

**Charakterisierung einer pflanzlichen Cysteinprotease aus
*Cuscuta reflexa***

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Hochschule Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Biol. **Marc Bleischwitz**

aus

Bremerhaven

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer

Tag der Einreichung: 17.03.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2008

Darmstadt 2008

D17

Ich danke...

...Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die Bereitstellung des Themas, sein Vertrauen, seine Hilfe und Unterstützung während der Arbeit, sowie seine konstruktive Kritik.

...Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer, dass er sich als Zweitgutachter für meine Arbeit zur Verfügung stellt und für den stets netten Gedankenaustausch.

...Prof. Dr. Heribert Warzecha, dass er sich als Drittgutachter für meine Arbeit zur Verfügung stellt.

...allen Mitgliedern der AG Kaldenhoff, besonders Beate Otto für die Weitergabe ihrer Kenntnisse im Umgang mit Proteinen. Des Weiteren danke ich besonders Nadin, Marlies und Kerstin für ihre wertvolle Motivation und Norbert Uehlein für die Unterstützung in technischen Angelegenheiten.

...meiner Mutter Marlies Bleischwitz für ihre Unterstützung während der gesamten Studienzeit.

...meiner Freundin Sonja Völker für ihre tatkräftige Unterstützung. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft.

...Lilli und Manfred Völker, Jürgen und Reiner Völker mit Familien und Ellen Faust-Schnabel.

...Timo Stadtlander.

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Der Holoparasit <i>Cuscuta reflexa</i>	1
1.2.	Interaktion mit kompatiblen Wirten	2
1.3.	Cysteinproteasen	4
1.4.	Cysteinproteasen parasitärer Organismen	7
1.5.	Ziele der Arbeit	9
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1.	Arbeiten mit Bakterien.....	10
2.1.1.	<i>Escherichia coli</i>	10
2.1.2.	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	10
2.1.3.	Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i>	12
2.1.4.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
2.2.	Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren.....	13
2.2.1.	Enzymatischer Abbau von DNA	13
2.2.2.	Auftrennung von DNA-Molekülen im Agarosegel.....	13
2.2.3.	Herstellung einer genspezifischen digoxigeninmarkierten Sonde.....	14
2.2.4.	Verwendung des GATEWAY™-Systems zur Klonierung von DNA-Fragmenten	15
2.3.	Verfahren mit Ribonukleinsäuren	16
2.3.1.	Isolation von mRNA/Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe	17
2.3.2.	Auftrennen von RNA mittels Gelelektrophorese.....	17
2.3.3.	Transfer von RNA auf eine Nylonmembran	18
2.3.4.	Northern-Hybridisierung.....	19
2.3.5.	Synthese von Erststrang-cDNA.....	20
2.4.	Verfahren mit Polypeptiden.....	20
2.4.1.	Auftrennung von Proteingemischen im Polyacrylamid-Gel.....	20
2.4.2.	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	21
2.4.3.	Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran.....	21
2.4.4.	Western-Hybridisierung.....	22
2.4.5.	Elektroelution	23
2.4.6.	Entfernen von SDS aus der Probe nach Henderson (1979).....	24
2.4.7.	Aktivierung der Cysteinprotease (Cuscuin) nach Tobbell <i>et al.</i> (2002).....	24
2.4.8.	Isolierung des Propeptids mittels BD TALON™ Metal affinity Resin.....	25
2.5.	Pflanzenmaterial/Anzucht/Verwendung.....	26
2.5.1.	Anzucht von <i>Cuscuta reflexa</i>	26
2.5.2.	Anzucht von <i>Nicotiana tabacum</i> var. Samsun NN (SNN)	26
2.5.3.	Infektion der Wirtspflanzen.....	26
2.5.4.	Probennahme zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus <i>Cuscuta reflexa</i>	27
2.6.	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> var. Samsun NN (SNN) nach Horsch (1985).....	27
2.7.	Charakterisierung der Cysteinprotease.....	28
2.7.1.	Messungen mit FTC-Casein	29
2.7.2.	Bestimmung von K_m -Werten.....	30
2.7.3.	Bestimmung von K_i -Werten.....	30
2.8.	Applikation des Propeptids auf die Wirtspflanze	30

3.	ERGEBNISSE	30
3.1.	Expression einer Cysteinprotease während der Interaktion	30
3.1.1.	Vergleichende Analyse der Nucleotid- und der Aminosäuresequenz der Protease.....	31
3.1.2.	<i>In silico</i> berechnetes 3D-Modell von Cuscuin.....	31
3.2.	Expression und Isolation von Cuscuin.....	32
3.2.1.	Expression von Cuscuin.....	32
3.2.2.	Isolation von Cuscuin	33
3.3.	Charakterisierung von Cuscuin	34
3.3.1.	Messungen mit Cuscuin	34
3.3.2.	Bestimmung der optimalen Reaktionsparameter	36
3.3.3.	Bestimmung der Wechselzahl	37
3.3.4.	Bestimmung des K_m -Wertes nach Hanes-Woolf	38
3.3.5.	Bestimmung der K_i -Werte von Cuscuin und anderen Cysteinproteasen	39
3.4.	Wirkung des Propeptids auf Papain, Bromelain und Trypsin	40
3.5.	Einsatz des Propeptids als Pflanzenschutzmittel	42
3.5.1.	Behandlung von <i>Cuscuta japonica</i> mit dem Propeptid.....	47
3.6.	Konstitutive Expression des Propeptids in Tabak.....	48
3.6.1.	Integration der codierenden Sequenz des Propeptids in das Genom von <i>Nicotiana tabacum</i> mittels agrobakterieller Transformation	48
4.	DISKUSSION.....	50
4.1.	Expression einer Cysteinprotease während der Wirt-Parasit-Interaktion	50
4.2.	<i>In silico</i> Untersuchungen zur Cysteinprotease.....	51
4.2.1.	Vergleichende Analyse der Nucleotid- und Aminosäuresequenz der Protease	51
4.3.	Expression und Isolation von Cuscuin.....	51
4.4.	Charakterisierung von Cuscuin	52
4.4.1.	Messungen mit Cuscuin	52
4.4.2.	Bestimmung der optimalen Reaktionsparameter	53
4.4.3.	Bestimmung der K_i -Werte von Cuscuin und anderen Cysteinproteasen	54
4.5.	Einsatz des Propeptids als Pflanzenschutzmittel	55
5.	ZUSAMMENFASSUNG	57
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	58
7.	ANHANG	63
7.1.	Liste der Abkürzungen.....	63
7.2.	cDNA Sequenz von Cuscuin.....	64
7.3.	Verwendete Primer	65
7.4.	Verwendete Plasmide	67
7.4.1.	Plasmide zur Proteinexpression.....	67
7.4.2.	Plasmide zur Pflanzentransformation	68

1. Einleitung

1.1. Der Holoparasit *Cuscuta reflexa*

Die Familie der *Cuscutaceae* umfasst ca. 170 Spezies der Gattung *Cuscuta*. Alle Arten dieser Gattung sind für die Versorgung mit Nährstoffen vollständig auf ihren Wirt angewiesen und werden deshalb als Holoparasiten bezeichnet. Der Spross der Pflanzen windet sich während der Infektion um den des Wirts und ist wurzellos. Die Blätter von *Cuscuta* sind nur rudimentär ausgebildet (Abb. 1-1). Zur Infektion eines kompatiblen Wirts kommt es durch sogenannte Haustorien (Lat. *haurire*: trinken).



Abb. 1-1: *Cuscuta reflexa* interagiert mit der kompatiblen Wirtspflanze *Nicotiana tabacum*. Blätter des Parasiten sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Haustorien sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Diese speziellen Organe dienen dazu, Kontakt zum Gefäßsystem der Wirtspflanze herzustellen und ihr organische und anorganische Nährstoffe sowie Wasser zu entziehen (Jeschke *et al.*, 1994a; Jeschke *et al.*, 1994b). *Cuscuta* ist ein Sprossparasit und lebt

ausschließlich auf oberirdischen Teilen der Wirtspflanze. Viele Arten der Gattung *Cuscuta* besitzen keine Chloroplasten und sind nicht zur Photosynthese fähig. Für andere Arten, so auch für *Cuscuta reflexa*, konnte jedoch Photosyntheseaktivität nachgewiesen werden. Sie verfügen jedoch nur über wenige Chloroplasten mit einem geringen Gehalt an Thylakoiden. $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahmestudien haben gezeigt, dass durch die Ribulose-1,6-bisphosphatcarboxylase (RUBISCO) geringe Mengen CO_2 assimiliert werden (Hibberd *et al.*, 1998). Die Fixierung beschränkt sich auf wenige Zellen, welche sich nahe dem Zentralzylinder befinden (Macleod, 1961). Trotz dieser Leistungen ist *Cuscuta* vollständig von dem befallenen Wirt abhängig. Falls nach der Keimung des Parasiten kein kompatibler Wirt zur Aufnahme von lebensnotwendigen Stoffen zur Verfügung steht, ist der Parasit nicht überlebensfähig.

Cuscuta reflexa besitzt ein großes Wirtsspektrum. Hierunter fallen auch viele Nutzpflanzen, wie zum Beispiel Alfalfa, Zwiebel, Sojabohne und Kartoffel. Der Parasit ist auf allen Kontinenten der Welt verbreitet. Besonders in Asien und Südamerika kommt es so regelmäßig zu großen Ertragseinbußen. Der Befall eines Feldes kann unter Umständen zum Verlust der gesamten Ernte führen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine kostengünstige und einfache Methode zu finden, um den Befall mit *Cuscuta reflexa* abzuwenden.

1.2. Interaktion mit kompatiblen Wirten

Die Aufnahme von Nährstoffen und Wasser setzt einen direkten Kontakt mit den Xylem- und Phloemgefäßen des Wirts voraus. Wird dies nicht durch die Pflanze verhindert, wie beispielsweise durch Lignifizierung des Gewebes wie im Falle der Tomate (Albert *et al.*, 2006), spricht man von einem kompatiblen Wirt. Dies bezeichnet man als hypersensitive Reaktion. Die Haustorien entwickeln sich ausschließlich auf der sprosszugewandten Seite (Abb. 1-2).

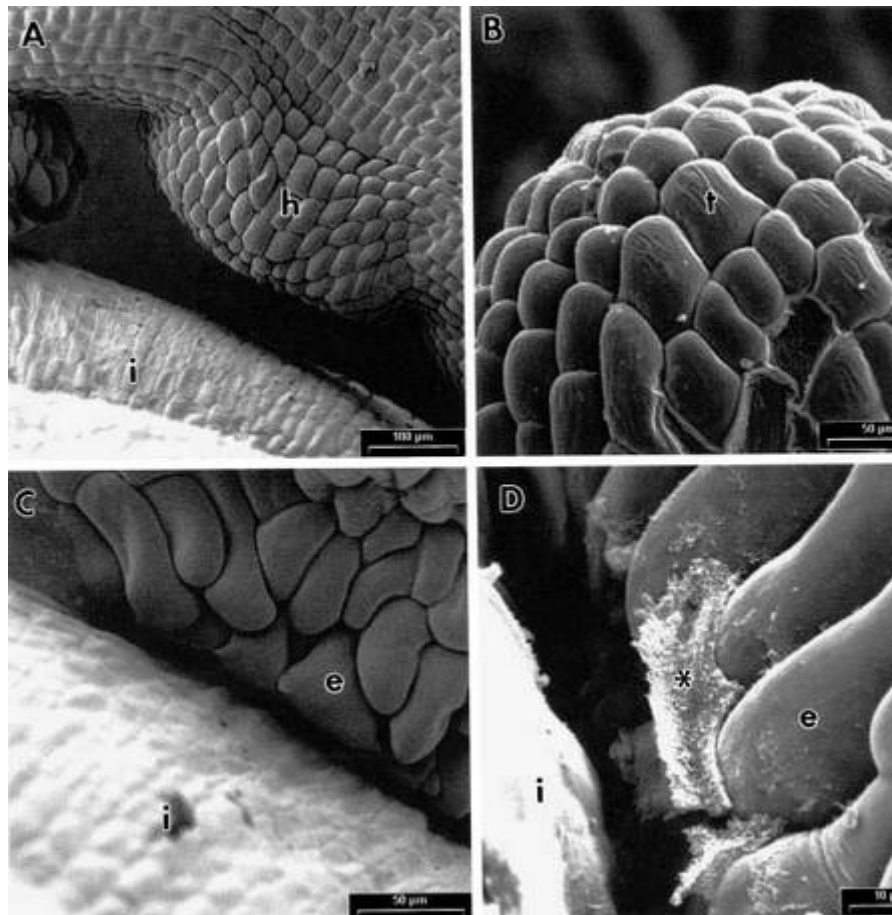


Abb. 1-2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von sich entwickelnden *Cuscuta*-Haustorien und der Anheftung an *Impatiens royalei* (Springkraut). **A** Ein entstehendes Haustorium (h) nähert sich *Impatiens* (i). **B** Ein Haustorium vor dem Kontakt mit elongierten Epidermiszellen (t). **C** Die Epidermiszellen (e) nehmen die morphologische Form des Sprosses an. **D** Ein Haustorium, das von der Wirtspflanze abgelöst wurde: "Polysaccharidreiches Material" (*), epidermale Zellen (e), *Impatiens*-Spross (i). Abbildung aus Vaughn (2002).

Die Bildung scheint auf mechanischen Reizen zu beruhen, da Haustorien sich auch entwickeln, wenn *Cuscuta* um einen Holzstab gewunden wird. Prähaustorien wachsen ausschließlich an den Kontaktstellen von *Cuscuta* mit dem Wirt und entwickeln ein sekundäres Meristem von parasitären epidermalen und parenchymalen Zellen (Heidejorgensen, 1991). Die eigentliche Haustorienbildung startet mit der Differenzierung von parasitischen Epidermis- und Rindenzellen zu sog. Prähaustorien. Wenn *Cuscuta* einen kompatiblen Wirt erreicht, elongieren die epidermalen Zellen und differenzieren sich zu sezernierenden Zellen. Diese sind dehnbar und passen sich der Form der Zellen des Wirtssprosses an. Sie sekretieren ein polysaccharidreiches Material, das der Mittellamelle höherer Pflanzen entspricht und die Adhäsion des Parasiten an den Wirt unterstützt (Vaughn, 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass Multienzym-Komplexe mit pektinase- und zellulaseartigen Eigenschaften, sog. „loosening particles“, ein Eindringen des Haustoriums in den Wirt erleichtern (Vaughn, 2003a) (Abb. 1-2). Wenn das Haustorium in den Wirt eingedrungen ist, differenzieren die vorderen Zellen zu sogenannten Suchhyphen, um in die

umgebenen Leitbündel einzudringen und Nährstoffe und Ionen zu entziehen. Die Zellen des Parasiten bilden chimäre Zellwände mit denen des Wirts und sind über Plasmodesmata miteinander verbunden (Vaughn, 2003b). Diese Zellen haben die Funktion von Siebelementen und Transferzellen (Dorr, 1997). Durch die Anwendung von phloemmobilen GFP-Fusionsproteinen und phloemmobilen fluoreszierenden Stoffen konnte eine cytoplasmatische Verbindung zwischen den Wirtszellen und den Zellen von *Cuscuta* nachgewiesen werden (Birschwilks *et al.*, 2006). Suchhyphen, die auf ein Xylemparenchym treffen, differenzieren synchron mit diesen Zellen. Beide Zellen bilden ein kontinuierliches Xylemelement von der Wirtspflanze zum Parasiten (Schulz, 1987). Damit sind die Entwicklung und die Ausbildung des Xylems abgeschlossen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *Cuscuta* als "Brücke" zwischen Pflanzenspezies dienen kann und Viren zwischen Individuen ausgetauscht werden (Ross and Aldrich, 1988; Schmelzer, 1955; Bennett, 1940). Roney und Mitarbeiter (Roney *et al.*, 2007) beobachteten, dass phloemmobil mRNA von der Tomate in den Parasiten *Cuscuta pentagonia* übertragen werden. *Cuscuta reflexa* entzieht auf diese Weise dem kompatiblen Wirt *Lupinus albus* 81 % der Photosyntheseprodukte und den vom Wirt fixierten und teilweise auch bereits gespeicherten Stickstoff (Jeschke *et al.*, 1994b). Während der Fruchtbildung des Wirts konkurriert *Cuscuta* mit der sich entwickelnden Frucht (Wolswinkel, 1974).

Um die molekularen Vorgänge während der Interaktion von *Cuscuta reflexa* mit einem kompatiblen Wirt zu verstehen, hatte Markus Albert im Rahmen seiner Dissertation eine cDNA-Bank von *Cuscuta reflexa* erstellt. Die cDNA-Bank wurde auf mRNAs durchsucht, die während der Bildung von Haustorien transkribiert werden. Ein Gen wurde nachgewiesen, das für eine Cysteinprotease codiert. Das Transkript fand sich nur in den RNA-Proben, welche aus Haustorien gewonnen wurde. Cysteinproteasen nehmen im Zusammenhang mit einigen parasitierenden Organismen bei der Infektion ihrer Wirte eine übergeordnete Rolle ein. Deshalb sollte im Folgenden die Relevanz der entdeckten Protease für den Infektionsverlauf analysiert werden.

1.3. Cysteinproteasen

Peptidhydrolasen (Proteasen) katalysieren die Hydrolyse von Peptiden. Die erste isolierte und charakterisierte Protease stammt aus der Frucht von *Carica papaya* und wird Papain genannt. Papainähnliche Cysteinproteasen besitzen eine ähnliche Tertiärstruktur und entsprechend ein sehr ähnlich aufgebautes katalytisches Zentrum. Dieses besteht aus den drei konservierten

Aminosäuren Cys 25, His 159 und Asn 175 (gemäß der Papain-Nummerierung). Viele der identifizierten, parasitären Proteasen gehören den papainähnlichen Enzymen und damit dem CA-Klan an (Abb. 1-3). Bei diesen Enzymen liegt das Cystein im aktiven Zentrum in direkter Nachbarschaft zum basischen Histidin. Der CA-Klan wird weiter in die Familien C1 (Cathepsin B- und Cathepsin L-ähnliche) und C2 (calpainähnlich) unterteilt. Karrer und Mitarbeiter (Karrer *et al.*, 1993) schlugen die weitere Unterteilungen der C1 Familie in zwei Unterfamilien vor, die sich in den Propeptiden der Enzyme unterscheiden. Das Propeptid der Cathepsin L-ähnlichen Enzyme besteht aus einer α -Helix und einem kurzen Peptidstrang, gefolgt von einer zweiten α -Helix. In der zweiten Helix befindet sich das ERFNIN-Motiv (E, X₃, R, X₂, (I/V), F, X₂ N, X₃, I, X₃, N (ERFNIN; benannt nach dem Einbuchstabencode für Aminosäuren; X sind beliebige Aminosäuren). Die Sequenz ist wesentlich für die stabile Interaktion des Aktivierungspeptids mit der reifen Domäne der Protease (Abb. 1-4). Zum einen variieren die Propeptide in der Größe und zum anderen sind strukturelle Unterschiede vorhanden. Cathepsin L-ähnliche Enzyme weisen ein längeres Propeptid und das ERFNIN-Motiv auf. Enzymen der Cathepsin B-Unterfamilie fehlt dieses Motiv. Die Enzyme besitzen im Gegensatz dazu den sogenannten „verschließenden Loop“, durch den das aktive Zentrum partiell blockiert wird (Abb. 1-4). Eukaryotische C1-Peptidasen werden als Zymogene translatiert, das heißt, nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz, die der Sekretion des Proteins dient, besteht das Protein aus dem reifen Enzym und einer Prosequenz (Coulombe *et al.*, 1996a; Coulombe *et al.*, 1996c; Cygler *et al.*, 1996; Turk *et al.*, 1995). Das Propeptid wirkt als Inhibitor der Protease, bis es in der Regel autokatalytisch entfernt wird. Beispielsweise wird Procaricain *in vitro* bei einem pH-Wert von 4,0 intramolekular aktiviert (Fox *et al.*, 1992; Revell *et al.*, 1993). Das ist darauf zurückzuführen, dass durch eine hohe Protonenkonzentration in der Lösung die ionischen Wechselwirkungen des Propeptids mit der Umgebung des aktiven Zentrums gelockert wird. Außerdem wird die Konformation der α -Helices des Propeptids geändert (Maubach *et al.*, 1997). Wenn sich die Protease ohne Hilfe eines anderen Enzyms durch Autolyse des Propeptids aktiviert, wird von einem intramolekularen Prozess gesprochen (Groves *et al.*, 1996).

