



Konrad Dreizler (Autor)

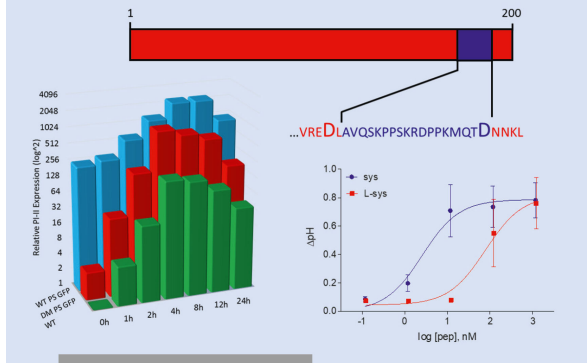
# Die Reifung des Peptidhormons Systemin durch Phytaspasen und ihre Bedeutung für die Wundsignaltransduktion in der Tomate



UNIVERSITÄT  
HOHENHEIM

200  
JAHRE

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



Cuvillier Verlag Göttingen

[www.uni-hohenheim.de](http://www.uni-hohenheim.de)

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7859>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellen</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abbildungen</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>Summary</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
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
<b>2.    Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
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 <sup>2+</sup> -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 <sub>18</sub> -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



<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
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
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>99</b>
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.	<b>Literatur</b> .....	<b>117</b>
6.	<b>Anhang</b> .....	<b>135</b>
7.	<b>Danksagung</b> .....	<b>139</b>
8.	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>141</b>
9.	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>143</b>