblättern

Für die Analyse des Gesamtextrakts wurden Gewebeproben vor der apoplastischen Extraktion genommen und anschließend nach der gleichen Methode wie bei den Tomatenblättern (2.5.6) verfahren.

2.5.10. SDS (Sodiumdodecylsulfat) PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Für einen späteren Western Blot oder Coomassie-Färbung wurden 1-20 µg (Gesamt- oder apoplastisches Proteinextrakt aus Pflanzen) bzw. 5-200 ng (gereinigtes PS-Protein) Protein mit 4x SDS-Ladepuffer (2.5.3); 40% (v/v) Glycerin) in einem Gesamtvolumen von 5-40 µl 10 min bei 90 °C inkubiert und 5-40 µl davon auf ein 10- oder 15 %iges Polyacrylamidgel geladen. Als Größenstandard wurden 5-7 µl Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 Volt.

Benötigte Lösungen und Chemikalien

4 x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS

4 x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS;

APS 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H₂O

Trenngel 10 % ig, für 2 Gele (1,5 mm):

4,5 ml Acrylamid Stammlösung (Rotiphorese® Gel40, Roth);

4,5 ml 4 x Trenngelpuffer; 9,0 ml H₂O; 180 µl APS 10 % (v/v), 18 µl TEMED

APS und TEMED als letztes zugeben, Komponenten gemischt und sofort ca. 2/3 hoch in Gekassetten gegossen, mit H₂O überschichtet, ca. 30 min polymerisiert

Trenngel 15 % ig, für 2 Gele (1,5 mm):

6,75 ml Acrylamid Stammlösung (Rotiphorese® Gel40, Roth);



4,5 ml 4x Trenngelpuffer; 6,75 ml H₂O_{dd}; 180 µl APS 10 % (v/v); 18 µl TEMED

APS und TEMED als letztes zugegeben, Komponenten gemischt und sofort ca. 2/3 hoch in Gekassetten gegossen, mit H₂O_{dd} überschichtet, ca. 30 min polymerisiert

Sammelgel für 2 Gele (1,5 mm):

0,75 ml Acrylamid Stammlösung (Rotiphorese® Gel40, Roth);

1,7 ml 4 x Sammelgelpuffer; 4,25 ml H₂O_{dd}; 70 µl APS 10 %; 12 µl TEMED

APS und TEMED als letztes zugegeben, Komponenten gemischt und auf das feste Trenngel gegossen (vorher Wasser vom Trenngel entfernt). Dann wurde der Taschenkamm (10 bzw. 15 Taschen) eingeschoben und ca. 20 min polymerisiert

Laufpuffer (Gelelektrophorese):

50 mM Tris/HCl pH 8,3; 385 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

2.5.11. Coomassie-Färbung

Für die Coomassie-Färbung wurde das Proteingel eine Stunde in Coomassie-Lösung (0,25 % (w/v) Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg); 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Eisessig; 44,75 % H₂O_{dd}) gefärbt und anschließend über Nacht in Entfärbelösung (30 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Eisessig; 60% H₂O_{dd}) inkubiert, bis die Protein-Banden gut zu erkennen waren. Für die Bildgebung wurden die Gele entweder eingescannt oder mit dem Gel Doc™ EZ Imager (BioRad, München) fotografiert.

2.5.12. Western Blot

Beim Western-Blot werden die Proteine auf Blotting-Membranen (PROTRAN® CLEAR SIGNAL, auf 9 x 5,5 cm zugeschnitten, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Das ebenfalls auf 9 x 5,5 cm zugeschnittene Blotting-Papier (Schleicher & Schuell) wurde 10 min in den entsprechenden Puffern getränkt (drei Papiere in Anodenlösung 1, sechs Papiere in

Anodenlösung 2 und sechs in Kathodenlösung). Die Membran wurde kurz in H_2O eingeweicht und anschließend in Anodenlösung 1 eingelegt. Die Graphitelektroden wurden etwa 30 min in H_2O gewässert, abgetrocknet und die Blotting-Apparatur wie folgt luftblasenfrei aufgebaut:

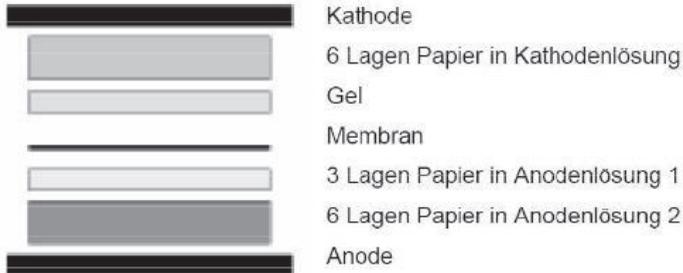


Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau der Western-Blot Apparatur.

Nach 1 ½ Stunden bei 100 mA pro Gel war der Transfer der Proteine abgeschlossen und die Membranen wurden über Nacht in Blockierungslösung unter Schütteln im Kühllabor bei 4 °C oder 1h bei RT abgesättigt. Anschließend wurden sie in Blockierungslösung mit dem ersten Antikörper gelegt und 1-3 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal für 5 min in TBS/Tween gewaschen und für mindestens eine Stunde in der Blockierungslösung mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Blots erneut dreimal mit TBS/Tween gewaschen, außerdem einmal mit TBS. Sofern der primäre Antikörper Peroxidase-gekoppelt war wurden sie gleich entwickelt. Entwickelt wurden die Blots mittels ECL (enhanced chemiluminescence). Dazu wurden je 100 µl der beiden ECL-Lösungen (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Thermo-Scientific) gemischt, gleichmäßig auf die Membran verteilt und für 5 min inkubiert. Man ließ die Membran gut abtropfen, legte sie in eine Plastikfolie und fertigte in der Dunkelkammer Abzüge mit Röntgenfilmen (Hyperfilm™ MP, Amersham Bioscience, Freiburg) an oder sie wurden mit einem Blot Scanner (Li-Cor C-Digit, LI-COR Biosciences – GmbH, Lincoln, USA) visualisiert.



Benötigte Lösungen und Chemikalien:

Kathodenlösung: 40 mM 6 Aminohexansäure; 20 % (v/v) Methanol

Anodenlösung 1: 0,3 M Tris/HCl pH 10,4; 20 % (v/v) Methanol

Anodenlösung 2: 25 mM Tris/HCl pH 10,4; 20 % (v/v) Methanol

20 x TBS: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 3 g Tris in 800 ml H₂Odd gelöst, auf pH 7,4 eingestellt, mit H₂Odd auf 1l aufgefüllt

TBS/Tween: 0,1 % (w/v) Tween® 20 in 1 x TBS

Blockierungslösung: 6 % (w/v) Magermilchpulver in TBS/Tween

2.5.13. Konzentrationsbestimmung von Peptiden nach Lowry

Die Peptide aus Tabelle 2.1 wurden in H₂Odd verdünnt und die Konzentrationen nach Lowry bestimmt. Dazu wurden in einer 96-well Platte (Greiner CELLSTAR® 96 well plates, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) je 1µl der Probe zu 6µl H₂Odd gegeben. Danach wurde je Probe 25µl Reagenz A (Bio-Rad DC™ ProteinAssay) und 200µl Reagenz B (Bio-Rad DC™ ProteinAssay) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch gut vermischt. Die Proben wurden für 15min in der Dunkelheit inkubiert, bis die Reaktion stattgefunden hatte und die Absorption der Lösung bei 750nm im ELISA-Reader (Tecan Infinite M200Pro, i-control 2.0, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bestimmt. Die Absorption des Nullwerts (alle Lösungen ohne Probe) wurde subtrahiert und die Peptidkonzentration konnte anhand eines BSA-Standards bestimmt werden. Alle Proben wurden in dreifacher technischer Ausführung gemessen.

2.5.14. Ein-Schritt Immunoprecipitation von GFP-Fusionsproteinen

Die anti-GFPV₁₁H gebundenen Agarose-Kügelchen (GFP-Trap®-AKit, Chromotek, Planegg-Martinsried, Deutschland) wurden drei Mal zwei Minuten mit Natriumphosphatpuffer (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; 300 mM

NaCl) unter Zentrifugation bei 2500g äquilibriert. Anschließend wurde 1,5 ml apoplastischer Extrakt von *N. benthamiana* Pflanzen, die transient das Zielprotein exprimieren, mit 15 μ l anti-GFPV_H gebundenen Agarose-Kügelchen für zwei Stunden bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Für die Präzipitation der Agarose-Kügelchen wurden diese nun zwei Minuten bei 2500g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Präzipitat drei Mal zwei Minuten mit Natriumphosphatpuffer (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; 300 mM NaCl) unter Zentrifugation bei 2500 g gewaschen. Um die GFP-Fusionsproteine zu eluieren wurden nun der Überstand vollständig abgenommen, das Präzipitat mit 2 x SDS-Puffer (2.5.3) versetzt und 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 16000g für 2 min konnte das Eluat gelöst in SDS-Puffer entnommen werden und wurde für weitere Analysen bei -20 °C eingefroren. Um die einzelnen Schritte der Immunopräzipitation zu dokumentieren und einen möglichen Verlust der Fusionsproteine zu erkennen, wurden für die Fraktionen Überstand, Waschschritt 1,2,3 und die eluierten Agarose-Kügelchen Proben entnommen, in 4 x SDS-Puffer (2.5.3) aufgeköcht und für die weitere Analyse bei -20 °C eingefroren.

2.5.15. Enzymatischer In-Gel Proteinverdau mit Trypsin/Glu-C

Das Proteingemisch der Immunopräzipitation inklusive aller Fraktionen wurde zuerst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die entsprechenden Proteinbanden in den Eluaten wurden markiert und für den Trypsin- bzw. Glu-C- (Glutamyl-Endopeptidase) Verdau, sowie anschließender ESI-Analyse (NanoLC-ESI-MS LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) an die Core Facility Hohenheim (Mass Spectrometry Unit, Dr. Pfannstiel, Hohenheim) weitergegeben, wo sie freundlicherweise analysiert wurden. Zur Identifikation der Peptide wurde die Software Scaffold 4 (Version 4.4.8, Proteomsoftware, Portland, USA) verwendet.

2.5.16. Enzymatischer In-Lösung-Verdau von Proteingemischen mit Trypsin

Apoplastische Extrakte von Tabakpflanzen, welche die PS-OPR1-Reporterproteine transient überexprimieren wurden über Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 500, 30.000 MWCO, Th. Geyer, Renningen, Deutschland) 40 min bei 10.0 rcf im Überstand angereichert. Nach der Proteinbestimmung nach Bradford (2.5.5) wurden je 50 µg Gesamtprotein 1 µl Reduktionspuffer (1 µg/µl DTT in Wasser; 6,5 mM) hinzugefügt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde der Lösung 1 µl Alkylierungspuffer (5 µg/µl Iodacetamid in Wasser; 27 mM) je 50 µg Gesamtprotein hinzugefügt und 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Um den richtigen pH-Wert für den Trypsin-Verdau zu erhalten wurden 4 Volumeneinheiten 10 mM TrisHCl pH:8 hinzugefügt. Anschließend wurde je 50 µg Gesamtprotein 1 µl Trypsin (0,4 µg/µl, Trypsin rec., Proteomics Grade, Roche Diagnostics, Mannheim) hinzugefügt und die Lösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung 10 min bei 4 °C und 24000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Folgenden wurden die Peptide mit C₁₈-StageTips isoliert (2.4.18) und über ESI identifiziert.

2.5.17. Proteinverdau und Isolierung von Peptiden aus einem Proteingemisch

Die apoplastischen Extrakte von transient Phytaspase exprimierenden *N. benthamiana* Pflanzen wurden über Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 500, 30.000 MWCO, Th. Geyer) drei mal zehn Minuten bei 10.0 rcf im Überstand angereichert. Nach der Proteinbestimmung nach Bradford wurde das apoplastische Konzentrat mit heterolog in *E. coli* produzierten und aufgereinigten (DM) PS GFP-Fusionsproteinen für 15 min bei 24 °C in Natriumphosphatpuffer (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; 300 mM NaCl) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter Schütteln inkubiert. Danach wurde das

Proteingemisch fünf Minuten auf Eis gegeben, um eine weitere Phytaspase-Aktivität zu inhibieren und drei Minuten bei 14000 upm zentrifugiert, um ausgefallene Proteine zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend auf Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 500, 10.000 MWCO, Th. Geyer) überführt und zwei Mal zehn Minuten bei 10.0 rcf zentrifugiert. Die im Durchfluss enthaltenen Peptide wurden für die Isolierung durch C₁₈-StageTips (2.4.18) und anschließende MS-Analyse verwendet.

2.5.18. Isolierung von Peptiden mit C₁₈-StageTips

Für die MALDI-ToF-ToF Analyse an der Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA):

Zunächst wurde das Volumen der Peptidlösung bestimmt und diese mit 0,2 % TFA (Trifluoressigsäure, Fluka) auf einen pH von 1-2 angesäuert. Das C₁₈-StageTips Material (Millipore, Schwalbach) wurde ausgestochen und in eine Pipettenspitze (10-100 µl) überführt. Die C₁₈-StageTips wurden zunächst drei Mal mit 20 µl Acetonitril 50 %/0,1 % TFA (1:1) äquilibriert. Für die Konditionierung wurde das C₁₈-Material drei Mal mit 20 µl 0,1 % TFA behandelt. Zum Binden der Peptide an die Säule wurde die Probe 20 Mal auf und ab pipettiert. Das anschließende Waschen erfolgte drei Mal in 20 µl 0,1% TFA. Für die Elution wurden 1-2 µl Matrixlösung (5 mg/ml α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure in Acetonitril/0,1 % TFA (1:1)) mit Hilfe eines „MiniFlex Round Tip“ (Roth) in das ZipTip pipettiert. Die Elution erfolgte direkt auf das Target (Bruker Daltonics, Billerica, USA) und wurde mittels MALDI-ToF-ToF gemessen

Für die NanoLC-ESI-MS Analyse an der LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific):

Zunächst wurde das Volumen der Peptidlösung bestimmt und diese mit 0,2 % TFA auf einen pH von 1-2 angesäuert. Die C₁₈-StageTips wurden zunächst einmal mit 50 µl 80 % Acetonitril konditioniert. Für die Äquilibrierung wurde das C₁₈-Material einmal mit 100 µl 0,5 % Essigsäure behandelt. Zum Binden der Peptide an die Säule wurde bis zu 150 µl der Probe auf den C₁₈-StageTip



geladen, zweimal mit 100 µl 0,5% Essigsäure gewaschen und die Peptide mit zweimal 20 µl 80 % Acetonitril eluiert. Die Peptidlösung wurde dann im SpeedVac Concentrator (Bachofer, Reutlingen) eingedampft, in die Core Facility Hohenheim (Mass Spectrometry Unit, Dr. Pfannstiel, Hohenheim) weitergegeben, wo es freundlicherweise analysiert wurde. Zur Identifikation der Peptide wurde die Software Scaffold 4 (Version 4.4.8, Proteomsoftware, Portland,USA) verwendet.

2.5.19. MALDI-ToF-ToF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight Massenspektrometrie)

Für die MALDI-ToF-ToF Messung am Autoflex III (Bruker Daltonics) wurde zunächst eine externe Kalibrierung mit einem Standard-Peptidgemisch (Bruker Daltonics) durchgeführt. Für die Aufnahme eines Massenspektrums wurden mindestens 2000 Laserschüsse pro Probe addiert. Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Flex analysis 3.0 (Bruker Daltonics). Für die Datenbanksuchen wurden die SwissProt (www.expasy.org) und die NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>) verwendet.

2.6. Biologische Nachweisverfahren (Biotests) und Aktivitätsmessungen

2.6.1. Proteinase Inhibitor II (PI-II) Genexpression in Tomatenpflanzen

Samen von *S. lycopersicum* (cv UC82B) wurden über Nacht einer Hitzebehandlung von 70 °C ausgesetzt. Am darauf folgenden Tag wurden die Samen 5 min in 70 % (v/v) EtOH gewaschen und für 3 h in 10 % (w/v) Trinatriumphosphat inkubiert, um eventuell im Saatgut enthaltene Viren zu inaktivieren und somit einer Infektion des Pflanzenmaterials vorzubeugen. Nach fünfmaligem Waschen der Samen mit H₂O für 5 min konnten diese

nun in Anzuchtboxen ausgesät und bei einer Photoperiode von 16 h, 26 °C und 100 μ E Lichtintensität im Anzuchtschrank (Conviron Adaptis C, Manitoba, Canada) 14-16 Tage angezogen werden.

Die aufgereinigten Prosystemin-Proteine, sowie Systemin und L-Systemin wurden auf Eis aufgetaut und die benötigten Verdünnungen in den angegebenen Konzentrationen in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4) pH 6,5 hergestellt. Je Behandlung wurden 5 x 50 μ l der Verdünnungen, sowie als Kontrolle nur Puffer ohne Protein in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und in ein Gestell aus Eppendorf-Reaktionsgefäßständern gestellt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Eppendorf-Gefäße einen gewissen Abstand zueinander hatten, damit sich die Pflanzen aus den verschiedenen Gefäßen später nicht berühren. Zur Kenntlichmachung der unterschiedlichen Konzentrationen und Prosystemin-Proteinen wurden die Ränder der Reaktionsgefäßständer farblich markiert. Anschließend wurden die 14-16 Tage alten Tomatenpflanzen (cv UC82B) mit einem Skalpell an der Basis des Hypocotyls abgetrennt, auf eine Glasplatte gelegt, noch einmal schräg abgeschnitten und je eine Pflanzen in jedes Eppendorf-Gefäß überführt, sodass sie die Peptid-bzw. Kontrolllösung aufnehmen konnten. Nun wurde das Eppendorfgefäß-Gestell 50-70 min in den Anzuchtschrank gestellt, bis die ersten Pflanzen die Lösung vollständig aufgenommen hatten. Nach Beendigung der Resorption wurden die Pflanzen in Szintillationsgefäße mit Leitungswasser überführt, in eine verschließbare Plastikbox gestellt und für 8 h im Anzuchtschrank inkubiert, um den Pflanzen Zeit zu geben die Abwehrgenexpression zu induzieren, da bei 8 h das Maximum der Proteinaseinhibitor II mRNA Konzentration liegt (McGurl et al., 1992). Nach Ablauf der 8 h wurden die Pflanzen aus den Szintillationsgefäßen herausgenommen und zwischen den Kotyledonen und dem ersten Blattpaar mit einem Skalpell abgeschnitten. Der untere Teil mit Kotyledonen und Stängel wurde verworfen, der obere Teil mit den Blättern wurde in Reaktionsgefäße überführt und für analytische Zwecke bei -70 °C eingefroren. Hierbei wurden immer alle fünf Pflanzen je Behandlung vereinigt. Im Folgenden wurde die RNA (2.3.14) isoliert und die PI-II Induktion via quantitativer Real-Time PCR (2.3.17) gemessen.

2.6.2. Zellkulturen und pH-Antwort Messungen

50 ml Nover Medium (3 % (w/v) Saccharose) wurde mit 7-9 ml Suspensionszellen der Stammkultur (1 Woche alt) von *Solanum peruvianum* (freundlicherweise bereitgestellt von Georg Felix, Universität Tübingen) angeimpft und bei 25 °C und 100 upm im Orbitalschüttler inkubiert (Schaller and Oecking, 1999). Nach einer Woche Inkubation wurden je 10 ml Suspensionszellen in vier Szintillationsgefäße überführt und diese in eine Halterung gestellt, die sich auf einem Orbitalschüttler befindet, um die pH-Messungen durchzuführen. In die Szintillationsgefäße mit den Suspensionszellen wurden nun die Elektroden (INLAB Semi Micro, Mettler Toledo, Gießen) des Seven-Multi pH Meters (Mettler-Toledo) eingeführt, um über eine Software (LabX direct pH 2.1, Mettler Toledo) kontinuierlich die pH-Änderung über die Zeit zu messen. Die Peptide bzw. Proteine, die nun getestet wurden (Tab.2.2 und Abb. 2.1), wurden in wässriger Lösung in einem Gesamtvolumen von 50 µl hinzugegeben. Davor wurden die Zellen mindestens 30 min äquilibriert. Die pH-Änderung im Medium wurde anschließend über einen Zeitraum von 1-2 h jede 10 s bestimmt und die Daten über Excel ausgewertet.

2.6.3. Isolation transgener homozygoter Linien von WT und DM PS EGFP

Nach der *A. tumefaciens* vermittelten Transformation von *S. lycopersicum* mit WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP unter der Kontrolle des dualen CaMV 35S Promoters durch Jutta Babo wurden die positiv auf Kanamycin isolierten Pflanzen (T_0 , Parentalgeneration) im Gewächshaus bis zur Frucht- und Samenreife angezogen. Es konnten für WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP je 10-15 unabhängige Transformationsereignisse generiert werden. Die Samen dieser Pflanzen wurden gesammelt und getrocknet. Viren wurden durch Hitze- und Trinitriumphosphatbehandlung inaktiviert, wie unter 2.6.1 beschrieben. Im Folgenden wurden 20-40 Samen je Linie mit



Natriumhypochlorit (NaClO, 1,5 % (v/v) in H₂O₂) für exakt 10 min sterilisiert und wiederum 5 x 5 min mit sterilem H₂O₂ gewaschen. Die Samen wurden anschließend unter sterilen Bedingungen auf Selektionsmedium (Murashige and Skoog Medium including Vitamins, Duchefa Biochemie, 4,4 g/l; 3 % (w/v) Saccharose; 6,5 g/l Agar; 50 mg/l Kanamycin; pH 5,5) in Weckgläsern ausgelegt und bei 21 °C und 12 h Licht/12 h Dunkelheit für 16-21 Tage angezogen. Es wurden für WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP je 20-30 Pflanzen isoliert (T₁) und auf Erde im Gewächshaus bis zur Frucht- und Samenreife angezogen. Zur Bestätigung der Transformation mit den korrekten Konstrukten wurden diese Pflanzen mittels PCR (2.3.11) mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 2.4 genotypisiert und die Expression mit einem anti-GFP Antikörper (2.1.5) durch Western Blot (2.4.12) ermittelt. Die Samen dieser Pflanzen wurden wiederum gesammelt, getrocknet und die Prozedur zur Selektion und Bestätigung der Expression wiederholt. Es konnten nun in der T₂-Generation je Konstrukt drei homozygote Linien isoliert werden, die entweder WT-PS-EGFP oder DM-PS-EGFP konstitutiv überexprimieren. Diese Linien wurden für die *in planta* Versuche zur Auswirkung einer Überexpression von Prosystemin und seiner Doppelmutante für die Relevanz der aspartatspezifischen Spaltstellen verwendet.

2.6.4. Zeitabhängige PI-II- Genexpression von WT-/DM-PS-EGFP überexprimierenden Pflanzen nach Verwundung

Für jede der drei homozygoten Linien von WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP (2.6.3), wurden 60 Samen bei 70 °C hitzebehandelt und auf Erde in Anzuchtboxen ausgelegt. Die Samen wurden anschließend für 14 Tage im Anzuchtschrank (Conviroon Adaptis) bei 26 °C und bei einer Photoperiode von 16 h, 26 °C und 100 µE Lichtintensität angezogen. Für den null Stunden Wert wurde bei fünf Pflanzen einer Linie das erste Blattpaar abgeschnitten, in einem Reaktionsgefäß vereinigt, in Stickstoff überführt und bei -80 °C eingefroren. Die restlichen Pflanzen wurden an einer Feder des ersten



Blattpaars zweimal mit einer Klemme verwundet. Für die jeweiligen Zeitschritte (1, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden) wurde das erste Blattpaar von jeweils 5 Pflanzen einer Linie abgeschnitten. Das verwundete (lokale) Blatt und das gegenüberliegende (systemische) Blatt wurden getrennt, in einem Reaktionsgefäß vereinigt, in Stickstoff überführt und bei -80 °C eingefroren. Im Folgenden wurde die RNA (2.3.14) isoliert und die PI-II Induktion via quantitativer Real-Time PCR (2.3.17) gemessen.

2.6.5. Mikroskopie

Mikroskopische Beobachtungen wurden mit dem Axio Imager Z.1 (Zeiss, Jena) über die AxioVision RS Software (Zeiss, Jena) und die AxioCam MRm (Zeiss, Jena,) Kamera durchgeführt. Die Bilder wurden mit verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen. Für die Detektion der GFP-Fluoreszenz wurde der Filteraufsatz 38HE (Zeiss, Jena) verwendet.

2.7. Statistik

Für die statistischen Analysen wurde SigmaStat® 3.5 (Systat Software GmbH; Erkrath) verwendet. Die verwendeten statistischen Tests und Signifikanzniveaus sind in den Abbildungslegenden angegeben.



3. Ergebnisse

3.1. Spaltung von Prosystemin durch *S/Phyt-1* und *-2*

3.1.1. Heterologe Expression von PS und doppelt-mutiertem (DM) PS in *E. coli*

Das Prosystemin der Tomate wird durch ein einziges, ca. 4500 bp großes, nukleares Gen codiert, das aus 11 Exons und 10 Introns besteht. Der offene Leserahmen umfasst 600 bp und codiert für ein 200 Aminosäure großes Protein (McGurl et al. 1992).