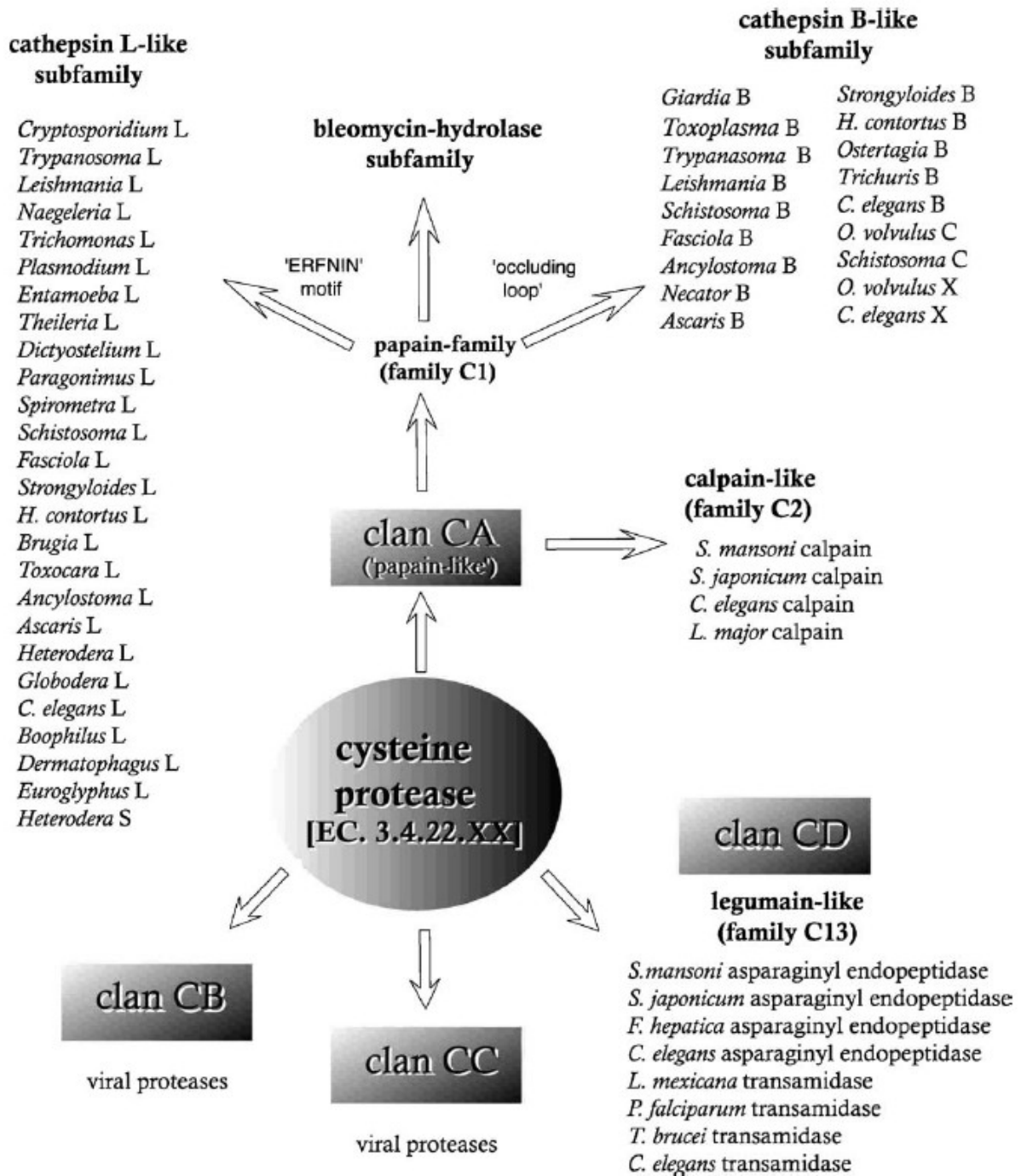


Abb. 1-3: Klassifizierung der Cysteinproteasen-Superfamilie. Die Unterteilung erfolgt nach Sequenzhomologien. Aus Sajid (2001).

Cysteinpeptidasen des CA-Klans sind in allen biologischen Systemen wie Viren, Prokaryoten und im Tier- und Pflanzenreich zu finden. In keimenden Samen werden Cysteinproteasen genutzt, um Speicherproteine bei Abbruch der Dormanz zu mobilisieren (Schlereth *et al.*, 2001).

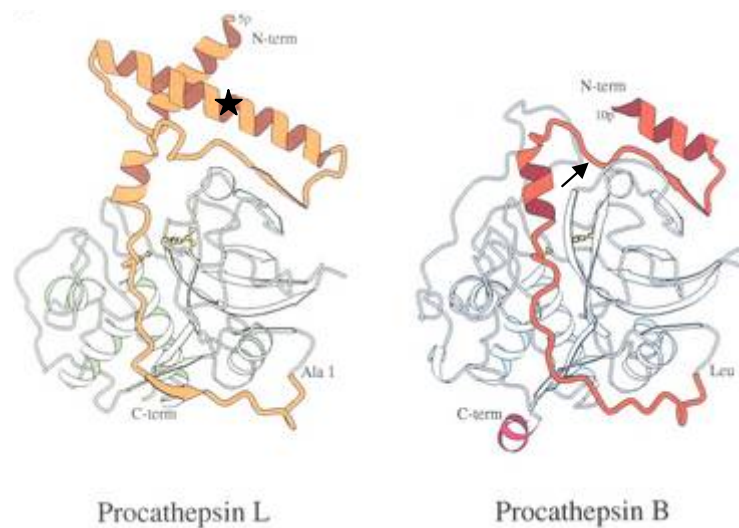


Abb. 1-4: Vergleich der Prosegmente von Cathepsin L und B. Die Lokalisation des ERFNIN-Motivs ist mit einem Stern gekennzeichnet. Der „verschließende Loop“ ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Abbildung aus Coulombe (1996).

Cathepsin B-ähnlichen Enzymen wird eine wichtige Rolle bei bestimmten Krebsarten wie Brust- oder Prostatakrebs zugeschrieben. In den malignen Zellen konnte eine signifikant verminderte Konzentration von Cysteinproteaseinhibitoren beobachtet werden und eine Überexpression von Cathepsin B (Nomura and Katanuma, 2005). Das Ungleichgewicht von Proteasen und ihren Inhibitoren fördert das invasive Wachstum der Tumorzellen und somit die Metastasierung (Nomura and Katanuma, 2005). Daher kann man diese Enzyme als Marker zur Früherkennung bösartiger Tumore verwenden.

Cysteinproteasen spielen während des normalen Lebenszyklus eine wichtige Rolle. Die Kontrolle der Enzymaktivität muss gewährleistet sein, damit es nicht zu unkontrolliertem Proteinabbau kommt.

1.4. Cysteinproteasen parasitärer Organismen

Die Mehrheit der parasitären Cysteinproteasen gehört zur C1-Familie. Ihre Mitglieder werden entweder in intrazelluläre Kompartimente transportiert (Cathepsin B, C, H, K, L und S), oder sie werden sekretiert und besitzen zusätzlich das sog. Prepeptid. Die meisten parasitären Cysteinproteasen sind bei einem neutralen oder leicht alkalischen pH-Wert aktiv und haben einen extrazellulären Wirkort. Dort helfen sie dem Parasiten in das Wirtsgewebe einzudringen, Abwehrenzyme zu hydrolysieren und Nährstoffe zu mobilisieren. Dieser Prozess hat viele Gemeinsamkeiten mit der Tumorzellinvasion.

Mehrere parasitisch lebende prokaryotische sowie eukaryotische Organismen sekretieren Cysteinproteasen während der Interaktion. Unter diesen befinden sich *Trypanosoma cruzi*

(Reis *et al.*, 2006), *Entamoeba* (Makioka *et al.*, 2005; Moncada *et al.*, 2006), *Leishmania tropica* (Mahmoudzadeh-Niknam and McKerrow, 2004) sowie der parasitäre Kartoffelkäfer. Seine Larven wachsen langsamer auf Kartoffelpflanzen, die einen Proteaseinhibitor aus *Podisus maculiventis* exprimieren (Michaud *et al.*, 1993; Visal *et al.*, 1998; Varez-Alfageme *et al.*, 2007). Die Antisense-Inhibition der Cysteinprotease 5 von *Entamoeba histolytica* verhindert die Degradierung der Magen-Darm-Schleimhaut und somit die Zerstörung des Darmepithels.

Alle Befunde kennzeichnen die Relevanz der Enzyme von vielen parasitisch lebenden Organismen für die Interaktion mit kompatiblen Wirten.

Daher sollte die Bedeutung der von M. Albert (2005) identifizierten Protease aus *Cuscuta* für die Infektion eines kompatiblen Wirts untersucht werden. Als Inhibitor der Cysteinprotease wurde ihr eigenes Propeptid verwendet.

1.5. Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die entdeckte Cysteinprotease von *Cuscuta reflexa* isoliert und biochemisch charakterisiert werden.

Des Weiteren sollte die inhibitorische Wirkung (K_i -Wert) des Propeptids in Bezug auf die verwandte Protease und auf weitere pflanzliche Cysteinproteasen bestimmt werden. Alle kinetischen Analysen sollten mit Casein als Substrat durchgeführt werden, an das ein Fluorogen kovalent gebunden ist.

Abschließend sollte im Laborversuch untersucht werden, ob das Propeptid als Pflanzenschutzmittel zur Bekämpfung von *Cuscuta*-Befall eingesetzt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Arbeiten mit Bakterien

2.1.1. *Escherichia coli*

2.1.1.1. Anzucht von *Escherichia coli*

Die Bakterienzellen wurden entweder aus einer Dauerkultur oder von einer Agarplatte in 3 ml flüssiges LB-Medium überimpft. Die Selektion zur Gewinnung von bestimmten Klonen beruhte auf Antibiotika Resistenzen, welche auf den rekombinanten Plasmiden lokalisiert waren. Normalerweise waren dies Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml oder Kanamycin in einer Konzentration von 100 µg/ml.

Die Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und bei 225 rpm inkubiert.

LB-Medium nach Luria-Bertani:	10,0 g Trypton
	5,0 g NaCl
	5,0 g Hefeextrakt
	ad 1l H ₂ O _{bidest.} , pH 7,5 mit HCl

2.1.2. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Zellen wurden durch alkalische Hydrolyse aufgeschlossen. Aus dem Lysat ließen sich die bakterielle genomische DNA sowie Proteine selektiv durch Erniedrigung des pH-Wertes ausfällen, so dass im Überstand nur die Plasmid-DNA verblieb. Es wurden ca. 1 ml Zellen einer Bakterienkultur mit einem Volumen von 3 ml, die über Nacht bei 37 °C gewachsen waren, entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 sec bei einer Geschwindigkeit von 13.000 rpm. Der Überstand wurde dekantiert, und die Zellen wurden in 300 µl Puffer P1 aufgenommen und resuspendiert. Danach wurden 300 µl Puffer P2 appliziert, und die Suspension durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Die Probe wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer P3 erfolgte erneutes Mischen durch Invertieren. Die Probe wurde für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm. Nach diesem Schritt wurde 600 µl des

Überstands abgenommen. Hier war es wichtig nicht das Pellet, das aus genomischer DNA und ausgefällten Proteinen bestand, zu stören. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in welchem sich 700 µl Isopropanol befand. Es wurde durch Invertieren gemischt und anschließend für 15 min bei einer Geschwindigkeit von 13.000 rpm zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml 70 %igem Ethanol. Daraufhin wurden die Plasmide bei 37 °C getrocknet und in 30 µl H₂O resuspendiert. Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

P1 (Resuspensionspuffer):	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNaseA
P2 (Lysepuffer):	200 mM NaOH 1 % SDS
P3 (Neutralisationspuffer):	3 M Kaliumacetat, pH 5,5

2.1.2.1. Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden die Kulturen XL1blue (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI q ZΔM15 Tn10 (Tetr)]) und DH5α (Genotyp: F-deoR recAI endAI hsdR1(rk- mk+) supE44 1-thi gyrA96 relAI) verwendet. Die kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert und zur Vorbereitung der Aufnahme der DNA auf Eis aufgetaut. Danach wurde die DNA appliziert. Die Zellen verblieben für weitere 30 min auf Eis. Anschließend wurden sie für 30 sec in ein Wasserbad gehalten, das auf 42 °C temperiert war. Dann wurden sie weitere 2 min auf Eis gelagert. Es folgte die Applikation von 300 µl S.O.C. Medium. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach dieser Zeit wurden sie bei einer Geschwindigkeit von 3.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen Rest verworfen. In diesem Restüberstand wurden die Zellen resuspendiert und auf Agarplatten, welche das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Kolonien, die sich am nächsten Tag gebildet hatten, wurden in LB-Medium überführt.

SOC-Medium:	2 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose
	pH 7,0

2.1.2.2. Herstellung von Dauerkulturen

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurde Glycerin verwendet (Endkonzentration: 20 %). Die Kulturen wurden bei -80 °C gelagert.

2.1.3. Überexpression von Proteinen in *E. coli*

Eine Übernachtskultur mit Zellen, die mit dem Vektor pET/Dest42 transformiert waren, wurde zur Inokulation des LB-Mediums benutzt. Der Vektor enthielt entweder das Propeptid oder das reife Enzym. Das Verhältnis von Übernachtskultur zu Medium betrug 1:100. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert, bis das Medium eine optische Dichte von 0,6-0,8 erreicht hatte. Danach wurde IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) mit einer Endkonzentration von 1 mM appliziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 4 h inkubiert. Die Expression wurde mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft.

2.1.4. *Agrobacterium tumefaciens*

2.1.4.1. Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Für die stabile Transformation von Tabakpflanzen wurde der Stamm GV3101 (Genotyp: PM90RK, GM^R, Rif^R) verwendet. Die Bakterien wurden bei 28 °C kultiviert.

2.1.4.2. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Zellen wurden tiefgefroren bei - 80 °C entnommen und auf Eis aufgetaut. Es wurden 50-100 ng zu transformierende DNA zu den Zellen appliziert. Die Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Wärmeschock fand bei 37 °C für 5 min statt. Danach wurde 1 ml 2YT Medium hinzupipettiert. Die Zellen wurden bei 28 °C für 2-4 h inkubiert. Anschließend wurden sie für 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert und in ca. 100 µl 2YT Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf LB Platten, die ein geeignetes Antibiotika enthielten, ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

2YT-Medium	16 g Trypton
	10 g Hefeextrakt
	5 g NaCl

2.2. Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren

2.2.1. Enzymatischer Abbau von DNA

Der Restriktionsabbau der DNA wurde mittels spezifischer Restriktionsenzyme vollzogen. Die Bedingungen für den enzymatischen Abbau wurden nach Empfehlung des Herstellers (Fermentas) gewählt. Pro µg eingesetzter DNA-Menge wurde 1 U des entsprechenden Enzyms eingesetzt und bei empfohlener Temperatur inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug normalerweise 1,5 h.

2.2.2. Auftrennung von DNA-Molekülen im Agarosegel

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch die Retention in einem Agarosegel. Standardmässig wurde eine 1%ige Agarose/TAE-Lösung benutzt. Die Agarose wurde zuvor durch Erhitzen in 1fachem TAE-Puffer gelöst. Als Puffersystem fungierte 1facher TAE-Puffer. Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei einer Spannung von 5-10 Volt/cm vollzogen. Zum Vergleich der Molekülgrößen wurde parallel ein Standard mit Fragmenten definierter Größe (Hyperladder 1, Bioline) aufgetrennt. Durch zugesetztes Ethidiumbromid im

Agarosegel (0,05 µg/ml) konnte die DNA mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden (LTF Labortechnik).

50 x TAE-Puffer:	242 Tris
	57,1 ml Essigsäure (99 %)
	100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

2.2.3. Herstellung einer genspezifischen digoxigeninmarkierten Sonde

Durch die Herstellung einer digoxigeninmarkierten Sonde konnten RNA-Fragmente auf einer Membran nachgewiesen werden. Das Prinzip beruht auf dem Einbau von digoxigeninmarkiertem Uracil-Triphosphat (DIG-UTP) in das PCR-Produkt. Die Sonde wurde exakt nach dem Protokoll der Firma Roche synthetisiert. Es wurden zwei PCR-Ansätze pipettiert, wobei der erste Ansatz digoxigeninmarkiertem Uracil enthielt und der zweite nicht. Beim Einbau der markierten Nukleotide sollte das Fragment bei gleicher Stromstärke und gleicher elektrophoretischer Auftrennungstrecke etwas langsamer laufen. Durch die kovalent an die Sonde gebundenen Digoxigeninmoleküle ist die Sonde sperriger und zeigt im Gel ein verändertes Laufverhalten gegenüber der unmarkierten Sonde. Der Ansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert.

Reaktionsansatz zur Herstellung DIG

markierter cDNA Sonden (50 µl):	5 µl 10 x PCR-Puffer
	1 µl dNTPs (10 mM)
	5 µl 0,1 mM DIG-11-UTP (1:10)
	1,0 µl sense Primer (RNAi foru) 10 pmol/µl
	1,0 µl antisense Primer (RNAi revu) 10 pmol/µl
	1,0 µl Template (Plasmidlösung, 1:10)
	1,0 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)
	35 µl H ₂ O _{bidest.}

Die cDNA wurde nach folgendem Protokoll vervielfältigt:

Startdenaturierung:	95 °C	5 min	
Denaturierung:	95 °C	30 sec	} 25 Zyklen
Primer Annealing:	T _m - 4 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min pro 1k bp	
Endsynthese:	72 °C	5 min	

2.2.4. Verwendung des GATEWAY™-Systems zur Klonierung von DNA-Fragmenten

Dieses System basiert auf Rekombination der DNA in den Vektor anstelle eines Restriktionsabbaus und Ligation. Die Schlüssel-DNA-Rekombinationssequenzen (*att*-sites), sowie die Proteine, die die Rekombination antreiben, sind Bestandteil des GATEWAY™-Klonierungssystems (Landy, 1989).

Die GATEWAY™-Reaktion besteht aus zwei Reaktionen:

- Herstellung des Zugangsklons durch die BP-Reaktion
In diesem Schritt wird ein Vektor hergestellt der als Ausgangspunkt zur Klonierung des Wunschs in verschiedene Expressionsvektoren dient (siehe Abb. 2-1)

	negativ Kontrolle	Probe
<i>att</i> B PCR-Produkt 40-100 fmol	1 - 4 µl	1 - 4 µl
Zugangsvektor, 150 ng/µl	1 µl	1 µl
BP Reaktionspuffer (5x)	2 µl	2 µl
BP Clonase-Mix	---	2 µl
TE, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA	ad 10 µl	ad 10 µl

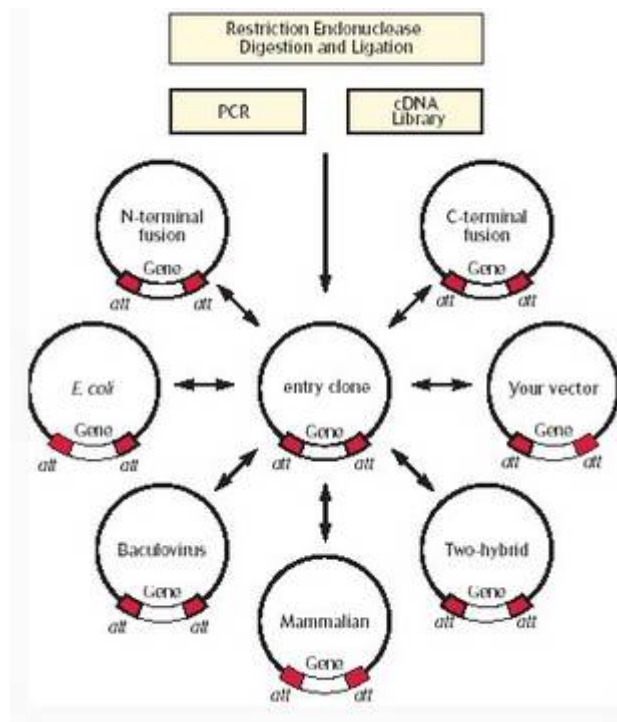


Abb. 2-1: Schema über die Verwendungsmöglichkeiten des Zugangsklons (Entry clone). Aus <https://catalog.invitrogen.com/index.cfm>.

- Herstellung des "Expression Clones" durch die LR-Reaktion

Nach dem der Entry vector hergestellt wurde, kann mit Hilfe des LR-Clonase-Enzyme mix der Expressionsvektor hergestellt werden.

	negativ	Probe
	Kontrolle	
Zugangsklon, 50 - 150 ng/reaction	1 - 4 μ l	1 - 4 μ l
Zielvektor, 150 ng/Reaktion	1 μ l	1 μ l
LR Reaktionspuffer (5x)	2 μ l	2 μ l
LR Clonase-Mix	---	2 μ l
TE, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA	ad 10 μ l	ad 10 μ l

Die Reaktionsmischung wurde bis auf den entsprechenden Klonase-Mix in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis vorgelegt. Danach wurde die bei -80 °C eingefrorene Enzymmischung für 2 min auf Eis aufgetaut. 2 μ l wurden sodann zum Reaktionsansatz pipettiert, gemischt und kurz zentrifugiert. Die Rekombination der DNA fand über Nacht bei 25 °C statt.

2.3. Verfahren mit Ribonukleinsäuren

2.3.1. Isolation von mRNA/Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe

Die RNA-Isolation erfolgte mittels des RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Es wurde genau nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die RNA wurde im letzten Schritt in 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

2.3.2. Auftrennen von RNA mittels Gelelektrophorese

Zum Überprüfen der photometrischen Daten der RNA-Proben wurde die RNA in einem 1%igen, denaturierendem MEN-Agarosegel (Formaldehydhaltig) aufgetrennt. Dazu wurden je Probe 1 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser und RNA-Ladungspuffer auf ein gleiches Volumen gebracht und 10 min bei 65°C denaturiert. Nachdem die Proben 2 min auf Eis gekühlt waren, wurden sie auf das Gel aufgetragen und bei 70 V in 1 x MEN-Puffer aufgetrennt. Im RNA-Ladungspuffer befand sich Ethidiumbromid, das in die RNA interkalierte und nach Anregung durch UV-Licht hell gefärbte Banden sichtbar machte. Die Analyse der Daten erfolgte mittels eines ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

RNA-Ladungspuffer	0,72 ml Formamid
	0,16 ml 10 x MEN
	0,26 ml 37 % Formamid
	0,10 ml 80 % Glycerin
	0,18 ml bidest. Wasser
	0,08 ml 2 % Bromphenolblau
	3 µl 1 % Ethidiumbromid-Lösung
10 x MEN-Puffer:	0,2 M Morpholinpropansulfonsäure
	0,01 M EDTA
	0,05 M Natriumacetat
MEN-Agarosegel:	0,5 g Agarose (ICN)
	42,5 ml bidest. Wasser, wurde zusammen in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war; nach Abkühlung auf ca. 50 – 60 °C wurde zugegeben:
	5 ml 10 x MEN
	2,7 ml 37 % Formaldehyd

2.3.3. Transfer von RNA auf eine Nylonmembran

Das Transferieren von RNA aus einem Gel auf eine Nylonmembran wird als "Nothernblot" bezeichnet. Über Kapillarkräfte wird die RNA auf die Nylonmembran (Nytran, Schleicher und Schüll oder Hybond-N, Amersham Life Science) übertragen. Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung der RNA, wird das Gel luftblasenfrei auf die zuvor in 10fachem SSC getränkte Membran gelegt. Unter die Membran wurden saugfähige Tücher gelegt mit einer Stärke von ca. 20 cm. Der Kontakt von Puffer zu Gel wurde durch Whatmanpapier hergestellt (3MM). Danach wurden die Ränder mit Plastikfolie abgedichtet. Der Transfer erfolgte über Nacht. Im Anschluss wurde die Membran durch UV-Licht fixiert (Bio-Link® BLX, LTF Labortechnik). Die Energie betrug 120 mJoules.

