

Inhaltsverzeichnis

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

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

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