Vier verschiedene rekombinante PS-Proteine wurden für die *in vitro* Spaltungsversuche und die Aktivitätsmessungen verwendet. Zum einen das wildtypische PS (WT-PS) und zum anderen das doppelt-mutierte PS (DM-PS), wobei entweder das erste oder das zweite Methionin als Startcodon verwendet wurde (Abb. 3.1). Im Falle der Volllängekonstrukte wurde das Codon für Methionin an Position 15 durch ein Alanin-Codon ersetzt um sicherzustellen, dass nur ein Translationsprodukt gebildet wird. Bei DM-PS wurden die Aspartat-Codons an den potentiellen Phytaspaseschnittstellen durch Alanin-Codons substituiert. Für die Aufreinigung aus *E. coli* über Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen) wurde ein His₆-Tag am C-Terminus angefügt. Die beiden Volllängekonstrukte wurden zusätzlich mit GFP fusioniert, um eine Visualisierung der Prozessierung durch Gel-Elektrophorese und Western Blot-Analyse zu erlauben (Abb. 3.1)

Ergebnisse

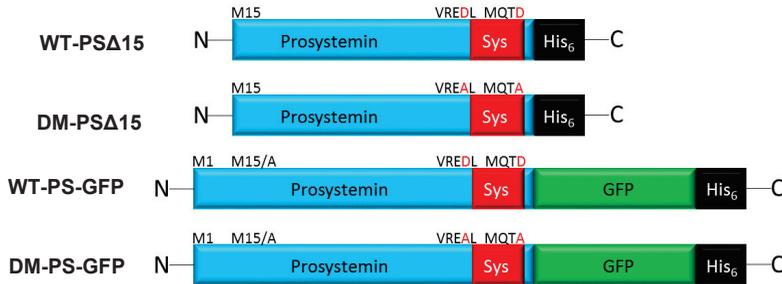


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung von wildtypischem (WT) PS und seiner Doppelmutante (DM).

Die Systemin Sequenz (18 Aminosäuren, roter Kasten) wird von Aspartat-Resten (gezeigt in roten Buchstaben) flankiert, die sich an den Positionen -2 und 18 relativ zur ersten Aminosäure der Systemin-Sequenz befinden. Auch in Rot werden die Alanin-Substitutionen der flankierenden Aspartat-Reste als Doppel (DM)-Mutante (D-2/A und D18/A) gezeigt. Ein His₆-Tag wurde am C-Terminus von PS hinzugefügt, um eine Isolation des Proteins zu erlauben. Zusätzlich wurden die beiden Volllänge PS-Konstrukte an GFP fusioniert, um eine Visualisierung der Prozessierung durch Gel-Elektrophorese zu erlauben.

Die PS-Varianten im Vektor pET-33b (+) (Novagen) wurden in *E. coli* (DH10B, Invitrogen) transformiert, die Plasmide vervielfältigt und isoliert und ihre Identität durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Daten nicht gezeigt). Der Expressionsstamm BL21 RIL von *E. coli* (Stratagene) wurde für die Expression der PS-Proteine verwendet. Diese wurden anschließend mit Ni²⁺-NTA Agarose über ihren His₆-Tag isoliert.

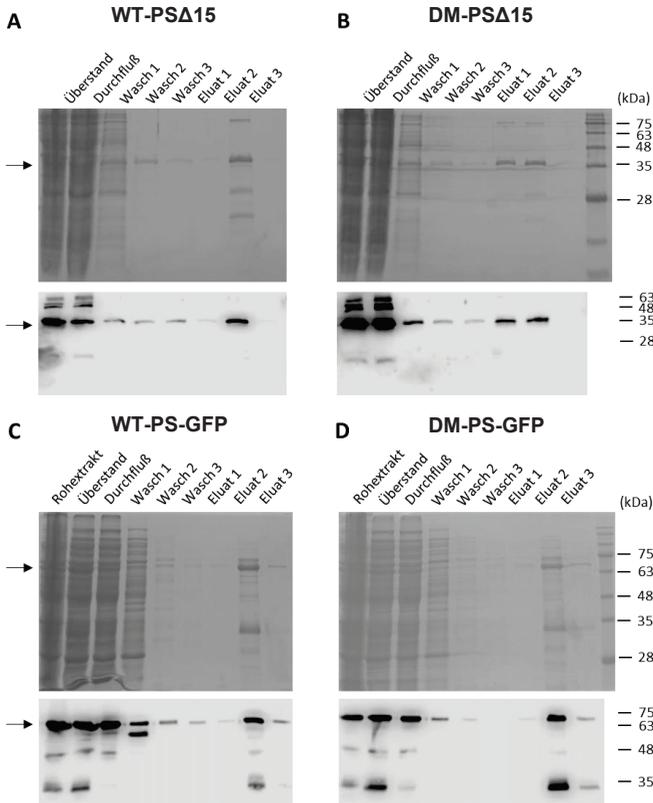


Abbildung 3.2: Aufreinigung verschiedener PS-His Fusionsproteine durch Ni-NTA Chromatografie.

Heterologe Expression in *E. coli* (BL21-RIL) und Aufreinigung von wildtypischem (WT) und mutiertem (DM) PS, verkürzt um die ersten 15 Aminosäuren (**A/B Δ 15**) oder fusioniert mit GFP (**C/D**). Die einzelnen Fraktionen der Aufreinigung wurden nach Auftrennung durch SDS-PAGE (10% **C/D** bzw. 15% **A/B**) mittels Coomassie angefärbt (**A-D** oben). Die spezifische Detektion von PS erfolgte durch Western Blot mit einem anti-Prosystemin Antiserum (**A/B**) oder einem polyklonalen anti-GFP Antikörper (**C/D**) mit sekundärem goat-anti-rabbit IgG HRP-Konjugat. Der Nachweis erfolgte durch „enhanced chemiluminescence“ (ECL; A-D, unten). PS-His Proteine (Pfeil), sowie Markerproteine (kDa) wurden gekennzeichnet.

Die PS- Proteine konnten alle zu einem hohen Grad aufgereinigt werden (Abb. 3.2). Für die Volllängeconstructe ist allerdings in beiden Fällen eine zweite prominente Bande zu beobachten, bei der es sich vermutlich um GFP handelt. Eigentlich würden WT-PS Δ 15 und DM-PS Δ 15 bei einem wesentlich geringeren Molekulargewicht, von ca. 23 kDa (http://web.expasy.org/compute_pi/), erwartet werden. Aufgrund des hohen Anteils an geladenen Aminosäuren, aber einem sehr geringen Anteil an hydrophoben Aminosäuren ist Prosystemin sehr hydrophil (McGurl et al., 1992). Dies könnte die unerwarteten Laufeigenschaften bei der SDS-PAGE erklären (Vetsch et al., 2000). Bei WT-PS-GFP und DM-PS-GFP konnten ähnliche Umstände beobachtet werden. Hier wäre die theoretische Masse bei ca. 52 kDa (http://web.expasy.org/compute_pi/), wohingegen sie auf der SDS-PAGE bei ca. 70 kDa zu sehen sind. Die aufgereinigten PS-Proteine wurden im Weiteren für die Spaltungsversuche und Aktivitätsmessungen verwendet.

3.1.2. Spaltung von WT-PS und DM-PS *in vitro*

Ziel dieser Untersuchungen war es nun zu prüfen, ob die Kandidatenproteasen *S*Phyt-1 und/oder *S*Phyt-2 in der Lage sind Prosystemin zu spalten, und ob die Prozessierung von den Aspartatresten abhängt, die das Systeminpeptid innerhalb des Vorläufers in den Positionen D-2 und D18 relativ zur Systemin-Sequenz flankieren (Abb. 1.3). Diese Aspartatreste befinden sich in den Sequenzmotiven VRED (N-terminal) und MQTD (C-terminal) vor bzw. in Systemin. Sie ähneln stark den VEID und TATD Motiven, welche als Substrate der nativen Phytaspase identifiziert wurden (Beloshistov et al., 2017).

Dazu wurden die beiden Proteasen transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert und durch Zellwandextraktion („apoplastic wash“) isoliert (Abb. 3.3 A). Die apoplastischen Extrakte, welche rekombinantes *S*Phyt-1 und *S*Phyt-2 enthielten, wurden mit heterolog in *E. coli* produziertem WT-PS bzw. DM -PS

Ergebnisse

inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot analysiert, wobei WT PS und seine Spaltprodukte mit Hilfe eines GFP-Antiserums nachgewiesen wurden (Abb. 3.3 B).

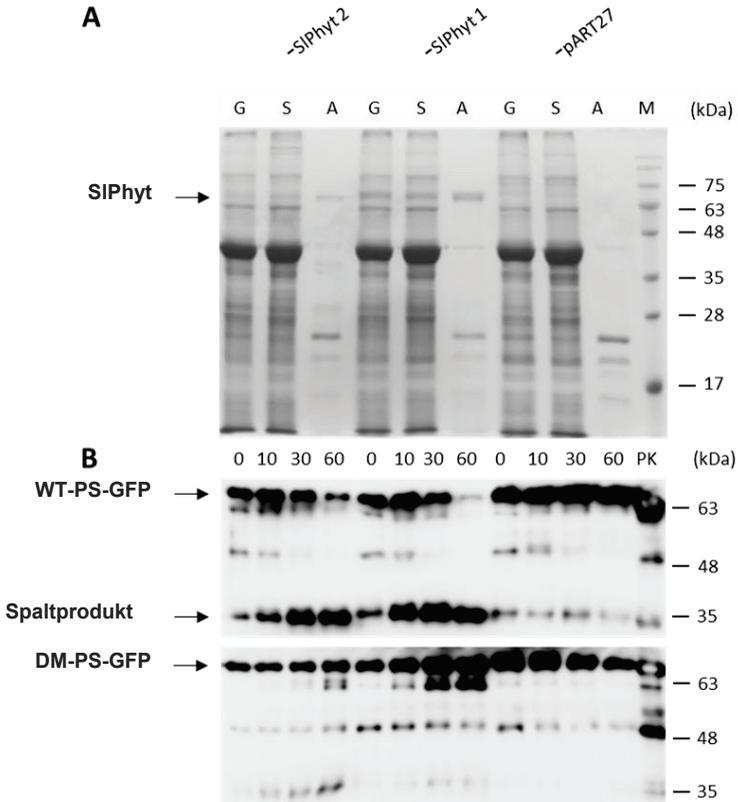


Abbildung 3.3: Expression und apoplastische Extraktion von *S*Phyt-1 und -2 sowie Spaltung von PS GFP Fusionsproteinen *in vitro*.

Transiente Expression von *S*Phyt-1 und -2 in *N. benthamiana* und Extraktion des apoplastischen Proteins. Unspezifische Anfärbung der Proteine aus Gesamtextrakt (G), Symplast (S) und Apoplast (A) mit Coomassie Blau. (B) Prozessierung von WT-PS-GFP (oben) und DM-PS-GFP (unten) durch *S*Phyt-1 und -2 im Verlauf von 0-60 min, sowie

Ergebnisse

die Kontrolle mit leerem Vektor (pART27). Nach Auftrennung durch SDS-PAGE (15%) wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper in Verbindung mit einem sekundären goat-anti-rabbit IgG HRP-Konjugat über Chemilumineszenz detektiert. *S*Phyt-1/-2, WT-/DM-PS-GFP und Spaltprodukt (Pfeil) sowie Markerproteine (kDa) wurden gekennzeichnet.

Sowohl *S*Phyt-1 als auch *S*Phyt-2 waren in der Lage, wildtypisches Prosystemin zu spalten. Der Vorläufer verschwindet über einen Zeitraum von 60 Minuten fast vollständig und es kommt zeitabhängig zur Akkumulation eines C-terminalen Spaltprodukts von ca. 30-35 kDa, das in der Negativkontrolle (pART27) nur sehr schwach gebildet wird (Abb. 3.3 B, oben). Die Spaltung durch *S*Phyt-1 scheint bei gleicher Konzentration der beiden Phytaspen rascher und vollständiger zu erfolgen als die durch *S*Phyt-2.

Im Gegensatz dazu verschwindet der Vorläufer von DM-PS-GFP nicht und es kommt auch nicht zur Bildung des 30-35 kDa Spaltproduktes (*S*Phyt-1) oder nur in stark vermindertem Maße (*S*Phyt-2) (Abb. 3.3 B, unten). Es konnte also gezeigt werden, dass *S*Phyt-1 und -2 in der Lage sind Prosystemin *in vitro* zu prozessieren, und dass die beiden Aspartate, wie für die Prozessierung durch eine Phytaspase zu erwarten, wichtig für die Spaltung sind.

Die genauen Spaltstellen von PS werden nun im Folgenden näher betrachtet.

3.1.3. Identifizierung der N-terminalen Spaltstelle von PS *in vitro*

Da für beide Phytaspen Spaltprodukte von WT-PS, nicht aber von DM-PS-GFP im Western Blot zu sehen waren, galt es nun die Aspartatspezifität zu beweisen. Für die nativ aus Tomatenblättern aufgereinigte endogene Phytaspase-Aktivität konnte eine Aspartatspezifität *in vitro* schon gezeigt werden (Beloshistov et al., 2017).

Dazu wurden die beiden Phytaspen, wie zuvor beschrieben, transient in *N. benthamiana* exprimiert und durch Zellwandextraktion („apoplastic wash“)

Ergebnisse

isoliert (Abb. 3.3 A). Die rekombinanten *S*Phyt-1 und *S*Phyt-2 wurden über Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 500, 30.000 MWCO) aufkonzentriert und der konzentrierte apoplastische Extrakt mit heterolog in *E. coli* produziertem Prosystemin (PS) inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde danach kurz auf Eis abgestoppt und die kleinen Peptide über Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 500, 5.000 MWCO) von den größeren Proteinen getrennt. Der Durchfluss wurde an C_{18} -Säulen gebunden, die Peptide wurden eluiert und mittels NanoLC-ESI-MS/MS analysiert (Abb. 3.4).

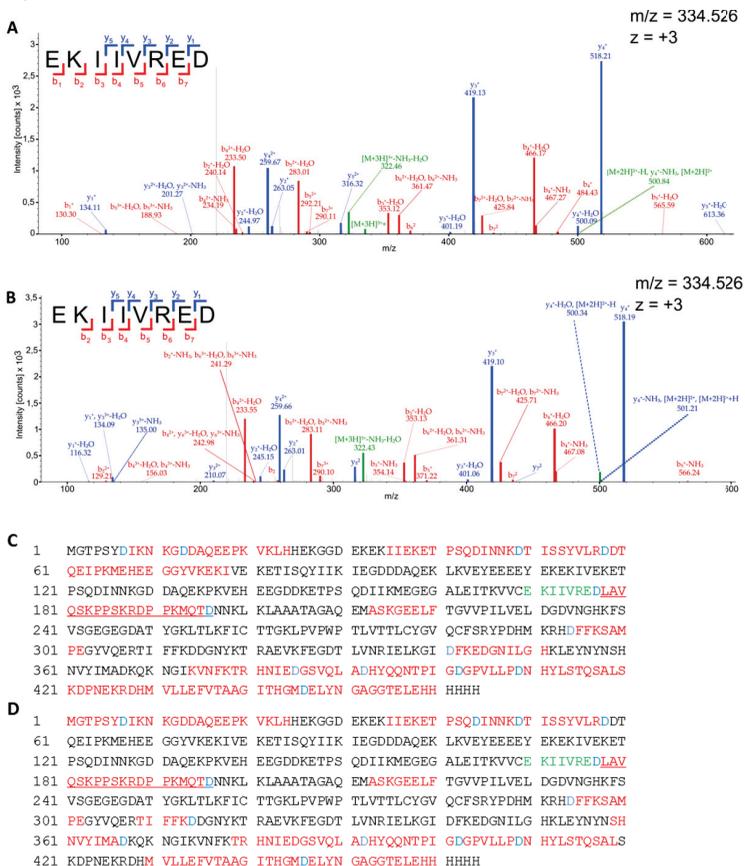


Abbildung 3.4: Massenspektrometrische Identifizierung der N-terminalen Spaltstelle von Prosystemin durch *S/Phyt-1* and *S/Phyt-2* *in vitro* mittels NanoLC-ESI-MS/MS Analyse.

Wildtypisches Prosystemin-GFP wurde mit rekombinantem *S/Phyt-1* (A) oder *S/Phyt-2* (B) inkubiert und die Spaltprodukte wurden durch NanoLC-ESI-MS/MS analysiert. Das Peptid EKIIVRED und somit die N-terminale Spaltstelle von L-Systemin konnte in beiden Ansätzen identifiziert werden. Die Identität und Sequenz der Peptide wurde durch die b- und y-Ionenserien bestätigt, welche rot bzw. blau dargestellt sind. Der Neutralverlust von NH₃ ist in grün dargestellt. Die identifizierten Peptide werden für *S/Phyt-1* (C) und *S/Phyt-2* (D) in der Sequenz von WT-PS-GFP rot dargestellt. Aspartate, nach denen gespalten wurde, sind blau markiert, L-Systemin unterstrichen, das gesuchte Peptid ist grün gefärbt.

Für beide Phytaspen konnten Peptide isoliert werden, die die N-terminale Spaltstelle von L-Systemin repräsentieren (Abb. 3.4). Die Identität und Sequenz der EKIIVRED Peptide konnte eindeutig über die b- und y-Ionenserien bestätigt werden. Das Auftreten von EKIIVRED belegt die aspartatspezifische Spaltung an D-2 für *S/Phyt-1* und *S/Phyt-2*.

Die aspartatspezifische Prozessierung an D-2 resultiert in L-Systemin und nicht im originalen Systemin-Peptid. Dies deutet darauf hin, dass eine L-Aminopeptidase für die weitere Reifung von Systemin erforderlich sein mag.

3.1.4. Identifizierung der C-terminalen Spaltstelle und des freigesetzten Peptids *in vitro*

Die aus der Spaltung von WT-PS-GFP generierten und über C₁₈-Säulen gereinigten Peptide wurden über Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 500, 5.000 MWCO) isoliert und wurden auch mittels MALDI-ToF-ToF analysiert. Abbildung A.1 und A.2 (Anhang) zeigt das Massenspektrum der Peptide, die aus der Spaltung daraus hervorgegangen sind. Auffällig ist hierbei die Bildung eines Peptids mit der m/z von 2123,149 durch *S/Phyt-1* und 2123,187 durch *S/Phyt-2* was auf L-Systemin mit der monoisotopischen Masse von 2122,144 hindeutet. Im Fragmentierungsspektrum der MALDI-ToF-ToF-Analyse (Abb. 3.5) und mittels NanoLC-ESI-MS/MS Analyse (Abb. 3.6) konnten diese Peptide eindeutig als L-Systemin identifiziert werden. Damit wurde

Ergebnisse

sowohl die N-, wie auch die C-terminale Spaltstelle bestätigt und die Freisetzung von L-Systemin nachgewiesen.

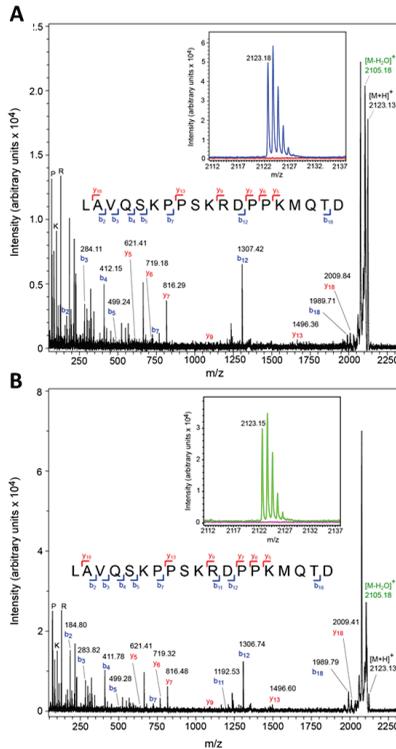


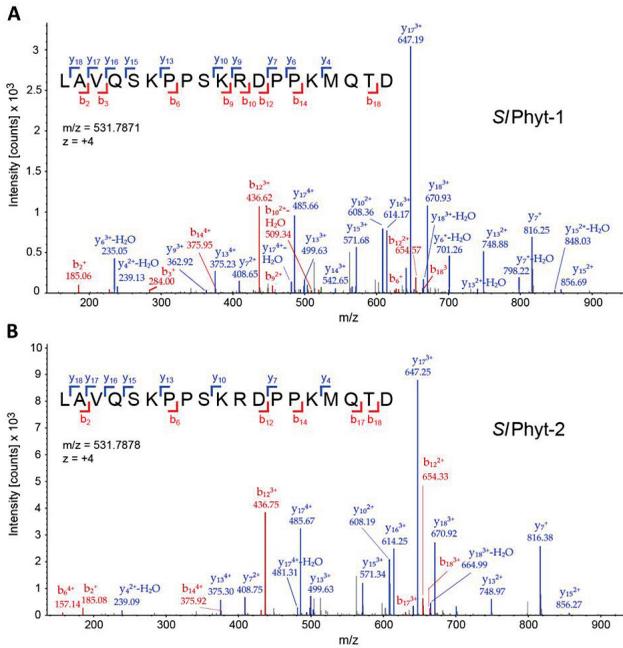
Abbildung 3.5: MALDI-ToF-ToF-MS Analyse von L-Systemin als Spaltprodukt von Prosystemin durch *SPhyt-1* und *SPhyt-2*.

WT-PS-GFP wurde mit den *SPhyt*asptasen verdaut, die in *N. benthamiana* Blättern exprimiert wurden. Die Fraktionen mit niedrigem Molekulargewicht (5 kDa cut off filter) dieser Ansätze wurden im MALDI-ToF-ToF Peptidmassenfingerprint analysiert, um die Peptide zu identifizieren, die nach der Inkubation mit *SPhyt-1* (**A**) und *SPhyt-2* (**B**) freigesetzt wurden. Der relevante Teil des Massenfingerprints wird in den Einschüben mit einem Massensignal von 2123 Da für *SPhyt-1* (**A**, blau) und *SPhyt-2* (**B**, grün) dargestellt, welcher nicht in den Ansätzen mit DM-PS detektiert werden konnte (rot bzw. magenta). In der anschließenden MS/MS Analyse wurde das Massensignal als L-Systemin identifiziert (Hauptfeld **A**, **B**). Die Identität und Sequenz von L-Systemin wurde durch die b- und y-



Ergebnisse

Ionen-Serien bestätigt, die blau bzw. rot dargestellt sind. Die neutrale Verlustreaktion von H_2O des Vorläuferions ist in grün dargestellt.



Ergebnisse

C	1	MGTPSYD	<u>IKN</u>	KGDDAQEEP	VKLHHEKGGD	EKEK	<u>II</u> EKET	PSQDINN	KDT	ISSYVLR	DDT
	61	<u>QE</u> IPKME	<u>H</u> EE	GGYVKEK	IVE	KETISQ	YIIK	IEGDDDA	QEK	LKVEYEE	EEY
	121	PSQDINN	KG	DAQEK	PVEH	EEGDDK	ETPS	QDIIRME	GEG	ALEITK	VVCE
	181	<u>QSKPP</u>	<u>SKRDP</u>	<u>PKMQ</u>	<u>TD</u> NNKL	KLAAAT	AGAQ	<u>EM</u> ASK	GEEELF	TGVVPI	LVEL
	241	VSGEGEG	DAT	YGKLT	LKFC	TTGKLP	VFPW	TLVTTLC	YGV	QCFSRY	PDHM
	301	<u>PE</u> GYQ	<u>ERTI</u>	<u>FF</u> KDD	GNYKT	RAEVK	FEGDT	LVRNIE	LKGI	<u>DF</u> KED	GNILG
	361	NVYIMAD	KQK	NGIKV	NFKTR	<u>HN</u> IED	GSVQL	<u>AD</u> HYQ	QNTPI	<u>GD</u> GPV	LLP
	421	KDPNEKR	DHM	VLLEF	VTAAG	ITHGM	DELYN	GAGGTE	LEHH	HHHH	
D	1	MGTPSYD	<u>IKN</u>	KGDDAQEEP	VKLHHEKGGD	EKEK	<u>II</u> EKET	PSQDINN	KDT	ISSYVLR	DDT
	61	<u>QE</u> IPKME	<u>H</u> EE	GGYVKEK	IVE	KETISQ	YIIK	IEGDDDA	QEK	LKVEYEE	EEY
	121	PSQDINN	KG	DAQEK	PVEH	EEGDDK	ETPS	QDIIRME	GEG	ALEITK	VVCE
	181	<u>QSKPP</u>	<u>SKRDP</u>	<u>PKMQ</u>	<u>TD</u> NNKL	KLAAAT	AGAQ	<u>EM</u> ASK	GEEELF	TGVVPI	LVEL
	241	VSGEGEG	DAT	YGKLT	LKFC	TTGKLP	VFPW	TLVTTLC	YGV	QCFSRY	PDHM
	301	<u>PE</u> GYQ	<u>ERTI</u>	<u>FF</u> KDD	GNYKT	RAEVK	FEGDT	LVRNIE	LKGI	<u>DF</u> KED	GNILG
	361	NVYIMAD	KQK	NGIKV	NFKTR	<u>HN</u> IED	GSVQL	<u>AD</u> HYQ	QNTPI	<u>GD</u> GPV	LLP
	421	KDPNEKR	DHM	VLLEF	VTAAG	ITHGM	DELYN	GAGGTE	LEHH	HHHH	

Abbildung 3.6: Identifizierung der C-terminalen Spaltstelle und von L-Systemin als Spaltprodukt von Prosystemin durch *S*/Phyt-1 und *S*/Phyt-2 mittels NanoLC-ESI-MS/MS Analyse.