10 x SSC-Puffer:	1,5 M NaCl
	0,15 M Na-Citrat, pH 7,5

2.3.4. Northern-Hybridisierung

Nach der Immobilisierung der RNAs auf der Membran mittels UV-Bestrahlung (Bio-Link® BLX, LTF Labortechnik) wurde die Membran in ein 40 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 10 ml DIG Easy Hyb (Roche, Schweiz, Basel) Lösung appliziert. Die Prähybridisierung fand im Inkubator bei 42 °C für 2 h statt. Die DIG markierte Sonde wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in welches zuvor 100 µl DIG Easy Hyb vorgelegt wurde. Das Gemisch wurde bei 95 °C für 10 min denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der Sonde. Die Inkubation der Membran mit der Sonde erfolgte über Nacht bei 42 °C. Darauf folgend wurde die Membran mit Waschlösung A bei Raumtemperatur 2mal für 15 min gewaschen. Es folgte ein Waschschrift unter stringenteren Bedingungen mit Waschlösung B bei 62 °C und anschließend eine Äquilibrierung der Membran in DIG-Waschpuffer für 5 min. Die Membran wurde danach in 20 ml DIG-Blockierungspuffer bei Raumtemperatur blockiert. Der DIG Antikörper (Roche, Schweiz, Basel) wurde für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, von der Oberfläche 1 µl abgenommen und in 10 ml DIG-Blockierungspuffer pipettiert. Die Membran wurde für 1 h in der Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde sie vorsichtig aus dem Reaktionsgefäß entnommen und 2 mal 15 min in DIG-Waschpuffer gewaschen. Zur indirekten Detektion der Transkripte auf der Membran wurde CDP-Star verwendet. Nach Spaltung des Substrates emittierte das Produkt Fluoreszenz. Die Visualisierung und Auswertung erfolgte mittels digitaler Geldokumentation (ChemiDoc™ XRS-System, Bio-Rad).

Waschlösung A	2 x SSC 0,1 % SDS
Waschlösung B	0,5 x SSC 0,1 % SDS
DIG-Waschpuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,3 % Tween 20
Blockierungspuffer	1:10 DIG-Waschpuffer
DIG-Detektionspuffer	0,1 M Tris/HCl pH 9,5 0,1 M NaCl

2.3.5. Synthese von Erststrang-cDNA

Zur Herstellung der Erststrang-cDNA aus Gesamt-RNA mittels RT-PCR wurden „Ready-To-Go First-Strand beads“ (Amersham, Pharmacia Biotech) verwendet. Das Hersteller-Protokoll wurde exakt befolgt. Für die Synthese wurden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Als Primer dienten in jedem Fall der 3`CDS- und der SMARTIIA-Oligo-Primer (Clontech). Der 3`CDS-Primer besteht aus einer Oligo-dT-Sequenz von ca. 30 Basen am 3`-Ende und einer Nukleotidsequenz von 25 Basen am 5`-Ende zur Amplifikation der cDNA.

2.4. Verfahren mit Polypeptiden

2.4.1. Auftrennung von Proteingemischen im Polyacrylamid-Gel

Zur Auftrennung der Proteine wird standardmäßig die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Mit dieser Methode lassen sich Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennen. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das sich an die Proteine bindet. Je größer ein Protein ist, desto mehr SDS kann sich binden. Das Polyacrylamid dient im polymerisierten Zustand als Sieb. Je kleiner die Moleküle sind, desto schneller wandern diese durch das elektrische Feld.

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Stammlösung	10 ml	1,33 ml
4 x Trenngel-Puffer	7,5 ml	---
4 x Sammelgel-Puffer	---	2,5 ml
10 % SDS	0,3 ml	0,1 ml
H ₂ O	12,16 ml	6 ml
1 % Bromphenolblau	---	5 µl
TEMED	10 µl	5 µl
40 % APS	0,38 ml	12,5 µl

Acrylamid-Stammlösung	Rotiphorese 40 (29:1): 40 % Acrylamid-Bisacrylamid Acrylamid : Bisacrylamid = 29:1
4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
10 % SDS	10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in H ₂ O
TEMED	N, N, N', N' Tetramethyläthylendiamin
Bromphenolblaulösung	1 % Bromphenolblau in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 % (w/v) Ammoniumperoxydisulfat in H ₂ O
Elektrodenpuffer	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 0,1 % SDS
Färbelösung	1,5 g Coomassie Blue R-250 500 ml Methanol 100 ml Essigsäure H ₂ O ad 1l
Entfärber	30 % Methanol 10 % Essigsäure H ₂ O ad 1l

2.4.2. Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Die Proteinbestimmung wurde mittels Roti[®]-Nanoquant durchgeführt. Es wurde das vom Hersteller beschriebene Protokoll eingehalten (Carl Roth GmbH + CO. KG).

2.4.3. Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran

Als Westernblot oder auch Immunoblot bezeichnet man das Übertragen von Proteinen auf eine Trägermatrix. Die zuvor durch ein SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die immobilisierten Proteine wurden durch den spezifischen "primären" Antikörper detektiert. Der erste Antikörper wurde durch den "sekundären" Antikörper erkannt. An diesen war eine alkalische Phosphatase gekoppelt, die das Substrat CDP-Star spaltete. Das Spaltprodukt chemielumineszierte und konnte detektiert werden.

Der Zusammenbau des Blots erfolgte luftblasenfrei und von der Kathodenseite beginnend. Zunächst wurden zwei Whatman Filterpapiere mit etwas Puffer getränkt und übereinander auf ein Schwämmchen gelegt. Danach wurden das Gel und die Membran auf die Filterpapiere gelegt und mit zwei weiteren Filterpapieren bedeckt. Der Transfer erfolgte bei 80 V für 2 h.

Transferpuffer:	10 mM CAPS/NaOH pH 11
	10 % Methanol

2.4.4. Western-Hybridisierung

Nach dem Transfer erfolgte eine 45minütige Inkubation in Blocklösung. Danach wurde die Membran 1 h mit dem ersten Antikörper inkubiert. Sie wurde 3 x 10 min in der Waschlösung gebadet, um dann mit dem zweiten Antikörper inkubiert zu werden. Nachfolgend wurde sie mit Assay B 2 x 5 min inkubiert und anschließend flach auf eine Unterlage gelegt und mit etwas Nitroblock befeuchtet. Dies diente zur Verstärkung der Signale. Danach wurde die Membran erneut für 2 x 5 min in Assay B gebadet, mit Substratlösung befeuchtet und luftblasenfrei in Folie eingeschlagen. Die Visualisierung und Auswertung erfolgte mittels digitaler Geldokumentation (ChemiDoc™ XRS-System, Bio-Rad).

10 x PBS:	82,3 g Na ₂ PO ₄ 23,5 g NaH ₂ PO ₄ 40 g NaCl ad H ₂ O 1l
Waschlösung:	1 x PBS 0,5 % Tween 20
Blocklösung:	Waschlösung 5 % Magermilchpulver
Primärer Antikörper	1: 500 in Blocklösung
Sekundärer Antikörper	1 : 30000 in Blocklösung
10 x Assay B	200 mM Tris/HCl, pH 9,8 20 mM MgCl ₂
Nitroblock-Lösung	2 ml Nitroblock (Tropix), 1:20 in Assay B
Substratlösung	1 : 50 in Assay B

2.4.5. Elektroelution

Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die ersten 2 Spuren von dem Gel abgeschnitten und einer Coomassie-Färbung unterzogen und wieder entfärbt. Danach wurden die Spuren neben das nicht gefärbte Gel gelegt. Das gewünschte Protein wurde sauber mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die in *E. Coli* überexprimierte Cysteinprotease wurde mittels Gelelution isoliert. Bei dieser Methode werden Proteine, welche zuvor elektrophoretisch in einem Gel aufgetrennt wurden, mittels eines elektrischen Feldes eluiert. Der Aufbau der Elutrap (Schleicher & Schuell) gestaltet sich wie in Abb. 2-2 gezeigt. Die Elutionskammer besteht aus einer BT1-Membran und einer BT2-Membran. Die BT1-Membran hat eine Ausschlussgröße von 3 kDa, die BT2 Membran ist permeabel für nahezu alle Substanzen. Die Elektrophorese wurde in einem 40 mM Tris/Borat-Puffer über Nacht vollzogen. Die Spannung betrug 80 Volt. Nach ca. 12 Stunden wurde umgepolt und eine Spannung von 200 Volt angelegt. Die Dauer betrug 20 Sekunden. Danach konnten die Proteine aus der Elutionskammer entnommen werden. Das Volumen entsprach normalerweise 500 µl. Die Überprüfung der Elution wurde mittels einer SDS-PAGE unternommen.

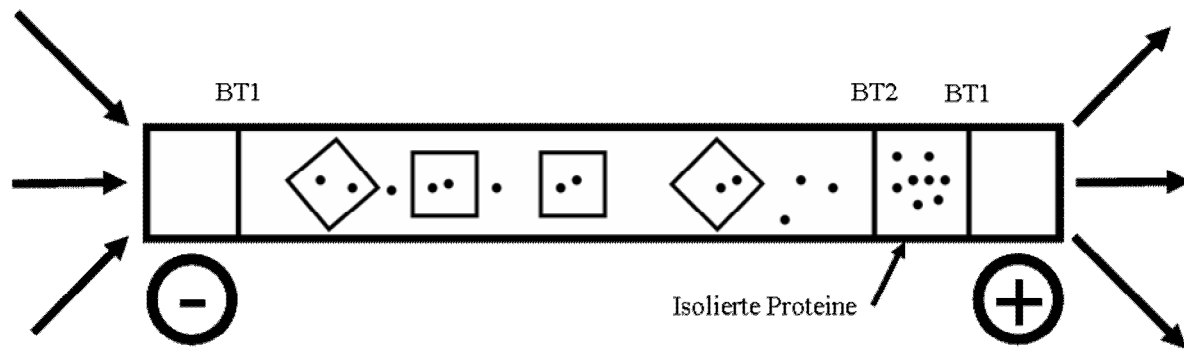


Abb. 2-2: Schema der Elutrap.

2.4.6. Entfernen von SDS aus der Probe nach Henderson (1979)

Da die Proteine mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden und sich nach der Gelelektion noch SDS in der Probe befand, musste dies wegen seiner denaturierenden Wirkung entfernt werden. Bei dieser Methode wird SDS mit Aceton aus der Probe entfernt (Henderson *et al.*, 1979). Die Probe von 500 µl wurde 20:1 mit dem Lösungsmittel verdünnt und für 2 h im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde sie für 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde durch Dekantieren entfernt. Die Probe wurde mit Aceton gewaschen. Danach wurde das Aceton durch Ausdampfen entfernt.

organisches Lösungsmittel

Aceton (90 Teile)

Triethanolamin (5 Teile)

Essigsäure (5 Teile)

2.4.7. Aktivierung der Cysteinprotease (Cuscuin) nach Tobbell *et al.* (2002)

Die Methode nach Tobbell wurde in leicht abgewandelter Form verwendet (Tobbell *et al.*, 2002). Nach vollständiger Entfernung von Natriumdodecylsulfat und Aceton wurde die Probe in 100 µl 40 mM Tris/Borat, pH 8,4, aufgenommen. Danach wurde sie tropfenweise in einem Verhältnis von 200:1 in den Aktivierungspuffer gegeben. Dies entsprach einem Puffervolumen von 20 ml. Die Probe wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag für 2 h einer Elektroelution unterzogen. Dazu wurden 20 ml des Aktivierungspuffers in die Elutionskammer gegeben, und die Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 200 V eluiert. Anschließend wurde die Spannung für 20 sek umgepolt. Zum Schluss wurde

die proteinenthaltende Lösung der Kammer entnommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Aktivierungspuffer	40 mM Tris/Borat, pH 8,4
	50 % Glycerin
	3 mM Glutathion (reduziert)

2.4.8. Isolierung des Propeptids mittels BD TALON™ Metal affinity Resin

Da sich ein Großteil der Propeptid-Moleküle in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) befand, musste die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgen. Dazu wurden die Zellen, die sich in 100 ml LB-Medium befanden, 4 h nach der Inkubation mit 1 mM IPTG abzentrifugiert, in 3 ml Denaturierungspuffer aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Danach wurden sie für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, und der Überstand wurde in ein 13 ml Reaktionsgefäß überführt.

BD TALON Resin wurde sorgfältig resuspendiert und 0,5 ml der Suspension entnommen. Dann wurde das Harz bei 700 rpm für 2 min zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde verworfen. Das Harz wurde vorsichtig in 5 ml Equilibrierungspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals verworfen, und der Waschschrift wurde wiederholt. Anschließend wurden die resuspendierten Proteine zum Harz hinzupipettiert. Die Bindung der Proteine erfolgte über Nacht bei 4 °C. Dann wurde die Probe für 5 min bei 700 rpm zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Harz wurde in 5 ml Equilibrierungspuffer appliziert. Es folgte eine Zentrifugation. Der Überstand wurde erneut verworfen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde 1 ml des Elutionspuffers hinzupipettiert. Die Suspension wurde danach gemischt und kurz bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich das polyhistidinmarkierte Protein befand, wurde vorsichtig abgenommen. Um den Harnstoff aus der Probe zu entfernen, wurde gegen 40 mM Tris/Borat, pH 8,5, dialysiert.

Equilibrierungspuffer/Waschpuffer:	50 mM Natrium-Phosphat, pH 8,5 4 M Urea 300 mM NaCl
Elutionspuffer	45 mM Natrium-Phosphat, pH 8,5 4 M Urea 270 mM NaCl 150 mM Imidazol

2.5. Pflanzenmaterial/Anzucht/Verwendung

2.5.1. Anzucht von *Cuscuta reflexa*

Cuscuta reflexa wurde ausschließlich vegetativ auf *Coleus blumei* kultiviert. Im Gewächshaus war der Tag-/Nachtrhythmus 16/8 h. Die Temperaturen betragen 18 - 22 °C. Die Luftfeuchtigkeit war auf 60 - 70 % eingestellt.

2.5.2. Anzucht von *Nicotiana tabacum* var. Samsun NN (SNN)

Die Pflanzen wurden nach der Keimung pikiert und unter gleichen Anzuchtbedingungen wie *Cuscuta* angezogen. Für die Infektionsversuche wurden 5 - 6 Wochen alte Tabakpflanzen verwendet.

2.5.3. Infektion der Wirtspflanzen

Zur Infektion der Wirtspflanze mit *Cuscuta reflexa* wurden ca. 20 cm lange Sprosse des Parasiten von der "Kultivierungspflanze" *Coleus blumei* entfernt und um Pflanzstöcke gewunden, so dass die natürliche Orientierung (gegen den Uhrzeigersinn) beibehalten wurde. Sie wurden für einen Tag kultiviert und anschließend um den Wirt gewickelt. Dies wird im Weiteren als Infektionsbeginn bezeichnet.

2.5.4. Probennahme zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus *Cuscuta reflexa*

Sprosse von *Cuscuta*, die drei Tage nach Infektionsbeginn Haustorien gebildet hatten, wurden vorsichtig mit einer Rasierklinge von der Wirtspflanze entfernt und von Sprossgewebe befreit. Danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.6. Transformation von *Nicotiana tabacum* var. Samsun NN (SNN) nach Horsch (1985)

Diese Methode erlaubt die stabile Transformation von Blattscheiben und wurde von Horsch entwickelt (Horsch *et al.*, 1985). Die transformierten Agrobakterien-Zellen wurden über Nacht bei 28-30 °C in 4 ml 2YT Medium angezogen. 1 ml der Kultur wurde verwendet, um 50 ml 2YT zu inokulieren. Nach einer Inkubationszeit von 24-36 h wurde die OD₆₀₀ auf 1,0 mit 2YT (ohne Antibiotika) eingestellt. Das Endvolumen betrug 200 ml. Tabakscheiben von 6 Wochen alten Tabakblättern wurden mit einem Korkbohrer Ø 0,8 cm ausgestanzt und in einer 2 %igen Natriumhypochlorid-Lösung für 5 min sterilisiert. Dann wurden sie 4mal in sterilem Wasser gewaschen. Das Volumen betrug ca. 250 ml. Anschließend wurden sie für 5 min in die Agrobaktériensuspension überführt und leicht geschwenkt. Danach wurden die Zellen mit sterilen Tüchern trockengetupft und auf sog. Co-Kultivierungsplatten transferiert. Diese Platten enthalten keine Antibiotika, hier können gleichermaßen Bakterien sowie Pflanzenzellen gedeihen. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Blattscheiben auf Selektionsplatten überführt und für zwei Tage inkubiert. Die Inkubation fand in einer Klimakammer statt, in der eine Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % herrschte. Der Tag/Nachtrhythmus betrug 16/8h.

Co-Kultivierungsmedium:	1 x MS (Murashige & Skoge) Mikro- und Makroelemente 3 % Sucrose 0,8 % Pflanzenagar pH 5,8 mit KOH einstellen nach dem Autoklavieren wird hinzugefügt: 1 mg/l 6-Benzylaminopurin (BAP) 0,1 mg/l 1-Naphthyllessigsäure (NAA)
Selektionsmedium:	wie Co-Kultivierungsmedium jedoch mit Antibiotika 250 mg/l Carbenicillin 50 mg/l Hygromycin B
Bewurzelungsmedium:	alle Bestandteile des Selektionsmediums bis auf die Phytohormone

2.7. Charakterisierung der Cysteinprotease

Alle Charakterisierungen wurden mit FTC-Casein (Pierce) unternommen. Hierbei handelt es sich um Casein, das mit einem großen molaren Überschuss an Fluoresceinisothiocyanat (FTC) markiert wurde. Die Fluoreszenz wird durch die FTC- Moleküle, die im Verhältnis 3:1 an ein Caseinmolekül gebunden sind, emittiert. Durch Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) wird diese gelöscht, so lange sich die FTC Moleküle in einer zu geringen Entfernung voneinander befinden (10-100 Å) (Betts *et al.*, 2003). Sobald die Moleküle gespalten werden und sich der Abstand der FTC Moleküle vergrößert, nimmt die Intensität des emittierten Lichts mit der Inkubationszeit zu (Abb. 2-3).

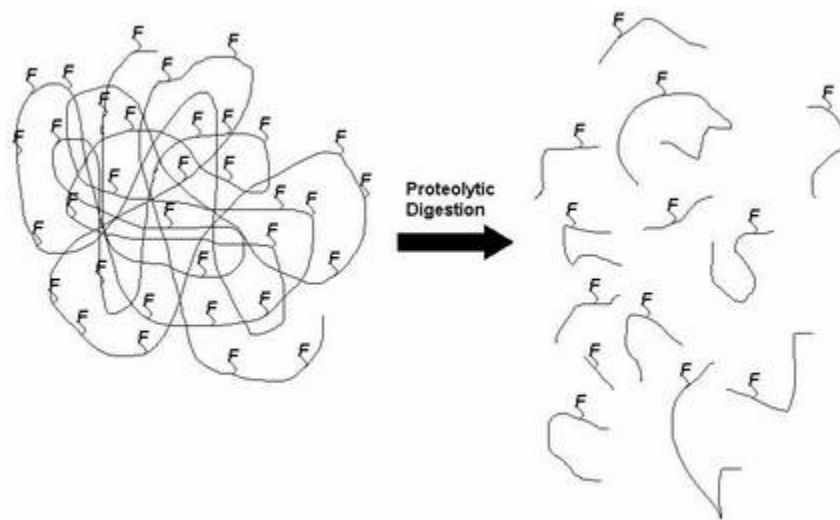


Abb. 2-3: QuantiCleave™ Fluoreszenz Protease Assay. Der Abbau von mit Fluoreszein markiertem Casein in kleinere Fragmente ergibt eine messbare Änderung der Fluoreszenz. Aus Instructions QuantiCleave™ Fluorescent Protease Assay Kit.

2.7.1. Messungen mit FTC-Casein

2.7.1.1. Kontinuierliche Messungen mit dem Fluorimeter

Zur kontinuierlichen Messung mit dem Fluorimeter wurde eine bestimmte Menge des Inhibitors und/oder des jeweiligen Enzyms vorgelegt. Zum Starten der Reaktion wurde dann das FTC-Casein hinzupipettiert. Die Reaktion wurde über einen definierten Zeitraum gemessen. Dieser betrug normalerweise 5 oder 20 min.

2.7.1.2. Diskontinuierliche Messung mit dem Fluorimeter

In saurem Milieu (unter pH ~5,5) fluoreszieren die FTC-Moleküle kaum. Um trotzdem die Aktivität einer Protease in saurem Milieu bestimmen zu können, findet die Reaktion bei dem gewählten pH-Wert statt. Das noch vorhandene Casein wird ausgefällt, die Spaltprodukte verbleiben im Überstand und können nach Umpuffern der Lösung fluorimetrisch vermessen werden (Twining, 1984). Das Reaktionsvolumen betrug 500 µl. Die Inkubation dauerte 30 min. Danach wurde 100 % TCA appliziert und gemischt. Die Probe wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm. 100 µl des Überstandes wurden abgenommen und in 500 µl 0,5 M Tris/HCl pH 9.0 überführt. Diese Lösung wurde im Fluorimeter vermessen.

2.7.2. Bestimmung von K_m -Werten

Die K_m -Werte wurde durch Anfertigung eines Hanes-Woolf-Diagramms bestimmt. Hierbei wird $[S]/v$ ($[S]$ = Substratkonzentration als, v = Geschwindigkeit) gegen $[S]$ aufgetragen. Der Vorteil gegenüber einer Lineweaver-Burk-Auftragung ist, dass es bei geringen Substratkonzentrationen nicht zu übermäßigen Abweichungen durch Pipettierfehler kommen kann. Der Schnittpunkt mit der X-Achse entspricht dem negativen K_m -Wert. Der Anstieg der Regressionsgeraden beträgt $1/V_{max}$, der Schnittpunkt mit der Y-Achse entspricht K_m/V_{max} .

