

Zusammenfassung	IV
Summary	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Matrix Metalloproteinasen	1
1.1.1 Struktur und Funktion	1
1.1.2 MMPs aus Pflanzen	4
1.1.3 <i>SMMP1</i>	7
1.2 Membranständigkeit über GPI-Anker	13
1.2.1 Struktur und Funktion des GPI-Ankers	14
1.2.2 GPI-verankerte Proteine in Pflanzen	18
1.2.3 Vorhersage und Überprüfung von GPI-Verankerung	20
1.3 Die Pflanze in ihrer Umwelt und die Bedeutung des Apoplasten	21
1.3.1 Aufbau und Funktion der extrazellulären Matrix	22
1.3.2 Das „Sekretom“	24
1.4 Zielsetzungen dieser Arbeit	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits	28
2.2 Organismen	28
2.2.1 Tomatenpflanzen	28
2.2.2 Zellkulturen	29
2.2.3 Bakterien-Stämme	29
2.3 Vektoren und Plasmide	29
2.4 Anzucht des biologischen Materials	30
2.4.1 Desinfektion der Tomatensamen	30
2.4.2 Ernte der Samen und Stratifikation	30
2.4.3 Wachstumsbedingungen für Tomaten- und Tabakpflanzen	31
2.5 Molekularbiologische Methoden	31
2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Plasmid-Mini-Präparation)	31
2.5.2 Transiente Expression von Fusionsproteinen in Zwiebelepidermis	31
2.6 Proteinanalytische Methoden	32
2.6.1 Isolierung von Proteinen aus Kalli	32

2.6.2	Isolierung von Proteinen aus Suspensionskultur	32
2.6.3	Isolierung von Proteinen aus Pflanzen	33
2.6.4	Isolierung von Membranen aus Suspensionskultur	33
2.6.5	Isolierung von Membranen aus Pflanzen	33
2.6.6	Gewinnung apoplastischer Proteine aus Pflanzen	34
2.6.7	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	35
2.6.8	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.6.9	Western Blot	37
2.6.10	Immunodetektion	37
2.6.11	Phasenseparation mit TX-114	38
2.6.12	Prozessierungstests	39
2.6.13	Phospholipase-Behandlung von Zellen und Membranen	39
2.6.14	Expression von MMP-(His ₆) in <i>E.coli</i> BL-21-RIL	40
2.6.15	Zweidimensionale SDS-PAGE zur Substratidentifizierung	42
2.6.16	Tris-II-Ruthenium-Fluoreszenzfärbung	43
2.6.17	Zymographie mit fluorogener Gelatine	43
2.6.18	Massenspektrometrie	44
2.6.19	N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau)	46
2.6.20	Expression von P69B-(His) ₆ in <i>N.benthamiana</i>	47
2.6.21	<i>In-vitro</i> -Verdau und Analyse aufgereinigten P69B-(His) ₆	47
2.7	Proteomische Methoden	47
2.7.1	Isolierung und Aufreinigung von Proteinen	50
2.7.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D)	52
2.7.3	Differenzielle fluoreszierende 2D-Gelelektrophorese (2D-DIGE)	55
2.7.4	Statistische Auswertung	57
2.7.5	Präparative Gele	58
2.7.6	Massenspektrometrische Analyse	59
2.8	Transiente Expression von Proteinen in <i>N.benthamiana</i>	59
2.8.1	Anzucht von <i>A.tumefaciens</i>	59
2.8.2	Infiltration in Blätter	60
2.8.3	Färbung der Blätter	60
3	Ergebnisse	61
3.1	Subzelluläre Lokalisation von <i>SiMMP1</i>	61

3.1.1	Prognose mit online verfügbaren Programmen	61
3.1.2	Erstellung von Expressionskonstrukten	63
3.1.3	Analyse der Expressionskonstrukte in Zellkultur	64
3.1.4	Analyse der Expressionskonstrukte in Blattextrakten	68
3.1.5	Transiente Expression von Fusionsproteinen in Zwiebelepidermis	71
3.2	Funktionelle Analyse	74
3.2.1	Identifikation von P69B als physiologisches Substrat von <i>S/MMP1/2</i>	74
3.2.2	Spaltung von P69B <i>in vitro</i>	76
3.2.3	N-terminale Sequenzierung der P69B-Spaltprodukte	77
3.2.4	Nachweis der Inaktivierung von P69B durch <i>S/MMP1</i> mittels Zymographie	78
3.2.5	Transiente Expression von P69B in Tabak und Tomate	80
3.3	Proteomische Analyse	84
3.3.1	2D-Gelelektrophorese	84
3.3.2	2D-DIGE	86
4	Diskussion	100
4.1	Subzelluläre Lokalisation von <i>S/MMP1(/2)</i>	101
4.2	Identifizierung und Funktion eines <i>S/MMP-in-vivo</i> -Substrates	104
4.3	Proteomische Analyse	114
4.4	Fazit	122
4.5	Ausblick	122
5	Literatur	124
6	Anhang	152
6.1	Aminosäuresequenzen der <i>S/MMP1</i> -Expressionskonstrukte und der heterolog exprimierten katalytischen Domäne	152
6.2	Struktur von P69B und Analyse ihrer Spaltprodukte	153
6.3	Ergebnis der 2D-DIGE-Experimente	158

Eidesstattliche Erklärung

Dankeschön!