Prosystemin wurde mit rekombinantem *S*/Phyt-1 (A) oder *S*/Phyt-2 (B) inkubiert und die Spaltprodukte wurden durch NanoLC-ESI-MS/MS analysiert. Die C-terminale Spaltstelle, endend auf MQTD, und das N-terminale Leucin wurde in beiden Ansätzen identifiziert. Die Sequenz und Identität wurde durch die b- und y-Ionen-Serien, dargestellt in rot und blau, bestätigt. Die identifizierten Peptide werden für *S*/Phyt-1 (C) und *S*/Phyt-2 (D) in der Sequenz von WT-PS-GFP rot dargestellt. Aspartate, nach denen gespalten wurde, sind blau markiert, L-Systemin unterstrichen und das in A und B dargestellte Peptid ist grün gefärbt.

Bei einem in gleicher Weise durchgeführten Verdau von DM-PS-GFP konnten keine Peptide identifiziert werden, deren Masse einem aspartatspezifischen Spaltprodukt von Prosystemin entsprachen (Abb. A.2, B, Anhang). Diese Ergebnisse zeigen, dass *S*/Phyt-1 und -2 dazu in der Lage sind, L-Systemin und nicht Systemin *in vitro* aus Prosystemin freizusetzen, wobei die Spaltung die flankierenden Aspartate D-2 und/oder D18 erfordert.

3.1.5. Identifizierung der Spaltstellen *in vivo*

Um zu untersuchen, ob eine aspartatspezifische Spaltung von Prosystemin durch *S*/Phyt-1 und -2 nicht nur unter kontrollierten Bedingungen *in vitro*, sondern auch *in vivo*, stattfindet wurden die beiden Proteasen transient in N.

benthamiana mit WT- oder DM-PS-GFP koexprimiert. Um die Expression der Phytaspen zu bestätigen, wurden durch Zellwandextraktion (apoplastic wash) die apoplastischen Proteine isoliert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Beide Phytaspen konnten hierdurch bei ca. 75 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.7 A). Weiterhin wurde im Apoplast mit WT-PS-GFP ein GFP-assoziiertes Spaltprodukt mit ca. 30-35 kDa, das bereits schon in den *in vitro* Versuchen erschienen ist (Abb. 3.3 B), in allen Proben identifiziert (Abb. 3.7 B Pfeile). Dies war *in vivo* aber auch für DM-PS-GFP der Fall. Daher mussten die genauen Spaltstellen massenspektrometrisch identifiziert werden, da bei einer ektopischen Überexpression auch andere Proteasen die Fusionsproteine unspezifisch spalten können, mit denen sie unter physiologischen Bedingungen nicht in Kontakt kämen. Um die Spaltstellen zu identifizieren, wurden diese Spaltprodukte von PS aus den apoplastischen Extrakten mithilfe des angehängten GFP immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.7 B) und die identifizierten Spaltprodukte aus dem Gel isoliert.

Ergebnisse

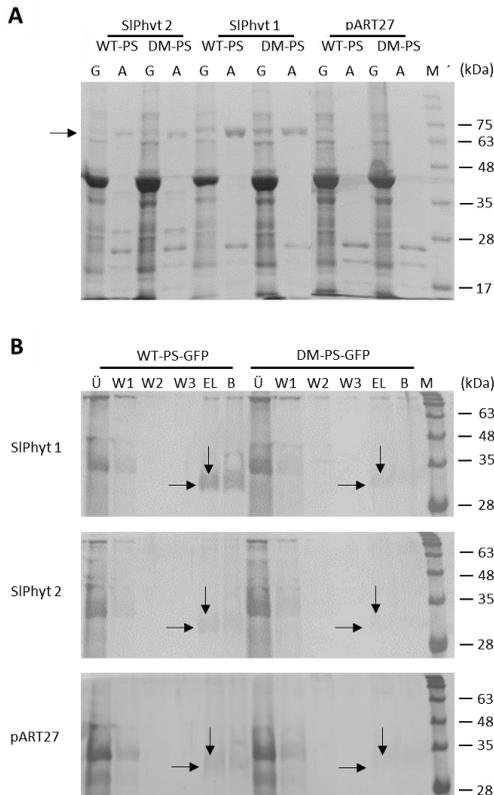


Abbildung 3.7: Koexpression von *S*Phyt-1/2 mit WT- bzw. DM-PS-GFP und Aufreinigung des C-terminalen Spaltprodukts über GFP-Immunopräzipitation.

PS-Fusionsproteine wurden transient mit *S*Phyt-1/-2 in *N. benthamiana* koexprimiert und die C-terminalen Spaltprodukte immunpräzipitiert. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Gel extrahiert, tryptisch verdaut und die Peptide durch NanoLC-ESI-MS/MS analysiert. **(A)** Transiente Expression von *S*Phyt-1 und -2 mit WT- bzw. DM-PS-GFP in *N. benthamiana* und Isolierung des apoplastischen Extrakts. Unspezifische Anfärbung der Proteine aus Gesamtextrakt (G), und Apoplast (A) mit Coomassie Brilliant Blue. **(B)** Unspezifische Anfärbung der Proteine aus der GFP-Immunopräzipitation Überstand (Ü), Waschschritte (W1-W3), Eluat (E) und Proteinrückstände auf den Agarose-Beads (B) mit Coomassie Brilliant Blue. *S*Phyt-1/-2 (Pfeil Abb. A) und Spaltprodukte (Pfeile Abb. B) sowie Markerproteine (kDa) wurden gekennzeichnet.



Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob man die Spaltstellen von PS in diesen Präzipitaten nachweisen kann, wurden diese tryptisch verdaut. Tryptische Peptide mit der Sequenz von Systemin konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was beweist, dass der Vorläufer C-terminal gespalten wurde. Eine solche C-terminale Spaltung für DM-PS-GFP wurde dagegen weder für *S/Phyt-1* noch für *S/Phyt-2* beobachtet. In beiden Fällen enthielt das über GFP präzipitierte Spaltprodukt Peptide, die aus Systemin und Bereichen des Vorläufers stammen und die N-terminal der Spaltstelle liegen. Auch die Spaltung an D-2 wurde durch Substitution mit Ala in DM-PS-GFP verhindert. Sowohl für *S/Phyt-1* als auch *S/Phyt-2* wurden Peptide identifiziert, die eine Spaltstelle beinhalten (Abb. 3.8). Diese Befunde zeigen, dass D-2 und D18 auch *in vivo* für eine Spaltung durch die *S/Phyts* nötig sind.

Ergebnisse

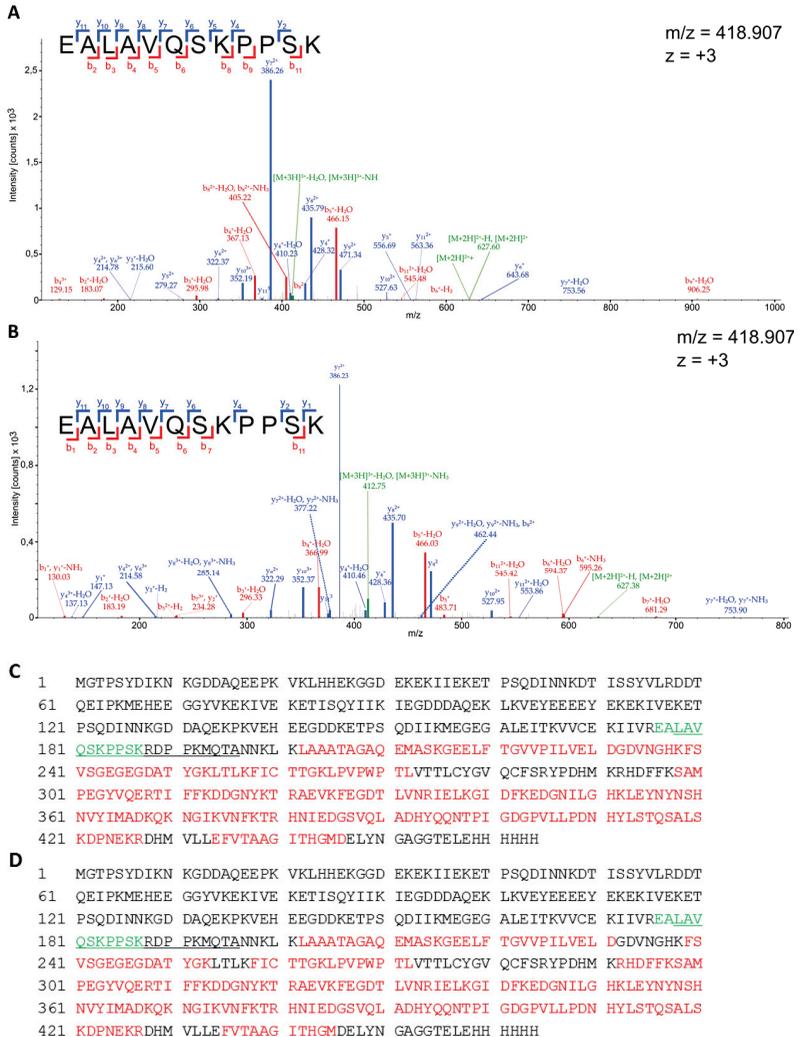


Abbildung 3.8: Keine Spaltung von mutiertem PS nach Koexpression von *S*/Phyt-1/-2 mit DM-PS-GFP.

Das Spaltprodukt aus der GFP-Immunopräzipitation von DM-PS-GFP wurde tryptisch verdaut und die Peptide durch NanoLC-ESI-MS/MS analysiert. Sowohl bei *S*/Phyt-1 (B), wie auch *S*/Phyt-2 (A) wurden Peptide identifiziert, die den N-Terminus und die

Ergebnisse

substituierte Spaltstelle von PS vollständig zeigen. Der Neutralverlust von NH_3 ist in grün dargestellt. Die Identität und Sequenz der Peptide wurde durch die b- und y-Ionenserien bestätigt, welche rot bzw. blau dargestellt sind. Die identifizierten Peptide werden für *S*Phyt-2 (**C**) und *S*Phyt-1 (**D**) in der Sequenz von DM-PS-GFP rot dargestellt. L-Systemin ist unterstrichen und das in **A** und **B** dargestellte Peptid ist grün gefärbt.

3.1.6. Identifizierung der C-terminalen Spaltstelle *in vivo*

Für eine Identifizierung der C-terminalen Spaltstelle wurde das Präzipitat aus der GFP-Immunoprecipitation von WT-PS-GFP mit *S*Phyt-1 (Abb. 3.7 B) und Glu-C (Glutamil-Endopeptidase) verdaut, da eine tryptische Spaltung Peptide generiert, die zu klein sind, um den C-Terminus massenspektrometrisch zu bestimmen. Für diesen Verdau wurde eine höhere Menge an Spaltprodukt benötigt, als dies für Trypsin der Fall war. Deshalb war diese Analyse nur für *S*Phyt-1 möglich, da mit *S*Phyt-2 nicht ausreichend Spaltprodukt generiert wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine Spaltung durch *S*Phyt-1 wesentlich effizienter erfolgt und deshalb mehr apoplastisches Spaltprodukt vorhanden ist.

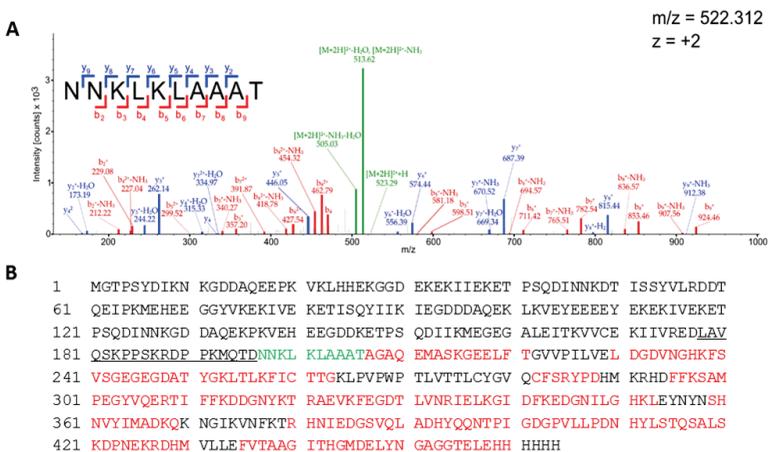


Abbildung 3.9: Identifikation der C-terminalen Spaltstelle von PS nach Koexpression von *S*Phyt-2 mit WT-PS-GFP.

Ergebnisse

Das sekretierte Spaltprodukt aus der GFP-Immunopräzipitation von WT-PS-GFP wurde mit Glu-C verdaut und die Peptide durch NanoLC-ESI-MS/MS analysiert. Der komplette C-Terminus von PS und der Linker zu GFP konnten identifiziert werden. Der Neutralverlust von NH_3 ist in grün dargestellt. Die Identität und Sequenz der Peptide wurde durch die b- und y-Ionenserien bestätigt, welche rot bzw. blau dargestellt sind. Die identifizierten Peptide werden in der Sequenz von WT-PS-GFP rot dargestellt. L-Systemin ist unterstrichen und das in (A) dargestellte Peptid ist grün gefärbt.

In Abbildung 3.9 sieht man, dass ein Peptid bestehend aus den vier der D18 Spaltstelle folgenden Aminosäuren (NNKL) und dem N-Terminus von GFP (KLAAAT) bei der Ko-Expression von WT-PS-GFP mit *S*Phyt-1 generiert wurde.

WT-PS-GFP ist also von *S*Phyt-1 nach D18 gespalten worden. Diese C-terminale Spaltung wurde bei DM-PS-GFP weder für *S*Phyt-1, noch für *S*Phyt-2 beobachtet (Abb.3.8). Die Spaltung von WT-PS-GFP erfolgt also aspartatabhängig.

3.2. Aktivität von Systemin, L-Systemin und Prosystemin

3.2.1. Aktivität von PS und DM-PS *in vivo*

Im Weiteren wurde untersucht, ob die Prozessierung von Prosystemin an D-2 und D18 auch notwendig für die Aktivität des Wundsignalmoleküls Systemin ist. Dabei wurde ein Biotest eingesetzt, um die Aktivität von Prosystemin, einem Fusionsprotein von Prosystemin mit GFP, und der D-2/A, D18/A Doppelmutante des Fusionsproteins zu vergleichen. Drei Wochen alte Tomatenkeimlinge wurden an der Basis des Hypokotyls abgetrennt und die Polypeptide (5 nM) über den Transpirationsstrom zugefüttert. Es ist bereits bekannt, dass Prosystemin, wie auch Systemin hier die Induktion von Abwehrsignalwegen auslöst (Dombrowski et al., 1999; Li et al., 2003). Als „read-out“ des Biotests wurde die Induktion von Proteinaseinhibitor II (PI-II), einem Marker gen der Wundantwort, analysiert. Acht Stunden nach Zufütterung der Peptide wurde die Expression von Proteaseinhibitor II

mittels quantitativer RT-PCR analysiert und mit den jeweiligen Kontrollen, die nur das Lösungsmittel ohne Peptid zugefüttert bekamen, verglichen. Die Behandlung von Tomatenpflanzen mit Prosystemin führte zu einer zehnfachen Induktion der PI-Expression (Abb. 3.10 A) was darauf hindeutet, dass Prosystemin entweder *per se* aktiv ist, oder aber effizient prozessiert wird, um aktives Systemin während des Fütterungsprozesses freizusetzen. Dasselbe scheint auch für PS-GFP zu gelten, welches sich hinsichtlich seiner PI-II induzierenden Aktivität nicht signifikant von PS unterscheidet (Abb. 3.10 A). Hingegen ging bei DM-PS-GFP die PI-II induzierende Aktivität nahezu vollständig verloren (Abb. 3.10 A). Die Daten weisen darauf hin, dass eine Prozessierung von Prosystemin an D-2 und D18 für die Aktivierung tatsächlich erforderlich ist, und sie stehen weiterhin in Einklang mit einer Rolle von *S/Phyt-1* und/oder *S/Phyt-2* bei der Freisetzung von Systemin aus seinem Vorläufer.

Die Aktivität von DM-PS wurde nun auch in einem sogenannten Alkalinisierungstest, einer Messung der Systemin-induzierten pH-Änderung im Medium von *S. peruvianum* Zellen (Schaller and Oecking 1999; Holton et al., 2007), mit der von PS verglichen (Abb. 3.10 B). Es ist bekannt, dass das Peptidhormon Systemin in der Tomate nach Rezeptorbindung an der Plasmamembran die Ionenpermeabilität ändert. Dies führt zur Depolarisierung der Plasmamembran und zu einer Alkalinisierung des extrazellulären Milieus. Die daraus resultierende Alkalinisierung des Kulturmediums lässt sich leicht in Zellsuspensionskulturen von *S. peruvianum* (Schaller and Oecking, 1999) und *L. pinellifolium* (Holton et al., 2007) messen. Auch PS löst in Zellkulturen die Alkalinisierungsreaktion aus (Vetsch et al., 2000). Dabei ist bisher unklar, ob es PS selbst ist, was die Reaktion auslöst, oder ob PS erst durch Proteasen im Kulturmedium gespalten wird, um Systemin freizusetzen. Dies sollte sich durch einen Vergleich der Aktivität von PS und DM-PS entscheiden lassen. In der Dosis-Antwort-Kurve in Abbildung 3.10 B kann man sehen, dass die halbmaximale Aktivität (EC_{50}) von PS bei 11,4 nM liegt, die von DM-PS um den Faktor 10 höher bei 147,5 nM. Dies bestätigt, dass eine Reifung von Systemin nötig ist und dass diese die

beiden flankierenden Aspartate erfordert. Ein vollständiger Aktivitätsverlust war allerdings nicht zu beobachten. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass trotz der Inaktivierung der Asp-Spaltstellen eine Prozessierung an anderer Stelle (durch andere Proteasen) erfolgt und Systemin dennoch freigesetzt wird. Möglich wäre auch, dass es im PS Vorläufer neben Systemin noch weitere wundinduzierende Signale gibt, die in der Lage sind, die Alkalinisierungsreaktion auszulösen oder dass der Vorläufer *per se* schon aktiv ist.

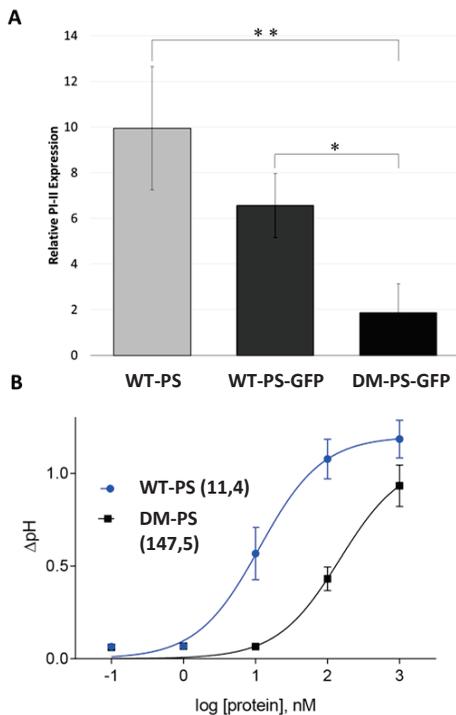


Abbildung 3.10: Die aspartat-spezifische Prozessierung von Prosystemin (PS) wird für die Systemin-induzierte Wundantwort benötigt.

(A) Aktivierung der PI-II Genexpression in Blättern von zwei Wochen alten Tomatenpflanzen, die über den abgeschnittenen Stengel mit einer 5 nM Lösung von wildtypischem PS (WT-PS/WT-PS-GFP) oder seiner doppelt mutierten Form (DM-PS-

Ergebnisse

GFP, D18/1 und D-2/A) in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH: 6,5 oder mit Puffer (Kalibrator, relative Quantität=1) allein behandelt wurden. Die Gesamt-RNA wurde 8h nach der Behandlung isoliert, revers transkribiert und der relative Anstieg an PI-II mRNA durch quantitative Real-Time PCR bestimmt. Acht Proben wurde je Behandlung analysiert und der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Dargestellt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$ zu DM-PS-GFP, Students t-test. **(B)** Vergleich der Aktivität von Prosystemin (PS, blau) und seiner doppelt mutierten Form (DM PS, schwarz) mithilfe von kultivierten *S. peruvianum* Zellen. Die Alkalinisierungsantwort im Medium der *S. peruvianum* Zellen wurde durch kontinuierliche pH-Messung erfasst. Der maximale pH-Anstieg im Medium nach der Peptidzugabe (Δ pH) wird gegen den \log_{10} der Peptidkonzentration (in nM) dargestellt. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von mindestens drei Replikaten +/- Standardabweichung. Die Konzentration, bei der die halb-maximale Aktivität ermittelt wurde, wird in Klammern gezeigt (in nM).

3.2.2. Die Relevanz Spaltung nach D-2 für die Aktivität *in vivo*

Im Abschnitt 3.3.1 wurde gezeigt, dass eine Spaltung von Prosystemin an D-2 und D18 ausreichend ist, um ein aktives Wundsignal zu generieren. Spaltung an diesen Stellen führt aber nicht zu Systemin selbst, sondern zu einem Peptid, das N-terminal um die Aminosäure Leucin verlängert ist (L-Systemin). Da die Phytaspase-vermittelte Prozessierung von PS L-Systemin und nicht Systemin generiert, wurde nun untersucht, ob L-Systemin selbst fähig ist, Verteidigungssignalwege in Tomatenpflanzen zu induzieren oder ob es zusätzlich einer N-terminalen Verkürzung bedarf. Zu diesem Zweck wurden die biologischen Aktivitäten von Systemin und L-Systemin verglichen.

Zunächst wurde die Aktivität von L-Systemin und Systemin im Fütterungsversuch verglichen (Abb. 3.11 A). Die synthetischen Peptide wurden jungen Tomatenpflanzen über das abgeschnittene Hypocotyl zugeführt und acht Stunden später wurde die Induktion der PI-II mRNA über qRT-PCR Analyse gemessen.

Die Zugabe von Systemin resultierte in der erwarteten Dosis-abhängigen Hochregulierung des PI-II mRNA Spiegels (Abb. 3.11 A). Die Behandlung mit L-Systemin verursachte auch einen Dosis-abhängigen Anstieg der PI-II Genexpression, obwohl eine ca. 100-fach höhere Konzentration von L-



Ergebnisse

Systemin benötigt wurde, um einen Geninduktionsspiegel zu erreichen, der vergleichbar mit dem von Systemin war.

Die Aktivität von L-Systemin und Systemin wurde auch in der Alkalinisierungsreaktion verglichen (Abb. 3.11 B).

Die halbmaximale Aktivität (EC_{50}) wurde für Systemin bei 2,57 nM und bei L-Systemin bei 78,69 nM erreicht. Die Aktivität von Systemin im Alkalinisierungsassay ist somit 30-fach höher als die von L-Systemin.

Dies deutet darauf hin, dass trotz der geninduzierenden Aktivität von L-Systemin, eine N-terminale Verkürzung benötigt wird, um das vollständig aktive Peptidhormon zu erhalten. Ein Kandidat unter den Enzymen für diese N-terminale Verkürzung ist eine Leucin-Aminopeptidase, deren Gen im Verlauf der Verwundungsreaktion aktiviert wird (Chao et al., 1999) und welche relevant für die PI-II Induktion und die Verteidigung gegen herbivore Frassfeinde ist (Fowler et al., 2009).

Ergebnisse

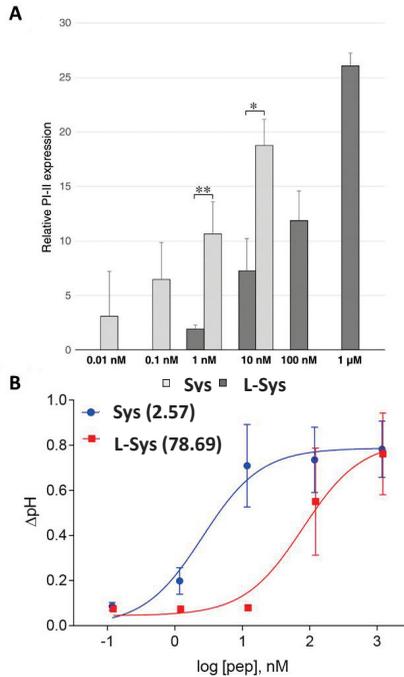


Abbildung 3.11: L-Systemin ist weniger aktiv als Systemin.

(A) Zwei Wochen alte Tomatenpflanzen wurden über das abgetrennte Hypocotyl mit Systemin (Sys) oder L-Systemin (L-Sys), gelöst in Kaliumphosphatpuffer in den angegebenen Konzentrationen, behandelt. Die Gesamt-RNA wurde 8h nach der Behandlung isoliert, revers transkribiert und der relative Anstieg an PI-II mRNA durch quantitative Real-Time PCR bestimmt. Die Induktion wird relativ zur Pufferkontrolle gezeigt. Die Werte repräsentieren den Mittelwert von drei biologischen Replikaten +/- SD. Signifikante Unterschiede zwischen Systemin und L-Systemin laut student's t-test: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. (B) Vergleich der Aktivität von Systemin (Sys, blau) und L-Systemin (L-Sys, rot) mithilfe von kultivierten *S. peruvianum* Zellen. Die Alkalinisierungsantwort im Medium der *S. peruvianum* Zellen wurde durch kontinuierliche pH-Messung erfasst. Der maximale pH-Anstieg im Medium nach der Peptidzugabe (Δ pH) wird gegen den \log_{10} der Peptidkonzentration (in nM) dargestellt. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert

Ergebnisse

von mindestens drei Replikaten +/- SD. Die Konzentration, bei der die halb-maximale Aktivität ermittelt wurde, wird in Klammern gezeigt (in nM).