2.7.3. Bestimmung von K_i -Werten

Zur Bestimmung der K_i -Werte wurde die Methode nach Dixon verwendet (Dixon, 1953). Wenn $1/v$ gegen die InhibitorKonzentration bei konstanter Substratkonzentration aufgetragen wird, entsteht eine Gerade. Wenn dies für mindestens 2 Substratkonzentrationen durchgeführt wird, kreuzen sich beide Linien links der Y-Achse. Dieser Schnittpunkt gibt den negativen K_i -Wert an und kann von der X-Achse abgelesen werden.

2.8. Applikation des Propeptids auf die Wirtspflanze

Studien zur Interaktion von *Cuscuta reflexa* mit dem kompatiblen Wirt *Nicotiana tabacum* wurden in Bezug auf das Propeptid unternommen. Die Wirtspflanzen wurden wie unter 2.5. beschrieben kultiviert. Etwa 6 Wochen nach Aussaat des Wirts wurde der Parasit um den Wirt gewunden und 2mal täglich mit dem Propeptid behandelt. Die Konzentration des Propeptids betrug $100 \mu\text{g/ml}$. Nach 7 Tagen wurden die Haustorien, die sich entwickelt hatten, gezählt. Zudem wurde mit einer Federwaage die Kraft gemessen, mit der sich die Haustorien an die Pflanze geheftet hatten. Dazu wurde ein Draht an der Federwaage angebracht und in das letzte Haustorium gefädelt. Nun wurde langsam die Kraft erhöht und deren Wert beim Austritt des Haustoriums aus der Pflanze notiert. Diese Methode ist bereits in der Dissertation von Markus Albert (2005) beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1. Expression einer Cysteinprotease während der Interaktion

Die Untersuchungen von Markus Albert (2005) haben gezeigt, dass *Cuscuta reflexa* während des Befalls eines potentiellen Wirts Proteine exprimiert, die eine erfolgreiche Infiltration fördern. Unter den lytischen Enzymen befinden sich eine Pektinase, eine Aldolase, eine ATP-abhängige-Protease sowie eine Cysteinprotease, die im Weiteren Cuscuin genannt wird. Um die Expression von Cuscuin zu verifizieren, wurde aus *Cuscuta reflexa* die gesamte RNA isoliert und auf eine Nylonmembran transferiert. Anschließend wurde die mRNA von Cuscuin mittels einer genspezifischen Sonde detektiert (Abb. 3-1). Die RNA stammte aus Sprossgewebe mit entwickelten und ohne entwickelte Haustorien.

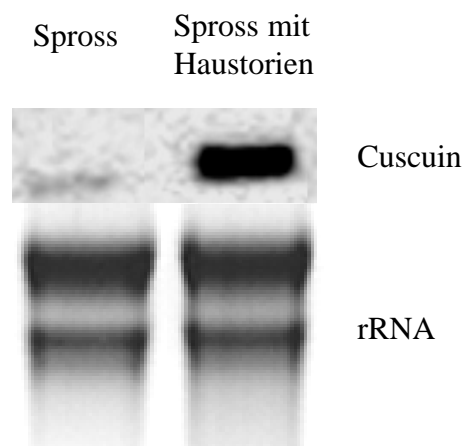


Abb. 3-1: Agarosegel (unten) und Northern-Blot (oben) von *Cuscuta reflexa* RNA zur Identifizierung eines Cuscuin kodierenden Transkripts. Eine Tabakpflanze wurde am Spross mit *Cuscuta reflexa* infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurde die RNA aus dem Gewebe isoliert. Die NC-Membran wurde mit einer spezifischen Sonde hybridisiert, die das Cuscuin-Aktivzentrum kodiert. Die Ethidiumbromid-Fluoreszenz der Proben im Agarosegel zeigt eine gleichmäßig übertragene RNA-Menge.

Das Ergebnis zeigte, dass drei Tage nach der Infektion des kompatiblen Wirts *Nicotiana tabacum* eine massive Anreicherung der mRNA der betreffenden Cysteinprotease stattgefunden hatte. Die Sonde wurde mit Primern hergestellt, die die kodierende Nukleotidsequenz des aktiven Zentrums amplifizieren.

3.1.1. Vergleichende Analyse der Nucleotid- und der Aminosäuresequenz der Protease

Die vollständige cDNA wurde *in silico* in die Proteasesequenz (s. Anhang) übersetzt (Abb. 3-2) und mit schon bekannten Sequenzen verglichen (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Dabei wurde eine Sequenzhomologie von 86 % zu einer papainähnlichen Cysteinprotease aus *Ipomea batatas* (Süßkartoffel) gefunden. Cysteinproteasen werden als sogenannte Zymogene translatiert und bestehen aus 3 Teilen, dem Pre- oder Signalpeptid, dem Pro- oder Aktivierungspeptid und der reifen Domäne. Das Prepeptid, das als Lokalisationssignal dient, wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % an der Stelle SSS-DD zwischen Serin und Aspartat gespalten (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Abb. 3-2). Des Weiteren ist das Prepeptid ein Signalpeptid, das mit 98,2%iger Wahrscheinlichkeit über einen sekretorischen Weg aus der Zelle transportiert wird. Das Propeptid enthält das sog. ERFNIN-Motiv, wobei die letzten beiden Aminosäuren oft davon abweichen (Karrer *et al.*, 1993). Dieses Motiv wurde zuerst bei Procathepsin-L entdeckt und dient der Stabilisierung des Propeptids während der Interaktion mit dem reifen Enzym. Bei papainähnlichen Familien sind 2 Struktur motive des Propeptids zu finden (Coulombe *et al.*, 1996b). Das bestimmte, relative Molekulargewicht des Propeptids war ca. 11,7 kDa und das der Cysteinprotease lag bei 24,8 kDa (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

MALRLSLMFLLCSEFLLVTTSLGLADGSSSDDILIRQVVGDDGALLSDDHQFTVFKKRFGKAYA
 SEEEHDYRFSVFKVNMRLAKQHQQLDPSAVRGVTRFSDLTPSEFKRNFLGLNRRLRFPADAQT
 APTLPTDDLPSTDFWRDHGAVTAVKNQGS CGSCWSFSTTGALEGANFLATGKLVSLSEQQLVD
 CDHECDPEEAGSCDSGCNGGLMTSAFEYTLKAGGLMREEDYPYTGNDQVCNFDKTKIAAKVA
 NFSVSLDEDQIAANLVKNGPLAVAINAVFMQTYAGGVSCP YICSKRLDHGVLLVGYGSAGYA
 PVRAKEKPYWVIKNSWGEQWGEKGYKICRGSNVCVDSMVSTVA AVSTNSE

Abb. 3-2: Sequenz von Cuscuin. Die grüne Sequenz gibt das Prepeptid an, die rote das Propeptid und die blaue das reife Enzym. Das wahrscheinliche Spaltungsmotiv ist kursiv und unterstrichen dargestellt. Das sog. ERFNIN-Motiv befindet sich im Propeptid (schwarz und unterstrichen).

3.1.2. *In silico* berechnetes 3D-Modell von Cuscuin

Durch die Berechnung über Swissmodel ist es möglich, 3D-Strukturen von Enzymen zu berechnen und die Struktur falls möglich mit schon kristallisierten Proteinen zu vergleichen (Abb. 3-3). Hier wird deutlich, dass die Struktur der Protease der von Procathepsin L ähnlich ist. Die Gruppe der procathepsin-L-ähnlichen Enzyme stellt nahezu die größte Gruppe der parasitären Cysteinproteasen dar (Sajid and McKerrow, 2002).

Das ERFNIN-Motiv befindet sich in der zweiten Helix des Propeptids und dient der Stabilisierung. Der sogenannte Protein-Bindungs-Loop (PBL) ist eine der beiden Kontaktstellen des Propeptids mit dem Enzym. Dieser Loop wird über hydrostatische Wechselwirkungen an das Enzym gebunden. Die andere Kontaktstelle ist die Peptidkette, die durch das aktive Zentrum führt und die eigentliche inhibitorische Arbeit leistet.

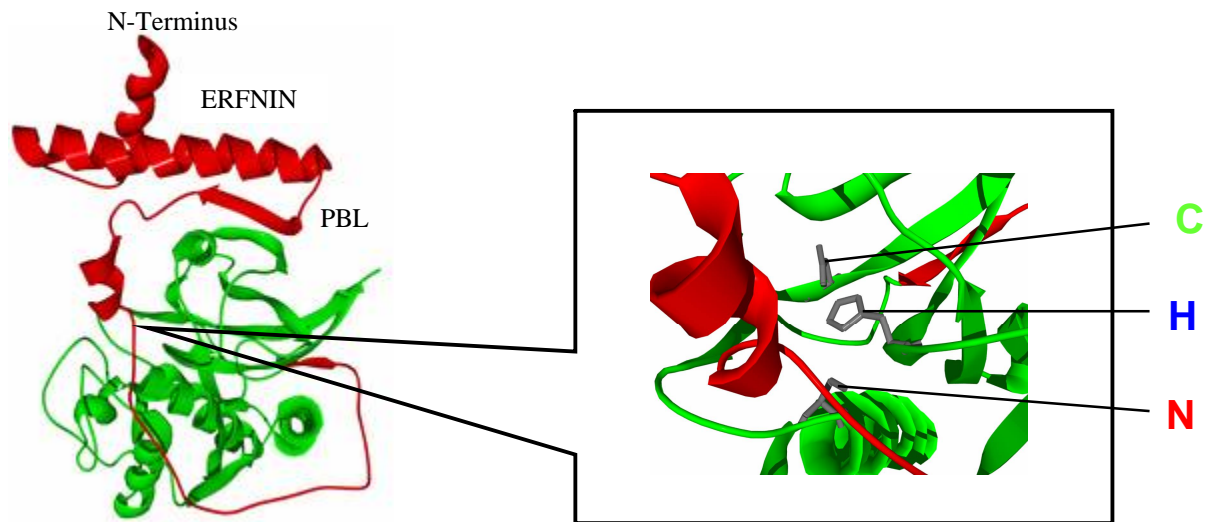


Abb. 3-3: Durch Swissmodel berechnete 3D-Struktur von Cuscuin. Der rote Teil des Stabmodells stellt das Propeptid dar und der grüne das Enzym. Das ERFNIN-Motiv befindet sich in der zweiten Helix vom N-Terminus aus gesehen. Der Protein-Bindungs-Loop (PBL), welcher mit dem Enzym interagiert, befindet sich im nachfolgenden β -Faltblatt. Das aktive Zentrum ist rechts dargestellt. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind mit den Einbuchstabencodes gekennzeichnet: C: Cystein, H: Histidin, N: Asparagin. Die Abbildung wurde mit povray erstellt (<http://www.povray.org/>).

3.2. Expression und Isolation von Cuscuin

3.2.1. Expression von Cuscuin

Die Protease wurde in *E. coli* exprimiert. Der codierende Bereich wurde unter Zuhilfenahme des GATEWAY™-Systems (Invitrogen) in den Expressionsvektor pETDEST42 rekombiniert und stand unter der Kontrolle eines Lactose induzierbaren Promoters. Durch die Zugabe des Lactose-Analogons IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) wurde die Transkription aktiviert. In Abb. 3-4 sind Proteinbanden mit den entsprechenden Molekulargewichten von Cuscuin und dem Propeptid zu sehen.

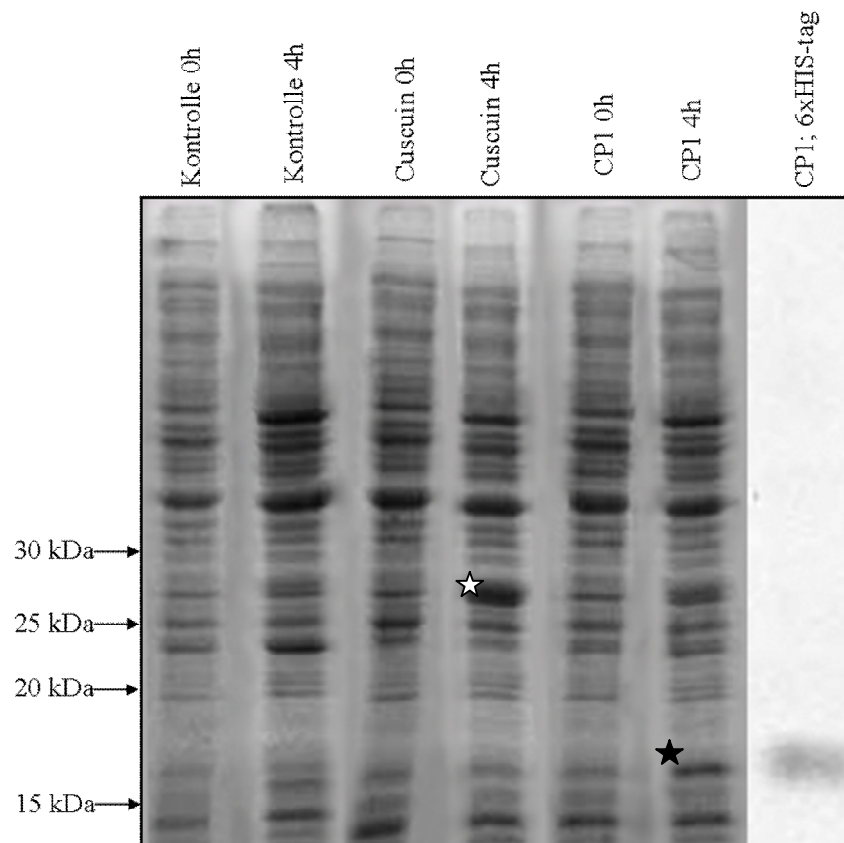


Abb. 3-4: Coomassie gefärbtes, diskontinuierliches SDS-Gel und Westernblot von *E. coli* Extrakten mit Cuscuin und seinem Aktivierungspeptid. Der Stern zeigt die Proteinbande des exprimierten Cuscuin und der ausgefüllte Stern die Proteinbande des exprimierten Propeptids. Die Färbung des Westernblots erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Oligohistidin.

Durch die Aminosäuren der flankierenden att-site zwischen der Cysteinprotease und dem Histag der codierenden Sequenz entstand ein Produkt, dessen relatives Molekulargewicht um rund 1100 Dalton größer als erwartet war. Entsprechend war die Retentionszeit im diskontinuierlichen SDS-Gel kürzer, als dies theoretisch der Fall sein sollte.

3.2.2. Isolation von Cuscuin

Die Cuscuin-Bande wurde aus dem Gel eluiert. Das Propeptid wurde mithilfe einer Nickel-Chelat-Matrix isoliert (siehe Material & Methoden). Auf den Abbildungen 3-5 a, b sind Banden mit den entsprechenden Molekulargewichten der isolierten Peptide zu erkennen.

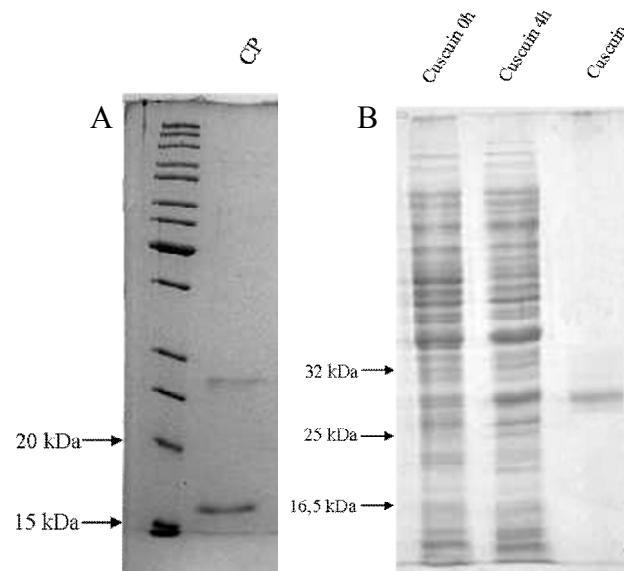


Abb. 3-5: Coomassie gefärbte, diskontinuierliche SDS-Gele mit dem durch Nickelaffinitätschromatographie gereinigten Propeptid (A) und der reifen Cysteinprotease Cuscuin (B), die durch SDS-PAGE von kontaminierenden Proteinen befreit und nach Elektroelution und Entfernung von SDS gefaltet wurde.

3.3. Charakterisierung von Cuscuin

Zuerst wurden der optimale pH-Wert und die Temperatur bestimmt. Anschließend die Wechselzahl, sowie der K_m - und der K_i -Wert. Alle zur Charakterisierung des Cuscuis im Fluorimeter durchgeführten Experimente wurden mit FTC-Casein vollzogen.

3.3.1. Messungen mit Cuscuin

Bei kontinuierlichen Messungen, die mit Cuscuin erfolgten, wurde das Edukt zum Starten der Reaktion in die Messküvette gegeben. Nach Zugabe von Casein stieg die Fluoreszenz in den ersten 3 - 4 Minuten stark an (Abb. 3-6). Dies war nicht allein auf die Aktivität der Protease zurückzuführen, sondern auch auf die an das Casein gekoppelten Fluorophore. Eine geringe Entfernung der Fluorophore voneinander (10-100 Å) resultierte in einer geringeren Emission von Fluoreszenz, da die emittierte Fluoreszenz gelöscht wird (Betts *et al.*, 2003). Nach dem Überführen von FTC-Casein in die Messküvette verteilten sich die Moleküle gleichmäßig. In den ersten Minuten war deshalb ein starker Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten.

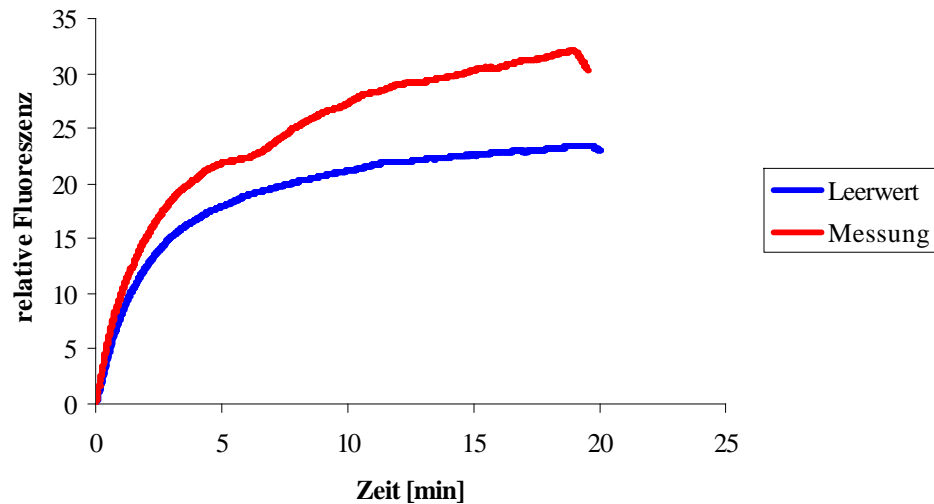


Abb. 3-6: Spaltung von $1,2\ \mu\text{M}$ FTC-markiertes Casein durch $8,7\ \text{nM}$ Cuscuin. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte in $40\ \text{mM}$ Tris/HCl pH 7,5 bei $30\ ^\circ\text{C}$.

Der Leerwert (Kontrollmessungen ohne Enzym zur Abschätzung der Hintergrundfluoreszenz) diente dazu, die Zunahme der Fluoreszenzintensität gegen die Zunahme der Intensität durch die Hydrolyse des Caseins zu ermitteln und zu korrigieren. Ein standardisiertes Verfahren zum Umgang mit Cuscuin wurde eingesetzt. Die gesamte Messung dauerte insgesamt 20 min. Die Hydrolysegeschwindigkeit von Cuscuin, angezeigt durch den Anstieg der Fluoreszenzintensität, wurde in dem Zeitintervall nach 15 bis 18 min bestimmt und gegen den Leerwert korrigiert (Abb. 3-7). Bei allen Messungen mit Cuscuin wurde eine Konzentration von $8,7\ \text{nM}$ Enzym eingesetzt.

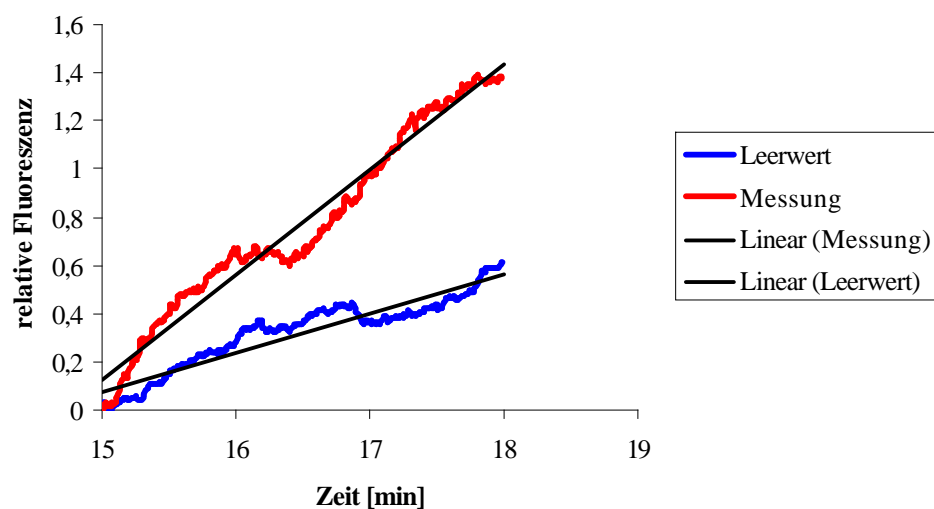


Abb. 3-7: Linearität des Fluoreszenzanstiegs 15 bis 18 min nach Zugabe von $8,7\ \text{nM}$ Cuscuin zu $1,2\ \mu\text{M}$ FTC-markiertes Casein. Die Reaktionsbedingungen entsprechen denen von Abb. 3-6. Aus den Steigungen von Probe ($R^2 = 0.9676$) und Leerwert ($R^2 = 0.8859$) wurde die Hydrolysegeschwindigkeit berechnet.

