



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