3.2.3. Die Relevanz der Spaltung nach D18 für die Aktivität *in vivo*

Um die Bedeutung der Prozessierung am C-Terminus (D18) für die Peptidhormonaktivierung zu verifizieren wurde ein C-terminal um vier Aminosäuren (NNKL) verlängertes Systemin-Derivat synthetisiert, was dem exakten C-Terminus von PS entspricht (Abb. 3.12 A). Im Alkalinisierungsversuch mit *S. peruvianum* Zellen induzierte dieses verlängerte Systemin Derivat ähnlich des natürlichen Systemins, mit einer halbmaximalen Aktivität von 2,4 nM (Abb. 3.12 B). Wenn jedoch die Peptidbindung zwischen D18 und N19 durch Methylierung des Amidstickstoffs resistent gegenüber einer Proteasespaltung gemacht wurde (Schaller, 1998), war die Aktivität des verlängerten Systemin Derivats schwer beeinträchtigt und mit einer halbmaximalen Aktivität von 118,3 nM ca. 50-fach schwächer (Abb. 3.12 B).

Ergebnisse

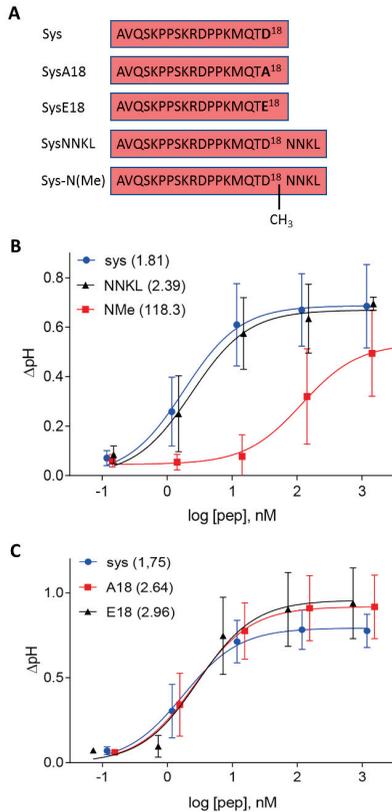


Abbildung 3.12: Die Spezifität des C-terminalen Aminosäurerests und der spaltbaren C-terminalen Verlängerung für die Systemin Aktivität.

(A) Schematische Repräsentation der Peptide, die in diesen Experimenten benutzt wurden. Die Sequenz von Systemin und seine Modifikation werden gezeigt (verändert nach Beloshistov et al, 2017). Die Bioaktivität von Systemin und Systemin-Derivaten wurde unter Anwendung der Alkalinisierungsantwort von kultivierten *S. peruvianum* Suspensionszellen verglichen. Der maximale Anstieg des pHs im Medium nach der Peptidzugabe (ΔpH) ist gegen den \log_{10} der Peptidkonzentration aufgetragen (in nM). Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte von mindestens vier Replikaten \pm Standardabweichung. Die Konzentration, bei der die halbmaximale Aktivität erreicht wurde, wird in Klammern dargestellt (in nM). (B) Die Aktivität von Systemin verglichen mit den D18-substituierten Derivaten. $n=9, 8$ und 7 für Systemin (Sys) und die Glu (E18)

Ergebnisse

und Ala (A18) substituierten Derivate. (C) Die Aktivität von Systemin verglichen zu dem C-terminal verlängerten und N-methylierten Derivaten. n= 5, 4 und 4 für Systemin (Sys), Systemin mit vier zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus (NNKL) und dem C-terminal verlängerten Peptid, das an der D18-N19 Bindung (NMe) methyliert ist.

Bisher ist aus der Literatur bekannt, dass die Systeminsequenz die einzige Region von PS sein soll, die essentiell für die Wundantwort ist (Dombrowski et al., 1999). Da die D-2/A Mutation außerhalb dieser Region liegt, ist es unwahrscheinlich, dass die Systemin Aktivität durch eine Veränderung dieser Spaltstelle beeinflusst wird. Auf der anderen Seite von Systemin verändert die D18/A Mutation den C-terminalen Aminosäurerest von Systemin selbst und deshalb könnte eine Mutation in Systemin auch einen Effekt auf die Aktivität haben, der nicht auf einen Defekt in der PS Prozessierung zurückzuführen ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die biologische Aktivität von Systemin verloren geht, wenn die terminale Aminosäure am COOH-Ende beseitigt wird (Pearce et al., 1991). Um auszuschließen, dass die verminderte Aktivität von DM-PS auf die Substitution des C-terminalen Aspartats, und nicht auf einen Verlust der Prozessierung zurückzuführen ist, wurde eine Reihe von Systemin-Mutanten synthetisiert und hinsichtlich ihrer Aktivität getestet. Bezeichnet wurden diese als Systemin-A18 und Systemin-E18, welche Ala- bzw. Glu- Substitutionen am C-terminalen Aspartat-Rest haben (Abb. 3.12 A). Die biologische Aktivität dieser Peptide wurde in dem vorher erwähnten Tomaten- (*S. peruvianum*) Zellkulturversuch verglichen. Wieder wurde eine Systemin-induzierte Medium-Alkalinisierung mit halbmaximaler Aktivität von 1,8 nm (Abb. 3.12 C) beobachtet. Die Antwort der kultivierten Zellen auf die Zugabe von Systemin-A18 und Systemin-E18 war quantitativ ähnlich, wie die von Systemin (Abb. 3.12 C). Dies zeigt, dass der C-terminale Aminosäurerest ohne Aktivitätsverlust substituiert werden kann. Diese Schlussfolgerung ist übereinstimmend mit früheren Experimenten, in denen gezeigt wurde, dass die PI-II induzierende Aktivität von Systemin nur unwesentlich von der Substitution des C-terminalen Aspartat zu Alanin beeinflusst wird (Pearce et al., 1993). Zusammengefasst deuten die hier dargelegten Ergebnisse für die PS-Mutanten und die synthetischen Systemin-Derivate darauf hin, dass die

Prozessierung des Systemin-Vorläufers an den Phytaspase Spaltstellen *in vivo* benötigt wird, um die biologische Aktivität des Wundhormons Systemin auszulösen.

3.2.4. Aktivität von PS in *S/Phyt-1*-überexprimierenden und *S/Phyt-1/2*-defizienten Pflanzen

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob *S/Phyt-1* und/oder -2 auch zur Prozessierung von PS in der Tomate in der Lage sind und ob diese Prozessierung für die Wundreaktion erforderlich ist. Für diesen Zweck wurden *S/Phyt-1* und -2 defiziente und *S/Phyt-1* überexprimierende Pflanzen verwendet, da *S/Phyt-1*, im Vergleich zu *S/Phyt-2*, mehr PS-Spaltprodukt im Apoplasten bei der Ko-Expression mit WT-PS-GFP anreicherte. Die entsprechenden transgenen RNAi- und überexprimierenden Pflanzen wurden von Sven Reichardt in einem parallelen Projekt erstellt.

Die Aktivität von WT-PS in den verschiedenen Genotypen wurde im Fütterungsversuch verglichen (Abb. 3.13). WT-PS 15 (10nM) wurde jungen Tomatenpflanzen über den abgeschnittenen Stengel zugeführt und acht Stunden später wurde die Induktion der PI-II mRNA über qRT-PCR Analyse gemessen.

Ergebnisse

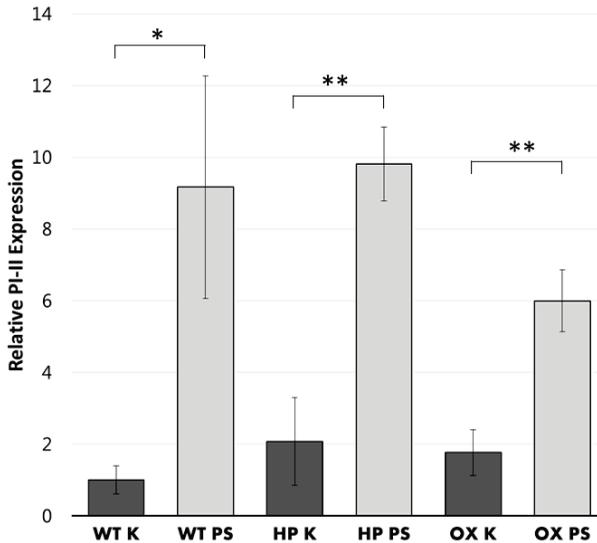


Abbildung 3.13: *SPhyt-1*-überexprimierende oder *SPhyt-1/2*-defiziente Tomatenpflanzen sind in ihrer Reaktion auf PS unverändert.

Zwei Wochen alte wildtypische (WT), *SPhyt-1*-überexprimierende (OX; Linie 461-33) oder *SPhyt-1/2*-defiziente (HP, Linie 1-1) Tomatenpflanzen, je vier vereinigt, wurden über den abgeschnittenen Stiel mit 10 nM WT-PS, gelöst in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH. 6,5, behandelt. Die RNA wurde 8h nach der Behandlung isoliert und der relative Anstieg an PI-II mRNA durch qRT-PCR bestimmt. Die Induktion wird relativ zur Pufferkontrolle gezeigt. Paarweiser t-test: * $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$. Die Werte repräsentieren den Mittelwert von fünf biologischen Replikaten +/- SD. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den wildtypischen, den Phytase-überexprimierenden oder -defizienten Pflanzen laut paarweisem t-test.

In Abbildung 3.13 werden PS behandelte wildtypische (WT) Tomatenpflanzen mit den behandelten *SPhyt-1* überexprimierenden (OX) bzw. *SPhyt-1/2*-defizienten Pflanzen (HP) verglichen. Zusätzlich wurden unbehandelte Pflanzen miteinander verglichen um eine konstitutive PI-II Expression und Wundantwort auszuschließen. Dies konnte bestätigt werden. In diesem Experiment konnten aber keine Unterschiede nach PS Behandlung beobachtet werden. Die Induktion von PI-II der *SPhyt-1*

überexprimierenden (OX) bzw. *SPhyt-1/2* defizienten (HP) Pflanzen war vergleichsweise zu denen des WT.

3.2.5. Die Aktivität von sukzessive deletiertem PS ohne Sys

Schon Ende der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde festgestellt, dass das Genom von höherer Organismen eine große Menge an sich wiederholenden Nukleotidsequenzen besitzt und dass diese einen Einfluß auf die Genregulation haben (Britten and Kohne, 1968; Britten and Davidson, 1969).

Bei näherer Betrachtung des Vorläufers PS konnten wir feststellen, dass dieser sich aus wiederholenden Elementen der Aminosäuresequenz zusammensetzt (Abb. 3.15 A). Aufwärts des N-terminalen Spaltmotifs von L-Systemin (VRED) konnten wir insgesamt fünf Aminosäurecluster identifizieren, die sich in insgesamt 3 Blöcken ähneln. Schon 1992 identifizierten McGurl und Ryan fünf Polypeptidsequenz Elemente bei der Charakterisierung von PS, die sich in regelmäßigen Abständen wiederholen. Diese sechs bis neun Aminosäuren-lange Peptidelemente erscheinen unvollständig und haben keinerlei Ähnlichkeiten mit dem einzigartigen Systemin (McGurl and Ryan, 1992). Dies legt die Vermutung nahe, dass sie aus sukzessiven Duplikations- oder Elongationsereignissen aus einem gemeinsamen Vorfahren evolviert sind (McGurl and Ryan, 1992).

Bei der neuen Unterteilung wurden die von McGurl and Ryan vorgeschlagenen Peptidelemente zwar in der Mitte unterbrochen, allerdings konnten mit dieser Unterteilung weitaus größere übereinstimmende Muster identifiziert werden. Was die Aufgabe dieser Elemente im Vorläufer ist und ob die biologische Aktivität dadurch beeinflusst wird, wurde im Folgenden analysiert (Masterarbeit Andre Jorzick 2015).

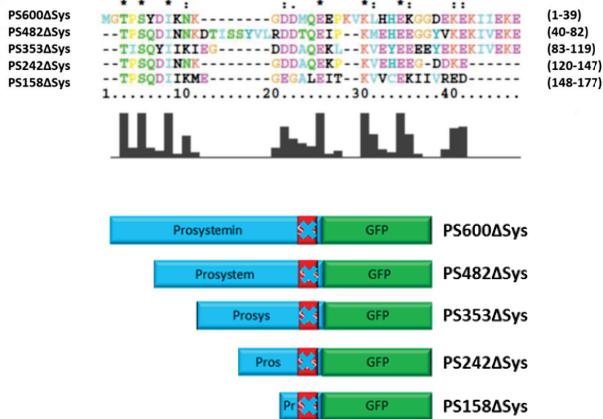
Um eine biologische Aktivität in Bezug auf die Wundantwort zu analysieren wurden zunächst die repetitiven Elemente in PS sukzessive deletiert, Systemin entfernt und an GFP-His₆ fusioniert. Nachdem die deletierten PS (Δ Systemin)-GFP-His₆ Fusionsproteine heterolog in *E. coli* exprimiert wurden, konnten sie



Ergebnisse

über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt werden (Masterarbeit Andre Jorzick 2015).

A



B

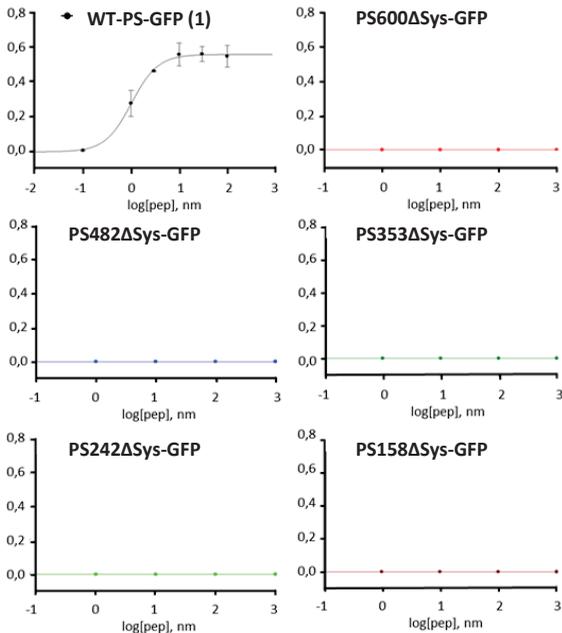


Abbildung 3.14: Die repetitiven Elemente von PS sind nicht in der Lage die Alkalinisierungsreaktion auszulösen.

(A) Clustal-X Alignment des Vorläufers von Systemin (Prosystemin) bis zur N-terminalen Spaltstelle des unreifen Peptidhormons L-Systemin (VRED). Prosystemin verfügt N-terminal der Systemin-Sequenz über fünf repetitive Elemente (PS158-PS600), die eine hohe Ähnlichkeit zueinander zeigen. Darunter werden die fünf Deletionsproteine schematisch dargestellt, die sukzessive um die repetitiven Elemente verkürzt und an GFP fusioniert wurden. Um eine Aktivität durch Systemin auszuschließen, wurde dieser Bereich deletiert.

(B) Vergleich der Aktivität der fünf sukzessive deletierten Prosysteminproteine ohne Systemin fusioniert an GFP (PS158 Δ Sys-GFP-PS600 Δ Sys-GFP) zu WT-PS-GFP mithilfe von kultivierten *S. peruvianum* Zellen. Die Alkalinisierungsantwort im Medium der *S. peruvianum* Zellen wurde durch kontinuierliche pH-Messung erfasst. Der maximale pH-Anstieg im Medium nach der Peptidzugabe (Δ pH) wird gegen den \log_{10} der Peptidkonzentration (in nM) dargestellt. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von mindestens drei Replikaten +/- Standardabweichung. Die Konzentration, bei der die halb-maximale Aktivität ermittelt wurde, wird in Klammern gezeigt (in nM), verändert nach A. Jorzick (2015).

Die Aktivität der Deletionskonstrukte wurde nun bei Suspensionszellen von *S. peruvianum* im Alkalinisierungsversuch mit der von wildtypischem PS (+Sys)-GFP verglichen. Die halbmaximale Aktivität (EC_{50}) wurde für WT-PS-GFP bei 1 nM erreicht und war damit vergleichbar mit den bisherigen Ergebnissen (Abb. 3.14 B). Jedoch konnte für keines der Deletionskonstrukte ohne Systemin eine Aktivität festgestellt werden (Abb. 3.14 B). Der pH des Mediums änderte sich auch bei hohen Konzentrationen von 1 μ M nicht. In Fütterungsversuchen mit jungen Tomatenpflanzen über den abgeschnittenen Stiel konnte auch keine Aktivität nachgewiesen werden (Masterarbeit Andre Jorzick., 2015), was dafür spricht, dass sich keine weiteren bioaktiven Peptide bezüglich der Wundantwort im Vorläufer PS befinden. Im Fall von PS scheinen also nicht mehrere Peptidhormone aus einem Vorläufer freigesetzt zu werden, wie dies bei Säugetieren häufig der Fall ist (Fisher and Scheller, 1988) und wie es auch schon in Tabak gezeigt wurde, wo aus einem einzigen Vorläufer zwei Peptidhormone prozessiert werden (Pearce et al., 2001).

Damit stellt sich die Frage, was die Funktion der repetitiven Elemente ist. Im Weiteren wird untersucht, ob sie eine Rolle bei der Sekretion des Peptidhormons Systemin in den extrazellulären Raum spielen.

3.3. Die Sekretionsprozesse von Systemin

3.3.1. Die Bedeutung der repetitiven Elemente für die Sekretion von Systemin

Eine Prozessierung von Prosystemin durch die Subtilasen *S*/Phyt-1 und/oder *S*/Phyt-2 würde eine Ko-Lokalisation im selben subzellulären Kompartiment erfordern. Eine solche ist aber nicht offensichtlich. Für die Phytaspen wird aufgrund des N-terminalen Signalpeptides eine extrazelluläre Lokalisation vorhergesagt (Chichkova et al, 2010). Diese konnte bereits durch transiente Expression in *N. benthamiana* bestätigt werden (Abb. 3.3 A). Aber auch eine Re-Lokalisation der Phytaspen vom Apoplast ins Cytoplasma konnte beobachtet werden (Chichkova et al, 2010). Systemin wird durch einen Rezeptor an der Zelloberfläche erkannt (Scheer and Ryan, 2002), sollte sich also ebenfalls im Apoplasten befinden. Prosystemin hat nun kein Signalpeptid. Es ist daher unklar wie Systemin den Apoplasten erreicht, und ob die Prozessierung möglicherweise erst nach Sekretion von PS extrazellulär erfolgt, oder ob es nach intrazellulärer Prozessierung zu einer Sekretion des reifen Systemins kommt. Falls die Sekretion ungeachtet des fehlenden Signalpeptids über den klassischen sekretorischen Weg erfolgen sollte, kann eine Prozessierung entweder im sekretorischen Weg (Palade, 1975) oder nach erfolgter Sekretion extrazellulär stattfinden. Um Einblicke in die Sekretion von (Pro)Systemin zu erhalten und eine mögliche Rolle der repetitiven Elemente zu adressieren wurden eine Reihe von N-terminal verkürzten PS-Deletionskonstrukten erstellt, die im Gegensatz zu 3.2.5, aber das Systemin Peptid behielten (Abb. 3.15, 1-5).

Weiterhin wurden zwei Konstrukte erstellt, die nur die Systemin-Sequenz einschließlich der flankierenden Spaltstellen, einmal mutiert und einmal

wildtypisch, beinhalten (Abb. 3.15, 6 und 7). Um eine Identifikation mittels Western-Blot Analyse zu gewährleisten, wurden alle Konstrukte N-terminal mit einem FLAG-Tag und C-terminal mit GFP markiert.

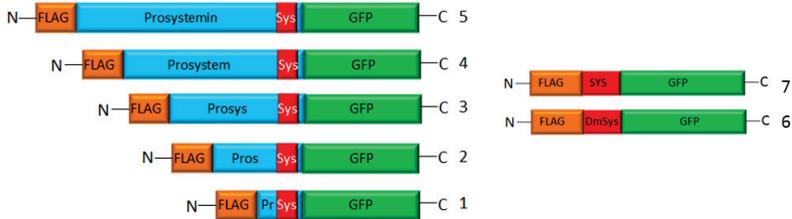


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der PS-Deletionskonstrukte, zum Nachweis der Prozessierung und Lokalisation *in planta*.

Prosystemin verfügt N-terminal der Systemin-Sequenz über fünf repetitive Elemente. Für die transiente Expression in Tabak wurden Konstrukte generiert, welche die Prosysteminsequenz sukzessiv um die identifizierten repetitiven Elemente verkürzten (links, Konstrukte 5 bis 1). Weiterhin wurden zwei Konstrukte erstellt welche nur die Systeminsequenz bzw. die Systeminsequenz mit den doppelmutierten flankierenden potenziellen Spaltstellen enthalten (rechts, Konstrukte 6 und 7). Alle Konstrukte beinhalten N-terminal einen FLAG- und C-terminal einen GFP-Tag.

Nach zunächst transienter Expression in *N. benthamiana* konnte nun festgestellt werden, welche Bereiche von PS die für die Sekretion relevante Information enthalten. Fünf Tage nach Infiltration der Konstrukte in *N. benthamiana* wurden Totalextrakte, symplastische und apoplastische Extrakte isoliert und mittels Western-Blot analysiert.

Als Kontrollen wurden wildtypisches PS-GFP und doppelmutiertes PS-GFP exprimiert, um eine Relevanz der Prozessierung für die Sekretion zu adressieren. Diese wurde ausgeschlossen (Abb. 3.16 A).

Die unprozessierten Kontrollen und Deletionskonstrukte wurden mit einem anti-GFP gerichteten Antikörper und einem anti-FLAG gerichteten Antikörper ausschließlich im Totalextrakt und im Symplasten nachgewiesen (Abb. 3.16 A, B). Extrazellulär, im Apoplasten, konnte dagegen für jedes der

Ergebnisse

Konstrukte, das zumindest eines der repetitiven Elemente Prosystemins enthält, ein C-terminales (GFP-enthaltendes) Spaltprodukt nachgewiesen werden (Abb. 3.16 A, B). Für die beiden Konstrukte ohne Elemente aus Prosystemin konnte dieses Spaltprodukt nicht detektiert werden (Abb. 3.16 B, links).

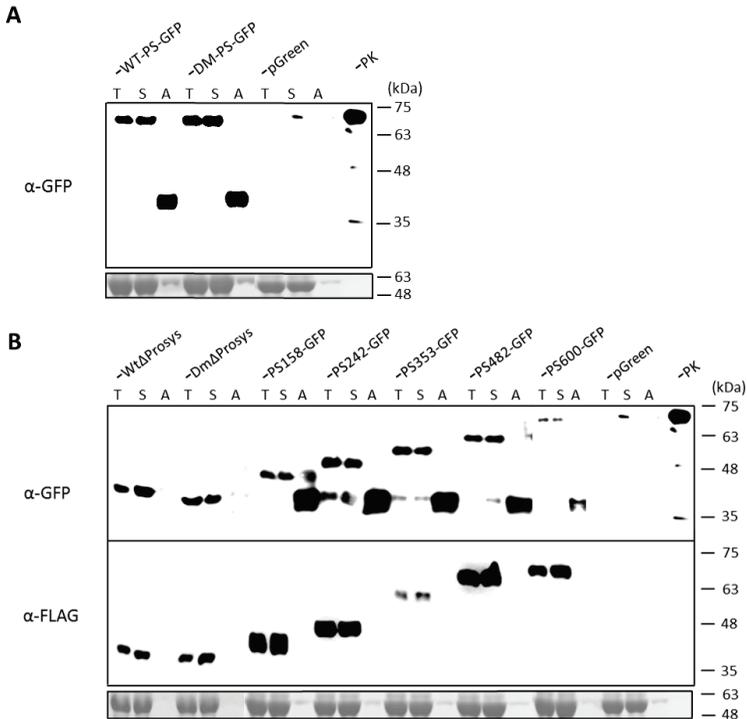


Abbildung 3.16: Immunospezifische Detektion der PS-Deletionskonstrukte mit GFP nach transienter Expression in Tabak.

(A) Transiente Expression von WT- und DM-PS-GFP in *N. benthamiana* und Extraktion des apoplastischen Extrakts. Nach Auftrennung der Proteine aus Gesamtextrakt (T), Symplast (S) und Apoplast (A) durch SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper in Verbindung mit einem sekundären goat-anti-rabbit IgG konjugierten HRP Antikörper über Chemilumineszenz detektiert, pGreen0029 (leerer Vektor) fungierte als Negativkontrolle.

Ergebnisse

(B) Transiente Expression der fünf Deletionskonstrukte (PS158-GFP bis PS-600-GFP), sowie wildtypisches (Wt Δ Proslys) und doppelt mutiertes (Dm Δ Proslys) Systemin fusioniert an GFP in *N. benthamiana* und Extraktion des apoplastischen Extrakts. Nach Auftrennung der Proteine aus Gesamtextrakt (T), Symplast (S) und Apoplast (A) durch SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und entweder mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper, wie unter (A) beschrieben, oder mit einem anti-FLAG Antikörper, der bereits Peroxidase konjugiert ist, nachgewiesen. Markerproteine (kDa) wurden gekennzeichnet und identische Gele, die mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt wurden, werden unter den Blots als Ladekontrolle für die Proteine gezeigt.

Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass die für die Sekretion erforderliche Information nicht in Systemin selbst, sondern in Elementen von Prosystemin enthalten ist.

Im gleichen Zusammenhang wurden die sukzessiv deletierten PS-Proteine an OPR1 fusioniert, welches hier als Reporterprotein dienen sollte. Die genaue physiologische Relevanz von OPR1 ist nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass es bei abiotischem und biotischem Stress eine Rolle bei der Entgiftung zytotoxischer Metabolite spielt, da es dort zu einer Hochregulierung kommt (Biesgen and Weiler, 1999; Stintzi et al., 2001; He et al., 2002; Strassner et al., 2002). Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation wurde festgestellt, dass es sich um ein cytosolisches Protein handelt (Strassner et al., 2002) das nicht in den Apoplasten sekretiert wird. Wenn Elemente in PS für die Sekretion verantwortlich sind, sollte es hier zu einem Nachweis von OPR1 im apoplastischen Raum kommen. Zunächst wurden die PS-OPR1-Deletionskonstrukte transient in *N. benthamiana* exprimiert. Drei Tage nach Infiltration der Konstrukte wurden Totalextrakte und apoplastische Extrakte isoliert. Als Kontrolle wurde OPR1 unter der Kontrolle des 35S-Promoters exprimiert. Die Expression der Volllänge PS-OPR1-Fusionsproteine, sowie die Überexpression von OPR1 konnte mit einem gegen OPR1 gerichteten Antiserum mittels Western-Blot im Totalextrakt nachgewiesen werden. Die PS-OPR1-Fusionsproteine wurden alle zwischen 48-70 kDa und OPR1 allein bei ca. 40 kDa mit dem erwarteten Molekulargewicht detektiert (Abb. 3.17 A, blaue Pfeile).

Ergebnisse

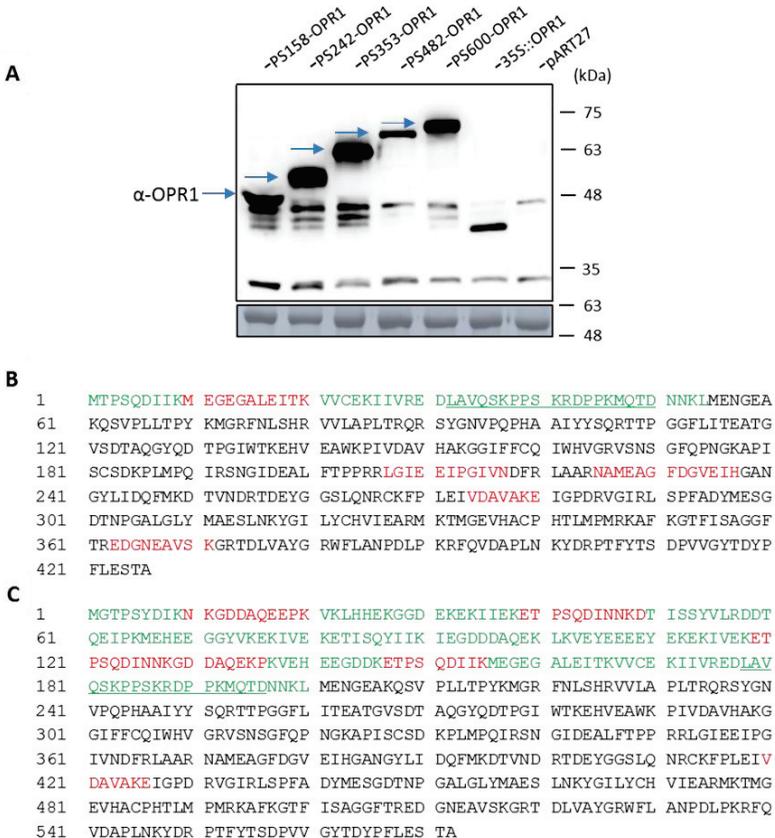


Abbildung 3.17: Immunospezifische Detektion der PS-Deletionskonstrukte mit OPR1 nach transienter Expression in Tabak.

(A) Transiente Expression der fünf Deletionskonstrukte von PS fusioniert an OPR1 (PS158-OPR1 bis PS-600-OPR1), sowie OPR1 unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten 35S-Promotors in *N. benthamiana* und Extraktion des Gesamtproteins. Nach Auftrennung der Proteine des Gesamtextrakts durch SDS-PAGE wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem anti-OPR1 Antiserum in Verbindung mit einem peroxidasegekoppelten zweiten Antikörper detektiert, pART27 (leerer Vektor) fungierte als Negativkontrolle. Ein identisches Gel, das mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt wurde, wird darunter als Ladekontrolle für die Proteine gezeigt. Die Position der

Ergebnisse

Markerproteine wird angezeigt und die Masse in kDa angegeben. Die apoplastischen Proteine von PS158-OPR1 (**B**) und PS600-OPR1 (**C**) wurden mit Trypsin verdaut und die Peptide durch NanoLC-ESI-MS/MS analysiert. Die verkürzte (**B**) bzw. vollständige (**C**) PS-Sequenz ist in grün dargestellt, L-Systemin unterstrichen und die Sequenz von OPR1 in schwarz. Die identifizierten Peptide sind rot gefärbt.

Um die Relevanz von PS für die Sekretion zu bestätigen wurden die apoplastischen Extrakte von PS158-OPR1 (mit nur einem repetitiven Element), PS-600-OPR1 (Volllänge-PS) und 35S-OPR1 tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. In Abbildung 3.17 sieht man, dass sowohl für PS158-OPR1 (B), wie für PS600-OPR1 (C) Peptide von PS, wie auch von OPR1 identifiziert werden konnten. In einem gleichzeitig durchgeführten tryptischen Verdau des apoplastischen Extrakts von OPR1 unter der Kontrolle des CaMV 35: S-Promoters konnten keine Peptide von OPR1 identifiziert werden. Dies bestätigt die Ergebnisse der PS-GFP Fusionsproteine, dass ein repetitives Element von PS ausreicht, um eine Sekretion zu ermöglichen.

3.4. **Charakterisierung von Tomatenpflanzen die WT- und DM-PS-EGFP konstitutiv exprimieren**

3.4.1. **Die funktionelle Relevanz der Prozessierung von PS *in vivo***

Hier wurde untersucht, ob die aspartatspezifische Spaltung von PS durch *S*Phyt-1 und/oder -2 in der Tomate notwendig ist für die Wundantwort und ob eine Substituierung der Spaltstellen diese Prozessierung verhindert und es zu einer verminderten oder gar keiner Wundantwort kommt. Als wichtiges Werkzeug wurden für diese Untersuchungen transgene Tomatenpflanzen benötigt, die WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP unter Kontrolle des 35S-Promoters überexprimieren.

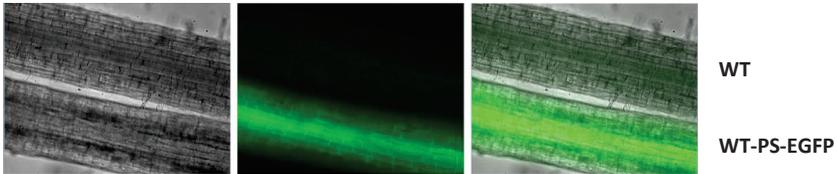


Abbildung 3.18: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der WT-PS-EGFP Überexpression in Wurzeln von jungen Tomatenpflanzen.

Die Wurzeln transgener 35S:PS-EGFP Tomatenpflanzen wurden am Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager Z.1, Software Axio Vision RS; Zeiss, Jena, Deutschland) auf EGFP Expression untersucht (Filtersatz 38HE; Zeiss). Die Vergrößerung ist 200x. Gezeigt ist die Hellfeld Aufnahme (links), der Fluoreszenzkanal (mitte) und die Überlagerung zweier Aufnahmen (Hellfeld und Fluoreszenzkanal).

Dafür wurden die Tomatenpflanzen (etiolierte Kotyledonen, *cv* UC82B) mit *A. tumefaciens* (GV3101+pSoup) mit den Konstrukten WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP im Vektor pGreen0029 unter der Kontrolle des dualen Blumenkohl Mosaik Virus (CaMV) 35S Promoters und Terminators, wie bei Bosch et al., 2014 beschrieben, transformiert und die Transformationsereignisse auf Kanamycin selektioniert (Durchgeführt von Jutta Babo). Als grüne Sprosse auftraten wurden diese vom restlichen Blattstück getrennt und in direkten Kontakt mit dem Selektionsmedium gebracht. Als die Sprosse ca. 2-3 cm groß waren, wurden sie auf Bewurzelungsmedium überführt. Nach ca. 2 Monaten wurden die regenerierten Pflänzchen auf Erde überführt und bis zur Samenbildung im Gewächshaus angezogen. Die Samen dieser Pflanzen wurden ausgesät und erneut bis zur Fruchtreife angezogen.

Zur Selektion homozygoter Linien wurden die Samen aus der zweiten Generation von jeweils 30-40 WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP überexprimierenden Tomatenpflanzen auf Kanamycin-haltigem Medium selektioniert. Auf diese Weise konnten für WT-PS-EGFP und für DM-PS-EGFP je drei unabhängige homozygote Linien isoliert werden. Alle drei WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP Linien zeigten eine starke Expression des Transgens (Abb. 3.19 A). Die Expression von WT-PS-EGFP ließ sich auch fluoreszenzmikroskopisch in den Wurzeln junger Tomatenpflanzen

nachweisen und ist konstitutiv in allen Geweben der Wurzel vorhanden (Abb. 3.18).

Um die Bedeutung der PS-Prozessierung an den Phyaspase-Spaltstellen für die Hochregulierung der Abwehr Genexpression weiter beurteilen zu können wurden die sechs transgenen Tomatenlinien herangezogen, die entweder das WT-PS-EGFP- oder das DM-PS-EGFP-Protein überexprimieren. In vorangegangenen Studien wurde bereits berichtet, dass eine Überexpression von PS, sogar ohne Verwundung, Rezeptor-ähnliche Proteinkinasen (RLK) hochreguliert, die eine Rolle in der angeborenen Immunität von Pflanzen besitzen (Bubici et al., 2017), die Resistenz gegenüber biotischem Stress steigert (Coppola et al., 2015; Chen Chen et al., 2016) und die Expression von wundinduzierbaren Genen, wie Proteinase Inhibitor II, in der Tomate konstitutiv hochreguliert (McGurl et al., 1992, Mc Gurl et al. 1994). Dies bestätigte sich hier ebenfalls für die Überproduktion von WT-PS-EGFP, die zu einer über 200-fach erhöhten PI-II Genexpression führte (Abb. 3.19 B). Im Gegensatz dazu hatte die transgene Überproduktion von DM-PS-EGFP fast keinen Effekt auf die PI-II Genexpression (Abb. 3.19 B).

Ergebnisse

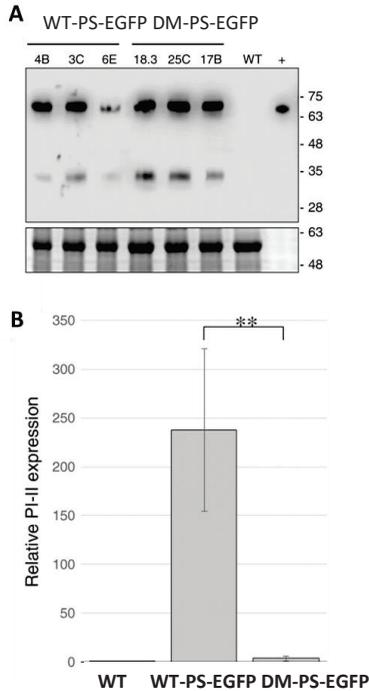


Abbildung 3.19: Die Spaltung von PS an den Phytaspase-Spaltstellen wird für die Wundsignalweiterleitung benötigt.

(A) Western Blot Analyse der WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP Expression in transgenen Tomatenpflanzen. Proteinextrakte (10 µg Gesamtprotein) von drei unabhängigen transgenen Linien (Bezeichnung oberhalb der Spur) wurden durch eine 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Immunoblots wurden mithilfe eines primären anti-GFP und eines sekundären goat-anti-rabbit IgG konjugierten HRP Antikörpers über Chemilumineszenz Detektion entwickelt. Ein wildtypischer Protein-Extrakt und rekombinantes DM-PS-EGFP (23 ng), gereinigt aus *E. coli*, wurden als Negativ- (WT) und Positivkontrolle (+) verwendet. Ein identisches Gel, das mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt wurde, wird darunter als Ladekontrolle für die Proteine gezeigt. Die Position der Markerproteine wird angezeigt und die Masse in kDa angegeben. (B) PI-II mRNA Spiegel in transgenen Tomatenpflanzen, die entweder WT-PS-EGFP oder DM-PS-EGFP exprimieren, relativ zu den nicht -transgenen Kontrollpflanzen. qRT-PCR wurde auf RNA von drei unabhängigen transgenen Linien (vereinigtes Blattmaterial von sechs zwei Wochen alten unverwundeten Pflanzen) gemacht, die entweder WT- oder DM-PS-



Ergebnisse

EGFP überexprimieren. Die Daten repräsentieren den Mittelwert +/- Standardabweichung (n=3). Signifikanter Unterschied nach student's t-test: ** $P \leq 0,01$.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Protease-Inhibitor mRNA-Akkumulation in wildtypischen Tomatenpflanzen lokal und systemisch durch mechanische Verwundung oder durch herbivore Frassfeinde binnen 2h ansteigt (Howe et al., 2000; Ryan, 2000). Das Maximum für die PI-II mRNA wird sowohl lokal, wie auch systemisch bei Insektenfraß nach 8h erreicht, wobei sich bei mechanischer Verwundung der PI-II mRNA Spiegel zwischen 4-12h kaum unterscheidet (Howe et al., 2000).

Um zu untersuchen, wie sich die Induktion der PI-II Genexpression im zeitlichen Verlauf einer Verwundungsreaktion in den transgenen WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP verhält, wurden junge Tomatenpflanzen der vorher generierten Linien, wie auch wildtypische Tomatenpflanzen, mit einer Klemme mechanisch verwundet. Anschließend wurde die PI-II Genexpression via qRT-PCR bestimmt.

Ergebnisse

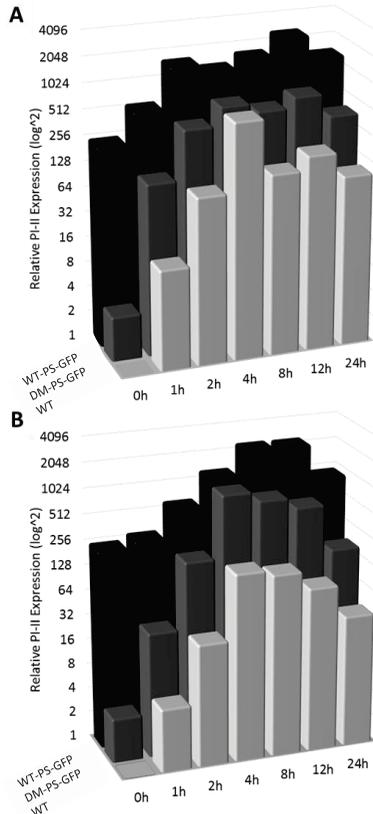


Abbildung 3.20: Lokale und systemische Induktion von PI-II nach Verwendung in WT- und DM-PS-EGFP überexprimierenden Pflanzen im zeitlichen Verlauf.

Lokales (**A**) und systemisches (**B**) PI-II mRNA Level in transgenen Tomatenpflanzen nach Verwundung (t in h, x-Achse), die entweder WT-PS-EGFP oder DM-PS-EGFP überproduzieren, relativ zu den nicht-transgenen unverwundeten Kontrollpflanzen. qRT-PCR wurde auf mRNA von drei unabhängigen transgenen Linien (vereinigtes Blattmaterial von sechs zwei Wochen alten verwundeten Pflanzen) gemacht, die entweder WT- oder DM-PS-EGFP überexprimieren. Die Daten repräsentieren den logarithmierten Mittelwert (\log_2).

Nach mechanischer Verwundung von wildtypischen Tomatenpflanzen wurde ein Maximum der PI-II Akkumulation sowohl lokal, wie auch systemisch bei

4h ermittelt, welches nach 24h wieder auf dem Niveau von 2h war. Die Akkumulation der PI-II mRNA startete bereits nach weniger als 1h (Abb. 3.20 A, B).

Bei den transgenen WT-PS-EGFP überexprimierenden Pflanzen ist lokal wie auch systemisch eine starke konstitutive PI-II Expression zu sehen, die durch die Verwundung und der damit verbundenen Aktivierung von endogenem PS nochmals verstärkt wird (Abb. 3.20 A, B). Im Vergleich zum Wildtyp (WT) war das Maximum je Zeitschritt zwischen 4- und 13-fach höher. Sowohl die konstitutive Expression von PI-II bei unverwundeten Pflanzen, wie auch das stark erhöhte Maximum der PI-II Akkumulation zeigt, dass eine erfolgreiche Prozessierung des fusionierten Vorläuferproteins stattfindet. Aus diesen Daten kann man außerdem schließen, dass auch die absolute Akkumulation von PI-II einen Grenzwert hat, die bei den WT-PS-EGFP überexprimierenden Linien lokal schon nach ca. 2h erreicht ist.

Bei den DM-PS-EGFP überexprimierenden Pflanzen wurde das Maximum der PI-II Akkumulation lokal und systemisch, wie bei den wildtypischen Pflanzen, nach 4h ermittelt (Abb. 3.20 A, B). Auch hier kommt es zu einer Aktivierung der Wundantwort, da das endogene PS prozessiert wird. Diese ist aber systemisch bei jedem Zeitpunkt signifikant schwächer als bei den WT-PS-EGFP überexprimierenden Linien (Abb. A.3, A, Anhang), da das mutierte PS an den Phytaspase-Spaltstellen nicht mehr aspartatspezifisch gespalten werden kann. Im Vergleich zu den wildtypischen Pflanzen ist der Anstieg lokal und systemisch im zeitlichen Verlauf aber wesentlich stärker, weshalb dieser Effekt nicht ausschließlich auf das endogene PS zurückzuführen ist. Vor allem systemisch kann man sehen, dass der PI-II Spiegel zu jedem Zeitpunkt höher ist, als im WT und die maximale PI-II Akkumulation das 6-fache vom WT erreicht, der zeitliche Verlauf der Verwundungsreaktion aber der gleiche ist. Dies spricht dafür, dass es ein weiteres, bisher unbekanntes Signal im Vorläufer geben muss, welches nur nach Verwundung aktiviert wird und die Akkumulation von PI-II in der Pflanze systemisch verstärkt, da der Vorläufer *per se* nicht oder nur sehr gering wundinduzierend wirkt (Abb. 3.14 und 3.19).

4. Diskussion

Bevor Insulin entdeckt wurde, war Diabetes eine gefürchtete Krankheit, welche in den meisten Fällen schnell zum Tod führte. Mit der Entdeckung von Insulin 1921 (Nobelpreis 1923) durch Frederick Banting und Charles Best (Banting and Best, 1922) wurde der Diabetes der Kampf angesagt und das erste Peptidhormon war identifiziert. Peptidhormone spielten plötzlich eine entscheidende Rolle in der Regulation von Körperfunktionen und der Entwicklung von Säugetieren. Erst ziemlich genau 70 Jahre später wurde in der Tomate mit Systemin das erste Peptidhormon in Pflanzen durch die Arbeitsgruppe von Clarence A. Ryan entdeckt (Pearce et al., 1991), ein Meilenstein in der Erforschung der intra- und interzellulären Kommunikation und der Regulation von Pflanzenabwehr und -entwicklung. Die Mechanismen, welche für die Entstehung von Peptidhormonen in Pflanzen zuständig sind, sind aber bis heute nicht eindeutig geklärt. Systemin wird, wie auch viele andere Pflanzenhormone, als wesentlich größerer Vorläufer gebildet.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Vorläufer von Systemin, Prosystemin (PS), durch aspartatspezifische Proteolyse gespalten wird, um das aktive Peptidhormon freizusetzen. Die Phytaspasen, eine Gruppe von aspartatspezifischen Proteasen unter den Subtilasen, sind für diese Prozessierung verantwortlich (Beloshistov et al., 2017).

4.1. Die Spaltung von PS durch *S*Phyt-1 und *S*Phyt-2 *in vitro* ist aspartatspezifisch

Um zu untersuchen, ob *S*Phyt-1 und/oder -2 in der Lage sind, PS *in vitro* zu prozessieren, wurde wildtypisches und mutiertes PS, fusioniert an GFP, mit Phytaspase-1 und -2 (Die Phytaspasen -1 und -2 aus der Tomate (*Solanum*

lycopersicum) wurden in einem parallelen Projekt von Sven Reichardt charakterisiert) behandelt.

Die *S*Phytaspasen wurden in *N. benthamiana* exprimiert und lagen aktiv im apoplastischen Extrakt vor (Abb. 3.3 A). Zunächst wurde festgestellt, dass beide Phytaspasen ein ca. 35 kDa großes, GFP-haltiges Spaltprodukt aus wildtypischem PS generieren konnten, welches zeitabhängig an Konzentration zunahm und beim doppelt mutierten (D-2/A und D18/A) PS stark vermindert oder gar nicht vorhanden war (Abb. 3.3 B). Da die einzigen Unterschiede zwischen PS und DM-PS die beiden Spaltstellen sind, impliziert dieser Befund, dass hier eine spezifische Prozessierung stattgefunden hat. Auch bei der Negativkontrolle im Tabakhintergrund (*N. benthamiana*) konnte ein Spaltprodukt mit derselben Größe, wenn auch erkennbar schwächer, detektiert werden (Abb. 3.3 B). Ein Homolog der Tomaten-Phytaspasen findet sich auch im Tabak und für diese Tabakphytaspase wurde bereits eine Aspartatspezifität nachgewiesen (Chichkova et al., 2010). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen verschiedener Peptidhormonvorläufer untereinander (Matsubayashi, 2011-a, -b) stellt man fest, dass saure Reste, insbesondere Aspartate, mit großer Häufigkeit in unmittelbarer Nähe der vorhergesagten Spaltstellen auftreten. Interessanterweise wird Systemin in seinem Vorläufer Prosystemin auch von Aspartaten, an Position D-2 und D18 bezüglich der Systeminsequenz (Abb. 3.3), flankiert (McGurl et al., 1992). Prozessierungen nahe Aspartaten sind für die Freisetzung mehrerer Peptidhormone in Pflanzen notwendig. RGF1 (ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR 1), PSY1 (PLANT PEPTIDE CONTAINING SULFATED TYROSINE 1) und CEP1 (C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE 1) werden N-terminal vor einem Aspartat gespalten und gehören im Gegensatz zu Systemin zu den „small post-translationally modified peptide signals“ (Matsubayashi, 2011-a, -b). Massenspektrometrisch konnte für *S*Phyt-1 und -2 eine hohe Aspartatspezifität gezeigt werden. Es wurden zahlreiche aspartatspezifische Spaltungen im Vorläufer, wie auch im angehängten GFP identifiziert und es konnte sowohl die C-, wie auch die N-terminale aspartatspezifische Spaltung des Peptidhormons nachgewiesen werden (Abb. 3.4, 3.5, 3.6). Es kommt daher nicht zur Freisetzung des originalen Systemin Peptids, sondern zu L-

Systemin. Da nachweislich Systemin das aktive Peptidhormon ist (Pearce et al., 1991), führt dies zu der Frage, welche Bedeutung L-Systemin zukommt.

4.2. **Beide Aspartate sind notwendig für die Prozessierung von Prosystemin *in vivo***

Um eine Prozessierung *in vivo* zu bestätigen wurden die beiden Phytaspasen mit PS GFP und seiner doppelmutierten Form als Fusionsprotein in *N. benthamiana* koexprimiert. GFP ist ein beliebter Biomarker um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen (Akashi et al., 1998; Yamaguchi et al., 1999) und den Proteinverkehr (Imlau et al., 1999; Oparka et al., 1999) zu untersuchen. Es eignet sich hervorragend als Reporter-Protein, da es keinen Kofaktor oder Substrat für die Fluoreszenz benötigt, es stabil in einem weiten pH-Bereich zwischen pH 5,5-12,0 ist und es Temperaturen bis 65 ° C erträgt (Liu et al., 2001). In keiner der Behandlungen konnte das Volllänge PS-GFP apoplastisch nachgewiesen werden (Abb. 3.7 B). Sowohl für PS, wie auch DM-PS konnte aber mit beiden Phytaspasen das 35 kDa große, GFP-haltige Spaltprodukt, das schon *in vitro* identifiziert wurde, im Apoplasten detektiert werden (Abb. 3.7 B). Dies spricht entweder für eine cytoplasmatische Prozessierung oder für eine Spaltung während der Sekretion, wie dies auch schon in anderen Studien in Tabak (Tortiglione et al., 2003) oder Arabidopsis (Zhang et al., 2017) gezeigt werden konnte. Die Tatsache, dass das Spaltprodukt für DM PS apoplastisch in erheblich geringerer Menge vorlag als für WT-PS, spricht dafür, dass es bei DM-PS zu keiner oder nur zu einer unvollständigen Prozessierung gekommen ist. Das Spaltprodukt der (DM-) PS-Prozessierung wurde aufgereinigt, enzymatisch verdaut und die Peptide massenspektrometrisch auf eine potentielle aspartatspezifische Spaltung analysiert. Und tatsächlich konnte gezeigt werden, dass im mutierten Vorläufer (L-)Systemin nicht freigesetzt wurde und sowohl N- wie auch C-terminal keine Spaltung von Systemin stattgefunden hat (Abb. 3.8). Die Sekretion eines alternativen Spaltprodukts konnte dennoch beobachtet werden (Abb. 3.7 B), was zeigt, dass die Sekretion unabhängig der korrekten

Prozessierung von PS stattfindet. Bei wildtypischem PS wurde das Peptidhormon freigesetzt, aber nur für *SPhyt-1* konnte die aspartatspezifische C-terminale Spaltung nachgewiesen werden. Der vollständig prozessierte C-Terminus wurde im Apoplasten identifiziert. Die letzten vier Aminosäuren (NNKL) des Vorläufers PS wurden am sekretierten Spaltprodukt von PS-GFP N-terminal von GFP detektiert (Abb. 3.9). Hier wird klar, dass es *in vivo* zu keiner alternativen Freisetzung des Peptidhormons kommt, wenn die Spaltstellen durch eine Einzelmutation deletiert sind. Dies konnte auch schon bei anderen Peptidvorläufern wie *ARALF1* (Matos et al., 2008) gezeigt werden.