3.3.2. Bestimmung der optimalen Reaktionsparameter

3.3.2.1. Bestimmung des optimalen pH-Wertes

Der optimale pH-Wert wurde aus dem Mittelwert von zwei Messungen bestimmt. Das pH-Optimum betrug 7,5 (Abb.3-8). Die gewählte Reaktionstemperatur belief sich auf 37 °C, da eine bereits charakterisierte Cysteinprotease aus dem parasitären Organismus *Trypanosoma cruzi* hier das Temperaturoptimum hat.

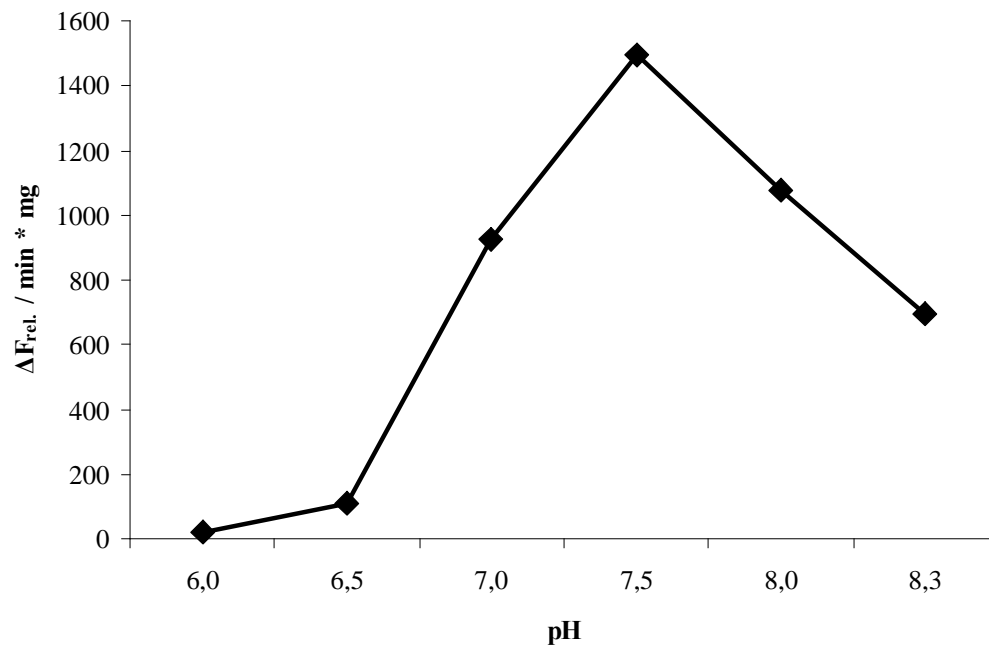


Abb. 3-8: pH-Optimum von Cuscuin aus *Cuscuta reflexa*. 8,7 nM Cuscuin und 0,8 μM FTC-Casein wurden in 40 mM MES-Puffer pH 5,5 - 6,5 40 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0-8,4 bei 37 °C inkubiert. Die Steigung nach 15 bis 18 min wurde zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit verwendet.

3.3.2.2. Bestimmung der optimalen Temperatur

Die optimale Temperatur wurde durch den Mittelwert von zwei Messungen bestimmt (Abb. 3-9). Sie lag bei 30 °C und somit 7 °C unter der von *Trypanosoma*. Die Differenz ist wahrscheinlich auf unterschiedlichen Wirt und Lebensraum der Organismen zurückzuführen.

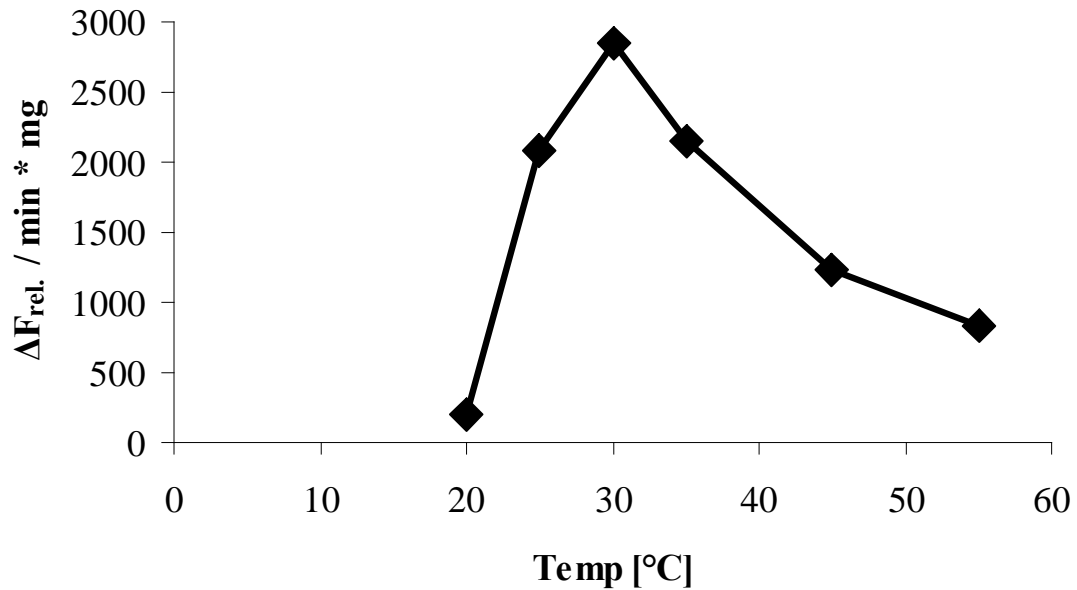


Abb. 3-9: Temperatur-Optimum von Cuscuin aus *Cuscuta reflexa*. 8,7 nM Cuscuin und 0,8 μ M FTC-Casein wurden in 40 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.5 bei 37 °C inkubiert. Die Steigung nach 15 bis 18 min wurde zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit verwendet.

3.3.3. Bestimmung der Wechselzahl

Die Wechselzahl gibt an, wieviele Peptidbindungen in einer Sekunde von einem Molekül Cuscuin hydrolysiert werden. Die Fluoreszenz nimmt linear mit steigender Konzentration von FTC zu (Abb. 3-10). Dadurch konnte die Wechselzahl per Dreisatz bestimmt werden.

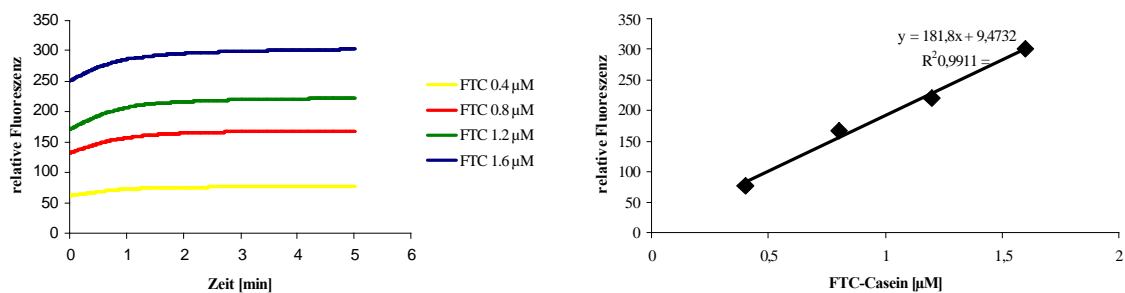


Abb. 3-10: Eichreihe zur Bestimmung des Umsatzes oder auch der Wechselzahl von Cuscuin. Die relative Fluoreszenz wurde im Fluorimeter für 5 min gemessen. Danach wurde der Wert, welcher nach 3 min gemessen wurde, gegen die eingesetzte Konzentration aufgetragen.

Es wurde die Fluoreszenzintensität nach 18 min für den Leerwert und die Messung ermittelt (Gleichung 1). Die in einer Sekunde verbrauchte Substratmenge konnte nun bestimmt werden (Gleichung 2/3). Die Konzentration an umgesetztem Casein wurde durch die in der Reaktion eingesetzten Enzymmoleküle geteilt, um die Anzahl der gespaltenen Peptidverbindungen pro Sekunde zu erhalten (Gleichung 4).

$$175,758695 \triangleq 0,8 \mu\text{M}$$

$$177,637958 \triangleq X \mu\text{M} \quad (\text{Gleichung 1})$$

$$X = 0,808845131 - 0,8 = 0,008845131 \mu\text{M} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$(0,008845131 / 18) / 60 = 8,19\text{E-}06 \mu\text{M} \quad (\text{Gleichung 3})$$

$$8,19 \times 10^{-6} \mu\text{M/s} / 8,7 \times 10^{-6} \mu\text{M} = 0,94137186/\text{s} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Diese Bestimmung wurde bei einer Substratkonzentration von 0,8 μM dreimal wiederholt. Die Konzentration von Cuscuin betrug stets $8,7 \times 10^{-6} \mu\text{M}$. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Die Wechselzahl hat einen Wert von 1,2207 Peptidbindungen/Sekunde.

Tab. 3-1: Ermittelte Wechselzahlen für Cuscuin (8,7 nM) bei der Hydrolyse von FTC-Casein

FTC-Casein [μM]	Wechselzahl [1/s]
0,8 (1)	1,984165362
0,8 (2)	0,736683935
0,8 (3)	0,94137186
Standardabweichung	0,550707152

3.3.4. Bestimmung des K_m -Wertes nach Hanes-Woolf

Bei der Lineweaver-Burk-Auftragung ergibt sich das Problem, dass kleine Fehler in der Geschwindigkeit der Reaktion [V] bei geringen Substratkonzentrationen [S] eine große Abweichung ergeben. Darum wurde zur Bestimmung das Verfahren nach Hanes-Woolf angewendet.

Bei dieser Auftragungsmethode geben Fehler in [S]/V eine bessere Annäherung in V. Aufgrund einer unverfälschten Spreizung der Messpunkte entlang der [S]-Achse wird das Ergebnis durch einzelne Ausreißer prinzipiell weniger verfälscht.

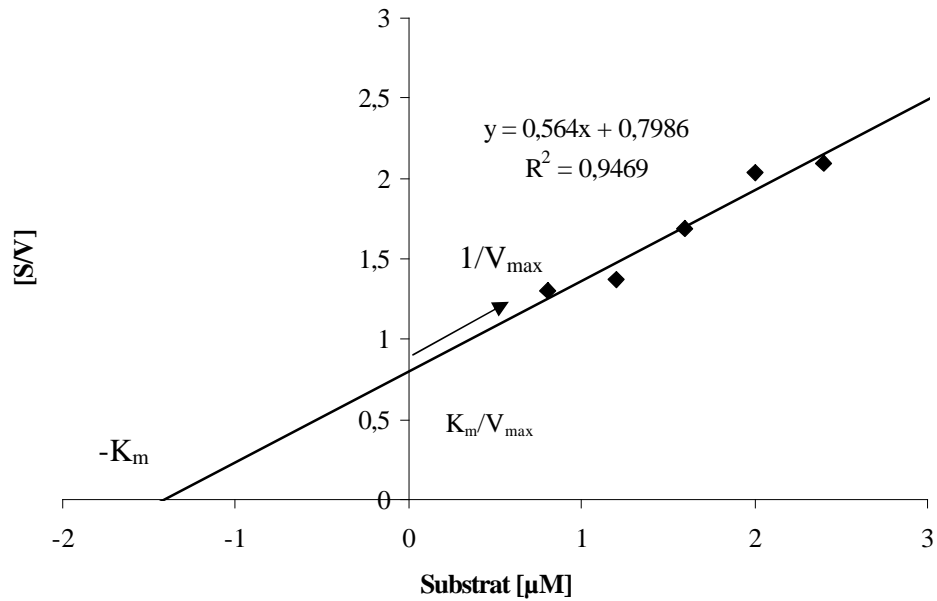


Abb. 3-11: Bestimmung des K_m -Werts von Cuscuin nach Hanes-Woolf. 8,7 nM Cuscuin in 40 mM Tris-HCl pH 7,5 wurden mit 0,8 μM , 1,2 μM , 1,6 μM , 2,0 μM und 2,4 μM FTC-Casein bei 30 °C inkubiert. Der relative Fluoreszenzanstieg wurde zwischen 15-18 min nach Zugabe des Enzyms ermittelt.

Der Anstieg der Regressionsgeraden betrug $1/V_{\max}$. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse entsprach K_m/V_{\max} . Der K_m -Wert betrug unter diesen Bedingungen 1,42 μM (Abb. 3-11).

3.3.5. Bestimmung der K_i -Werte von Cuscuin und anderen Cysteinproteasen

3.3.5.1. Bestimmung des K_i -Wertes von Cuscuin

Der K_i -Wert ist eine Zerfallskonstante, die das reversible Gleichgewicht zwischen einem Enzym-Inhibitor-Komplex und den freien Bindungspartnern widerspiegelt. Der K_i -Wert ist ein wichtiges Mittel, um Enzymaffinitäten und Inhibitorstärken miteinander vergleichen zu können, da keine Konzentrationsabhängigkeit besteht.

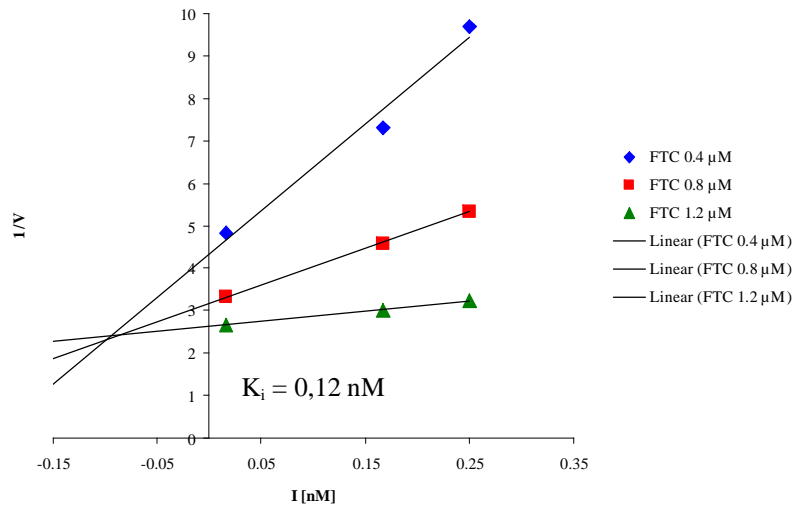


Abb. 3-12: Bestimmung des K_i -Wertes von Cuscuin aus *Cuscuta reflexa* und seinem Propeptid nach der methode von Dixon. Es wurde standardmäßig 8,7 pM Cuscuin eingesetzt. Der ermittelte K_i -Wert betrug 0,12 nM. Die Bestimmung wurde bei einem pH-Wert von 7,5 (40 mM Tris-HCl) und einer Temperatur von 30 °C durchgeführt.

Der K_i -Wert für Cuscuin betrug 0,12 nM, die Vergleichswerte für Papain von *Papaya carica* und Bromelain von *Ananas comosus* 16 nM bzw. 26 nM (Daten nicht gezeigt). Im Falle von Papain musste eine 133fach erhöhte Konzentration des Inhibitors appliziert werden, um das Enzym in der gleichen Weise zu hemmen wie Cuscuin. Bei Bromelain musste die Konzentration um das 216fache erhöht werden.

3.4. Wirkung des Propeptids auf Papain, Bromelain und Trypsin

Die Wirkung des Inhibitors auf andere Proteasen wurde weiterhin getestet, um die Anwendbarkeit des Aktivierungspeptids im therapeutischen Bereich oder im Pflanzenschutz näher zu charakterisieren zu können. Dies waren zum einen die pflanzlichen Cysteinproteasen Papain und Bromelain und die Serinprotease Trypsin. Da Trypsin aus einer anderen Familie proteolytischer Enzyme stammt, sollte das Propeptid nicht auf dieses ansprechen. Deshalb diente dieser Versuchsansatz hauptsächlich als Kontrolle. Bei vielen Cysteinproteasen konnte nur eine schwache Inhibition durch Propeptide bei niedrigem pH-Werten, also im sauren Milieu, beobachtet werden. Deshalb sollte auch bestimmt werden, ob eine inhibitorische Wirkung des Peptids bei einem niedrigen pH-Wert gegeben ist. Die Untersuchungen fanden bei optimalen Bedingungen für die jeweilige Protease statt. Diese hatten bei Bromelain und Papain einen pH-Wert von 6,25 und eine Temperatur von 25 °C. Zudem wurde ein pH-Wert von 4,5 für beide Proteasen gewählt (Abb. 3-13). Für Trypsin wurde ein pH-Wert von 8,0

bzw. 6,0 gewählt, da bei einem pH-Wert von 4,5 keine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-14).

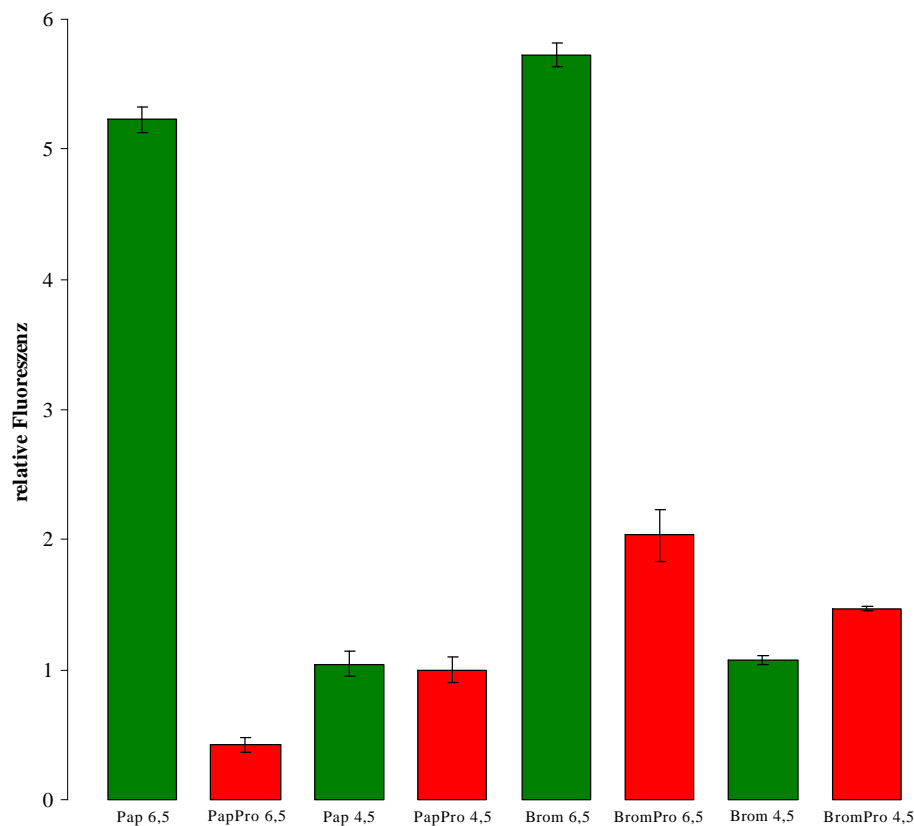


Abb. 3-13: Inhibierende Wirkung des Cuscuin-Aktivierungspeptids auf Papain und Bromelain. Die Aktivitätsmessung wurde, wie in Abb. 3-6 beschrieben, bei einem pH-Wert von 8,3 durchgeführt. Die grünen Balken stehen für die Versuchsansätze ohne das Propeptid unter dem gewählten pH-Wert. Die roten Balken stehen für die Versuchsansätze mit dem Propeptid unter dem gewählten pH Wert. Es wurden jeweils 44 nM der jeweiligen Protease und 125 nM des Propeptids eingesetzt. Die Konzentration des Substrats belief sich auf 0,8 μ M. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messungen bestimmt.

In den einzelnen Versuchsansätzen spiegelte sich das Bild wieder, das schon bei anderen Cysteinproteasen beobachtet werden konnte: eine starke Inhibition bei einem fast neutralen pH-Wert und eine stark abgeschwächte Inhibition in einem stark sauren Milieu. Dieses Verhalten wurde durch die höhere Protonenkonzentration verursacht, bei der durch Umladung vermutlich die elektrostatische Wechselwirkung des Peptids mit dem Enzym verhindert wurde. Wahrscheinlich wurde bei diesem pH auch bereits das Peptid abgebaut und damit der inhibitorische Faktor inaktiviert. Auch wenn die Aktivität der beiden Cysteinproteasen bei einem pH-Wert von 4,5 stark reduziert war, war dies nicht auf die Anwesenheit des Inhibitors zurückzuführen. Bromelain hatte sogar bei pH 4,5 eine höhere proteolytische Aktivität, obwohl das Peptid sich in dem Reaktionsgemisch befand.

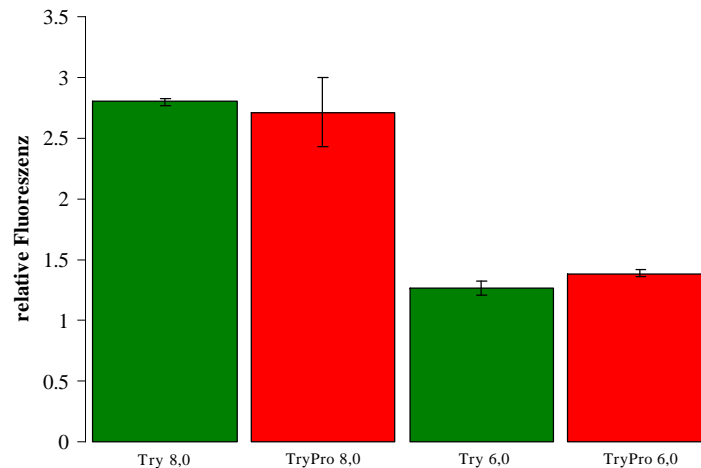


Abb. 3-14: Inhibierende Wirkung des Cuscuin-Aktivierungspeptids auf bovines Trypsin. Die Aktivitätsmessung wurde, wie in Abb. 3-6 beschrieben, bei einem pH-Wert von 8,3 durchgeführt. Die grünen Balken stehen für die Versuchsansätze ohne das Propeptid unter dem gewählten pH-Wert. Die roten Balken stehen für die Versuchsansätze mit dem Propeptid unter dem gewählten pH-Wert. Es wurden jeweils 44 nM Trypsin eingesetzt und 125 nM des Propeptids. Die Konzentration des Substrats belief sich auf 0,8 μ M. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messungen bestimmt.

3.5. Einsatz des Propeptids als Pflanzenschutzmittel

Um die Wirksamkeit des Propeptids als Pflanzenschutzmittel *in vivo* zu bestimmen, wurden Tabakpflanzen als kompatible Wirte eingesetzt. Für den Laborversuch wurden insgesamt 58 *Cuscuta reflexa* Pflanzen verwendet. Die Pflanzensprosse wurden mit *C. reflexa* bestückt, nachdem diese zuvor für eine Nacht um Pflanzstöcke gewickelt wurden, um ihre natürliche Windung zu erhalten. 29 der 58 Pflanzen wurden mit dem Propeptid behandelt. Der Versuchszeitraum belief sich auf 7 Tage, in denen die Pflanzen täglich zweimal mit der Peptidlösung behandelt wurden. Die Entwicklung des Parasiten wurde täglich dokumentiert und fotografiert. Abb. 3-15 zeigt die Ergebnisse einen Tag nach dem Start der Infektion bis zum Versuchende.

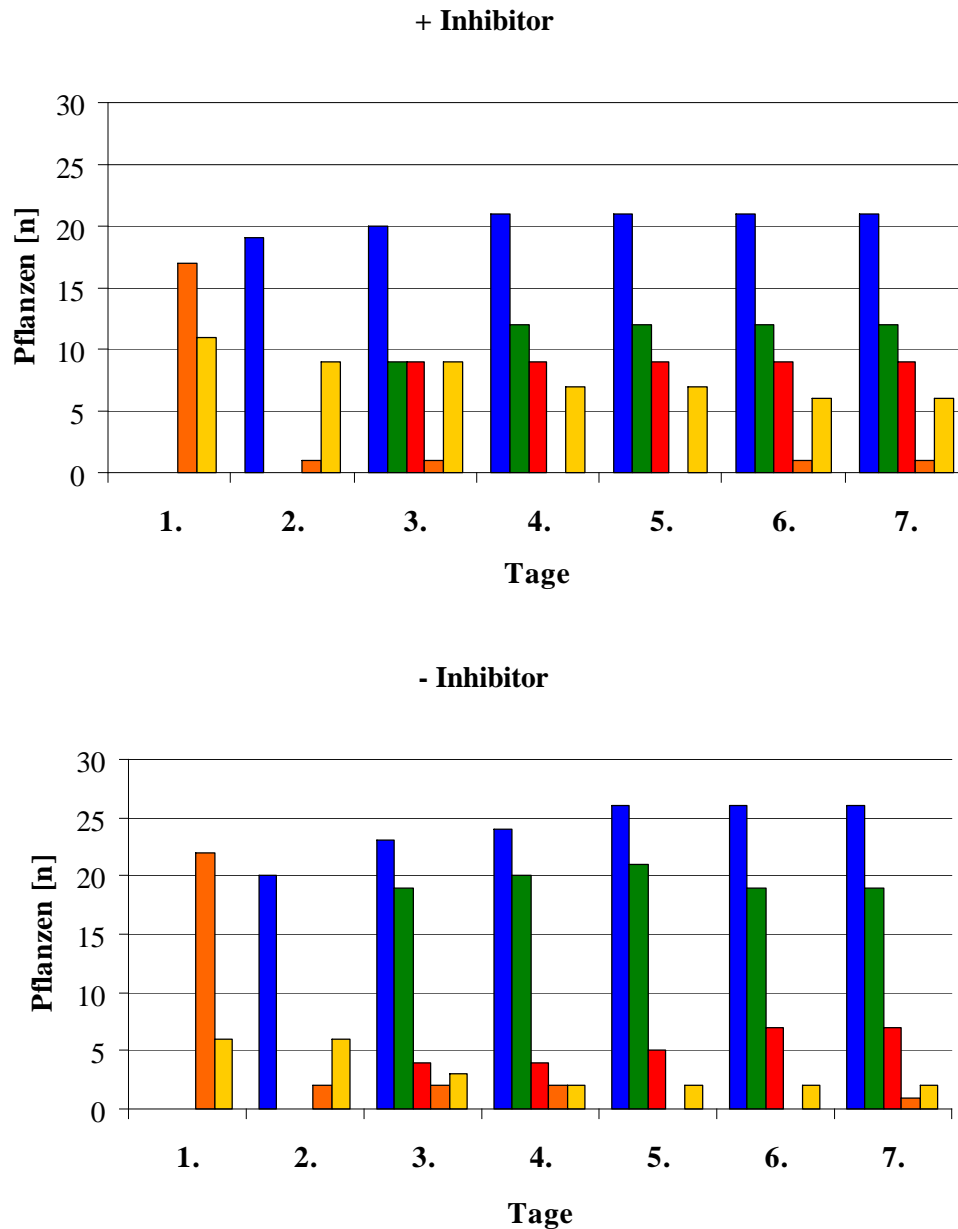


Abb. 3-15: Entwicklung der Parasiten, die über den siebentägigen Zeitraum dem Inhibitor ausgesetzt waren (+ Inhibitor), und der Parasiten, die als Kontrollen dienten und unbehandelt blieben (- Inhibitor)
 ■ Prähaustorien; ■ keine Haustorien; ■ Haustorien; ■ Anhaftung; ■ keine Anhaftung.

Auf der Abbildung ist zu erkennen, dass die meisten Parasiten über Nacht Prähaustorien gebildet hatten. Dies traf auf die behandelten als auch auf die unbehandelten Pflanzen zu. Fast alle Pflanzen bildeten am zweiten Tag Haustorien. Wie aus Abb., 3-16 ersichtlich, infizierten die Parasiten, welche über den siebentägigen Zeitraum der Behandlung mit dem Inhibitor ausgesetzt waren, weniger erfolgreich den Wirt als die Kontrollpflanzen. Insgesamt bildeten 21 von 28 Parasiten, die mit dem Propeptid behandelt wurden, Haustorien und 26 Parasiten, die nicht mit dem Propeptid behandelt wurden, Haustorien. Von den 21 behandelten Haustorienbildnern befielen 12 erfolgreich den Wirt ($P = 0,01412$). Von den 26

unbehandelten Haustorienbildnern befielen 19 erfolgreich den Wirt ($P = 0,033895$). Die p-Werte wurden mittels des McNemar-Tests bestimmt.

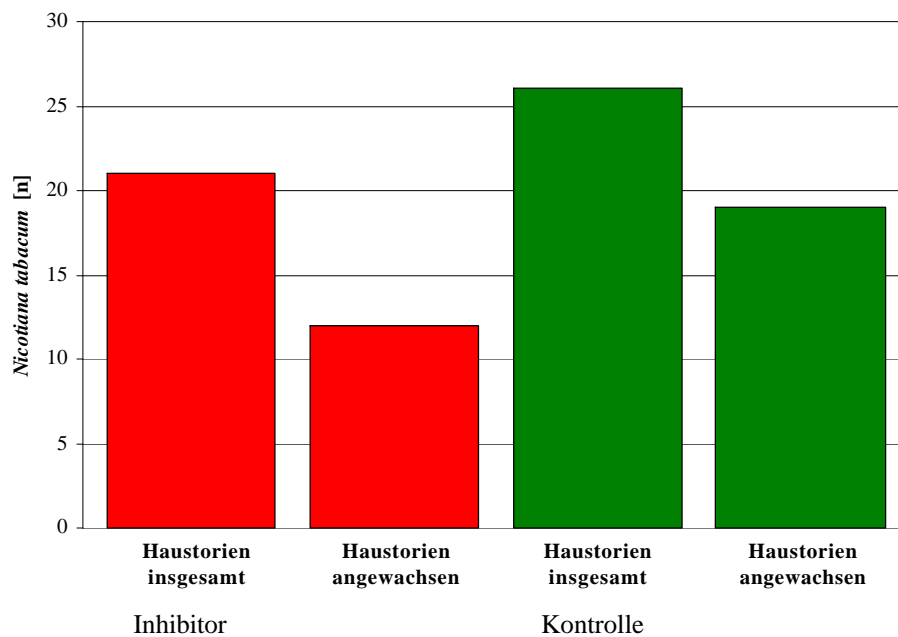


Abb. 3-16: Wirkung des Cuscuin-Aktivierungspeptids auf haustorielle Bereiche von *Cuscuta reflexa* während des Befalls des kompatiblen Wirts *Nicotiana tabacum* (SNN). Der Inhibitor wurde mit einer Sprühflasche aufgetragen. Die Anzahl der Wirtspflanzen betrug insgesamt 58. 7 Tage nach der Infektion fand die Auswertung statt. Inhibitor: insgesamt 21 Haustorien bildende Parasiten, davon 12 Haustorien angewachsen; Kontrolle: insgesamt 26 Haustorien bildende Parasiten, davon 19 Haustorien angewachsen.

Durch die Behandlung mit dem Propeptid wiesen einige Parasiten einen eher „kränklichen“ Phänotyp auf (Abb.3-17, 3-18). Nach dem 7. Tag wurde die Anheftungskraft jedes einzelnen Individuums mit einer Federwaage mechanisch bestimmt. Dies diente dazu, die relative Anheftungskräfte von behandelten und unbehandelten Pflanzen zu bestimmen.

Die Daten ließen den Schluss zu, dass die ermittelten relativen Anheftungskräfte keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Pflanzen zeigten. Jedoch ist zu bemerken, dass die Anheftungskräfte mit den Phänotypen korrelierten. Zum Teil lagen die Anheftungskräfte einer *Cuscuta* Pflanze mit einem „ungesunden“ Phänotyp erheblich unter denen einer „gesunden“ Pflanze. Deshalb wurden die Pflanzen in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen in Individuen, bei denen stärkere Kräfte als 1,5 N benötigt wurden, um den Parasiten vom Wirt zu lösen und zum anderen in Pflanzen, bei denen Kräfte unter 1,5 N ausreichend waren, um sie vom Wirt zu entfernen (Abb. 3-19).



Abb. 3-17: *Cuscuta reflexa* während der Interaktion mit *Nicotiana tabacum*. a: *Cuscuta reflexa* an einem unbehandelten Spross. b, c: *Cuscuta reflexa* an einem mit Cuscutin-Aktivierungspeptid besprühten Spross.



Abb. 3-18: *Cuscuta reflexa*-Sprosse während der Interaktion mit Cuscutin-Aktivierungspeptid behandeltem *Nicotiana tabacum* nach 7 Tagen. a: Aufnahme der Interaktion vor der Messung der Anheftungskraft; b: nach der Messung der Anheftungskraft. Diese betrug hier unter 1,5 N.

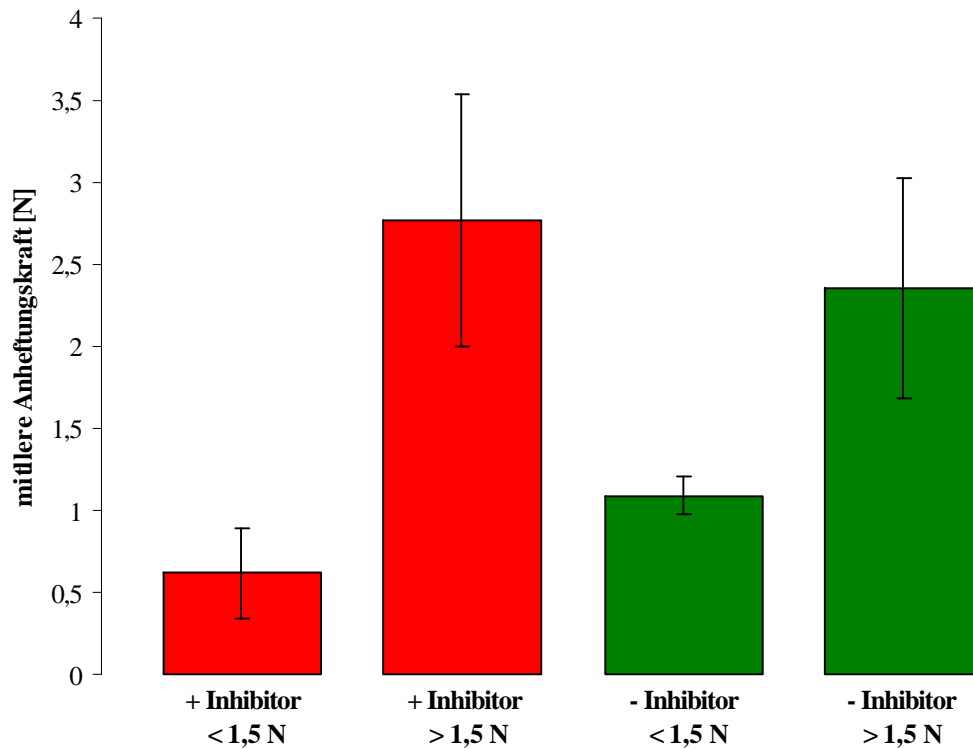


Abb. 3-19: Inhibitorischer Effekt des Cuscuin-Aktivierungspeptids auf die relative Anheftungskraft von *Cuscuta reflexa*. Die Anheftungskraft wurde mit einem Kraftmesser mechanisch bestimmt. Die Messungen wurden in Kolonnen unterteilt, bei denen die Kraft unter 1,5 N bzw. über 1,5 N betrug.

Die Auszählung der Individuen und die Zuteilung zu den beiden Gruppen (Anheftungskraft < 1,5 N und > 1,5 N) zeigte interessanterweise, dass bei der Hälfte der mit Peptidlösung behandelten Pflanzen eine Anheftungskraft von unter 1,5 Newton gemessen wurde. Es konnte ein hochsignifikanter Unterschied der 16 unbehandelten Pflanzen mit einer Anheftungskraft von über 1,5 N zu den behandelten 6 Pflanzen erfasst werden ($P = 0,00853$). Bei den unbehandelten Pflanzen dagegen lagen die Anheftungskräfte lediglich bei 4 der 21 Individuen unter 1,5 N ($P = 0,00643$) (Abb. 3-20). Die p-Werte wurden mittels des McNemar-Tests bestimmt.

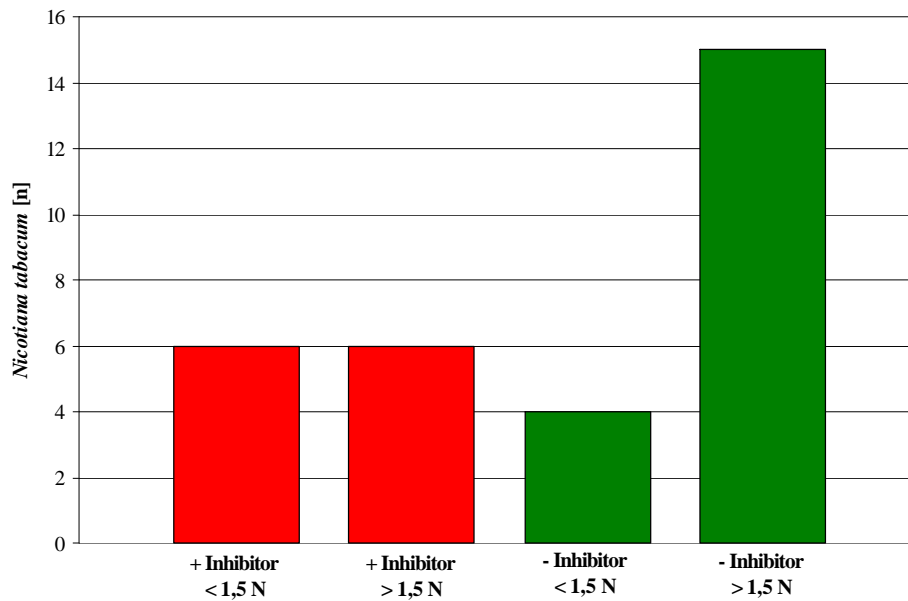


Abb. 3-20: Anzahl der Individuen mit einer Anheftungskraft über und unter 1,5 N. Angewachsene Individuen insgesamt: +Inhibitor: 12; -Inhibitor: 19. +Inhibitor < 1,5 N: 6; +Inhibitor > 1,5 N: 6; -Inhibitor < 1,5 N: 4; -Inhibitor > 1,5 N: 15.

3.5.1. Behandlung von *Cuscuta japonica* mit dem Propeptid

Eine chinesische Ulme (*Ulmus parvifolia*), die mit *Cuscuta japonica* befallen war, wurde mit der Propeptidlösung behandelt (Abb. 3-21). Die Behandlung verlief über 10 Tage und war effektiv. Das Peptid wurde auf die Haustorien und auf den gesamten Parasiten gesprüht. Die Behandlung wurde 2mal am Tag wiederholt. Dadurch konnte der Befall anderer Teile der Pflanze vermieden und die Zufuhr von Nährstoffen unterbrochen werden. Der Parasit löste sich nach dieser Zeit vom Wirt. Das zerstörte Gewebe ist in Abb. 3-22 gezeigt.



Abb. 3-21: *Cuscut japonica* auf dem kompatiblen Wirt *Ulmus parvifolia*



Abb. 3-22: Nach 10tägiger Behandlung mit Cuscuin-Aktivierungspeptid ist der Parasit abgefallen. Die Narben, die durch das Eindringen der Haustorien entstanden sind, sind deutlich zu erkennen.

3.6. Konstitutive Expression des Propeptids in Tabak

3.6.1. Integration der codierenden Sequenz des Propeptids in das Genom von *Nicotiana tabacum* mittels agrobakterieller Transformation

Um die Integration des Inhibitors in das Genom der Transformanten zu überprüfen, wurde die DNA isoliert. Die PCR wurde mit genspezifischen Primern für das Propeptid vollzogen. Als Kontrolle diente hier der Expressionsvektor, der zur Transformation der Pflanzen verwendet wurde. Auf der Abbildung 3-23 ist zu erkennen, dass die für das Propeptid codierende

Sequenz nicht in allen Pflanzen nachweisbar war. Möglicherweise ist die unterschiedliche Intensität der Banden auf eine doppelte oder mehrfache Integration des Peptids in das Genom der Pflanze zurückzuführen.

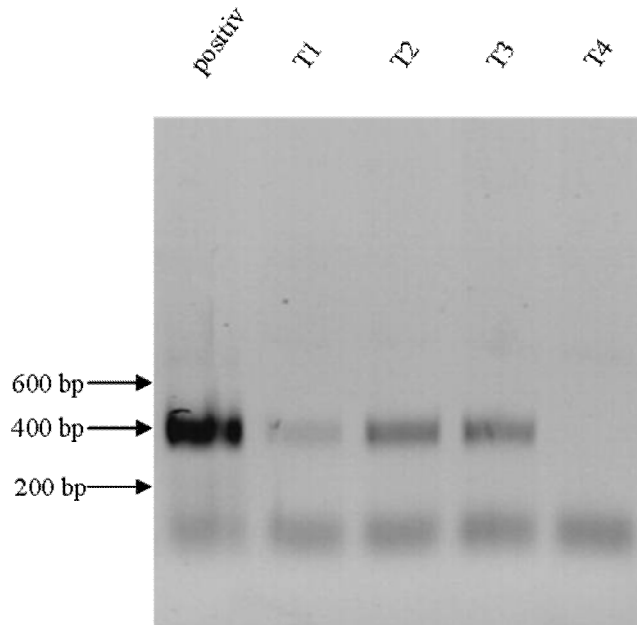


Abb. 3-23: Polymerase-Ketten-Reaktion zum Nachweis der Integration des Propeptids in das Genom. Die Reaktion wurde unter Standardbedingungen mit genspezifischen Primern durchgeführt. Beschreibung: positiv: Amplifikation der codierenden Sequenz des Propeptids aus pDonr/Zeo, T1-T4: Nachweis des Propeptids aus den transformierten Tabakpflanzen.

Obwohl die codierende Sequenz des Propeptids in das Genom von *Nicotiana tabacum* aufgenommen worden zu sein scheint, waren die transformierten Pflanzen nicht vor dem Befall von *Cuscuta* geschützt (Ergebnisse nicht gezeigt).

4. Diskussion

4.1. Expression einer Cysteinprotease während der Wirt-Parasit-Interaktion

Cuscuin wird ausschließlich während der Bildung von Haustorien exprimiert. Dies bestätigen die vorangegangenen Studien von Markus Albert. Die erste Barriere für eine erfolgreiche Interaktion des kompatiblen Wirts ist die Zellwand. Dadurch werden einige Fragen aufgeworfen: Ist die Expression der Protease von extrazellulären oder von intrazellulären Signalen abhängig? Warum beginnt die Transkription der Protease sofort nach der Anheftung, obwohl die Zellwand noch nicht durchdrungen ist?

Der gesamte Ablauf der Bildung der Haustorien ist letztendlich unabhängig vom Wirt und verläuft völlig autonom (Dawson *et al.*, 1994). Es konnte beobachtet werden, dass *Cuscuta* auch Haustorien bildet, wenn der Parasit um totes Material wie z. B. ein Kabel oder ein Pflanzstößchen gewickelt wird. Es wäre außergewöhnlich, dass alle Proteine zur Bildung der Haustorien exprimiert werden, jedoch dieses Enzym nicht. Wahrscheinlicher ist es, dass alle Enzyme in einem "Paket" exprimiert werden.