Aufgrund der blockierten Prozessierungsstellen bei DM-PS, der Freisetzung des Peptids bei PS und der Identifizierung der C-terminalen Spaltstelle bei *SPhyt-1*, ist *SPhyt-1* ein sehr vielversprechender Kandidat für eine aspartatspezifische Spaltung von PS *in vivo*. Dieser Prozessierungsmechanismus nach einer einzelnen sauren Aminosäure steht im Gegensatz zu dem der tierischen Proprotein Konvertasen. Die Prozessierung von funktionellen Peptidhormonen erfolgt hier durch die Spaltung von Vorläuferproteinen nach paarweise angeordneten, sogenannten dibasischen Motiven (Barr, 1991; Steiner, 1998), welche die Systemin-Sequenz in seinem Vorläufer aber nicht flankieren (Beloshistov et al., 2017).

4.3. Die flankierenden Aspartate sind notwendig für die vollständige Aktivität von PS

Eine Prozessierung von PS an den identifizierten aspartatspezifischen Spaltstellen impliziert jedoch noch nicht die Notwendigkeit dieser Spaltung für die Biogenese des Wundsignals *in vivo*.

Um zu beweisen, dass beide Spaltstellen für die Systemin-induzierte Wundantwort notwendig sind, wurde ein etablierter Biotest verwendet, der über die Genexpression des wundspezifischen Markers Proteinaseinhibitor II (PI-II) (Ryan, 2000) die Aktivität von Systemin konstatiert (Pearce et al., 1991). Proteinaseinhibitoren sind typische Marker der pflanzlichen

Wundantwort (Green and Ryan 1972). Prosystemin zeigte in diesem Verfahren bereits dieselbe biologische Aktivität wie Systemin (Dombrowski et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass bei DM-PS die PI-II-induzierende Aktivität nahezu verloren ging, wohingegen PS die prognostizierte Wirkung erzeugte (Abb. 3.10 A).

Um dieses Resultat zu verifizieren wurde die Aktivität von DM-PS über die pH-Änderung im Medium von *S. peruvianum* Zellen (Schaller and Oecking 1999; Holton et al. 2007) mit der von PS verglichen. Die Systemin-Behandlung von *S. peruvianum* (Schaller and Oecking 1999) und *L. pinellifolium* (Holton et al. 2007) Suspensionszellen führte dosisabhängig zu einem raschen pH-Anstieg. Auch PS zeigte eine erwartete und ähnlich starke Induktion des pHs in *S. peruvianum* Suspensionszellen (Vetsch et al., 2000), wohingegen die Aktivität von DM-PS stark reduziert war (Abb. 3.11 B). Dies bestätigt die Ergebnisse des Biotests zur Induktion wundspezifischer Gene, dass nämlich eine Substitution der Phytaspase-Spaltstellen die Freisetzung des Peptidhormons verhindert. Andererseits ist im Alkalinisierungstest eine deutliche Restaktivität bei DM-PS vorhanden. Das legt die Vermutung nahe, dass nicht nur Systemin, sondern auch der Vorläufer Prosystemin wundinduzierend wirkt (Dombrowski et al., 1999, Vetsch et al. 2000). Alternativ könnte eine unspezifische Spaltung durch andere Proteasen zu Systemin-Derivaten führen, die eine verminderte Bioaktivität aufweisen.

Eine aspartatspezifische Spaltung von PS würde logischerweise auch *in vivo* L-Systemin und nicht das aktive Peptidhormon Systemin freisetzen. Die Aktivität von L-Systemin unterschied sich aber sowohl in der Aktivierung der Wundantwort (Abb. 3.11 B), wie auch in der Induktion von wundspezifischen Genen signifikant zum wesentlich aktiveren Systemin (Abb. 3.11 A). Eine N-terminale Verkürzung scheint daher zwingend notwendig zu sein, um die vollständige Aktivität zu gewährleisten. Die proteolytische Prozessierung von Signalpeptiden in Pflanzen scheint also nicht in einem Schritt zu erfolgen, sondern nach der initialen (hier Asp-spezifischen) Spaltung, die zunächst eine Verkürzung des unreifen Peptids erfordert (Matsubayashi, 2011-a, -b). Das bestätigen auch die Ergebnisse der *in vitro* Prozessierung. Die Involvierung weiterer prozessierender Enzyme bei der Peptidreifung wird hierdurch

bekräftigt. Eine wundspezifische Leucin-Amino-peptidase (LapA), die dabei eine Rolle spielen könnte, wurde bereits identifiziert (Chao et al., 1999; Gu and Walling, 2000; Fowler et al., 2009). Da die LapA hauptsächlich cytoplasmatisch vorliegt und nur teilweise in Plastiden, spricht für eine cytoplasmatische Prozessierung von PS (Gu et al., 1996-a, -b).

Um auch die Notwendigkeit der korrekten C-terminalen aspartatspezifischen Prozessierung zu verifizieren wurde der flankierende Bereich der Systemin-Sequenz, sowie die terminalen Aminosäuren im Detail betrachtet. Es ist bekannt, dass eine Verkürzung der N-terminalen Aminosäuren von Systemin sukzessive zu einer massiven Aktivitätsreduktion, ein Verlust des C-Terminus sogar zu einem völligen Aktivitätsverlust führt (Pearce et al., 1993) (Abb. 4.1).

Systemin Fragmente	fmol/Pflanze (50% der maximalen Aktivität)
AVQSKPPSKRDPPKMQTD	12
VQSKPPSKRDPPKMQTD	3,600
QSKPPSKRDPPKMQTD	40,000
SKPPSKRDPPKMQTD	76,000
KPPSKRDPPKMQTD	231,000
SKRDPPKMQTD	373,000
DPPKMQTD	10,900,000
MQTD	4,000,000
QTD	Inaktiv
TD	Inaktiv
AVQSKPPSKRDPPKMQT	Inaktiv
AVQSKPPSKRDPPKMQ	Inaktiv
AVQSKPPSKRDPPKM	Inaktiv
AVQSKPPSKRDPPK	Inaktiv
AVQSKPPSKR	Inaktiv
AVQS	Inaktiv

Abbildung 4.1: Das Verhältnis von Struktur zu Aktivität synthetischer Systemin Fragmente.

N- bzw. C-Terminal verkürztes Systemin wurde jungen Tomatenpflanzen über das abgeschnittene Hypocotyl zugeführt und die Proteaseinhibitor I Induktion bestimmt (verändert nach Pearce et al., 1993).

Die artifizielle Resistenz gegenüber einer Proteasespaltung durch Methylierung des Amidstickstoffs an der C-terminalen Spaltstelle (Schaller, 1998; Schardon et al., 2016) eines um vier Aminosäuren (NNKL) verlängerten Systemin-Derivats sollte die Notwendigkeit der C-terminalen Prozessierung belegen. Eine Blockierung der Spaltung am C-Terminus führte zu einer

schweren Beeinträchtigung der Aktivität (Abb. 3.12 B). Substitutionen am C-Terminus von Systemin beeinträchtigten die Aktivität allerdings nur marginal (Abb. 3.12 C).

Dennoch ist zu beachten, dass Aminosäuresubstitutionen innerhalb des aktiven Peptidhormons an Position P13/A zu einer sehr stark verminderten und an Position T17/A zu einem Verlust der Aktivität führten (Abb. 4.2)

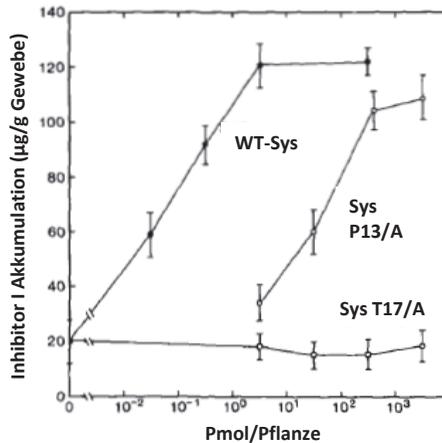


Abbildung 4.2: Aktivitätsreduktion bzw.-verlust durch Aminosäuresubstitutionen innerhalb von Systemin.

Proteaseinhibitor-induzierende Aktivitäten von P13/A und T17/A Systeminderivaten an jungen Tomatenpflanzen verglichen mit der Aktivität von nativen Systemin (Verändert nach Pearce et al., 1993).

Chowdhury stellte 2016 unterstützt durch Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations (Sugita et al., 1999) die Hypothese auf, dass Aminosäuresubstitutionen innerhalb des aktiven Peptidhormons an der Positionen P13/A, aufgrund der Konformationsflexibilität, und vor allem aber an Threonin 17 zu einem Aktivitätsverlust führen. Das Threonin an Position 17 steht als Substrat für eine Kinase im weiteren Signalweg zur Disposition (Pearce et al., 1993) und ein Verlust der Phosphorylierungsstelle könnte deshalb weitreichende Folgen haben (Chowdhury et al., 2016).

Es konnte also *in vivo* gezeigt werden, dass es die Spaltung am korrekten C-Terminus ist, die notwendig ist für die Aktivität von Systemin, und nicht der Rest, der sich in C-terminaler Position befindet. Weiterhin ist eine Verkürzung des N-Terminus Voraussetzung, um aus L-Systemin das aktive Peptidhormon Systemin zu generieren.

4.4. Weitere Signale in Prosystemin kompensieren die Systemin-induzierte Abwehr

Im Biotest zur Induktion wundspezifischer Gene (Pearce et al., 1991) konnte weder bei Phytaspase-überexprimierenden noch bei -defizienten Pflanzen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.13). Es wurde in allen Pflanzen der wundspezifische Marker PI-II nach PS Zugabe induziert. Zumindest für die überexprimierenden Pflanzen steht dies im Einklang mit den erwarteten Ergebnissen, da möglicherweise schon die konstitutiv vorhandene endogene Phytaspase bei WT-Tomatenpflanzen für eine vollständige Spaltung ausreichend ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass andere Phytaspen redundant für die Spaltung verantwortlich sein könnten und es deshalb auch in den *S/Phyt-1/-2* defizienten Pflanzen zu einer Prozessierung kommt, wie dies schon für andere Subtilasen bestätigt werden konnte (Schardon et al., 2016). Alternative Prozessierungsmechanismen könnten durch eine entwicklungs- bzw. organspezifische Expression von *S/Phyt-1/-2* hervorgerufen werden. Die Spezifität der Expression in bestimmten Entwicklungsstadien bzw. Organen wurde für Subtilasen schon in vielen Studien bestätigt (Tanaka et al., 2001; Rautengarten et al., 2008; Srivastava et al., 2008; D'Erfurth et al., 2012; Martinez et al., 2015; Schardon et al., 2016).

Allerdings deuten diese Ergebnisse auch darauf hin, dass weitere wundinduzierende Signale in PS vorliegen könnten. Aus tierischen Systemen ist bekannt, dass Peptidhormone im Vorläufer auch in mehreren Kopien (Lechan et al., 1986) oder sogar verschiedene bioaktive Peptidhormone in einem Vorläufer (Takahashi et al., 1981) vorliegen können. Dies konnte auch

schon bei pflanzlichen Peptidvorläufern festgestellt werden (Pearce et al., 2001). Die Systeminsequenz liegt in seinem Vorläufer allerdings nur als Einzelkopie vor. Gibt es also weitere wundinduzierende Peptidhormone in Prosystemin? Die Inaktivität von DM-PS spricht zunächst dagegen. Aber könnten die Aminosäuresubstitutionen in DM-PS möglicherweise zu einer Konformationsänderung des Vorläufers geführt haben? Es ist bekannt, dass die Proteinstruktur und -stabilität durch Einzelmutationen stark beeinträchtigt werden kann (Wang and Moulton, 2001; Bromberg and Rost, 2008). Eine Unterbrechung dieser Strukturbildung durch Substitutionen bei DM-PS könnte die korrekte Konformation von PS verhindern, die benötigt wird, um auch andere Signale freizusetzen. Im Gegensatz zu vielen anderen Peptidhormonvorläufern zeigte Prosystemin in der CD Spektroskopie allerdings, dass es größtenteils unstrukturiert ist. CD und NMR Spektroskopie deuten darauf hin, dass PS zu den intrinsisch ungeordneten Proteinen (IDP; intrinsically disordered protein) gehört (Buonanno et al., 2017). IDPs sind eine große Proteinklasse, denen eine stabile oder geordnete dreidimensionale Struktur fehlt. Eine chemische Behandlung, die eine Protein-Protein-Interaktion vortäuscht, führte aber dazu, dass PS eine geordnete dreidimensionale Struktur annahm (Buonanno et al., 2017). Dreidimensionale Strukturen verschiedener Proteine, die mehrere Interaktionspartner besitzen, zeigten, dass die Flexibilität und Plastizität von intrinsisch ungeordneten Proteinen sehr wichtig für die Bindungsdiversität ist (Oldfield et al., 2008). Da diese möglicherweise bei DM-PS nicht vorhanden ist, wäre eine Freisetzung weiterer wundinduzierender Peptide nicht mehr gewährleistet. Dass in den identifizierten repetitiven Elementen eine weitere wundinduzierende Aktivität vorliegt, ist deshalb nicht ausgeschlossen (Abb. 3.14 A). Keines der Deletionskonstrukte ohne Systemin zeigte aber eine pH-induzierende Aktivität (Abb. 3.14 B). Die pH-abhängige Zellantwort von PS war ausschließlich Systemin-spezifisch und wird deshalb sehr wahrscheinlich Rezeptor-gesteuert induziert. Dies schließt jedoch nicht aus, dass es in PS weitere wundinduzierende Signale geben könnte, die nicht alkalinisierend wirken.

Diese Problematik wird *in planta* in Absatz 1.6 nochmal näher betrachtet.

Aufgrund begrenzter Ressourcen macht es evolutionär keinen Sinn, ein enorm großes Vorläuferprotein für ein kleines Peptidhormon zu produzieren. Dies wirft die Frage auf, welche physiologische Bedeutung dahintersteckt und ob die repetitiven Elemente dabei eine Rolle spielen. Auch von anderen Proteinen ist bekannt, dass sie sich aus wiederholenden Sequenzen aufbauen (Katti et al., 2000; Andrade et al., 2001). Bei vielen ist die Funktion dieser Wiederholungen auch nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass sie unter anderem für die Bindung an Zielmoleküle oder -proteine und die Strukturgebung verantwortlich sind (Katti et al., 2000; Andrade et al., 2001).

4.5. Das Sekretionssignal von Systemin liegt nicht im Peptidhormon

Da Vorläufer von Peptidhormonen normalerweise als Prä-Pro-Proteine translatiert und über ein Signalpeptid sekretiert werden (Tabata and Sawa, 2014) stellt sich die Frage, wie Systemin sekretiert wird, da der Vorläufer PS kein Signalpeptid besitzt (Delano et al., 1999) und der Rezeptor SYR1 (Wang et al., 2018) sich aber an der Plasmamembran befindet (Scheer and Ryan, 1999). Bis vor kurzem wurde noch vermutet, dass dieser Rezeptor eine 160kDa „leucin-rich repeat receptor-like kinase“ ist, die dem BRI1 aus *A. thaliana* sehr ähnlich ist. Der BRI1/SR160 bindet zwar Systemin, aber kann keine Signalweiterleitung bewirken (Holton et al., 2007; Malinowski et al., 2009).

SPhyt-1/-2 wurden ausschließlich im Apoplasten nachgewiesen und die Aktivität wurde bestätigt (Abb. 3.3). Das Volllänge (DM-) PS konnte aber apoplastisch nicht identifiziert werden (Abb. 3.7 B). Dies deutet darauf hin, dass es entweder zu einer Re-Lokalisation der aktiven Phytaspase zur Prozessierung von PS ins Cytoplasma kommt (Chichkova et al., 2010; Chichkova et al., 2012), oder dass die Prozessierung während der Passage durch den sekretorischen Weg z.B. in den Endosomen stattfindet (Tamaki et al., 2013). Da PS weder ein Signalpeptid, noch post-translationale Modifikationen besitzt, wird jedoch vermutet, dass es nicht über den

sekretorischen Weg synthetisiert wird, sondern wahrscheinlich durch freie Ribosomen im Cytosol (Ryan et al., 2002). Die Vorläufer einer weiteren Familie von Abwehrpeptiden in *A. thaliana*, den *AtPeps*, besitzen auch kein Signalpeptid, es kommt aber auch hier zu einer extrazellulären Rezeptorbindung des Peptidhormons (Huffaker et al., 2006). Die chemischen und physiologischen Eigenschaften von *AtPEP1* und Systemin, wie die Freisetzung am C-Terminus des stark positiv geladenen Vorläufers, die Induktion durch Methyl-Jasmonat und die Aktivierung von Abwehrgenen, zeigen eine auffällige Ähnlichkeit zueinander (Huffaker et al., 2006). Es wird angenommen, dass die PROPEPs im Cytoplasma lokalisiert sind und über einen Mechanismus der unkonventionellen Proteinsekretion in den extrazellulären Raum gelangen (Ding et al., 2012; Bartels et al., 2013) (Abb.4.3). Die unkonventionelle Proteinsekretion steht auch im engen Zusammenhang mit Stress oder Pathogenbefall, da hier eine schnelle Sekretion und die Relokalisation cytosolischer Proteine von Nöten sind (Krause et al., 2013). Einige nicht konventionelle Sekretionsmechanismen, die entweder Vesikel-abhängig oder -unabhängig sind, konnten bereits identifiziert werden (An et al., 2006; Cheng et al., 2009; Hatsugai et al., 2009; Wang et al., 2010; Zhang et al., 2011; Krause et al., 2013).

dadurch belegt, dass Systemin ohne PS, fusioniert an GFP, nicht sekretiert wurde (Abb. 3.16 B links). Um die Sekretionsereignisse von sukzessive deletiertem PS-GFP zu bestätigen wurden die PS-Deletionskonstrukte an das cytoplasmatische OPR1 (Strassner et al., 2002) fusioniert. Sowohl für ein bzw. alle fünf repetitiven Elemente konnte massenspektrometrisch auch eine Sekretion des Reporterproteins OPR1 beobachtet werden (Abb. 3.17).

Interessanterweise sagen *in silico* Analysen vorher, dass es C-terminal in PS zur Formierung einer beta-hairpin Struktur (AS 172-180) kommt, die sowohl innerhalb des Systemin-Peptids liegt (AS 178-196), wie auch einen Teil von PS miteinbezieht (Buonanno et al., 2017). Da genau diese Region noch im letzten repetitiven Element von PS vorhanden ist, gibt es starke Anzeichen dafür, dass hier der Bereich vorliegt, der für die Sekretion zuständig ist und dieser auch nicht durch die Mutationen in DM-PS seine funktionelle Bedeutung verliert. Falls aber diese beta-hairpin Struktur primär für die Prozessierung und nur sekundär für die Sekretion zuständig sein sollte (Buonanno et al., 2017), besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die Phytaspasen zusammen mit der LapA cytoplasmatisch an dieser Struktur binden und der Komplex in den Apoplast sekretiert wird und, dass während dieses Vorgangs Systemin aspartatspezifisch freigesetzt wird. Andere Proteasen könnten ebenfalls diese Struktur erkennen, aber Systemin nicht korrekt freisetzen, sondern eine durch die Substitution bei DM-PS generierte alternative N-terminale Spaltung vornehmen. Dies würde auch erklären, warum eine Sekretion bei DM-PS möglich ist (Abb. 3.16 A), aber das aktive Peptidhormon noch vollständig am C-Terminus von PS vorhanden ist (Abb. 3.8). Allerdings ist nicht anzunehmen, dass nur ein einziges repetitives Element ausreicht, um eine dreidimensionale Struktur zu generieren, aber auch unwahrscheinlich, dass die Spaltstellen in einem stark verkürzten Vorläufer durch die dreidimensionale Struktur überhaupt verdeckt sind.

Im Volllänge DM PS könnten die Substitutionen aber dazu beitragen, dass die bindungsgesteuerte Strukturänderung von PS durch die Phytaspasen nicht mehr oder nur verändert stattfinden kann und die Spaltstellen anderer Peptide verdeckt sind.

4.6. **Die Phytaspase-Spaltstellen sind notwendig für die Prozessierung von PS *in planta* und Systemin ist nicht das einzige wundinduzierende Signal in PS**

PS wird in der Tomate zu einem niedrigen Level konstitutiv exprimiert und kann überall in der Pflanze, außer der Wurzel, gefunden werden (McGurl et al., 1992). Eine Antisense-Inhibierung von PS beeinträchtigt die Wundantwort schwer. Dies führt etwa zu einer reduzierten Abwehr gegen Larven von *Manduca sexta* (McGurl et al., 1992; Orozco-Cardenas et al., 1993). Der Systeminsignalweg ist in wildtypischen Pflanzen wundinduziert (Ryan, 2000), aber es ist auch bekannt, dass die Überexpression von PS in der Tomate zu einer konstitutiven Wundinduktion führt (McGurl et al., 1994; Howe and Ryan 1999). Alle drei unabhängigen Linien transgener Tomatenpflanzen, die das WT PS als EGFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des dualen 35S Promoters aus dem Blumenkohl Mosaik Virus (Benfey and Chua, 1990) überexprimieren, zeigten ein hohes Level an PI-II und somit auch eine konstitutive Wundantwort (Abb. 3.19 B). Eine mögliche Erklärung für die konstitutive Wundantwort ist die ektopische PS Expression in diesen Pflanzen, da in wildtypischen Pflanzen die Phytaspasen und PS unterschiedlich lokalisiert sind (Narvaez-Vasquez and Ryan, 2004). In gesundem Pflanzengewebe sind beide voneinander getrennt und es kommt zu keiner Wundinduktion, da die Prophytaspasen ein Signalpeptid besitzen und in den Interzellulärraum sekretiert werden (Chichkova et al., 2010; Chichkova et al., 2012), das Volllänge PS sich aber nachweislich nur im Zellkern und im Cytoplasma befindet (Narvaez-Vásquez and Ryan, 2004; Zhang et al., 2017). Dies beantwortet allerdings noch nicht die Frage, ob die Spaltung von PS durch die Phytaspasen an den Systemin-flankierenden Aspartaten für die Wundantwort *in planta* notwendig ist. Alle drei unabhängigen Linien, die DM-PS als EGFP-Fusionsprotein überexprimieren, wiesen keine konstitutive Wundantwort auf (Abb. 3.19 B). Der Grundspiegel der PI-II mRNA war niedrig und von dem wildtypischen nicht signifikant verschieden. Dies bestätigt, dass die aspartatspezifische Spaltung von PS an den Phytaspase

Spaltstellen notwendig für die Wundantwort *in planta* ist, und dass der Vorläufer *per se* keine andere wundinduzierende Aktivität besitzt. Ein Novum, da bisher vermutet wurde, dass auch der Vorläufer PS eine wundinduzierende Aktivität besitzt (Vetsch et al., 2000; Dombrowski et al., 1999). Eine aspartatspezifische Prozessierung würde aber bedeuten, dass es auch *in planta* zu einer Bildung von L-Systemin kommt. In den Fütterungsversuchen konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Eliminierung des N-terminalen Leucins notwendig ist, um die vollständige Wundantwort zu erhalten (Abb. 3.11).

Das bedeutet, es muss *in planta* enzymatisch durch eine Exopeptidase zu einer N-terminalen Verkürzung von L-Systemin kommen muss.

Auch ohne Verwundung konnte eine Expression der Exopeptidase LapA in der Tomate bei der Blüten- und Fruchtentwicklung beobachtet werden, aber nicht in gesunden vegetativen Organen (Chao et al., 1999). Allerdings könnte auch hier die ektopische Expression von PS eine konstitutive Wundantwort in WT- PS-EGFP Pflanzen erklären, da LapA Gene durch den Octadecanoidweg positiv reguliert werden, dieser nachweislich im Zusammenhang mit der Systemin-induzierten Wundantwort steht (Chao et al., 1999) und eine Spaltung von PS in einem einzigen Gewebe ausreicht, um die systemische Wundantwort auszulösen. Interessanterweise beeinträchtigt auch eine LapA-Defizienz die späte Wundantwort in der Tomate (Fowler et al., 2009). Eine Substitution am Leucin durch Alanin vor der aktiven Systemin-Sequenz führte zu einer verminderten Spaltung von PS *in vitro* (Zhang and Hu, 2017), was impliziert, dass das Leucin auch eine wesentliche Rolle bei der Prozessierung *in planta* spielt.