Cysteinproteasen haben zumeist ein breites Substratspektrum und dienen dazu, Speicherproteine zu mobilisieren und Proteine in den Lysosomen abzubauen (Ishii, 1994; Hara-Nishimura *et al.*, 1993). Cysteinproteasen werden von parasitierenden Organismen während der Infektion eines Wirts sekretiert, um Abwehrenzyme und Membranen des Wirts zu hydrolysieren (Sajid and McKerrow, 2002). Die Prozessierung der Proteine erfolgt autokatalytisch oder durch andere Proteasen (Rowan *et al.*, 1992; Mach *et al.*, 1994). Falls sich die Proteasen bei *Cuscuta reflexa* selbst aktivieren, ist es möglich, dass sie sich während der Expression im Parasiten im inaktiven Zustand befinden. Beim Eintritt in das Gewebe des Wirts werden sie dann durch einen veränderten pH-Wert aktiviert, möglicherweise beim Durchtritt durch den Apoplasten. Es konnte gezeigt werden, dass Cathepsin B aus Ratten durch andere Cathepsine prozessiert wird. Es ist denkbar, dass Cuscuin ebenso durch andere Proteasen aktiviert wird. Bei dem differentiellen Durchmustern der cDNA-Bank von *Cuscuta reflexa* (Albert, Dissertation, 2005), das zur Entdeckung des Enzyms geführt hatte, konnten jedoch keine Cysteinproteasen außer Cuscuin ermittelt werden. Auch Signale weiterer cDNAs von Peptidasen anderer Familien konnten nicht beobachtet werden.

4.2. *In silico* Untersuchungen zur Cysteinprotease

4.2.1. Vergleichende Analyse der Nucleotid- und Aminosäuresequenz der Protease

Die meisten intrazellulär wirkenden Cysteinproteasen besitzen kein Signalpeptid. Sie werden durch kovalent gebundenes Mannose-6-Phosphat von M6P-Rezeptoren im *Trans-Golgi-Netzwerk* erkannt und so in die Endosomen transportiert (Wiederanders *et al.*, 2003). Cysteinproteasen, die ihre Funktion außerhalb der Zelle haben, sind durch das Fehlen dieses Bindungsmotivs und durch das Vorhandensein einer Signalsequenz am N-Terminus gekennzeichnet. Sie werden über einen unbekanntem sekretorischen Weg aus der Zelle geschleust. Wie die Ergebnisse zeigen, besitzt auch diese Protease ein Signalpeptid zur Sekretion. Dies ist ein sicheres Zeichen dafür, dass dieses Enzym aus der Zelle geschleust wird, um extrazellulär tätig zu sein.

Das Propeptid hat eine Länge von 104 Aminosäuren und beinhaltet das bekannte ERFNIN-Motiv. Es weist keine weiteren Besonderheiten zu anderen Propeptiden der Cathepsin L Familie auf.

Das eigentliche Enzym besitzt die üblichen 5 Cysteinreste, von denen vier über Disulfidbrücken die Tertiärstruktur stabilisieren. Das fünfte Cystein bildet wie bei allen Cysteinproteasen aus Cystein zusammen mit Histidin und Asparagin die katalytische Triade. Da in der Primärstruktur das Cystein stromaufwärts des Histidins angesiedelt ist, wird das Enzym zum CA-Klan gezählt. Im Gegensatz hierzu ist im Klan CD das Histidin stromaufwärts des Cysteins angesiedelt (s. Kapitel 1.3). Dies spricht für die Hypothese, dass die Cysteinproteasen mehrfach konvergent entstanden sind (Sajid and McKerrow, 2002).

4.3. Expression und Isolation von Cuscuin

Das N-terminale His-tag konnte bei Cuscuin durch einen Immunoblot nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurde das Protein aus einem Gel eluiert. Danach wurde das SDS aus der Probe entfernt und Cuscuin aktiviert.

Durch korrekte Faltung ist es möglich, dass das His-tag sich innerhalb des Proteins befindet. Daher konnte eine Isolation auf nativem Wege nicht erzielt werden. Jedoch war sie auch auf denaturierendem Wege nicht erfolgreich. Allerdings war eindeutig eine Bande, die der Größe des Enzyms entsprach, im denaturierenden SDS-Gel zu erkennen. Möglicherweise ist ein Fehlen des His-tags durch die rigide Behandlung des Proteins zu erklären.

Des Weiteren sind die erzeugten Signale, die auf die Bindung des Antikörpers an das His-Tag zurückzuführen sind, nur sehr schwach. Möglicherweise ist dies ebenfalls ein Grund für das Ausbleiben einer Detektion.

Die Ausbeute von Enzymen ist bei der Elution aus dem Gel bei weitem nicht so hoch wie bei einer Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie. Es war aber genug Material vorhanden, um Studien zur Charakterisierung durchführen zu können. Das Propeptid wurde unter denaturierenden Bedingungen über eine Nickel-Chelat-Matrix isoliert und nach einer Dialyse verwendet.

4.4. Charakterisierung von Cuscuin

Die individuellen Parameter, die bestimmt wurden, sind charakteristisch für eine parasitäre Cysteinprotease. Diese Proteasen haben ein breiteres pH-Spektrum und ein physiologisches Temperaturoptimum (Sajid and McKerrow, 2002). Es konnte keine Aktivität in einem stark sauren Milieu nachgewiesen werden. Dies wirft die Frage auf, ob andere Enzyme bei der Aktivierung nötig sind. Für andere Proteasen konnte dies bestätigt werden. Deshalb scheint diese Möglichkeit nicht allzu unwahrscheinlich.

In den folgenden Absätzen wird oft der Vergleich zu der Protease Cruzipain gezogen, da dies eine sehr gut charakterisierte Protease aus dem Organismus *Trypanosoma cruzi* ist. Dieser Organismus gehört zu den geißeltragenden Protozoen, kommt im Darm vieler Warmblüter vor und ist Überträger der Chagas-Krankheit. Auch in diesem Organismus wird während des Angriffs eine Cysteinprotease (Cruzipain) exprimiert (Engel *et al.*, 1998; Scory *et al.*, 2007; Troeberg *et al.*, 1996). Diese Protease hat ähnliche Eigenschaften wie Cuscuin. Die biochemischen Daten des Enzyms stammen aus der Enzymdatenbank BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info>)

4.4.1. Messungen mit Cuscuin

FTC emittiert im pH-Bereich von 5,5 bis 6,0 nur wenig Photonen. Daher mussten verschiedene Messmethoden angewandt werden, um eine Aussage über die Aktivität der Protease bei verschiedenen pH-Werten treffen zu können. Bei einem pH-Wert von über 6 Einheiten wurde kontinuierlich gemessen. Dabei wurde das FTC-Casein zum Starten der Reaktion in die Messküvette gegeben.

Bei einem pH-Wert unter 6,0 wurde diskontinuierlich gemessen. Hier wurde zum Starten der Reaktion das Enzym appliziert. Die Geschwindigkeit konnte dabei nicht bestimmt werden. Es wurde lediglich ermittelt, ob eine Aktivität unter den gewählten Reaktionsparametern vorliegt. Bei kontinuierlichen Messungen wurde lediglich der Fluoreszenzanstieg nach 15 bis 18 Minuten zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit benutzt. Da diese Steigung auch über die nächsten 30 Minuten ohne Änderungen zu beobachten war, konnte davon ausgegangen werden, dass ein großer Überschuss an Substrat in der Messküvette vorhanden war. Die Bestimmung der Geschwindigkeit der Reaktion in diesem Zeitraum ist also zulässig.

4.4.2. Bestimmung der optimalen Reaktionsparameter

4.4.2.1. Bestimmung des optimalen pH-Wertes

Da unterhalb eines pH-Werts von 6 keine Aktivität festgestellt werden konnte, wurden alle Messungen mit der beschriebenen kontinuierlichen Methode vollführt. Die Aktivität der Protease ist ähnlich wie bei Cruzipain aus *Trypanosoma cruzi* (Sajid and McKerrow, 2002). Das pH-Optimum bei diesem Enzym liegt jedoch bei 8,0 und nicht bei 7,5. Auch bei einem pH-Wert von 4,5 ist die Protease noch minimal aktiv. Procathepsin L und B, die in den Lysosomen des Menschen aktiv sind, haben ein pH-Optimum von 6,0 und 4,5. Dieser Unterschied in den pH-Optima ist charakteristisch für extrazellulär agierende Cysteinproteasen im Vergleich zu Peptidasen aus Endosomen.

4.4.2.2. Bestimmung der Wechselzahl

Die Wechselzahl von Cuscuin beträgt 1,2207 Peptidbindungen/s für FTC-Casein, von Cruzipain beträgt sie 4,49 Peptidbindungen/s für Benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-aminomethylcoumarin. Dieses Substrat ist spezifisch für Cruzipain. Somit kann jede Peptidbindung während der Reaktion hydrolysiert werden. Das ist bei Casein nicht der Fall, da es sich dabei um ein komplexes Substrat handelt. Leider wurde für Cruzipain die Wechselzahl für Casein nie bestimmt, deshalb ist kein direkter Vergleich möglich. Es scheint aber so, dass Cuscuin unter optimalen Reaktionsbedingungen eine höhere Aktivität als Cruzipain aufweist, da die Aktivität für ein unspezifisches Edukt wie Casein nur rund 4mal unter der von Cruzipain in Verbindung mit einem spezifischen Substrat liegt. Papain hat eine Wechselzahl von 3340 Peptidbindungen/s für die Verbindung Benzoyl-thiocarbonsäure, für Cathepsin L beträgt

sie 50 Peptidbindungen/s für Benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-4-Methylcoumarin-7-amide. Papain scheint mit 3340 hydrolysierten Peptidbindungen pro Sekunde eine Sonderstellung einzunehmen. Aber wie es scheint sind Proteasen aus Parasiten bei weitem nicht so aktiv wie Proteasen anderer Organismen.

4.4.2.3. Bestimmung des K_m -Wertes nach Hanes-Woolf

Zum Vergleich wurden die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk und die Methode nach Hanes-Woolf angewandt. Es wurde festgestellt, dass sich Fehler bei der Methode nach Lineweaver-Burk bei sehr kleiner Substratkonzentration stärker auswirkten. Deshalb wurde das Hanes-Woolf-Diagramm zur Bestimmung des K_m -Wertes benutzt. Hierbei wirkten sich Ausreißer weniger stark auf das Ergebnis aus, da aufgrund einer unverfälschten Spreizung der Messpunkte entlang der [S]-Achse das Ergebnis durch einzelne Ausreißer prinzipiell weniger verfälscht wurde.

Bei dem gewählten Substrat FTC-Casein beträgt der K_m -Wert von Cuscuin unter optimalen Bedingungen 1,41 μM . Der K_m -Wert von Cruzipain beträgt beim gleichen Substrat nur 29 μM unter optimalen Bedingungen. Dieser Wert ist rund 20mal größer. Das beste Substrat von Cruzipain ist laut BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info>) 2-aminobenzoyl-LGMISLMKRPQ-N-(2,4-dinitrophenyl)ethylenediamine mit einem K_m -Wert von 0,065 μM . Dieser Wert ist im Vergleich zu Cuscuin 22mal niedriger. Das kann bedeuten, dass Cuscuin ein breiteres Substratspektrum als Cruzipain hat, oder dass die Peptidverbindung öfter in Casein vorkommt.

4.4.3. Bestimmung der K_i -Werte von Cuscuin und anderen Cysteinproteasen

4.4.3.1. Bestimmung des K_i -Wertes von Cuscuin

Die Affinität des Propeptids zu seinem verwandten Enzym ist sehr gut und konnte auch bei anderen Proteasen und ihren Propeptiden beobachtet werden (Fox *et al.*, 1992). Die K_i -Werte zu anderen pflanzlichen Proteasen nahm deutlich ab, was auch bei anderen Peptiden beobachtet werden konnte. Laut <http://www.brenda-enzymes.info> ist die Affinität zu anderen Proteasen selbst in der gleichen Familie um rund 100mal schlechter als zu ihren Enzymen. Hier macht das Propeptid von Cuscuin keine Ausnahme. Dies könnte bei der Anwendung des

Peptids als Pflanzenschutzmittel eine übergeordnete Rolle spielen, falls ein infiltriertes Feld von mehreren *Cuscuta*-Arten befallen worden ist.

4.5. Einsatz des Propeptids als Pflanzenschutzmittel

Beim Befall eines potentiellen Wirts werden mehrere lytische Enzyme exprimiert, wie zum Beispiel eine Pektinase, eine ATP-abhängige Protease und Cuscuin (Albert, 2005). Bei Sprühversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Haustorien mit dem Propeptid von Cuscuin eine erfolgreiche Infektion signifikant vermindert. Jedoch wurde auch beobachtet, dass eine Überexpression des Propeptids in Tabak eine Infektion nicht verhindert. Dies kann mehrere Gründe haben. Es könnte sein, dass das Cuscuin andere Angriffsenzyme durch proteolytische Spaltung aktiviert und nur sekundär am Angriff beteiligt ist. Jedoch spricht dagegen, dass Cuscuin ein sehr breites Substratspektrum hat und die Peptidbindungen unspezifisch hydrolysiert. Da der Apoplast der Pflanzen einen pH-Wert von circa 5,5 aufweist und hier keine Aktivität des Enzyms beobachtet werden konnte, ist der Wirkungsbereich im Apoplasten eher unwahrscheinlich. Zudem deutet alles darauf hin, dass die Protease sekretiert wird, da das Propeptid am N-Terminus ein Signal zur Sekretion ist.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die wichtigste Aufgabe von Cuscuin die Beseitigung der Abwehrenzyme des Wirts zu sein scheint. Die mit dem Propeptid transformierten Tabakpflanzen weisen keine erhöhte Resistenz gegen den Angriff von *Cuscuta reflexa* auf. Möglicherweise wird das Peptid nicht exprimiert, obwohl es in das Genom von *Nicotiana tabacum* integriert wurde.

Es konnte zudem beobachtet werden, dass nicht alle Haustorien, die sich an ein und demselben Parasiten befanden, den Wirt erfolgreich infiltrieren konnten. Das heißt, sie agieren "unabhängig" voneinander. Deshalb ist es notwendig, sie direkt mit dem Wirkstoff zu besprühen, um eine Infektion zu verhindern. Diese Tatsache wirft die Frage auf, ob das Propeptid in der Landwirtschaft als Pflanzenschutzmittel erfolgreich eingesetzt werden kann. Es ist in jedem Falle eine technische Herausforderung alle Haustorien eines Parasiten mit der Peptidlösung zu besprühen, da diese durch die Blätter oder auch den Spross des Wirts vor dem Kontakt mit dem Peptid geschützt sind. Eine weitere Schwierigkeit ist zudem das relativ kurze Zeitfenster von der Entwicklung eines Prähaustoriums zum Haustorium. Bei einer gesunden *Cuscuta*-Pflanze dauert dies manchmal nur einen Tag. Die Infektion kann bei regelmäßiger Anwendung (im Labor 2mal pro Tag) abgewendet werden. Ein Übergreifen des Parasiten auf andere Wirtspflanzen in der näheren Umgebung kann somit verhindert werden.

Sobald der ursprüngliche Wirt nicht mehr zur Verfügung steht, um Nährstoffe zu liefern und ein Überleben des Parasiten zu gewährleisten, kann einer Infektion Einhalt geboten werden. Besonders stark befallene Wirtspflanzen sollten zudem mechanisch per Hand entfernt werden. Aufgrund dieser Beobachtungen kann geschlussfolgert werden, dass eine Anwendung des Propeptids durchaus unterstützend bei der Bekämpfung von *Cuscuta* in der Landwirtschaft herangezogen werden kann. Jedoch bedarf es auch der Mithilfe der Landwirte, um die Felder von *Cuscuta* zu befreien. Da *Cuscuta spec.* zumeist in Ländern mit einer schwachen Infrastruktur ein landwirtschaftliches Problem darstellt, wäre die Möglichkeit, ein leicht herzustellendes, billiges und wirksames Pflanzenschutzmittel zu produzieren, eine große Chance.

Des Weiteren werden die Felder der Landwirte in diesen Regionen auch mit parasitierenden Pflanzen anderer Gattungen, wie zum Beispiel *Orobanch*e und *Striga*, in Mitleidenschaft gezogen. Hier müssen weitere Anstrengungen unternommen werden, um zu überprüfen, ob diese Parasiten einen ähnlichen Mechanismus zur Infiltration der kompatiblen Wirte benutzen. Unter Umständen kann das Propeptid auch hier zur Bekämpfung angewendet werden.

Ebenso lässt die Arbeit von Albert *et al.* (2004) auf eine Lösung des Problems hoffen. Hier wurde gezeigt, dass der inkompatible Wirt *Lycopersicon esculentum* während des Befalls von *Cuscuta* eine Xyloglucan Endotransglycosylase/Hydrolase exprimiert, das am Aufbau der Zellwand beteiligt ist. Dieses Enzym könnte direkt an der Abwehr des Parasiten beteiligt sein. Möglicherweise können kompatible Wirte, die das Enzym konstitutiv exprimieren, eine Resistenz gegen *Cuscuta* erlangen.

5. Zusammenfassung

Cuscuta reflexa ist ein Pflanzenparasit der ohne Blätter und Wurzeln auf den Sprossen anderer Pflanzen wächst. Mit Hilfe der sogenannten Haustorien dringt der Parasit in das Gewebe des Wirts ein und erlangt auf diese Weise Assimilate, Nährstoffe und Wasser. Da *Cuscuta spec.* ein breites Wirtsspektrum hat und viele ökonomisch bedeutsame Pflanzen dazu zählen, kann dies unter Umständen zu beträchtlichen Schäden in der Landwirtschaft führen. Auf Tomatenfeldern in Kalifornien kommt es durch den Befall von *C. pentagona* regelmäßig zu 50 – 75 % Ernteaussfällen.

Neben anderen lytischen Enzymen wird die pflanzliche Cysteinprotease (Cuscuin) während der Interaktion mit einem kompatiblen Wirt in den Haustorien exprimiert. Cuscuin wurde in *E. coli* exprimiert und isoliert. Zur Charakterisierung wurde FTC-Casein als Substrat verwendet. Die optimalen Reaktionsparameter wie Temperatur, pH-, K_m - und der K_i -Wert zeigen, dass Cuscuin viele Gemeinsamkeiten mit Cysteinproteasen anderen parasitierenden Organismen aufweist. Das Enzym ist in einem neutralen oder leicht alkalischen Milieu stabil und weist ein Temperaturoptimum von 30 °C auf. Der K_i zeigt eine bemerkenswerte Inhibition der Protease durch das Propeptid. Andere pflanzliche Cysteinproteasen werden durch das Peptid wesentlich schwächer gehemmt.

Die Tabakpflanze ist ein kompatibler Wirt für *Cuscuta reflexa* und wurde durch den Einsatz des Propeptids teilweise gegen den Angriff durch den Parasiten immunisiert. Das Peptid war identisch mit der Prosequenz von Cuscuin.

Cuscuin scheint eine Schlüsselrolle bei der Hydrolyse von Abwehrenzymen und/oder der Mobilisierung von Speicherproteinen des Wirts einzunehmen, nachdem die Zellwand durch andere lytische Enzyme abgebaut wurde.

6. Literaturverzeichnis

Albert,M., Belastegui-Macadam,X., and Kaldenhoff,R. (2006). An attack of the plant parasite *Cuscuta reflexa* induces the expression of attAGP, an attachment protein of the host tomato. *Plant J.* 48, 548-556.

Bennett,C. (1940). Acquisition and transmission of viruses by dodder (*Cuscuta subinclusa*). *Phytopathology* 30, 2-11.

Betts,R., Weinsheimer,S., Blouse,G.E., and Anagli,J. (2003). Structural determinants of the calpain inhibitory activity of calpastatin peptide B27-WT. *Journal of Biological Chemistry* 278, 7800-7809.

Birschwilks,M., Haupt,S., Hofius,D., and Neumann,S. (2006). Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta* sp. *J. Exp. Bot.* 57, 911-921.

Coulombe,R., Grochulski,P., Sivaraman,J., Menard,R., Mort,J.S., and Cygler,M. (1996a). Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J.* 15, 5492-5503.

Coulombe,R., Grochulski,P., Sivaraman,J., Menard,R., Mort,J.S., and Cygler,M. (1996b). Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J.* 15, 5492-5503.

Coulombe,R., Li,Y., Takebe,S., Menard,R., Mason,P., Mort,J.S., and Cygler,M. (1996c). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human procathepsin L. *Proteins* 25, 398-400.

Cygler,M., Sivaraman,J., Grochulski,P., Coulombe,R., Storer,A.C., and Mort,J.S. (1996). Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure.* 4, 405-416.

Dawson,J.H., Musselman,L.J., Wolswinkel,P., and Dörr,I. (1994). Biology and control of *Cuscuta*. *Rev. Weed. Sci.* 6, 265-317.

Dixon,M. (1953). The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochemical Journal* 55, 170-171.

- Dorr,I. (1997). Contact of Cuscuta-Hyphae with Sieve Tubes of Its Host Plants. *Protoplasma* 75, 167.
- Engel,J.C., Doyle,P.S., Hsieh,I., and McKerrow,J.H. (1998). Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp Med.* 188, 725-734.
- Fox,T., de,M.E., Mort,J.S., and Storer,A.C. (1992). Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* 31, 12571-12576.
- Groves,M.R., Taylor,M.A., Scott,M., Cummings,N.J., Pickersgill,R.W., and Jenkins,J.A. (1996). The prosequence of procaricain forms an alpha-helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure* 4, 1193-1203.
- Hara-Nishimura,I., Takeuchi,Y., and Nishimura,M. (1993). Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Plant Cell* 5, 1651-1659.
- Heidejorgensen,H.S. (1991). Cuticle Development and Ultrastructure - Evidence for A Procuticle of High Osmium Affinity. *Planta* 183, 511-519.
- Henderson,L.E., Oroszlan,S., and Konigsberg,W. (1979). Micromethod for Complete Removal of Dodecyl-Sulfate from Proteins by Ion-Pair Extraction. *Analytical Biochemistry* 93, 153-157.
- Hibberd,J.M., Bungard,R.A., Press,M.C., Jeschke,W.D., Scholes,J.D., and Quick,W.P. (1998). Localization of photosynthetic metabolism in the parasitic angiosperm *Cuscuta reflexa*. *Planta* 205, 506-513.
- Horsch,R.B., Fry,J.E., Hoffmann,N.L., Eichholtz,D., Rogers,S.G., and Fraley,R.T. (1985). A Simple and General-Method for Transferring Genes Into Plants. *Science* 227, 1229-1231.
- Ishii,S. (1994). Legumain: asparaginyl endopeptidase. *Methods Enzymol.* 244, 604-615.
- Jeschke,W.D., Baumel,P., Rath,N., Czygan,F.C., and Proksch,P. (1994a). Modeling of the Flows and Partitioning of Carbon and Nitrogen in the Holoparasite *Cuscuta-Reflexa* Roxb and Its Host *Lupinus-Albus* L. 2. Flows Between Host and Parasite and Within the Parasitized Host. *Journal of Experimental Botany* 801-812.

- Jeschke, W.D., Rath, N., Baumel, P., Czygan, F.C., and Proksch, P. (1994b). Modeling the Flow and Partitioning of Carbon and Nitrogen in the Holoparasite *Cuscuta-Reflexa* Roxb and Its Host *Lupinus-Albus* L. 1. Methods for Estimating Net Flows. *Journal of Experimental Botany* 45, 791-800.
- Karrer, K.M., Peiffer, S.L., and DiTomas, M.E. (1993). Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 3063-3067.
- Landy, A. (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda-Site-Specific Recombination. *Annual Review of Biochemistry* 58, 913-949.
- Mach, L., Mort, J.S., and Glossl, J. (1994). Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J. Biol. Chem.* 269, 13030-13035.
- Macleod, D. (1961). Photosynthesis in *Cuscuta*. *Experientia* 17, 542-545.
- Mahmoudzadeh-Niknam, H. and McKerrow, J.H. (2004). *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Exp Parasitol.* 106, 158-163.
- Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S., and Takeuchi, T. (2005). *Entamoeba invadens*: cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development. *Exp Parasitol.* 109, 27-32.
- Maubach, G., Schilling, K., Rommerskirch, W., Wenz, I., Schultz, J.E., Weber, E., and Wiederanders, B. (1997). The inhibition of cathepsin S by its propeptide--specificity and mechanism of action. *Eur. J. Biochem.* 250, 745-750.
- Michaud, D., Nguyen-Quoc, B., and Yelle, S. (1993). Selective inhibition of Colorado potato beetle cathepsin H by oryzacystatins I and II. *FEBS Lett.* 331, 173-176.
- Moncada, D., Keller, K., Ankri, S., Mirelman, D., and Chadee, K. (2006). Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. *Gastroenterology* 130, 721-730.
- Nomura, T. and Katanuma, N. (2005). Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *J. Med. Invest* 52, 1-9.
- Reis, F.C.G., Costa, T.F.R., Sulea, T., Mezzetti, A., Scharfstein, J., Brömme, D., Menard, R., and Lima, A.P.C.A. (2006). The propeptide of cruzipain a potent selective inhibitor of the

trypanosomal enzymes cruzipain and brucipain, and of the human enzyme cathepsin F. *FEBS Journal* 274, 1224-1234.

Revell,D.F., Cummings,N.J., Baker,K.C., Collins,M.E., Taylor,M.A., Sumner,I.G., Pickersgill,R.W., Connerton,I.F., and Goodenough,P.W. (1993). Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of cDNAs encoding papaya proteinase omega from *Carica papaya*. *Gene* 127, 221-225.

Roney,J.K., Khatibi,P.A., and Westwood,J.H. (2007). Cross-species translocation of mRNA from host plants into the parasitic plant dodder. *Plant Physiol* 143, 1037-1043.

Ross,U.P. and Aldrich,H.C. (1988). Intracellular-Localization and Morphology of Rhabdovirus-Like Particles in Dodder (*Cuscuta Sp*). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 66, 2499-2504.

Rowan,A.D., Mason,P., Mach,L., and Mort,J.S. (1992). Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J. Biol. Chem.* 267, 15993-15999.

Sajid,M. and McKerrow,J.H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 1-21.

Schlereth,A., Standhardt,D., Mock,H.P., and Muntz,K. (2001). Stored cysteineproteinases start globulin breakdown in protein bodies of embryonic axis and cotyledons of germinating vetch (*Vicia sativa L.*) seeds. *Planta* 212, 718-727.

Schmelzer,K. (1955). Die Übertragbarkeit des Tabakmauche-Virus Durch *Cuscuta*-Arten. *Naturwissenschaften* 42, 19.

Schulz,A. (1987). Sieve-Element Differentiation and Fluorescein Translocation in Wound-Phloem of Pea Roots After Complete Severance of the Stele. *Planta* 170, 289-299.

Scory,S., Stierhof,Y.D., Caffrey,C.R., and Steverding,D. (2007). The cysteine proteinase inhibitor Z-Phe-Ala-CHN2 alters cell morphology and cell division activity of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in vivo. *Kinetoplastid. Biol. Dis.* 6, 2.

Tobbell,D.A., Middleton,B.J., Raines,S., Needham,M.R.C., Taylor,I.W.F., Beveridge,J.Y., and Abbott,W.M. (2002). Identification of in vitro folding conditions for procathepsin S and cathepsin S using fractional factorial screens. *Protein Expression and Purification* 24, 242-254.

- Troeberg,L., Pike,R.N., Morty,R.E., Berry,R.K., Coetzer,T.H., and Lonsdale-Eccles,J.D. (1996). Proteases from *Trypanosoma brucei brucei*. Purification, characterisation and interactions with host regulatory molecules. *Eur. J. Biochem.* 238, 728-736.
- Turk,D., Podobnik,M., Kuhelj,R., Dolinar,M., and Turk,V. (1996). Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.* 384, 211-214.
- Turk,D., Podobnik,M., Popovic,T., Katunuma,N., Bode,W., Huber,R., and Turk,V. (1995). Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-A resolution: A basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors. *Biochemistry* 34, 4791-4797.
- Twining,S.S. (1984). Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Casein Assay for Proteolytic-Enzymes. *Analytical Biochemistry* 143, 30-34.
- varez-Alfageme,F., Martinez,M., Pascual-Ruiz,S., Castanera,P., Diaz,I., and Ortego,F. (2007). Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. *Transgenic Res.* 16, 1-13.
- Vaughn,K.C. (2002). Attachment of the parasitic weed dodder to the host. *Protoplasma* 219, 227-237.
- Vaughn,K.C. (2003). Dodder hyphae invade the host: a structural and immunocytochemical characterization. *Protoplasma* 220, 189-200.
- Visal,S., Taylor,M.A., and Michaud,D. (1998). The proregion of papaya proteinase IV inhibits Colorado potato beetle digestive cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 434, 401-405.
- Wiederanders,B., Kaulmann,G., and Schilling,K. (2003). Functions of propeptide parts in cysteine proteases. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 309-326.
- Wolswinkel,P. (1974). Enhanced Rate of C-14-Solute Release to Free Space by Phloem of *Vicia-Faba* Stems Parasitized by *Cuscuta*. *Acta Botanica Neerlandica* 23, 177-188.
- Zitierte Dissertation:
- Albert, M. (2005). Studien zur Interaktion des pflanzlichen Parasiten *Cuscuta reflexa* mit dem inkompatiblen Wirt *Lycopersicon esculentum*. Dissertation

7. Anhang

7.1. Liste der Abkürzungen

cDNA	Copy-DNA
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FTC	Fluorescein Isothiocarbamoyl
GFP	Grün-fluoreszierendes-Protein
LB	Luria-Bertani
mGFP6	Mutated GFP6
MS	Murashige & Skoge
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat

7.2. cDNA Sequenz von Cuscuin

GATGCTCAACAATAACAACAATGGCACTCCGTTTATCTCTCATGTTCTTACTATGCTCCTTCC
 TCCTAGTGACAACGTCTTTGGGGCTCGCCGACGGCAGTAGCAGCGACGACATTCTGATCCGTC
 AAGTTGTCGGAGACGACGGCGCACTGCTGAGCGACGACCACCAATTCACAGTTTTCAAGAAGC
 GGTTCGGAAAGGCGTACGCCTCGGAGGAGGAGCACGATTACAGGTTCTCTGTGTTCAAGGCTA
 ACATGCGCCTTGCAAAGCAACACCAACAGCTCGACCCCTCCGCCGTCCACGGTGTCACTCGCT
 TCTCCGATTTGACCCCATCCGAATTCAAACGCAACTTTCTCGGATTGAATCGCCGGCTTAGGT
 TTCCAGCCGATGCTCAAACAGCTCCCACCCTTCCCACCGACGATCTCCCGTCAGATTTGATT
 GGAGAGACCATGGTGCCGTTACGGCAGTAAAGAATCAGGGTTCCTGCGGGTCGTGCTGGTCAT
 TCAGTACCACTGGAGCATTGGAAGGAGCCAATTTCTCGCCACTGGGAAGCTCGTGAGCCTTA
 GTGAGCAACAGCTTGTGGATTGTGATCACGAGTGTGACCCTGAAGAAGCTGGTTCTTGTGATT
 CTGGCTGCAATGGCGGGCTCATGACCAGCGCCTTTGAATACACATTGAAAGCTGGCGGGCTAA
 TGAGGGGAAGAAGACTACCCTTACACAGGCAACGATGCTCAAGTCTGCAACTTTGACAAAACCA
 AGATTGCAGCCAAGGTTGCCAACTTCAGCGTGGTATCCCTCGACGAAGACCAAATCGCTGCAA
 ATCTGGTCAAGAACGGCCCTCTTGCAGTGGCAATCAACGCAGTGTTCATGCAGACATACGCAG
 GGGGAGTTTCATGCCCATACATTTGCTCCAAGCGGTTGGACCATGGCGTCCTGCTGGTGGGTT
 ATGGTTCAGCAGGCTATGCCCCTGTTGCGGGCGAAAGAGAAGCCTTATTGGGTCATCAAGAACT
 CTTGGGGAGAGCAATGGGGGGAGAAGGGGTAACAAGATATGCAGGGGAAGCAATGTGTGTG
 GAGTGGACTCCATGGTTTCAACTGTTGCAGCTGTTAGCACCAACTCGGAGTAGCAGCAGCAAA
 GAAAGTAGCTTTTGTACATAAGTTTTTTTTTTCGCTGTGATGTCCTGGGGAGCCATAACACAAT
 ACAGCATCACATTATGCAAGTGTGTGATTCACTATTATTTATTAAATCTATTTCTCAATTTG
 GTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Abb. 7-1: Sequenz der cDNA die der Cuscuin-RNA entspricht. Das Start-ATG des offenen Leserasters, sowie das Stop Codon TAG sind fett geschrieben und unterstrichen.

7.3. Verwendete Primer

507	Cys-prepro-for	5` GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGAT AGAACCATGCTCCCGTCAGATTTTCGATTGG 3`
514	Cys-pro-for	5` GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGAT AGAACCATGATTCTGATCCGTCAAGTTGTCCG 3`
515	Cys-prepro-rev	5` GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATCGTCGGTGG GAAGGGTGG 3`
452	Cysgate-rev	5` GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTCCGAGTTGG TGCTAACAGCTG 3`
732	Cys-Prefor-Gate	5` GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGCACTCC GTTTATCTCTCATGTT 3`

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

7.4. Verwendete Plasmide

7.4.1. Plasmide zur Proteinexpression

7.4.1.1. Der Zugangsvektor pDONRTM201

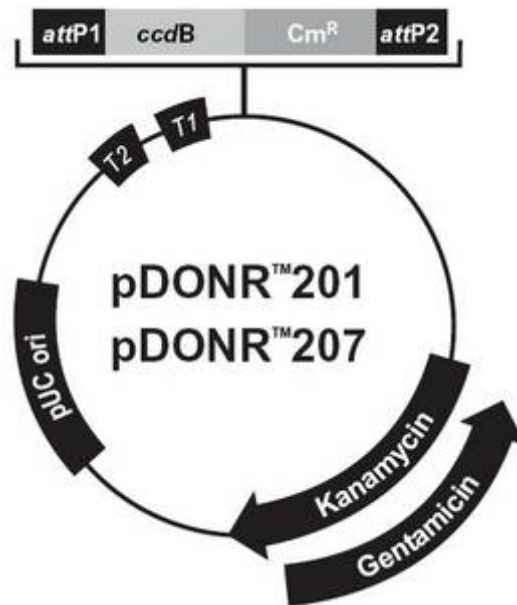


Abb. 7-2: Der Zugangsvektor pDONRTM201 der Firma InvitrogenTM (www.invitrogen.com).

7.4.1.2. Der Expressionsvektor pET-DEST42TM

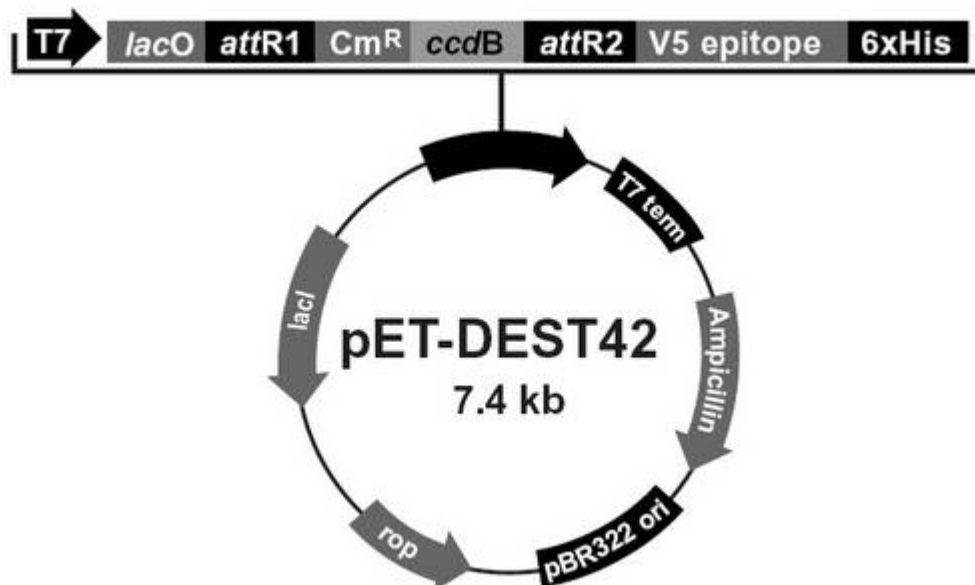


Abb. 7-3: Der Expressionsvektor pET-DEST42TM der Firma InvitrogenTM (www.invitrogen.com).

7.4.2. Plasmide zur Pflanzentransformation

7.4.2.1. Der Zugangsvektor pDONRTM/Zeo

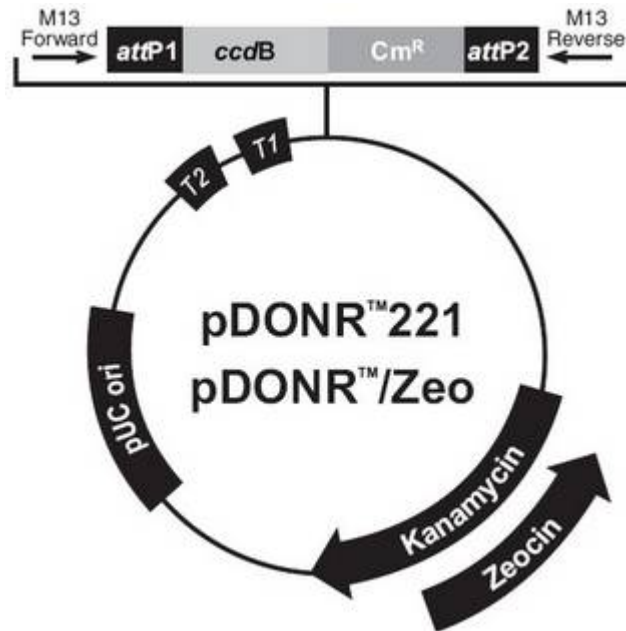


Abb. 7-4: Der Zugangsvektor pDONRTM/ZEO der Firma InvitrogenTM (www.invitrogen.com)

7.4.2.2. Der Expressionsvektor pMDC32

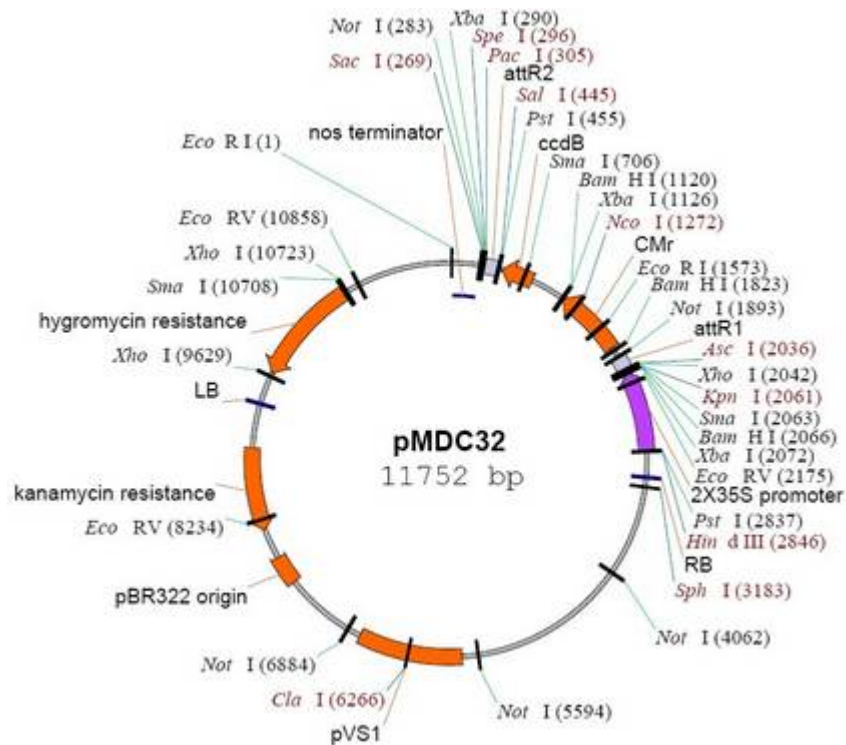


Abb. 7-5: Der Expressionsvektor pMDC32 erworben von ABRC (<http://www.arabidopsis.org/abrc/>)

7.4.2.3. Der Expressionsvektor pMDC83

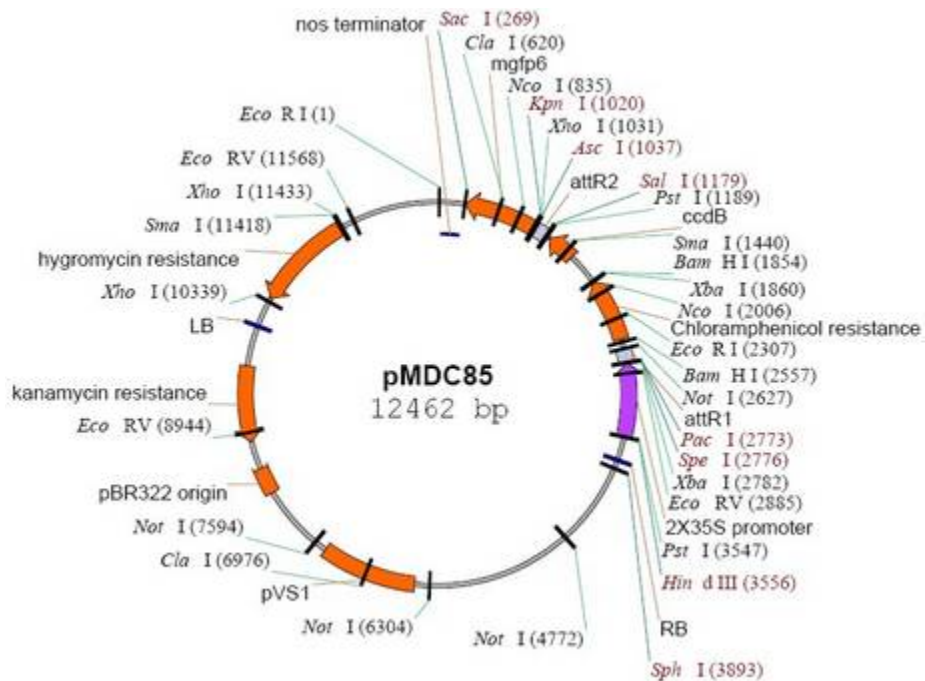


Abb. 7-6: Der Expressionsvektor pMDC85 erworben von ABRC (<http://www.arabidopsis.org/abrc/>)

Publikationen

Markus Albert, Xana M. Belastegui-Macadam, Marc Bleischwitz and Ralf Kaldenhoff (2008).
Cuscuta spp: "Parasitic Plants in the Spotlight of Plant Physiology, Economy and Ecology".
Progress in Botany 69, 267-277

Posterpräsentationen

Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", Dabringhausen, 2005. Assault proteins from the
plant parasite *Cuscuta reflexa*, a molecular approach towards plant-plant interaction

Tagung "Regionale wissenschaftliche Konferenz Pflanzenbiotechnologie", Wien, 2006.
Assault proteins from the plant parasite *Cuscuta reflexa*, a molecular approach towards plant-
plant interaction

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Marc Bleischwitz
Geburtsdatum: 18.11.1975
Geburtsort: Bremerhaven
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982 – 1986 Grundschule Bremerhaven
1986 – 1993 Realschule Bremerhaven
1993 – 1995 Höhere Handelsschule
1996 – 1998 Abendgymnasium Bremerhaven

Hochschulstudium

1998 – 2003 Studium der Biologie mit Hauptfach "Botanik" an der Universität Bremen
2003 – 2004 Diplomarbeit mit dem Thema: "Regulation des Photosystem II"

Promotion

2005 – 2008 Promotionsstudium bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff im Institut für angewandte Pflanzenwissenschaften
April 2008 Abschluss der Promotion

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Darmstadt, März 2008

.....