Dies bekräftigt die Hypothese, dass die SPhytaspase(n), die Leucin Aminopeptidase und PS zusammenarbeiten und eine Art PS-prozessierenden Komplex bilden, um die korrekte Prozessierung des aktiven Peptidhormons Systemin zu bewerkstelligen.

Der Effekt einer Verwundung auf 35S WT- und DM-PS-EGFP Pflanzen wurde über einen Zeitraum von 24 h untersucht und mit wildtypischen verglichen (Abb. 3.20). Nach Verwundung zeigten wildtypische Tomatenpflanzen aufgrund des endogenen PS eine Akkumulation der PI-II

mRNA mit einem erwarteten lokalen und systemischen Maximum nach 4-8 Stunden (Ryan, 2000; Howe et al., 2000). Der zeitlich ähnliche Verlauf der lokalen und systemischen Akkumulation, bekräftigt die Hypothese, dass die leicht über das Leitgewebe zu transportierende Jasmonsäure für die systemische Antwort zuständig ist (Schilmiller and Howe 2005; Wasternack, 2007).

Bei den WT-PS-EGFP überexprimierenden Linien gab es über die hohe konstitutive Expression von PI-II hinaus nach Verwundung noch einen erheblichen Anstieg (Abb. 3.20). Dies spricht dafür, dass entweder das transgene PS durch den Stress-induzierten Zelltod und die Hochregulierung von Phytaspasen und der LapA noch effektiver gespalten wird oder aber, dass es ein weiteres Signal in PS gibt, das erst nach Verwundung aktiviert wird. Es konnte zwar gezeigt werden, dass Systemin das einzige Signal in PS ist, welches in vollem Umfang alkalinisierend wirkt, da ein inaktiver Systemin Antagonist die Aktivität von PS aufhob (Vetsch et al., 2000) und DM-PS wesentlich weniger aktiv bei der Aktivierung der Wundantwort war (Abb. 3.10), aber es konnte dennoch eine gewisse wundinduzierende Wirkung des Vorläufers auf die PI-II Expression in Tomatenpflanzen beobachtet werden. Es wäre schließlich nicht überraschend, dass mehrere Peptidhormone aus dem Vorläufer PS prozessiert werden können, da dies für drei wundinduzierende Hydroxyprolin-reiche Glycopeptide aus der Tomate, die aus einem einzigen Vorläufer freigesetzt werden, schon gezeigt werden konnte (Pearce and Ryan, 2003) und auch bei Tieren ein Vorläufer mehrere Peptidhormone freisetzen kann (Kurjan and Herskowitz, 1982; Douglass et al., 1984). Es wäre auch möglich, dass dieses unbekanntes Signal in PS indirekt verstärkend wirkt und zu einer gesteigerten endogenen PS Expression beisteuert.

Die DM-PS-EGFP überexprimierenden Pflanzen hatten, wie zu erwarten, eine signifikant schwächere Wundinduktion von PI-II als die WT-PS-EGFP Pflanzen (Abb. 3. 20). Allerdings wiesen sie eine intermediäre PI-II Induktion nach Verwundung auf, die nicht ausschließlich auf das endogene PS zurückzuführen ist, da sie erstaunlicherweise wesentlich stärker war, als in den WT Pflanzen. Dies bekräftigt die Annahme, dass es weitere wundinduzierende

Signale in PS geben muss, die allerdings erst nach Verwundung freigesetzt werden.

Fraßversuche an den WT- bzw. DM-PS-EGFP überexprimierenden Pflanzen mittels Choice-Test durch Spezialisten (*Manduca sexta*) und Generalisten (*Spodoptera exigua*) untermauern diese Schlußfolgerung zusätzlich, da es hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden transgenen PS Überexprimierern gab, aber deutlich signifikante zum WT (Konrad Dreizler, Masterarbeit, 2012). Die ektopische Expression von mutiertem PS könnte allerdings auch zu einer Spaltung an den substituierten Spaltstellen führen, die durch ein wundinduziertes Enzym bewerkstelligt wird, welches normalerweise andere Vorläufer prozessiert.

4.7. **Schlussfolgerung und Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tomaten-Phytasasen für die aspartatspezifische Prozessierung von PS an D-2 und D18 verantwortlich sind. Das Peptid, welches freigesetzt wurde, war Systemin mit einem zusätzlichen Leucin am N-Terminus, das im Vergleich zu Systemin eine deutlich verminderte Aktivität hinsichtlich der Induktion der Wundantwort aufwies. Dies bekräftigt die Bedeutung einer Leucin-Aminopeptidase im Verlauf der PS-Prozessierung, um das biologisch aktive Peptidhormon Systemin zu erhalten. Eine Reihe von Befunden unterstützt die Hypothese, dass die Phytasasen mithilfe der wundinduzierten Exopeptidase LapA für die aspartatspezifische Prozessierung am N-Terminus und die Bildung von Systemin verantwortlich sind. Eine korrekte Prozessierung am C-Terminus erwies sich als genauso essentiell, wohingegen die terminale Aminosäure nur einen geringen Einfluß auf die Aktivität hatte. Es konnten keine Unterschiede bei der Wundinduktion durch externe Zugabe von PS bei Phytaspase-defizienten und –überexprimierenden, sowie wildtypischen Tomatenpflanzen festgestellt werden. Dies zeigt, dass es wahrscheinlich noch weitere Proteasen gibt, die redundant zu den Phytasasen sind und möglicherweise durch die Verwundung bei der PS Zugabe freigesetzt wurden.

Der Vorläufer PS und seine sukzessiv verkürzten Derivate ohne Systemin hatten keine pH-induzierende Aktivität. Das bedeutet, dass es ohne Systemin keine Induktion der Wundantwort gibt. Allerdings befindet sich das Signal für die Sekretion von Systemin in den repetitiven Elementen des Vorläufers und nicht in Systemin selbst. Mindestens eines der repetitiven Elemente war notwendig, um eine erfolgreiche Sekretion von Systemin in den Apoplasten zu gewährleisten. Keines der Deletionskonstrukte von PS konnte aber in Volllänge im Extrazellulärraum nachgewiesen werden, was zumindest für eine Prozessierung des N-Terminus im Cytoplasma spricht. Für die Überexpression in der Tomate konnten für WT-PS-EGFP und DM-PS-EGFP je drei unabhängige homozygote Linien generiert werden. Eine konstitutive Wundantwort wurde ausschließlich für WT-PS-EGFP aber nicht für DM-PS-EGFP beobachtet. Dies bestätigt die funktionelle Relevanz der aspartatspezifischen Prozessierung von PS *in vivo*. Mechanische Verwundung dieser Pflanzen konnte im zeitlichen Verlauf zeigen, dass aber auch eine DM-PS-EGFP Überexpression eine höhere PI-II Induktion als der Wildtyp generierte. Aufgrund dieser hier dargelegten Befunde muss angenommen werden, dass es weitere wundinduzierende Signale in PS gibt, die es noch zu identifizieren gilt.

Der genaue Mechanismus der Prozessierung und die Sekretion von Systemin bleiben allerdings weiterhin schleierhaft. Fakt ist, dass die Volllänge PS nur cytoplasmatisch vorliegt und die aktiven Phytaspasen sich im extrazellulären Raum befinden. Eine Verwundung durch Herbivore und der damit einhergehende mechanische Zellaufschluss würde eine Zusammenführung der interzellulären Phytaspase und des intrazellulären PS gewährleisten. Eine Relokalisation der N-Phytaspase aus dem Apoplast ins Cytoplasma konnte allerdings auch beobachtet werden (Chichkova et al., 2010). Dieser retrograde Transport könnte deshalb auch bei den S-Phytaspasen die Phytaspase-vermittelte Prozessierung von PS bewerkstelligen.

Mit diesen Ergebnissen habe ich die wesentlichen Aspekte der Fragestellung meiner Doktorarbeit beantwortet und konnte zeigen, dass die Tomaten-Phytaspasen für die Spaltung von Prosystemin und die Aktivierung des Wundsignals verantwortlich sind.

5. Literatur

- Akashi, K., Grandjean, O., & Small, I. (1998). Potential dual targeting of an *Arabidopsis* archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Letters*. 431: 39–44.
- Alexandersson, E., Mulugeta, T., Lankinen, Å., Liljeroth, E., & Andreasson, E. (2016). Plant resistance inducers against pathogens in *Solanaceae* species—from molecular mechanisms to field application. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(10): 1673.
- Ament, K., Kant, M. R., Sabelis, M. W., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2004). Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology*. 135(4): 2025–37.
- An, Q., Hüchelhoven, R., Kogel, K. H., & van Bel, A. J. E. (2006). Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cellular Microbiology*. 8(6): 1009–1019.
- Andrade, M. A., Perez-Iratxeta, C., & Ponting, C. P. (2001). Protein repeats: Structures, functions, and evolution. *Journal of Structural Biology*. 134(2–3): 117–131.
- Arimura, G. I., Matsui, K., & Takabayashi, J. (2009). Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: Proximate factors and their ultimate functions. *Plant and Cell Physiology*. 50(5): 911–923.
- Avilés-Arnaut, H., & Délano-Frier, J. P. (2012). Characterization of the tomato prosystemin promoter: organ-specific expression, hormone specificity and methyl jasmonate responsiveness by deletion analysis in transgenic tobacco plants. *Journal of Integrative Plant Biology*. 54(1):15–32.
- Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., & Fletcher, A.A. (1922). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*. 12: 141-6.
- Barr, P. J. (1991). Mammalian subtilisins: The long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell*. 66(1): 1–3.



Literatur

- Bartels, S., Lori, M., Mbengue, M., Verk, M. Van, Klauser, D., Hander, T., ... Boller, T. (2013). The family of peps and their precursors in *Arabidopsis*: Differential expression and localization but similar induction of pattern-triggered immune responses. *Journal of Experimental Botany*. 64(17): 5309–5321.
- Baydoun, E. A., & Fry, S. C. (1985). The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. *Planta*. 165: 269–276.
- Benfey, P. N., & Chua, N.-H. (1990). The cauliflower mosaic virus 35s promoter: Combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*. 250(4983): 959–966.
- Bergau, N., Bennewitz, S., Syrowatka, F., Hause, G., & Tissier, A. (2015). The development of type VI glandular trichomes in the cultivated tomato *Solanum lycopersicum* and a related wild species *S. habrochaites*. *BMC Plant Biology*. 15: 289–303.
- Berger, D., & Altmann, T. (2000). A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, 14(9): 1119–31.
- Biesgen, C., & Weiler, E. W. (1999). Structure and regulation of *OPR1* and *OPR2*, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10, 11-reductases from *Arabidopsis*. *Planta*. 208: 155–165.
- Black, R. A., Kronheim, S. R., & Sleath, P. R. (1989). Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Letters*. 247(2): 386–90.
- Blee, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*. 7(7): 315–322.
- Boller, T. (2005). Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. *Current Opinion in Cell Biology*. 17(2): 116–122.
- Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G. E., & Gallois, P. (2008). What happened to plant caspases? *Journal of Experimental Botany*. 59(3): 491–499.
- Bosch, M., Berger, S., Schaller, A., Stintzi, A. (2014). Jasmonate-dependent induction of polyphenol oxidase activity in tomato foliage is important for defense against *Spodoptera exigua* but not against *Manduca sexta*. *BMC Plant Biology*. 14: 257

- Boyd, P. M., Barnaby, N., Tan-Wilson, A., & Wilson, K. A. (2002). Cleavage specificity of the subtilisin-like protease C1 from soybean. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1596(2): 269–282.
- Britten, R.J., & Davidson, E.H. (1969). Gene regulation for higher cells: A theory. *Science*. 165 (3891): 349-57.
- Britten, R.J., & Kohne, D.E. (1968). Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science*. 161(3841): 529-40.
- Bromberg, Y., & Rost, B. (2009). Correlating protein function and stability through the analysis of single amino acid substitutions. *BMC Bioinformatics*. 10(8): S8.
- Brown, J. K. M., & Tellier, A. (2011). Plant-parasite coevolution: Bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology*. 49(1): 345–367.
- Bubici, G., Carluccio, A. V., Stavalone, L., & Cillo, F. (2017). Prosystemin overexpression induces transcriptional modifications of defense-related and receptor-like kinase genes and reduces the susceptibility to *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNAs in transgenic tomato plants. *PLOS One*. 12(2): 1–15.
- Buonanno, M., Coppola, M., Di Lelio, I., Molisso, D., Leone, M., Penacchio, F., ... Monti, S.M. (2017). Prosystemin, a prohormone that modulates plant defense barriers, is an intrinsically disordered protein. *Protein Science*. Epub ahead of print.
- Orozco-Cardenas, M. O., McGurl, B., & Ryan, C. A. (1993). Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance towards *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90: 8273–8276.
- Cedzich, A., Huttenlocher, F., Kuhn, B. M., Pfannstiel, J., Gabler, L., Stintzi, A., & Schaller, A. (2009). The protease-associated domain and C-terminal extension are required for zymogen processing, sorting within the secretory pathway, and activity of tomato subtilase 3 (SISBT3). *Journal of Biological Chemistry*. 284(21): 14068–14078.



- Chao, W. S., Gu, Y., Pautot, V., Bray, E. A., & Walling, L. L. (1999). Leucine aminopeptidase Rnas , proteins , and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiology*. 120: 979–992.
- Chatzivasilieiadis, E. A., & Sabelis, M. W. (1997). Toxicity of methyl ketones from tomato trichomes to *Tetranychus urticae* Koch. *Experimental & Applied Acarology*. 21: 473–484.
- Chen, C., Zhang, Y., Qiakufu, K., Zhang, X., Han, L. M., Hua, W. P., ... Wang, Z. Z. (2016). Overexpression of tomato *Prosystemin (leps)* enhances pest resistance and the production of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* bunge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64(41): 7760–7769.
- Chen, Y.-L., Lee, C.-Y., Cheng, K.-T., Chang, W.-H., Huang, R.-N., Nam, H. G., & Chen, Y.-R. (2014). Quantitative peptidomics study reveals that a wound-induced peptide from PR-1 regulates immune signaling in tomato. *The Plant Cell*. 26(10): 4135–4148.
- Cheng, F. Y., Zamski, E., Guo, W. W., Pharr, D. M., & Williamson, J. D. (2009). Salicylic acid stimulates secretion of the normally symplastic enzyme mannitol dehydrogenase: A possible defense against mannitol-secreting fungal pathogens. *Planta*. 230(6): 1093–1103.
- Chichkova, N. V., Shaw, J., Galiullina, R. A., Drury, G. E., Tuzhikov, A. I., Kim, S. H., ... Taliansky, M. (2010). Phytaspase, a relocalisable cell death promoting plant protease with caspase specificity. *EMBO Journal*. 29(6): 1149–1161.
- Chichkova, N. V., Tuzhikov, A. I., Taliansky, M., & Vartapetian, A. B. (2012). Plant phytaspases and animal caspases: Structurally unrelated death proteases with a common role and specificity. *Physiologia Plantarum*. 145(1): 77–84.
- Chichkova, N. V., Kim, S. H., Titova, E. S., Kalkum, M., Morozov, V. S., Rubtsov, Y. P., ... Vartapetian, A. B. (2004). A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *The Plant Cell*. 16(1): 157–171.
- Chowdhury, S. D., Sarkar, A. K., & Lahiri, A. (2016). Effect of inactivating mutations on peptide conformational ensembles: The plant polypeptide hormone systemin. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 56(7): 1267–1281.

- Coffeen, W. C., & Wolpert, T. J. (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *The Plant Cell*. 16(4): 857–873.
- Coppola, M., Corrado, G., Coppola, V., Cascone, P., Martinelli, R., Digilio, M. C., ... Rao, R. (2015). Prosystemin overexpression in tomato enhances resistance to different biotic stresses by activating genes of multiple signaling pathways. *Plant Molecular Biology Reporter*. 33(5): 1270–1285.
- Dalin, P., Ågren, J., Björkmann, C., Huttunen, P., & Kärkkäinen, K. (2008). Leaf trichome formation and plant resistance to herbivory leaf trichome formation and plant resistance to herbivory. *Induced Plant Resistance to Herbivory* 89–105.
- D'Erfurth, I., Le Signor, C., Aubert, G., Sanchez, M., Vernoud, V., Darchy, B., ... Gallardo, K. (2012). A role for an endosperm-localized subtilase in the control of seed size in legumes. *New Phytologist*. 196(3): 738–751.
- Délano, J. P., Dombrowski, J. E., & Ryan, C. A. (1999). The expression of tomato prosystemin in *Escherichia coli*: A structural challenge. *Protein Expression and Purification*. 17(1): 74–82.
- Ding, Y., Wang, J., Wang, J., Stierhof, Y. D., Robinson, D. G., & Jiang, L. (2012). Unconventional protein secretion. *Trends in Plant Science*. 17(10): 606–615.
- Dombrowski, J. E., Pearce, G., & Ryan, C. A. (1999). Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(22): 12947–12952.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12947>
- Douglass, J.O., Civelli, O., Birnberg, N., Comb, M., Ubler, M., Lissitzky, J.C., & Herbert, E. (1984). Regulation of expression of opioid peptide genes. *American Neurological Association*. 16: 22-30.
- Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (1964). Butterflies and Plants : A Study in Coevolution. *Society for the Study of Evolution*. 18(4): 586–608.
- Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1990). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87(19): 7713–7716.
- Felix, G., & Boller, T. (1995). Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *The Plant Journal*. 7(3): 381–389.



- Figueiredo, J., Sousa Silva, M., & Figueiredo, A. (2017). Subtilisin-like proteases in plant defence: the past, the present and beyond. *Molecular Plant Pathology*. 1–12.
- Fisher, M. J., & Scheller, R. H. (1988). Prohormone processing and the secretory pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(32): 16515–16518.
- Fowler, J. H., Narvaez-Vasquez, J., Aromdee, D. N., Pautot, V., Holzer, F. M., & Walling, L. L. (2009). Leucine aminopeptidase regulates defense and wound signaling in tomato downstream of jasmonic acid. *The Plant Cell*. 21(4): 1239–1251.
- Fraenkel, G. S. (1959). The raison d'être substances of secondary plant. *Science*. 129(3361): 1466–1470.
- Freeman, B.C., & Beattie, G.A. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*.
- Fuller, R. S., Sterne, R. E., & Thorner, J. (1988). Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annual Review of Physiology*. 50(1): 345–362.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S. (2013). *Plant defense against insect herbivores*. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14).
- Gershenson, J. (1994). Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher-plants. *Journal of Chemical Ecology*. 20(6): 1281–1328.
- Ghorbani, S., Hoogewijs, K., Pečenková, T., Fernandez, A., Inzé, A., Eeckhout, D., ... Hilson, P. (2016). The SBT6.1 subtilase processes the GOLVEN1 peptide controlling cell elongation. *Journal of Experimental Botany*. 67(16): 4877–4887.
- 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(6): 1203-1207.
- Gozzo, F., & Faoro, F. (2013). Systemic acquired resistance (50 years after discovery): Moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61: 12473-12491.
- Gómez-Gómez, L., & Boller, T. (2002). Flagellin perception: A paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*. 7(6): 251–256.
- Green, T. R., & Ryan, C. A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. *Science*. 175(4023): 776–777.



Literatur

- Greenberg, J. T. (1997). Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 525–45.
- Gu, Y. Q., Chao, W. S., & Walling, L. L. (1996)-a. Localization and post translational processing of the wound induced leucine aminopeptidase proteins of tomato. *Journal of Biological Chemistry*. 271(42): 25880-25887.
- Gu, Y., Pautot, V., Holzer, F. M., & Walling, L. (1996)-b. A complex array of proteins related to the multimeric leucine aminopeptidase of tomato. *Plant Physiology*. 110: 1257-1 266.
- Gu, Y., & Walling, L. L. (2000). Specificity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-A) of tomato. Activity on dipeptide and tripeptide substrates. *European Journal of Biochemistry*. 267: 1178-1187
- Hamilton, R.H., & Fall, M.Z. (1971). The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia*. 27(2): 229-30
- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., & Fuji, K. (2009). A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes & Development*. 23: 2496–2506.
<https://doi.org/10.1101/gad.1825209>
- Hausmann, L., & Töpfer, R. (1999). Entwicklung von Plasmid-Vektoren. *Vortr. Pflanzenzücht.* 45: 155–172.
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D. F., & Gan, S. (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in arabidopsis leaf senescence. *Plant Physiology*. 128: 876–884. <https://doi.org/10.1104/pp.010843>.
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*. 44: 321–334.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., & Mullineaux, P.M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*. 42(6): 819-832
- Hind, S. R., Malinowski, R., Yalamanchili, R., & Stratmann, J. W. (2010). Tissue-type specific systemin perception and the elusive systemin receptor. *Plant Signal Behaviour*. 5(1): 42–44.



Literatur

- Holton, N., Cano-Delgado, A., Harrison, K., Montoya, T., Chory, J., & Bishop, G. J. (2007). Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is required for systemin-induced root elongation in *Solanum pimpinellifolium* but is not essential for wound signaling. *The Plant Cell*. 19(5): 1709–1717.
- Horsfall, J.G., & Cowling, E.B. (1980). Plant disease: An advanced treatise. Vol. 5. How plants defend themselves. *Academic Press*.
- Howe, G. A., & Ryan, C. A. (1999). Suppressors of systemin signaling identify genes in the tomato wound response pathway. *Genetics*. 153(3): 1411–1421.
- Howe, G. A., Lee, G. I., Itoh, A., Li, L., & Derocher, A. E. (2000). Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiology*. 123(2): 711–724.
- Howe, G. A., & Schaller, A. (2008). Direct Defenses in Plants and Their Induction by Wounding and Insect Herbivores. *Induced Plant Resistance to Herbivory*. pp 7-29. Springer Verlag
- Hrazdina, G., Marx, G. A., & Hoch, H. C. (1982). Distribution of secondary plant metabolites and their biosynthetic enzymes in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. Anthocyanins and flavonol glycosides. *Plant Physiology*. 70(3): 745–748.
- Huffaker, A., Pearce, G., & Ryan, C. A. (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(26): 10098–10103.
- Imlau, A., Truernit, E., & Sauer, N. (1999). Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant Cell*. 11: 309–322.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*. 444(7117): 323–329.
- Kaneda, M., & Tominga, N. (1975). Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *Journal of Biochemistry*. 78(6): 1287–1296.



Literatur

- Kang, J.-H., Liu, G., Shi, F., Jones, A. D., Beaudry, R. M., & Howe, G. A. (2010). The tomato odorless-2 mutant is defective in trichome-based production of diverse specialized metabolites and broad-spectrum resistance to insect herbivores. *Plant Physiology*. 154(1): 262–72.
- Katsir L., Davies, K.A., Bergmann, D.C., & Laux, T. (2011). Peptide signaling in plant development. *Current Biology*. 21(9): 356–364.
- Katti, M. V, Sami-Subbu, R., Ranjekar, P. K., & Gupta, V. S. (2000). Amino acid repeat patterns in protein sequences: Their diversity and structural-functional implications. *Protein Science*. 9(6): 1203–1209.
- Kenrick, P., & Crane, P. R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature*. 389: 33-39.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26(4): 239-57.
- Krause, C., Richter, S., Knöll, C., & Jürgens, G. (2013). Plant secretome — From cellular process to biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1834(11): 2429–2441.
- Kurjan, J., & Herskowitz, I. (1982). Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): A putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell*. 30(3): 933-43.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., ...Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23(21): 2947-8.
- Lechan, R. M., Wu, P., Jaconson, I. M. D., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G., & Goodman, R. H. (1986). Thyrotropin-releasing hormone precursor: Characterization in rat brain. *Science*. 231: 159–161.
- Li, C., Liu, G., Xu, C., Lee, I., Bauer, P., Ling, H., ... Howe, G.A. (2003). The tomato *suppressor of Prosystemin-mediated responses2* gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *The Plant Cell*. 15: 1646–1661.

- Li, C., Wang, Z., & Jones, A. D. (2014). Chemical imaging of trichome specialized metabolites using contact printing and laser desorption / ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406:171–182.
- Liu, S., Bugos, R. C., Dharmasiri, N., & Su, W. W. (2001). Green fluorescent protein as a secretory reporter and a tool for process optimization in transgenic plant cell cultures. *Journal of Biotechnology*. 87: 1–16.
- Malinowski, R., Higgins, R., Luo, Y., Piper, L., Nazir, A., Bajwa, V. S., ... Stratmann, J. W. (2009). The tomato brassinosteroid receptor BRI1 increases binding of systemin to tobacco plasma membranes, but is not involved in systemin signaling. *Plant Molecular Biology*. 70(5): 603–616.
- Martinez, D. E., Borniego, M. L., Battchikova, N., Aro, E. M., Tyystjärvi, E., & Guiamét, J. J. (2015). SASP, a senescence-associated subtilisin protease, is involved in reproductive development and determination of silique number in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 66(1): 161–174.
- Matos, J. L., Fiori, C. S., Silva-Filho, M. C., & Moura, D. S. (2008). A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 582(23–24): 3343–3347.
- Matsubayashi, Y. (2011)-a. Post-translational modifications in secreted peptide hormones in plants. *Plant and Cell Physiology*. 52(1): 5–13.
- Matsubayashi, Y. (2011)-b. Small post-translationally modified peptide signals in arabidopsis. *The Arabidopsis Book*. Vol.9: 1-11
- Matsubayashi, Y. (2014). Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 65(1): 385–413.
- Matsubayashi, Y., & Sakagami, Y. (2006). Peptide hormones in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 649-74
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E., & Browse, J. (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94(10): 5473–7.
- McDowell, E. T., Kapteyn, J., Schmidt, A., Li, C., Kang, J.-H., Descour, A., ... Gang, D. R. (2011). Comparative functional genomic analysis of solanum glandular trichome types. *Plant Physiology*, 155(1): 524–539.



Literatur

- McGurl, B., Orozco-Cardenas, M., Pearce, G., & Ryan, C. A. (1994). Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91(21): 9799–9802.
- McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M., & Ryan, C. A. (1992). Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science*. 255(5051): 1570-3.
- McGurl, B., & Ryan, C. A. (1992). The organization of the prosystemin gene. *Plant Molecular Biology*. 20(3): 405–409.
- Meindl, T., Boller, T., & Felix, G. (1998). The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *The Plant Cell*. 10(9): 1561–1570.
- Metraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Gaudin, J., Raschdorf, K., ... Inverardi, B. (1983). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*. 250(8): 8–11.
- Meyer, M., Huttenlocher, F., Cedzich, A., Procopio, S., Stroeder, J., Pau-Roblot, C., ... Schaller, A. (2016). The subtilisin-like protease SBT3 contributes to insect resistance in tomato. *Journal of Experimental Botany*. 67(14): 4325–4338.
- Murphy, E., Smith, S., & Smet, I. De. (2012). Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: How cells communicate over a short distance. *The Plant Cell*. 24: 3198–3217.
- Narváez-Vásquez, J., & Pearce, G. (1995). Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic translocation of systemin in tomato plants. *Planta*. 195: 593–600.
- Narváez-Vásquez, J., & Ryan, C. A. (2004). The cellular localization of prosystemin: A functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta*. 218(3): 360–369.
- Oldfield, C. J., Meng, J., Yang, J. Y., Yang, M. Q., Uversky, V. N., & Dunker, A. K. (2008). Flexible nets: Disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners. *BMC Genomics*. 9: S1.
- Oparka, K. J., Roberts, A. G., Boevink, P., Cruz, S. S., Roberts, I., Pradel, K. S., ... Epel, B. (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell*. 97(6): 743–754.



- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. 189(4200): 347-58.
- Pearce, G., Johnson, S., & Ryan, C. A. (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.
- Pearce, G., Moura, D. S., Stratmann, J., & Ryan, C. A. (2001). Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature*. 411(6839): 817–820.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., & Ryan, C. A. (1991). A polypeptide from Tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*. 253: 895-897.
- Perez-Clemente, R. M., Vives, V., Zandalinas, S. I., Lopez-Climent, M. F., Munoz, V., & Gomez-Cadenas, A. (2013). Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *BioMed Research International*. 2013: 654120.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5(5): 308–316.
- Purrington, C. B. (2000). Costs of resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 3(4): 305–308.
- Rautengarten, C., Steinhauser, D., Büssis, D., Stintzi, A., Schaller, A., Kopka, J., & Altmann, T. (2005). Inferring hypotheses on functional relationships of genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *PLoS Computational Biology*. 1(4): 0297–0312.
- Rautengarten, C., Usedal, B., Neumetzler, L., Hartmann, J., Büssis, D., & Altmann, T. (2008). A subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from *Arabidopsis* seed coats. *The Plant Journal*. 54: 466–480.
- Rose, R., Schaller, A., & Ottmann, C. (2010). Structural features of plant subtilases. *Plant Signaling and Behavior*. 5(2): 180–183.
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1477(1–2): 112–121.
- Ryan, C. A., & Moura, D. S. (2002). Systemic wound signaling in plants: a new perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Commentary*. 99(10): 6519–6520.



Literatur

- Schaller, A. (1998). Action of proteolysis-resistant systemin analogues in wound signalling. *Phytochemistry*. 47(4): 605–612.
- Schaller, A., & Frasson, D. (2001). Induction of wound response gene expression in tomato leaves by ionophores. *Planta*. 212(3): 431–435.
- Schaller, A., & Stintzi, A. (2008). Jasmonate biosynthesis and signaling for induced plant defense against herbivory. *Induced Plant Resistance to Herbivory*. pp 349–366. Springer Verlag
- Schaller, A., & Stintzi, A. (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. *Phytochemistry*. 70(13–14): 1532–1538.
- Schaller, A., Stintzi, A., Rivas, S., Serrano, I., Chichkova, N. V., Vartapetian, A. B., ... Vera, P. (2017). From structure to function - A family portrait of plant subtilases. *New Phytologist*.
- Schaller, A., & Oecking, C. (1999). Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *The Plant Cell*. 11(2): 263–72.
- Schaller, A., & Ryan, C.A. (1995). Systemin - A polypeptide defense signal in plants. *BioEssays*. 18(1): 27-33.
- Schaller, A., Bergey, D.R., & Ryan, C.A. (1995). Induction of wound response genes in tomato leaves by Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase. *The Plant Cell*. 7: 1893-1898.
- Schardon, K., Hohl, M., Graff, L., Pfannstiel, J., Schulze, W., Stintzi, A., & Schaller, A. (2016). Precursor processing for plant peptidehormone maturation by subtilisin-likeserine proteinases. *Science*. 354:1594-1597
- Scheer, J. M., & Ryan, C. A. (2002). The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99(14): 9585–90.
- Scheer, J. M., & Ryan, C. A. (1999). A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *The Plant Cell*. 11(8): 1525–1536.
- Schillmiller, A. L., & Howe, G. A. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*. 8(4): 369–377.



Literatur

- Schillmiller, A. L., Schauvinhold, I., Larson, M., Xu, R., Charbonneau, A. L., Schmidt, A., ... Pichersky, E. (2009). Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 106(26): 10865–10870.
- Sequeira, L. (1983). Mechanisms of induced resistance in plants. *Annual Review of Microbiology*. 37(1): 51–79.
- Shepherd, R. W., Bass, W. T., Houtz, R. L., & Wagner, G. J. (2005). Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on aerial surfaces by short glandular trichomes. *Plant Cell*. 17:1851–1861.
- Smith, E.L., Markland, F.S., Kasper, C.B., DeLange, R.J., Landon, M., & Evans, W.H. (1966). The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN and Carlsberg. *Journal of Biological Chemistry*. 241 (24): 5974–5976
- Srivastava, R., Liu, J. X., Guo, H., Yin, Y., & Howell, S. H. (2009). Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 59(6): 930–939.
- Srivastava, R., Liu, J. X., & Howell, S. H. (2008). Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 56(2): 219–227.
- Staswick, P. E., Tiryaki, I., & Rowe, M. L. (2002). Jasmonate response locus *JAR1* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell*, 14: 1405–1415.
- Stegmann, M., Monaghan, J., Smakowska-Luzan, E., Rovenich, H., Lehner, A., Holton, N., ... Zipfel, C. (2017). The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science*. 355(6322): 287–289.
- Steiner, D.F. (1998). The proprotein convertases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2: 31–39.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., & Farmer, E. E. (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 98(22): 12837–12842.



- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U. B., Howe, G. A., Weiler, E. W., Amrhein, N., ... Schaller, A. (2002). Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *The Plant Journal*. 32(4), 585–601.
- Sugita, Y., & Okamoto, Y. (1999). Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters*. 314: 141–151.
- Sun, J. Q., Jiang, H. L., & Li, C. Y. (2011). Systemin/Jasmonate-mediated systemic defense signaling in tomato. *Molecular Plant*. 4(4): 607–615.
- Tabata, R., & Sawa, S. (2014). Maturation processes and structures of small secreted peptides in plants. *Frontiers in Plant Science*. 5(311): 1–6.
- Takahashi, H., Teranishi, Y., Nakanishi, S., Shosaku, N. (1981). Isolation and structural organization of the human corticotropin- β -lipotropin precursor gene. *FEBS Letters*. 135: 97-102.
- Tamaki, T., Betsuyaku, S., Fujiwara, M., Fukao, Y., Fukuda, H., & Sawa, S. (2013). SUPPRESSOR of LLP1 1-mediated C-terminal processing is critical for CLE19 peptide activity. *The Plant Journal*. 76(6): 970–981.
- Tanaka, H., Onouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C., & Machida, Y. (2001). A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development*. 128(23): 4681–4689.
- Taylor, A., & Qiu, Y. (2017). Evolutionary History of Subtilases in Land Plants and Their Involvement in Symbiotic Interactions. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 30(6): 489–501.
- Thorsteinson, A.J. (1953). The chemotactic responses that determine host specificity in an oligophagus insect (*Plutella maculipennis* (Curt.) Lepidoptera). *Canadian Journal of Zoology*. 31: 52-72.
- Thornberry, N.A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science*. 281: 1312-1316
- Tissier, A. (2012). Glandular trichomes: What comes after expressed sequence tags? *The Plant Journal*. 70(1): 51–68.
- Tortiglione, C., Fogliano, V., Ferracane, R., Fanti, P., Pennacchio, F., Monti, L. M., & Rao, R. (2003). An insect peptide engineered into the tomato prosystemin gene is released in transgenic tobacco plants and exerts biological activity. *Plant Molecular Biology*. 53(6): 891–902.

- Turner, J. G., Ellis, C., & Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell*. 14: S153–164.
- Vartapetian, A. B., Tuzhikov, A. L., Chichkova, N. V., Taliansky, M., & Wolpert, T. J. (2011). A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. *Cell Death and Differentiation*. 18(8): 1289–97.
- Vetsch, M. (1999). Prosystemin aus *Lycopersicon esculentum*: Überexpression, Reinigung und Charakterisierung. *Diplomarbeit*.
- Vetsch, M., Janzik, I., & Schaller, A. (2000). Characterization of prosystemin expressed in the baculovirus/insect cell system reveals biological activity of the systemin precursor. *Planta*. 211(1): 91–7.
- Chao, W. S., Gu, Y. Q., Pautot, V., Bray, E. A., Walling L.L. (1999). Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiology*, 120(4): 979–992.
- Wang, J., Ding, Y., Wang, J., Hillmer, S., Miao, Y., Lo, S. W., ... Jiang, L. (2010). EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in *Arabidopsis* and tobacco cells. *The Plant Cell*. 22(12): 4009–4030.
- Wang, Z., & Moulton, J. (2001). SNPs, Protein Structure, and Disease. *Human Mutation*. 17: 263–270.
- Wang, L., Einig, E., Almeida-Trapp, M., Albert, M., Fliegmann, J., Mithöfer, A., ... Felix, G. (2018). The systemin receptor SYR1 enhances resistance of tomato against herbivorous insects. *Nature Plants*. 4: 152–156.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling and Behavior*. 7(10): 1306–1320.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*. 100(4): 681–697.
- Wittstock, U., & Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*. 5(4): 300–307.



Literatur

- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S. A., & Nagatani, A. (1999) Light-dependent translocation of a phytochrome b-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *The Journal of Cell Biology*. 145(3): 437–445.
- Zhang, H., Yu, P., Zhao, J., Jiang, H., Wang, H., Zhu, Y., ... Lin, J. (2017). Expression of tomato prosystemin gene in *Arabidopsis* reveals systemic translocation of its mRNA and confers necrotrophic fungal resistance. *New Phytologist*.
- Zhang, H., & Hu, Y. (2017). Long-distance transport of prosystemin messenger RNA in tomato. *Frontiers in Plant Science*. 8(1894): 1–8.
- Zhang, H., Zhang, L., Gao, B., Fan, H., Jin, J., Botella, M. A., ... Lin, J. (2011). Golgi apparatus-localized synaptotagmin 2 is required for unconventional secretion in *Arabidopsis*. *PLOS One*. 6(11): 1-14



6. Anhang

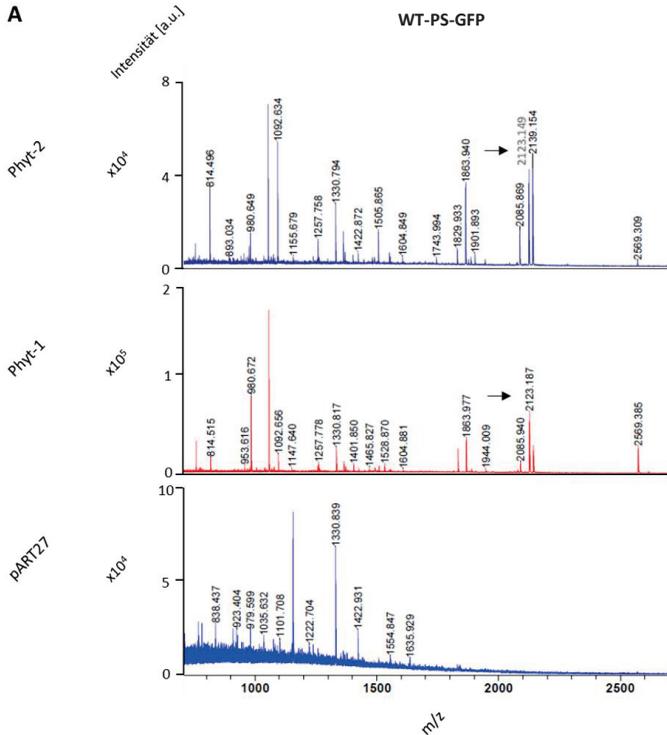


Abbildung A 1: MALDI-TOF-MS Analyse der Spaltprodukte von WT-PS-GFP, die durch *SPhyt-1* und *SPhyt-2* generiert wurden.

SPhyt-1/-2 bzw. pART27 (NK) wurden in *N. benthamiana* exprimiert und die apoplastischen Proteinextrakte über Zentrifugalkonzentratoren (30kDa) angereichert. Danach wurden die Extrakte mit WT PS GFP inkubiert und die prozessierten Peptide über Zentrifugalkonzentratoren (10kDa) isoliert. Die MALDI-TOF-MS Analyse zeigte ein Massesignal von ca. 2123 Da für *SPhyt-1* (A, mitte) und *SPhyt-2* (A, oben), welches bei der Negativkontrolle (pART27) (A, unten) nicht detektiert werden konnte.

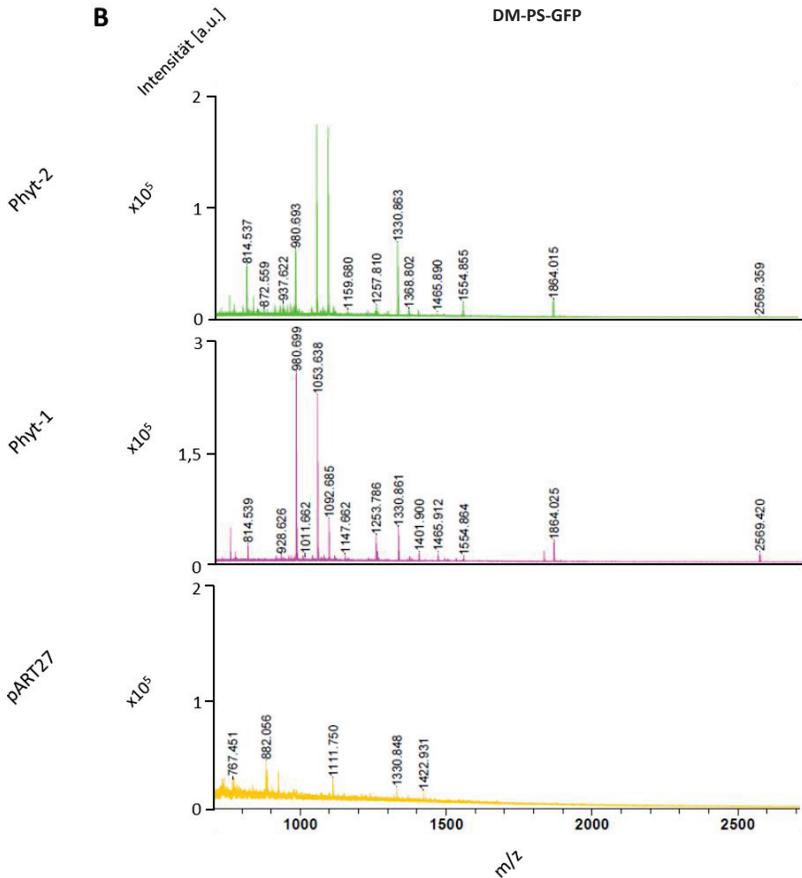


Abbildung A 2: MALDI-TOF-MS Analyse der Spaltprodukte von DM-PS-GFP, die durch *SPhyt-1* und *SPhyt-2* generiert wurden.

SPhyt-1/-2 bzw. pART27 (NK) wurden in *N. benthamiana* exprimiert und die apoplastischen Proteinextrakte über Zentrifugalkonzentratoren (30kDa) angereichert. Danach wurden die Extrakte mit DM PS GFP (**B**) inkubiert und die prozessierten Peptide über Zentrifugalkonzentratoren (10kDa) isoliert. Die MALDI-TOF-MS Analyse zeigte kein Massesignal von ca. 2123 Da für *SPhyt-1* (**B**, mitte) und *SPhyt-2* (**B**, oben) oder bei der Negativkontrolle (pART27) (**B**, unten)

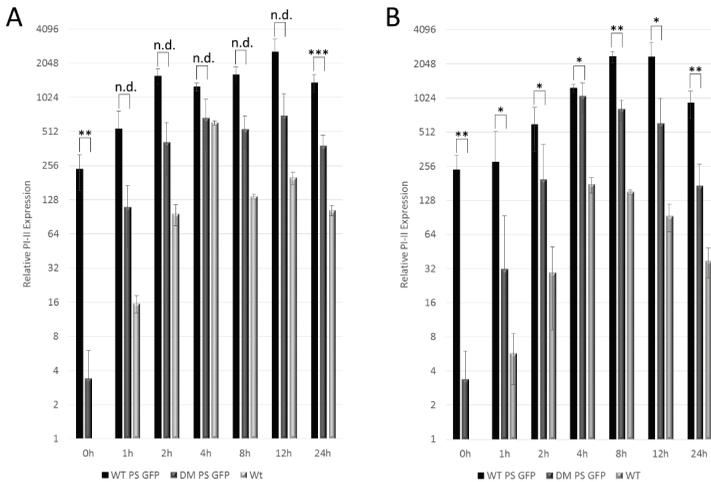


Abbildung A 3: Lokale und systemische Induktion von PI-II nach Verwundung in WT- und DM-PS-EGFP überexprimierenden Pflanzen im zeitlichen Verlauf.

Lokales (**A**) und systemisches (**B**) PI-II mRNA Level in transgenen Tomatenpflanzen nach Verwundung (t in h, x-Achse), die entweder WT PS EGFP oder DM PS EGFP überproduzieren, relativ zu den nicht-transgenen unverwundeten Kontrollpflanzen. qRT-PCR wurde auf mRNA von drei unabhängigen transgenen Linien (vereinigt Blattmaterial von sechs zwei Wochen alten verwundeten Pflanzen) gemacht, die entweder WT oder DM PS EGFP überexprimieren. Die Daten repräsentieren den logarithmierten Mittelwert (log₂) +/- Standardabweichung (n=3). Signifikanter Unterschied nach student's t-test: * p ≤ 0,1; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001.



7. Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herr Prof. Dr. Andreas Schaller für die Möglichkeit meine Dissertation anzufertigen. Sowohl die sehr gute Unterstützung und Motivation, wie auch die herausragende Betreuung machten es mir erst möglich, dieses Ziel zu erreichen. Die zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene werden mir immer in sehr guter Erinnerung bleiben und waren sehr bereichernd. Bei Herrn Prof. Dr. Artur Pfitzner möchte ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit bedanken. Ein weiterer besonderer Dank geht an Frau Dr. Annick Stintzi, die mich sowohl fachlich, wie auch persönlich in den letzten Jahren während der Masterarbeit und der Doktorarbeit intensiv begleitet hat, mir stetig zur Entwicklung von neuen Denkansätzen verhalf. Bei Frau Prof. Dr. Waltraud Schulze bedanke ich mich für den Prüfungsbeisitz. Ein großer Dank geht an Dr. Jens Pfannstiel und Berit Würtz für die Analyse der MS-Daten und die zahlreichen Besprechungen. Ein weiterer Dank geht an die Kooperationspartner Prof. Dr. Andrey Vartapetian und Dr. Roman Beloshistov (Belozersky Institute of Physico Chemical Biology, Moscow State University) für die Zusammenarbeit an der Spaltung von Prosystemin. Ein großer Dank geht auch an Dr. Nils Stührwohldt, der immer ein offenes Ohr hatte und mit seiner Fachkenntnis immer zu helfen wusste.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die zweijährige finanzielle Förderung. Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen bedanken, die ihren Teil zu dieser beigetragen haben. Ein besonderer Dank geht an Denisa Heindel für die Unterstützung bei den Versuchen und Ursula Glück-Behrens für die Erhaltungskulturen, sowie allen Mitarbeitern des Gewächshauses, die meinen Urwald aus Tomaten über die Jahre gepflegt haben.

Ein weiterer großer Dank geht an meine Familie, die mich immer unterstützt hat und auch in schwierigen Zeiten mir immer wieder Kraft gegeben hat, wie auch meiner Freundin und ihrer Familie und allen, die ich vergessen habe.



8. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema „Die Reifung des Peptidhormons Systemin durch Phytaspasen und ihre Bedeutung für die Wundsignaltransduktion in der Tomate“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift



Konrad Dreizler, Biologe (M.Sc.)

Neckarstraße 140/1 • 70190 Stuttgart • Mobil: 0176-63120293
E-Mail: Konrad.Dreizler@gmx.de

Lebenslauf

Geburtstag: 14. November 1985 in Heidelberg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch



BERUFSERFAHRUNG

- 02/2013 – bis jetzt **Universität Hohenheim, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, *Doktorand***
- Titel der Dissertation: „Die Reifung des Peptidhormons Systemin durch Phytaspasen und ihre Bedeutung für die Wundsignaltransduktion in der Tomate“
 - Projektplanung und Anleitung von neuen Doktoranden und Studenten. S1-Labor
- 10/2015 – 10/2017 **Universität Hohenheim, Humboldt reloaded, Bundesministerium für Bildung und Forschung (<https://humboldt-reloaded.uni-hohenheim.de/>), *Projektkoordinator***
- Forschungsorientierte Hochschullehre
 - Planung und Organisation von Abschlussstagen
 - Teilnahme an Seminaren zur Lehr- und Lernprozessen
 - Planung und Organisation von Projekten
 - Projektakquise (An Projektbetreuern und Studierenden)
- 10/2012 – 12/2012 **Universität Hohenheim, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, *Wissenschaftliche Hilfskraft***
- Hilfswissenschaftliche Laborarbeiten
 - Technische Prüfung von Laborgeräten
- 03/2008 – 04/2008 **FLI, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Tübingen *Wissenschaftliche Hilfskraft***
- Erwerb von methodischen Kenntnissen in der Immunologie
- 11/2009 – 07/2010 **Institut für Tropenmedizin, Universitätsklinikum Tübingen *Wissenschaftliche Hilfskraft***
- Zucht und Pflege von verschiedenen Versuchstieren

AUSBILDUNG

- 10/2010 – 12/2012 **Universität Hohenheim *Master of science in Biologie* (Note: 1,3)**
- Titel der Masterarbeit: „Untersuchungen zur Phytaspase-abhängigen Reifung des Wundhormons Systemin“. S1-Labor



Konrad Dreizler, Biologe (M.Sc.)

Neckarstraße 140/1 • 70190 Stuttgart • Mobil: 0176-63120293

E-Mail: Konrad.Dreizler@gmx.de

AUSBILDUNG (Fortsetzung)

- 10/2007 – 09/2010 **Universität Tübingen, FLI, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit *Bachelor of science in Biologie*** (Note: 2,4)
- Titel der Bachelorarbeit: „Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen das humane Rhinovirus 1B“. S3/L3-Labor
- 09/2003-07/2006 **Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Schwäbisch Gmünd *Abitur*** (Note: 2,7)

PUBLIKATIONEN

- 2017 Beloshistov and Dreizler et al., 2017. Phytaspase-mediated precursor processing and maturation of the wound hormone systemin. *The New Phytologist* (2017) doi:10.1111/nph.14568

AUSZEICHNUNGEN

- 04/2014 – 03/2016 **Promotionsstipendium des Landes Baden-Württemberg**

KONFERENZEN

- 02/2017 **30. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen**, Dabringhausen
Vortrag – „Maturation of the wound hormone systemin and identification of prosystemin processing enzymes“
- 04/2017 **Regio plant science Meeting**, MPI, Tübingen
Vortrag – „Wound hormone biogenesis by phytaspase mediated processing of prosystemin“
- 2013 – 2017 **Plant Regio Meeting Stuttgart – Ulm – Tübingen**
Jährliches Poster und Kurzpräsentation

LEHRE

- 2015 Konzeption und Betreuung von Abschlussarbeiten (M.Sc. und B.Sc.)
2013 – 2016 Konzeption und Durchführung von Laborpraktika (M.Sc. und B.Sc.)
2013 – 2017 Seminarbetreuung, „Einführung in die Molekularbiologie“ (B.Sc.)

GRUNDKENNTNISSE UND SOZIALES ENGAGEMENT

- Sprachen: Deutsch (Muttersprachlich) / Englisch (verhandlungssicher) / Französisch (Grundkenntnisse)
- EDV: MS Office, Inkscape, Adobe Photoshop, GraphPad Prism, SigmaPlot, SigmaStat
- Interessen: Outdoor-Aktivitäten, Sport
- Engagement: Württembergischer Angelverein (WAV), Ehrenamtliche Jugendarbeit, Kinderschutzbund, Naturkundeverein



